

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HERBİSİT BİLEŞİK PENDİMETALİNİN OLASI
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Ecz.Nazlı YILMAZ

**Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEK LİSANS**

ANKARA

2011

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HERBİSİT BİLEŞİK PENDİMETALİNİN OLASI
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Ecz.Nazlı YILMAZ

Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEK LİSANS

TEZ DANIŞMANI
Doç.Dr. Ülkü ÜNDEĞER

ANKARA
2011

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne:

Bu çalışma jürimiz tarafından Farmasötik Toksikoloji Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Nurşen BAŞARAN
Hacettepe Üniversitesi



Danışman: Doç. Dr. Ülkü ÜNDEĞER
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Gönül ŞAHİN
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Yalçın DUYDU
Ankara Üniversitesi



Üye: Doç. Dr. Aylin Gürbay
Hacettepe Üniversitesi



ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Hakan Sedat ORER
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın tüm aşamasında bilgi ve emeğini esirgemeyen, bana yol gösteren ve beni her zaman destekleyen değerli danışman hocam Doç. Dr. Ülkü ÜNDEĞER'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarında bilgi ve yardımlarından dolayı Dr. Ecz. Sevtap AYDIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarıma ve tüm arkadaşlarıma desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Her şekilde bana destek olan sevgili aileme kalbimle sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Yılmaz, N. Herbisit bileşik pendimetalinin olası genotoksik etkilerinin incelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2011. Pendimetalin (N-(1-etilpropil)-3,4-dimetil-2,6-dinitro-benzenamin) dinitroanilin yapısında, seçici herbisit bileşiktir. Hücre bölünmesini ve devamlılığını inhibe eder. Bitkilerin topraktan çıkmalarını takiben filizlenme aşamasından hemen sonra kısa sürede ölmelerine neden olur. Çeşitli formülasyonlarının yaygın tarımsal kullanımı nedeniyle toprak, yeraltı ve yeryüzü sularında ve havada kirletici olarak bulunmaktadır. Pendimetalin ülkemizde üretilmekte ve ithal edilmektedir. Ülkemizde ve dünyada tarım alanlarında yaygın kullanımı vardır. Pendimetalin, Çevre Koruma Birimi (*Environmental Protection Agency, EPA*) toksisite sınıflandırmasında toksisite sınıfı III'de yer alan az toksik bir bileşiktir. Çevre Koruma Birimi'nin karsinojenite sınıflandırmasında grup C (insanda muhtemel karsinojenler) sınıfına dahil edilen bir bileşiktir ancak genotoksik etkileriyle ilgili sınırlı bilgi bulunmaktadır. Çalışmamız kapsamında, çeşitli konsantrasyonlarda pendimetalinin olası genotoksik etkileri, insan lenfosit ve Çin hamsteri over hücrelerinde *in vitro* tek hücre jel elektroforez (comet) yöntemiyle incelendi. Hücreler, 1, 10, 100, 1000 ve 10000 µM konsantrasyonlarda pendimetalin ile 0.5 saat 37°C'de inkübe edildi ve DNA hasarı pendimetalin uygulanmayan, aynı vericiden alınan lenfositler ve CHO hücreleri ile kıyaslandı. Pozitif kontrol olarak, 50 µM hidrojen peroksit kullanıldı. Çalışılan konsantrasyon aralığında önemli hücre toksisitesi gözlenmedi. Pendimetalin 10, 100 ve 1000 µM konsantrasyonlarda insan lenfositlerinde DNA hasarını önemli biçimde artırdı. Ayrıca, CHO hücrelerinde DNA hasarı 1, 100, 1000 ve 10000 µM konsantrasyonlar ile önemli biçimde artarken 10 µM pendimetalin DNA hasarını önemli şekilde azalttı.

Anahtar Kelimeler: Pendimetalin, genotoksisite, tek hücre jel elektroforez yöntemi, Çin hamster over hücreleri, lenfositler.

ABSTRACT

Yılmaz, N. Research on genotoxic effects of herbicide pendimethaline. Hacettepe University Health Sciences Institute Master Thesis in Pharmaceutical Toxicology, Ankara, 2011. Pendimethaline (N-(1-ethylpropyl)-3,4-dimethyl-2,6-dinitrobenzeneamine) is a dinitroaniline herbicide which selectively controls weeds. It is a cell division and growth inhibitor. It descends plants in a short time after seedling. Pendimethaline which is a soil and water contaminant, causes wide agricultural usage of its formulations. Pendimethaline is manufactured and imported in Turkey. It has a wide usage in Turkey and around the world. Pendimethaline is a slightly toxic compound in Environmental Protection Agency (EPA) toxicity class III. Its classified group C (human possible carcinogen) by the EPA but it has scanty knowledge about its genotoxic effects. In this study, we investigated in vitro genotoxic effects of different concentrations of pendimethaline on human peripheral lymphocytes and Chinese hamster over (CHO) cells by the single cell gel electrophoresis (comet) assay. The cells were incubated with 1, 10, 100, 1000 and 10000 μM concentrations of the pendimethaline for 0.5 h at 37°C and DNA damage was compared with that obtained in lymphocytes from the same donor and CHO cells not treated with pendimethaline. Hydrogen peroxide, 50 μM , was used as a positive control. Within the concentration ranges studied, no significant cytotoxic effects were observed. Pendimethaline at 10, 100 and 1000 μM concentrations significantly increased DNA damage in human lymphocytes. Furthermore, DNA damage in CHO cells, were significantly increased at concentrations of 1, 100, 1000 and 10000 μM whereas at 10 μM pendimethaline decreased DNA damage significantly.

Key Words: Pendimethaline, genotoxicity, single cell gel electrophoresis assay, Chinese hamster over cells, lymphocytes.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Herbisitlerin Tanımı ve Sınıflandırılması	3
2.1.1. Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırma	4
2.1.2. Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırma	5
2.2. Herbisitlerin Genel Özellikleri	7
2.2.1. Formülasyonları	7
2.2.1.1. Sprey/Sıvı Formülasyonlar	8
2.2.1.2. Kuru Formülasyonlar	9
2.2.1.3. Tuz ya da Esterler	9
2.2.1.4. Adjuvanlar	10
2.2.2. Dağılımları	10

2.2.2.1.	Parçalanmaları	10
2.2.2.1.1.	Işıkla Parçalanmaları	10
2.2.2.1.2.	Mikroorganizmalar İle Parçalanmaları	11
2.2.2.1.3.	Kimyasal Parçalanmaları	11
2.2.2.2.	Hareketsizleşmeleri/Adsorbsiyonları	11
2.2.2.3.	Hareketleri/Uçuculukları	12
2.2.2.4.	Havada Dağılışı	13
2.2.2.5.	Toprak ve Suda Dağılışı	13
2.2.2.6.	Besinlerde Dağılışı	14
2.2.3.	Biyolojik Yazgısı	14
2.2.3.1.	Absorbsiyonu	14
2.2.3.2.	Dağılımı	15
2.2.3.3.	Metabolizması	15
2.2.3.4.	Atılımı	15
2.2.4.	Maruziyetin Saptanması	15
2.2.5.	Toksik Etkileri	16
2.2.5.1	Çevreye Toksik Etkileri	16
2.2.5.1.1.	Kuşlara ve Memelilere Toksik Etkileri	16
2.2.5.1.2.	Su Canlılarına Toksik Etkileri	16
2.2.5.1.3.	Toprak Canlılarına Toksik Etkileri	17
2.2.5.2.	İnsana Toksik Etkileri	17
2.2.6.	Zehirlenme Tedavisi	19
2.2.7.	Pendimetalin	20

2.2.7.1.	Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	20
2.2.7.2.	Dağılışı	21
2.2.7.3.	Biyolojik Yazgısı	21
2.2.7.4.	Toksik Etkileri	22
2.3.	Herbisitlerin Genotoksik Etkileri	23
2.3.1.	Herbisitlerin Mutajenite Testleriyle Gözlenen Etkileri	23
2.3.1.1.	Herbisitlerin Gen Mutasyon Testleriyle Gözlenen Mutajenik Etkileri	23
2.3.1.2.	Herbisitlerin Sitogenetik Testlerle Gözlenen Mutajenik Etkileri	23
2.3.1.3.	Herbisitlerin Diğer Mutajenite Testleriyle Gözlenen Etkileri	25
2.3.2.	Herbisitlere Çevresel ya da Mesleki Olarak Temas Eden Bireylerde Gözlenen Genotoksik Etkiler	25
2.4.	Tek Hücre Jel Elektroforez “COMET” Yöntemi	26
3.	GEREÇ ve YÖNTEM	28
3.1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	28
3.2.	Kullanılan Kültür Hücresi	29
3.3.	Kullanılan Araç ve Gereçler	29
3.4.	Kullanılan Çözeltiler	31
3.4.1	Tek Hücre Jel Elektroforez “COMET” Yöntemiyle DNA Hasarının Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	31
3.5.	Lenfosit Örneklerine Pendimetalin Uygulaması Sonucu Tek Hücre Jel Elektroforez “COMET” Yöntemiyle DNA Hasarının Belirlenmesi	34

3.6.	Lenfosit Örneklerine Pendimetalin ve H ₂ O ₂ Uygulanması Sonucu Oksidatif DNA Hasarına Duyarlılığın Belirlenmesi	36
3.7.	Lenfosit Örneklerine Pendimetalin, H ₂ O ₂ ve Fpg Enzim Çözeltisi Uygulanarak Gruplardaki Oksidatif DNA Hasar ve Onarımlarının Değerlendirilmesi	37
3.8.	CHO Hücrelerine Pendimetalin Uygulanması Sonucu Tek Hücre Jel Elektroforez “COMET” Yöntemiyle DNA Hasarının Belirlenmesi	37
3.9.	CHO Hücrelerine Pendimetalin ve H ₂ O ₂ Uygulanması Sonucu Oksidatif DNA Hasarına Duyarlılığın Belirlenmesi	39
3.10.	CHO Hücrelerinde H ₂ O ₂ ve Fpg Enzim Çözeltisi Uygulanarak Gruplardaki Oksidatif DNA Hasar ve Onarımlarının Değerlendirilmesi	40
3.11.	İstatistiksel Yöntemler	41
4.	BULGULAR	42
4.1.	Lenfosit Örneklerinde Tek Hücre Jel Elektroforez “COMET” Yöntemiyle DNA Hasarının Belirlenmesi	42
4.1.1.	Lenfosit Örneklerinde Pendimetalinin DNA Hasarına İlişkin Bulgular	42
4.1.2.	Lenfosit Örneklerinde Pendimetalin, H ₂ O ₂ ve Fpg Enzim Çözeltisi Uygulanarak Gruplardaki Oksidatif DNA Hasar ve Onarımlarına İlişkin Bulgular	47
4.2.	CHO Hücrelerinde Tek Hücre Jel Elektroforez “COMET” Yöntemiyle DNA Hasarının Belirlenmesi	53
4.2.1.	CHO Hücrelerinde Pendimetalinin DNA Hasarına İlişkin Bulgular	53

4.2.2.	CHO Hücresinde Pendimetalin, H ₂ O ₂ ve Fpg Enzim Çözeltisi Uygulanarak Graplardaki Oksidatif DNA Hasar ve Onarımlarına İlişkin Bulgular	58
5.	TARTIŞMA	64
	KAYNAKLAR	72
	ÖZGEÇMİŞ	83

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CHO hücresi	Çin hamster over hücresi
CH₂O	Formaldehit
CO	Karbonmonoksit
CO₂	Karbondioksit
COMET	Tek hücre jel elektroforez
dk.	Dakika
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DT₅₀	Herbisitin toprağa uygulanmasının ardından, uygulanan dozun yarıya düşmesi için geçen süre (<i>dissipate time</i>)
EtBr	Etidiyum Bromür
FCS	Sığır serum albumin
Fpg	Formamido pirimidin glikozilaz
HCl	Hidroklorik asit
H₂ O₂	Hidrojen peroksit
H₂	Hidrojen
H₂O	Su
K-SDS	Potasyum-sodyum dodesil sulfat
LC₅₀	Belli bir sürede popülasyonun % 50'sinde ölüm meydana getiren konsantrasyon
LD₅₀	Belli bir sürede popülasyonun % 50'sinde ölüm meydana getiren doz
LMPA	Düşük erime noktalı agar
LogP_{ow}	Oktanol/su dağılma katsayısı
MEEO	Orta erime noktalı agar

MN	Mikroçekirdek (<i>micronucleus</i>)
Na	Sodyum
NaCl	Sodyum klorür
Na₂EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit, disodyum tuzu
NaHCO₃	Sodyum bikarbonat
NaOH	Sodyum hidroksit
NMPA	Normal erime noktalı agar
NOAEL	Yan etki gözlenmeyen doz (<i>No observed adverse effect level</i>)
PBS	Fosfat tamponlu serum fizyolojik
PM	Pendimetalin
ppm	Milyonda bir kısım (mg/L) (<i>Parts per million</i>)
SCE	Kardeş kromatid değişimi (<i>Sister chromatid exchange</i>)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Pendimetalin'in kimyasal yapısı	20
4.1. Pendimetalin'in (PM) lenfositlerde kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğu yönünden değerlendirilen DNA hasarına ilişkin bulgular	44
4.2. Pendimetalin'in (PM) lenfositlerde kuyruk momenti ve kuyruk göçü yönünden değerlendirilen DNA hasarına ilişkin bulgular	45
4.3. Lenfositlerde Pendimetalin (PM), H ₂ O ₂ ve Fpg enzim çözeltisi uygulanarak gruplardaki kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğu yönünden değerlendirilen oksidatif DNA hasar ve onarımlarına ilişkin bulgular	50
4.4. Lenfositlerde Pendimetalin (PM), H ₂ O ₂ ve Fpg enzim çözeltisi uygulanarak gruplardaki kuyruk momenti ve kuyruk göçü yönünden değerlendirilen oksidatif DNA hasar ve onarımlarına ilişkin bulgular	51
4.5. CHO hücrelerinde Pendimetalin'in (PM) kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğu yönünden değerlendirilen DNA hasarına ilişkin bulgular	55
4.6. CHO hücrelerinde Pendimetalin'in (PM) kuyruk momenti ve kuyruk göçü yönünden değerlendirilen DNA hasarına ilişkin bulgular	56
4.7. CHO hücrelerinde Pendimetalin (PM), H ₂ O ₂ ve Fpg enzim çözeltisi uygulanarak gruplardaki kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğu yönünden değerlendirilen oksidatif DNA hasar ve onarımlarına ilişkin bulgular	61
4.8. CHO hücrelerinde Pendimetalin (PM), H ₂ O ₂ ve Fpg enzim çözeltisi uygulanarak gruplardaki kuyruk momenti ve kuyruk göçü yönünden değerlendirilen oksidatif DNA hasar ve onarımlarına ilişkin bulgular	62

TABLolar

Tablo		Sayfa
4.1.	Pendimetalin'in (PM) lenfositlerde DNA hasarına ilişkin bulgular	43
4.2.	Lenfositlerde Pendimetalin (PM), H ₂ O ₂ ve Fpg enzim çözeltisi uygulanarak gruptaki kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğu yönünden değerlendirilen oksidatif DNA hasar ve onarımlarına ilişkin bulgular	48
4.3.	Lenfositlerde Pendimetalin (PM), H ₂ O ₂ ve Fpg enzim çözeltisi uygulanarak gruptaki kuyruk momenti ve kuyruk göçü yönünden değerlendirilen oksidatif DNA hasar ve onarımlarına ilişkin bulgular	49
4.4.	CHO hücrelerinde Pendimetalin'in (PM) DNA hasarına ilişkin bulgular	54
4.5.	CHO hücrelerinde Pendimetalin (PM), H ₂ O ₂ ve Fpg enzim çözeltisi uygulanarak gruptaki kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğu yönünden değerlendirilen oksidatif DNA hasar ve onarımlarına ilişkin bulgular	59
4.6.	CHO hücrelerinde Pendimetalin (PM), H ₂ O ₂ ve Fpg enzim çözeltisi uygulanarak gruptaki kuyruk momenti ve kuyruk göçü yönünden değerlendirilen oksidatif DNA hasar ve onarımlarına ilişkin bulgular	60

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Pestisitler, insan ve hayvan vücudunda, bitki üzerinde ya da çevresinde bulunan veya yaşayan ayrıca besin maddelerinin üretimi, hazırlanması, depolanması ve tüketimi sırasında besinlerin değerini azaltan veya hasara uğratan zararlıları uzaklaştırmak, yok etmek amacıyla kullanılan kimyasal ya da biyolojik ürünlerdir. Herbisitler, zararlı ya da istenmeyen bitkilerle mücadelede kullanılan pestisit bileşikleridir. Herbisitleri hazırlayan ve uygulayan kişiler temas açısından en yüksek risk altındadır. Tarım işçileri havanın 1m³'ünde mikrogram'dan miligram seviyelerine kadar değişen miktarda herbisite solunum yoluyla temas eder. Uygun güvenlik önlemleri alındığında insanların doğal ortamlarda kullanılan herbisitlere maruziyeti çok düşüktür. Kişisel korunma gereçleri ve acil durum planları, hem normal şartlarda hem de kazara dökülme durumlarında, insan maruziyetinin azaltılmasını sağlasa da yerleşim yerlerinde ve endüstride yaygın kullanımları nedeniyle herbisitlerin genotoksik etkilerinin değerlendirilmesi halk sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır.

Pendimetalin dinitroanilin yapısında, seçici bir herbisit bileşiktir. Çeşitli formülasyonlarının yaygın tarımsal kullanımı nedeniyle toptak, yeraltı ve yeryüzü sularında ve havada kirletici olarak bulunmaktadır. Ülkemizde ve dünyada tarım alanlarında yaygın kullanımı vardır. Tahıl, soğan, pırasa, sarımsak, rezene, mısır, darı, pirinç, soya, fıstık, havuç, bezelye, bakla, lale, patates, domates, pamuk, elma, armut, ayva, sert çekirdekli meyveler, çilek, böğürtlen, ahududu, limon, portakal, mandalina, greyfurt, patlıcan, kabak, domates, ay çiçeği ve tütündeki çok sayıda yıllık zararlı otların kontrolü için kullanılır. Çevresel yazgısı ve kalıntı düzeylerine ait veri eksikliği bulunmaktadır. Kapsamlı ekolojik risk değerlendirmesi, kesin çevresel verilerdeki eksiklik tamamlanmadıkça yapılamayacaktır. Pendimetalin, Çevre Koruma Birimi (*Environmental Protection Agency, EPA*) toksisite sınıflandırmasında toksisite sınıfı III'de yer alan az toksik bir bileşiktir. Çevre Koruma Birliği'nin karsinojenite sınıflandırmasında grup C (insanda muhtemel karsinojenler) sınıfına dahil edilen bir bileşiktir ancak Pendimetalin'in genotoksik etkisine ilişkin çok az veri bulunmaktadır. *Salmonella typhimurium*'da metabolik aktivasyon ile genetik mutasyona neden olduğunu ancak yüksek saflıktaki maddenin aynı deney sisteminde mutasyon meydana getirmediğini ayrıca kromozom hataları,

programlanmamış DNA sentezi ve dominant letal mutasyonlara neden olmadığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır.

Çalışmamızda pendimetalin'in çeşitli konsantrasyonlarda *in vitro* periferik kan lenfositlerinde ve CHO hücrelerinde oluşturduğu genotoksik etkiler araştırılmıştır. Hücrelerde meydana gelen DNA hasarının tek hücre jel elektroforez yöntemi ile kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk göçü yönünden değerlendirilmesi planlanmıştır. Pozitif kontrol olarak, 50 μ M hidrojen peroksit kullanılmıştır. Pendimetalin'in periferik kan lenfositlerinde ve CHO hücrelerinde, 1-10000 μ M konsantrasyonlarda DNA hasar yapıcı etkileri bulunup bulunmadığının comet yöntemiyle saptanması amaçlanmıştır. Bu amaçla hücrelerin, 1, 10, 100, 1000 ve 10000 μ M konsantrasyonlarda pendimetalin ile 30 dakika 37°C'de inkübe edilmesi ve DNA hasarının pendimetalin uygulanmayan, aynı vericiden alınan lenfositler ve CHO hücreleri ile kıyaslanması planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Pestisitler, zararlı organizmaları engellemek, kontrol altına almak, ya da zararlarını azaltmak için kullanılan kimyasal madde ya da maddelerden oluşan karışımlardır.

Zararlı organizmalar, insanların besin kaynaklarına, mal varlıklarına zarar veren, hastalık yayan böcekler, bitki patojenleri, yabani otlar, yumuşakçalar, kuşlar, memeliler, balıklar, solucanlar ve mikroplar olabilir.

Pestisit türleri;

- a. İnsektisit: Böcek, haşerelere karşı kullanılır.
- b. Fungusit: Mantarlara karşı kullanılır.
- c. Herbisit: Bitkilere karşı kullanılır.
- d. Mollusit: Yumuşakçalara karşı kullanılır.
- e. Rodentisit: Kemirgenlere karşı kullanılır.
- f. Nematisit: Solucanlara karşı kullanılır.
- g. Akarisit: Akarlara karşı kullanılır[4,5,6].

2.1. Herbisitlerin Tanımı ve Sınıflandırılması

Herbisitler, zararlı ya da istenmeyen bitkilerle mücadelede kullanılan pestisit bileşikleridir.

Herbisitler, bitkilere topraktan çıkış öncesi (*pre-emergence*) ya da topraktan çıkış sonrası (*post-emergence*) uygulanır. Çıkış öncesi uygulanan herbisitler, toprak altında çimlenme esnasında veya toprak yüzeyine çıkış esnasında bitkileri öldürür. Çıkış sonrası uygulanan herbisitler ise toprak yüzeyine çıkmış, gözle kolaylıkla görülebilen bitkileri öldürür. Herbisitler, bitkilerin toprak altı kısımlarını etkileyebilir, toprak üstü kısımlarını etkileyebilir veya her iki kısma aynı anda etki edebilir. Toprak altı kısımlara etki eden herbisitler genellikle çıkış öncesi etki gösterir[7].

Herbisitler seçiciliklerine göre ikiye ayrılırlar. Seçici herbisitler uygulandıkları çevrede bazı bitkileri öldürürken diğerlerine zarar vermez, seçici olmayan herbisitler ise ortamdaki bütün bitki çeşitleri üzerinde etki gösterir.

Bitkideki taşınımlarına göre sistemik herbisitler ya da temas (*contact*) herbisitleri olarak adlandırılırlar. Bitkiye kök, gövde ya da yapraklardan alınan

sistemik herbisit, etkisini bitkinin başka bölgelerine taşınarak gösterir. Temas herbisiti ise etkisini bitkiye alındığı yerde gösterir ve bitkinin diğer kısımlarına taşınmaz. Bazı herbisit çeşitleri hem sistemik herbisit hem de temas herbisiti özelliği gösterebilir.

Herbisitler kimyasal yapılarına göre ve etki mekanizmalarına göre iki ayrı şekilde sınıflandırılabilir[7,8,9,10].

2.1.1. Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırma

Herbisitler kimyasal yapılarına göre iki ana gruba ayrılırlar;

- 1- İnorganik Herbisitler
- 2- Organik Herbisitler

İnorganik Herbisitler:

Otların kimyasal kontrolünde ana olarak inorganik bileşikler kullanılmıştır. İnorganik kimyasal herbisitler fazla seçici değildir bu nedenle zararlı otların yanı sıra ekili bitkilere de zarar vermektedirler. Ayrıca toprakta kalıcı olmaları nedeni ile daha sonra ekilen bitkiler de zarar görmektedir. Bu özelliklerinden dolayı inorganik herbisitler, yerini büyük ölçüde organik herbisitlere bırakmıştır. Ancak, günümüzde de çeşitli inorganik herbisitler, otların kontrolünde kullanılmaktadır. Örneğin, kalsiyum siyanür, bakır sülfat, demir sülfat, civa klorür, potasyum siyanat, sodyum tetraborat.

Organik Herbisitler:

- a- Klorlu fenil bileşikler
- b- Klorlu alifatik asitler ve bunların sodyum tuzları
- c- Karbamatlar ve allil alkol
- d- Sübstitüe üreler
- e- Triazinler
- f- Sübstitüe fenoller

a) Klorlu Fenil Bileşikler

Fenoksi asetik asit, propiyonik asit, bütirik asitin klorlanmış bileşikler herbisit madde olarak kullanılmaktadır. Özellikle çift çenekli bitkilerde, aşırı ve kontrolsüz büyümeye neden olarak bitkinin ölümüne yol açarlar. Bu grubun en önemli bileşikler suda çözünen tuzlar ve yağda çözünen esterlerdir.

b) Klorlu alifatik asitler ve bunların sodyum tuzları

Klorlu alifatik asitler fitotoksik etkileriyle yaygın olarak kullanılırlar. Mekanik hasat öncesi bitkilerde kurumaya ve yaprak dökülmesine neden olurlar.

c) Karbamatlar ve Allil Alkol

Bu grupta karbamat, tiyokarbamat ve ditiyokarbamat türevi herbisitler yer alır. Bitkilere, topraktan çıkış öncesi uygulanan seçici herbisitlerdir. Profam ve klorprofam bu grupta yer alır.

Doymamış alkol olan allil alkoller, örneğin metil izotiyosiyanat, çözelti halinde toprağa uygulanır. Bitkiler üzerindeki güçlü toksik etkileri kısa sürelidir.

d) Sübstitüe Üreler

Önemli bir herbisit grubu olan sübstitüe üreler çok çeşitli bitkilere etki eder ve etkileri uzun süre kalıcı olur. Bitkilerde uzun süre kalıcı olduklarından hasat sonrası ürünlerde de herbisit kalıntıları bulunabilir. Diuron, monuron ve fenuron bu grupta yer alan herbisitlerdendir.

e) Triazinler

Fitotoksik etkili ve bitkilerde büyüme düzenleyici özellikte bir seri aminotriazin bu grupta yer alır. Atrazin, simazin, dinitrokrezol ve dinoseb yoğun kullanılan triazin türevi herbisitlerdir. Triazinler, düşük çözünürlükleri nedeniyle toprakta uzun süre kalıcıdır. Uygulandıkları yerde bulunan ot çeşitlerinin tümüne etki ederler. Genellikle meyve ağaçları gibi bitkilerin çevresindeki tüm otların temizlenmesinde kullanılırlar.

f) Sübstitüe Fenoller

Dinitrofenoller ve pentaklorofenol bu grupta yer alan herbisit etkili kimyasal bileşiklerdir[8,11].

2.1.2. Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırma

- a) Büyüme Düzenleyici Herbisitler (*Growth Regulator Herbicides*)
- b) Fotosentez Engelleyiciler (*Photosynthesis Inhibitors*)
- c) Pigment Engelleyiciler (*Pigment Inhibitors*)
- d) Tohum Büyümesini Engelleyiciler (*Seedling Growth Inhibitors*)
- e) Hücre Membranını Bozucular (*Cell Membrane Disruptors*)
- f) Yağ Sentezi Engelleyiciler (*Lipid Synthesis Inhibitors*)
- g) Amino Asit Sentezi Engelleyiciler (*Amino Acid Synthesis Inhibitors*)

a) Büyüme Düzenleyici Herbisitler

Büyüme düzenleyici herbisitler genellikle geniş yapraklı otların kontrolünde kullanılır. Bu herbisitler bitkinin hücre bölünmesi, hücre büyümesi, protein sentezi ve solunum işlevlerini düzenleyen hormon dengesini bozarak etki oluşturur. Genellikle bitkinin yapraklarına uygulanırlar. Ancak toprağa uygulanan herbisitler de toprağın iç kısmına geçerek bitki kökleri tarafından alınır ve etki gösterir. En yaygın etkileri yaprakta ve gövdede şekil bozukluğu yapmalarıdır.

b) Fotosentez Engelleyiciler

Bitki için hayati önem taşıyan fotosentezi bozarak etki gösterirler. Fotosentez yapan tüm yeşil bitkiler üzerine etki ederler. Fotosentez engelleyiciler daha çok geniş yapraklı bitkilere karşı kullanılır. Bunun yanında, tek yıllık bitkilere de etki ederler. Genellikle bitkinin yapraklarına uygulanırlar.

c) Pigment Engelleyiciler

Yapraktaki yeşil pigment klorofili yıkan herbisitlere pigment engelleyiciler denir. Klorofil bitkinin yaşaması için vazgeçilmez olan fotosentez olayında görevlidir. Bu tip herbisitler, etki ettikleri bitkide yeni çıkan yaprakların beyaz ya da sarı renkte olması nedeniyle ağartıcı herbisitler olarak da adlandırılır. Pigment engelleyiciler bitki köklerinden alınarak bitkinin toprak üstü kısımlarına taşınır. Bitkide klorofilleri koruyan karotenoidlerin üretimini engellerler. Bu tür herbisitler, bitkideki mevcut karotenoidler üzerine yıkıcı etkiye sahip değildir ancak yeni karotenoid oluşumunu bozar.

d) Tohum Büyümesini Engelleyiciler

Bu tür herbisitler, toprak yüzeyine çıkış öncesi çimlenmeden hemen sonra bitkilerin filizlenmesi sırasında etki gösterir. Etkileri toprak altında olduğundan nadiren izlenebilir. Tohum büyüme engelleyiciler, kök ve gövde engelleyiciler olarak iki grupta incelenir.

Kök engelleyiciler: Toprak altında bulunan tohumdaki hücre bölünmesini durdurarak tohumun büyümesini ve filizlenmesini engeller.

Gövde engelleyiciler: Yeni çimlenmiş bitki fidelerine etki eder. Hücre büyüme ve gelişimini önler.

e) Hücre Membranı Bozucular

Toprak yüzeyine çıkış sonrasında bitkilerin hücre membranlarını yıkarak, bitkilerde hızlı bir şekilde kurumaya yol açar. İki tip hücre zarı bozucu herbisit vardır. Birincisi bipiridilyumlar diğeri difenileterlerdir. Bipiridilyum herbisitlerinin toprak altında etkisi yoktur. Bu tür herbisitlerin etki göstermesi için bitkinin gövde ve yapraklarının herbisite maruz kalması gerekmektedir. Difenileter türevi herbisitler bipiridilyum herbisitleri ile aynı etkiyi daha yavaş biçimde oluşturur.

Organik arsenik herbisitleri hücre zarının yapısını bozan temas herbisitleridir. Hücre zarını bozucu herbisitlere maruz kalan bitkiler suya batırılmış gibi hızla sarı renge döner.

f) Yağ Sentezi Engelleyiciler

Yağ sentezi engelleyici herbisitler yalnızca tek yıllık ve çok yıllık bitkilere etki ettikleri için diğeri etki gruplarından ayrılır. Yağ sentezi engelleyiciler topraktan çıkış sonrası uygulanır ve toprağa uygulanmaları ile çok az etki gösterirler ya da etki göstermezler. Yapraklar tarafından hızla absorbe edilirler. Bitkinin normal işlevleri için gerekli olan lipidlerin biyosentezini bozarak etki meydana getirirler. Etkileri 7 ila 14 gün arasında ortaya çıkar.

g) Amino Asit Sentezi Engelleyiciler

Yeni bir herbisit türü olan aminoasit sentez engelleyiciler oldukça düşük oranda kullanılır. Özellikle, memeliler ve bitki dışı canlı türlerinde toksik etki göstermezler. Hem toprak düzeyinde hem de yaprak düzeyinde etkileri vardır. Bitkide protein biyosentezinde rol alan özgül bir enzime bağlanarak protein biyosentezini bozarlar[7,9,12].

2.2. Herbisitlerin Genel Özellikleri

2.2.1. Formülasyonları

Piyasada kuru toz şeklinde ya da sprey uygulamaya uygun sıvı şekilde herbisit formülasyonları bulunmaktadır. Bu formülasyonlarda etkin madde ve bazı yardımcı maddeler bulunur. Formülasyonlarda kullanılan yardımcı maddeler herbisitün uygulanmasını kolaylaştıracak bir madde (adjuvan), etkin maddenin etkinliğini artıracak bir madde ya da etkin madde dayanıklılığını artıran bir madde olabilir. Bunun yanında taşıyıcı, çözücü ve boya da formülasyona ilave edilebilir.

Uygun formülasyon, uygulama metoduna ve herbisitın uygulanacağı bölgeye göre belirlenir. Çoğunlukla kullanımı daha basit ve daha güvenli olan uygulama şekillerine göre formülasyonlar üretilir. Uygulama öncesi maruziyetin azaltılmasına olanak veren bazı herbisit formları mevcuttur. Kullanılacak herbisitın tartılmış paketlerde sunulması veya hali hazırda sıvı halde hemen uygulamaya uygun formda sunulması maruziyet riskini azaltabilir[12].

2.2.1.1. Sprey/Sıvı Formülasyonlar

a)Çözelti Formülasyonları: Suda çözünebilen sıvılar, tozlar ve granüllerdir. Sadece çok az sayıda herbisit etkili aktif madde suda kolaylıkla çözünür ve sulu çözeltileri halinde formüle edilebilir.

b)Emülsiyon Formülasyonlar: Konsantre emülsiyonlar ve jellerdir. Kullanımı ve saklanması kolaydır. Emülsiyon biraz çalkalama ile hazırlanabilir. Deriden etkin maddenin kolayca absorbe olabilmesi ve formüldeki çözücülerin uygulama aracının plastik kısımlarına zarar vermesi bu tür formülasyonların dezavantajlarıdır.

c)Süspansiyon Formülasyonlar: Konsantre süspansiyonlar, sulu süspansiyonlar, suda çözünen aktif maddenin yağdaki emülsiyonu, yağda çözünen aktif maddenin sudaki emülsiyonu, mikrokapsül formülasyonları ve kapsül süspansiyonlarıdır. Tüm bu formüllerde etkin madde parçacık halinde veya bir damla içerisinde çözünmüş halde bulunur ve başka bir sıvı içerisinde süspande edilmiştir. Hazırlanmaları ve uygulanmaları kolaydır. Nadiren spreyleme iğnesinde tıkanmaya yol açarlar. Kullanım öncesinde çalkalanmaları gerekir.

d)Süspande edilebilen kuru tozlar: Islanabilir tozlar, suda dağılabilir granüller, kuru akışkan tozlardır. Süspansiyon için hazır kuru tozlar en sık kullanılan formülasyon çeşididir. Uygulama öncesi alınan kuru toz, kil gibi parçacıklı bir taşıyıcı ile karıştırılır. Ardından bu karışımın sudaki süspansiyonu hazırlanır. Bu tür formülasyonlar ucuzdur, hazırlanması ve saklanması kolaydır. Emülsiyon ve diğer sıvı formülasyonlarda olduğu gibi deriden absorpsiyonu yüksek değildir. Ancak, hazırlanışı sırasında tozların solunması riski vardır. Sprey pompa ve iğnesini de aşındırabilirler.

2.2.1.2. Kuru Formülasyonlar

a) Granüller: Genellikle toprağa uygulanan herbisitler için granüller kullanılır. Granüller aktif maddenin daha büyük parçacıklara adsorbe edilmesi ile elde edilir. Uygulandığı yerden rüzgar ve benzeri nedenlerle taşınma riski düşüktür. Granüle herbisit toprakla karıştırılması gerekebilir.

b) Pelletler ve Tabletler: Pelletler etkin maddenin granüllerde olduğu gibi daha büyük parçacıklara adsorbe edilmesi ile hazırlanır. Pellet parçacıkları benzer büyüklük ve şekildedir.

c) Tozlar: Çok ince etkin madde tozlarının, inert kuru bir yardımcı madde ile karıştırılarak toz formülasyonları hazırlanır. Toz formülasyonların kullanımı esnasında solunma tehlikesi ve uygulanan yerden taşınması riski vardır.

2.2.1.3. Tuz ya da Esterler

Herbisit etkili birçok bileşik asidik özellik taşımaktadır. Bu asit bileşikler uygulama için tuz ya da ester şeklinde formüle edilirler. Hazırlanan tuz veya ester halindeki bileşik bitkiye alındıktan sonra etkin asit molekülüne parçalanır. Bir etkin herbisit hangi şekilde hazırlanacağına karar vermek için bazı ölçütlere dikkat etmek gerekir.

Tuzlar;

a) Birçok tuz suda kolaylıkla çözünür. Dolayısıyla tuz şeklinde hazırlanan herbisitlerin emülsiyon ya da süspansiyon şeklinde hazırlanmasına ihtiyaç duyulmaz.

b) Tuzlar yağda çözünmezler.

c) Tuzun, bitkinin kütikül tabakasından geçmesi için formülünde sürfaktan kullanılması gerekir.

d) Uçuculuk özellikleri esterlerden düşüktür.

e) Tuzlar suda çözündüklerinde ana asit molekülüne ayrışabilirler. Oluşan asit molekülü sert sulardaki magnezyum ya da kalsiyum ile birleşerek çökebilir ve etkisini kaybedebilir.

Esterler;

a) Bitki dokularına özellikle odunsu dokulara hızla penetre olurlar.

b) Bitkilere toksik etkileri, tuzlardan daha çoktur.

c)Suda çözünürlükleri yoktur. Bu nedenle emülsiyon ya da süspansiyonlarının hazırlanması gerekir. İlave emülsiyon oluşturun ve süspand edici maddelere ihtiyaç duyulur.

d)Çeşitli buharlaşma derecelerine sahiplerdir.

2.2.1.4. Adjuvanlar

Pestisit karışımlarına, karıştırma işleminin, uygulama işleminin ve pestisit etkisinin kolaylaştırılması için ilave edilen maddelere adjuvanlar denmektedir. Adjuvanlar, özel durumlarda herbisit formüle edilmesine olanak sağlar. Yüzey etkin maddeler, tamponlar, pH değiştiriciler, köpük gidericiler, etki uzatıcılar, boyalar, viskozite arttırıcılar, yapıştırıcılar, aktive ediciler, çöktürücüler ve benzeri maddeler adjuvan olarak herbisit formülasyonlarında kullanılır. Yüzey etkin maddeler en önemli adjuvanlardır. Yüzey etkin maddeler etkin herbisit maddenin bitki içine girişini kolaylaştırır.

2.2.2. Dağılımları (*Dissipation*)

Herbisitlerin dağılımları çevrede taşınmaları, parçalanmaları veya hareketsizleşmelerini ifade eder.

2.2.2.1. Parçalanmaları

Herbisitlerin daha küçük yapısal parçalara ayrılmasına parçalanma (*degradation*) denir. Fotokimyasal, kimyasal ya da biyolojik parçalanma ile herbisitler sonunda karbondioksit, su ve tuzlara kadar parçalanabilir. Biyolojik parçalanma reaksiyonları, herbisitlerin parçalanma reaksiyonları içerisinde en büyük paya sahiptir. Bir herbisit parçalandığında kendine has kimyasal özellikleri (toksikite, adsorbsiyon kapasitesi, parçalanma direnci gibi) olan birtakım bileşikler (metabolitler) ortaya çıkar. Metabolitlerin bazıları ana bileşikten daha toksik ya da çevrede daha kalıcı özellikte olabilir. Hemen hemen birçok metabolitin doğası büyük ölçüde bilinmemektedir[12,13].

2.2.2.1.1. Işıkla Parçalanmaları

Güneş ışığı ile herbisitlerin yapılarının parçalanmasına ışıkla parçalanma denmektedir. Güneş ışığının yoğunluğu bölgesel faktörler, mevsimsel faktörler, gün

içi zaman, hava koşulları, kirlilik, toprak, bitki veya çöpler tarafından gölgelenme ve benzeri birçok faktörden etkilenir[12,14].

2.2.2.1.2. Mikroorganizmalar ile Parçalanmaları

Mikroorganizmalar aracılıklı metabolizma ile herbisit molekülün yapısının bozulmasına mikroorganizmalar ile parçalanma denir. Farklı herbisit etkili moleküllerin parçalanmasından farklı mikroorganizmalar sorumludur[12,15,16]. Mikroorganizmalar ile parçalanma derecesi ortamdaki mevcut mikroorganizma topluluğuna göre değişim gösterir. Nem, sıcaklık ve organik içeriğin fazla olması gibi toprakla ilgili faktörler de mikroorganizmalar ile parçalanma derecesine etki eder.

Herbisitlerin yıkımı iki şekilde olur. Birincisi, mikroorganizmaların herbisit etkili maddeyi karbon ve enerji kaynağı şeklinde kullanması ile doğrudan yoldan parçalanmadır[17]. İkinci yol ise, herbisitin mikroorganizmalar ile parçalanma için gerekli toplam enerjiyi sağlamadığı durumlarda yardımcı bir substrat ile birlikte parçalanmasıdır.

Mikroorganizmalar ile parçalanmanın başlaması bazen zaman alır. Bu bekleme süresi mikroorganizma ortamının uygunluğundan ya da mikroorganizma ortamında parçalanma için gerekli enzimlerinin başlangıçta düşük oranda olmasından kaynaklanır. Eğer bekleme süresi uzun olursa diğer parçalanma yolları devreye girebilir[12,18,19].

2.2.2.1.3. Kimyasal Parçalanmaları

Herbisitler hidroliz olma, oksidasyon ve ayrışma gibi kimyasal reaksiyonlar sonucu bozulmaya uğrayarak kimyasal olarak parçalanırlar. Hidroliz olma genellikle herbisitin sudaki hidrojen ile tepkimeye girmesi sonucu gerçekleşir. Oksidasyon, herbisitin oksijen ile tepkime vermesidir. Ayrışma ise ana molekülden bir amonyum ya da kimyasal grubun ayrılmasıdır[12,14].

2.2.2.2. Hareketsizleşmeleri/Adsorbsiyonları

Herbisitler toprak parçacıklarına adsorbe olarak ya da herbisite duyarlı olmayan bitkilere alınarak hareketsizleşirler. Bu hareketsizleşme herbisitlerin çevrede yayılmalarını engeller ancak hem adsorbsiyon hem de bitkiye alınma geri

dönüşlüdür. Adsorbsiyonun yavaş gerçekleştiği durumlarda herbisit kalıcı olarak bozulması da mümkündür.

Herbisitin toprak parçacıklarına adsorbsiyon oranı hem toprağın hem de herbisit özelliklerine bağlıdır. Adsorbsiyon genellikle topraktaki organik içeriğin fazla olması ve katyon değişim kapasitesinin fazla olması halinde artış gösterir. Toprak pH ve sıcaklığının artması ile adsorbsiyon azalır[12,18,20]. Herbisit suda çözünürlüğü de toprağa adsorbsiyonda önemli etkiye sahiptir. Suda çözünürlüğün düşmesi herbisit toprak parçacıklarına kuvvetli biçimde adsorbsiyonuna neden olur. Suda çözünürlükleri bazı istisnalar dışında tuzlardan asitlere, asitlerden esterlere doğru azalır. Hem suda yüksek çözünürlüğe sahip olan hem de toprağa güçlü şekilde adsorbe olan "*glyphosate*" kural dışı bir örnek olarak verilebilir[12,14].

Toprak yüzeyine adsorbsiyon mikroorganizmalar ile parçalanmayı belirgin şekilde yavaşlatır veya durdurur. Diğer yönden adsorbsiyon kimyasal ya da biyolojik bozulmayı kolaylaştırabilir. Adsorbsiyon düzeyi zamanla değişebilir. Çoğunlukla geri dönüşlüdür, herbisit topraktan ayrılarak toprak sularına ya da su kanallarına geçer[12,18].

2.2.2.3. Hareketleri/Uçuculukları

Herbisitler çevrede farklı yollarla taşınırlar. Herbisit madde yeraltı veya yerüstü akarsularına karışarak, uygulama esnasında ya da sonrasında buharlaşarak, toprak veya yaprak yüzeyinden havalandırarak veya toprak altına geçerek hareketlenebilir. Bu hareketler birbirinden farklıymış gibi anlatılsa da çevresel ortamlarda hemen hepsi aynı anda veya birbirinin devamı şeklinde gerçekleşebilir[12,17].

Uçuculuk toprak veya yaprak yüzeyine uygulanan herbisit maddenin buharlaşarak rüzgarla birlikte taşınmasına neden olur. Bir herbisit maddenin uçuculuğu birincil olarak maddenin molekül ağırlığına bağlıdır. Çok yüksek uçuculuğa sahip herbisit maddeler artık kullanılmamaktadır.

Sıcaklığın ve toprağın neminin artması, toprağın kil ve organik madde içeriğinin azalması ile uçuculuk artar. Yüzey etkin madde kullanımı herbisit uçuculuk özelliğini etkiler. Aşırı derecede uçuculuk bazen uygulanan herbisit % 80 - % 90 oranında kaybına neden olabilir[12,21].

2.2.2.4. Havada Dağılışı

Bir herbisitın sudaki çözünürlüğü onun çevresel ortamdaki yazgısını belirleyen en önemli etmendir. Suda çözünürlüğü yüksek olan herbisitler toprağa düşük oranda adsorbe olur. Bu maddelerin çevrede hareketleri daha fazladır. Mikroorganizmalar ile ve diğer yollarla parçalanma olasılıkları yüksektir. Ester şeklindeki herbisitler, tuz ve asit formülasyonlarına göre daha uçucudur. Ancak, suda çözünürlükleri yoktur ve toprağa yüksek oranda adsorbe olurlar[12,22].

Birçok pestisitın havada ve yağmur sularında eser miktarda bulunduğu, yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu konuda ilk bulgu, 1960’larda yağmur sularında organoklorlu insektisitlerin tespit edilmesidir. Kentsel yaşamdan uzakta tarım alanlarında kullanılan bu bileşiklerin belirgin uçuculuk özelliklerinden dolayı büyük şehirlerin atmosferlerini kirletme riskleri yüksektir[24-32].

Bu kirtleticiler havada gaz ya da aerosol şeklinde bulunmaktadır. Bileşiklerin fizikokimyasal özellikleri, ziraı uygulama biçimleri ve meteorolojik koşullar gibi parametreler bileşiklerin atmosferde değişik şekillerde dağılmasını belirlemektedir. Pestisitlerin atmosfere girişı çeşitli yollardan gerçekleşir. Bunların en önemlileri bileşiğin uygulama sırasında buharlaşması, kontamine olan toprak ya da bitkiden daha sonra buharlaşması veya rüzgar ile taşınmasıdır. Özellikle herbisitlerin yoğun miktarda kullanımı nedeniyle uygulama yerinden uzak bölgelere kadar atmosferde taşınmaları sonucu kentsel havada bulundukları, nitel ve nicel olarak tespit edilmiştir. Örneğin, klorfenoksi asit türevi bileşiklerin havanın 1 m³’ünde birkaç nanogramdan birkaç yüz nanograma kadar bulunduğu tespit edilmiştir[22, 33-34].

2.2.2.5. Toprak ve Suda Dağılışı

Bir herbisit maddenin toprakta kalış süresi o maddenin yarı ömrü DT₅₀ (*dissipate time*) ile ifade edilir. Bu yarı ömür herbisitın toprağa uygulanmasının ardından, uygulanan dozun yarısına düşmesi için geçen süredir. Bir herbisitın topraktaki yarı ömrü toprağın özelliklerine, hava koşullarına ve bitki örtüsüne göre değişmektedir, bununla birlikte DT₅₀ herbisitlerin toprakta kalış sürelerini kabaca karşılaştırmak için kullanılır[35].

Herbisitin topraktaki dağılımı, toprağın sıcaklık, pH, nem, organik madde içeriği, kil içeriği, yüzey alanı ve tipi ile değişkenlik gösterir. Doğal toprakların pH değeri 5 ila 8 arasındadır.

Su kaynakları uygulama esnasında doğrudan, buharlaşmayla taşınarak, toprak içerisinde yeraltı sularına karışarak ve yeraltı-yerüstü akarsuları ile taşınarak herbisitle kontamine olur. Uygulamadan sonraki bir kaç gün içerisinde yağın yağmur miktarı bu kontaminasyonu etkiler. Ancak, şiddetli yağışlarla bile uygulanan herbisit en fazla %5 ila %10'u kaybedilmektedir. Herbisit, toprağa yüksek adsorbsiyon göstermesi, uygulama dozunun düşmesi ve yağmur miktarının azalması yerel suların kontaminasyonunu azaltır[12,21,36].

Bir herbisit sudaki davranışını suda çözünürlüğü belirlemektedir. Tuz ya da asit yapıda olan bir herbisit suda çözündükten sonra hidrolizle veya ışıkla parçalanana kadar suda kalma eğilimi gösterir. Esterler ise suda çözünmezler, suda süspansiyon olmuş parçacıklara tutunurlar. Ardından sedimentlere ve toprağa adsorbe olur ya da mikroplarla parçalanmaya uğrarlar. Yüksek asit ya da alkali özellikteki sular herbisitlerin normal sudaki davranışlarını değiştirebilir. Yüzey sularının pH'sı ortalama 5 ila 9 arasındadır[12,17].

2.2.2.6. Besinlerde Dağılışı

Besin kaynağı olan bitkilere, doğrudan herbisit uygulanması ile kontaminasyon gerçekleşir. Bitkilerde kalan herbisit miktarı uygulama programı, sıklığı ve uygulamadan bitkinin toplanmasına kadar geçen zamanla ilişkilidir. Bu süreçte yağın yağmur aktif bileşiğin bir kısmını uzaklaştırabilir veya hidroliz edebilir. Herbisitlerin yıkımlanmaları ve uzaklaşmaları için geçmesi gereken kesin süre hava şartlarına bağlıdır. Herbisitlerin bazıları yıkımlanmadan besinleri kirletebilir[37].

2.2.3. Biyolojik Yazgısı

2.2.3.1. Absorbsiyonu

Klorofenoksiasetik asitlerin amin tuzlarının absorpsiyonu hemen olduğu halde, esterlerinin tamamı absorbe olamamaktadır. Absorbe olmuş herbisitlerin hemen hidroliz olarak fenoksiasetik asit verdikleri gösterilmiştir[8].

2,4-Diklorofenoksi asetik asit mide ve bağırsaklardan iyi bir şekilde absorbe edilmektedir. Bu bileşiklerin akciğerler tarafından absorblanması daha düşük seviyededir. Deriden absorpsiyonu ise düşük miktarlarda olur. Klorofenoksi bileşiklerinin yağ dokularında anlamlı miktarda birikiminden söz edilmez[38,39].

2.2.3.2. Dağılımı

Herbisit bileşiklerin memeli vücudunda dağılımları yüksek oranlarda gerçekleşmektedir. Su canlılarında suda çözünürlüğü yüksek olan 2,4-diklorofenoksi asetik asit konsantrasyonu uygulamadan hemen sonra genellikle yüksek düzeylere ulaşır ve dağılım gerçekleşir[8].

2.2.3.3. Metabolizması

Klorofenoksiasetik asitlerin doza bağlı olarak önemli bir kısmı değişmeden (% 75- % 96), çok azı ise glukuronik asit ve amino asitlerle konjuge olarak atılmaktadır.

Serbest dinitrofenoller indirgenme yolu ile metabolize olurlar ve böylece daha az toksik aminonitrofenoller oluşur. Bunlar da O-glukuronid veya (-NH₂) gruplarının asetilasyonu şeklinde konjuge olarak idrarla atılır.

Alınan doza bağlı olarak dipiridil bileşiklerinin % 90-% 100'ü değişmeden idrarla 48 saat içinde atılır. Atılım süresi daha da uzayabilir[8].

2.2.3.4. Atılımı

Klorofenoksiasetik asit, dinitrofenol ve dipiridil türevi herbisitlerin başlıca atılma yolu böbrektir.

2.2.4. Maruziyetin Saptanması

Metabolizma çalışmalarında, klorofenoksiasetik asit grubu herbisitlerin büyük bir kısmının idrarla serbest asit şeklinde atıldığı gösterilmiştir. Bu nedenle biyolojik materyal olarak idrar kullanılır.

Dinitrofenollerle zehirlenmenin tanımlanmasında, analitik toksikoloji açısından biyolojik materyalde (kan ve idrarda) dinitrofenoller aranır. Kanda taylorleri, kronik maruz kalma açısından önem taşır.

Dipiridil grubu herbisitlerle zehirlenmenin analitik toksikoloji açısından tanısı, biyolojik materyalde analizleri ile yapılır. Parakuat ve dikuat idrar ve feçesle değişmeden atılmaktadır. Biyolojik materyal olarak en çok idrar kullanılmaktadır. Bundan başka kan ve akciğer dokusu da sıklıkla kullanılan materyallerdir. Kuvvetli iyonize bileşikler olduğu için, biyolojik sıvılardan ayrılmasında iyon değiştirme kromatografisinden yararlanılır[8,40].

2.2.5. Toksik Etkileri

2.2.5.1. Çevreye Toksik Etkileri

2.2.5.1.1. Kuşlara ve Memelilere Toksik Etkileri

Bir herbisitın toksisitesi oral veya dermal yoldan uygulandığında uygulanan hayvan popülasyonunun yarısını öldüren doz ile tanımlanır (LD_{50} -Letal Doz). Genellikle hayvan vücut ağırlığının kilogramında, gram herbisit olarak rapor edilir. LD_{50} dozları koşullara bağlı olarak farklılık gösterebilir. Bu nedenle farklı herbisitler arasında yapılan bağıl toksisite karşılaştırmaları yaklaşık bir sonuç verir. Formülasyon kaynaklı safsızlıklar veya formüle eklenen yardımcı maddeler herbisitın kendisinden daha toksik etkili olabilir. Böyle durumlarda artan kanser riskini ya da diğer önemli toksik etkileri herbisitın kendisine bağlamak zordur. Herbisitlerin en dramatik etkileri hedef olmayan bitki ve hayvanların dolaylı olarak ölmesine yol açmalarıdır. Hedef bitkilerin ölmesi, bulundukları doğal koşulların değişmesi söz konusu olursa bu durum ortamda bulunan diğer hayvan ve bitkileri de etkilemektedir. Örneğin; Suda yayılan bir bitki türünün kaybı, suyun sıcaklığında ve berraklığında değişiklik yapabilir. Bu durum suda yaşayan diğer canlılar üzerinde güçlü etkiler oluşturabilir veya fiziksel etkilerle nehir ya da gölün erozyonuna neden olabilir. Çalılıkların yok edilmesi ile doğal ortamlar bazı kuş türlerinin yaşaması için artık uygun olmayan bir hale dönüşebilir ve diğer küçük memeli hayvanların av haline gelmesine neden olabilir[12].

2.2.5.1.2. Su Canlılarına Toksik Etkileri

Herbisitlerin su canlılarına toksik etkileri, uygulanan su canlısının yarısını öldürecek sudaki madde konsantrasyonu ile (Letal Konsantrasyon- LC_{50}) ifade edilir. Genellikle litre suda, mikrogram herbisit olarak rapor edilir. Su canlıları üzerinde, ester formülasyonları, asit ya da tuz formülasyonlarına göre daha toksik etkilidir. Ester formülasyonları lipofilik yapıda olduklarından su canlılarının deri ve solungaçlarından su canlıları tarafından kolaylıkla alınmaktadır. Ayrıca, ester formülasyonları suda çözünmediklerinden su ile seyreltilemez[12].

2.2.5.1.3. Toprak Canlılarına Toksik Etkileri

Herbisitlerin toprakta yaşayan mikroorganizmalar üzerine çeşitli etkileri mevcuttur. Bu etkiler herbisit konsantrasyonu ile topraktaki mevcut mikroorganizmalara göre çeşitlilik gösterir. Düşük konsantrasyonlar mikroorganizma sayısında artışa neden olurken, daha yüksek dozlar mikroorganizma sayısında azalmaya yol açabilir. Genellikle yapılan çalışmalara, toprak canlıları üzerindeki uzun dönem etkileri ortaya çıkarmaya yeterli olacak süre devam edilmemiştir.

2.2.5.2. İnsana Toksik Etkileri

Uygulama sırasında herbisit etkili maddeye çoğunlukla deri yoluyla temas ettiklerinden, zirai herbisit uygulayıcıları için oral LD₅₀ değerleri yerine dermal LD₅₀ değerlerinin dikkate alınması daha uygundur. Herbisit uygulayıcıları da dahil olmak üzere, çok az sayıda kişi LD₅₀ kadar yüksek dozda herbisit maddeye maruz kalmıştır. LD₅₀ değeri, daha düşük dozlarla ortaya çıkacak kronik veya uzun dönem toksik etkiler hakkında bilgi sağlamamaktadır. Ölümcül olmayan dozlar deri ve gözde irritasyonlara, baş ağrısına, mide bulantısına yol açabilir. Bazı ciddi durumlarda ise doğum kusurları, genetik bozukluklar, felç, kanser ve hatta ölümler görülebilmektedir[12,41].

Uygun güvenlik önlemleri alındığında insanların doğal ortamlarda kullanılan herbisitlere maruziyeti çok düşüktür. Kişisel korunma gereçleri ve acil durum planları, hem normal şartlarda hem de kazara dökülme durumlarında, insan maruziyetinin azaltılmasını sağlar.

Herbisitleri hazırlayan ve uygulayan kişiler temas açısından en yüksek risk altındadır. Deri ve akciğerler en yaygın temas yollarıdır. Tarım işçilerinde maruziyetin en sık nedeni, işçilerin farkında olmadan ilaçlı alanlara tekrar girişleridir. Tarım işçileri havanın 1m³'ünde mikrogram'dan miligram seviyelerine kadar değişen miktarda herbisite solunum yoluyla temas eder[42]. Ancak deriden maruziyet solunum yolundan maruziyet oranına göre çok daha fazladır. Cilt yüzeyine bir miktar derişik herbisit dökülmesi ya da sıçraması ile ortaya çıkacak toksik etki, tüm gün ilaçlı bir ortamda çalışıp solunum yoluyla herbisite maruz kalma ile ortaya çıkacak toksik etkiye eşdeğer olabilir. Aynı zamanda herbisitin göze teması halinde körlüğe kadar giden şiddetli göz hastalıkları oluşabilmektedir. Deriden geçişler

doğrudan açık ellerden, maddeye geçirgen eldivenlerden, ilaçlı ellerin değdiği ya da kirli malzemelere temas eden vücut yüzeylerinden olabilir. Herbisitlerin bağlı toksisiteyi deri yoluyla temasın oral yolla temastan çok daha yüksek olması nedeniyle oral LD₅₀ yerine, daha çok dermal LD₅₀ ile ifade edilir[12,43].

Pestisit zehirlenmesi sonucu insanda oluşan tepkiler, pestisit toksisitesine, doza, maruziyet süresine, absorpsiyon yoluna, pestisit vücutta metabolize edilme ve vücuttan atılma miktarına göre değişkenlik gösterir. Değişen parametreler aynı dozda herbisit farklı tepkiler oluşturmaya neden olur. Herbisitler insanda önemli biyokimyasal yolları engelleyerek veya hücre zarını bozarak toksik etki oluşturur. Düşük dozlar herhangi bir etki oluşturmazken yüksek dozlar şiddetli hastalık ve ölümlere neden olabilir. Etkiler, bölgesel ya da sistemik olabilir. Zehirlenme belirtileri temastan hemen sonra ya da belirli bir süre sonra ortaya çıkabilir. Etkileri genellikle geri dönüşlüdür. Düşük dozda herbisitlere maruziyet sonucu genellikle cilt ve göz tahrişi, baş ağrısı ve mide bulantısı gibi belirtiler görülür. Daha yüksek dozda herbisitlere maruziyet ile baş dönmesi, bulanık görme, aşırı terleme, halsizlik, karın ağrısı, kusma, diyare, aşırı susuzluk hissi ve deride kabarcıklı döküntüler görülebilir. Bunun yanı sıra huzursuzluk, endişe ve kızgınlık gibi davranış değişiklikleri ortaya çıkabilir. Zehirlenmeler nadiren, istemsiz kasılma, bilinç kaybı, felç ve ölümlerle sonuçlanır.

Bazen formülasyona ilave edilen bir yardımcı madde veya üretim sırasında etkin maddeden oluşan bir safsızlık, herbisit kendisinden daha toksik etkili olabilir. Bu nedenle, herbisit etkili bir aktif maddenin saf hammadde toksisitesi ile piyasadaki formülasyonunun toksisitesi aynı olmayabilir. Bir ya da daha fazla sayıda herbisit içeren birleştirilmiş formülasyonların toksisitesi, herbisitlerin ayrı ayrı toksisitelerinin toplamına eş olmayabilir. Formülasyonda bulunan herbisit etkili maddelerin birbirleri ile oluşturdıkları sinerjik ya da toplamsal etki toksisiteyi arttırmaktadır[44].

Parkinson hastalığının patogeneğinde, pestisitler ve diğer yabancı maddelerin metabolize edilmesinde görevli enzim olan Glutasyon transferaz enzimi poliomorfizminin rolünü 95 vaka ve 95 kontrol üzerinde araştıran bir çalışma yapılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre; Glutasyon transferaz enziminin Glutasyon transferaz 1 genotipini taşıyanlarda Parkinson hastalığı gelişme riski yüksek

bulunmuştur[45,46]. ABD’de yapılan bir araştırma sonucunda da, Parkinson hastalığı tanısı almış olanlarda herbisit maruziyetinin daha yüksek olduğu görülmüştür[47].

2.2.6. Zehirlenme Tedavisi

Herbisitlerle zehirlenmelerde tanı çoğunlukla akut temas öyküsü sayesinde konur. Zehirlenmelerde ilk olarak yaşam işlevlerini destekleyici tedavi uygulanır. Klorfenoksi herbisitleri ile zehirlenmelerde öncelikle solunumun desteklenmesi gerekir. Ardından zehirlenmeye neden olan bileşiğin düzeyi tespit edilir. Gerekliyse, zehirlenmeye neden olan maddenin vücuttan atılımının artırılması için idrar alkalilendirilir.

Pentaklorofenol ile zehirlenme inhalasyon yolu ile olduğunda, kişi derhal ortamdan uzaklaştırılır. Kontaminasyona neden olan elbise çıkarılır. Cilt sabun ve su ile yıkanır. Oral yol ile zehirlenmede, ağız bol su ile yıkanır. İki çorba kaşığı magnezyum sülfat su ile birlikte verilir. Semptomatik tedaviye geçilir. Spesifik bir antidotu yoktur.

Dinitrofenol türevi herbisitlerle oral yolla zehirlenmede, mide NaHCO_3 ile yıkanır. Tuzlu katartik verilir. Yapay solunum ve oksijen tedavisi gerektirir. Vücut ısını düşürmek için buz paketleri kullanmak veya alkol sürmek faydalıdır. Antipiretik ilaçlardan kaçınılmalıdır. Vücut elektrolit dengesi ve asidoz kontrol altına alınır. Gerekli semptomatik tedavi uygulanır. Deri yolu ile bulaşmada, cilt sabun ve su ile yıkanır.

Bipiridil türevi herbisitlerle zehirlenmelerde göz, deri ve mukozalarda şiddetli tahriş ortaya çıkabilir. Temas sonrası ilk bir veya iki gün ağız ve mukozalarda yanma oluşur, daha sonra bu bölgelerde yaralar ortaya çıkabilir. Bu tür zehirlenmede erken tedavi büyük önem taşır. Parakuat ile zehirlenmelerde maruz kalan kişide hiç bir semptom görülme bile, acil tedavinin derhal uygulanması gerekir. Zehirlenme sonrası kişiye oksijen uygulanması dokuların oksijensiz kalmasını ve akciğerin daha fazla hasarını engeller. Oral yolla alınmasından sonra 4 saat içinde, kusturma ve mide lavajı yapılabilir. Parakuat tahriş edici olduğu için bu işlemler dikkatle uygulanmalıdır. Kusturma ve lavajdan hemen sonra 200-500ml % 30'luk adsorban kil süspansiyonu ve beraberinde katartik olarak MgSO_4 verilir. Siyanoz ve solunum yetersizliği için oksijen tedavisi dikkatle uygulanmalıdır. Çünkü oksijen, akciğerlerde parakuat tarafından oluşturulan lezyonları daha çok tahrip edebilir.

Ayrıca zorlu diürez, böbrek yetmezliği hallerinde periton diyalizi veya hemodiyaliz; aktif kömür ve iyon değiştirici reçine ile hemoperfüzyon yöntemleri uygulanabilir.

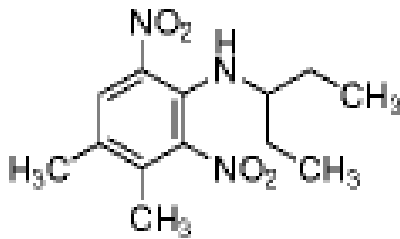
Süstitüe üre herbisitlerinin sistemik toksisiteleri düşüktür. Zehirlenmelerde destekleyici tedavi uygulanır. Bazı zehirlenme vakalarında methemoglobinemi görülür[8,47,48].

2.2.7. Pendimetalin

Pendimetalin, dinitroanilin türeği, bitkinin kök ve yaprakları tarafından absorplanan seçici bir herbisit bileşiktir. Bir yıllık ve geniş yapraklı yabancı, zararlı otları kontrol etmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Hücre bölünmesini ve devamlılığını inhibe eder. Bitkilerin topraktan çıkmalarını takiben filizlenme aşamasından hemen sonra kısa sürede ölmelerine neden olur. Tahıl, soğan, pırasa, sarımsak, rezene, mısır, darı, pirinç, soya, fıstık, havuç, bezelye, bakla, lale, patates, domates, pamuk, elma, armut, ayva, sert çekirdekli meyveler, çilek, böğürtlen, ahududu, limon, portakal, mandalina, greyfurt, patlıcan, kabak, domates, ay çiçeği ve tütündeki çok sayıda yıllık zararlı otların kontrolü için kullanılır [3,40].

2.2.7.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Pendimetalin turuncu-sarı renkte kristal yapıda tozudur. Kimyasal adı N-(1-etilpropil)-2,6-dinitro-3,4-dimetilanilin'dir. Molekülün ampirik formülü $C_{13}H_{19}N_3O_4$ 'tür ve molekül ağırlığı 281.3 g/mol'dür. Erime derecesi 54-58°C'dir. LogP_{ow} (oktanol/su dağılma katsayısı) 5.18'dir. Pendimetalin'in kimyasal yapısı Şekil 2.1.'deki gibidir[3,40,50,51].



Şekil 2.1. Pendimetalin'in Kimyasal Yapısı

Suda çözünürlüğü 20°C'de 0.3 mgL⁻¹'dir. Aseton, ksilen, benzen, heptan, toluen, kloroform, diklorometan gibi birçok organik çözücünde ve mısır yağında çözünür. İsoopropanolde kısmen, petrol ve petrol eterinde hafifçe çözünür[3,52-58].

2.2.7.2. Dağılışı

Pendimetalin ve metabolitlerinin toprak bileşenlerine afinitesi çok yüksektir. Topraktaki yarı ömrü 30-90 gün arasındadır. Toprağa güçlü bir şekilde adsorbe olduğu için topraktan yer altı sularına karışma ihtimali ihmal edilecek kadar azdır[59-62].

Pendimetalin'in kaynama derecesi 330 °C'dir. Kaynama derecesi yüksektir bu nedenle uçucu bir bileşik değildir. Uçucu bir bileşik olmadığından buharlaşma ile havada dağılışı söz konusu değildir. Havada rüzgarla farklı bölgelere parçacık halinde taşınması mümkün olabilir.

Pendimetalin'in suda çözünürlüğü 0.3 mgL⁻¹'dir. Su bileşenlerine ilgisi çok düşüktür. Bu nedenle pendimetalin'in su kirleticisi olmadığı bildirilse de oksijensiz koşullarda daha polar metabolitlerine dönüşebilir. Oluşan polar metabolitler yer altı ve yüzey sularını kirletebilir[56].

Bitkilerin kök ve gövdelerinden absorbe olur. Yaprak yüzeyinden pendimetalin absorpsiyonu gerçekleşmez. Toprağa aşırı derecede afinitesi olduğundan topraktan çok az miktarda pendimetalin bitkiye alınabilir. Pendimetalin'in bitki dokularına absorpsiyonundan sonra taşınması sınırlıdır. Pendimetalin bitkide oksidasyonla parçalanır. Hasat sırasında üründe genellikle tayin edilebilir düzeyde bulunmamaktadır[55].

2.2.7.3. Biyolojik Yazgısı

Pendimetalin düşük oranda absorbe olurken vücuttan hızla atılır. Oral yolla alımından 24 saat sonra yaklaşık % 95'i atılmaktadır. Yaklaşık % 20'si idrarla, % 75'i ise feçesle atılır. Vücutta karaciğer ve böbreklerde maksimum konsantrasyona ulaşır. Büyük oranda değişmeden vücuttan atılır. Buna rağmen halkadaki 4-metil grubunun ve N-alkil yan zincirinin oksidasyonu ile oluşan metabolitleri de aydınlatılmıştır. Oral yoldan alımdan 96 saat sonra vücut dokularında 0.3 ppm, yağ dokuda ise 0.9 ppm gibi düşük oranda bulunur. Özetle, pendimetalin kan dolaşımından büyük oranda absorbe edilmeden feçesle vücuttan atılır. Kandan absorbe edilen düşük miktardaki pendimetalin ise karaciğer ve böbrekler tarafından hızla metabolize edilerek idrarla atılır[63].

2.2.7.4. Toksik Etkileri

Pendimetalin yutulduğunda, solunduğunda ya da deriyle temas ettiğinde hafif akut toksik etki meydana getirir. Pendimetalin'in en olası maruziyet yolu zirai ilaç uygulayıcılarının karıştırma, hazırlama ve uygulama sırasında pendimetalin'e temas etmesi ile olur. Yapılan bir çalışmada tavşanın gözüne uygulanan pendimetalin'in, ortalama 7 gün içerisinde iyileşen kornea tahrişine neden olduğu görülmüştür. Toz ve buharının solunması ile ağız, burun, solunum yolu ve akciğer mukozalarında hafif tahrişe yol açabilir. Saf pendimetalin'in farelerdeki akut oral LD₅₀ dozu 5000mg/kg'dan, tavşanlardaki akut dermal LD₅₀ dozu ise 2000mg/kg'dan yüksektir[61,62].

Saf pendimetalin'in farelerde, 4 saatlik solumayı takiben belirlenen akut LC₅₀ konsantrasyonu 320mg/L iken, piyasa adı *Prowl 4EC* olan pendimetalin formülasyonunun 4 saatlik akut LC₅₀ konsantrasyonu 3.5 mg/L'dir.

Köpekler üzerinde 2 yıl süreyle yapılan bir çalışmada, oral yolla uygulanan 50mg/kg ve 200mg/kg dozlarındaki pendimetalin'in karaciğer organ ağırlığında ve alkalen fosfataz enzim miktarında artışa neden olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışma günde 12.5mg/kg dozun gözlenen bir etki oluşturmadığını göstermiştir.

90 gün boyunca farelerde yapılan çalışmada etki gözlenmeyen en yüksek doz (NOEL-*No Observed Effect Level*) günde 40mg/kg olarak bulunmuştur[64,65].

Olgunlaşmamış dişi farelerde, pendimetalin'in rahim ağırlığı üzerine etkileri araştırılmıştır. Dişi farelere 3 gün süreyle 150, 225, 300 ve 600 mg/kg/gün dozlarda pendimetalin ve pozitif kontrol olarak 0.001 mg/kg/gün dozda etinilestradiol uygulanmıştır. 300 ve 600 mg/kg/gün dozlarda pendimetalin rahim ağırlığında mutlak artışa ve 600 mg/kg/gün dozda pendimetalin rahim ağırlığında bağıl artışa neden olmuştur. Rahim ağırlığındaki bu artış, pendimetalin'in östrojenik etkili olabileceğini düşündürmüştür[66].

2.3. Herbisitlerin Genotoksik Etkileri

2.3.1. Herbisitlerin Mutajenite Testleriyle Gözlenen Etkileri

2.3.1.1. Herbisitlerin Gen Mutasyon Testleriyle Gözlenen Mutajenik Etkileri

Kloroaset anilid türevi herbisitler ve bunların metabolitlerinin bakteriyel mutajenik etkileri *Salmonella typhimurium*'un TA98 ve TA100 suşlarıyla yapılan bir çalışmada araştırılmıştır. Bu çalışmada dietil kinoiminin TA98 ve TA100 suşlarındaki etkisiz histidin proteinini etkin hale çevirip çevirmediği test edilmiştir. Dietil kinoiminin 10 µg/petri ve 30 µg/petri dozlarında TA98 suşu üzerindeki etkisinin negatif kontrol ile hemen hemen aynı olduğu gözlenmiştir. Buna karşılık 30 µg/petri dozunda TA100 suşunda mutasyon sıklığında artışa neden olduğu saptanmıştır. Gözlenen bu etkinin pozitif kontrol olan 5 µg/petri Sodyum Azid'ten 7 kat daha düşük oranda seyrettiği bildirilmiştir. Dolayısıyla *Salmonella typhimurium*'un TA100 suşunda zayıf mutajenik etkili olan dietil kinoimin, TA98 suşunda mutajenik etkili değildir.

Triazinilsülfonil üre türevi herbisitlerde *Salmonella typhimurium* ve Çin hamster over (CHO) hücrelerinde *in vitro* gen mutasyonları negatif sonuç vermiştir[67,68].

2.3.1.2. Herbisitlerin Sitogenetik Testlerle Gözlenen Mutajenik Etkileri

a) Herbisitlerin Yapısal ve Sayısal Kromozom Hasar Testlerine Etkisi

Kromozom hasarları, genetik hasar düzeyini değerlendirmede sıklıkla dikkate alınan bir biyolojik bulgudur. İnsan periferik lenfositlerinin, alaklor ve maleik hidrazit ile muamelesi sonucu lenfositlerdeki kromozom hasarlarında belirgin artış tespit edilmiştir.

Bifenoks'un sığır periferik lenfositlerindeki genotoksitesinin değerlendirilmesi için yapılan bir çalışmada, kültürü yapılan lenfositlere 25, 50, 250, 500 ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarda herbisit madde uygulanmıştır. 25 ila 250 µg doz aralığında 24 saat süreyle herbisite maruz bırakılan lenfositlerde hafif düzeyde kromozom hasarları gözlenmiştir. Herbisitin 500 ve 1000 µg/ml

konsantrasyonlarında mitotik indeks inhibisyonuna bağı olarak kromozom hasar sıklığında bir azalma gözlenmiştir[69].

b) Herbisitlerin Kardeş Kromatid Değişimine Etkileri

Alaklor ve iki alkilanilin herbisitinin muhtemel genotoksikite ve sitotoksikite belirlenmesi amacıyla CHO hücreleriyle, 48 saat inkübasyonları yapılmıştır. Dietilanilin 3 µg ve 30 µg, etilmetilanilin 30 µg dozlarında metafaz II safhasında olan hücre sayısında, metafaz III fazında olan hücre yüzdesindeki düşüş karşılık gelen miktarda artış gözlenmiştir. Alaklor'un 10 µM ve dietilanilin 3 µM ve 30 µM dozlarında metafaz II safhasındaki hücrelerde kardeş kromatid değişimini artırdığı bulunmuştur. Ancak etil metilanilin 30 µM dozda bu etkiye neden olmadığı görülmüştür.

İnsan lenfosit hücrelerinde alaklor ve analogu altı herbisitinin (butaklor, asetaklor, metaklor, dimetaklor, dimetenamid ve propaklor) kardeş kromatid değişimine etkileri incelenmiştir. Çalışmada sadece alaklor'un 10 µM dozda kardeş kromatid oranında belirgin artışa neden olduğu, propaklorun 1 µM ve asetaklorun 10µM dozlarında kardeş kromatid değişimine daha az etki ettiği ve butaklor, metaklor, dimetaklor ile dimetenamidin 10 µM dozlarında kardeş kromatid değişimi oranını artırmadığı görülmüştür[67].

c) Herbisitlerin Mikroçekirdek Oluşumuna Etkileri

Pirimidinil sülfonil üre türevi sülfosülfuronun *in vitro* sitogenetik testinde kültüre edilen insan lenfositlerinde hem metabolik aktivasyonlu hem de aktivasyonsuz şartlarda, 100, 250, 500, 750, 1000 µg/ml konsantrasyonlarda etkisi incelenmiştir. Mitotik indekste % 14,9'dan % 66,7'ye kadar bir azalma gözlenmiştir[70].

Pendimetalin'in fare kemik iliği hücresinde kromozomal hasarları ve mikroçekirdek oluşumunu artırdığı gösterilmiştir.

Sıkça kullanılan bir herbisit olan 2,4-dinitroanilin insan lenfosit hücresinde mikroçekirdek oluşumuna etkisinin araştırıldığı bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada kandan izole edilmiş lenfositlere ve tüm kana saf 2,4-dinitro anilin ile bu bileşiğin 0.001mM ve 1mM aralığında değişen konsantrasyonları 48 saat süreyle muamele edilmiştir. 2,4-dinitroanilin, tüm kan içerisindeki lenfositlerde mikroçekirdek

oluşumunu düşük düzeyde arttırırken, izole edilmiş lenfositlerde mikroçekirdek oluşumuna etkisinin daha da az olduğu görülmüştür. Mikroçekirdek oluşumunda görülen artışın sadece hücre canlılığındaki azalma oranında olduğu belirtilmiştir[71].

2.3.1.3. Herbisitlerin Diğer Mutajenite Testleriyle Gözlenen Etkileri

CHO hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, hücreler 10, 100, 1000 ve 10000 μM konsantrasyonlarda pendimetalin ile 3 saat inkübe edilmiştir. Sonuçlar, standart sapma ile birlikte % mitokondri etkinliği olarak verilmiştir. 1000 μM konsantrasyonda pendimetalin uygulanan CHO hücrelerinde mitokondri etkinliği % 65'e, 10 000 μM konsantrasyonda pendimetalin uygulanan CHO hücrelerinde mitokondri etkinliği % 54'e düşmüştür.

CHO hücrelerinde 0.01, 0.1, 1, 10 ve 100 μM konsantrasyonlarda PM'nin neden olduğu DNA hasarı kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve % kuyruklu DNA miktarı yönünden değerlendirilmiştir. DNA hasarı kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve % kuyruklu DNA miktarı cinsinden değerlendirildiğinde, 0.1, 10 ve 100 μM konsantrasyonda PM'nin CHO hücrelerinde yaptığı DNA hasarının negatif kontrole kıyasla istatistiksel olarak önemli ölçüde fazla olduğu gözlenmiştir[72].

Atrazin'in mutajenik ve genotoksik etkileri *O. niloticus*'un eritrosit hücreleri ile yapılan bir çalışma ile araştırılmıştır. Çalışmada mikroçekirdek oluşumu, diğer çekirdek anormalileri (çift çekirdek oluşumu ve benzeri) ve DNA göçü incelenmiştir[73].

2.3.2. Herbisitlere Çevresel ya da Mesleki Olarak Temas Eden Bireylerde Gözlenen Genotoksik Etkiler

Çeşitli herbisitler çevre kirleticisi olarak insan ve hayvanlara toksik etkiyecek düzeye erişmişlerdir. İlaçlama alanında çalışan erkeklerde cinsiyet hormonları ve pestisit maruziyeti arasında ilişki olduğu yapılan çalışmalarla saptanmıştır[74].

Pendimetalin N-nitrozo bileşikleri ve nitrozamin safsızlıkları içerir. N-nitrozo bileşikleri insanda muhtemel karsinojen olarak sınıflandırılır. Pendimetalin'e 7 yıldan daha az süreyle maruz kalan zirai çalışanlarda ortaya çıkan pankreas kanseri vakaları incelenmiş ve pendimetalin'in pankreas kanserine yakalanma riskini anlamlı ölçüde arttırdığı görülmüştür[75].

2.4. Tek Hücre Jel Elektroforez “COMET” Yöntemi

Tek hücre jel elektroforez yöntemi ilk kez 1984 yılında Ostling ve Johanson tarafından tek hücrede DNA hasarını görüntülemek amacıyla geliştirilmiştir[76]. Memeli hücrelerinde DNA kırıklarını inceleyen ve ölçen, basit, hızlı ve duyarlı bu yöntemde mikroskop lamı üzerindeki ince bir agar jeline emdirilmiş az sayıda hücre lize edildikten sonra elektroforeze tabi tutulur; elektrik akımı uygulanması, kırılmış ve hafiflemiş DNA parçalarının çekirdekten hızla göçünü sağlar. DNA, bağlayıcı floresans bir boya ile boyanır, görünüşleri kuyruklu yıldıza benzediğinden “COMET” diye adlandırılan bu görüntüler ölçülüp değerlendirilir.

Tek hücre jel elektroforez yöntemi tek bir hücrede DNA hasarının doğrudan tayininin yanı sıra bir gruptaki tüm hücrelerin aynı oranda hasara uğrayıp uğramadığının tespitine de olanak sağlar. Herhangi bir tedavi sırasında hücrelerin heterojen cevabının ve radyoterapi ve kemoterapi tedavi protokollerinde tümör cevabının öngörülmesine yardımcı olabilir. Tek hücre jel elektroforez yöntemi; DNA hasar ve onarımını ve mekanizmalarını pek çok deneysel şartlarda inceler ve tek hücre süspansiyonu şeklinde elde edilebilen her ökaryotik hücrede DNA hasar ve onarımını saptayabilir.

“COMET” tekniği tek hücrede DNA hasarını ölçtüğünden incelenen bileşiklerin genotoksitesini hızlı öngörmede bir bileşiğin DNA onarımını değiştirip değiştirmeyeceği hakkında bilgi sağlamada da yararlıdır. Tek hücre jel elektroforez yönteminde çok az sayıda hücre gerektiğinden küçük hacimde insan biyopsi örneklerinde, deney hayvanlarının herhangi bir dokusunda, DNA kırılmalarının boyutlarını saptamak olasıdır. Ayrıca işlem hızlıdır, birkaç saat içinde gerçekleşir ve duyarlılığı yüksektir. Oysa DNA kırılmalarını tespit eden standart alkali elüsyon tekniği gibi yöntemlerde fazla hücreye gerek vardır ve işlem uzundur. Yöntemdeki uygulama farklılıklarının çoğu elektroforez esnasında görülür ve uygulanan voltaj, elektroforez zamanı, tampondaki tuz konsantrasyonu ve DNA hasar düzeyi değerlendirilmesi ile ilişkilidir. “COMET” yöntemi hasar görmüş DNA’nın elektroforez ile çekirdekten salınması prensibine dayanır. Kuyruklu yıldız “COMET” oluşum şekillerini değerlendirmek ve tayinini yapmak için pek çok farklı çalışma yapılmaktadır. Değerlendirme tekniklerinin en basiti hasar boyutuna dayalı bir şekilde hücreleri ampirik olarak gözle kaydetmektedir. Hücredeki DNA en basit

şekliyle hasarlı, hasarsız şeklinde görünüşlerine göre değerlendirilebilir. Gözlemler için 515-600 nm’lik eksitasyon filtreli epi-floresan mikroskop kullanılır. Günümüz teknolojisinde daha detaylı ve geniş incelemeye otomatik olanak sağlayan görüntülü analiz sistemleri ile floresan mikroskoptan elde edilen görüntüler bilgisayar ortamına aktarılır. DNA hasarı; DNA göçü “COMET” (kuyruklu yıldız) uzunluğu (mm), “COMET” baş çap, “COMET” alanı ya da “COMET” momenti olarak da değerlendirilir.

Tek hücre jel elektroforez “COMET” yöntemi son yıllarda farklı laboratuvarlarda çeşitli değişikliklerle uygulanan, tek ve çift zincir kırıklarının tayinini kolaylaştıran bir yöntemdir. DNA tek ve çift zincir kırıklarının tayini için nötral ve alkali lizis uygulanabilirken, alkali labil bölgelerin analizi sadece alkali lizis uygulanarak gerçekleştirilebilmektedir. Hayvan ve klinik örneklerden alınan dokularda ve diğer örneklerde DNA hasar ve onarımını ölçmek için örneklerin izole bir süspansiyonu ek bir hasara veya onarıma yol açmayacak şekilde hazırlanmalıdır. En fazla insan lenfosit hücresi kullanılmaktadır, ancak pek çok parametrenin lenfosit cevabını etkilediği; vericinin yaşı, fiziksel aktivitesi, sigara içip içmediği gibi olası etmenlerin hücre cevabında farklılık yaratabildiği ve bireyler arası farklılıkların olabileceği unutulmamalıdır. *In vivo* hayvan çalışmalarında kan, karaciğer ve burun mukoza hücreleri kullanılabilir. *In vitro* toksikokinetik çalışmalarda burun mukoza hücreleri, lenfositler ve lenfoblastoit hücreler, akciğer hücreleri, mide-bağırsak kanalı hücreleri (yemek borusu, oniki parmak bağırsığı, kolon mukozası) incelenebilir. Özellikle izleme çalışmalarında mesleki veya kazai olarak çevresel veya işyeri kaynaklı çeşitli maddelere maruz kalan kişilerde DNA hasarının incelenmesinde kullanılan bir yöntemdir[77-79].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Sigma
Düşük Erime Noktalı Agar (LMPA)	Boehringer Mannheim
Etidiyum Bromür (EtBr)	Sigma
Etil Alkol	Merck
Etilen Diamin Tetraasetik Asit, Disodyum Tuzu (EDTA)	ICN
Sığır serum albümin (FCS) (steril)	Sigma
Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik (PBS)	Sigma
Heparin Sodyum (5.000 U/ml)	Nevparine
Formamido pirimidin glikozilaz (Fpg)	Sigma
Hidrojen Peroksit (%35)	Merck
Hidroklorik Asit (%37)	Merck
Ficoll (Histopaque-1077)	Sigma
İzotonik Sodyum Klorür (% 0.9) (Serum Fizyolojik)	Eczacıbaşı-Baxter
Orta erime noktalı agar (MEE0)	Roth
Metil Alkol	Merck
N-Lauril Sarkosinat Sodyum Tuzu	ICN
Normal Erime Noktalı Agar (NMPA)	Boehringer Mannheim
Pendimetalin	Sigma-Aldrich
Penisilin Streptomisin	Sigma-Aldrich
RPMI 1640 Vasatı	Sigma
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Merck
Sodyum Klorür (NaCl)	Merck

Tripsin	Sigma-Aldrich
Tris	ICN
Triton x-100	Sigma
Zeytinyağı	Eğaş

3.2. Kullanılan Kültür Hücresi

Çin Hamster Over Hücresi (CHO)	T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Şap Enstitüsü
--------------------------------	---

3.3. Kullanılan Araç ve Gereçler

Comet Bilgisayarlı Görüntüleme Sistemi	Comet Analysis Software, version 3.0 Kinetic Imaging
Deiyonize Su Cihazı	Easypure UV
Derin Dondurucu (-20 ⁰ C)	Ariston
Derin Dondurucu (-80 ⁰ C)	Revco
Elektroforez	Biometra Analitik
Elektroforez Güç Kaynağı	Power Pack P 25
Etüv	Dedeoğlu
Flask (steril, 25cm ² ve 75 cm ²)	TPP®
Floresan Mikroskop	Leica
Hücre Kültür Plağı (6 kuyucuklu ve 96 kuyucuklu)	Cellstar®
Isıtıcı	Multi-Blok, Lab-Line
İnkübatör	Heraeus Instruments
Kırık Buz Makinası	Scotsman AF100

Karıştırıcı-Isıtıcı	Jankel&Kunkel, Ikamag
Lam (26x76mm)	Marienfeld
Lamel (24x60mm)	Marienfeld
Laminar Flow	Kojair KR 105
Manyetik Karıştırıcı	Stuart Scientific
Mikrodalga Fırın	Vestel
Mikropipetler	Finnpipette, Gilson
1-10µl, 0,5-40µl, 40-200µl, 200-1000µl, 1-5ml	
Mikrosantrifüj	Hettich Micro 12-24
Otoklav	Rodwell Monarch MP 24
pHmetre	Cyberscan
Santrifüj	Heraeus, Hettich
Spektrofotometre	SpektraMax M2
Terazi	Schimadzu Libror
Ultrasonik Banyo	Transsonic 460/H
Vakum Pompası	Welch Vacuum
Vorteks	Heidolph Reax 2000

3.4. Kullanılan Çözeltiler

3.4.1. Tek Hücre Jel Elektroforez “COMET” Yöntemiyle DNA Hasarının Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

Düşük Erime Noktalı Agar (LMPA) Çözeltisi

125 mg LMPA tartılır. Kaynar su banyosu kullanılarak 25 ml PBS içinde çözülür. Küçük hacimler halinde buzdolabında saklanır.

Elektroforez Tampon Çözeltisi

1705 ml soğuk distile su, 52.8 ml 10 N NaOH, 8.8 ml 200 mM EDTA çözeltisi karıştırılır. Deney günü taze hazırlanır.

Etanol Çözeltisi (% 75)

% 99.8’lik mutlak etanol çözeltisinden 225.5 ml alınır, 300 ml’ye distile suyla tamamlanır.

Etanol Çözeltisi (% 50)

% 99.8’lik mutlak etanol çözeltisinden 150.3 ml alınır, 300 ml’ye distile suyla tamamlanır.

Etidiyum Bromür Çözeltisi

10 mg etidiyum bromür 50 ml distile suda çözülerek 200 µg/ml’lik stok etidiyum bromür çözeltisi hazırlanır. Oda sıcaklığında karanlıkta saklanır. Stok etidiyum bromür çözeltisinden 1 ml alınıp, distile su ile 10 ml’ye tamamlanarak 20 µg/ml’lik etidiyum bromür çözeltisi hazırlanır. Oda sıcaklığında karanlıkta saklanır.

200 mM EDTA Çözeltisi

14.89 g EDTA 200 ml distile suda çözülüp pH 10’a ayarlanır. Oda sıcaklığında saklanır.

Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik Çözeltisi (PBS)

1 PBS tableti 200 ml distile suda çözülür. 4 °C'de saklanır.

Formamido Pirimidin Glikozilaz (Fpg) Enzim Tampon Çözeltisi

2.42 g TrisHCl, 5.84 g NaCl, 0.37 g Na₂EDTA 1 litre distile su içerisinde çözülür. % 37'lik HCl ile pH 7.5'a ayarlanır.

1 ml Formamido Pirimidin Glikozilaz (Fpg) Enzim Çözeltisi

0.5 mg sığır serum albumini ve 1.45 µl Fpg enzimi 1 ml Fpg enzimi tampon çözeltisinde karıştırılarak taze hazırlanır.

0.1 M H₂O₂ Çözeltisi

% 35'lik H₂O₂ çözeltisinden 9.7 µl alınır, 4°C'de 990.3 µl distile su ile 1 ml'ye tamamlanır. Çözelti 1 hafta buzdolabında saklanabilir.

1 mM H₂O₂ Çözeltisi

Deney günü 0.1 M H₂O₂ çözeltisinden 20 µl alınıp 4°C'de 1980 µl PBS ilave edilerek 1 mM H₂O₂ çözeltisi hazırlanır

50 µM H₂O₂ Çözeltisi

50 µl 1 µM H₂O₂ üzerine 950 µl 4°C'deki PBS çözeltisi ilave edilir

Lizis Çözeltisi

146.1 g NaCl, 37.2 g EDTA, 1.2 g Tris tartılıp 500 ml distile suda çözülür. 10 g NaOH eklenerek pH 10'a ayarlanır. 10 g N-Lauril sarkosinat sodyum tuzu eklenir. Distile suyla 890 ml'ye tamamlanıp çözününceye kadar karıştırılarak stok lizis çözelti hazırlanır. Oda sıcaklığında saklanır.

178 ml stok lizis çözelti, 2 ml Triton x-100 ve 20 ml DMSO ile karıştırılır. Deney günü taze hazırlanır, kullanılacağı zamana kadar buzdolabında tutularak soğuk çözeltisi kullanılır.

10 N NaOH

200 g NaOH 500 ml distile suda çözülür. Oda sıcaklığında saklanır.

Normal Erime Noktalı Agar (NMPA) Çözeltisi

500 mg NMPA tartılır. Kaynar su banyosu kullanılarak 50 ml PBS içinde çözülür. Lamlar bu çözeltiye daldırılır ve bir tarafı silindikten sonra kurumaya bırakılır.

Nötralizasyon Tampon Çözeltisi

48.5 mg tris 750 ml distile suda çözülüp pH 7.5'e ayarlanır. Distile suyla 1000 ml'ye tamamlanır. Oda sıcaklığında saklanır.

Orta Erime Noktalı Agar (MEEO) Çözeltisi

0.75 g MEEO 100 ml PBS içinde çözülür. Buzdolabında saklanır.

500 mM Pendimetalin Çözeltisi

42.2 mg pendimetalin 300 µl DMSO: Zeytinyağı (1:3, v/v) çözeltisi içinde ultrasonik banyoda çözülür. Kısımlar halinde -80°C'de saklanır.

0.5 mM Pendimetalin Çözeltisi

500 mM pendimetalin çözeltisinden 3 µl alınır. 2997 µl PBS ilave ederek son hacim 3 ml'ye tamamlanır.

3.5. Lenfosit Örneklerine Pendimetalin Uygulaması Sonucu Tek Hücre Jel Elektroforez “COMET” Yöntemiyle DNA Hasarının Belirlenmesi

1. İçinde 0.1 ml heparin bulunan steril enjektörle sağlıklı vericiden 5 ml kan örneği alındı.
2. Alınan kan örneği 5 ml PBS ile 1:1 oranında seyreltildi.
3. 2 ml *Ficoll* (*Histopaque-1077*) üzerine seyreltilmiş kan örneği Pastör pipetiyle yavaşça yayıldı.
4. Oda sıcaklığında 2300 rpm’de 20 dakika süreyle santrifüj edildi.
5. Santrifüj işlemi sonunda *Ficoll* üzerindeki interfazda ince bir tabaka halinde bulunan lenfositler Pastör pipetiyle dikkatle alındı.
6. Alınan lenfositler steril tüpe kondu ve üzerine PBS eklendi. 2300 rpm’de 10 dakika süreyle santrifüj edildi.
7. Süpernatant atılarak çöken kısımdaki hücreler *Neubauer* lamında sayıldıktan sonra PBS ile seyreltilerek 50 µl’de 5×10^4 hücre olması sağlandı.
8. 50 µl hücre süspansiyonu eppendorf tüplere alındı. Çözeltideki DMSO konsantrasyonu % 0.5’i ve zeytinyağ konsantrasyonu % 0.05’i aşmayacak şekilde pendimetalin’in bu çözütüdeki çözeltilerinden uygun hacimler konularak son hacim PBS ile 1 ml’ye tamamlandı. 1, 10, 100, 1000 ve 10000 µM konsantrasyonlarda pendimetalin’in lenfosit DNA’sı üzerine etkileri incelendi. Negatif kontrol olarak % 0.5 konsantrasyonda DMSO ve % 0.05 zeytinyağı kullanıldı. Pozitif kontrol olarak 50 µM H_2O_2 kullanıldı. Tüm örnekler çift çalışıldı.
9. İncelenen bileşikler içeren hücre süspansiyonları $37 \pm 0.5^\circ C$ ’de 30 dakika bekletilerek inkübe edildi.
10. İnkübasyon sonunda hücreler 2300 rpm’de 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
11. Pozitif kontrol olarak 50 µM H_2O_2 kullanılacak hücelere inkübasyondan sonra $+4^\circ C$ ’de 950 µl PBS ve 50 µl 1 mM H_2O_2 çözeltisinden ilave edildi. 5 dakika buz banyosunda inkübe edildi. $+4^\circ C$ ’de 2300 rpm’de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. $+4^\circ C$ ’de 1 ml PBS ile 2300 rpm’de 5 dakika süreyle santrifüj edilerek hücreler yıkandı. Süpernatant atıldı.
12. $37 \pm 0.5^\circ C$ ’de eritilmiş 75 µl % 0.5’lik LMPA, 25 µl hücre süspansiyonu ile karıştırıldıktan sonra önceden % 1’lik NMPA çözeltisine daldırılıp agar ile

kaplanmış lamlara yayıldı ve üzerine lamel kapatıldı ve buzlu yüzey üzerinde 5 dakika bekletilerek agarın katılaşması sağlandı. Agar üzerindeki lamel zedelenmeden alındı.

13. Lamlar daha önceden hazırlanıp buzdolabında bekletilen soğuk lizis çözeltisine daldırılarak en az 1 saat süreyle buzdolabında bekletildi.
14. 50 μ M H₂O₂ uygulanan lamlar ayrı olarak soğuk lizis çözeltisine daldırılarak en az 1 saat süreyle buzdolabında bekletildi.
15. Takiben elektroforez işlemi uygulandı.
16. Elektroforez işlemi için tank soğuk elektroforez çözeltisi ile dolduruldu.
17. Lamlar agar yayılan kısımları üste gelecek şekilde elektroforez tankının içine yerleştirildi. Akım uygulamadan 20 dakika bekletildi.
18. 25 V ve 300 mA akım uygulayarak 20 dakika elektroforez uygulandı.
19. Elektroforez işlemi bittikten sonra alınan lamlar 5 dakika distile suda bekletildi.
20. Ardından lamlar 15 dakika nötralizasyon tampon çözeltisinde bekletildi.
21. Takiben lamlar sırasıyla 5'er dakika % 50'lik, % 75'lik ve %99'luk etanol çözeltisinde bekletildi.
22. Okuma öncesi lamların kuruması için en az 1 gün bekletildi.
23. Tüm bu işlemler ek bir DNA hasarını önlemek üzere karanlıkta yapıldı.
24. Deney, her bileşik için her konsantrasyon çift olmak üzere en az 3 kez tekrarlandı.
25. Lamların üzerine 60 μ l 20 μ g/ml etidiyum bromür çözeltisi ilave edildi.
26. Her örnek için 2 lama uygulama yapıldı ve her lamda 50 hücre ve toplam 100 hücre 40x objektif kullanılarak floresan mikroskopunda bilgisayarlı görüntüleme sistemi ile (Comet Analysis Software, version 3.0, Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK) değerlendirildi ve DNA hasar derecesinde kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu, kuyruk moment ve kuyruk göçü esas alındı.

3.6. Lenfosit Örneklerine Pendimetalin ve H₂O₂ Uygulanması Sonucu Oksidatif DNA Hasarına Duyarlılığın Belirlenmesi

1. 3.5'te anlatılan şekilde lenfosit hücre süspansiyonu elde edildi.
2. 25 µl hücre süspansiyonu eppendorf tüplere alındı. Çözeltilerdeki DMSO konsantrasyonu % 0.5'i ve zeytinyağ konsantrasyonu % 0.05'i aşmayacak şekilde pendimetalinin bu çözücüdeki çözeltilerinden uygun hacimler konularak son hacim PBS ile 1 ml'ye tamamlandı. 1, 10, 100, 1000 ve 10000 µM konsantrasyonlarda pendimetalin'in lenfosit DNA'sı üzerine etkileri incelendi. Negatif kontrol olarak % 0.5 konsantrasyonda DMSO ve % 0.05 zeytinyağ, pozitif kontrol olarak 50 µM H₂O₂ kullanıldı. Tüm örnekler çift çalışıldı.
3. İncelenen bileşikler içeren hücre süspansiyonları 37 ± 0.5 °C'de 30 dakika bekletilerek inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonunda hücreler 2300 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
5. Pozitif kontrol olarak 50 µM H₂O₂ kullanılacak hücrelere inkübasyondan sonra +4 °C'de 950 µl PBS ve 50 µl 1 mM H₂O₂ çözeltisinden ilave edildi. 5 dakika buz banyosunda inkübe edildi. + 4°C'de 2300 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. +4 °C'de 1 ml PBS ile 2300 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edilerek hücreler yıkandı. Süpernatant atıldı.
6. 37± 0.5 °C'de eritilmiş 75 µl % 0.5'lik LMPA, 25 µl hücre süspansiyonu ile karıştırıldıktan sonra önceden % 1'lik NMPA çözeltisine daldırılıp agar ile kaplanmış lamlara yayıldı ve üzerine lamel kapatıldı ve buzlu yüzey üzerinde 5 dakika bekletilerek agarın katılaşması sağlandı. Agar üzerindeki lamel zedelenmeden alındı.
7. Lamalar daha önceden hazırlanıp buzdolabında bekletilen soğuk lizis çözeltisine daldırılarak en az 1 saat süreyle buzdolabında bekletildi.
8. 3.5'te anlatılan şekilde elektroforez ve DNA hasar değerlendirme işlemi uygulandı.

3.7. Lenfosit Örneklerine Pendimetalin, H₂O₂ ve Fpg Enzim Çözeltisi Uygulanarak Gruplardaki Oksidatif DNA Hasar ve Onarımlarının Değerlendirilmesi

1. 3.6’da anlatılan şekilde lenfosit hücrelerine H₂O₂ uygulandı.
2. 25 µl lenfosit hücre süspansiyonu 37 ± 0.5 °C’de eritilmiş 75 µl % 0.5’lik LMPA ile karıştırıldıktan sonra önceden % 1’lik NMPA çözeltisine daldırılıp agar ile kaplanmış lamlara yayıldı ve üzerine lamel kapatıldı ve buzlu yüzey üzerinde 5 dakika bekletilerek agarın katılaşması sağlandı. Agar üzerindeki lamel zedelenmeden alındı.
3. Lamalar daha önceden hazırlanıp buzdolabında bekletilen soğuk lizis çözeltisine daldırılarak en az 1 saat süreyle buzdolabında bekletildi.
4. Lamalar lizis çözeltisinden çıkarıldı ve 3’er kez 5 dakika Fpg enzim tampon çözeltisinde bekletildi.
5. Lamaların dört köşesine 1’er damla MEEO agar damlatıldı. Agarın katılaşması için 1-2 dakika beklendi. Üzerine 200 µl Fpg enzim çözeltisi kondu ve üzerine lamel kapatıldı. 37 ± 0.5 °C’de 30 dakika bekletilerek inkübatörde (% 5 CO₂ ve % 95 O₂ içeren nemli atmosferde) inkübe edildi.
6. İnkübasyon sonrası lamaların üzerindeki lameller alındı ve distile suya daldırılıp çıkarıldı.
7. 3.5’te anlatılan şekilde elektroforez ve DNA hasar değerlendirme işlemi uygulandı.

3.8. CHO Hücrelerine Pendimetalin Uygulaması Sonucu Tek Hücre Jel Elektroforez “COMET” Yöntemiyle DNA Hasarının Belirlenmesi

1. Bu çalışma laminar flow altında steril koşullarda yapıldı. CHO hücreleri T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Şap Enstitüsü’nden alınarak çoğaltma işlemi yapıldı. Büyük boy kültür kabına 0.4x10⁶ hücre 25 ml RPMI 1640: % 10 FCS : Penisilin/Streptomisin (500ml:5ml:5ml; v/v/v) vasatı içine ekildi. 37 ± 0.5°C’de inkübatörde (% 5 CO₂ ve % 95 O₂ içeren nemli atmosferde) inkübe edildi.
2. 24 saat sonra flasktaki vasat steril pipetle vakumla atıldı ve üzerine 5 ml tripsin ilave edildi. 5-10 dakika hücrelerin süspande olması için inkübatörde bekletildi.
3. Üzerine 10 ml vasat ilave edildi.

4. Hücre süspansiyonu 1200 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant vakumla alındı.
5. Hücre pelleti vasat ile süspand edildi.
6. Hücre canlılığı Tripan Mavisi ile kontrol edildi. Ayrıca *Neubauer* lamında hücre sayımı yapıldı.
7. 50.000 hücre/50 µl vasat içinde 6 kuyucuklu plaklara ekildi.
8. Üzerlerine 1950 µl vasat konularak son hacim 2 ml'ye tamamlandı.
9. 24 saat inkübasyonu takiben vasat vakumla uzaklaştırıldı.
10. Pendimetalin uygulaması olarak; vasat içindeki pendimetalin test bileşiği ile CHO hücreleri 30 dakika inkübe edildi. 1, 10, 100, 1000 ve 10000 µM konsantrasyonlarda pendimetalin'in CHO hücresi DNA'sı üzerine etkileri incelendi.
11. Negatif kontrol olarak; DMSO konsantrasyonu % 0.5'i ve zeytinyağı konsantrasyonu % 0.05'i aşmayacak şekilde vasat içindeki çözeltisi ile CHO hücreleri 30 dakika inkübe edildi.
12. Pozitif kontrol olarak; 50 µM H₂O₂ uygulaması yapıldı. Bunun için 6 kuyucuklu plaklardaki ilgili vasat vakumla atıldı ve 50 µM H₂O₂ içeren vasat eklendi.
13. 5 dakika beklendi ve 50 µM H₂O₂ içeren vasat vakumla atıldı.
14. Hücreler steril PBS ile 1 kez yıkandı.
15. Takiben hücreler tripsinlendi. 200 µl tripsin eklenip 37 ± 0.5 °C'de 5-10 dakika inkübe edildi.
16. 1 ml vasat ilave edildi. Hücre süspansiyonu ependorf tüplerine alındı.
17. Hücre süspansiyonları 3000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
18. 37± 0.5 °C'de eritilmiş 75 µl % 0.5'lik LMPA, 25 µl hücre süspansiyonu ile karıştırıldıktan sonra önceden % 1'lik NMPA çözeltisine daldırılıp agar ile kaplanmış lamlara yayıldı ve üzerine lamel kapatıldı ve buzlu yüzey üzerinde 5 dakika bekletilerek agarın katılaşması sağlandı. Agar üzerindeki lamel zedelenmeden alındı.
19. Lamalar daha önceden hazırlanıp buzdolabında bekletilen soğuk lizis çözeltisine daldırılarak en az 1 saat süreyle buzdolabında bekletildi.

20. 50 μM H_2O_2 uygulanan lamalar ayrı olarak soğuk lizis çözeltisine daldırılarak en az 1 saat süreyle buzdolabında bekletildi.
21. İnkübasyon sonrası lamaların üzerindeki lameller alındı ve distile suya daldırılıp çıkarıldı.
22. 3.5'te anlatılan şekilde elektroforez ve DNA hasar değerlendirme işlemi uygulandı.

3.9. CHO Hücrelerine Pendimetalin ve H_2O_2 Uygulanması Sonucu Oksidatif DNA Hasarına Duyarlılığın Belirlenmesi

1. 3.8'de anlatılan şekilde 50.000 CHO hücre/50 μl vasat içinde 6 kuyucuklu plaklara ekildi.
2. Üzerlerine 1950 μl vasat konularak son hacim 2 ml'ye tamamlandı.
3. 24 saat inkübasyonu takiben vasat vakumla uzaklaştırıldı.
4. Pendimetalin uygulaması olarak; vasat içindeki pendimetalin test bileşiği ile CHO hücreleri 30 dakika inkübe edildi. 1, 10, 100, 1000 ve 10000 μM konsantrasyonlarda pendimetalin'in CHO hücresi DNA'sı üzerine etkileri incelendi.
5. Negatif kontrol olarak; DMSO konsantrasyonu % 0.5'i ve zeytinyağ konsantrasyonu % 0.05'i aşmayacak şekilde vasat içindeki çözeltisi ile CHO hücreleri 30 dakika inkübe edildi.
6. Pozitif kontrol olarak; 50 μM H_2O_2 uygulaması yapıldı. Bunun için 6 kuyucuklu plaklardaki ilgili vasat vakumla atıldı ve 50 μM H_2O_2 içeren vasat eklendi.
7. 5 dakika beklendi ve 50 μM H_2O_2 içeren vasat vakumla atıldı.
8. Hücreler PBS ile 1 kez yıkandı.
9. Takiben hücreler tripsinlendi. 200 μl tripsin eklenip 37 ± 0.5 $^\circ\text{C}$ 'de 5-10 dakika inkübe edildi.
10. 1 ml vasat ilave edildi. Hücre süspansiyonu ependorf tüplerine alındı.
11. Hücre süspansiyonları 3000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
12. 37 ± 0.5 $^\circ\text{C}$ 'de eritilmiş 75 μl % 0.5'lik LMPA, 25 μl hücre süspansiyonu ile karıştırıldıktan sonra önceden % 1'lik NMPA çözeltisine daldırılıp agar ile

kaplanmış lamlara yayıldı ve üzerine lamel kapatıldı ve buzlu yüzey üzerinde 5 dakika bekletilerek agarın katılaşması sağlandı. Agar üzerindeki lamel zedelenmeden alındı.

13. Lamalar daha önceden hazırlanıp buzdolabında bekletilen soğuk lizis çözeltisine daldırılarak en az 1 saat süreyle buzdolabında bekletildi.
14. 50 μM H_2O_2 uygulanan lamalar ayrı olarak soğuk lizis çözeltisine daldırılarak en az 1 saat süreyle buzdolabında bekletildi.
15. İnkübasyon sonrası lamaların üzerindeki lameller alındı ve distile suya daldırılıp çıkarıldı.
16. 3.5'te anlatılan şekilde elektroforez ve DNA hasar değerlendirme işlemi uygulandı.

3.10. CHO Hücrelerinde H_2O_2 ve Fpg Enzim Çözeltisi Uygulanarak Gruplardaki Oksidatif DNA Hasar ve Onarımlarının Değerlendirilmesi

1. 3.8'de anlatılan şekilde 50.000 CHO hücre/50 μl vasat içinde 6 kuyucuklu plaklara ekildi.
2. Üzerlerine 1950 μl vasat konularak son hacim 2 ml'ye tamamlandı.
3. 24 saat inkübasyonu takiben vasat vakumla uzaklaştırıldı.
4. Pendimetalin uygulaması olarak; vasat içindeki pendimetalin test bileşiği ile CHO hücreleri 30 dakika inkübe edildi. 1, 10, 100, 1000 ve 10000 μM konsantrasyonlarda pendimetalin'in CHO hücresi DNA'sı üzerine etkileri incelendi.
5. Negatif kontrol olarak; DMSO konsantrasyonu % 0.5'i ve zeytinyağ konsantrasyonu % 0.05'i aşmayacak şekilde vasat içindeki çözeltisi ile CHO hücreleri 30 dakika inkübe edildi.
6. Pozitif kontrol olarak; 50 μM H_2O_2 uygulaması yapıldı. Bunun için 6 kuyucuklu plaklardaki ilgili vasat vakumla atıldı ve 50 μM H_2O_2 içeren vasat eklendi.
7. 5 dakika beklendi ve 50 μM H_2O_2 içeren vasat vakumla atıldı.
8. Hücreler PBS ile 1 kez yıkandı.
9. Takiben hücrelere tripsinleme yapıldı. 200 μl tripsin eklenip 37 ± 0.5 $^\circ\text{C}$ 'de 5-10 dakika inkübe edildi.

10. 1 ml vasat ilave edildi. Hücre süspansiyonu ependorf tüplerine alındı.
11. Hücre süspansiyonları 3000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
12. 37 ± 0.5 °C'de eritilmiş 75 µl % 0.5'lik LMPA, 25 µl hücre süspansiyonu ile karıştırıldıktan sonra önceden % 1'lik NMPA çözeltisine daldırılıp agar ile kaplanmış lamlara yayıldı ve üzerine lamel kapatıldı ve buzlu yüzey üzerinde 5 dakika bekletilerek agarın katılaşması sağlandı. Agar üzerindeki lamel zedelenmeden alındı.
13. Lamalar daha önceden hazırlanıp buzdolabında bekletilen soğuk lizis çözeltisine daldırılarak en az 1 saat süreyle buzdolabında bekletildi.
14. 50 µM H₂O₂ uygulanan lamalar ayrı olarak soğuk lizis çözeltisine daldırılarak en az 1 saat süreyle buzdolabında bekletildi.
15. Fpg uygulaması yapılacak olan lamalar lizis çözeltisinden çıkarıldı ve 3'er kez 5 dakika Fpg enzim tampon çözeltisinde bekletildi.
16. Lamaların dört köşesine 1'er damla MEEO agar damlatıldı. Üzerine 200 µl Fpg enzim çözeltisi kondu ve üzerine lamel kapatıldı. 37 ± 0.5 °C'de 30 dakika bekletilerek inkübatörde (% 5 CO₂ ve % 95 O₂ içeren nemli atmosferde) inkübe edildi.
17. İnkübasyon sonrası lamaların üzerindeki lameller alındı ve distile suya daldırılıp çıkarıldı.
18. 3.5'te anlatılan şekilde elektroforez ve DNA hasar değerlendirme işlemi uygulandı.

3.11. İstatistiksel Yöntemler

Sonuçlar ortalama $\pm$ ortalama standart hata olarak verildi. Windows işletim sistemi için SPSS 11.5 programı kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testiyle yapıldı. Grup farklılıkları tek yönlü varyans analizi (ANOVA), LSD test ile belirlendi ve $p < 0.05$, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Lenfosit Örneklerinde Tek Hücre Jel Elektroforez “COMET” Yöntemiyle DNA Hasarının Belirlenmesi

4.1.1. Lenfosit Örneklerinde Pendimetalinin DNA Hasar Etkisine İlişkin Bulgular

1, 10, 100, 1000 ve 10 000 μ M konsantrasyonlarda Pendimetalin (PM)'in *in vitro* periferik kan lenfositlerinde oluşturduğu DNA hasarına ilişkin 3 ayrı deneyin sonuçları Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Tabloda, toplam hücre sayısı üzerinden değerlendirilen ortalama kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk göçü ve bunların standart hataları verilmiştir. (Tablo 4.1.; Şekil 4.1. ve 4.2.).

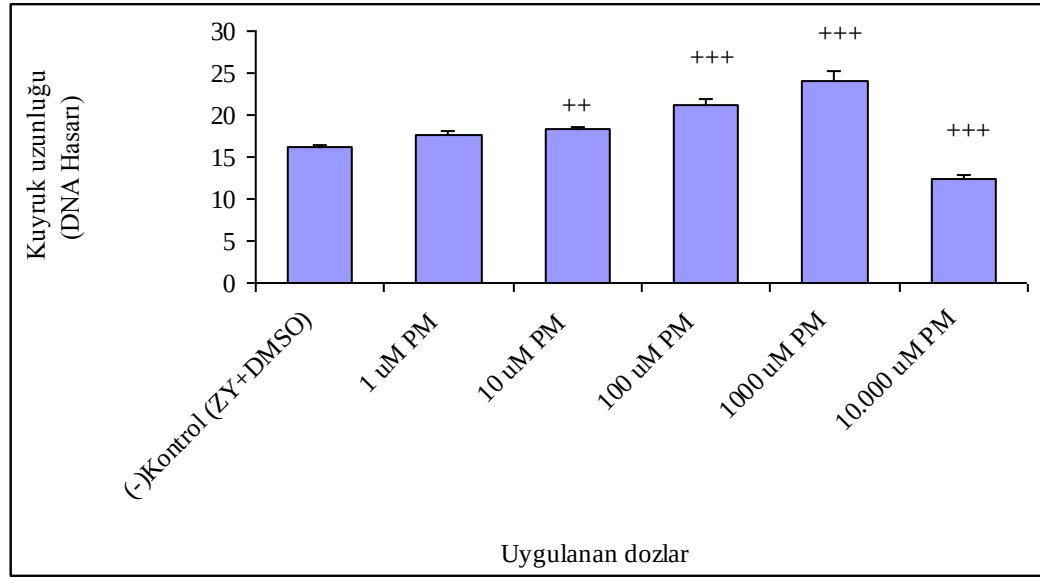
Tablo 4.1. Pendimetalin'in (PM) lenfositlerde DNA hasarına ilişkin bulgular *

		Kuyruk Uzunluğu
1	(-) Kontrol [DMSO(%0,5)+ZY(%0,02)]	16,2 ± 0,14
2	1 µM PM	17,65 ± 0,39
3	10 µM PM	18,3 ± 0,37 ++
4	100 µM PM	21,09 ± 0,80 +++
5	1000 µM PM	24,16 ± 0,97 +++
6	10 000 µM PM	12,49 ± 0,40 +++
		Kuyruk Yoğunluğu
1	(-) Kontrol [DMSO(%0,5)+ZY(%0,02)]	2,12 ± 0,26
2	1 µM PM	1,59 ± 0,25
3	10 µM PM	3,27 ± 0,55
4	100 µM PM	6,51 ± 0,92 +++
5	1000 µM PM	9,10 ± 1,17 +++
6	10 000 µM PM	3,66 ± 0,37
		Kuyruk Momenti
1	(-) Kontrol [DMSO(%0,5)+ZY(%0,02)]	0,27 ± 0,04
2	1 µM PM	0,24 ± 0,05
3	10 µM PM	0,50 ± 0,11
4	100 µM PM	1,28 ± 0,25 +++
5	1000 µM PM	1,78 ± 0,33 +++
6	10 000 µM PM	0,29 ± 0,03
		Kuyruk Göçü
1	(-) Kontrol [DMSO(%0,5)+ZY(%0,02)]	1,00 ± 0,14
2	1 µM PM	2,61 ± 0,38 +
3	10 µM PM	2,80 ± 0,41 +
4	100 µM PM	5,23 ± 0,74 +++
5	1000 µM PM	10,15 ± 0,98 +++
6	10 000 µM PM	2,43 ± 0,41

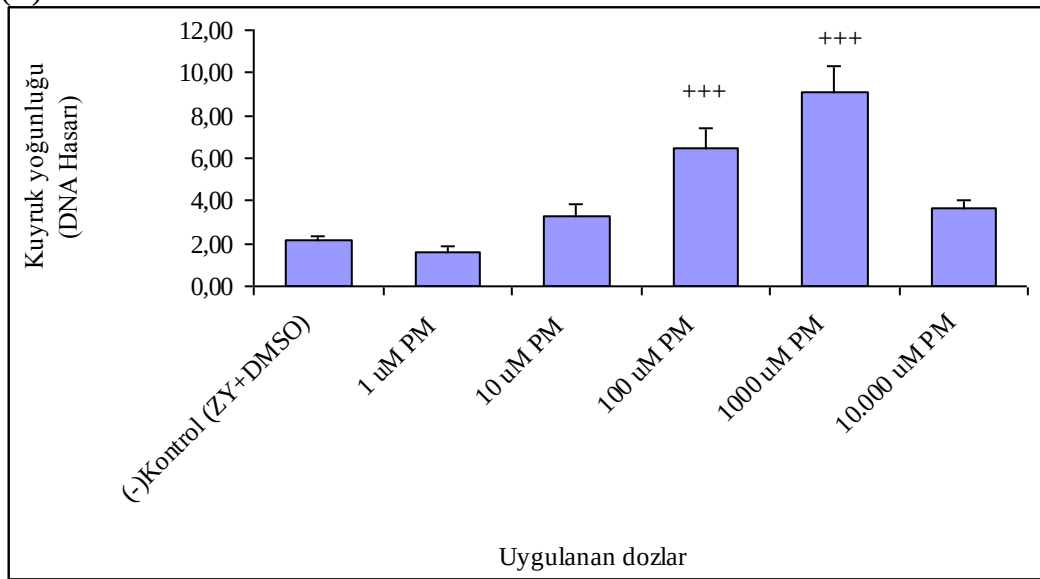
^a Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeridir ve sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

⁺p<0.05, ⁺⁺p<0.01, ⁺⁺⁺p<0.001, negatif kontrol [DMSO(%0,5)+ZY(%0,02)] ile kıyaslanmıştır.

(A)



(B)

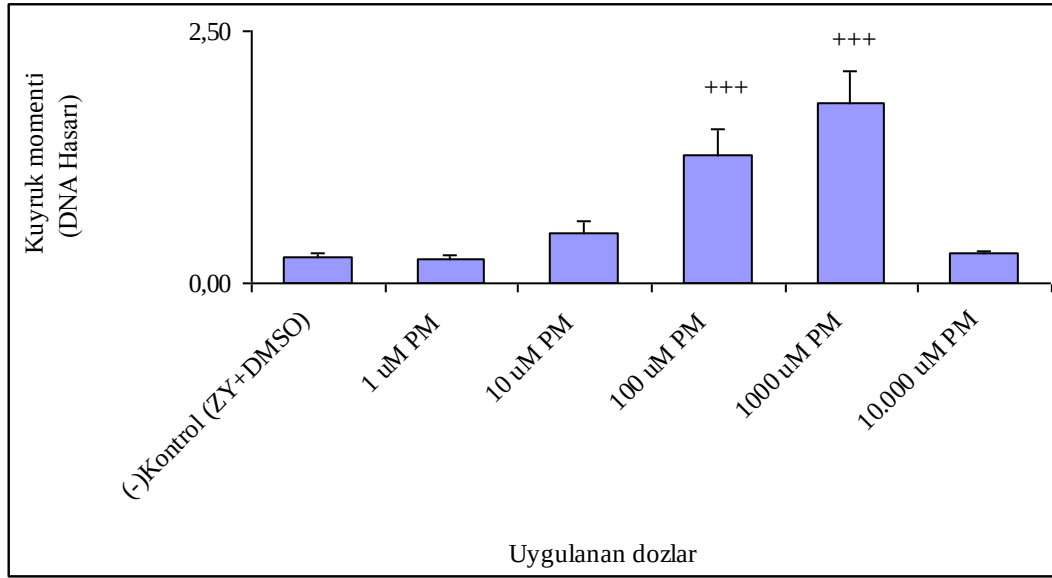


Şekil 4.1. Pendimetalin'in (PM) lenfositlerdeki DNA hasarına ilişkin bulgular*

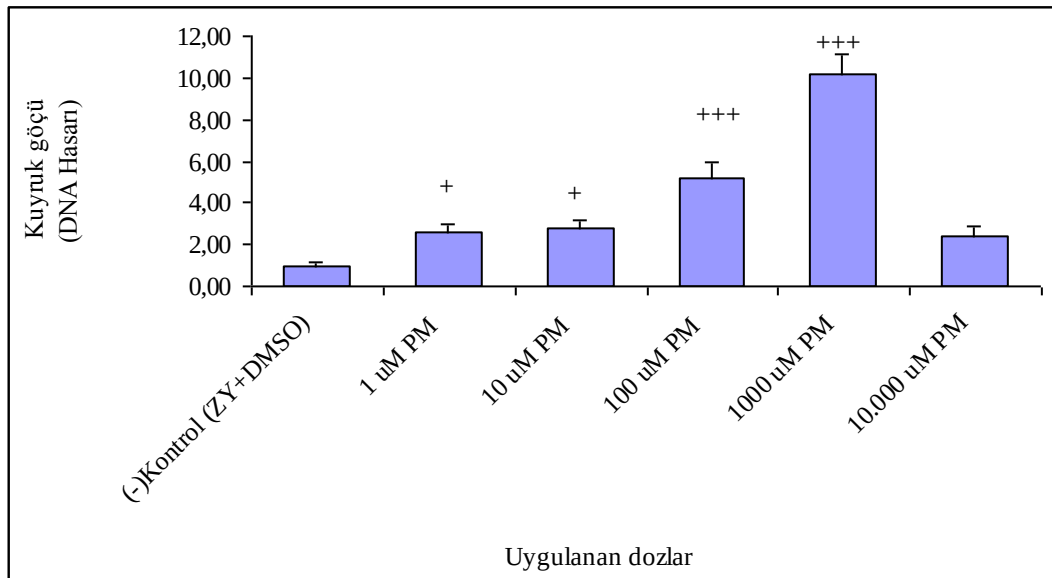
^a Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeridir ve sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir.

⁺p<0.05, ⁺⁺p<0.01, ⁺⁺⁺p<0.001, negatif kontrol [DMSO(%0,5)+ZY(%0,02)] ile kıyaslanmıştır.

(A)



(B)



Şekil 4.2. Pendimetalin'in (PM) lenfositlerde DNA hasarına ilişkin bulgular *

^a Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeridir ve sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir.
⁺p<0.05, ⁺⁺p<0.01, ⁺⁺⁺p<0.001, negatif kontrol [DMSO(%0,5)+ZY(%0,02)] ile kıyaslanmıştır.

DNA hasarı kuyruk uzunluğu cinsinden değerlendirildiğinde, PM'in negatif kontrol ile kıyaslandığında 1 μM konsantrasyonda lenfositlerde önemli bir DNA hasarı oluşturmadığı ancak 10 μM ve üzerindeki konsantrasyonlarda yaptığı DNA hasarının negatif kontrole kıyasla fazla olduğu gözlenmiştir (sırasıyla $p<0.01$, $p<0.001$).

DNA hasarı kuyruk yoğunluğu cinsinden değerlendirildiğinde, PM'in negatif kontrol ile kıyaslandığında 1 μM ve 10 μM konsantrasyonda lenfositlerde önemli bir DNA hasarı oluşturmadığı ancak 100 μM ve 1000 μM konsantrasyonlarda yaptığı DNA hasarının negatif kontrole kıyasla fazla olduğu gözlenmiştir ($p<0.001$). PM'in 10 000 μM konsantrasyonda lenfositlerde yaptığı DNA hasarının negatif kontrole kıyasla çok az oranda fazla olduğu ancak farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı saptanmıştır.

DNA hasarı kuyruk momenti cinsinden değerlendirildiğinde, PM'in negatif kontrol ile kıyaslandığında 1 μM ve 10 μM konsantrasyonda lenfositlerde önemli bir DNA hasarı oluşturmadığı ancak 100 μM ve 1000 μM konsantrasyonlarda yaptığı DNA hasarının negatif kontrole kıyasla fazla olduğu gözlenmiştir ($p<0.001$). PM'in 10 000 μM konsantrasyonda lenfositlerde yaptığı DNA hasarının negatif kontrole kıyasla çok az oranda fazla olduğu ancak farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı saptanmıştır.

DNA hasarı kuyruk göçü cinsinden değerlendirildiğinde, PM'in negatif kontrol ile kıyaslandığında 1, 10, 100 ve 1000 μM konsantrasyonda lenfositlerde yaptığı DNA hasarının negatif kontrole kıyasla fazla olduğu gözlenmiştir (1, 10 μM için $p<0.05$; 100 ve 1000 μM için $p<0.001$). PM'in 10 000 μM konsantrasyonda lenfositlerde yaptığı DNA hasarının negatif kontrole kıyasla fazla olduğu ancak farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı saptanmıştır.

4.1.2. Lenfosit Örneklerinde Pendimetalin, H₂O₂ ve Fpg Enzim Çözeltilisi Uygulanarak Gruplardaki Oksidatif DNA Hasar ve Onarımlarına İlişkin Bulgular

1, 10, 100, 1000 ve 10 000 µM konsantrasyonlarda PM'in *in vitro* periferik kan lenfositlerinde oluşturduğu DNA hasarına ilişkin 3 ayrı deneyin sonuçları Tablo 4.2. ve 4.3'de gösterilmiştir. Tabloda, toplam hücre sayısı üzerinden değerlendirilen ortalama kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk göçü ve bunların standart hataları verilmiştir. (Tablo 4.2. ve 4.3.; Şekil 4.3. ve 4.4.).

Tablo 4.2. Lenfositlerde Pendimetalin (PM), H₂O₂ ve Fpg Enzim Çözeltisi Uygulanarak Gruplardaki Oksidatif DNA Hasar ve Onarımlarına İlişkin Bulgular ^a

		Periferal Lenfosit Hücreleri		H ₂ O ₂ Uygulanan Periferal Lenfosit Hücreleri		H ₂ O ₂ +Fpg Uygulanan Periferal Lenfosit Hücreleri	
		Kuyruk Uzunluğu	Kuyruk Yoğunluğu	Kuyruk Uzunluğu	Kuyruk Yoğunluğu	Kuyruk Uzunluğu	Kuyruk Yoğunluğu
1	(-) Kontrol [DMSO(% 0,5)+ZY(% 0,02)]	16,27±0,14	2,12 ±0,26	26,65 ±0,75 ***	14,50 ±1,34 ***	31,70 ±0,72 ###	22,44 ±1,83 ###
2	1 µM PM	17,65 ± 0,39	1,59 ±0,25	33,69 ±0,93 ***	30,68 ±1,95 ***	35,41 ±0,73	29,02 ±1,93
3	10 µM PM	18,30 ±0,37 ++	3,27 ±0,55	37,22 ±0,84 ***	31,89 ±1,82 ***	40,22 ±0,80 ##	42,85 ±2,18 ###
4	100 µM PM	21,09 ±0,80 +++	6,51 ±0,92 +++	35,21 ±0,80 ***	35,30 ±2,14 ***	44,94 ±1,09 ###	45,26 ±2,39 ###
5	1000 µM PM	24,16 ±0,97 +++	9,10 ±1,17 +++	38,24 ±0,93 ***	36,89 ±2,28 ***	45,28 ±0,90 ###	48,57 ±2,18 ###
6	10000 µM PM	12,49 ±0,40 +++	3,66 ±0,37	12,77 ±0,55	4,68 ±0,46	11,79 ±0,47	3,77 ±0,44

^a Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeridir ve sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

⁺p<0.05, ⁺⁺p<0.01, ⁺⁺⁺p<0.001, uygulanan PM konsantrasyonları negatif kontrol [DMSO(%0,5)+ZY(%0,02)] ile kıyaslanmıştır.

^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001, uygulanan PM konsantrasyonu PM+ H₂O₂ ile kıyaslanmıştır.

[#]p<0.05, ^{##}p<0.01, ^{###}p<0.001, uygulanan PM+H₂O₂ konsantrasyonu PM + H₂O₂ + FPG ile kıyaslanmıştır.

Tablo 4.3. Lenfositlerde Pendimetalin (PM), H₂O₂ ve Fpg Enzim Çözeltisi Uygulanarak Gruplardaki Oksidatif DNA Hasar ve Onarımlarına İlişkin Bulgular ^a

		Periferal Lenfosit Hücreleri		H ₂ O ₂ Uygulanan Periferal Lenfosit Hücreleri		H ₂ O ₂ +Fpg Uygulanan Periferal Lenfosit Hücreleri	
		Kuyruk Momenti	Kuyruk Göçü	Kuyruk Momenti	Kuyruk Göçü	Kuyruk Momenti	Kuyruk Göçü
1	(-)Kontrol [DMSO(% 0,5)+ZY(% 0,02)]	0,27 ± 0,04	1,00 ± 0,14	2,91 ± 0,30 ***	12,42 ± 0,77 ***	4,95 ± 0,46 ###	17,97 ± 0,85
2	1 µM PM	0,24 ± 0,05	2,61 ± 0,38 +	6,82 ± 0,47 ***	20,86 ± 1,00 ***	6,89 ± 0,49	20,34 ± 0,88
3	10 µM PM	0,50 ± 0,11	2,80 ± 0,41 +	7,25 ± 0,44 ***	23,17 ± 0,95 ***	10,99 ± 0,62 ###	27,11 ± 0,98 ##
4	100 µM PM	1,28 ± 0,25 +++	5,23 ± 0,74 +++	8,25 ± 0,53 ***	21,43 ± 0,97 ***	11,23 ± 0,74 ##	31,63 ± 1,35 ###
5	1000 µM PM	1,78 ± 0,33 +++	10,15 ± 0,98 +++	9,14 ± 0,64 ***	24,50 ± 1,07 ***	13,40 ± 0,70 ###	34,09 ± 1,05 ###
6	10000 µM PM	0,29 ± 0,03	2,43 ± 0,41	0,49 ± 0,07 *	3,44 ± 0,52	0,33 ± 0,05	3,05 ± 0,45

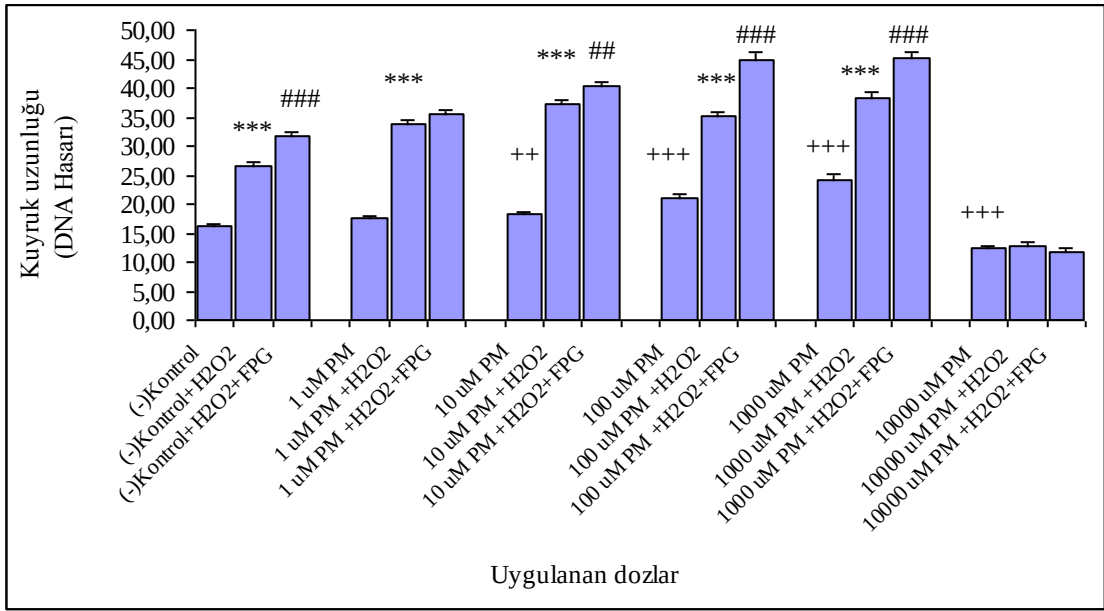
^a Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeridir ve sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

⁺p<0.05, ⁺⁺p<0.01, ⁺⁺⁺p<0.001, uygulanan PM konsantrasyonları negatif kontrol [DMSO(%0,5)+ZY(%0,02)] ile kıyaslanmıştır.

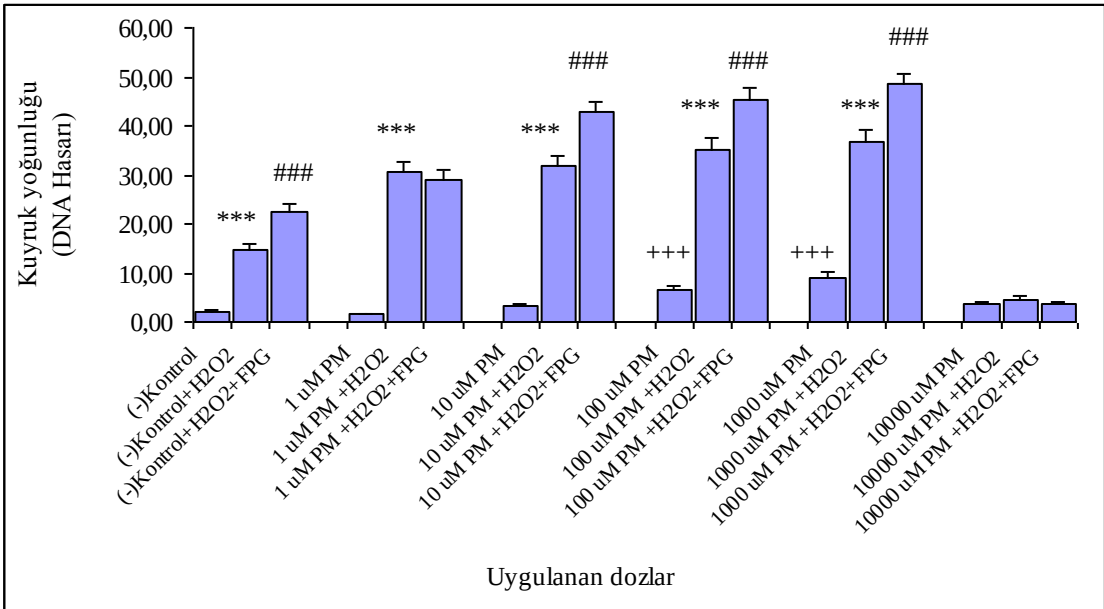
^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001, uygulanan PM konsantrasyonu PM+ H₂O₂ ile kıyaslanmıştır.

[#]p<0.05, ^{##}p<0.01, ^{###}p<0.001, uygulanan PM+H₂O₂ konsantrasyonu PM + H₂O₂ + FPG ile kıyaslanmıştır.

(A)



(B)



Şekil 4.3. Lenfositlerde Pendimetalin (PM), H₂O₂ ve Fpg Enzim Çözeltisi Uygulanarak Gruplardaki Oksidatif DNA Hasar ve Onarımlarına İlişkin Bulgular *

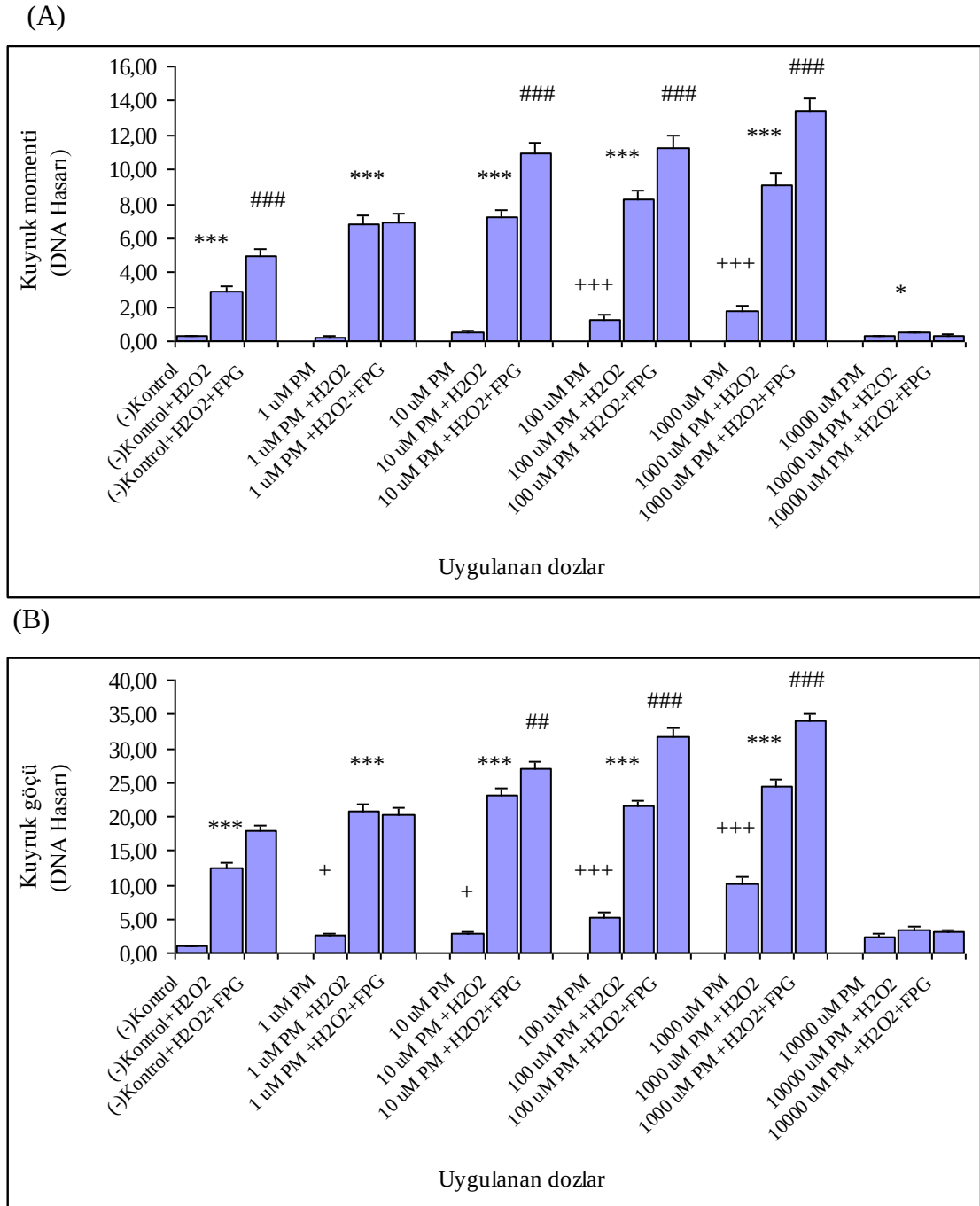
^a Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeridir ve sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir.

⁺p<0.05, ⁺⁺p<0.01, ⁺⁺⁺p<0.001, uygulanan PM konsantrasyonları negatif kontrol

[DMSO(%0,5)+ZY(% ,02)] ile kıyaslanmıştır.

^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001, uygulanan PM konsantrasyonu PM+ H₂O₂ ile kıyaslanmıştır.

[#]p<0.05, ^{##}p<0.01, ^{###}p<0.001, uygulanan PM+H₂O₂ konsantrasyonu PM + H₂O₂ + FPG ile kıyaslanmıştır.



Şekil 4.4. Lenfositlerde Pendimetalin (PM), H₂O₂ ve Fpg Enzim Çözeltisi

Uygulanarak Gruplardaki Oksidatif DNA Hasar ve Onarımlarına İlişkin Bulgular *

^a Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeridir ve sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir.

⁺p<0.05, ⁺⁺p<0.01, ⁺⁺⁺p<0.001, uygulanan PM konsantrasyonları negatif kontrol

[DMSO(%0,5)+ZY(% ,02)] ile kıyaslanmıştır.

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, uygulanan PM konsantrasyonu PM+ H₂O₂ ile kıyaslanmıştır.

#p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001, uygulanan PM+H₂O₂ konsantrasyonu PM + H₂O₂ + FPG ile kıyaslanmıştır.

DNA hasarı kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu, kuyruk momentı ve kuyruk göçü cinsinden değerlendirildiğinde, PM+H₂O₂'in tüm konsantrasyonlarda yaptığı DNA hasarının yalnızca PM uygulanan lenfositlerdeki hasara kıyasla fazla olduğu gözlenmiştir (p<0.001).

DNA hasarı kuyruk uzunluğu cinsinden değerlendirildiğinde, 10, 100 ve 1000 µM konsantrasyonlarda PM+H₂O₂+FPG'nin yaptığı DNA hasarının PM+H₂O₂ uygulanan lenfositlerdeki hasara kıyasla fazla olduğu gözlenmiştir (10 µM için p<0.01; 100 ve 1000 µM için p<0.001). 1 µM konsantrasyonda PM+H₂O₂+FPG'nin lenfositlerde yaptığı DNA hasarının PM+H₂O₂ uygulanan lenfositlere kıyasla fazla olduğu ancak farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı saptanmıştır.

DNA hasarı kuyruk yoğunluğu cinsinden değerlendirildiğinde, 1 µM konsantrasyonda PM+H₂O₂+FPG'nin yaptığı DNA hasarının 1 µM PM+H₂O₂ uygulanan lenfositlere kıyasla daha az olduğu, 10, 100 ve 1000 µM konsantrasyonlarda PM+H₂O₂+FPG'nin yaptığı DNA hasarının PM+H₂O₂ uygulanan lenfositlere kıyasla fazla olduğu gözlenmiştir (100 µM için p<0.01; 10 µM ve 1000 µM için p<0.001).

DNA hasarı kuyruk momentı cinsinden değerlendirildiğinde, 10, 100 ve 1000 µM konsantrasyonlarda PM+H₂O₂+FPG'nin yaptığı DNA hasarının PM+H₂O₂ uygulanan lenfositlere kıyasla fazla olduğu gözlenmiştir (100 µM için p<0.01; 10 µM ve 1000 µM için p<0.001). 1 µM konsantrasyonda PM+H₂O₂+FPG'nin lenfositlerde yaptığı DNA hasarının PM+H₂O₂'e kıyasla fazla olduğu ancak farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı saptanmıştır.

DNA hasarı kuyruk göçü cinsinden değerlendirildiğinde, 10, 100 ve 1000 µM konsantrasyonlarda PM+H₂O₂+FPG'nin lenfositlerde yaptığı DNA hasarının PM+H₂O₂ uygulanan lenfositlere kıyasla fazla olduğu gözlenmiştir (10 µM için p<0.01; 100 ve 1000 µM için p<0.001). 1 µM konsantrasyonda PM+H₂O₂+FPG'nin lenfositlerde yaptığı DNA hasarının PM+H₂O₂'e kıyasla fazla olduğu ancak farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı saptanmıştır.

4.2. CHO Hücresinde Tek Hücre Jel Elektrophorez “COMET” Yöntemiyle DNA Hasarının Belirlenmesi

4.2.1. CHO Hücresinde Pendimetalinin DNA Hasar Etkisine İlişkin Bulgular

1, 10, 100, 1000 ve 10 000 μM konsantrasyonlarda PM'in *in vitro* Çin hamster over hücrelerinde oluşturduğu DNA hasarına ilişkin 3 ayrı deneyin sonuçları Tablo 4.4.'de gösterilmiştir. Tabloda, toplam hücre sayısı üzerinden değerlendirilen ortalama kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk göçü ve bunların standart hataları verilmiştir. (Tablo 4.4.; Şekil 4.5. ve 4.6.).

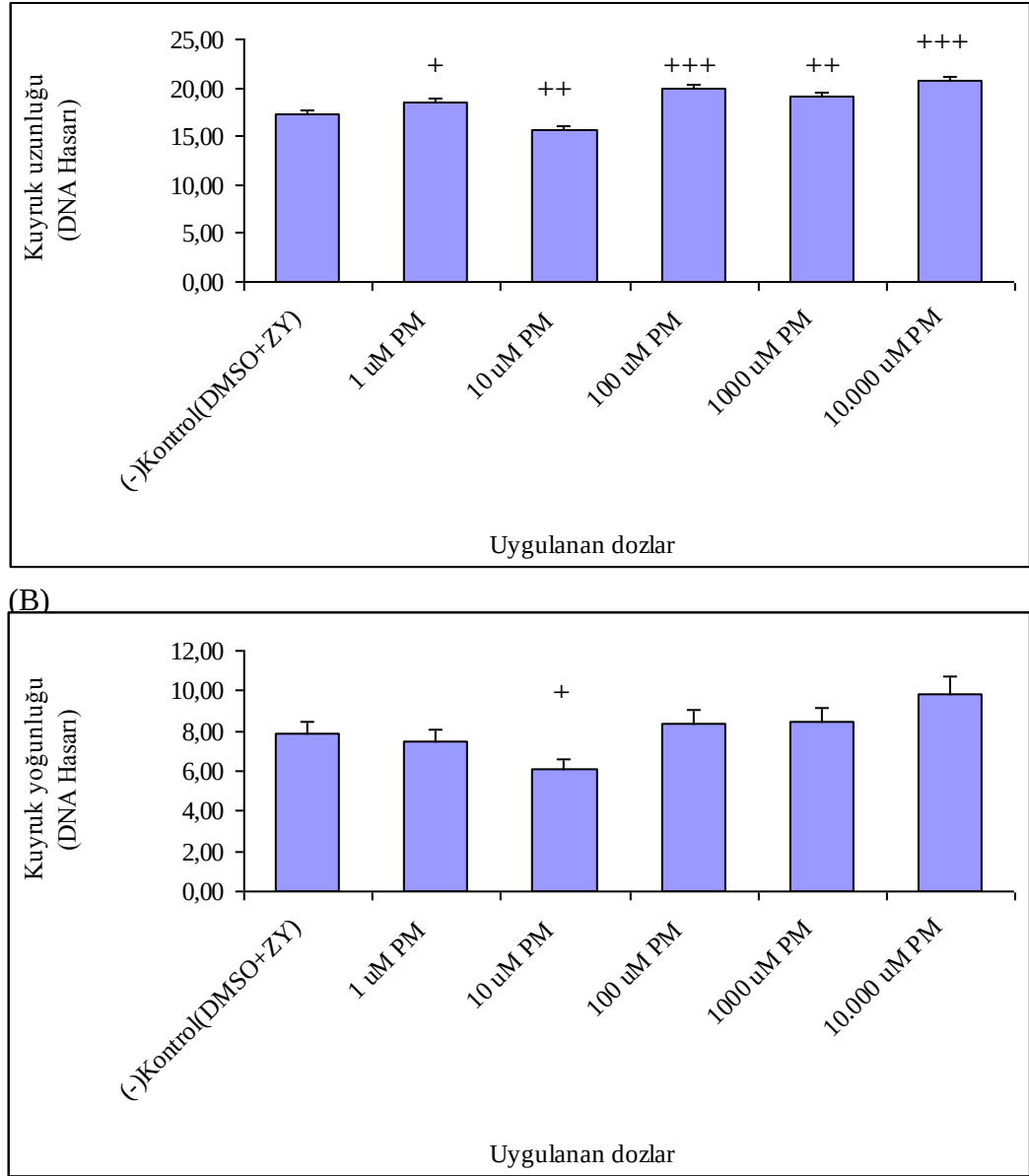
Tablo 4.4. CHO Hücrelerinde Pendimetalin'in (PM) DNA hasarına ilişkin bulgular ^a

		Kuyruk Uzunluğu
1	(-) Kontrol [DMSO(%0,5)+ZY(0,02)]	17,25 ± 0,35
2	1 µM PM	18,41 ± 0,40 +
3	10 µM PM	15,66 ± 0,36 ++
4	100 µM PM	19,93 ± 0,42 +++
5	1000 µM PM	19,13 ± 0,39 ++
6	10 000 µM PM	20,65 ± 0,50 +++
		Kuyruk Yoğunluğu
1	(-) Kontrol [DMSO(%0,5)+ZY(0,02)]	7,89 ± 0,54
2	1 µM PM	7,46 ± 0,62
3	10 µM PM	6,06 ± 0,54 +
4	100 µM PM	8,40 ± 0,65
5	1000 µM PM	8,48 ± 0,62
6	10 000 µM PM	9,83 ± 0,86
		Kuyruk Momenti
1	(-) Kontrol [DMSO(%0,5)+ZY(0,02)]	0,91 ± 0,07
2	1 µM PM	0,90 ± 0,08
3	10 µM PM	0,64 ± 0,06 ++
4	100 µM PM	0,98 ± 0,08
5	1000 µM PM	1,00 ± 0,08
6	10 000 µM PM	1,37 ± 0,15 ++
		Kuyruk Göçü
1	(-) Kontrol [DMSO(%0,5)+ZY(0,02)]	5,67 ± 0,35
2	1 µM PM	7,24 ± 0,39 ++
3	10 µM PM	4,36 ± 0,35 +
4	100 µM PM	9,34 ± 0,43 +++
5	1000 µM PM	8,57 ± 0,39 +++
6	10 000 µM PM	10,04 ± 0,52 +++

^a Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeridir ve sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

⁺p<0.05, ⁺⁺p<0.01, ⁺⁺⁺p<0.001, negatif kontrol [DMSO(%0,5)+ZY(%0,02)] ile kıyaslanmıştır.

(A)

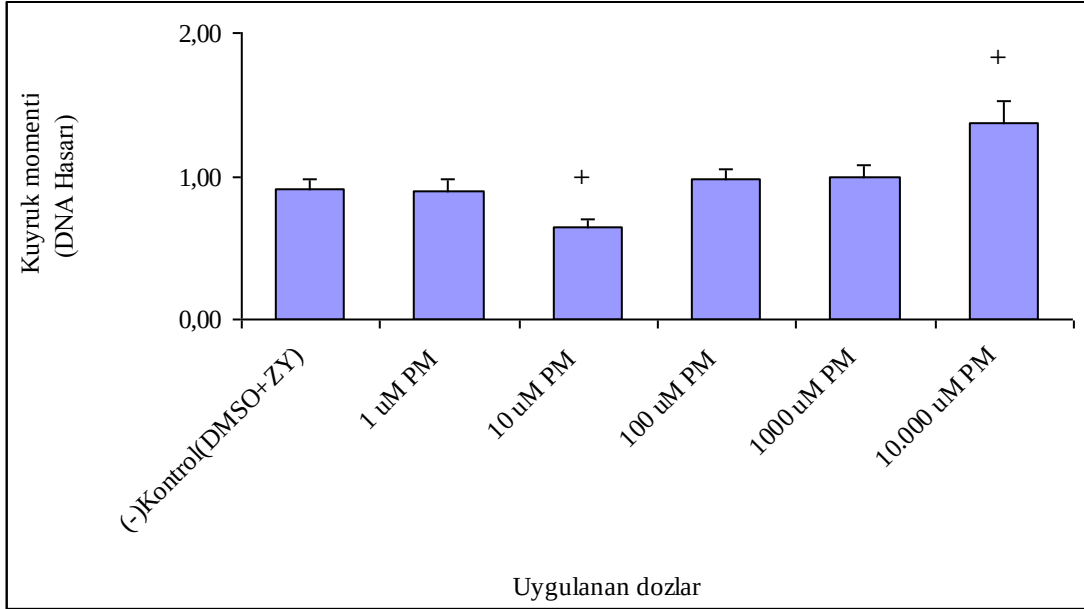


Şekil 4.5. CHO Hücrelerinde Pendimetalin'in (PM) DNA hasarına ilişkin bulgular *

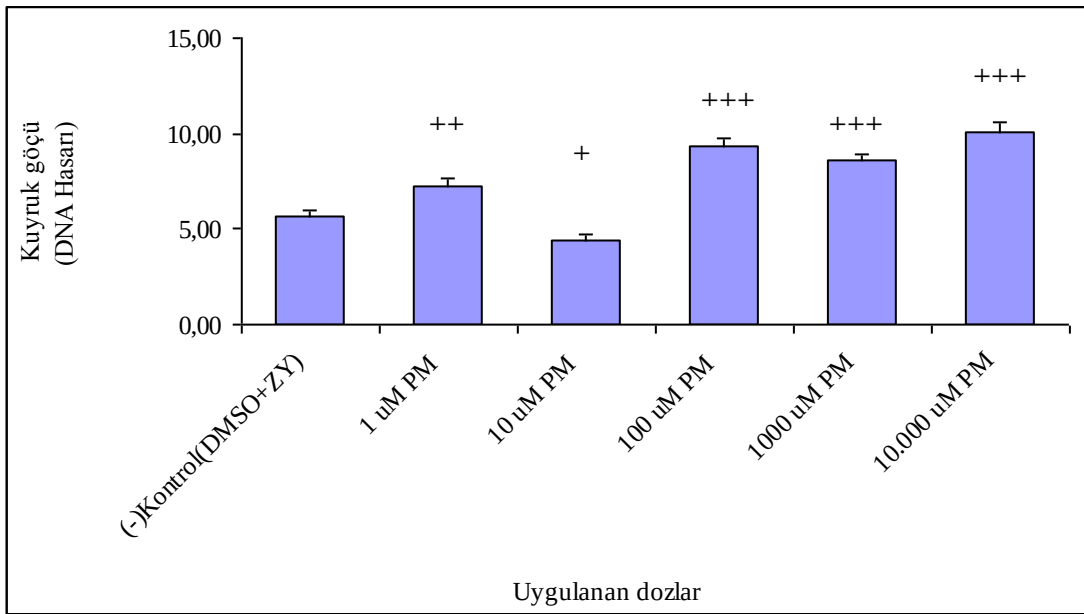
^a Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeridir ve sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir.

⁺ $p < 0.05$, ⁺⁺ $p < 0.01$, ⁺⁺⁺ $p < 0.001$, negatif kontrol [DMSO(%0,5)+ZY(%0,02)] ile kıyaslanmıştır.

(A)



(B)



Şekil 4.6. CHO Hücrelerinde Pendimetalin'in (PM) DNA hasarına ilişkin bulgular *

^a Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeridir ve sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir.

⁺p<0.05, ⁺⁺p<0.01, ⁺⁺⁺p<0.001, negatif kontrol [DMSO(%0,5)+ZY(%0,02)] ile kıyaslanmıştır.

DNA hasarı kuyruk uzunluğu cinsinden değerlendirildiğinde, PM'in negatif kontrol ile kıyaslandığında 1, 100, 1000 ve 10 000 μM konsantrasyonlarda CHO hücrelerinde yaptığı DNA hasarının negatif kontrole kıyasla fazla olduğu gözlenmiştir (1 μM için $p<0.05$; 1000 μM için $p<0.01$; 100 ve 10 000 μM için $p<0.001$). Ancak PM'in 10 μM konsantrasyonda CHO hücrelerinde yaptığı DNA hasarının negatif kontrole kıyasla istatistiksel olarak önemli derecede az olduğu saptanmıştır ($p<0.01$).

DNA hasarı kuyruk yoğunluğu cinsinden değerlendirildiğinde, PM'in negatif kontrol ile kıyaslandığında 1 μM konsantrasyonda CHO hücrelerinde DNA hasarında istatistiksel olarak önemli olmayan azalma oluşturduğu ancak 10 μM konsantrasyonda yaptığı DNA hasarının negatif kontrole kıyasla istatistiksel olarak önemli derecede az olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$). PM'in 100 μM , 1000 μM ve 10 000 μM konsantrasyonlarda CHO hücrelerinde yaptığı DNA hasarının ise negatif kontrole kıyasla fazla olduğu ancak farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı saptanmıştır.

DNA hasarı kuyruk momenti cinsinden değerlendirildiğinde, PM'in negatif kontrol ile kıyaslandığında 1 μM konsantrasyonda CHO hücrelerinde önemli bir DNA hasarı oluşturmadığı ancak 10 000 μM konsantrasyonda yaptığı DNA hasarının negatif kontrole kıyasla fazla olduğu gözlenmiştir ($p<0.01$). PM'in 100 μM ve 1000 μM konsantrasyonlarda CHO hücrelerinde yaptığı DNA hasarının negatif kontrole kıyasla fazla olduğu ancak farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı saptanmıştır. Ayrıca PM'in 10 μM konsantrasyonda CHO hücrelerinde yaptığı DNA hasarının negatif kontrole kıyasla düşük olduğu ve farkın istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır ($p<0.01$).

DNA hasarı kuyruk göçü cinsinden değerlendirildiğinde, PM'in 1, 100, 1000 ve 10 000 μM konsantrasyonlarda CHO hücrelerinde yaptığı DNA hasarının negatif kontrole kıyasla fazla olduğu gözlenmiştir (1 μM için $p<0.01$; 100, 1000 ve 10 000 μM için $p<0.001$). Ancak PM'in 10 μM konsantrasyonda CHO hücrelerinde yaptığı DNA hasarının negatif kontrole kıyasla istatistiksel olarak önemli derecede az olduğu saptanmıştır ($p<0.05$).

4.2.2. CHO Hücrelerinde Pendimetalin, H₂O₂ ve Fpg Enzim   zeltisi Uygulanarak Gruplardaki Oksidatif DNA Hasar ve Onarımlarına İlişkin Bulgular

1, 10, 100, 1000 ve 10 000 µM konsantrasyonlarda PM'in *in vitro* CHO hücrelerinde oluşturduğu DNA hasarına ilişkin 3 ayrı deneyin sonuçları Tablo 4.5 ve 4.6.'da gösterilmiştir. Tabloda, toplam hücre sayısı üzerinden değerlendirilen ortalama kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk göçü ve bunların standart hataları verilmiştir. (Tablo 4.5 ve 4.6.; şekil 4.7. ve 4.8.).

Tablo 4.5. CHO Hücrelerinde Pendimetalin (PM), H₂O₂ ve Fpg Enzim Çözeltisi Uygulanarak Gruplardaki Oksidatif DNA Hasar ve Onarımlarına İlişkin Bulgular ^a

		CHO Hücreleri		H ₂ O ₂ Uygulanan CHO Hücreleri		H ₂ O ₂ +Fpg Uygulanan CHO Hücreleri	
		Kuyruk Uzunluğu	Kuyruk Yoğunluğu	Kuyruk Uzunluğu	Kuyruk Yoğunluğu	Kuyruk Uzunluğu	Kuyruk Yoğunluğu
1	(-) Kontrol [DMSO(% 0,5)+ZY(% 0,02)]	17,25 ± 0,35	7,89 ± 0,54	28,17 ± 0,45 ***	15,23 ± 0,99 ***	60,56 ± 0,88 ###	64,46 ± 1,41 ###
2	1 µM PM	18,41 ± 0,40 +	7,46 ± 0,62	32,23 ± 0,41 ***	24,34 ± 1,53 ***	61,55 ± 0,72 ###	56,79 ± 1,32 ###
3	10 µM PM	15,66 ± 0,36 ++	6,06 ± 0,54 +	31,39 ± 0,35 ***	34,81 ± 1,37 ***	71,21 ± 0,62 ###	62,28 ± 1,32 ###
4	100 µM PM	19,93 ± 0,42 +++	8,40 ± 0,65	29,88 ± 0,32 ***	38,35 ± 1,32 ***	66,43 ± 0,61 ###	62,52 ± 1,33 ###
5	1000 µM PM	19,13 ± 0,39 ++	8,48 ± 0,62	29,18 ± 0,37 ***	33,33 ± 1,32 ***	65,49 ± 0,57 ###	59,01 ± 1,25 ###
6	10000 µM PM	20,65 ± 0,50 +++	9,83 ± 0,86	34,64 ± 0,36 ***	51,03 ± 1,36 ***	65,60 ± 0,59 ###	57,75 ± 1,33 ###

^a Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeridir ve sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

⁺p<0.05, ⁺⁺p<0.01, ⁺⁺⁺p<0.001, uygulanan PM konsantrasyonları negatif kontrol [DMSO(%0,5)+ZY(%0,02)] ile kıyaslanmıştır.

^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001, uygulanan PM konsantrasyonu PM+ H₂O₂ ile kıyaslanmıştır.

[#]p<0.05, ^{##}p<0.01, ^{###}p<0.001, uygulanan PM+H₂O₂ konsantrasyonu PM + H₂O₂ + FPG ile kıyaslanmıştır.

Tablo 4.6. CHO Hücrelerinde Pendimetalin (PM), H₂O₂ ve Fpg Enzim Çözeltisi Uygulanarak Gruplardaki Oksidatif DNA Hasar ve Onarımlarına İlişkin Bulgular^a

		CHO Hücreleri		H ₂ O ₂ Uygulanan CHO Hücreleri		H ₂ O ₂ +Fpg Uygulanan CHO Hücreleri	
		Kuyruk Momenti	Kuyruk Göçü	Kuyruk Momenti	Kuyruk Göçü	Kuyruk Momenti	Kuyruk Göçü
1	(-)Kontrol [DMSO(% 0,5)+ZY(% 0,02)]	0,91 ± 0,07	5,67 ± 0,35	2,40 ± 0,18 **	16,75 ± 0,46 ***	20,85 ± 0,53 ###	46,11 ± 1,04 ###
2	1 µM PM	0,90 ± 0,08	7,24 ± 0,39 ++	4,24 ± 0,28 ***	20,26 ± 0,53 ***	18,22 ± 0,47 ###	45,33 ± 0,92 ###
3	10 µM PM	0,64 ± 0,06 ++	4,36 ± 0,35 +	5,53 ± 0,23 ***	21,41 ± 0,47 ***	23,34 ± 0,54 ###	54,05 ± 1,05 ###
4	100 µM PM	0,98 ± 0,08	9,34 ± 0,43 +++	5,78 ± 0,22 ***	20,78 ± 0,44 ***	21,49 ± 0,53 ###	51,39 ± 0,91 ###
5	1000 µM PM	1,00 ± 0,08	8,57 ± 0,39 +++	5,11 ± 0,24 ***	19,29 ± 0,49 ***	20,86 ± 0,50 ###	49,04 ± 0,90 ###
6	10000 µM PM	1,37 ± 0,15 ++	10,04 ± 0,52 +++	9,20 ± 0,27 ***	25,42 ± 0,53 ***	20,59 ± 0,54 ###	48,85 ± 0,91 ###

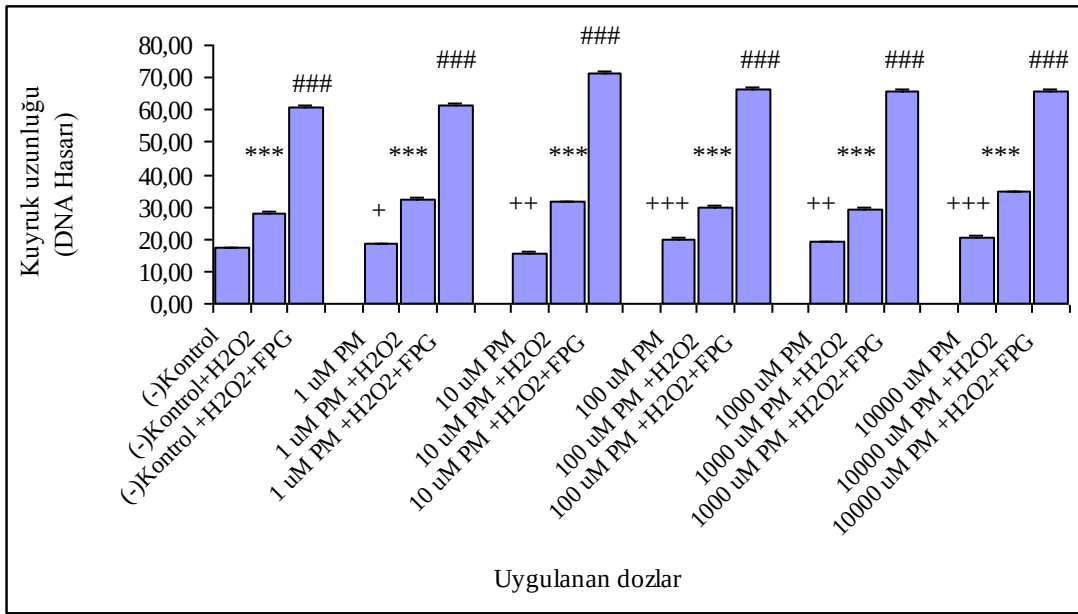
^a Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeridir ve sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

⁺p<0.05, ⁺⁺p<0.01, ⁺⁺⁺p<0.001, uygulanan PM konsantrasyonları negatif kontrol [DMSO(%0,5)+ZY(%0,02)] ile kıyaslanmıştır.

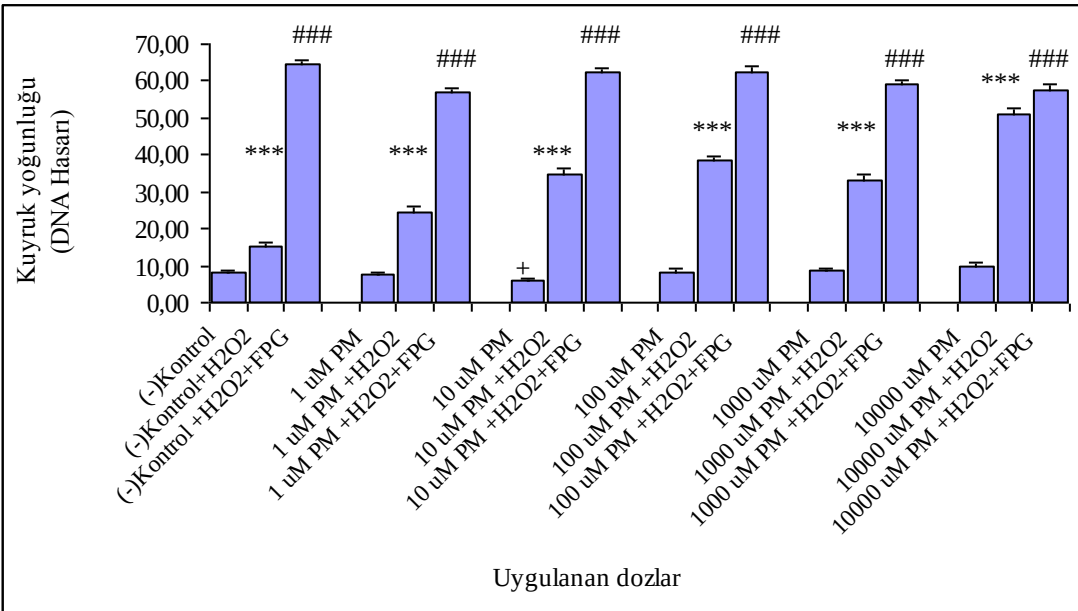
^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001, uygulanan PM konsantrasyonu PM+ H₂O₂ ile kıyaslanmıştır.

[#]p<0.05, ^{##}p<0.01, ^{###}p<0.001, uygulanan PM+H₂O₂ konsantrasyonu PM + H₂O₂ + FPG ile kıyaslanmıştır.

(A)



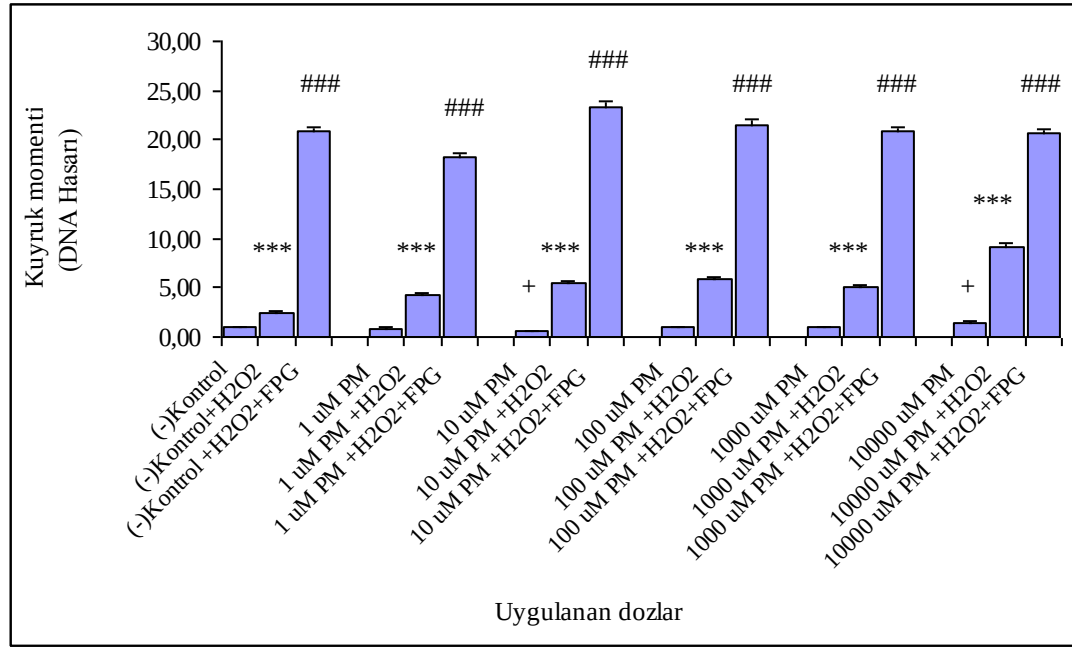
(B)



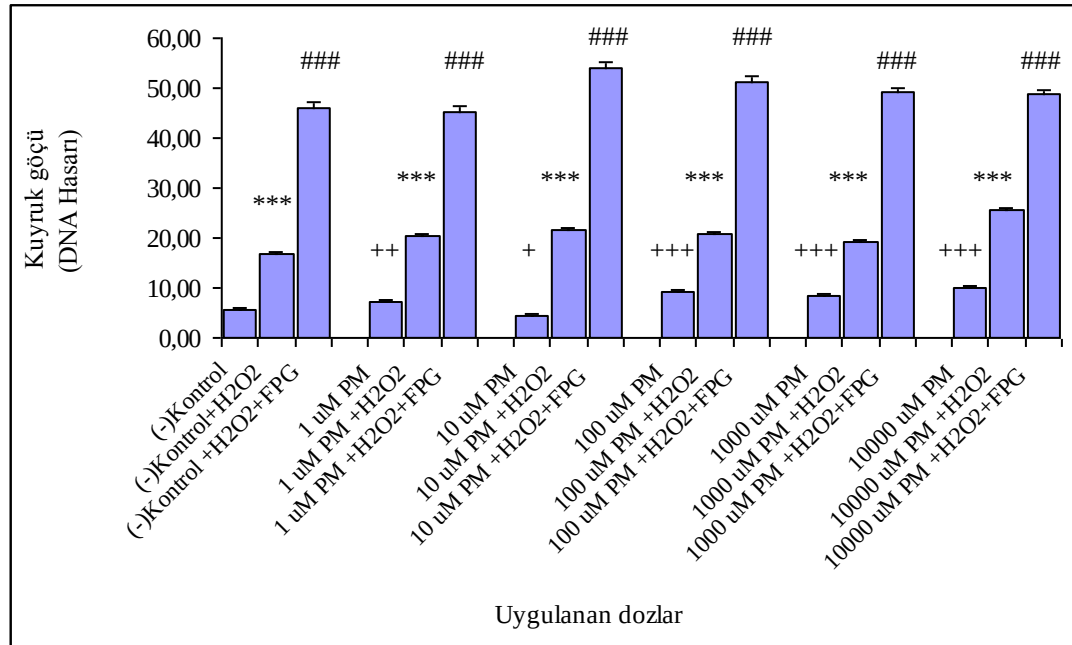
Şekil 4.7. CHO Hücrelerinde Pendimetalin (PM), H₂O₂ ve Fpg Enzim Çözeltilisi Uygulanarak Gruplardaki Oksidatif DNA Hasar ve Onarımlarına İlişkin Bulgular *

^a Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeridir ve sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.
⁺ p<0.05, ⁺⁺ p<0.01, ⁺⁺⁺ p<0.001, uygulanan PM konsantrasyonları negatif kontrol [DMSO(%0,5)+ZY(% ,02)] ile kıyaslanmıştır.
^{*} p<0.05, ^{**} p<0.01, ^{***} p<0.001, uygulanan PM konsantrasyonu PM+ H₂O₂ ile kıyaslanmıştır.
[#] p<0.05, ^{##} p<0.01, ^{###} p<0.001, uygulanan PM+H₂O₂ konsantrasyonu PM + H₂O₂ + FPG ile kıyaslanmıştır.

(A)



(B)

Şekil 4.8. CHO Hücrelerinde Pendimetalin (PM), H₂O₂ ve Fpg Enzim

Çözeltisi Uygulanarak Gruplardaki Oksidatif DNA Hasar ve Onarımlarına İlişkin

Bulgular *

^a Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeridir ve sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.⁺p<0.05, ⁺⁺p<0.01, ⁺⁺⁺p<0.001, uygulanan PM konsantrasyonları negatif kontrol

[DMSO(%0,5)+ZY(% ,02)] ile kıyaslanmıştır.

^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001, uygulanan PM konsantrasyonu PM+ H₂O₂ ile kıyaslanmıştır.[#]p<0.05, ^{##}p<0.01, ^{###}p<0.001, uygulanan PM+H₂O₂ konsantrasyonu PM + H₂O₂ + FPG ile kıyaslanmıştır.

DNA hasarı kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk göçü cinsinden değerdendirildiğinde, PM+H₂O₂'in tüm konsantrasyonlarda CHO hücrelerinde yaptığı DNA hasarının yalnızca PM uygulanan CHO hücrelerindekiine kıyasla fazla olduğu gözlenmiştir (p<0.001).

DNA hasarı kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk göçü cinsinden değerdendirildiğinde, PM+H₂O₂+FPG uygulamasının tüm konsantrasyonlarda CHO hücrelerinde yaptığı DNA hasarının PM+H₂O₂ uygulanan CHO hücrelerindekiine kıyasla fazla olduğu gözlenmiştir (p<0.001).

5. TARTIŞMA

Pendimetalin, dinitroanilin türevi, bitkinin kök ve yaprakları tarafından absorplanan seçici bir herbisit bileşiktir. Hücre bölünmesini ve devamlılığını inhibe eder. Bitkilerin topraktan çıkmalarını takiben filizlenme aşamasından hemen sonra kısa sürede ölmelerine neden olur.

Bir yıllık ve geniş yapraklı yabani, zararlı otları kontrol etmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Tahıl, soğan, pırasa, sarımsak, rezene, mısır, darı, pirinç, soya, fındık, havuç, bezelye, bakla, lale, patates, pamuk, elma, armut, ayva, sert çekirdekli meyveler, çilek, böğürtlen, ahududu, limon, portakal, mandalina, üzüm, greyfurt, patlıcan, kabak, domates, ay çiçeği, tütün ekili alanlar ve çim alanlardaki çok sayıda zararlı otun kontrolü için kullanılır[80].

Pendimetalin'in sıçanlardaki başlıca metabolik yolağı 4-metil ve N-1-etil gruplarının hidroksilasyonu, bu alkil gruplarının karboksilik asite oksidasyonu, nitro redüksiyon, aromatik hidroksilasyon ve konjugasyondur. Bitkilerde benzen halkasındaki 4-metil grubunun alkol yardımıyla karboksilik asite oksidasyonu ayrıca aminonitrojenin oksidasyonu gerçekleşir[81].

Hasat zamanında ekinlerde, analitik yöntemlerin tayin limitinin (0.05 ppm) altında kalıntı bulunduğu bildirilmekle birlikte Amerika'da yapılan bir çalışmada elma posası, yaş ve kuru domates posası, badem kabukları, yeşil soğan, kuru ve yaş incir ve mentol yağında 0.05 ppm'in üzerinde pendimetalin saptanmıştır[50]. Pendimetalin toprak ve suda bitkilerdeki gibi metabolize olur. Maddenin % 50 sinin yok olması için gerekli zaman (Half-maximal dissipation time, DT₅₀) 3-4 aydır. İtalya'nın Veneto bölgesinde, 1987-1988 yılında yapılan bir çalışmada 76 içme suyu örneğinden birinde 0.1 µg/l'nin altında pendimetalin saptanmıştır. Çevresel yazgısı ve kalıntı düzeylerine ait veri eksikliği bulunmaktadır. Kapsamlı ekolojik risk değerlendirmesi, kesin çevresel verilerdeki eksiklik tamamlanmadıkça yapılamayacaktır[56, 81-83]

Akut oral LD₅₀ değeri tavşanlarda > 1250 mg/kg, albino sıçanlarda 1050-1250 mg/kg, albino farelerde 1340-1620 mg/kg, av köpeklerinde > 5000 mg/kg olarak bildirilmiştir[57]. Akut dermal LD₅₀ değeri tavşanlarda > 5000 mg/kg'dır; sıçanlarda 4 saat temas ile akut inhalasyon LC₅₀ değeri > 320 mg/l'dir. EPA'nın toksikolojik sınıflandırmasına göre, akut toksisitesi III. Sınıfta (az toksik) yer

almaktadır ve göze temasla orta şiddette tahriş yapıcı etkisi ve yutulması ya da ciltten absorplanması durumunda, tehlikesi nedeniyle, pendimetalin içeren ürün üzerinde, ‘DİKKAT’ uyarısı bulundurulması gerekmektedir. Kuşlarda akut oral toksisitesi 1421 mg/kg’dır. 8 gün diyetle verildiğinde Kuzey Amerika bıldırcınında LC₅₀ değeri > 3149 ppm, yaban ördeklerinde >4640 ppm’dır. Balıklardaki LC₅₀ değeri ise, 96 saat süreyle teması takiben ay balığında 0.199 ppm (çok toksik), gökkuşaklı alabalıkta 0.138 ppm (çok toksik)’dir. Omurgasız su canlılarından *Daphnia magna*’da 48 saat teması takiben LC₅₀ değeri 0.28 ppm (çok toksik)’dir. Pendimetalin soğuk su balıklarına çok toksiktir, ılık su balıklarına ve tatlı sularda yaşayan omurgasız canlılara toksisitesi ise çoktan orta dereceye kadar değişmektedir. Arılarda, topikal uygulamada LC₅₀ >50 µg/arı’dır[81].

Charles River CD sıçanlarına 13 ardışık hafta, diyetle 100, 500 ve 5000 mg/kg dozda pendimetalin verilerek kısa süreli maruziyet çalışması gerçekleştirilmiş, sadece 5000 mg/kg pendimetalin verilen sıçanlarda yenilen yem miktarı ve vücut ağırlığı artışında azalma saptanmıştır. Aynı zamanda, bu doz düzeyinde çeşitli karaciğer toksisitesi bulguları da gözlenmiştir. Erkek sıçanlarda 5000 mg/kg dozla mutlak ve göreceli olarak böbrek ağırlıkları artarken dişilerde 500 mg/kg dozla mutlak ve göreceli olarak rahim ve yumurtalık ağırlıkları azalmıştır[56].

1974 yılında gerçekleştirilen iki adet uzun süreli maruziyet çalışmasından bir tanesinde CD-1 farelerine 18 ay süreyle diğerinde Long-Evans sıçanlarına 2 yıl süreyle, 100, 500 ve 2500 mg/kg dozda pendimetalin yemlere karıştırılarak verilmiştir. Her iki çalışmada da 2500 mg/kg dozda genel toksik etkiler gözlenmiştir. Bu etkiler farelerde hiperglisemi, tiroid ve adrenal bez ağırlıklarında artış; sıçanlarda alkali fosfat düzeylerinde, tiroid ve böbrek ağırlıklarında artış, karaciğer büyümesi şeklindedir. Farelerde gözlenen hiperglisemi ve sıçanlarda görülen karaciğer toksisitesi gibi bazı toksik etkiler en düşük doz düzeyi olan diyetle 100 mg/kg dozla (günde 5 mg/kg vücut ağırlığına eşdeğer doz) da ortaya çıkmıştır[56].

Pendimetalin’in Kabul Edilebilir Günlük Alım (Acceptable Daily Intake, ADI) düzeyi, köpeklerde 2 yıl süreyle yapılan bir çalışmadan elde edilen veriler ve 100 güvenlik faktörü kullanılarak 0.125 mg/kg vücut ağırlığı/gün olarak hesaplanmıştır. Kabul Edilebilir Uygulayıcı Alım (Acceptable Operator Exposure Level, AOEL) düzeyi ise sıçanlarda 90 gün süreyle diyetle verilerek gerçekleştirilen,

oral absorpsiyon oranı % 56 olan bir çalışmadan elde edilen veriler ve 100 güvenlik faktörü kullanılarak 0.234 mg/kg vücut ağırlığı/gün olarak belirlenmiştir[83].

Köpeklerde yapılan 2 yıllık yemleme çalışmasında, 12.5, 50 ve 200 mg/kg dozlarda pendimetalin, alkali fosfat düzeylerinde ve karaciğer ağırlığında artış meydana getirmiştir. NOEL değeri 12.5 mg/kg/gün'dür[81]. Gerçekleştirilen teratojenite deneylerinde; sıçanlara verilen en yüksek doz 1000 mg/kg/gün, tavşanlara verilen en yüksek doz 60 mg/kg/gün teratojenik ya da fetotoksik etki meydana getirmemiştir[56, 83]. Sıçanlara gebeliğin 6-15. günlerinde pendimetalin verilerek gerçekleştirilen diğer bir çalışmada 1000 mg/kg vücut ağırlığı dozda pendimetalin ile küçük şekil bozuklukları ve fetal ağırlıkta azalma ve 250, 500 mg/kg dozda pendimetalin ile el, ayak kemikleşmesinde azalma meydana geldiği gözlenmiştir[56]. Long-Evans sıçanlarında, 3 nesilde gerçekleştirilen üreme toksisitesi çalışmasında 500 ppm den 5000 ppm'e kadar pendimetalin denenmiş, üreme toksisitesi gözlenmezken süten kesilmeden yetişkinliğe kadar geçen zamanda yavru sayısında, ölüm ve kilo artışında azalma ile ilişkili olmayan azalma bildirilmiştir[56, 83]. Dişi, erişkin olmayan sıçanlarda gerçekleştirilen *in vivo* çalışmada, 3 gün süreyle pendimetalin uygulamasının, 300 ve 600 mg/kg/gün dozlarda mutlak rahim ağırlığını artırdığı saptanmış. Aynı çalışmada, *real-time* PCR yöntemiyle kantitatif olarak tayin edilen östrojen düzenleyen genler; östrojen reseptör-alfa, androjen reseptör, insüline benzeyen büyüme faktörü 1, progesteron reseptör ve östrojen reseptör beta'nın mRNA düzeylerinde kontrollere kıyasla değişiklikler meydana geldiği bulunmuştur[66].

1974 yılında gerçekleştirilen iki çalışmada; 18 ay süreyle 2500 mg/kg doza kadar pendimetalin ile beslenen CD-1 farelerinde ve 2 yıl süreyle 2500 mg/kg doza kadar pendimetalin ile beslenen sıçanlarda kanser gözlenmemiştir [56]. Ancak bu çalışmaların histolojik incelemelerinde madde verilmiş hayvan sayısının sınırlı olduğu, önemli yöntem kısıtlamalarının bulunduğu da Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kılavuzlarında belirtilmiştir [56]. Diğer taraftan, ABD Çevre Koruma Birliği Pestisit Programları bölümü, pestisitlerin karsinojenik etkilerini araştırmak amacıyla yaptığı çalışmada pendimetalin'in hepatik metabolizmayı bozduğunu ve tiroid hormon salınımını artırdığını bildirmiştir[84]. Avrupa Komisyonu, Sağlık ve Tüketici Koruma Başkanlığı, 2003 yılında yayınladığı raporda, uzun süreli toksisite çalışmalarında, karaciğer ve tiroid bezinin pendimetalin'in hedef organları olduğunu

bildirmiştir. Bu raporda, pendimetalin'in sıçanlarda maksimum dayanma dozunda (maximum tolerated dose, MTD) tiroid adenoması yaptığı ancak bu verinin insanlarla ilişkilendirilemediği bilgisi bulunmaktadır. Kronik sıçan çalışmaları ve geçerli mutajenite, karsinojenite verilerinin yetersiz olması sebebiyle pendimetalin'in kronik toksisite riskinin tam olarak değerlendirilemediği bildirilmekle birlikte [81-83] 2008 yılında Ulusal Sağlık Enstitüsü tarafından yayınlanan tarım alanlarında pestisit kullanımı ve pankreas kanseri riski konulu 64 pestisit uygulayıcısı ve bu uygulayıcılardan 29'unun eşinin değerlendirildiği 93 pankreas kanseri olgusundan oluşan cohort çalışmasında, değerlendirilen pestisit bileşikleri içinde pendimetalin'in pankreas kanseriyle istatistiksel olarak önemli temas-yanıt ilişkisi gösterdiği bulunmuştur [75].

Pendimetalin'in genotoksik etkisine ilişkin çok az veri bulunmaktadır. *Salmonella typhimurium*'da metabolik aktivasyon ile genetik mutasyona neden olduğunu ancak yüksek saflıktaki maddenin aynı deney sisteminde mutasyon meydana getirmediğini ayrıca kromozom hataları, programlanmamış DNA sentezi ve dominant letal mutasyonlara neden olmadığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır [56]. Erkek ve dişi farelerin kemik iliğinde mikroçekirdek [85], insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi [86] sıklığını artırmadığını bildiren çalışmalar da vardır. Diğer taraftan, Dimitrov ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, pendimetalin'in genotoksik etkileri bitki (*Crepis capillaris* L.) ve fare kemik iliği deney sistemlerinde kromozom hasarı ve mikroçekirdek yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Bu araştırmada, pendimetalin tarım uygulamalarında kullanılan konsantrasyonlarında; % 0.005, 0.1, 0.2 ve 0.4 etkin içerik olacak şekilde incelenmiştir. Pendimetalin bitki hücrelerinde kromozom hasarını artırmazken, fare hücrelerinde denenen en yüksek doz ile (1/2 LD₅₀, 489.0 mg/kg) kromozom hasar sıklığını artırmıştır. Mikroçekirdek sıklığını ise her iki deney sisteminde de artırmıştır. Pendimetalin bu çalışmada denenen tüm konsantrasyonlarda C-mitoz meydana getirdiği için bitkilerdeki mikroçekirdek sıklığını artırıcı etkisinin iğ bozucu etkisine bağlı olabileceği bildirilmiştir. Pendimetalin'in C-mitoz ile sonuçlanan mitozda iğ bozucu etkisi, tarım uygulamalarında kullanılan en düşük etkin konsantrasyonun 53 kez altında olan % 0.005 konsantrasyonda da gözlenmiştir. Fare kemik iliği hücrelerinde kromozom hasar sıklığı artırıcı etkisi, uygulamadan sonraki geç örnekleme zamanlarında (uygulamadan 96 saat sonra) gözleendiği için ise bu

etkinin genotoksik metabolitlerin biyosentezine bağılı olabileceği ileri sürülmüştür [69]. Dimitrov ve ark. çalışmalarında, pendimetalin'in, antimikrotübül etkileri iyi belgelenmiş olan, mitozu metafaz evresinde engelleyen, iç ve korteksle ilgili sitoplazma mikrotubulüslerinin polimer yapısını bozan ve kolşisin etkisine benzeyen bir etki meydana getiren orizalin adlı herbisit bileşik ile benzer kimyasal yapıya sahip dinitroanilin grubunda yer alan bir herbisit bileşik olduğunu ayrıntılı olarak tartışmışlardır [87,88]. Dinitroanilin yapısındaki bileşiklerin antimikrotubulüs etkileri çok sayıda bitki ve protozoa türünde gözlenmiştir ancak mantar ya da omurgalı mikrotubulüslerinde etkili olmadıkları rapor edilmiştir [87,89]. Bu nedenle Dimitrov ve ark., çalışmalarında gözledikleri fare kemik iliği hücrelerinde mikroçekirdek sıklığı artışının, büyük olasılıkla klastojenik etkiden kaynaklandığını bildirmişlerdir [69].

Çalışmamızda pendimetalin'in çeşitli konsantrasyonlarda *in vitro* periferik kan lenfositlerinde ve CHO hücrelerinde oluşturduğu DNA hasarı; kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk göçü cinsinden değerlendirilmiştir.

Periferik kan lenfositlerine 30 dakika süreyle 10, 100 ve 1000 μM konsantrasyonlarda pendimetalin uygulamasından sonra, DNA kuyruk uzunluğu, negatif kontrole kıyasla, konsantrasyonla artan şekilde yüksek bulunmuştur (10 μM ile $p<0.01$, 100 ve 1000 ile μM $p<0.001$). DNA kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti 100 ve 1000 μM konsantrasyonlarda pendimetalin uygulaması ile negatif kontrollere kıyasla artmıştır ($p<0.001$). DNA kuyruk göçü de 1, 10, 100 ve 1000 μM konsantrasyonda pendimetalin uygulaması ile negatif kontrollere kıyasla, konsantrasyonla artan şekilde yüksek bulunmuştur (1 ve 10 μM ile $p<0.05$, 100 ve 1000 μM ile $p<0.001$). İncelenen tüm DNA hasar değişkenlerinde 10000 μM konsantrasyonda pendimetalin uygulaması ile, 1000 μM konsantrasyonda gözlenen artıştan sonra, azalma meydana geldiği saptanmıştır. 10000 μM konsantrasyonda pendimetalin uygulaması ile DNA kuyruk uzunluğunda negatif kontrollere kıyasla da önemli azalma gözlenmiştir.

CHO hücrelerinde incelenen tüm DNA hasar değişkenleri, 30 dakika süreyle çeşitli konsantrasyonlarda pendimetalin uygulaması ile U şeklinde bir konsantrasyon-yanıt eğrisi oluşturmuştur. Pendimetalin'in 1 μM konsantrasyonu ile kuyruk uzunluğu ve kuyruk göçü negatif kontrollere kıyasla önemli şekilde artarken

(sırasıyla $p < 0.05$ ve $p < 0.01$), kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti değerleri 1 μM konsantrasyonda pendimetalin ile kontrollere kıyasla istatistiksel olarak önemli olmayan azalma göstermiştir. Bununla birlikte, 10 μM konsantrasyonda pendimetalin uygulamasıyla CHO hücrelerinin DNA kuyruk uzunluğu ($p < 0.01$), kuyruk yoğunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk göçü ($p < 0.05$) değerlerinde negatif kontrollere kıyasla önemli azalma saptanmıştır. 100, 1000 ve 10000 μM konsantrasyonda pendimetalin uygulaması ise incelenen tüm DNA hasar değerlerini negatif kontrollere kıyasla artırmıştır. Bu artış DNA kuyruk uzunluğu ve kuyruk göçü için üç konsantrasyonda da ($p < 0.001$), DNA kuyruk momenti için ise sadece 10000 μM konsantrasyonda ($p < 0.05$) istatistiksel olarak önemlidir.

Bulgularımız, Patel ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmanın bulguları ile uyum göstermektedir. Patel ve ark. pendimetalinin sitotoksik etkilerini, CHO hücrelerine 3 saat süreyle 1, 10, 100, 1000 ve 10000 μM konsantrasyonlarda uygulamanın ardından MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) yöntemiyle değerlendirmiş ve daha sonra comet yöntemiyle DNA hasar tayini yapmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, pendimetalin'in IC_{50} (100 hücreden 50 sini öldüren en yüksek konsantrasyon) değerinin 10000 μM a yakın olduğunu, 10000 μM konsantrasyonda pendimetalin'e 3 saat maruz kalan CHO hücrelerinin mitokondri etkinliklerinin kontrollere kıyasla % 54 azaldığını göstermiştir. Pendimetalin'e 3 saat maruziyet sonrasında, hücre canlılığının % 90 olduğu konsantrasyon aralığı 10-100 μM olarak saptanmıştır. Ardından, Patel ve ark., 0.01, 0.1, 1, 10 ve 100 μM konsantrasyonlarda pendimetalin'e 3 saat süreyle maruz kalan CHO hücrelerinin hücre canlılığının % 90'dan fazla olduğu Tripan mavisi boyama yöntemiyle saptamış ve DNA hasarını comet yöntemiyle görelî birim (arbitrary unit), % kuyruk DNA'sı ve kuyruk uzunluğu değişkenleri cinsinden incelemiştir. Pendimetalin'in 0.1 ile 100 μM konsantrasyonları arasında, incelenen DNA hasar değişkenlerinde konsantrasyona bağlı önemli artmaya neden olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). Çalışmamızın Patel ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmadan farkı, çalışmamızda CHO hücrelerine 3 saat değil 30 dakika süreyle pendimetalin uygulaması yapılmış olmasıdır [72]. Çalışmamızda 30 dakika süreyle 1, 10, 100, 1000 ve 10000 μM konsantrasyonlarda pendimetalin uygulanan periferik kan lenfosit ve CHO hücrelerinin canlılığı Tripan mavisi boyama yöntemiyle % 90'dan fazla

saptandıktan sonra comet yöntemiyle DNA hasar değerlendirmesi gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılığı 10000 μM konsantrasyonda pendimetaline 30 dakika maruziyeti takiben % 90'dan fazla olmasına rağmen periferik kan lenfositlerinin DNA hasarında 10000 μM konsantrasyonla 1000 μM konsantrasyona kıyasla daha az hasar meydana gelmesi, 10000 μM konsantrasyonda pendimetalinin hücreler üzerindeki olası sitotoksik ve klastojenik etkisinin göstergesi olabilir. DNA üzerinde birincil hasar oluşturmada DNA çoğalmasını, hücre döngüsünü bozan, sitotoksik, klastojenik etki gibi DNA da ikincil hasar yapan kimyasal maddelerin, comet yönteminde belirlenen DNA hasarında azalma yapabilecekleri ve bu tür bileşiklerin oluşturduğu *in vitro* DNA hasarının comet yöntemiyle saptanabilmesi için uzun maruziyet süreleri gerektiği bildirilmiştir [90].

Bu çalışmada, 1, 10, 100, 1000 ve 10000 μM konsantrasyonlarda pendimetalin, H_2O_2 ve Fpg periferik kan lenfositlerine uygulanarak gruplardaki oksidatif hasar ve onarımları DNA kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk göçü cinsinden değerlendirilmiştir. İncelenen tüm DNA hasar değişkenlerinde 10, 100 ve 1000 μM konsantrasyonlarda pendimetalin+ H_2O_2 +Fpg uygulamasının yaptığı DNA hasarının aynı konsantrasyonlarda pendimetalin+ H_2O_2 uygulanan lenfositlerdeki hasara kıyasla artmış olduğu saptanmıştır. Bu bulgu, 10, 100 ve 1000 μM konsantrasyonlarda pendimetalin+ H_2O_2 ile lenfositlerde oluşturulan DNA hasarının, Fpg ile onarılabilen oksidatif türde bir hasar olduğunu göstermektedir. İncelenen DNA hasar değişkenlerinin tümünde 10000 μM konsantrasyonda pendimetalin+ H_2O_2 +Fpg uygulamasının yaptığı DNA hasarının, aynı konsantrasyonda pendimetalin+ H_2O_2 uygulanan lenfositlerdeki hasara kıyasla farklı olmadığı bulunmuştur. Bu bulgu ise 10000 μM konsantrasyonda pendimetalin'in CHO hücrelerinde 3 saat uygulamayı takiben sitotoksik olduğunu saptayan Patel ve ark.'larının bulgularını desteklemektedir. 10000 μM konsantrasyonda pendimetalinin lenfosit hücrelerinde oluşturduğu hasar büyük olasılıkla klastojenik etki gibi comet yöntemiyle saptanamayan ikincil DNA hasarıdır ya da bu konsantrasyonda pendimetalin ile olası DNA hasarını saptayabilmek için daha uzun süreli maruziyet gerekmektedir [90]. Diğer taraftan, çalışmamızda incelenen tüm konsantrasyonlarda pendimetalin+ H_2O_2 +Fpg uygulamasının yaptığı DNA hasarı, aynı konsantrasyonda pendimetalin+ H_2O_2 uygulanan lenfositlerdeki

hasara kıyasla yüksek bulunmuştur. CHO hücrelerinde 30 dakika süreyle 1-10000 μM konsantrasyonlarda pendimetalin ardından 5 dakika H_2O_2 uygulamasıyla oluşan DNA hasarı Fpg ile onarılabilen oksidatif DNA hasarıdır.

Literatür bilgileri ile çalışmamızdan elde edilen bulgular birleştirildiğinde yaygın kullanılan pendimetalin adlı dinitroanilin grubu herbisit bileşiğin periferik kan lenfositlerinde ve CHO hücrelerinde, 1-10000 μM konsantrasyonlarda comet yöntemiyle saptanabilen DNA hasar yapıcı etkileri bulunduğu ayrıca aynı kimyasal yapıya sahip olan bazı dinitroanilin herbisit bileşikler gibi klastojenik etkilere de sahip olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada pendimetalin, periferik kan lenfositleri ve CHO hücreleri ile 30 dakika süre ile inkübe edilmiştir. Pendimetalin'in DNA hasarı yapıcı etkileri hakkında daha geniş bilgi sahibi olabilmek için 30 dakikadan daha uzun inkübasyon süreleri kullanılarak benzer çalışmalar gerçekleştirmek yararlı olacaktır. Çalışmamızda 1 – 10000 μM olarak kullanılan konsantrasyon aralığında saptanan DNA hasarı verilerini ayrıntılandırmak ve insan maruziyetine yakın konsantrasyonlardaki olası etkiler hakkında bilgi sahibi olabilmek için de, 10 μM 'ın altında ve daha geniş aralıkta konsantrasyonlar kullanılarak ileri DNA hasarı tayin çalışmaları yapılabilir. Ayrıca, pendimetalin'in öngörülen klastojenik etkilerinin saptanması için kromozom hasar çalışmalarının gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- 1- Richardson, M.L., Gangolli, S.E. (1994). The dictionary of substances and their effects, Vol.6 The Royal Society of Chemistry, Clays Ltd., Cambridge, UK, pp.431-432.
- 2- Kegley, S., Hill, B., Orme, S. (2007). Pendimethalin. PAN Pesticide Database, Pesticide Action Network, North America, San Francisco, CA. Available via DIALOG. <http://www.pesticideinfo.org>. (Erişim Tarihi: 21.07.2011)
- 3- United States Environmental Protection Agency (US EPA), (1997).US Environmental Protection Agency, R.E.D. Facts: Pendimethalin. US EPA, Washington DC.
- 4- Ündeğer, Ü. (2001). ‘Pestisitlerin Olası Genotoksik ve İmmünotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi’, T.C. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara
- 5- Ecobichon, D.J. (1996). Toxic effects of pesticides. ‘Casarett and Doull’s Toxicology’ (Ed. C.D. Klaassen)’de, 5. Baskı, Mc Graw-Hill Co., New York, s. 643-689.
- 6- Marrs, T.C., Dewhurst, I. (2000). Toxicology of pesticides. ‘General and Applied Toxicology (Ed.B. Ballantyne, T. Marrs, T. Syversen) 3. Cilt’de, 2.Baskı, Macmillian Referance Ltd., New York, s.1993-2012.
- 7- Baumann, P., Dotray, A., Prostko, E. (1999). Herbicides How They Work and the Symptoms They Cause The Texas A&M University.
- 8- Vural, N. (1996) .‘Toksikoloji’, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No: 73, Ankara.

9- State of Colorado, 'Volume IV - Creating an Integrated Weed Management Plan: A Handbook for Owners and Managers of Lands with Natural Values', Appendix 9 - Herbicide Basics, s. 315-319.

<http://www.parks.state.co.us/SiteCollectionImages/parks/Programs/CNAP/CNAPPublications/App9.pdf> (Erişim Tarihi: 15.07.2011)

10- Ross, M.A., Childs, D.J. (1996). Herbicide mode-of-action summary. Cooperative Extension Service Publication WS-23, Purdue University, West Lafayette, IN.

11- Mikkelsen, D., Poulsen, E. (1962). 'Toxicology Of Herbicides', Pharmacological Reviews, Department Pharmacology and Toxicology, Royal Veterinary and Agricultural College, Copenhagen, Denmark.

12- Tu, M., Hurd, C., Robison, R., Randall, J.M. (2001). Weed Control Methods Handbook, General Properties of Herbicides, The Nature Conservancy, Arlington, Virginia..

13- Freed, V.H., Chiou, C.T. (1981). Physicochemical factors in routes and rates of human exposure to chemicals. Chapter 3 in Environmental health chemistry. J.D. McKinney, ed. Ann Arbor Science Publishers Inc., Ann Arbor, Michigan.

14- Helling, C.S., Kearney P.C., Alexander, M. (1971). Behavior of pesticides in soil. *Adv. Agron.*, 23, 147-240.

15- Voos, G., Groffman, P.M. (1997). Relationships between microbial biomass and dissipation of 2,4-D and dicamba in soil. *Biology and Fertility of Soils*, 24, 106-110.

16- McCall, P.J., Vrona, S.A., Kelley, S.S. (1981). Fate of uniformly carbon-14 ring labeled 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid and 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 29, 100-107.

17- Hutzinger, O. (1981). Environmental and toxicological chemistry at the University of Amsterdam: Five years of philosophy and practice of environmental health chemistry. Chapter 2 in *Environmental health chemistry*.

18- Farmer, W. J., Aochi, Y. (1987). Chemical conversion of pesticides in the soil-water environment. Chapter 7 in *Fate of pesticides in the environment*.

19- Kearny, P. C., Karns, J. S. (1987). Microbial Metabolism. Chapter 10 in *Fate of pesticides in the environment*.

20- Que Hee, S.S., Sutherland, R.G. (1991). The phenoxyalkanoic herbicides. Vol 1, CRC series in pesticide chemistry. CRC Press, Boca Raton, Fla.

21- Taylor, A.W., Glotfelty, D.E. (1988). Evaporation from soils and crops. Chapter 4 in *Environmental chemistry of herbicides*, Vol I. R. Grover, ed. CRC Press, Boca Raton, Fla.

22- Trajkovska, S., Mbaye, M., Gaye Seye, M.D., Aaron, J.J., Chevreuil, M., Blanchoud, H. (2009). 'Toxicological Study of Pesticides in Air and Precipitations of Paris by Means of a Bioluminescence Method', *Anal Bioanal Chem.*, 394, 1099-1106.

23- Weatley. G., Hardman. J. (1965). 'Indications of the presence of organochlorine insecticides in rainwater in central England', *Nature*; 207(996):486-487.

24- Buser, H.R. (1990). 'Atrazine and other s-triazine herbicides in lakes and in rain in Switzerland', *Environmental Science and Technology*, 7, 1049-1058.

25- Trautner, F., Huber, K., Niessner, R. (1992). 'Appearance and Concentration Ranges of Atrazine in Spring Time Cloud and Rainwater from the Vosges', *Journal of Aerosol Science*, 23, 999-1002.

- 26-** Trevisan, M., Montepiani, C., Ragoza, L., Bartoltti, C., Ioannilli, E., Del Re, A.A.M. (1993). 'Pesticides in rainfall and air in Italy', *Environmental Pollution*, 80, 31.
- 27-** Bester, K., Hühnerfuss, H., Neudorf, B., Thiemann, W. (1995). 'Atmospheric deposition of triazine herbicides in Northern Germany and the German Bight', *Chemosphere*, 30, 1639.
- 28-** Charizopoulos, E., Mourkidou, E.P. (1999). 'Occurrence of pesticides in rain of the Axios. River Basin, Greece', *Environmental Science and Technology*, 33, 2363.
- 29-** Chevreuil, M., Garmouma, M., Teil, M.J., Chestérikoff A. (1996). 'Occurrence of organochlorine (PCBs, pesticides) and herbicides (triazines, phenylureas) in the atmosphere and in the fallout from urban and rural stations of the Paris area', *Science of the Total Environment*, 182, 25-37.
- 30-** Chevreuil, M., Garmouma, M. (1993). 'Atmospheric fallout of triazines on the catchment basin of the river Mame', *Chemosphere*, 27, 1605-1608.
- 31-** Goolsby, D., Thurman, M., Pomes, M., Meyer, M., Battaglin, W. (1993). U.S. Geological Survey, open-file report, 93, 418-475.
- 32-** Aaron, J.J., Pernot, P., Quisefit, J.P., Tessier, D., Pinart, J. (2003). Actes de Colloque, 31ème Congrès du Groupe Français des Pesticides, Ed. Cemagref, Lyon, France, 259.
- 33-** Chevreuil, M. (2004). 'L'atmosphère, vecteur de micropolluants organiques aux écosystèmes', *L'Actualité Chimique*, 40, 277-278.
- 34-** Baraud, L., Tessier, D., Aaron, J.J., Quisefit, J.P., Pinart, J. (2003). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377, 1148-1152.

- 35-** Parker, L.W., Doxtader, K.G. (1983). Kinetics of the microbial degradation of 2,4-D in soil: effects of temperature and moisture. *Journal of Environmental Quality* 12, 553-558.
- 36-** Bovey, R. W., Richardson, C., Burnett, E., Merkle, M.G., Meyer, R.E. (1978). Loss of spray and pelleted picloram in surface runoff water. *Journal of Environmental Quality*, 7, 178-180.
- 37-** Chlorophenoxy herbicides (excluding 2,4-D and MCPA) in Drinking-water. Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed. Vol.2. Health criteria and other supporting information. World Health Organization, Geneva, 1996.
- 38-** Yalçinkaya, M. (2006). 'Bir Herbisit Olan 2,4-Diklorofenoksi Asetik Asit'in Medulla Spinalis Üzerine Etkileri', T.C. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir.
- 39-** Arnold., E.K. (1989). Pharmacokinetics of Chlorinated Phenoxy Acid Herbicides, *Veterinary Human Toxicology*, 31, 121-125.
- 40-** Guan, F., Watanabe, K., Ishii, A. (1998). Headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic determination of dinitroaniline herbicides in human blood, urine and environmental water. *Journal of Chromatography B Biomedical Sciences and Applications*, 714, 205-213.
- 41-** Ibrahim, M.A., Bond, G.G.,Burke,T.A., Cole,P., Dost, F.N., Enterline, P.E., Gough, M., Greenberg, R.S., Halperin, W.E., McConell, E., Munrun, L.C., Sweendberg, J.A., Zahm, S.H., Graham, J.D. (1991). Weight of the Evidence on the Human Carcinogenicity of 2,4-D. *Environmental Health Perspectives*, 96, 213-222.
- 42-** Spear, R. (1991). Recognized and Possible Exposure to Pesticides. Chapter 6 in Handbook of Pesticide Toxicology, Vol. 1, General Principles.

- 43-** Marer, P.J., Flint, M.L., Stimmann, M.W. (1988). The Safe and Effective Use of Pesticides. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources. Publication 3324, 387.
- 44-** Thompson, H. M. (1996) Interactions between pesticides; a review of reported effects and their implications for wildlife risk assessment. *Ecotoxicology*, 5, 59-81.
- 45-** İstanbulluoğlu, H., Oğur, R., Güleç, M. (2009). Pestisit Maruziyeti ve Nörolojik Bozukluklar. *Genel Tıp Dergisi*, 19,193-201.
- 46-** Menegon, A., Board, P., Blackburn, A.C., Mellick, G.D., Le Couteur, D.G. (1998) Parkinson's disease, pesticides, and glutathione transferase polymorphisms. *Lancet*, 352, 1344-1346.
- 47-** Gorell, J.M., Johnson, C.C., Rybicki, B.A., Peterson, E.L., Richardson, R.J. (1998). The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology*, 50, 1346-50.
- 48-** T.C. Sağlık Bakanlığı Zehirlenmeler Tanı Ve Tedavi Rehberleri, (2006), Ankara.
- 49-** Tintinalli, J.E., Stapczynski, J.S., Cline, D.M., Ma, O.J., Cydulka, R.K., Meckler, G.D. (2010). Tintinalli's Emergency Medicine: A Comprehensive Study Guide, 7e. Chapter 195 Pesticides.
- 50-** Engebretson J, Hall G, Hengel M, Shibamoto T. (2001). Analysis of pendimethalin residues in fruit, nuts, vegetables, grass, and mint by gas chromatography. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 49, 2198-2206.
- 51-** Tsukada, K., Azuhata, H., Katoh, H., Kuwano, H. (2009). Acute gastroduodenal injury after ingestion of diluted herbicide pendimethalin. *Singapore Med Journal*, 50, e105-106.

- 52-** Navarro, S., Perez, G., Navarro, G., Vela, N. (2007). 'Decline of Pesticide Residues from Barley to Malt', *Food Additives and Contaminants* 24(8): 851-859.
- 53-** Miyake, Y., Hashimoto, K., Matsuki, H., Ono, M., Tajima, R. (2002). Fate of insecticida and fungicide residues on barley during storage and malting. *Journal of the American Society of Brewing Chemist,s* 69, 110-115.
- 54-** Miyake, Y., Koji, K., Matsuki, H., Tajima, R., Ono, M., Mine, T. (1999). Fate of agrochemical residues, associated with malt and hops, during brewing. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 57, 46-54.
- 55-** Extoxnet, (1993) Pesticide Information Profile, 'Pendimethalin'. Extension Toxicology Network, <http://ace.orst.edu/info/extoxnet/tibs/manifest.htm> (Erişim Tarihi: 21.04.2011)
- 56-** 'Pendimethalin in Drinking Water', Guidelines for Drinking Water Quality, 2. Baskı, 2. Bölüm (1996), World Health Organization, Geneva.
- 57-** Worthing CR, ed. The pesticide manual, 9th ed. Farnham, British Crop Protection Council, (1991).
- 58-** Strandberg, M., Scott-Fordsmand, J.J. (2004). Effects of pendimethalin at lower trophic levels, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57, 190–201.
- 59-** Drinking-water quality for selected herbicides. Copenhagen, WHO Regional Office for Europe, (1987).
- 60-** Wauchope, R.D., Buttler, T.M., Hornsby A.G., Augustijn Beckers, P.W.M., Burt, J.P., (1992) Pesticide properties database for environmental decisionmaking. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 123, 1-157, 10-12.
- 61-** Kidd, H., James, D.R., (1991), Eds. The Agrochemicals Handbook, Third Edition. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, UK, s.10-12.

- 62-** Weed Science Society of America. Herbicide Handbook, Seventh Edition. Champaign, IL, (1994), s.10-59.
- 63-** Zulalian, J. (1990). Study of the absorption, excretion, metabolism, and residues in tissues of rats treated with carbon 14 labeled pendimethalin, Prowl herbicide. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 38, 1743-1754.
- 64-** U.S. Environmental Protection Agency, (1985). Pesticide Fact Sheet Number 50: Pendimethalin. Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, s.10-116.
- 65-** U.S. Environmental Protection Agency, (1987). Pesticide tolerance for pendimethalin. *Federal Register*, 52, 241, 47734-47735.
- 66-** Ündeğer, Ü., Schlumpf, M., Lichtensteiger, W. (2010). Effect of the herbicide pendimethalin on rat uterine weight and gene expression and in silico receptor binding analysis. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 502–508.
- 67-** Hill, A.B., Jefferies, P.R., Quistad, G.B., Casida, J.E. (1997). 'Dialkylquinoneimine Metabolites of Chloroacetanilide Herbicides Induce Sister Chromatid Exchanges in Cultured Human Lymphocytes'. *Mutation Research*, 395, 159-171.
- 68-** Jones, E.C.S., Kenner, J. (1931). The direct formation of quinones from 2,6-disubstituted derivatives of 4-nitrophenol, *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 1842–1857.
- 69-** Dimitrov, B.D., Gadeva1, P.G., Benova, D.K., Bineva, M.V. (2006). Comparative genotoxicity of the herbicides Roundup, Stomp and Reglone in plant and mammalian test systems. *Mutagenesis*, 21, 375–382.

- 70- Gökalp Muranlı, F.D. (2006). Kültürü Yapılan İnsan Lenfositlerinde Triasulfuron'un Genotoksik Etkileri, T.C. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Edirne.
- 71- Holland, N.T., Duramada, P., Rothmanb, N., Figgsc, W.L., Blairb, A., Hubbardd, A., Smitha, M.T. (2002). Micronucleus frequency and proliferation in human lymphocytes after exposure to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in vitro and in vivo. *Mutation Research*, 521, 165–178.
- 72- Patel, S., Bajpayee, M., Pandey, A.K., Parmar, D., Dhawan, A. (2007). In vitro induction of cytotoxicity and DNA strand breaks in CHO cells exposed to cypermethrin, pendimethalin and dichlorvos. *Toxicology in Vitro*, 21, 1409-1418.
- 73- Ventura, B.C., Angelis, D.F., Morales, M.A.M. (2008). Mutagenic and Genotoxic Effects of The Atrazine Herbicide in Oreochromis Niloticus (Perciformes, Cichlidae) Detected by The Micronuclei Test and The Comet Assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 90, 42–51.
- 74- Straube, E., Straube, W., Kruger, E., Bradatsch, M., Meisel, M., Rose, H. (1999). Disruption of male sex hormones with regard to pesticides: Pathophysiological and regulatory aspects. Institute of Occupational Medicine, University of Greifswald, Germany.
- 75- Andreotti1, G., Freeman, L.E.B., Hou, L., Coble, J., Rusiecki, J., Hoppin, J.A., Silverman, D.T., Alavanja, M.C.R. (2009). 'Agricultural Pesticide Use And Pancreatic Cancer Risk In The Agricultural Health Study Cohort. *International Journal of Cancer*, 124, 2495–2500.
- 76- Steenland,K., Carrano, A., Clapp, D., Ratcliffe, J., Ashworth, L., Meinhardt, T. (1985). Cytogenetic studies in humans after short-term exposure to ethylene dibromide. *Journal of Occupational Medicine*, 27, 729-732.

77-Kaurakis, A., Mouratidou, M., Barbouti, A., Dimikiotou, M. (1996). Cytogenetic effects of occupational exposure in the peripheral blood lymphocytes of pesticide sprayers. *Carcinogenesis*, 17, 99-101.

78-Yoder, J., Watson, M., Benson, W.W. (1973). Lymphocyte chromosome analysis of agricultural workers during extensive occupational exposure to pesticides. *Mutation Research*, 21, 335-340.

79-Robello, M.N., Becak, W., De Almeida, W.F., Pigati, P., Ungaro, M.T., Murata, T., Pereira, C.A.B. (1975). Cytogenetic study on individuals occupationally exposed to DDT. *Mutation Research*, 28, 449-454.

80-State of Washington, Department of Agriculture/Endangered Species Program (2004). Washington, s.1-19,
<http://agr.wa.gov/PestFert/EnvResources/EndangSpecies.htm>
(Erişim Tarihi: 29.07.2011)

81-Pendimethalin, Herbicide Profile 3/85, ‘Chemical Fact Sheet for Pendimethalin’, (1985). Washington, <http://pmep.cce.cornell.edu> (Erişim Tarihi: 30.07.2011)

82-United States Environmental Protection Agency (US EPA), (2008). ‘Pendimethalin (CASRN 40487-42-1) Integrated Risk Information System’, Washington, <http://www.epa.gov/iris/subst/0292.htm> (Erişim Tarihi: 12.06.2011)

83-European Commission, (2003). ‘Health & Consumer Protection Directorate-General’, Pendimethalin 7477/VI/98-final.

84- Hurley, P.M., Hill, R.N., Whiting, R.J. (1998). Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular cell tumors in rodents. *Environmental Health Perspectives*, 106, 437-445.

- 85-** Gebel, T., Kevekordes, S., Pav, k., Edenharder, R, Dunkelberg, H. (1997). In vivo genotoxicity of selected herbicides in the mouse bone-marrow micronucleus test. *Archives of Toxicology*, 71, 193-197.
- 86-**Dunkelberg, H, Fuchs, J., Hemgstler, J.G., Klein, E., Oesch, F., Strüder, K. (1994). Genotoxic effects of the herbicides alachlor, atrazine, pendimethaline and simazine in mammalian cells. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, 52, 498-504.
- 87-**Morejohn, L.C., Fosket, D.E. (1986). Tubulins from plants fungi and protests; a review. Shay J.W. (ed.), 'Cell and Molecular Biology of the Cytoskeleton', Plenum Publishing Corp, Mew York, s. 257-329.
- 88-**Morejohn, L.C.,Bureau, T.E. Mole-Bajer, J., Bajer, A.S., Fosket, D.E. (1987) Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro. *Planta*, 172, 252-264.
- 89-**Morisette, N.S., Mitra, A., Sept, D., Sibley D. (2004) Dinitroanilines bind α -tubulin to disrupt microtubules. *Molecular Biology of the Cell*, 15, 1960-1968.
- 90-**Speit, G., Schütz, P. (2008) The effect of inhibited replication on DNA migration in the comet assay in relation to cytotoxicity and clastogenicity. *Mutation Research*, 655, 22-27.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Düzce ilinde doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Düzce’de tamamladım. Lisans eğitimimi 2007 yılında Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi’nde tamamladım. 2008 yılında aynı üniversitenin Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans programına başladım. 3 yıl Fargem A.Ş. adlı ilaç arge firmasında formülasyon uzmanı olarak görev yaptıktan sonra, 2011 yılının başında Düzce Atatürk Devlet Hastanesi’nde eczacı ünvanıyla göreve başladım. Halen bu görevimi sürdürmekteyim.