



Neonikotinoidler ile İnsan Lenfositlerinde Genotoksisitenin Uyarılması

Halit KIZILET¹, Handan UYSAL^{2*}

¹Sağlık Bakanlığı, Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Erzurum, TÜRKİYE

²Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Erzurum, TÜRKİYE

Received: 22.05.2017; Accepted: 21.11.2017

<http://dx.doi.org/10.17776/csj.406158>

Özet: Bu çalışmada, neonikotinoid grubu insektisitlerden imidakloprid (İMİ) ve asetamiprid (ASE)'in genotoksik etkileri insane peripheral lenfosit hücrelerinde Kardeş Kromatid Değişim Testi (KKD) ile araştırılmıştır. Bu maddelerin olası genotoksik etkilerinin giderilebilmesi için de *Portulaca oleracea* L. (Semizotu) bitkisine ait su ve metanol ekstreleri kullanılmıştır. İsektisitlere ait genotoksisitenin belirlenmesi amacıyla kültür ortamına farklı konsantrasyonlarda İMİ (50, 100, 250 ve 500 ppm) ve ASE (25, 50, 100 ve 250 ppm) insektisitleri ilave edilmiştir. Yapılan incelemeler sonucu, her iki insektisit artan konsantrasyonuna bağlı olarak tüm uygulama gruplarında KKD frekansında artış gözlenmiştir ($P<0,05$). Ancak semizotu bitkisinin su (PO_{su}) ve metanol (PO_{met}) ekstreleri, insektisitlerin en yüksek uygulama grupları (İMİ:500ppm ve ASE:250ppm) ile birlikte (1:1/v:v) uygulandığı zaman KKD frekansının azaldığı ve bunun da istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur ($P<0,05$). Elde edilen bu bulgulara göre kardeş kromatit değişiminde gözlenen artış, genetik materyalde oluşan hasarın bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca PO_{met} ve PO_{su} ile bu hasarların azaltılması da semizotunun antijenotoksik bir ajan olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: İmidakloprid, Asetamiprid, Semizotu, *Portulaca oleracea* L., Kardeş Kromatid Değişim Testi

Induced Genotoxicity in Human Lymphocytes by Neonicotinoids

Abstract: In this study, genotoxic effects of imidacloprid (IMI) and acetamiprid (ASE) from neonicotinoid group insecticides were investigated in the human peripheral lymphocyte cells with the Sister Chromatid Exchange Test (SCE). Water and methanol extracts of *Portulaca oleracea* L. (Purslane) plant were used to eliminate the possible genotoxic effects of these substances. IMI (50, 100, 250 and 500 ppm) and ACE (25, 50, 100 and 250 ppm) insecticides were added to the culture medium at different concentrations in order to determine the genotoxicity of the insecticides. As a result, an increase in SCE frequency depending on the increased concentration was observed in all treatment groups of both insecticides ($P<0,05$). However, when the water (PO_{wtr}) and methanol (PO_{met}) extracts of the purslane plant were applied together with the highest application groups of insecticides (IMI: 500 ppm and ASE: 250 ppm) (1:1/v:v), the frequency of SCE decreased and found to be statistically significant ($P<0,05$). According to these findings, the increase in sister chromatite exchange was considered as a sign of damage to the genetic material. In addition, the reduction of these damages with PO_{wtr} and PO_{met} also indicated that the purslane may be an antigenotoxic agent.

Keywords: Imidacloprid, Acetamiprid, Purslane, *Portulaca oleracea* L., Sister Chromatid Exchange

1. GİRİŞ

Günümüzün en önemli sorunlarından birisi hızlı nüfus artışıdır. Türkiye İstatistik Kurumu verilerine göre, 1927'de 2 milyar olan dünya nüfusu günümüzde 7 milyarı geçerken, yine aynı yılda yaklaşık 13 milyon olan ülke nüfusumuz 2016 yılı sonu itibariyle 79 milyondan fazladır [1]. Hızlı nüfus artışıyla beraber gıda ihtiyacı da aynı oranda artmaktadır. Ancak dünyada tarıma ayrılan alan, 1950'den günümüze kadar 1,5 milyar hektar olarak sabit kalmıştır. Tarımsal alanların ve hayvansal üretimin kısıtlı oluşu da artan nüfusun besin ihtiyacını karşılamada yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle tarımda birim alandan elde edilebilecek verimi artırmak için yeni tarım tekniklerinin geliştirilmesi ve uygulanmasına gereksinim duyulmuştur [2]. Geleneksel tarımdan modern tarıma geçiş, ürün verimliliğini artırmış, ancak bu tekniklerin ve sulu tarımın yaygınlaşması bitki hastalıkları ve zararlılarının salgın haline gelmesine yol açmıştır [3]. Bu tür olumsuz durumları aşabilmek için de hala ilk ve en etkili yöntem olarak akla gelen tarımda zararlı hayvanlara, yabancı otlara ve hastalıklara karşı pestisit kullanımıdır. Pestisit, zararlı organizmaları engellemek, kontrol altına almak ya da zararlarını azaltmak için kullanılan madde ya da maddelerden oluşan karışımlardır. Pestisit, kimyasal bir madde, virüs ya da bakteri gibi biyolojik bir ajan, antimikrobik, dezenfektan ya da herhangi bir araç olabilir. Farklı alt grupları ile farklı türlere özgü olarak kullanılan bu maddeler birçok iç ve dış parazite karşı, hayvansal üretim sürecinde ve halk sağlığını korumak için karasinek, sivrisinek ve ev böceklerine karşı da en etkili yöntem olarak bildirilmektedir [4]. Pestisitlerin bir alt grubu olan insektisitler (böcek ilacı), tarımsal üretimde, depolarda ve evlerde zararlı böceklerin öldürülmesi ya da çoğalmalarının durdurulması amacıyla kullanılan kimyasal bileşiklerdir. Bunlar böceklerin doğrudan yumurtaları (ovisidal), larvaları (larvisidal) ve erginleri (adultisidal) üzerinde etkili olup yaygın kullanım alanına sahiptir.

İnsektisitler içerdikleri organik bileşiklere göre, organoklorlular, organofosfatlar, karbamatlar, piretroidler ve neonikotinoidler olarak sınıflandırılmaktadır. Neonikotinoidler, tütün bitkisinin bir ürünü olan nikotin kimyasal yapısı baz alınarak üretilen sentetik insektisitlerdir. Ancak 1970'li yıllardan itibaren sık kullanıma bağlı olarak insektisitlere karşı zararlılarda direnç geliştiği gözlenmiştir. Neonikotinoidler, farklı etki mekanizmaları ile direnç geliştiren birçok önemli zararlının kontrol edilmesinde etkili olmuş ve bu nedenle 2008'de dünya insektisit piyasasında %24 oranında pazar payı bulmuştur [5]. Bu çalışmada kullanılan neonikotinoid grubundan ve sistemik etkili imidakloprid (İMİ) ve asetamiprid (ASE), özellikle ışığa dayanıklı olmalarından dolayı dünyada ve ülkemizde en çok kullanılan insektisitler arasında yer almaktadır [6]. Ülkemizde de pamuk, meyve, sebze, tütün, antepfıstığı, turuncgiller ve üzüm bağlarında bulunan çeşitli zararlılara karşı ruhsatlı olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır [7].

Daha önce yapılan bazı çalışmalarda örneğin; *Helicoverpa zea* (mısır kurdu)'da ovisidal etkili olduğu belirlenen ASE ve İMİ'nin *Eisenia fetida* (toprak solucanı)'da sperm anormalliğine [8-10], İMİ'ye maruz kalan tarım işçilerinde de mikronükleus (MN) ve kardeş kromatit değişimi (KKD) frekansında artışa neden olduğu belirlenmiştir [11]. Yavuz Kocaman [12]'a göre, farklı dozlarda ASE de tıpkı İMİ gibi insan periferik lenfosit hücrelerinde MN ve KKD frekansını önemli derecede artırmaktadır. Yine İMİ uygulamasından sonra *Rana limnocharis* ve *R. n. hallowell*'in iribaşlarında da MN frekansının arttığı ayrıca Comet analizi ile bu insektisit DNA hasarı meydana getirdiği de gözlenmiştir [13].

Ancak Plazar *et al.* [14] tarafından bitkisel kaynaklı doğal bileşiklerin oksidatif stresin neden olduğu genotoksisteye karşı koruyucu bir aktivite sergilediği gösterilmiştir. Yine farklı fitokimyasallar içeren meyve ve sebzeler, antimikrobiyal, antioksidan, antimutajen ve

antikanserojenik etki gösterebilirler [15]. Ayrıca çeşitli bitki ekstraktları kullanılarak, genotoksik ajanların canlılar üzerinde oluşturmuş olduğu hasarların giderilmesi üzerine çalışmalar da yapılmaktadır. Bu bitkilerden semizotunun (*Portulaca oleracea* L.) geleneksel ya da yöresel lezzet kaynağı olarak kullanımının yanı sıra tıbbi bitki olarak kullanımı da oldukça yaygındır. Semizotu, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından en çok kullanılan tıbbi bitki olarak listelemiş ve “küresel anlamda her derde deva” olarak tanımlanmıştır [16].

Bu çalışmada İMİ ve ASE insektisitlerinin olası genotoksik etkilerine karşı halk arasında sıklıkla kullanılan semizotu bitkisine ait metanol ve su ekstraktlarının antijenotoksik potansiyelinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. İsektisitler

Sigma-Aldrich şirketinden temin edilen insektisitler (İMİ için CAS numarası: 13826-41-3 ve ASE için CAS numarası: 135410-20-7) KKD testinde kullanılmak üzere %2 dimetilsülfoksit (DMSO)’de çözülmüştür. İMİ’nin 500 ppm, ASE’nin ise 250 ppm stok çözeltileri hazırlanarak uygulama dozları bu stoklardan seyreltilerek kullanılmıştır. İsektisitlerin yarılanma ömürlerine göre stok çözeltiler belirli aralıklarla yenilenmiş ve taze hazırlanan çözeltiler ile deneyler tekrarlanmıştır.

2.2. *In vitro* Kardeş Kromatid Değişim (KKD) Testi için Donör Seçimi ve Kan Örneklerinin Alınması

Bu çalışmada *in vitro* kısa süreli test tekniklerinden KKD testi kullanılmıştır. Uygulama için sigara ve alkol kullanmayan, yakın zamanda enfeksiyon geçirmemiş, X ışını gibi herhangi bir fiziksel ajana maruz kalmamış, 23-25 yaşlarında sağlıklı 3 farklı donörden periferik kan alınmıştır.

2.3. KKD Testinde Kullanılan Kimyasal Maddeler

KKD testi için Evans [17] ve Perry and Thomson [18]’un metotları modifiye edilmiştir. Bu amaçla, periferik kan kültürü yönteminde kromozom medyumunu (CAS no:12557013 Life tech), kolşisin (CAS no:15210040 Life tech), preparatların boyanması için de giemsa (CAS no:M109204.0500 Merck) ve hoechst 33258 boyası (CAS no: B2261-1G Sigma) kullanılmıştır.

2.4. Semizotu (*Portulaca oleracea* L.) Bitkisinin Toplanması

Antijenotoksik ajan olarak kullanılmak üzere belirlenen semizotu bitkisi, Adıyaman ili merkez ilçesine bağlı Hasancık köyü civarından, 600-900 metre yükseklikten toplanmıştır. Doğal ortamından çiçeklenme döneminde ve tarıma uzak arazilerden toplanan örnekler, Doç. Dr. Meryem Şengül Köseoğlu (Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü) tarafından teşhis edilmiştir. Toplanan bu bitkinin gövde, yaprak, çiçek gibi toprak üstü organlarının tamamı güneş görmeyen gölge ortamda, oda sıcaklığında (22–24°C) kurutulmuştur.

2.5. Semizotu Metanol (PO_{met}) Ekstraktının Hazırlanması

Kurutulup öğütülmüş 100g semizotu,150mL metanol ile 24 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra süzölmüş ve 50°C sıcaklıkta soxhlet ekstraktörü ile yoğunlaştırılmıştır. Bu işlemler sonucu 6,8g semizotu metanol ekstraktı (PO_{met}) elde edilmiştir. PO_{met} %1’lik DMSO’da çözümlenerek uygulama gruplarında kullanılmıştır.

2.6. Semizotu Su (PO_{su}) Ekstraktının Hazırlanması

Kurutulup öğütülmüş 100g semizotu üzerine 60-80°C sıcaklıkta 300 mL saf su dökölüp oda sıcaklığına (22–24°C) gelinceye kadar bekletilmiştir. Soğuyan karışım süzgeç kâğıdından geçirilerek sulu bitki çözeltilisi elde

edilmiş ve bu çözelti -18°C 'de dondurulmuştur. Dondurulmuş çözeltideki su, liyofilizatör ile uzaklaştırılmış ve böylece semizotu su ekstraktı (PO_{su}) elde edilmiştir. Bu ekstrakt -18°C 'de saklanmış, kullanılacağı zaman distile suda çözülerek besiyerine katılmıştır.

2.7. *In vitro* Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Testi için Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

KKD testi için, periferik kan kullanılarak hücre kültürleri ve preparatlar hazırlanmıştır [17-18]. Bu amaçla stok kültür şişesinden, deneylerin yapılacağı kültür tüplerine steril şartlarda 5 mL kromozom medyum konulup 37°C 'de etüvde bekletilmiştir. 37°C 'deki kültürlerle 0,5 mL heparinize kan ve son konsantrasyonu 10^{-4} M olacak kadar BrdU (5-bromo-2-deoksiüridin=timin bazı analogu) eklenmiştir. Tüm maddeler tüp içinde iyice karıştırılarak etrafları ışık görmeyecek şekilde alüminyum folyo ile sarılıp $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'lik etüvde 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kardeş kromatidler üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla her insektisit her uygulama konsantrasyonu için dilüe edilerek 24. saatte kültür tüplerine 0,25 mL olmak üzere ayrı ayrı eklenmiştir. İnsektisitlerin uygulama konsantrasyonları yapılan ön denemeler ile İMİ için 50, 100, 250 ve 500 ppm, ASE için de 25, 50, 100 ve 250 ppm olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada insektisit uygulama grupları dışında ayrıca hem negatif hem de pozitif kontrol grupları hazırlanmıştır. Negatif kontrol grupları için distile su ve insektisitlerin çözücüsü olan DMSO, pozitif kontrol grubu olarak da mutajenik etkisi iyi bilinen etil metansülfonat (EMS) kullanılmıştır.

Antigenotoksisite çalışmasında ise tüm insektisitlerin en yüksek uygulama grubuna PO_{met} ve PO_{su} (1:1 v/v) ayrı ayrı uygulanarak ikinci bir deney düzeniği hazırlanmıştır. Kültür tüplerine eklenen insektisitler, PO_{met} , PO_{su} , distile su, DMSO, EMS ve BrdU gibi kimyasal maddelerin tümü kontaminasyonu önlemek için membran filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

İnkübasyonun başlangıcından 70 saat sonra her tüpe son konsantrasyonu $0,5 \mu\text{g/mL}$ olacak kadar kolşisin eklenmiş ve hafifçe çalkalanmıştır. Tüpler tekrar $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de etüve konularak 2 saat daha bekletilmiştir. 72 saatin sonunda etüvden çıkarılan tüpler sırasıyla potasyum klorürle hazırlanan hipotonik solüsyondan ve 3:1 oranında metanol:asetik asit ile hazırlanan tespit çözeltisinden geçirilerek yayma preparatlar yapılmıştır. Yayma preparatlar Rooney and Czepulkowski [19]'nin fluoresan-giemsma metoduna göre boyanmış ve üzerlerine entellan damlatılıp lamellerle kapatılarak kalıcı hale getirilmiştir. Hazırlanmış olan daimi preparatlar, ışık mikroskopunda immersiyon objektifi ile incelenmiştir (10×100). KKD sayısı, her donörün kan kültürüne ait preparatlardan, ikinci mitozu geçiren 25 metafaz plağında saptanmıştır. Ayrıca insektisitlerin replikasyon üzerindeki etkilerini saptamak amacı ile replikasyon indeksi de (Rİ) hesaplanmıştır.

2.8. İstatistiksel Analiz

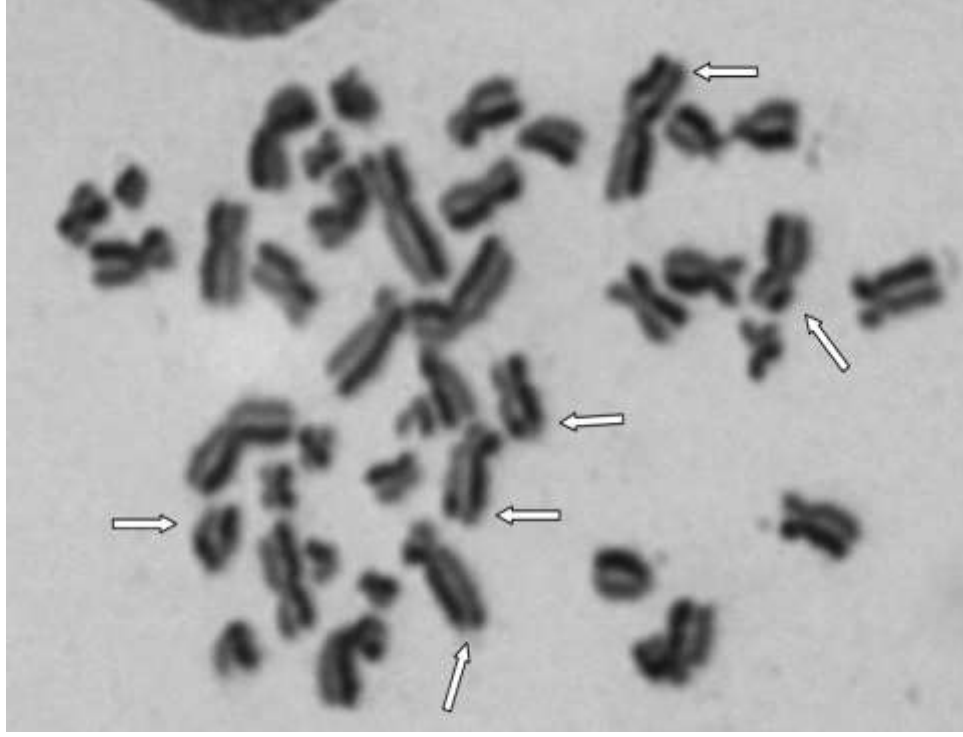
Çalışmalardan elde edilen KKD ve Rİ değerleriyle ilgili istatistiksel analizler için, SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 13.0 programı kullanılmıştır. Kontrol grupları ve uygulama gruplarına ait elde edilen verilerin karşılaştırılması için tek değişkenli varyans analizi (ANOVA) ve Tukey testi uygulanmıştır.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

İMİ ve ASE için oluşturulan uygulama gruplarına ait kardeş kromatid değişimleri mikroskopik olarak gözlenmiş (Şekil 1) ve onlara ait KKD değerleri, negatif ve pozitif kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. Distile su ve DMSO için ortalama KKD değerleri sırasıyla $3,60\pm 0,02$, $3,70\pm 0,01$ olup her iki kontrol grubu arasındaki fark istatistikî olarak önemsizdir ($P>0,05$). EMS için ise bu değer $32,61\pm 0,01$ 'dir ve negatif kontrol grubu olan distile su ile arasındaki fark $P<0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 1). Distile su, DMSO ve EMS için hesaplanan Rİ değerleri ise

sırasıyla $2,41\pm 0,03$, $2,24\pm 0,07$ ve $2,01\pm 0,07$ 'dir (Çizelge 1). Bu sonuçlara göre, Rİ değerleri bakımından distile su ve DMSO kontrol grupları arasındaki fark istatistikî olarak

önemsiz iken ($P>0,05$) her iki negatif kontrol ve EMS pozitif kontrol grupları arasındaki fark $P<0,05$ düzeyinde önemlidir.



Şekil 1. *In vitro* kan kültüründe ikinci mitozu geçiren metafaz plağı ve KKD'ler (10X100).

İMİ uygulanması sonucu elde edilen ortalama KKD değerleri ise 50, 100, 250 ve 500 ppm için sırasıyla $4,43\pm 0,01$; $4,68\pm 0,01$; $5,92\pm 0,01$ ve $7,12\pm 0,01$ olarak tespit edilmiştir (Çizelge 1). Tüm İMİ uygulamalarına ait sonuçlar, DMSO kontrol grubuna ait sonuçlar ile

karşılaştırıldığında aradaki fark $P<0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Bu uygulama gruplarına ait Rİ değerleri de sırasıyla $1,95\pm 0,04$; $1,88\pm 0,07$; $2,01\pm 0,08$; $1,99\pm 0,03$ olarak hesaplanmıştır (Çizelge 1).

Çizelge 1. İMİ uygulama gruplarına ait KKD değerleri ve istatistikî analiz sonuçları.

Uygulama grupları	KKD/hücre (Ortalama)	Minimum ve maksimum KKD değerleri	Replikasyon indeksi	
Distile su	$3,60\pm 0,02$	1-11	$2,41\pm 0,03$	
DMSO (%2)	$3,70\pm 0,01$	1-10	$2,24\pm 0,07$	
EMS(10mM)	$32,61\pm 0,01^*$	7-51	$2,01\pm 0,07$	
İMİ (ppm)	50	$4,43\pm 0,01^*$	1-12	$1,95\pm 0,04$
	100	$4,68\pm 0,01^*$	1-12	$1,88\pm 0,07$
	250	$5,92\pm 0,01^*$	1-11	$2,01\pm 0,08$
	500	$7,12\pm 0,01^*$	3-17	$1,99\pm 0,03$

*DMSO'ya göre 0,05 düzeyinde önemli

Çalışmamızda genotoksisitesini belirlemek amacıyla kullandığımız ikinci insektisit olan ASE'nin 25, 50, 100 ve 250 ppm uygulaması sonucu elde edilen ortalama KKD değerleri sırasıyla $3,92\pm 0,03$; $5,80\pm 0,01$; $6,14\pm 0,004$ ve

$6,73\pm 0,01$ olarak bulunmuştur (Çizelge 2). Çizelge 2'de de görüldüğü gibi tüm uygulama gruplarından elde edilen sonuçlar, DMSO kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman aradaki fark $P<0,05$ düzeyinde önemlidir. ASE

uygulama grupları için Rİ değerleri de sırasıyla 1,93±0,02;1,98±0,03;2,18±0,04;1,83±0,06 olarak hesaplanmıştır ve bu değerlerin doz artışı

ile birlikte hem negatif ve hem de pozitif kontrol gruplarına göre düşüş gösterdiği gözlenmiştir (Çizelge 2).

Çizelge 2. ASE uygulama gruplarına ait KKD değerleri ve istatistikî analiz sonuçları.

Uygulama grupları	KKD/hücre (Ortalama)	Minimum ve maksimum KKD değerleri	Replikasyon indeksi
Distile su	3,60±0,02	1-11	2,41±0,03
DMSO(%2)	3,70±0,01	1-10	2,24±0,07
EMS(10mM)	32,61±0,01*	7-51	2,01±0,07
ASE (ppm) 25	3,92±0,03*	2-9	1,93±0,02
ASE (ppm) 50	5,80±0,01*	1-16	1,98±0,03
ASE (ppm) 100	6,14±0,04*	1-11	2,18±0,04
ASE (ppm) 250	6,73±0,01*	3-14	1,83±0,06

*DMSO'ya göre 0,05 düzeyinde önemli

3.1. İnsektisit+PO_{met}/PO_{su} uygulaması sonucu elde edilen KKD bulguları

500 ppm İMİ için 7,12±0,01 ve 250 ppm ASE için 6,73±0,01 olan KKD değerleri (Çizelge 1 ve Çizelge 2), İMİ+PO_{met} ve ASE+PO_{met} için sırasıyla 3,88±0,04 ve 3,86±0,05 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3). İMİ/ASE+PO_{met} için hesaplanan bu değerler, her insektisit en yüksek uygulama grubuna ait KKD değerleri ile karşılaştırıldığında, KKD/hücre oranlarındaki düşüş antijenotoksiste açısından önemli

bulunmuştur (P<0,05). İMİ+PO_{met} ve ASE+PO_{met} uygulama grupları için ayrıca Rİ değerleri de sırasıyla 1,98±0,05 ve 2,04±0,08 olarak hesaplanmıştır. 500 ppm İMİ için 1,99±0,03 olan Rİ değeri ile İMİ+PO_{met} için bulunan 1,98±0,05 Rİ değeri arasında istatistikî olarak herhangi bir fark bulunmazken, 250 ppm ASE'de 1,83±0,06 olan Rİ değeri, ASE+PO_{met}'de 2,04±0,08'e yükselmiştir (Çizelge 3).

Çizelge 3. İMİ/ASE+PO_{met} için KKD değerleri ve istatistiksel analizleri

Uygulama grupları	KKD/hücre (Ortalama)	Minimum ve maksimum KKD değerleri	Replikasyon indeksi
İMİ(500ppm)	7,12±0,01	3-17	1,99±0,03
İMİ+PO _{met} (1:1)	3,88±0,04*	1-11	1,98±0,05
ASE(250ppm)	6,73±0,01	3-14	1,83±0,06
ASE+PO _{met} (1:1)	3,86±0,05*	1-12	2,04±0,08

*kendi insektisit grubuna göre önemli.

Semizotu bitkisinin antijenotoksik etkisinin belirlenmesi için bir diğer deney grubu PO_{su} ekstraktı ile oluşturulmuştur. Bu ekstrakt İMİ ve ASE ile birlikte uygulandığı zaman elde edilen KKD/hücre oranları İMİ+PO_{su} ve ASE+PO_{su} için sırasıyla 3,86±0,06 ve 3,81±0,04 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar kendi insektisit gruplarıyla karşılaştırıldığında KKD oranlarında gözlenen gerileme P<0,05 düzeyinde önemli bulunmuştur. Rİ değerleri ise

İMİ+PO_{su} ve ASE+PO_{su} için sırasıyla 1,95±0,05; 1,95±0,06 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4). Çizelge 4 incelendiği zaman, İMİ (500ppm) ve İMİ+PO_{su} arasında Rİ değerleri bakımından herhangi bir fark gözlenmezken, ASE (250ppm) için 1,83±0,06 olan indeks ASE+PO_{su} uygulama grubunda 1,95±0,06'ya yükselmiştir. Ancak her iki uygulama grubunun replikasyon indeksindeki bu değişimler istatistikî olarak önemli bulunmamıştır.

Çizelge 4. İMİ/ASE+PO_{su} için KKD değerleri ve istatistiksel analizleri.

Uygulama grupları	KKD/hücre (Ortalama)	Minimum ve maksimum KKD değerleri	Replikasyon indeksi
İMİ(500ppm)	7,12±0,01	3-17	1,99±0,03
İMİ+PO _{su} (1:1)	3,86±0,06*	1-11	1,95±0,05
ASE(250ppm)	6,73±0,01	3-14	1,83±0,06
ASE+PO _{su} (1:1)	3,81±0,04*	1-11	1,95±0,06

*kendi insektisit grubuna göre önemli.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tarih boyunca, tarımsal savaşında kullanılan insektisitlere karşı, zararlılar direnç geliştirmişlerdir. Bu direnç, bitkisel kökenli, spesifik ve yeni nesil sentetik insektisitlerin geliştirilmesine neden olmuştur. İMİ ve ASE neonikotinoidleri son 30 yıl içinde ülkemizde ve dünyada sıklıkla kullanılan sistemik insektisitler olarak hedef organizmaya özgüdürler. Daha önce yapılan çalışmalar ve elde ettiğimiz verilere göre İMİ ve ASE, çeşitli canlılarda genotoksik etki göstermektedir. Bu genotoksik etkinin oluşum mekanizması, Kaymak vd. [20] göre şöyledir; insektisitlerin oluşturduğu sinir ve endokrin sinyallerdeki kesintiler, hücre içinde Ca^{+2} değişimine neden olmaktadır. Bu durum oksidatif strese neden olan nitrik oksit sentaz gibi proteolitik enzimlerin aktivasyonuna ve serbest radikallerin üretilmesinde artışa yol açmaktadır. Sitoplazmada artan Ca^{+2} , inaktif durumdaki Ca^{+2} bağımlı proteazları ve nükleazları aktifleştirerek sitoplazmik proteinlerin parçalanmasına ve apoptozise özgü internükleozomal DNA kırıklarının oluşmasına neden olmaktadır. 180 baz çifti ve katları şeklinde oluşan kırılmalara bağlı olarak genotoksikite uyarılmaktadır [21]. Hücre içerisinde ise insektisitler hücresel bileşenlerin elektron alma/verme gibi redoks döngülerine (geri dönüşümlü oksidasyon yoluyla) girerek Reaktif Oksijen Türlerinin (Reactive Oxygene Species/ROS) seviyesini artırabilirler. Hücre metabolizmasında glutatyon gibi indirgeyicilerin rezervlerini tüketebilir ve sonuçta antioksidan potansiyelini azaltabilirler. Enerji sağlayan süreçlere müdahale ederek detoksifikasyon ve metabolizma için gerekli kaynakları azaltabilir ve temel yaşamsal süreçlerdeki değişimler (transkripsiyon ve translasyon gibi) dolaylı yoldan ROS düzeyini artırabilir [22]. Ayrıca insektisitler, serbest radikal oluşturmakta ve ROS temizleyen enzimlerin yapısında da değişiklik meydana getirerek oksidatif stres oluşmasına sebep olmaktadır [23]. Hidrojen peroksit ve hidroksil

radikali gibi ROS'lar ise biyolojik makromoleküllerle reaksiyona girerek enzim inaktivasyonu ve DNA hasarına neden olabilmektedirler [24]. Oksidatif stres sonucunda oluşan serbest radikaller, lipid peroksidasyonuna yol açarak hücre membranının geçirgenliğinin bozulmasına yol açarlar. Bu süreç sonucunda oluşan zincirleme reaksiyonlar ile hücrenin organelleri içerisinde bulunan doymamış yağ asitleri, çeşitli enzimlerin yapısına giren proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler de hasar görürler [25]. Çalışmalarımızda kullanmış olduğumuz İMİ ve ASE insektisitlerinin genotoksikitesi KKD testi ile tespit edilmiş ve mekanizmanın oksidatif strese dayalı olarak gerçekleştiği/gerçekleşmiş olabileceği literatür bilgileri ile de desteklenmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında PO_{met} ve PO_{su} ekstraktları kullanılarak genotoksik etkilerin giderilebildiği, KKD oranlarının düştüğü ve bu oranların kontrol grubuna yaklaştığı gözlenmiştir (Çizelge 3,4). Şifalı bitkiler, antioksidanlar ve ROS süpürücü moleküllerin potansiyel bir kaynağı olup [26], yüksek oranda ve çeşitlilikte vitamin ve mineral bulundurlar. Çeşitli araştırmacılar, bu şifalı bitkilerden birisi olan semizotunun hiçbir toksisite ve genotoksikite göstermediğini [27], vitamin, mineral ve bağışıklık sistemini güçlendirdiği bilinen Omega-3 yağ asitleri, glutatyon, α -linoleik asit, glutamik asit ve aspartik asit bakımından zengin olduğunu bildirmişlerdir [28]. Yine semizotu bitkisinin izolösin, lösin, lizin, metiyonin, sistin, fenilalanin, tirozin, treonin ve valin gibi birçok amino asitten oluşan oldukça zengin bir kaynak olduğu da belirtilmiştir [29]. Uddin *et al.* [30]'a göre, farklı semizotu türleri içerdikleri mineral ve antioksidanlar ile fonksiyonel gıda ve besin destekleri (nutrasötikler) olarak da kullanılabilirler. Örneğin Behravan *et al.* [31] insan lenfosit hücrelerinde çeşitli oksidatif ajanların neden olduğu DNA hasarlarını, Yen *et al.* [32]'da kinolinin neden olduğu mutajeniteyi semizotu su ekstraktının giderdiğini

bildirmişlerdir. Bu çalışmada da hem PO_{su} hem de PO_{met} ekstraktının KKD frekansını düşürdüğü tespit edilmiştir. Yine semizotu bitkisi içerdiği askorbik asit ve glutasyon ile nükleik asitlerde ve DNA’da hasara neden olan peroksidazları ve serbest radikalleri süpürürken aynı zamanda bu radikallerin üretimlerini de azaltır [33]. Ayrıca You Guo *et al.* [34], semizotunda bulunan polisakkaritlerin süperoksit anyonlarını, nitrik oksit ve hidroksil radikallerini önemli derecede süpürebildiklerini ve bu polisakkaritlerin T ve B lenfositlerinin çoğalmasını da artırabildiklerini bildirmişlerdir.

Benzer şekilde farklı şifalı bitkiler kullanılarak daha önce yapılan çeşitli çalışmalarda örneğin, *D. melanogaster*’de yapılan *in vivo* deneylerde *Echium amoenum* (İran borajı) metanol ekstraktının *D. melanogaster*’de EMS’nin genotoksik etkilerini azalttığı [35], *R. canina* (kuşburnu)’nin DNA hasarına neden olan EMS üzerine süpürücü etki gösterdiği [15], *Panax ginseng* (Kore ginsengi)’in antirekombinojenik etkili olduğu [36], *Salvia lavandulifolia* (adaçayı), *Hypericum scabrum* (binbirdelik otu), *Capsella bursa pastoris* (çobançantası) ve *Teucrium orientale* (mayasıl otu) bitkilerinin su ekstraktlarının *D. melanogaster*’de İMİ ve ASE’nin ömür uzunluğunu kısaltıcı etkilerini giderdiği [37] gözlemlenmiştir ve bu çalışmalar da bizim sonuçlarımızı destekler niteliktedir. Kasımoğlu and Uysal [38], sipermetrin ve fenvelerat insektisitlerinin insan periferik lenfositlerinde meydana getirdiği genotoksik etkinin *R. canina* (kuşburnu) su ve etanol ekstraktları ile Siddique *et al.* [39] ise siprotoren asetatin genotoksik etkisinin *Ocimum sanctum* (fesleğen) bitkisi ile giderildiğini bildirmişlerdir.

Sonuç olarak bu çalışmada ülkemizde ve dünyada son otuz yılda sıklıkla kullanılan sentetik insektisitlerden İMİ ve ASE’nin neden olduğu genotoksikite *in vitro* olarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan insektisitler bitkisel kökenli sentetik insektisitler olup memelilerde düşük toksisite göstermektedirler. Ancak benzer çalışmalarda ve sonuçlarımızda

da görüldüğü gibi yüksek dozlarda ve kronik uygulamalarda hücrede oksidatif strese ve buna bağlı olarak DNA hasarlarına neden olmaktadır. Çalışmanın ikinci kısmında ise insektisitlerin neden olduğu oksidatif stres kaynaklı DNA hasarları ve buna bağlı mutajenite, PO_{met} ve PO_{su} ekstraktlarıyla giderilmiştir. Bu güçlü etkinin semizotunun içerdiği zengin vitamin, mineral ve antioksidan maddelerin antigenotoksik ve antimutajenik etkiye sahip olmasından kaynaklandığını elde ettiğimiz bulgular ve literatür bilgileri ışığında söyleyebiliriz.

Teşekkür: Bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı tarafından “Bazı İsektisitlerin Genotoksik Etkileri ve *Portulaca oleracea* L. Bitkisine Ait Ekstraktların Antigenotoksik Özelliklerinin Belirlenmesi” isimli (BAP–2011/112) proje olarak desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1]. Türkiye istatistik kurumu resmi sitesi, TÜİK.
Adres: <http://www.tuik.gov.tr> Retrived April 12, 2017.
- [2]. Demircan V. ve Yılmaz H., Isparta ili elma üretiminde tarımsal ilaç kullanımının çevresel duyarlılık ve ekonomik açıdan analizi, *Ekoloji.*, 57 (2005) 15-25.
- [3]. Arslan N. ve Yılmaz G., Pestisit kirliliğinin azaltılmasında bitkisel bir kaynak pireotu (*Pyrethrum* sp.) türleri, *Ekoloji.*, 6 (1993) 3-6.
- [4]. Greene S.A. and Pohanish R.P., *Sittig’s Handbook of Pesticides and Agricultural Chemicals*, 2nd edition NY, Norwich, 2005; pp 1189.
- [5]. Jeschke P., Nauen R., Schindler M., Elbert A., Overview of the status and global strategy for neonicotinoids, *J Agr Food Chem.*, 59 (2011) 2897-2908.
- [6]. Tomizawa M. and Yamamoto I., Structure-activity relationships of nicotinoids and imidacloprid analogs, *J Pesticide Sci.*, 18-1 (1993) 91-98.

- [7]. Yücer M.M., Ruhsatlı Tarım İlaçları, İstanbul: Hasad Yayıncılık, 2012.
- [8]. Zang Y., Zhong Y., Luo Y. Kong Z.M., Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm, *Eisenia fetida*, Environ Pollut., 108 (2000) 271-278.
- [9]. All J., Lance K., Lohmeyer K., Ovicidal properties of leverage for bollworm in cotton, In Proc. Beltwide Cotton Conf., TN, Memphis, 2001.
- [10]. Parrish M.D., Ayad H., Holmes K., Ovicidal Activity of Acetamiprid (Assail TM brand 70WP insecticide) on Economic Pests of Cotton, In Proc. Beltwide Cotton Conf., TN, Memphis, 2001.
- [11]. Lucero L., Pastor S., Suárez S., Durbán R., Gómez C., Parrón T., Creus A., Marcos R., Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells, Mutat Res., 464 (2000) 255-262.
- [12]. Yavuz Kocaman A., Acetamiprid ve Alpha-cypermethrin Pestisidlerinin Tek Başına ve Karışım Halinde Kullanıldıkları Zaman İnsan Periferik Lenfositlerindeki *In Vitro* Genotoksik Etkileri, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana. 2007.
- [13]. Feng S., Kong Z., Wang X., Zhao L., Peng P., Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian, *Rana N. Hallowell*, Chemosphere., 56-5 (2004) 457-63.
- [14]. Plazar J., Filipic M., Groothuis G.M., Antigenotoxic effect of xanthohumol in rat liver slices, Toxicol *in vitro.*, 22 (2008) 318-327.
- [15]. Kızılet H., Kasımoğlu C., Uysal H., Can the *Rosa canina* plant be used against alkylating agents as a radical scavenger?, Pol J Environ Stud., 22 (2013) 1263-1267.
- [16]. Lim Y.Y. and Quah E.P.L., Antioxidant properties of different cultivars of *Portulaca oleracea*, Food Chem., 103 (2007) 734-740.
- [17]. Evans H.J., Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens. Chemical Mutagens: Principles and Methods for their Detection, Hollander, A (Ed), New York: Pleunum Press, 1976; pp 1-29.
- [18]. Perry P.E. and Thomson E.J., The Methodology of Sister Chromatid Exchanges. Kilbey B.J., Legator M., Nichols W., Ramel C., (Eds). Handbook of Mutagenicity Test Procedures. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 1984; pp 495-529.
- [19]. Rooney D.E. and Czepulkowski B.H., Human Cytogenetics: A Practical Approach. Rooney D.E. and Czepulkowski B.H., (Eds). Volume II: Malignancy and Acquired Abnormalities 2nd ed. England: IRL Press Oxford, 1986; pp 224.
- [20]. Kaymak G., Akbulut C., Esmer H.E., Kayhan F.E., Yön N.D., Sucul organizmalarda çevresel şartlara karşı geliştirilen oksidatif stress mekanizmaları ve adaptif yanıtlar, M.Ü. Fen Bilimleri Dergisi., 4 (2014) 154-169.
- [21]. Berliocchi L., Bano D., Nicotera P., Ca²⁺ signals and death programmes in neurons, Phil Trans R Soc B., 360-1 (2005) 2255- 2258.
- [22]. Stara A., Kristan J., Zuskova E., Velisek J., Effect of chronic exposure to prometryne on oxidative stress and antioxidant response in common carp (*Cyprinus carpio* L.), Pestic Biochem Physiol., 105-1 (2013) 18-23.
- [23]. Giordano G., Afsharinejad Z., Guizzetti M., Vitalone A., Kavanagh T.J., Costa L.G., Organophosphorus insecticides chlorpyrifos and diazinon and oxidative stress in neuronal cells in a genetic model of glutathione deficiency, Toxicol Appl Pharmacol., 219 (2007) 181-189.
- [24]. Banerjee B.D., Seth V., Ahmed R.S., Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends, Rev Environ Health., 16 (2001) 1-40.

- [25]. Hermes-Lima M., Zenteno-Savín T., Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress, *Comp Biochem Phys C*, 133 (2002) 537-56.
- [26]. Arora R., Gupta D., Chawla R., Sagar R., Sharma A., Kumar R., Prasad J., Singh S., Samanta N., Sharma R.K., Radioprotection by plant products: present status and future prospects, *Phytother Res.*, 19-1 (2005) 1-22.
- [27]. Liu L., Howe P., Zhou Y.F., Xu Z.Q., Hocart C., Zhan R., Fatty acids and beta-carotene in australian purslane (*Portulaca oleracea*) varieties, *J Chromatogr A*, 893-1 (2000) 207-13.
- [28]. Çoruh İ. ve Ercişli S., Semizotu (*Portulaca oleracea* L.): tıbbi ve aromatik amaçla kullanılan yenilebilir yabancı bir bitki. An International Conference "Medicinal and Aromatic Plants in Generating of New Values in 21 Century", Sarajevo. 2011.
- [29]. Dkhil M.A., Moniem A.E.A., Al-Quraishy S., Saleh R.A., Antioxidant effect of purslane (*Portulaca oleracea*) and its mechanism of action, *J Med Plant Res.*, 5-9 (2011) 1589-1563.
- [30]. Uddin M.K., Juraimi A.S., Ali M.E., Ismail M.R., Evaluation of antioxidant properties and mineral composition of purslane (*Portulaca oleracea* L.) at different growth stages, *Int J Mol Sci.*, 13-8 (2012) 10257–10267.
- [31]. Behravan J., Mosafa F., Soudmand N., Taghiabadi E., Razavi B.M., Karimi G., Protective effects of aqueous and ethanolic extracts of *Portulaca oleracea* L. aerial parts on H₂O₂-induced DNA damage in lymphocytes by comet assay, *J Acupunct Meridian Stud.*, 4-3 (2011) 193-197.
- [32]. Yen G.C., Chen H.Y., Peng H.H., Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emerging edible plants, *Food Chem Toxicol.*, 39 (2001) 1045–1053.
- [33]. Folkes L.K., Trujillo M., Bartesaghi S., Radi R., Wardman P., Kinetics of reduction of tyrosine phenoxyl radicals by glutathione, *Arch Biochem Biophys.*, 506 (2011) 242-249.
- [34]. You Guo C., Jia S.Z., Ping C.X., Evaluation of free radicals scavenging and immunity-modulatory activities of Purslane polysaccharides, *Int J Biol Macromol.*, 45 (2009) 448–452.
- [35]. Uysal H., Kızılet H., Ayar A., Taheri A., The use of endemic Iranian plant, *Echium amoenum* against the ethyl methanesulfonate and the recovery of mutagenic effects, *Toxicol Ind Health.*, 31-1 (2015) 44-51.
- [36]. Pereira D.G., Antunes L.M., Graf U., Spanó M.A., Protection by *Panax ginseng* CA Meyer against the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *D. melanogaster*, *Genet Mol Biol.*, 31-4 (2008) 947-955.
- [37]. Ünver S., Bazı Neonikotinoid İsektisitlerin *Drosophila melanogaster*'de Ömür Uzunluğu ile Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerine Etkileri ve Olası Toksik Etkilerinin Çeşitli Bitki Ekstraktları Kullanılarak İyileştirilmesi Üzerine Araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum. 2015.
- [38]. Kasımoğlu C. and Uysal H., Mutagenic biomonitoring of pirethroid insecticides in human lymphocyte cultures: Use of micronuclei as biomarkers and recovery by *Rosa canina* extracts of mutagenic effects, *Pharmaceut Biol.*, 53-5 (2014) 625-629.
- [39]. Siddique Y., Ara G., Beg T., Afzal M., Anti-genotoxic effect of *Ocimum sanctum* L. extract against cyproterone acetate induced genotoxic damage in cultured mammalian cells, *Biol.*, 58 (2007) 4-7.