



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FORKLORFENURONUN İNSAN LENFOSİT KÜLTÜRÜNDEKİ
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Berna MULLAOĞLU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY
KASIM-2021



T.C.

HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FORKLORFENURONUN İNSAN LENFOSİT KÜLTÜRÜNDEKİ
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Berna MULLAOĞLU
ORCID:0000-0003-0506-521X

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman
Prof. Dr. Ayşe YAVUZ KOCAMAN
ORCID:0000-0001-7700-784X

HATAY
KASIM-2021

26.11.2021

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

Berna MULLAOĞLU

ÖZET

FORKLORFENURONUN İNSAN LENFOSİT KÜLTÜRÜNDEKİ GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Forklorfenuron (FCF) sitokininler grubuna dahil olan ve dünya çapında tarımsal uygulamalarda yaygın olarak kullanılan bir bitki gelişim düzenleyicisidir. Yaygın kullanım alanına sahip olmakla birlikte, FCF'nin genotoksik potansiyeliyle ilgili bilgiler oldukça kısıtlıdır. Bu nedenle, bu çalışmada FCF'nin insan lenfositleri üzerindeki potansiyel genotoksik etkisinin *in vitro* kromozom anormallliği (KA) testi ile araştırılması amaçlanmıştır.

Kültürler, 0.25, 0.50, 1.00 ve 2.00 µg/ml konsantrasyonlarındaki FCF ile 24 ve 48 saat süre ile muamele edilmiştir. Çalışmada her deneye paralel olarak negatif kontrol ve pozitif kontrol kullanılmıştır. FCF, yüksek iki konsantrasyonda (1.00 ve 2.00 µg/ml) ve her iki uygulama periyodunda (24 ve 48 saat) KA oluşumunu uyararak anormal hücre yüzdesini negatif kontrole göre önemli derecede arttırmıştır. Ayrıca, toplam KA/hücre oranı, 0.50, 1.00 ve 2.00 µg/ml konsantrasyonlarındaki FCF uygulanan tüm kültürlerde negatif kontrole göre önemli derecede yüksek bulunmuştur. Fakat bu artışlar hiçbir uygulamada pozitif kontrol kadar olmamıştır. Ayrıca, FCF'nin tüm konsantrasyonlarda ve uygulama sürelerinde (24 saatlik uygulamada en düşük konsantrasyon hariç) mitotik indeksi negatif kontrole göre önemli derecede düşürerek sitotoksik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur.

Sonuçlar, FCF'nin insan lenfositleri üzerinde genotoksik ve sitotoksik potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir.

2021, 52 Sayfa

Anahtar kelimeler: Forklorfenuron, genotoksisite, kromozom anormallliği, mitotik indeks

ABSTRACT

DETERMINATION of GENOTOXIC EFFECTS of FORCHLORFENURON in HUMAN LYMPHOCYTE CULTURE

Forchlorfenuron (FCF) is a plant growth regulator that belongs to the group of cytokinin and is widely used in agricultural applications around the world. Despite its widespread use, information on the genotoxic potential of FCF is very limited. Therefore, in this study, it was aimed to investigate the potential genotoxic effect of FCF on human lymphocytes by in vitro chromosomal aberration (CA) test.

Cultures were treated with FCF at concentrations of 0.25, 0.50, 1.00 and 2.00 µg/ml for 24 and 48 hours. In the study, negative control and positive control were used in parallel with each experiment. FCF, at two high concentrations (1.00 and 2.00 µg/ml) and in both treatment periods (24 and 48 hours), significantly increased the percentage of abnormal cells compared to the negative control by stimulating CA formation. In addition, the total CA/cell ratio was significantly higher in all cultures treated with FCF at 0.50, 1.00 and 2.00 µg/ml concentrations compared to the negative control. However, these increases were not as high as the positive control in any application. In addition, FCF was found to have cytotoxic activity at all concentrations and treatment times (except for the lowest concentration at 24-hour), significantly reducing the mitotic index compared to the negative control.

The results indicate that FCF may have genotoxic and cytotoxic potential on human lymphocytes.

2021, 52 Pages

Key words: Forchlorfenuron, genotoxicity, chromosome aberrations, mitotic index

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında her türlü desteği sağlayan, yol gösterici olan, bilgi birikimini her zaman her koşulda benimle paylaşarak yardımlarını esirgemeyen Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü öğretim üyesi değerli hocam Prof. Dr. Ayşe YAVUZ KOCAMAN'a şükranlarımı sunar ve teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarımda beni yalnız bırakmayan ve her zaman yanımda olan aileme, sevgili oğlum Demir MULLAOĞLU'na teşekkür ederim.

Son olarak hayat arkadaşım sevgili Diren YAKAR'a çalışmalarımda ve her koşulda yanımda olduğu, beni her zaman desteklediği için sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	7
3. MATERYAL ve YÖNTEM	10
3.1. Materyal	10
3.1.1. Deney Materyali	10
3.1.2. Test Maddesi: Forklorfenuron (FCF)	10
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	11
3.1.4. Hipotonik Çözelti	12
3.1.5. Fiksatif	12
3.1.6. Sorenson Tamponu	12
3.1.7. Nitrik Asit Çözeltisi	12
3.2. Yöntem	12
3.2.1. Kromozom Anormalliği (KA) Testi	13
3.2.1.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması	13
3.2.1.2. Preparatların Boyanması	14
3.2.2. Mikroskopik İnceleme	14
3.2.3. Kromozom Anormalliklerinin (KA) Saptanması	15
3.2.4. Mitotik İndeksin (MI) Saptanması	16
3.2.5. Fotoğraf Çekimi	16
3.2.6. İstatiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi	16
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	17
4.1. Bulgular	17
4.1.1. Forklorfenuron Uygulamasının İnsan Periferal Kan Lenfosit Kültürlerinde Kromozom Anormalliklerinin (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri	17
4.1.2. Forklorfenuron Uygulamasının İnsan Periferal Kan Lenfosit Kültürlerinde Mitotik İndeks Üzerine Etkileri	35
4.2. Tartışma	38
4.2.1. Forklorfenuronun genotoksik potansiyeli	38
4.2.2. Forklorfenuronun sitotoksik potansiyeli	40
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	43
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	Forklorfenuronun kimyasal ve fiziksel özellikleri	11
Çizelge 4.1.	Farklı Konsantrasyonlarda Forklorfenuron ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferik Kan Lenfositlerinde Gözlenen Kromozom Anormallikleri.....	19
Çizelge 4.2.	Farklı Konsantrasyonlarda Forklorfenuron ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde Mitotik İndeks Değerleri.....	36



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1.	Forklorfenuronun yapısal formülü.....	10
Şekil 3.2.	Kromozomları dağılmış C-metafaz hücresi (♂). X1000.....	15
Şekil 4.1.	Farklı konsantrasyonlarda FCF ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde Anormal hücre yüzdesi.	20
Şekil 4.2.	Farklı konsantrasyonlarda FCF ile 24 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde Yapısal KA taşıyan hücre %'sinin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı. *: P<0.05	20
Şekil 4.3.	Farklı konsantrasyonlarda FCF ile 48 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde Yapısal KA taşıyan hücre %'sinin regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P>0.05)	21
Şekil 4.4.	Farklı konsantrasyonlarda FCF ile 24 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde Anormal hücre %'sinin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı. *: P<0.05	21
Şekil 4.5.	Farklı konsantrasyonlarda FCF ile 48 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde Anormal hücre %'sinin regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P>0.05).....	22
Şekil 4.6.	Farklı konsantrasyonlarda FCF ile 24 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde Toplam KA/Hücre oranının konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı. *: P<0.05	22
Şekil 4.7.	Farklı konsantrasyonlarda FCF ile 48 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde Toplam KA/Hücre oranının regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P>0.05)	23
Şekil 4.8.	Kromatid kırığı (B'), (0.50 µg/ml FCF, 48 saat uygulama). X1000....	23
Şekil 4.9.	Kromatid kırığı (B'), (0.50 µg/ml FCF, 48 saat uygulama). X1000...	24
Şekil 4.10.	Kromatid kırığı (B'), (1.00 µg/ml FCF, 48 saat uygulama). X1000...	24
Şekil 4.11.	Kromatid kırığı (B'), (0.50 µg/ml FCF, 24 saat uygulama). X1000...	25
Şekil 4.12.	Kromatid kırığı (B'), (2.00 µg/ml FCF, 48 saat uygulama). X1000...	25
Şekil 4.13.	Kromatid kırığı (B'), (2.00 µg/ml FCF, 24 saat uygulama). X1000...	26
Şekil 4.14.	Kromatid kırığı (B'), (1.00 µg/ml FCF, 48 saat uygulama). X1000...	26
Şekil 4.15.	Kromatid kırığı (B'), (0.25 µg/ml FCF, 48 saat uygulama). X1000...	27
Şekil 4.16.	Kromatid kırığı (B'), (0.50 µg/ml FCF, 24 saat uygulama). X1000...	27
Şekil 4.17.	Kromatid kırığı (B'), (2.00 µg/ml FCF, 48 saat uygulama). X1000...	28
Şekil 4.18.	Kardeş Kromatid Birleşmesi (KKB), (0.50 µg/ml FCF, 48 saat uygulama).X1000.....	28
Şekil 4.19.	Kardeş Kromatid Birleşmesi (KKB), (0.50 µg/ml FCF, 48 saat uygulama). X1000.....	29
Şekil 4.20.	Kardeş Kromatid Birleşmesi (KKB), (2.00 µg/ml FCF, 48 saat uygulama). X1000.....	29

Şekil 4.21.	Kardeş Kromatid Birleşmesi (KKB), (1.00 µg/ml FCF, 24 saat uygulama). X1000.....	30
Şekil 4.22.	Kardeş Kromatid Birleşmesi (KKB), (0.25 µg/ml FCF, 48 saat uygulama). X1000.....	30
Şekil 4.23.	Kardeş Kromatid Birleşmesi (KKB), (0.50 µg/ml FCF, 24 saat uygulama). X1000.....	31
Şekil 4.24.	Kromatid değişimi (KD), (1.00 µg/ml FCF, 24 saat uygulama). X1000.....	31
Şekil 4.25.	Kromatid değişimi (KD), (2.00 µg/ml FCF, 48 saat uygulama). X1000.....	32
Şekil 4.26.	Kromozom kırığı (B"), (1.00 µg/ml FCF, 24 saat uygulama). X1000.....	32
Şekil 4.27.	Kromozom kırığı (B"), (2.00 µg/ml FCF, 48 saat uygulama). X1000.....	33
Şekil 4.28.	Disentrik kromozom (DS), 0.25 µg/ml FCF, 24 saat uygulama). X1000.....	33
Şekil 4.29.	Poliploidi, (2.00 µg/ml FCF, 48 saat uygulama). X1000.....	34
Şekil 4.30.	Poliploidi, (2.00 µg/ml FCF, 48 saat uygulama). X1000.....	34
Şekil 4.31.	Poliploidi, (0.50 µg/ml FCF, 24 saat uygulama). X1000.....	35
Şekil 4.32.	Farklı konsantrasyonlarda Forklorfenuron ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde mitotik indeks.....	36
Şekil 4.33.	Farklı konsantrasyonlarda FCF ile 24 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde MI değerlerine ait regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P>0.05).....	37
Şekil 4.34.	Farklı konsantrasyonlarda FCF ile 48 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde MI değerlerine ait regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P>0.05).....	37

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

B'	: Kromatid Kırığı
B''	: Kromozom Kırığı
F	: Fragment
P	: İstatistiksel olarak önemlilik derecesi
n	: Kromozom sayısı
r	: Regresyon
♂	: Erkek birey

KISALTMALAR

Bw	: Body Weight (Vücut Ağırlığı)
BGD	: Bitki Gelişim Düzenleyicisi
Cat.No.	: Katalog Numarası
CPPU	: <i>N</i> -(2-Chloro-4-pyridyl)- <i>N'</i> -phenylurea
DNA	: De(z)oksiribonükleik asit
DS	: Disentrik Kromozom
EFSA	: European Food Safety Authority
FCF	: Forklorfenuron
GDP	: Guanozin difosfat
GTP	: Guanozin trifosfat
HNO ₃	: Nitrik Asit
IC ₅₀	: Half-maximal inhibitory concentration
IPCS	: International Programme on Chemical Safety
IUPAC	: International Union of Pure and Applied Chemistry
KA	: Kromozomal Anormallik
KCl	: Potasyum klorür
KKB	: Kardeş Kromatid Birleşmesi
KKD	: Kardeş Kromatid Değişimi
LSD	: Least Significant Difference

mg/kg	: Miligram/kilogram
mg/l	: Miligram/litre
µg/ml	: Mikrogram/mililitre
ml	: Mililitre
MI	: Mitotik İndeks
mM	: Milimolar
MMC	: Mitomycin C
MN	: Mikronükleus
NaCl	: Sodyum Klorür
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Bir dakika içerisinde gerçekleşen dönüş/devir sayısı
SEPT	: Septin
USEPA	: United States Environmental Protection Agency

1. GİRİŞ

Günümüzde çevre kirliliği dünya çapında bir sorun haline gelmiş bulunmaktadır (Briggs, 2003; Zhang ve ark., 2011). Çevre kirliliğine neden olan başlıca kirletici grupları, modern tarımın önemli bir parçası olan ve verimi arttırmak, mahsulleri ve çiftlik hayvanlarını korumak için kullanılan herbisitler, insektisitler, fungusitler, bitki gelişim düzenleyicileri gibi tarımda kullanılan kimyasallardır (Lu ve ark., 2015; Wang ve Yang, 2016; Rodrigues ve ark., 2018).

Tarımsal kimyasallar arasında, bitki gelişim düzenleyicileri (BGD), hücre bölünmesini, hücre büyümesini, organ oluşumunu ve bitkilerin diğer gelişim süreçlerini tetikleyen çevresel hormonlar olarak da bilinen bir sentetik pestisit sınıfıdır (Wang ve ark., 2011). Günümüzde, tarımsal üretimde BGD'ler dünya çapında yaygın olarak uygulanmaktadır. Bununla birlikte, diğer pestisitlere benzer şekilde, BGD'ler de birçok avantajına rağmen belirli bir derecede toksisiteye sahip olabilmektedirler. Bu nedenle, bu zirai kimyasalların yoğun kullanımı toprak ve su ortamını kirleterek çevre kirliliğine neden olmakta ve dolayısıyla insan sağlığını da etkilemektedir. Ayrıca, meyve ve sebzelerde BGD'lerin sıklıkla ve aşırı miktarlarda kullanımı, ürünler pazara ulaştığında gıda maddelerinde insan sağlığını kronik olarak etkileyebilecek kalıntıların varlığına yol açabilmektedir. Bundan dolayı, BGD'lerin kontrolsüz ve aşırı kullanımı hem çevre kirliliğine neden olmakta hem de hedef olmayan canlılar ve nihayetinde insan sağlığını tehdit edebilmektedir.

Forklorfenuron (FCF), IUPAC adı 1-(2-kloropiridin-4-il)-3-fenilüre, kimyasal adı N-(2-chloro-4-pyridinyl-N'-phenylurea), ticari adları CPPU ve KT-30, kimyasal sınıfı Phenyl urea olan, sitokinin grubuna dahil sentetik bir bitki gelişim düzenleyicisidir (USEPA, 2004).

Sitokininler, bitki büyümesini teşvik edici hormonlardır ve başlıca iki gruba ayrılmaktadırlar. Thidiazuron ve FCF sentetik phenylurea türevleridir. Kinetin ve 6-benzyladenine ise doğal olarak meydana gelen adenin türevlerine dahildir (Kumlay ve Eryiğit, 2011). Sentetik phenylurea türevlerinin adenin türevlerinden daha yüksek etki düzeyine sahip oldukları bildirilmiştir (Te-chato ve ark., 2008). Bitki hücrelerinin bölünmesini sağlayan sitokininlerin; bitki gelişim ve fizyolojisini tohum çimlenmesi,

çiçek ve meyve gelişimi gibi birçok yönüyle etkilediği belirtilmiştir (Haberer ve ark., 2002).

Çalışmamızın test maddesi olan ticari formülasyondaki FCF birçok tarım ürününün büyüklüğünü ve kalitesini artırma amacıyla dünya genelinde kullanılmaktadır (Gong ve ark., 2021). FCF'nin, bitki hücresinde bölünme ve lateral büyümeyi desteklemek için doğal oksinler ile sinerjistik olarak etki ettiği bildirilmiştir (USEPA, 2004). Bu madde, günümüzde, üzüm, elma ve kivi meyvelerinde meyve büyüklüğünü arttırmak için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Arima ve ark., 1995; Cruz Castillo ve ark, 2002; Kim ve ark., 2006; EFSA, 2017).

Ayrıca, FCF, tozlayıcı olmadan triploid karpuz üretmek, başka bir deyişle, çekirdeksiz karpuz üretmek için yapay olarak partenokarpiyi indüklemek amacıyla kullanılmıştır ve birçok rapor, FCF'nin meyve kalitesini ve gelişimini olumsuz etkilemeden meyve tutumunu ve çekirdeksiz meyve üretimini teşvik etmede etkili olduğunu göstermiştir (Hayata ve ark., 1995; Miguel ve ark., 2001; Huitrón ve ark., 2007). Yakın zamanda yapılan bir başka çalışmada ise, FCF uygulamasının salatalıkta partenokarpik meyve oluşumunu başarıyla indüklediği ve FCF ile muamele edilen meyvelerin şekil, doku ve protein, toplam flavonoidler ve C vitamini gibi temel besin maddeleri açısından, düşük fenolik asit içeriği dışında, tozlanan meyvelerden farklı olmadığı bildirilmiştir (Su ve ark., 2021).

Bununla birlikte, 2011 yılında Çinli çiftçiler tarafından, FCF daha büyük karpuz yetiştirmek için kullanılmış; fakat FCF uygulanan bazı karpuzların patladığı görülmüştür. FCF, Çin'de meydana gelen patlayan karpuz olayı nedeniyle suçlanmış ve ün kazanmıştır. Bu olaydan sonra, canlı organizmalar ve ekosistem için oluşturduğu potansiyel riskleri daha fazla gündeme gelmeye başlamıştır (Gong ve ark., 2021).

Yapılan çalışmalar, FCF uygulamasının, meyve gelişiminin yanı sıra, kivi meyvelerinin olgunlaşma davranışını da etkilediğini göstermektedir. Ayrıca FCF'nin etilen biyosentezini düzenlediğini ve merkezi plasenta yumuşamasını etkilediğini ve kivi dokusunun olgunlaşmasında da önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir (Ainalidou ve ark., 2016). FCF ve metabolitlerinin kullanımı sonucunda çevrede ve bunlara maruz kalan meyvelerde, suda, suda yaşayan organizmalarda kalıntılara rastlanmıştır (Gong ve ark., 2021).

Zebra balığı (*Danio rerio*) embriyolarına *in vivo* olarak uygulanan FCF'nin, embriyoların yaşamlarını sürdürememesi ve yumurtadan çıkamaması şeklinde olumsuz etkilere neden olduğu bildirilmiştir (Gong ve ark., 2021).

FCF uygulanan Sprague-Dawley sıçanlarında kronik toksisite testleri yapılmış; sıçanların rahimlerinde ağır hidrometra ve yumurtalıklarında patolojik değişimler bildirilmiştir (Bu ve ark., 2019).

FCF uygulamasının tomurcuklanan mayada septin lokalizasyonunu bozduğu ve sitokineze kusurlara neden olduğu bildirilmiştir (Iwase ve ark., 2004).

Septinler, hücre zarları ve hücre iskeleti ile ilişkili olan ve hücre bölünmesi ve hücre morfojenizde önemli rol oynayan filamentli GTPazlardır (Hu ve ark., 2008). Ayrıca, mitoz bölünme sırasında kromozomların uygun bir şekilde hizalanması ve dağılması (Spiliotis ve ark., 2005, Zhu ve ark., 2008) ile sitokinezin (Joo ve ark., 2007) uygun bir şekilde gerçekleşmesi için gereklidir. Septinler, kanser ve nöropatiler dahil olmak üzere birçok hastalıkta rol oynamaktadır (Hu ve ark., 2008). FCF'nin, memeli septin düzenine, organizasyonunu ve dinamiğini değiştirdiği bildirilmiştir (Hu ve ark., 2008). Bu nedenle, FCF'nin insanlar üzerindeki olası genotoksik etkilerinin belirlenmesi önem arz etmektedir.

Septinler, bitkiler hariç diğer ökaryot hücreye sahip canlılarda, mantarlar ve hayvanlarda, bulunmaktadır (Nishihama ve ark., 2011; Pan ve ark., 2007). Septinler, bölünme ve zarın yeniden şekillenmesi de dahil birçok hücre işlevinde yer alan GTP bağlayıcı proteinlerdir (Jiao ve ark., 2020). GTP-bağlanma alanları yoluyla oligomerize olarak filamentli hetero-polimerler oluştururlar (Sirajuddin ve ark., 2007; Gasper ve ark., 2009). Mikrotübüller, aktin mikrofilamentleri ve ara filamentlerin yanında, septinler, hücre proteinlerinin lokalizasyonunu kontrol ederek birçok hücre fonksiyonunda temel roller oynayan dördüncü bir hücre iskeleti benzeri elementi temsil eder (Mostowy ve Cossart, 2012; Caudron ve Barral, 2009; Kinoshita, 2006). Diğer hücre iskeleti filamentlerinden farklı olarak uzun zincirler halinde polimerleşebilmekte ve yanıl demetlenerek düzenli bir yapı oluşturabilmektedir (Fung ve ark., 2014). Septinler, direkt zarlarla birleşerek zarın aynı durumda kalmasını sağlar ve zar proteinleri için difüzyon engeli olarak da görev alır (Fung ve ark., 2014). Septinlerin sitokinez, hücre göçü, siliojeniz, polarite ve hücrenin patojen etkileşimi gibi birçok hücre içi görevde rol aldığı

belirtilmiştir (Fung ve ark., 2014). Bu noktada septinlerin ne kadar önemli oldukları görülmektedir (Fung ve ark., 2014).

Septin filament düzenliğini bozan küçük moleküllü bileşikler, septin fonksiyonlarını incelemek için değerli araçlar olarak kabul edilmiştir. Günümüze kadar, FCF, septin düzenliğini ve işlevlerini etkilediği bilinen tek bileşik olarak karşımıza çıkmaktadır. FCF, genişlemiş kararlı polimerlerin oluşumunu indükleyerek septin düzenliğinin dinamiklerini, etkin bir şekilde işlev görmesini, azaltır (Angelis ve ark., 2014). Angelis ve ark. (2014) yaptıkları çalışmalar sonucunda; FCF'nin, ilk olarak septinlerin (SEPT2 ve SEPT3) nükleotid bağlayıcı cepleri ile tercihli olarak etkileşime girebileceğini ve ikinci olarak, FCF, GDP'nin fosfat grupları kadar guanin bazı ve riboz halkaları ile temas eden artıklarla hidrojen bağları oluşturabileceğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, FCF'nin septinleri nükleotit bağlı bir durumu taklit eden bir konformasyona kilitleyerek ve daha fazla GTP bağlanmasını ve hidrolizi önleyerek stabilize ettiğini gösterdiğini belirtmişlerdir (Angelis ve ark., 2014).

FCF'nin hücreler üzerindeki etkilerinin bilinenlerden daha karmaşık olduğu düşünülmektedir. 1 mM FCF ile muamele edilen tomurcuklanan maya hücrelerinin büyümelerini durdurduğu belirtilmiştir (Heasley ve ark., 2014). Ayrıca, FCF septinlerin kullanımının olmadığı fisyon maya hücrelerinde poliferasyonun gerçekleşmesini ciddi şekilde engelledi. FCF, tomurcuklanan maya mitokondriyal retikülünü tahrip ederek mitokondriyal membran potansiyelini yok ettiği belirtilmiştir. Ayrıca, septinlere etki ettiği düşünülen FCF konsantrasyonlarında kültürlenmiş memeli hücrelerinin mitokondrilerinin tahrip edildiği belirtilmiştir. Bulguların FCF'nin septin fonksiyonları dışında önemli ve farklı hedeflere işaret ettiği belirtilmiştir (Heasley ve ark., 2014).

İnsan periferik kan lenfositleri kullanılarak sitogenetik araştırmalar yapılması yaygın ve etkili bir yöntemdir. Bu araştırmalar sonucunda genotoksik ajanların insan periferik kan lenfositlerindeki etkileri tespit edilebilmektedir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda periferik kan lenfositlerinde ortaya çıkan kromozom anormalliği (KA) kişilerde kanser olma ihtimalinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Bonassi ve ark., 2000). Periferik kan lenfositlerinde ortaya çıkan KA, kardeş kromatit değişimleri (KKD) ve mikronükleuslar (MN) genotoksik ajanların sitolojik değişimlerinde ayraç niteliği taşımaktadır (Hagmar ve ark., 1998). Kanser tespitinde kromozom tipi KA'ların kromatit tipi KA'lardan daha önemli bir kanıt olduğu öne sürülsede her iki KA'nın da kanser riski

ile ilişkili olduğunun bilindiği belirtilmiştir (Norppa ve ark., 2006). Kromozom aberasyonlarının artan kanser riskinin bir işareti olduğunu bildiren epidemiyolojik çalışmalarla desteklenmiştir (Norppa, 2004). KA sıklığı ile yüksek değerlerde ortaya çıkan kanser riski arasında pozitif bir ilişki olduğu belirtilmiştir (Hagmar ve ark., 1998). Kanser riskinin sadece yaşam tarzına bağlı faktörlerden ya da yaşa bağlı faktörlerden olmadığı belirtilmiştir (Belpomme ve ark., 2007).

Mutajenlerin ve karsinojenlerin çoğunluğu canlılarda kromozom aberasyonlarına neden olabilmektedir (Natarajan ve ark. 2003).

Genotoksisite kimyasal, fiziksel veya biyolojik ajanların genetik materyalde hasar yaratabilme özelliği olarak tanımlanabilmektedir. Mutajen ve kanserojenlerin genotoksik risklerini belirlemek için kullanılan insan periferik kan lenfositlerindeki KA frekansı (Carrano ve Natarajan, 1988; Anderson, 1988; Hagmar ve ark., 1994; Bonassi ve ark., 2004; 2005; 2007) yaygın olarak kullanılan hassas sitogenetik biyo-belirteçlerden biridir.

Günümüzde, tarımda yaygın bir şekilde kullanılan birçok sentetik bitki gelişim düzenleyicisinin çeşitli test sistemlerinde genotoksik etkilere sahip oldukları bulunmuştur (Ateeq ve ark., 2002; Priya ve ark., 2014; Kocaman ve Bucak, 2016; Kocaman ve Güven 2016; Özkul ve ark., 2016; Kocaman ve Kılıç, 2017). Bununla birlikte, literatür araştırmamıza göre, FCF'nin genotoksik risklerini belirlemeye yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, bu çalışma sonunda elde edilen verilerin bilimsel açıdan faydalı olacağını düşünüyoruz. Çünkü, tarım işçileri başta olmak üzere tüm insanların sentetik BGD'lerin olumsuz etkilerine maruz kalma potansiyeli oldukça yüksektir.

Tarımsal uygulama sırasında toprağa ve suya karışarak çevreye yayılan bitki gelişim düzenleyicileri, besin zinciri yoluyla bir canlıdan diğerine geçebilmekte ve vücutta birikime neden olabilmektedir. Ayrıca, BGD uygulanan zirai ürünlerde bulunan kalıntılar yoluyla da insanlara kadar ulaşabilmektedir. Bunun yanında, bu sentetik gelişim düzenleyicileri besinlerde toksik seviyeye kadar birikebilmekte ve sonunda halk sağlığını etkileyebilmektedir. Yapılan çalışmalarda, FCF'nin tarım işçileri üzerinde olumsuz etkilere neden olabilecek konsantrasyonlara erişebildiği ve insanlar tarafından biyolojik olarak biriktirildiği bildirilmiştir (Shi ve ark., 2012; Toumi ve ark., 2018).

Bu nedenle, günümüzde yaygın bir şekilde kullanılan sentetik bitki gelişim düzenleyicisi olan FCF'nin ticari formülasyonunun (sitofex, etken madde 10 g/l FCF) olası genotoksik risklerinin belirlenmesinin önemli olduğu kanaatindeyiz.

Çalışmamızın amacı, hem bölgemizde, hem de tüm dünyada sentetik bitki gelişim düzenleyicisi olarak kullanılan FCF'nin insan periferik kan lenfositlerinde, genotoksik ve/veya sitotoksik etkiye sahip olup olmadığını kromozom anormalliği (KA) testi *ile in vitro* olarak araştırmaktır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Iwase ve ark. (2004), sentetik bir bitki gelişim düzenleyicisi olan FCF'nin *Saccharomyces cerevisiae*'da sitokinezi etkilediği ve FCF uygulanması sonucu tomurcuk boynundaki septinlerin yapılarının bozulduğu bildirilmiştir.

Angelis ve ark. (2014) septin düzenegini etkileyen FCF'nin septin düzeneginin dinamikleri ve altta yatan etki mekanizmasının nasıl olduğu hakkında yeni bulgular ortaya koymuştur. FCF'nin SEPT2 ve SEPT3 ile bağlanması, FCF'nin septinlerin nükleotit bağlayıcı bölgeleriyle etkileşime girdiklerini bildirmiştir. FCF'nin GDP bağlanma kısımlarının nükleotit bağlanmasını gerçekleştiren hidrojen bağlarını taklit ettiklerinin tahmin edildiği belirtilmiştir. FCF'nin septinleri nükleotit bağlanmasıyla ilgili bir durumu taklit etmesi sonucu bir konformasyona kilitleyerek, daha fazla GTP bağlanmasını ayrıca hidrolizini engelleyerek stabilize ettiğini belirtmiştir.

Heasley ve ark. (2014) tarafından, FCF uygulamasının, septinlerde görülen değişiklikler ortaya çıkmadan *Tetrahymena thermophyla*'da siliasyon ve hareketliliği ciddi bir şekilde azalttığı ve mitokondriyal düzensizliği arttırdığı belirtilmiştir. Görülen etkilerin sadece septin düzeneklerinin durdurulması üzerinde değil FCF kullanılmasıyla farklı etkilerinden ortaya çıktığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada, FCF uygulamasının, tomurcuklanan maya mitokondriyal retikülünün parçalanmasına ve mitokondriyal membran potansiyelinin kaybına neden olduğu bulunmuştur. Araştırmacılar, ayrıca, daha önce yalnızca septinleri hedeflediği varsayılan FCF konsantrasyonları ile muamele edilen kültürlenmiş memeli hücrelerinde de mitokondrinin parçalandığını belirlediklerini bildirmişlerdir.

Zhang ve ark. (2015) yaptıkları *in vitro* çalışmada, FCF'nin $12,1 \pm 2,1 \mu\text{M}$ IC₅₀ değeriyle normal Çin hamsteri yumurtalık hücrelerine (CHO) sitotoksik olduğunu göstermişlerdir.

Kocaman ve Bucak (2016) tarafından yapılan çalışmanın sonuçlarına göre; araştırmacılar, herbisidal aktiviteye sahip sentetik bir BGD olan flumetralinin, 125, 250, 500 ve 1000 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında insan lenfositlerine *in vitro* uygulamasının özellikle yapısal tipteki kromozom anormalliklerine neden olarak klastojenik etkiye ve aynı zamanda sitotoksik/sitostatik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir.

Tarımda birçok meyvenin büyümesini teşvik etmek için sıklıkla kullanılan ve sentetik BGD'lerin oksinler grubuna dahil olan 1-Naftalenasetamitin genotoksik potansiyeli *in vitro* KA ve MN testleriyle araştırılmıştır. Araştırmacılar tarafından, 1-naftalenasetamitin test edilen 20, 40, 80 ve 160 µg/ml konsantrasyonlarında; 24 ve 48 saat uygulama sürelerinde insan lenfositlerinde KA ve MN oluşumlarını arttırarak genotoksik potansiyele sahip bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca, aynı araştırmada, 1-Naftalenasetamitin hücre kinetiği üzerine etkileri incelendiğinde, bu sentetik hormonun mitotik indeks ve nükleus bölünme indeksini kontrole göre önemli derecede düşürerek, insan lenfosit hücreleri üzerinde sitotoksik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Kocaman ve Güven, 2016).

Sentetik BGD'lerin defoliant (yaprak döktürücü) ve etilen salıcı grubun üyesi olarak kullanılan ve ticari olarak formüle edilmiş etefon ve karışım halindeki etefon+siklanilid formülasyonlarının sitogenotoksik etkileri *Allium cepa* L'nin kök meristem hücrelerinde anafaz-telofaz KA testi kullanılarak araştırılmıştır. Çalışma sonunda, araştırmacılar, her iki formülasyonun da test edilen tüm süre (24, 48 ve 72 saat) ve konsantrasyonlarda (25, 50 ve 100 ppm), *A. cepa* kök meristem hücrelerindeki toplam anormallik yüzdesini negatif kontrole göre önemli derecede arttırarak genotoksik; mitotik indeksi hem negatif kontrol, hem de pozitif kontrole (10 ppm, metil metasülfonat) göre önemli derecede azaltarak sitotoksik aktiviteye sahip bulunduğunu bildirmişlerdir (Kocaman ve Kılıç, 2017).

Bu ve ark. (2019) yaptıkları kronik toksisite çalışmasında (Sprague-Dawley sıçanları 180 gün boyunca 0.06 ve 60 mg/kg vücut ağırlığı dozaj seviyelerinde beslenmişlerdir) FCF'nin steroid hormonlarının üretimini bozduğunu ve Sprague-Dawley sıçanlarının yumurtalıklarında histopatolojik değişikliklere neden olduğunu bildirmişlerdir.

Gong ve ark., (2019) tarafından yapılan çalışmada, FCF'nin, zebra balıklarının (*Danio rerio*) sağkalımı, kardiyak morfolojisi ve işlevi ile hematopoietik sistemi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Araştırmacılar, özellikle, FCF uygulamasının (2.5-12.5 µg/ml) zebra balıklarında kardiyak morfoloji deformasyonuna, kardiyak kontraktıl fonksiyon bozukluğuna ve eritrosit azalmasına neden olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, FCF uygulamasının sitotoksisiteye, hücre iskeleti yıkımına neden olduğu ve *in vitro*

olarak H9c2 kardiyomiyositlerinde karşılık gelen proteinlerin (My17, Gata4 ve Mef2c) ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir. Sonuçta araştırmacılar, FCF'nin, düşük konsantrasyonlarda bile memeli hücrelerinde olduğu kadar larva ve yetişkin zebra balıklarında da kalp toksisitesine neden olabileceğini belirtmişlerdir (Gong et al, 2019).

Gong ve ark. (2021) tarafından, Zebra balığı embriyolarında (*Danio rerio*) FCF'nin toksik etkilerinin anjiyogenez ve damar sistemlerinde kalıcı olumsuz etkileri *in vivo* olarak incelenmiştir. Araştırmacılar, 10 mg/l FCF'ye maruz kalan embriyoların hayatta kalma ve yumurtadan çıkmasının olumsuz etkilendiğini fakat 2.5 mg/l FCF'ye maruz kalan embriyoların sadece gelişimlerini engellediğini tespit etmişlerdir. Ortak kardinal damarlar (CCV'ler) dahil olmak üzere gelişen damar yapısı, bölümler arası damarlar (ISV'ler) ve alt bağırsak damarları (SIV'ler), farklı dozlara bağlı bir şekilde FCF'ye maruz kalma ile önemli ölçüde kısıtlandığı bildirilmiştir. Zebra balığı embriyolarında anormal damar gelişimi saptandığı bildirilmiştir. Ayrıca, FCF'nin hücre iskeleti düzensizliğine neden olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, insan göbek damarı endotel hücrelerinde, FCF'nin toksik etkileri sonucu proliferasyon, hücre göçü ve tübüler benzeri yapıların *in vitro* olarak oluşumu gerçekleşmediğini bildirmişlerdir (Gong ve ark., 2021).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Deney materyali

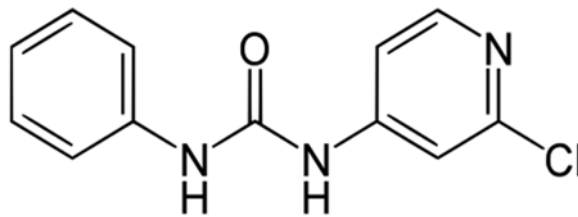
Bu çalışmada, FCF'nin insanlar üzerindeki genotoksik risklerini incelemek için materyal olarak insan periferik kan lenfositleri kullanılmıştır. Deneylerde kullanılmak üzere temin edilen kan örnekleri; sağlıklı, sigara ve alkol kullanmayan, yakın zamanlarda herhangi bir ilaç kullanmamış ve pestisit gibi çevresel ajanlara yüksek oranlarda maruz kalmadığı bilinen dört farklı (30–32 yaşlarında, 2 bayan ve 2 erkek) bireyden temin edilmiştir.

Bu çalışmanın etik kurallara uygunluğu, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 14/02/2019 tarih ve 09 nolu kararı ile onaylanmıştır.

3.1.2. Test Maddesi: Forklorfenuron (FCF)

Bu çalışmada genotoksik etkisi araştırılacak olan madde, FCF, sitokinin aktivitesine sahip sentetik bir bitki gelişim düzenleyicisidir. Günümüzde yaygın bir şekilde kullanılan FCF üzüm, kivi, karpuz, elma gibi tarım ürünlerinin hücre bölünmesini hızlandırarak meyve büyüklüğünü arttırmaktadır (USEPA, 2004).

Bu çalışmada, etken madde olarak 10 g/l FCF içeren Sitofex adlı ticari formülasyondaki bitki gelişim düzenleyicisi kullanılmıştır. Formülasyon şekli, suda çözünen konsantredir. Sitofex, Agrikem firmasından temin edilmiştir. FCF'nin yapısal formülü Şekil 3.1'de, kimyasal ve fiziksel özellikleri ise Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Forklorfenuronun yapısal formülü

Çizelge 3.1. Forklorfenuronun kimyasal ve fiziksel özellikleri (USEPA, 2004)

Özellikler	Değerler
Moleküler formülü	C ₁₂ H ₁₀ ClN ₃ O
Molekül ağırlığı	247.68 g/mol
Renk	Beyaz ile kirli beyaz
Fiziksel durumu	Kristal Toz (oda sıcaklığında)
Erime noktası	165-170 derece C
Sudaki çözünürlük	39 mg/L (pH 6.4, 21 derece C)
Metanoldaki çözünürlük	119 g/L
Aseton çözünürlük	127 g/L
Kloroform çözünürlük	2,7 g/L
Etanol çözünürlük	149 g/L
Yoğunluk/Özgül ağırlık	1.4 g/mL (21 derece C)
Çözünürlük (25°C'de suda)	150 mg/L
Çözünürlük (organik solventlerde)	Alkol, eter, kloroform, benzen, aseton
Buhar basıncı (25°C)	3,5×10 ⁻⁵ mmHg

IUPAC adı: 1-(2-chloro-4-pyridyl)-3-phenylurea

Sinonimleri: FCF, 1-(2-Kloro-4-piridil)-3-fenilüre, N-Fenil-N'-(2-kloro-4-piridil)üre, CPPU, USEPA/OPP

Ticari Adları: CPPU, KT-30

Kimyasal Sınıfı: Phenyl urea

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada hücre kültürü yapmak için kullanılmış olan kromozom medyumunu (Chromosome Medium B, Cat No. F 5023) Biochrom firmasının ürünüdür. Kromozom medyumunun içeriğinde esansiyel olmayan aminoasitler, heparin, sodyum tuzu, penisilin G, streptomisin sülfat ve fitohemaglutinin bulunmaktadır. Kromozom medyumunu -40 °C'de muhafaza edilmiş ve deneylerde kullanılmadan önce steril olarak temin edilen kültür tüplerine eşit olacak şekilde (her tüpe 2.5 ml) paylaştırılmıştır.

Çalışmamızda, pozitif kontrol olarak kullanılan mitomycin-C (MMC, Cas No: 50-07-7) Sigma-Aldrich ürünüdür.

Kromozomları dağılmış C-metafaz hücreleri elde etmek için mitotik zehir olarak kullanılan kolşisin (C₂₂H₂₅NO₆) (Cas No: 64-86-8) Sigma-Aldrich'den temin edilmiştir.

Giemsa (Cat No. 9204), entellan (Cat No. 7961), immersiyon yağı ve nitrik asit (HNO_3) Merck firmasının ürünüdür.

3.1.4. Hipotonik Çözelti

Bu çözelti, % 0,4'lük KCl (Merck) olacak şekilde bidistile su içinde hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözelti + 4 °C buzdolabında saklanmış ve her deneyden yaklaşık iki saat önce yeterli miktarı 37 °C'deki inkübatörde ısıtıldıktan sonra kullanılmıştır.

3.1.5. Fiksatif

Kromozom anormalliği deneyleri için; 1 hacim asetik asit (Merck) ve 3 hacim metanoldan (Merck) oluşan fiksatif kullanılmıştır.

3.1.6. Sorensen Tamponu

Sorensen Tamponu A (KH_2PO_4 , pH=4.8) ve Sorensen Tamponu B ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, pH=9.3) olmak üzere iki stok çözelti halinde hazırlanarak kullanılabilecek kadar +4 °C buzdolabında saklanmıştır. KH_2PO_4 ve $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ Merck firmasından temin edilmiştir.

3.1.7. Nitrik Asit çözeltisi

Çalışmada kullanılan lamaları temizlemek amacıyla 1 N nitrik asit (HNO_3) (Merck) çözeltisi hazırlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.2. Yöntem

Bu çalışma, IPCS (The International Programme on Chemical Safety) yönergesine uygun olarak gerçekleştirilmiştir (Albertini ve ark., 2000).

3.2.1. Kromozom Anormalliği (KA) Testi

3.2.1.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

İnsan periferel kan lenfositlerinde meydana gelen KA (Kromozom Anormalliği) testi *in vitro* olarak bazı farklı uygulamalarla Evans ve ark. (1984)'nın kullandıkları metoda göre uygulanmıştır (Kocaman ve Topaktaş, 2007).

FCF'nin insan periferel kan lenfositlerindeki potansiyel etkilerini belirleyebilmek için farklı konsantrasyonlar oluşturulmuştur. FCF'nin test konsantrasyonları ön denemelerle belirlenmiştir. Yapılan ön çalışmada, FCF için yarı-maksimal inhibitör konsantrasyon (IC_{50} , half-maximal inhibitory concentration), MI'i negatif kontrole göre yaklaşık olarak % 50 düşüren konsantrasyon, 2.00 µg/ml olarak belirlenmiştir. En yüksek konsantrasyon 2.00 µg/ml, diğer konsantrasyonlar ise $IC_{50}/2$ (1.00 µg/ml), $IC_{50}/4$ (0.5 µg/ml), $IC_{50}/8$ (0.25 µg/ml) şeklinde azalan konsantrasyonlarda seçilmiştir. Çalışmada kullanılan ticari formülasyondaki FCF sıvı formda olup, değişik konsantrasyonları steril distile su ile seyreltilerek (içerdiği etken madde miktarı temel alınarak), her deneyden önce taze olarak ve steril koşullarda hazırlanmıştır.

İnsan periferel kan lenfositlerindeki KA analizleri sağlıklı ve sigara içmeyen iki bayan ve iki erkekten alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örneklerinin (0.2 ml) steril şartlarda 2.5 ml kromozom medyumunu bulunan kültür tüplerine ekimi gerçekleştirilerek başlatılmıştır. Daha sonra, kültürler 37 ± 1 °C'deki inkübatörde 72 saat inkübe edilmiştir (Rencüzoğulları ve Topaktaş, 1991).

Değişik konsantrasyonlardaki (0.25, 0.50, 1.00 ve 2.00 µg/ml) FCF, kültür süresi bitiminden 24 ve 48 saat önce kültür tüplerine ilave edilmiştir. Her deney grubunda bir negatif (uygulama yapılmayan) kontrol ve bir pozitif kontrol (0.2 µg/ml MMC) çalışılmıştır.

Kültür tüplerine 70. saatte kolşisin eriyiği (0.06 µg/ml) eklenmiş ve lenfositlerin 2 saat boyunca 37 °C'de kolşisin ile ön muamele gerçekleştirilmiştir. Kültür süresi olan 72 saatin sonunda, kültür tüpleri 2000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Tüplerin dibinde kalan lenfositleri barındıran 0.5-0.7 ml'lik sıvı iyice karıştırılmış tüplere hipotonik eriyik (% 0.4 KCl, 37 °C) eklenmiştir.

Lenfositleri barındıran tüpler 37 °C’de 13 dk. boyunca hipotonik eriyik ile muamele edilip sonrasında 1200 rpm’de 15 dk. santrifüj edilmiştir ardından süpernatant pipetler ile uzaklaştırılmıştır. Sonrasında pipetler aracılığıyla damla damla olacak şekilde soğuk fiksatif (1/3 glasiyal asetik asit: metanol) eklenip karıştırılmıştır ve her tüpün 5 ml olması sağlanmıştır. Fiksatif ile muamele edilen hücreler oda sıcaklığında 20 dk. bekletildikten sonra 1200 rpm’de 15 dk. santrifüj edilmiştir süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra ikinci kez fiksatif ilave edilmiştir. Fiksatifle muamele etme, santrifüj ve süpernatant uzaklaştırılması işlemlerinde az üç kez tekrarlanarak tüpteki sıvının tamamen berrak bir hal alması sağlanmıştır.

Son işlemle tüplerde 0.5-0.7 ml sıvı kalacak şekilde işlem tamamlanmıştır. Tüpte bulunan lenfositler pastör pipeti ile çekilerek, önceden temizlenmiş ve soğutulmuş lamaların üzerine yaklaşık 50 cm yükseklikten 4-5 damla damlatılmıştır. Lenfositlerin lam üzerinde yayılması gerçekleştirilmiştir.

Preparatlar kurumaları için 24 saat üzerleri kapalı bir şekilde oda sıcaklığında bekletilmiştir.

3.2.1.2. Preparatların Boyanması

Kuruyan preparatlar Sorensen tamponunda hazırlanmış % 5’lik Giemsa boyası ile boyanmıştır. (% 5’lik Giemsa boyasının hazırlanması: 5 ml tampon A, 5 ml tampon B ve 5 ml Giemsa karıştırılarak üzerine 100 ml oluncaya kadar saf su ilave edilmiş ve filtre kâğıdı yardımıyla süzölmüştür, pH=6.8). Preparatlar 25 dk. boyunca boya içerisinde bekletilerek boyanmıştır. Boyanan preparatlar üç ayrı kapta bulunan saf suda yıkanarak kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatlar entellan ile lamellerle kapatılmıştır. Hazırlanan daimi preparatlar incelemeye hazır hale getirilmiştir.

3.2.2. Mikroskopik İnceleme

Preparatlar, OLYMPUS marka CX21 model ışık mikroskopunda incelenmiştir. KA incelemeleri 10X100=1000 büyütmede, MI değerlendirmesi için incelenen hücre popülasyonu ise 10X40=400 büyütmede yapılmıştır.

3.2.3. Kromozom Anormalliklerinin (KA) Saptanması

İki erkek ve iki kadından alınan periferik kan lenfositlerinden hazırlanan daimi preparatlarda iyi dağılmış ($2n=46$) metafaz (C-metafaz) kromozomlarına sahip (Şekil 3.2) 100 hücre (her bir konsantrasyon için dört kişiden oluşturulan preparatlarda toplam 400 hücre) incelenmiştir.

Preparatlarda görülen anormallikler yapısal ve sayısal KA olarak iki şekilde karşımıza çıkmaktadır (Paz-y-Miño ve ark., 2002). Ayrıca çalışmamızda gap (kromatidinin bir veya ikisinde görülen boyanmamış bölüm, bir kromatidin genişliğinden daha azdır) anormallik şeklinde değerlendirilmemiştir (Preston ve ark., 1987). Mosesso ve ark. (2013)'na göre, yapısal KA'lar kromatid ve kromozom tipi anormallikler olarak iki gruba ayrılmıştır. Çalışmamızda incelemeler sırasında rastlanılan; kromatid kırığı, kardeş kromatit birleşmesi ve kromatit değişimi kromatid tipi anormallikler; kromozom kırığı ve disentrik kromozom ise kromozom tipi anormallikler olarak değerlendirilmiştir (Mosesso ve ark., 2013). Preparatlarda incelemeler sırasında sayısal KA olarak değerlendirilen poliploid hücrelere rastlanmıştır.



Şekil 3.2. Kromozomları dağılmış C-metafaz hücresi (♂). X1000

Preparatların incelenmesinin ardından, yapısal KA taşıyan hücre %'si, anormal hücre %'si ve hücre başına düşen toplam KA frekansı bulunmuştur. Ayrıca, test maddesinin uygulandığı kültürlerden hazırlanan preparatlarda gözlenen KA'ların her bir çeşidinin %'si hesaplanmıştır. Kromozomal anormallik yüzdeleri hesaplanırken; sadece FCF'nin neden olduğu çeşitli tipteki KA potansiyelini belirleyebilmek için, negatif kontrol ve pozitif kontrolde gözlenen anormallikler hesaplamaya dahil edilmemiştir.

3.2.4. Mitotik İndeksin (MI) Saptanması

FCF'nin insan lenfositlerine sitotoksik etkilerinin saptanabilmesi için MI değerleri hesaplanmıştır. MI her hücre kültürü preparatında toplam 2000 hücre (her konsantrasyon için toplam 8000 hücre) olmak üzere incelenmiştir. Her preparat için toplam 2000 hücre içinde mitoz bölünme geçiren hücrelerin oranı yüzde olarak bulunarak MI saptanmıştır.

3.2.5. Fotoğraf Çekimi

FCF ilave edilmiş kültürlerden hazırlanan preparatların incelenmesi sırasında görülen farklı KA'ların fotoğrafları, NIKON marka, Eclipse E200 model trinoküler mikroskoba monte edilmiş bir aparat yardımıyla, 64 Megapiksel çözünürlüğe sahip Samsung A71 akıllı telefon kamerası kullanılarak 10X100=1000 büyütmede çekilmiştir.

3.2.6. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

İstatistik analizi SPSS 11.5 for Windows programı ile yapılmıştır. Deneysel gruplar arasındaki karşılaştırmada farkın istatistiksel olarak önemli olup olmadığı ONE WAY ANOVA (Post Hoc analiz-LSD Test) ile analiz edilmiştir.

Ayrıca, konsantrasyon-etki ilişkisi regresyon ve korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar, $P < 0.05$ anlamlılık düzeyine göre istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Forklorfenuron Uygulamasının İnsan Periferal Kan Lenfosit Kültürlerinde Kromozom Anormalliklerinin (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri

Bu çalışmada, 0.25, 0.50, 1.00 ve 2.00 µg/ml konsantrasyonlardaki FCF'nin insan lenfositlerine 24 ve 48 saat süre ile uygulanmasının KA üzerine etkisi Tablo 1.'de sunulmuştur.

In vitro KA testinden elde ettiğimiz sonuçlara göre; yüksek iki konsantrasyondaki (1.00 ve 2.00 µg/ml) FCF ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferal kan lenfosit kültürlerinde, yapısal KA taşıyan hücre %'si ve Anormal hücre %'si negatif kontrole göre istatistiksel olarak önemli derecede artış göstermiştir ($P<0.05$). Düşük iki konsantrasyonda (0.25 ve 0.50 µg/ml) ise FCF tarafından indüklenen KA'nın negatif kontrol ile kıyaslandığında önemli bir farklılık göstermediği belirlenmiştir ($P>0.05$). Farklı konsantrasyonlardaki FCF ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş insan periferal kan lenfositlerindeki anormal hücre %'sinin kontrol ve pozitif kontrole göre değişimi Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

Hücre başına düşen toplam KA oranı bakımından değerlendirildiğinde, FCF'nin en düşük konsantrasyon hariç diğer tüm konsantrasyonlarda (0.50, 1.00 ve 2.00 µg/ml) ve her iki uygulama süresinde (24 ve 48 saat) KA oluşumunu negatif kontrole göre önemli derecede arttırdığı belirlenmiştir ($P<0.05$). Fakat, Çizelge 4.1. de görülebileceği gibi, bu çalışmada FCF'nin neden olduğu KA oluşumları hiçbir konsantrasyonda pozitif kontrol olarak uyguladığımız MMC kadar etkili olmamış ve FCF uygulanan tüm konsantrasyon ve sürelerde pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında önemli derecede düşük bulunmuştur ($P<0.001$).

Uygulama süresi 24 saat olan kültürlerde, FCF tarafından uyarılan yapısal KA taşıyan hücre %'si ($r^2=0.837$, $P<0.05$) (Şekil 4.2), anormal hücre %'si ($r^2=0.891$, $P<0.05$) (Şekil 4.4) ve toplam KA/hücre oranı ($r^2=0.897$, $P<0.05$) (Şekil 4.6) konsantrasyona bağlı bir artış göstermiş ve bu artışlar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. 48 saatlik

uygulama süresinde ise FCF uygulanan kültürlerde konsantrasyon yükseldikçe KA artışı görülse de istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.3, Şekil 4.5, Şekil 4.7).

Çalışmamızda, FCF'nin kültüre alınmış insan lenfositlerinde özellikle kromatid tipi yapısal KA'lara neden olduğu belirlenmiştir. FCF'nin insan lenfositlerine 24 ve 48 saat süreyle uygulanması sonucu gözlenen kromatid tipi yapısal KA'lar, kromatid kırığı (% 63.07) (Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17), kardeş kromatid birleşmesi (% 29.41) (Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23) ve kromatid değişimi (% 0.65) (Şekil 4.24, Şekil 4.25)'dir. Kromozom tipi yapısal KA'lar ise kromozom kırığı (% 4.25) (Şekil 4.26, Şekil 4.27) ve disentrik kromozom (% 0.33) (Şekil 4.28)'dur. FCF uygulaması insan lenfosit kültürlerinde sayısal KA olarak poliploidiye (% 2.29) (Şekil 4.29, Şekil 4.30, Şekil 4.31) neden olmuştur.

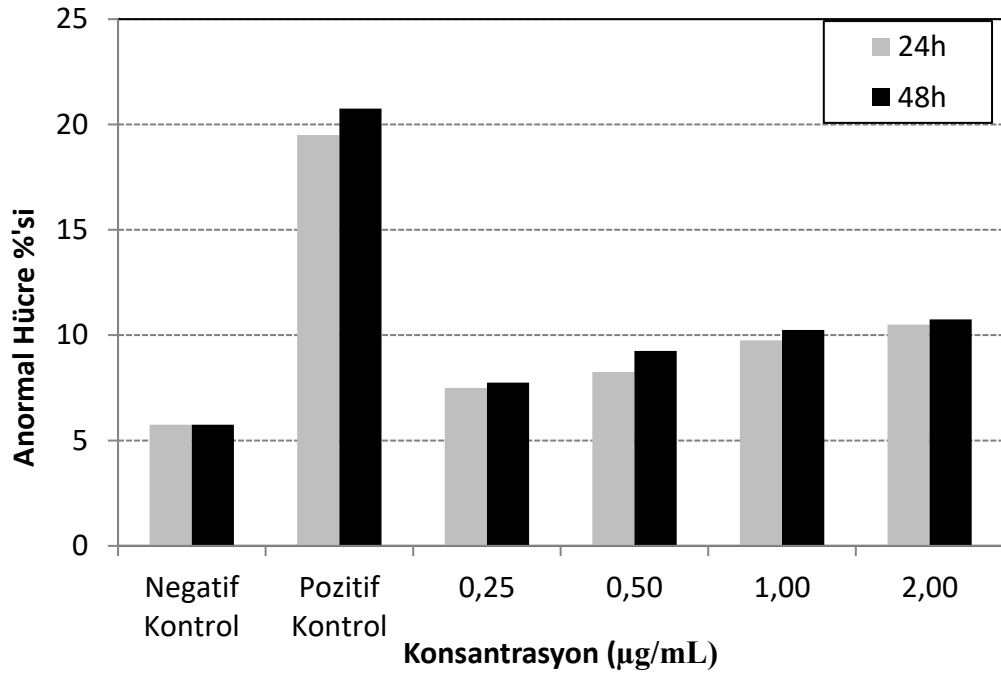
Çizelge 4.1. Farklı Konsantrasyonlarda Forklorfenuron ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferik Kan Lenfositlerinde Gözlenen Kromozom Anormallikleri

Test Maddesi	Uygulama		Kromozomal Anormallikler (KA)							Yapısal KA Taşıyan Hücre %’si ± SH	Anormal Hücre %’si ±SH	Toplam KA/Hücre ±SH
	Süre (saat)	Kons. (µg/ml)	Yapısal KA			Sayısal KA						
			Kromatid Tipi			Kromozom Tipi						
			B’	KKB	KD	B’’	F’’	DS	P			
Negatif Kontrol	--		14	9	0	0	0	0	0	5.75 ± 0.95	5.75 ± 0.95	0.058 ± 0.01
Pozitif Kontrol	24	0.20	53	6	7	14	0	0	0	19.50 ± 2.64 a ₃	19.50 ± 2.64 a ₃	0.200 ± 0.02 a ₃
Forklorfenuron	24	0.25	20	9	0	0	0	1	1	7.25 ± 1.50 b ₃	7.50 ± 1.29 b ₃	0.076 ± 0.01 b ₃
Forklorfenuron	24	0.50	25	10	0	0	0	0	1	8.00 ± 1.63 b ₃	8.25 ± 1.25 b ₃	0.090 ± 0.01 a ₁ b ₃
Forklorfenuron	24	1.00	24	9	1	5	0	0	0	9.75 ± 2.36 a ₁ b ₃	9.75 ± 2.36 a ₂ b ₃	0.098± 0.02 a ₁ b ₃
Forklorfenuron	24	2.00	25	16	0	2	0	0	1	10.25± 2.50 a ₂ b ₃	10.50± 2.51 a ₂ b ₃	0.110± 0.05 a ₂ b ₃
Pozitif Kontrol	48	0.20	49	9	12	14	1	1	0	20.75 ± 3.86 a ₃	20.75 ± 3.86 a ₃	0.220 ± 0.03 a ₃
Forklorfenuron	48	0.25	21	8	0	3	0	0	0	7.75 ± 2.87 b ₃	7.75 ± 2.87 b ₃	0.080 ± 0.02 b ₃
Forklorfenuron	48	0.50	24	12	0	0	0	0	1	9.00 ± 2.44 b ₃	9.25± 2.62 b ₃	0.093 ± 0.02 a ₁ b ₃
Forklorfenuron	48	1.00	29	11	0	2	0	0	1	10.00 ± 2.16 a ₁ b ₃	10.25± 1.89 a ₁ b ₃	0.108 ± 0.01 a ₂ b ₃
Forklorfenuron	48	2.00	25	15	1	1	0	0	2	10.25± 0.95 a ₁ b ₃	10.75± 0.95 a ₂ b ₃	0.110± 0.01 a ₂ b ₃
Kromozomal Anormallik Yüzdesi*			63.07	29.41	0.65	4.25	-	0.33	2.29			

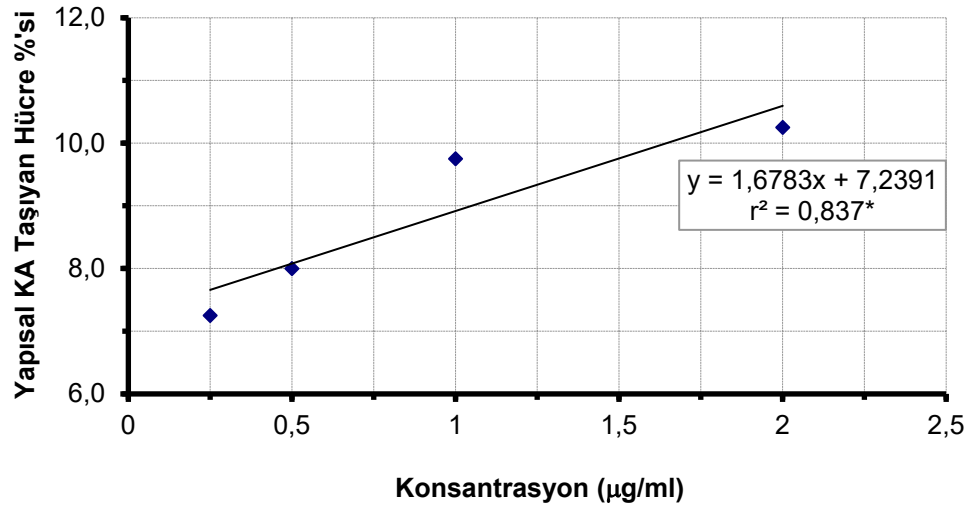
B': Kromatid kırığı, KKB: Kardeş kromatid birleşmesi, KD: Kromatid değişimi, B'': Kromozom kırığı, F'': Fragment, DS: Disentrik kromozom, P: Poliploid hücre.

*: Kromozomal anormallik yüzdesi hesaplanırken negatif kontrol ve pozitif kontrolde gözlenen anormallikler dahil edilmemiştir.

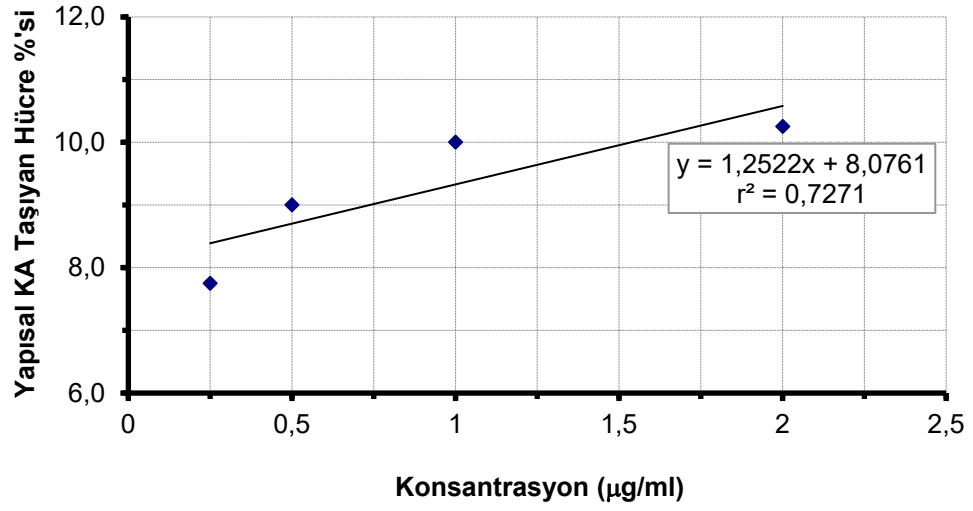
a: Kontrol ile, b: Pozitif kontrol ile aradaki fark önemlidir. a₁b₁: P $\leq$ 0.05, a₂b₂: P $\leq$ 0.01, a₃b₃: P $\leq$ 0.001



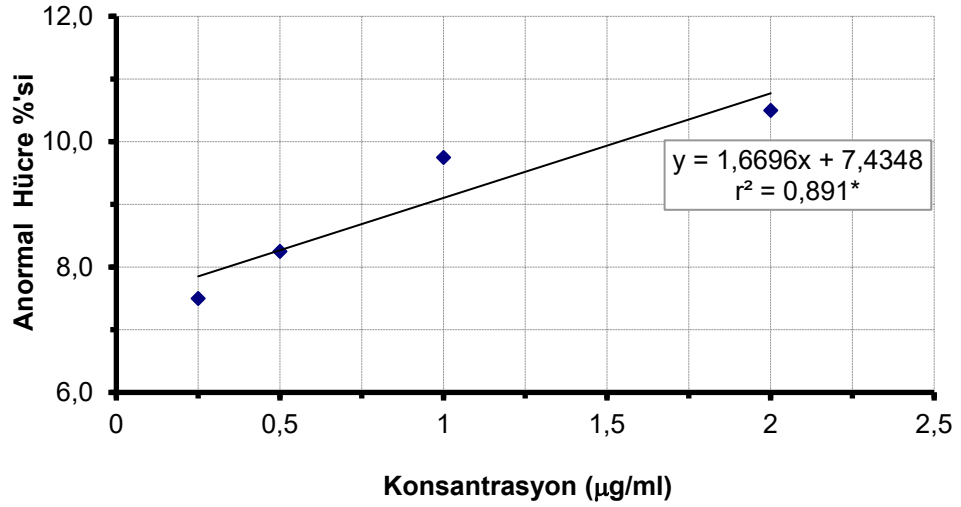
Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda FCF ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde Anormal hücre yüzdesi



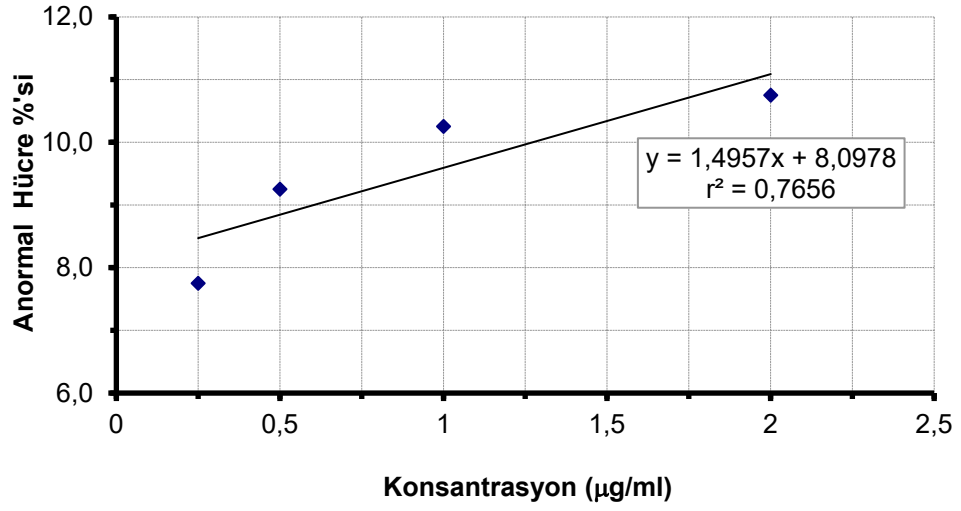
Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda FCF ile 24 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde Yapısal KA taşıyan hücre %'sinin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı. *: $P < 0.05$



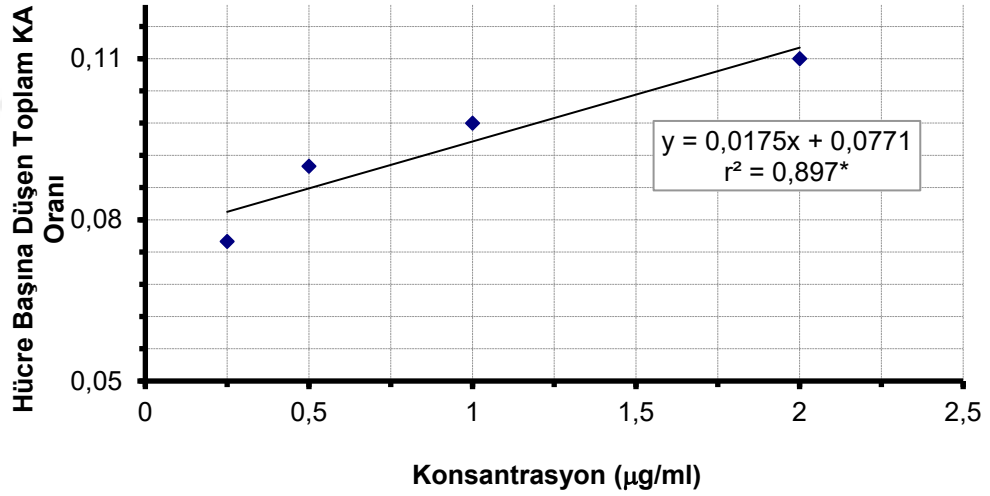
Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda FCF ile 48 saat muamele edilmiş insan periferall lenfositlerinde Yapısal KA taşıyan hücre %'sinin regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı ($P > 0.05$)



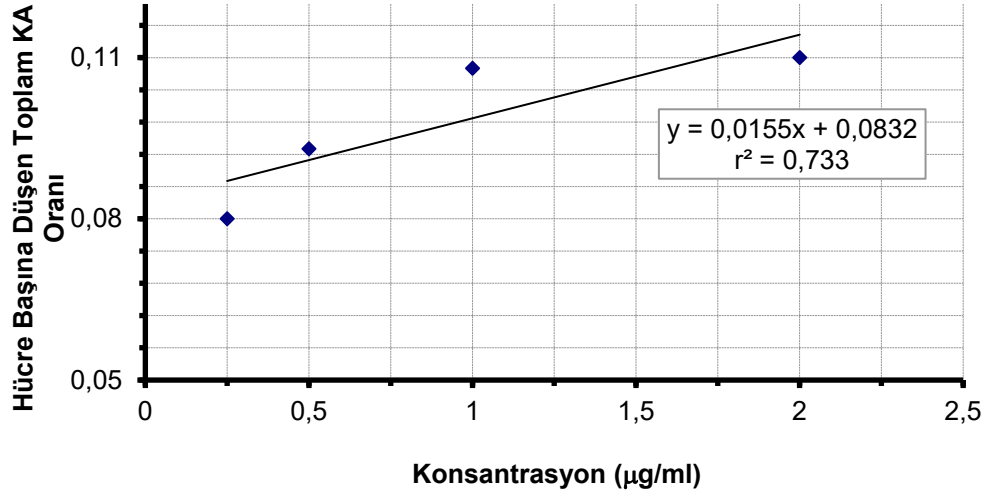
Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda FCF ile 24 saat muamele edilmiş insan periferall lenfositlerinde Anormal hücre %'sinin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı. *: $P < 0.05$



Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlarda FCF ile 48 saat muamele edilmiş insan periferall lenfositlerinde Anormal hücre %'sinin regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı ($P>0.05$)



Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda FCF ile 24 saat muamele edilmiş insan periferall lenfositlerinde Toplam KA/Hücre oranının konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı. *: $P<0.05$



Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda FCF ile 48 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde Toplam KA/Hücre oranının regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı ($P>0.05$)



Şekil 4.8. Kromatid kırığı (B'), (0.50 µg/ml FCF, 48 saat uygulama). X1000



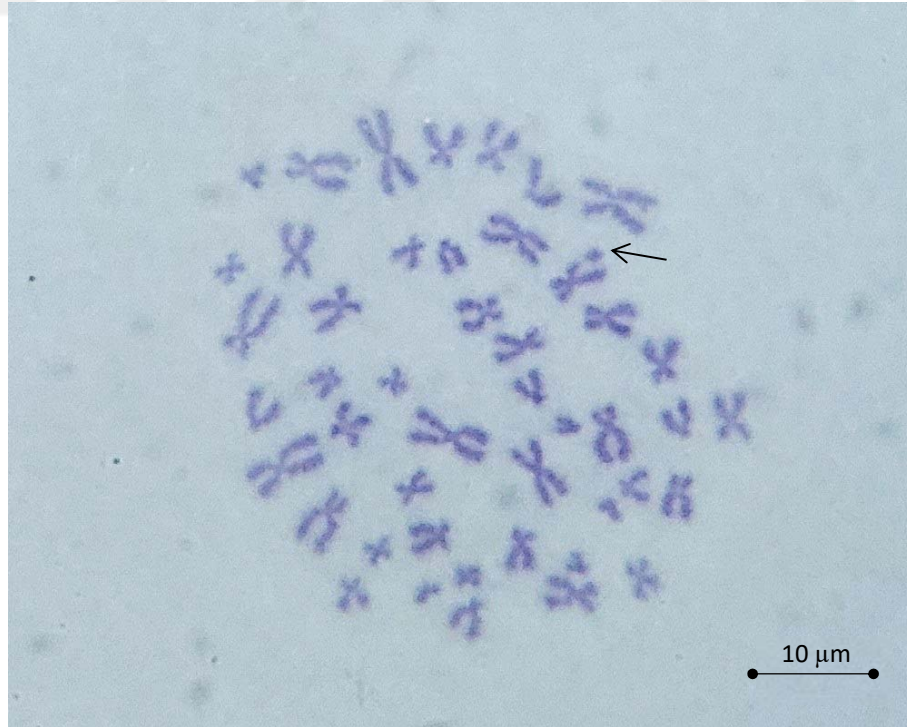
Şekil 4.9. Kromatid kırığı (B'), (0.50 µg/ml FCF, 48 saat uygulama). X1000



Şekil 4.10. Kromatid kırığı (B'), (1.00 µg/ml FCF, 48 saat uygulama). X1000



Şekil 4.11. Kromatid kırığı (B'), (0.50 µg/ml FCF, 24 saat uygulama). X1000



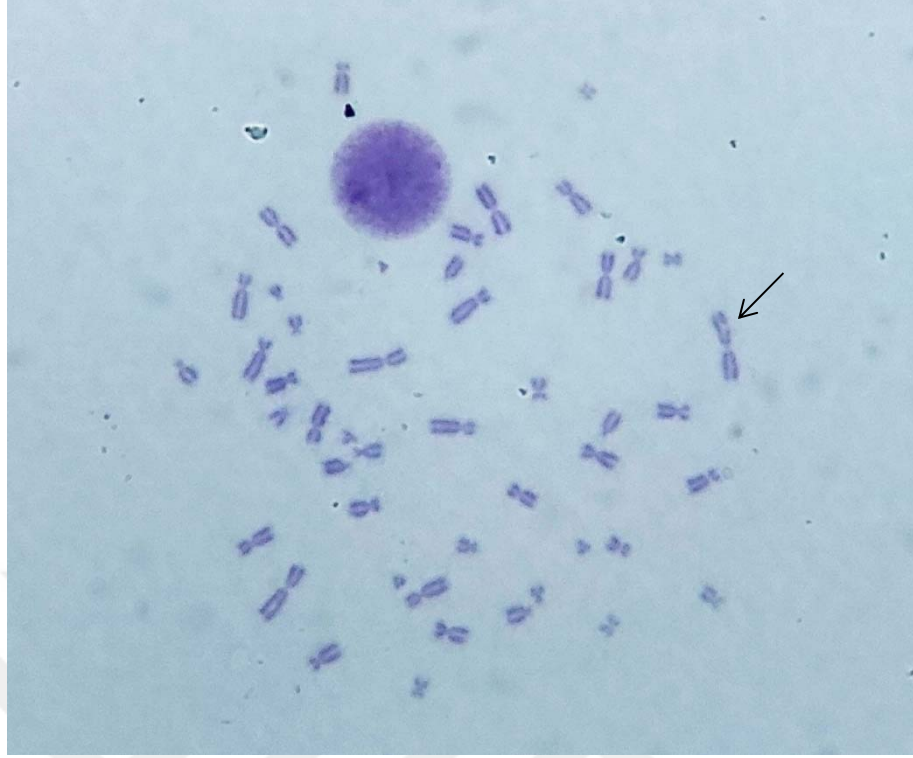
Şekil 4.12. Kromatid kırığı (B'), (2.00 µg/ml FCF, 48 saat uygulama). X1000



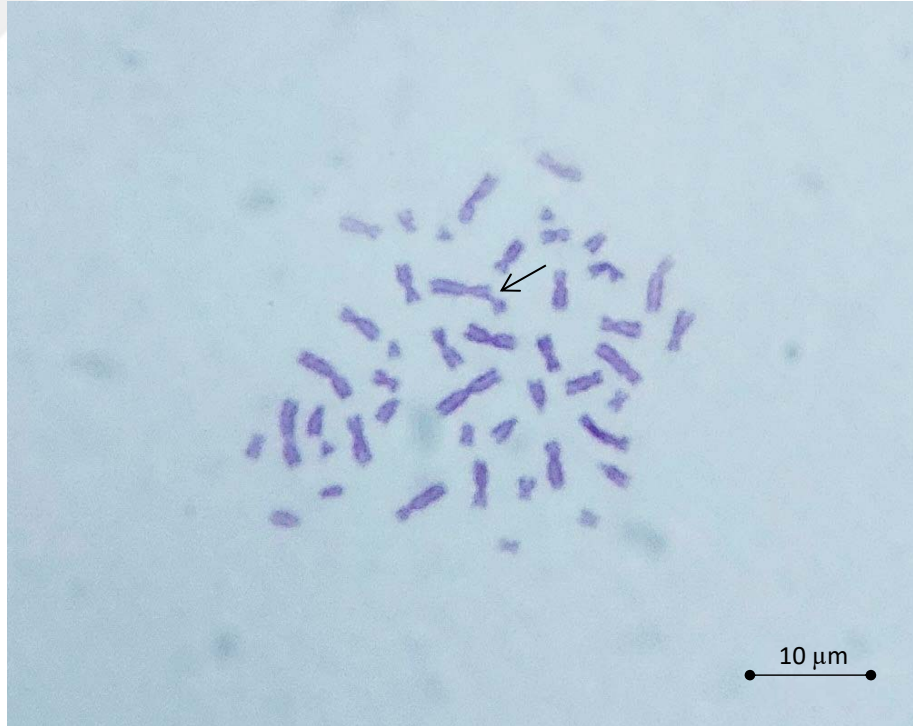
Şekil 4.13. Kromatid kırığı (B'), (2.00 µg/ml FCF, 24 saat uygulama). X1000



Şekil 4.14. Kromatid kırığı (B'), (1.00 µg/ml FCF, 48 saat uygulama). X1000



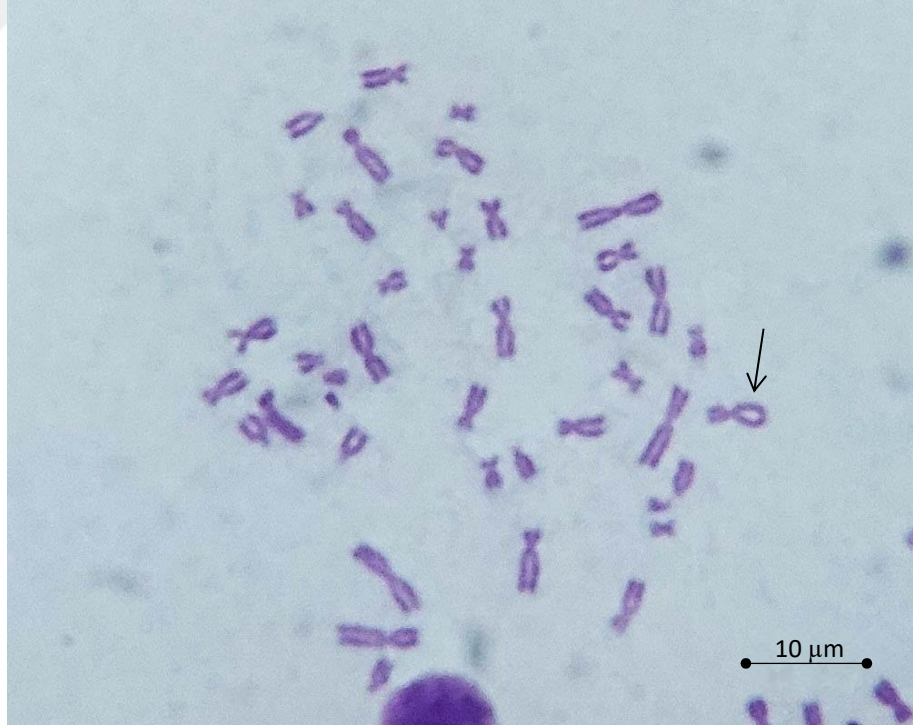
Şekil 4.15. Kromatid kırığı (B'), (0.25 µg/ml FCF, 48 saat uygulama). X1000



Şekil 4.16. Kromatid kırığı (B'), (0.50 µg/ml FCF, 24 saat uygulama). X1000



Şekil 4.17. Kromatid kırığı (B'), (2 µg/ml FCF, 48 saat uygulama). X1000



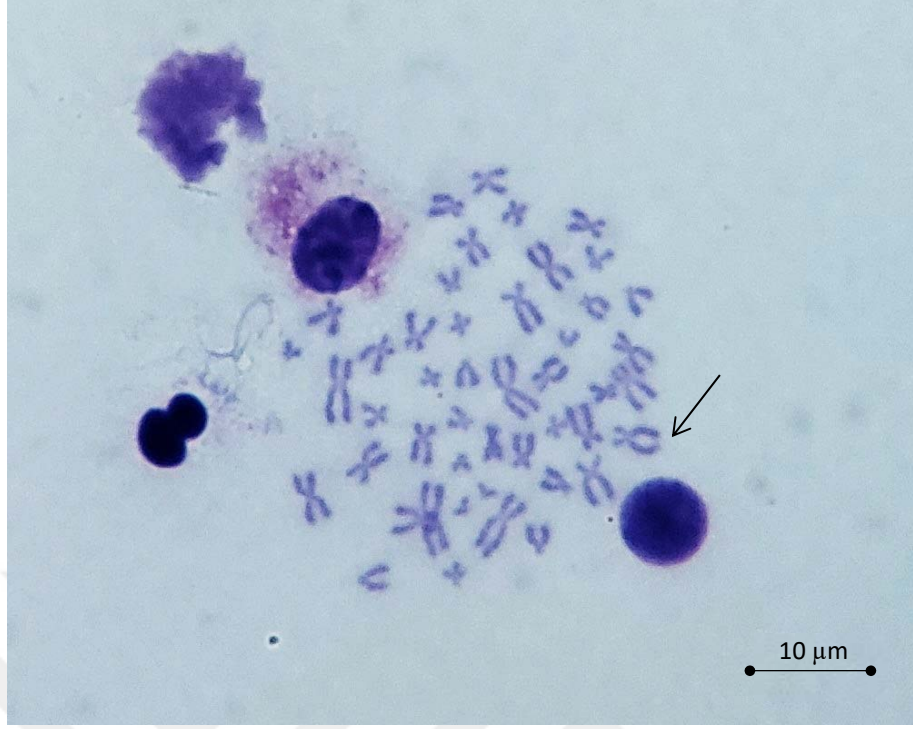
Şekil 4.18. Kardeş Kromatid Birleşmesi (KKB), (0.50 µg/ml FCF, 48 saat uygulama). X1000



Şekil 4.19. Kardeş Kromatid Birleşmesi (KKB), (0.50 µg/ml FCF, 48 saat uygulama).
X1000



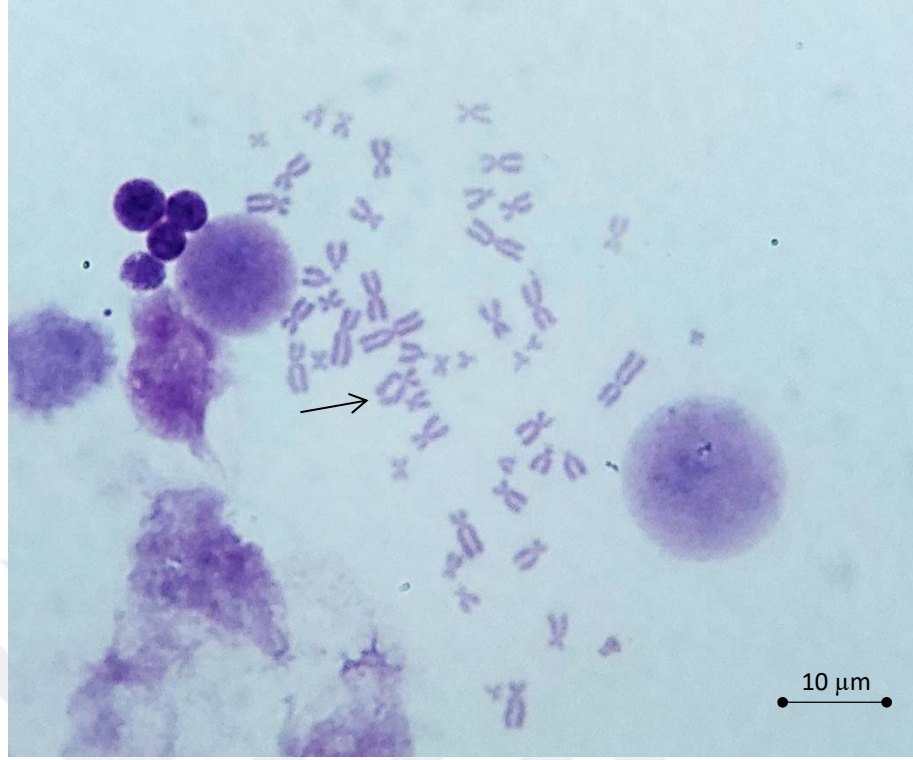
Şekil 4.20. Kardeş Kromatid Birleşmesi (KKB), (2.00 µg/ml FCF, 48 saat uygulama).
X1000



Şekil 4.21. Kardeş Kromatid Birleşmesi (KKB), (1.00 μg/ml FCF, 24 saat uygulama).
X1000



Şekil 4.22. Kardeş Kromatid Birleşmesi (KKB), (0.25 μg/ml FCF, 48 saat uygulama).
X1000



Şekil 4.23. Kardeş Kromatid Birleşmesi (KKB), (0.50 µg/ml FCF, 24 saat uygulama). X1000



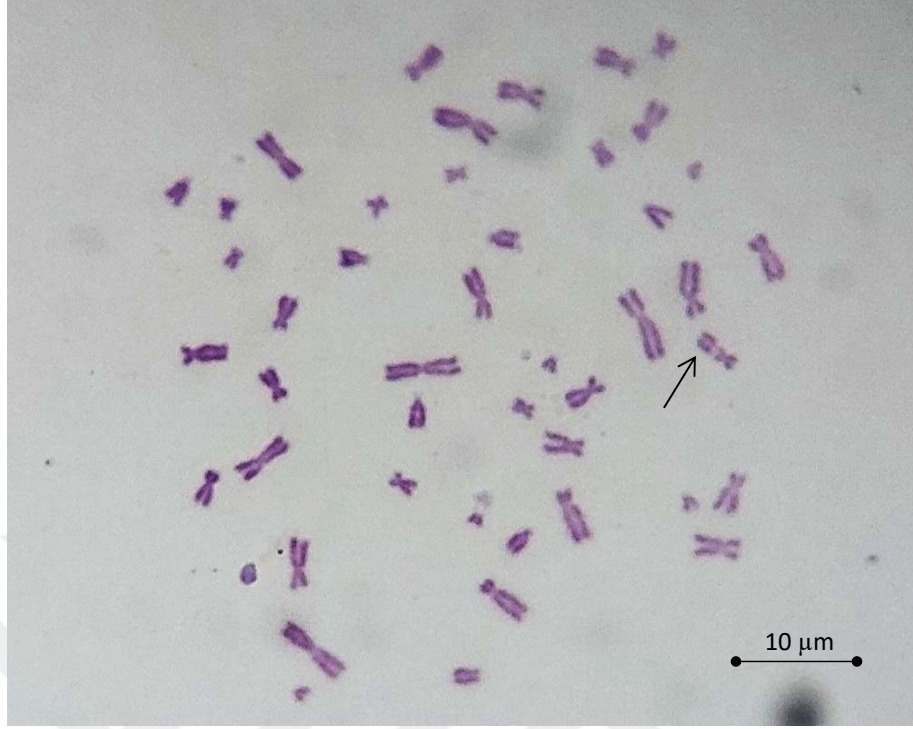
Şekil 4.24. Kromatid değişimi (KD), (1.00 µg/ml FCF, 24 saat uygulama). X1000



şekil 4.25. Kromatid değişimi (KD), (2.00 µg/ml FCF, 48 saat uygulama). X1000



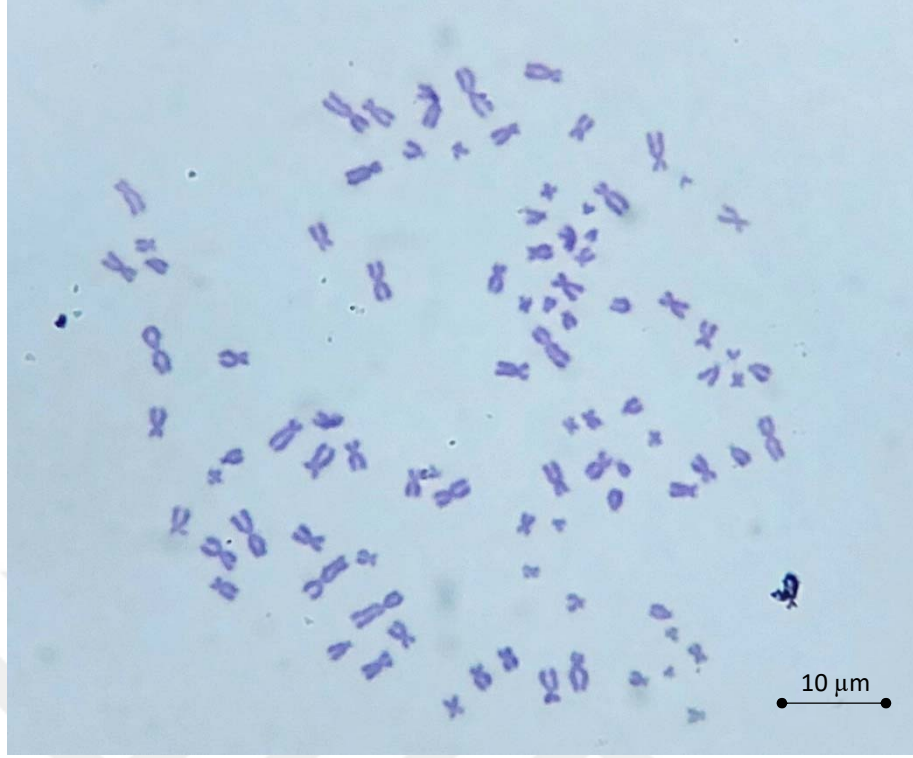
şekil 4.26. Kromozom kırığı (B"), (1.00 µg/ml FCF, 24 saat uygulama). X1000



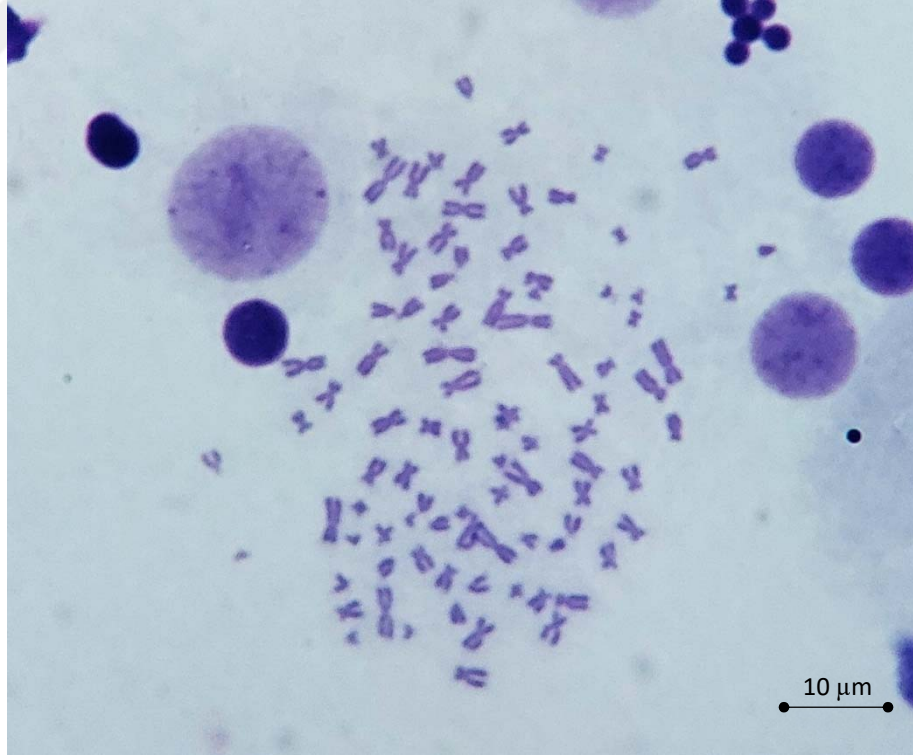
Şekil 4.27. Kromozom kırığı (B''), (2.00 µg/ml FCF, 48 saat uygulama). X1000



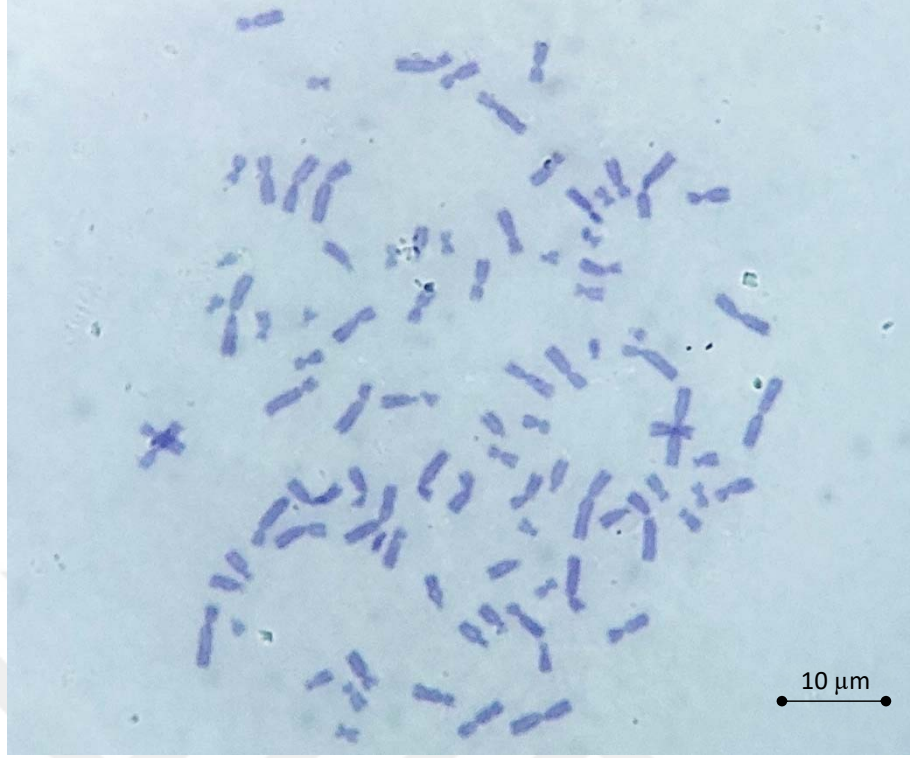
Şekil 4.28. Disentrik kromozom (DS), (0.25 µg/ml FCF, 24 saat uygulama). X1000



Şekil 4.29. Poliploidi, (2.00 µg/ml FCF, 48 saat uygulama). X1000



Şekil 4.30. Poliploidi, (2.00 µg/ml FCF, 48 saat uygulama, ♂). X1000

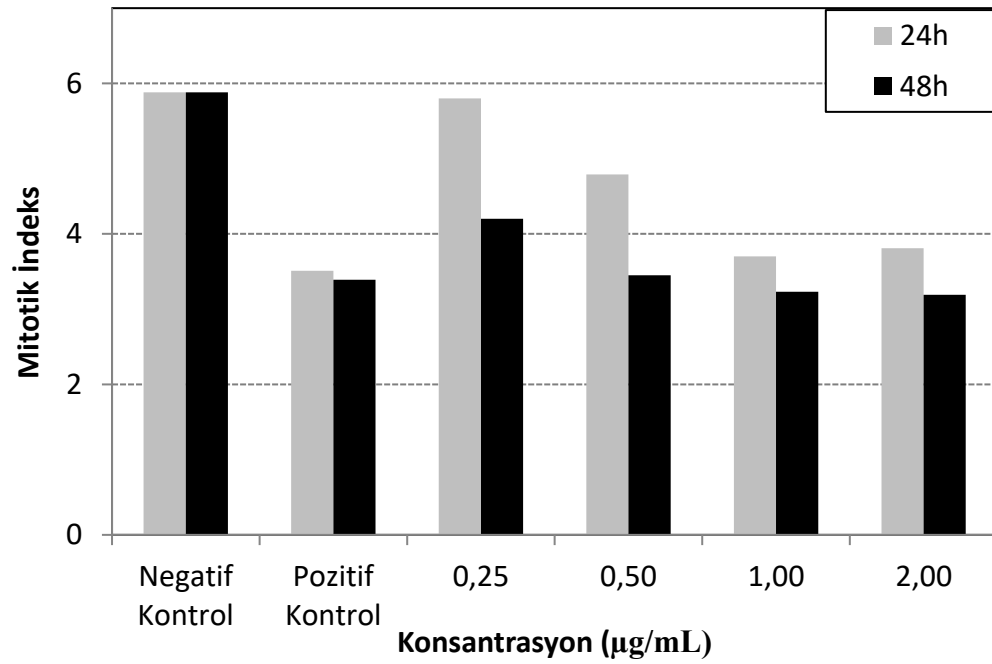


Şekil 4.31. Poliploidi, (0.50 µg/ml FCF, 24 saat uygulama). X1000

4.1.2. Forklorfenuron Uygulamasının İnsan Periferel Kan Lenfosit Kültürlerinde Mitotik İndeks Üzerine Etkileri

Bu çalışmada, FCF'nin muhtemel sitotoksik etkisini değerlendirebilmek için mitotik indeks (MI) değerleri hesaplanmıştır.

FCF'nin insan periferel kan lenfositlerine 24 saatlik uygulama periyodunda; FCF, test edilen en düşük konsantrasyon hariç diğer tüm konsantrasyonlarda MI'yı negatif kontrole kıyasla önemli derecede düşürmüştür. 48 saat FCF uygulanan kültürlerden elde edilen MI değerleri de tüm konsantrasyonlarda negatif kontrole göre istatistiksel bakımdan anlamlı derecede düşük bulunarak ($P<0.001$) sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, 24 saatlik uygulamadaki düşük iki konsantrasyon hariç, diğer tüm uygulamalarda FCF'nin pozitif kontrol kadar etkili bir sitotoksik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (Çizelge 4.3, Şekil 4.32). FCF genel olarak konsantrasyon arttıkça MI değerinin düşmesine neden olmuş; fakat istatistiksel olarak anlamlı konsantrasyon-etki ilişkisi bulunmamıştır ($P>0.05$) (Şekil 4.33, Şekil 4.34).



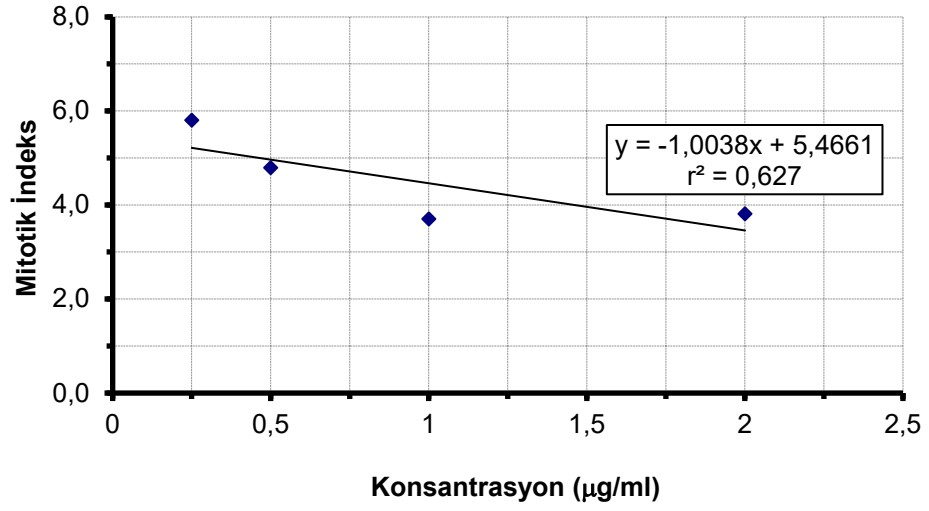
Şekil 4.32. Farklı konsantrasyonlarda Forklorfenuron ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde mitotik indeks

Çizelge 4.2. Farklı Konsantrasyonlarda Forklorfenuron ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde Mitotik İndeks Değerleri

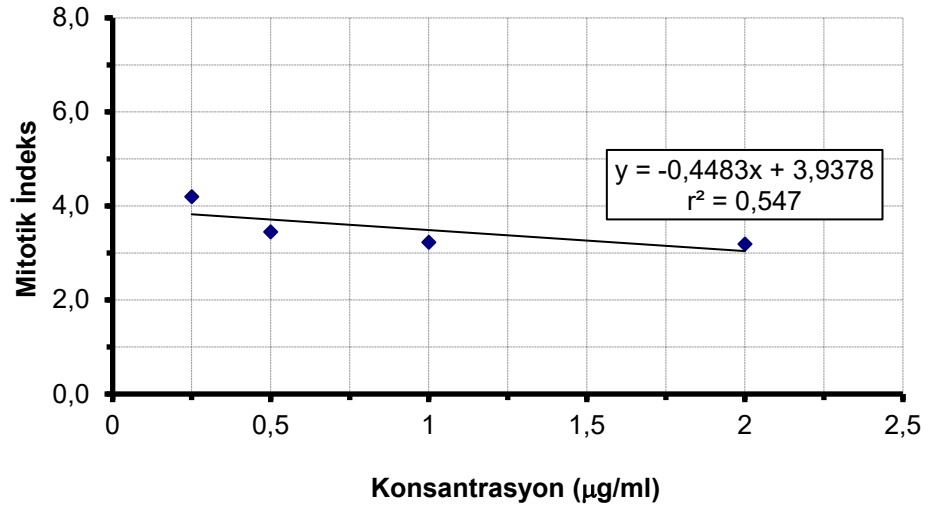
Test Maddesi	Uygulama		Mitotik İndeks± SH
	Süre (saat)	Kons. (µg/ml)	
Negatif Kontrol	--	--	5.88 ± 0.40
Pozitif Kontrol	24	0.20	3.51 ± 0.57 a ₃
Forklorfenuron	24	0.25	5.80 ± 0.16 b ₃
		0.50	4.79 ± 0.59 a ₁ b ₁
		1.00	3.70 ± 1.26 a ₃
		2.00	3.81 ± 0.82 a ₃
Pozitif Kontrol	48	0.20	3.39 ± 0.46 a ₃
Forklorfenuron	48	0.25	4.20 ± 0.98 a ₂
		0.50	3.45 ± 0.92 a ₃
		1.00	3.23 ± 0.66 a ₃
		2.00	3.19 ± 1.14 a ₃

a: Negatif kontrol ile, b: Pozitif kontrol ile aradaki fark önemlidir.

a₁b₁c₁: P≤0.05, a₂b₂c₂: P≤0.01, a₃b₃c₃: P≤0.001



Şekil 4.33. Farklı konsantrasyonlarda FCF ile 24 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde MI değerlerine ait regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı ($P>0.05$)



Şekil 4.34. Farklı konsantrasyonlarda FCF ile 48 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde MI değerlerine ait regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı ($P>0.05$)

4.2. Tartışma

4.2.1. Forklorfenuronun genotoksik potansiyeli

Bu çalışmada, tarımsal üretimde verimi arttırmak için yaygın bir şekilde kullanılan ticari formülasyondaki FCF'nin genotoksik potansiyeli *in vitro* KA testi kullanılarak çalışılmıştır.

Kromozom Anormalligi testi, DNA'da hasara neden olan maddelerin erken tespitine olanak sağlayan ve günümüzde yaygın olarak kullanılan kısa süreli genotoksisite testlerinden biridir (Bonassi ve ark., 2008; Murgia ve ark., 2008). KA frekansında meydana gelen artışın değerlendirilmesi genotoksik potansiyele ilişkin önemli bir biyo belirteçtir.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre; 0.25, 0.50, 1.00 ve 2.00 µg/ml konsantrasyonlarındaki FCF'nin *in vitro* olarak insan periferik kan lenfositlerine 24 ve 48 saat süre boyunca uygulanması, genel olarak yüksek iki konsantrasyonda KA oluşumunun negatif kontrole göre önemli derecede artışına sebep olmuştur. Ayrıca 24 saatlik uygulamada KA'daki artışın konsantrasyona bağlı olarak bulunması, FCF'nin insan periferik kan lenfositleri üzerinde genotoksik potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada, FCF'nin insan lenfositlerine uygulamasının özellikle DNA'da zincir kırıklarına neden olarak klastojenik etki gösterdiğini belirtebiliriz. Çalışmamızın sonucunda, her iki uygulama süresinde ve özellikle yüksek konsantrasyonlarda kromatid kırığı ve kardeş kromatid birleşmesi gibi yapısal hasarların meydana geldiği belirlenmiştir. Kromozom tipi anormalliklerden ise kromozom kırığı FCF'nin neden olduğu anormallik tiplerinden biridir. Bundan başka, FCF ile muamele edilen kültürlerde anöjenik etkinin göstergesi olarak poliploid hücrelere rastlanmıştır. FCF'nin hem yapısal hem de sayısal KA'lara neden olması, bu maddenin genotoksik potansiyelinin DNA'da zincir kırılmalarına neden olarak ortaya çıkabileceği gibi, hücre bölünme dinamiğini etkileyen mikrotübüller, mikrofilamentler ya da septinler gibi hücre iskeleti elemanları üzerinde de olumsuz etki göstererek ortaya çıkabileceği düşünülebilir. Bununla birlikte, Hu ve ark. (2008) tarafından, FCF'nin, aktin veya tübülün polimerizasyonunu

etkilemeden memeli hücrelerinde septin düzeneğini doğrudan ve spesifik olarak değiştirdiği bildirilmiştir (Hu ve ark., 2008). Aynı zamanda, septin polimerlerinin hayvanlarda kasılma halkası, aktin stres fibrilleri ve mitotik iğ gibi çeşitli yapıların organizasyonunda yer aldığı (Kinoshita, 2006) göz önüne alındığında; bizim çalışmamızda FCF'nin özellikle septinler üzerine etki göstererek sitokinezi engellemiş olabileceği ve böylece poliploid hücrelerin oluşumuna neden olabileceği düşünülebilir.

FCF ile muamelenin tomurcuklanan mayada sitokinezde kusurlara ve septin filamentlerinin deformasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Iwase ve ark., 2004). Hücre proliferasyonunun bozulduğu, hücre migrasyonu ve invazyonunun engellendiği gösterilmiştir (Vardi-Oknin et al., 2013; Zhang et al., 2016). FCF tarafından septin hücre iskeletinin hedeflenmesi, sıklıkla septin ekspresyonunun genetik olarak azalması ile tamamlanmıştır (Sidhaye ve ark., 2011; Zhang ve ark., 2016; Deb ve ark., 2016; Sharma ve ark., 2013; Tokhtaeva ve ark., 2015; Moller ve ark., 2018). Tomurcuklanan maya hücrelerinde yapılan bir çalışma, FCF'nin septin eksikliği olan mutantların proliferasyonunu inhibe edebildiğini ve böylece bu bileşiğin septinden bağımsız hücresel aktivitelerini de vurguladığını göstermiştir (Heasley ve ark., 2014)

Hu ve ark. (2008) tarafından memeli hücrelerinde, FCF'nin normal septin dinamiklerini baskıladığı ve septin polimerlerini stabilize ederek hücre morfolojisi değişiklikleri, mitotik kusurlar ve hücre hareketinin azalmasına neden olduğu bildirilmiştir.

Literatür araştırmamıza göre, günümüze kadar FCF'nin muhtemel genotoksik etkilerini belirlemeye yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, bu çalışma, FCF'nin insan lenfositleri üzerindeki genotoksik potansiyelini gösteren ilk verileri sunmaktadır.

Günümüzde, terapötik müdahaleler için potansiyel hedef olarak septin hücre iskeletine yönelik çalışmalar yapılmaktadır (Ivanov ve ark., 2021). Septin modüle edici bileşiklerin deneysel maddesi yalnızca küçük bir molekül olan FCF ile sınırlıdır (Ivanov ve ark., 2021). FCF, farklı deneysel sistemlerde septin hücre iskeletini hedeflemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Heasley ve McMurray, 2016). Ancak, FCF'nin kendisinin mevcut haliyle klinik kullanım için uygun olmayabileceği bildirilmiştir (Ivanov ve ark., 2021). Çünkü, FCF, septin filamentleri için nispeten düşük bir afiniteye sahiptir ve bu

nedenle sadece yüksek konsantrasyonlarda aktiftir. Ayrıca, FCF'nin olası hedef dışı etkileri ve hayvan dokusu toksisitesi bildirilmiştir (Sun ve ark., 2020; Heasley ve McMurray, 2016; Blum ve ark., 2019). Bizim çalışmamızda da etken maddesi FCF olan ticari formülasyondaki sentetik BGD'nin insan lenfosit hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda (1.00 ve 2.00 µg/ml) genotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Bunun yanında, birçok çalışmada farklı septinlerin değişen ekspresyonunun ve mutasyonlarının nörolojik hastalıkların ve kanserin gelişimi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Angelis ve Spiliotis, 2016; Marttinen ve ark., 2015; Poüs ve ark., 2016). İnflamasyon ve fibrozisin düzenlenmesinde septin hücre iskeletinin rolü hakkında ise çok daha az şey bilinmektedir (Ivanov ve ark., 2021). Bununla birlikte, FCF kullanan çalışmalar, yeni nesil septin inhibitörlerinin geliştirilmesine zemin hazırlamıştır.

4.2.2. Forklorfenuronun sitotoksik potansiyeli

Çalışmamızda, FCF'nin insan lenfosit kültürlerine 24 ve 48 saatlik uygulamalarında genel olarak tüm konsantrasyonlarda (24 saatlik uygulamada en düşük konsantrasyon hariç) negatif kontrole göre MI değerini önemli derecede düşürerek sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. MI, sitotoksik potansiyeli göstermek için yaygın olarak kullanılan parametrelerden biridir.

Çalışmamızın sonuçlarıyla uyumlu olarak, Zhang ve ark. (2015) tarafından yapılan *in vitro* çalışmada, FCF'nin Çin hamsteri yumurtalık hücrelerinde sitotoksik etkiye sahip bulunduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmada, FCF'nin insan lenfositleri üzerinde sitotoksik potansiyele sahip olması onun klastojenik etkisinden kaynaklanabilir. Çünkü, birçok araştırmacı tarafından, klastojenik maddeler sebebiyle artan yapısal KA'ların sitotoksositeye neden olabileceği bildirilmiştir (Armstrong ve ark., 1992; Galloway ve ark., 1998; Hillard ve ark., 1998; Vock ve ark., 1998; Kirkland ve Müller, 2000). Hücre içinde yapısal KA oluşumlarının yüksek oranda olması, DNA'nın replikasyon ve/veya transkripsiyon süreçlerini ve hücre proliferasyonunu olumsuz etkileyerek sitotoksik etkiye neden olabilmektedir. Ayrıca, hücre döngüsü için spesifik olan bazı protein ve/veya enzimlerin inhibisyonunun da DNA sentezi ve hücre çoğalmasını inhibe edebildiği bilinmektedir (Hung ve ark., 1996).

Bunların dışında, FCF'nin insan lenfosit hücrelerinde septin organizasyonunu bozarak sitotoksik etki göstermiş olması da muhtemeldir. Şöyle ki;

FCF, bitkilerde hücre bölünmesini teşvik ederek, hücre büyümesi ve farklılaşmasında rol oynarken (Vardi-Oknin ve ark., 2013), diğer ökaryotik organizmalarda yüksek dereceli septin montajını bozmaktadır. Bilindiği üzere, septinler, bitkiler hariç tüm ökaryotik organizmalarda bulunan ve birçok önemli hücresel görevleri olan GTP bağlayıcı bir protein ailesidir (Henzi ve ark., 2021)

Memeli septinleri üzerine yapılan çalışmalardan elde edilen ve giderek artan veriler, septin heteromerik komplekslerinin, kilit hücresel süreçlerde önemli olan diğer proteinler için kenetlenme alanlarının iskelesi olarak hareket edebilen daha üst düzey yapılar sağladığını göstermektedir (Vardi-Oknin ve ark., 2013).

FCF'nin septin filament dönümünü (turnover) bloke ederek kalın septin demetleri ve agregatlarının birikmesine neden olduğu gösterilmiştir (Hu ve ark., 2008). In silico yerleştirme (docking), FCF'nin septin monomerlerinin nükleoid bağlayıcı cebi ile etkileşime girerek septin filamentlerini stabilize ettiğini ve böylece GTP bağlanmasını ve hidrolizi önlediğini önermektedir (Angelis ve ark., 2014).

İlginç bir şekilde, septin hücre iskeletinin FCF ile indüklenen stabilizasyonu, hücre bölünmesi, hücre göçü, vezikül trafiği, kalsiyum girişi ve hücre-hücre yapışmalarını inhibe ederek; septin tükenmesinin fonksiyonel etkilerini taklit ettiği gösterilmiştir (Hu ve ark., 2008; Marcus ve ark., 2016; Tokhtaeva ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2016; Sharma ve ark., 2013; Sidhaye ve ark., 2011).

Ek olarak, septinler, hücre döngüsü kontrolünde (Barral ve ark., 1999; Shulewitz ve ark., 1999) ve DNA-hasar yanıtı ve hücre morfolojinin koordinasyonunda yer almıştır (Lew, 2003; Keaton ve Lew 2006; Enserink ve ark., 2006; Smolka ve ark., 2006; Weirich ve ark., 2008).

Sürekli bir polimer ağı oluşturmada sitoplazma boyunca dağılmış olan septin polimerlerinin, hücrede farklı işlevlere sahip anahtar sinyal moleküllerini saklayan depolar veya sinyali taşıyan iskeleler olarak hizmet ettiği yaygın bir görüştür (Kinoshita, 2006). Kremer ve ark. (2007), memeli hücrelerinde septin (SEPT2/6/7) kompleksinin hem sitokin sinyalini baskılayan SOCS7 ile hem de aktin ile ilişkili bir adaptör protein

olan NCK ile etkileşime girdiğini ileri sürmüştür. SOCS7 proteini, septin etkileşimli bir bölge aracılığıyla çekirdek ve sitoplazma arasında sinyal iletimi açısından dinamik bir geçiş sergiler. Araştırmacılar, yaptıkları çalışmada; septinlerin siRNA (small interferans RNA) tarafından tükenmesinin ardından, SOCS7 ve NCK sinyal proteinlerinin çekirdekte lokalize olduğunu; bu nükleer lokalizasyonun, DNA hasar kontrol noktalarının etkin aktivasyonu ve büyümenin durdurulması için gerekli olduğunu bildirmişlerdir (Kremer ve ark., 2007).

Buna göre, FCF'nin etkisiyle septinlerin stabilize edilerek, kalın septin demetlerinin oluşması, onların fonksiyonlarını yerine getirememesine ve böylece sinyal iletim trafiğinde bozulmalara neden olarak hücreyi apoptosize yönlendiriyor olabileceği düşünülebilir.

Ayrıca, septin polimerlerinin metazoda (hayvanlar) bulunan versiyonlarının, kasılma halkası, aktin stres fibrilleri ve mitotik iğ gibi çeşitli yapıların organizasyonunda yer aldığı (Kinoshita, 2006) bilinmekte olup, FCF uygulanarak kültüre alınmış insan lenfosit hücrelerinde, FCF'nin normal septin organizasyonunu bozması yoluyla, bu yapıları etkileyerek hücre bölünme dinamiği üzerine olumsuz etki göstermesi de oldukça muhtemeldir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızın sonuçlarına göre, bitki gelişim düzenleyicisi olarak yaygın bir şekilde kullanılan ticari formülasyondaki FCF'nin 1.00 ve 2.00 µg/ml konsantrasyonlarda insan periferik lenfositlerine *in vitro* uygulanması KA oluşumunu arttırarak genotoksik hasara; 0.50, 1.00 ve 2.00 µg/ml konsantrasyonlarda MI'yı düşürerek sitotoksik aktiviteye neden olduğu belirlenmiştir.

Bu nedenle, FCF'ye üretim sırasında ya da bu sentetik bitki hormonunun uygulanması sırasında maruz kalan kişilerin gözlük, yüz sperliği, maske ve eldiven gibi kişisel koruyucu ekipmanlarını kullanmaları önemli görünmektedir. Ayrıca, tarımsal üretimde uygun dozlarda, kontrollü kullanımının sağlanması ve denetlenmesinin de çevreye salınan toksik madde riskini de azaltabileceği düşünülebilir.

Bundan başka, şunu da belirtebiliriz ki; bu çalışma, FCF'nin insanlar üzerindeki potansiyel genotoksik riskini gösteren ilk çalışma niteliğindedir. Bununla birlikte, çalışmamızın zayıf yönü olarak sadece bir test, kültüre alınmış insan lenfositlerinde KA testi, kullanılmış olmasından dolayı başka *in vitro* ve *in vivo* deneysel sistemlerde de FCF'nin olası genotoksik potansiyeliyle ilgili çalışmalar yapılmasının uygun olacağı açıktır.

KAYNAKLAR

- Ainalidou, A., Tanou, G., Belghazi, M., Samiotaki, M., Diamantidis, G., Molassiotis, A., and Karamanoli, K., 2016. Integrated analysis of metabolites and proteins reveal aspects of the tissue-specific function of synthetic cytokinin in kiwifruit development and ripening. **Journal of Proteomics**, 30 (143): 318–333. doi: 10.1016/j.jprot.2016.02.013.
- Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E.G., Tice, R., Waters, M.D., and Aitio, A., 2000. IPCS Guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research**, 463 (2): 111–172.
- Anderson, D., 1988. Human Biomonitoring. **Mutation Research**, 204: 353–541.
- Angelis, D., Karasmanis, E.P., Bai, X., and Spiliotis, E.T., 2014. In silico docking of forchlorfenuron (FCF) to septins suggests that FCF interferes with GTP binding. **Plos one**, 9(5): e96390.
- Angelis, D., and Spiliotis, E.T., 2016. Septin mutations in human cancers. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, 4:122.
- Arima, Y., Oshima, K., and Shudo, K., 1995. Evolution of a novel urea-type cytokinin: Horticultura uses of forchlorfenuron. **Acta Horticulturae**, 394: 75–84
- Armstrong, M.J., Bean, C.L., and Galloway, S.M., 1992. A quantitative assessment of cytotoxicity associated with chromosomal aberration detection in Chinese hamster ovary cells. **Mutation Research**, 265(1): 45–60.
- Ateeq, B., Farah, M.A., Ali, M.N., and Ahmad, V., 2002. Clastogeneticity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by Allium root tip test. **Mutation Research**, 514(1–2):105–113.
- Barral, Y., Parra, M., Bidlingmaier, S., and Snyder, M., 1999. Nim1-related kinases coordinate cell cycle progression with the organization of the peripheral cytoskeleton in yeast. **Genes & Development**, 13: 176–187.
- Belpomme, D., Irigaray, P., Hardel, L., Alkış, R., Montagnier L., Epstein, and Sasco A.J., 2007. The multitude and diversity of environmental carcinogens. **Environmental Research**, 105 (3):414-429.
- Blum, W., Henzi, T., Pecze, L., Diep, K.L., Bochet, C.G., and Schwaller, B., 2019. The phytohormone forchlorfenuron decreases viability and proliferation of malignant mesothelioma cells in vitro and in vivo. **Oncotarget**, 10:6944–6956.
- Bonassi, S., Hagmar, L., Strömberg, U., Montagud, A.H., Tinnerberg, H., Forni, A., Heikkilä P., Wanders S., Wilhard P., Hansteen, I.L., Knudsen, L.E., and Norppa, H., 2000. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. **Epidemiology and Prevention**, 60 (6):1619–1625.
- Bonassi, S., Znaor, A., Norppa, H., and Hagmar, L., 2004. Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: an epidemiologic perspective. **Cytogenetic and Genome Research**, 104 (1-4): 376–382.
- Bonassi, S., Ugolini, D., Kirsch-Volders, M., Strömberg, U., Vermeulen, R., and Tucker, J.D., 2005. Human population with cytogenetic biomarkers: Review of the

- literature and future prospectives. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 45 (2-3): 258–270.
- Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fücic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L., Mirkova, E., Scarfi, M.R., Zijno, A., Norppa, H., and Fenech, M., 2007. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, 28 (3): 625–631.
- Bonassi, S., Norppa, H., Ceppi, M., Strömberg, U., Vermeulen, R., Znaor, A., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Gundy, S., Hansteen, I-L., Knudsen, L.E., Lazutka, J., Rossner, P., Sram, R.J., and Boffetta, P., 2008. Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: Results from a pooled cohort study of 22 358 subjects in 11 countries. **Carcinogenesis**, 29 (6): 1178–1183.
- Briggs, D., 2003. Environmental pollution and the global burden of disease. **British Medical Bulletin**, 68: 1–24.
- Bu, Q., Wang, X., Xie H., Zhong, K., Wu, Y., Zhang, J., Wang, Z., Gao H., and Huang, Y., 2019. 180 Day Repeated-Dose Toxicity Study on Forchlorfenuron in Sprague–Dawley Rats and Its Effects on the Production of Steroid Hormones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 67(36): 10207–10213.
- Carrano, AV., and Natarajan, AT., 1988. International Commission for Protection Against Environmental. Mutagens and Carcinogens. ICPEMC publication No. 14. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. **Mutation Research**, 204: 379–406.
- Caudron, F., and Barral, Y., 2009. Septins and the lateral compartmentalization of eukaryotic membranes. **Developmental cell**, 16: 493–506.
- Cruz Castillo, J.G., Woolley, D.J., and Lawes, G.S., 2002. Kiwifruit size and CPPU response are influenced by time of anthesis. **Scientia Horticulturae**, 95: 23–30
- Deb, B.K., Pathak, T., and Hasan, G., 2016. Store-independent modulation of Ca(2+) entry through Orai by Septin 7. **Nature Communications**, 7: 11751. <https://doi.org/10.1038/ncomms11751>
- EFSA (European Food Safety Authority), 2017. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance forchlorfenuron. **EFSA Journal** 2017,15(6):4874, 18 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4874>
- Evans, H.J., 1984. Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. In: Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C., eds., **Handbook of Mutagenicity Test Procedures**. Elsevier Science, 405–427, Amsterdam.
- Enserink, J. M., Smolka, M. B., Zhou, H., and Kolodner, R.D., 2006. Checkpoint proteins control morphogenetic events during DNA replication stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Cell Biology**, 175, 729–741.
- Fung, K.Y., Dai, L., and Trimble, W.S., 2014. Cell and molecular biology of septins. **International Review of Cell and Molecular Biology**, 310: 289–339.
- Galloway, S.M., Miller, J.E., Armstrong, M.J., Bean, C.L., Skopek, T.R., and Nichols, W.W., 1998. DNA synthesis inhibition as an indirect mechanism of

- chromosome aberrations: Comparison of DNA reactive and non-DNA-reactive clastogens. **Mutation Research**, 400: 169–186.
- Gaspar, R., Meyer, S., Gotthardt, K., Sirajuddin, M., and Wittinghofer, A., 2009. It takes two to tango: regulation of G proteins by dimerization. **Nature reviews Molecular cell biology**, 10: 423–429.
- Gong, G., Kam, H., Tse, Y., and Lee, S.M., 2019. Cardiotoxicity of forchlorfenuron (CPPU) in zebrafish (*Danio rerio*) and H9c2 cardiomyocytes. **Chemosphere** 235, 153–162.
- Gong, G., Kam, H., TSE, Yu-C., Giesy, J.P., Seto, S.W., and Lee, S.M.Y., 2021. Forchlorfenuron (CPPU) causes disorganization of the cytoskeleton and dysfunction of human umbilical vein endothelial cells, and abnormal vascular development in zebrafish embryos. **Environmental Pollution**, 271: 115791.
- Haberer, G., and Kemer, J.J., 2002. Cytokinins. New Insights into a Classic Phytohormone. **Plant Physiology**, 128 (2): 354–362.
- Hagmar, L., Brogger, A., Hansteen, I-L., Heim, S., Högstedt, B., Knudsen, L., Lambert, B., Linninmaa, K., Mitelman, F., Nordenson, I., Reuterwall, C., Salomaa, S., Skerfving, S., and Sorsa, M., 1994. Cancer risk in human predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. **Cancer Research**, 54: 2919–2922.
- Hagmar, L., Bonassi, S., Strömberg, U., Brøgger, A., Knudsen, L.E., Norppa, H., and Reuterwall, C., 1998. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). **Cancer Research**, 58(18): 4117–4121. PMID: 9751622.
- Hayata, Y., Niimi, Y., and Iwasaki, N., 1995. Synthetic cytokinin -CPPU- promotes fruit set and induces parthenocarpy in watermelon. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 120, 997–1000.
- Heasley, L.R., Garcia, G., and McMurray M.A., 2014. Off-target effects of the septin drug forchlorfenuron on nonplant eukaryotes. **Eucaryotic Cell**, 13 (11): 1411–1420.
- Heasley, L.R., and McMurray, M.A., 2016. Small molecule perturbations of septins. **Methods in Cell Biology**, 136: 311–319.
- Henzi, T., Lannes, N., and Filgueira, L., 2021. Septins in Infections: Focus on Viruses. **Pathogens**, 10(3): 278. doi: 10.3390/pathogens10030278. PMID: 33801245; PMCID: PMC8001386.
- Hillard, C.A., Armstrong, M.J., Bradt, C.I., Hill, R.B., Greenwood, S.K., and Galloway, S.M., 1998. Chromosome aberrations in vitro related to cytotoxicity of non-mutagenic chemicals and metabolic poisons. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 31 (4): 316–326.
- Hu, Q., Nelson, W.J., and Spiliotis, E.T., 2008. Forchlorfenuron alters mammalian septin assembly, organization, and dynamics. **Journal of Biological Chemistry**, 283: 29563–29571. doi:10.1074/jbc.M804962200.
- Huitrón, M.V., Diaz, M., Valverde, A., and Camacho, F., 2007. Effect of 2,4-D and CPPU on triploid watermelon production and quality. **HortScience**, 42, 559–564.
- Hung, D.T., Jamison, T.F., and Schreiber, S.L., 1996. Understanding and controlling the cell cycle with natural products. **Chemistry & Biology**, 3 (8): 623–639.

- Ivanov, A.I., Le, H.T., Naydenov, N.G., and Rieder, F., 2021. Novel Functions of the Septin Cytoskeleton: Shaping Up Tissue Inflammation and Fibrosis. **The American Journal of Pathology**, 191(1):40-51. doi: 10.1016/j.ajpath.2020.09.007.
- Iwase, M., Okada, S., Oguchi, T., and Toh-e, A., 2004. Forchlorfenuron, a phenylurea cytokinin, disturbs septin organization in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genes & Genetic Systems**, 79(4): 199–206.
- Joo, E., Surka, M. C., and Trimble, W. S., 2007. Mammalian SEPT2 is required for scaffolding nonmuscle myosin II and its kinases. **Developmental Cell**, 13(5): 677–690.
- Jiao, F., Canon, S.C., Lin, Yi-C., Gladfelter, A.S., and Scheuring, S., 2020. The hierarchical assembly of septins revealed by high-speed AFM. **Nature Communication**, 11: 5062.
- Keaton, M.A., and Lew, D.J., 2006. Eavesdropping on the cytoskeleton: progress and controversy in the yeast morphogenesis checkpoint. **Current Opinion in Microbiology**, 9: 540–546.
- Kim, J.G., Takami, Y., Mizugami, T., Beppu, K., Fukuda, T., and Kataoka, I., 2006. CPPU application on size and quality of hardy kiwifruit. **Scientia Horticulturae**, 110: 219–222.
- Kinoshita, M., 2006. Diversity of septin scaffolds. **Current Opinion in Cell Biology** 18:54–60.
- Kirkland, D.J. and Müller, L., 2000. Interpretation of the biological relevance of genotoxicity test results: The importance of thresholds. **Mutation Research**, 464 (1): 137–147.
- Kocaman, A.Y., and Topaktaş, M., 2007. In vitro evaluation of the genotoxicity of acetamiprid in human peripheral blood lymphocytes. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 48 (6): 483–490.
- Kocaman, A.Y., and Bucak, S., 2016. Genotoxic and cytotoxic effects of flumetralin in human peripheral blood lymphocytes in vitro. **Toxicology and Industrial Health**, 32(12):1927–1934.
- Kocaman, A.Y., and Güven, B., 2016. In vitro genotoxicity assessment of the synthetic plant growth regulator, 1-naphthaleneacetamide. **Cytotechnology**, 68(4):947–956.
- Kocaman, A.Y., and Kılıç, E., 2017. Evaluation of the genotoxicity of commercial formulations of ethephon and ethephon+cyclanilide on *Allium cepa* L. root meristematic cells. **Caryologia**, 70 (3): 229–237.
- Kremer, B.E., Adang, L.A., and Macara, I.G., 2007. Septins regulate actin organization and cell-cycle arrest through nuclear accumulation of NCK mediated by SOCS7. **Cell**, 130(5):837–850. doi: 10.1016/j.cell.2007.06.053.
- Kumlay, A.M., and Eryiğit, T., 2011. Bitkilerde Büyüme ve Gelişmeyi Düzenleyici Maddeler: Bitki Hormonları. **Iğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Der. /Iğdır Univ. J. Inst. Sci. & Tech.** 1(2): 47–56.
- Lew, D. J., 2003. The morphogenesis checkpoint: how yeast cells watch their figures. **Current Opinion in Cell Biology**, 15, 648–653.
- Lu, Y., Song, S., Wang, R., Liu, Z., Meng, J., Sweetman, A.J., Jenkins, A., Ferrier, R.C., Li, H., Luo, W., and Wang, T., 2015. Impacts of soil and water pollution on food safety and health risks in China. **Environment International**, 77: 5–15.

- Marcus, E.A., Tokhtaeva, E., Turdikulova, S., Capri, J., Whitelegge, J.P., Scott, D.R., Sachs, G., Berdichevski, F., and Vagin, O., 2016. Septin oligomerization regulates persistent expression of ErbB2/HER2 in gastric cancer cells. **The Biochemical Journal**, 473:1703–1718.
- Marttinen, M., Kurkinen, K.M., Soininen, H., Haapasalo, A., and Hiltunen, M., 2015. Synaptic dysfunction and septin protein family members in neurodegenerative diseases. **Molecular Neurodegeneration**, 10:16. doi: 10.1186/s13024-015-0013-z.
- Miguel, A., Maroto, J.V., and López-Galarza, S., 2001. Production of different triploid watermelon cultivars without pollinators. **Acta Horticulturae**, 559: 145–148.
- Moller, A.M.J., Fuchtbauer, E.M., Bruel, A., Andersen, T.L., Borggaard, X.G., Pavlos, N.J., Thomsen, J.S., Pedersen, F.S., Delaisse, J.M., and Soe, K., 2018. Septins are critical regulators of osteoclastic bone resorption. **Scientific Reports**, 8(1): 13016. doi: 10.1038/s41598-018-31159-1.
- Mosesso, P., Cinelli, S., Natarajan, A.T., and Palitti, F., 2013. In vitro cytogenetic assays: Chromosomal aberrations and micronucleus tests. (A. Dhawan and M. Bajpayee eds.). In: **Genotoxicity assessment: Methods and protocols, methods in molecular biology**, © Springer Science+Business Media. 1044: 123-146. DOI 10.1007/978-1-62703-529-3_6, New York.
- Mostowy, S., and Cossart, P., 2012. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 13, 183–194.
- Murgia, E., Ballardín, M., Bonassi, S., Rossi, A.M., and Barale, R., 2008. Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case– control study. **Mutation Research**, 639 (1–2): 27–34.
- Natarajan, A.T., and Boeing, J.J.W.A., 2003. Formation of chromosome aberrations: insights from FISH. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, 544(2-3): 299–304.
- Nishihama, R., Onishi, M., and Pringle, J.R., 2011. New insights into the phylogenetic distribution and evolutionary origins of the septins. **Biological Chemistry**, 392(0): 681–687.
- Norppa, H., 2004. Cytogenetic biomarkers. **IARC Scientific Publications**, 157:179-205. PMID: 15055296.
- Norppa, H., Bonassi, S., Hansteen, I.L., Hagmar, L., Strömberg, U., Rössner, P., Boffetta, P., Lindholm, C., Gundy, S., Lazutka, J., Cebulska-Wasilewska, A., Fabiánová, E., Srám, R.J., Knudsen, L.E., Barale, R., and Fucic, A., 2006. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. **Mutation Research**, 600 (1-2): 37–45. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2006.05.030.
- Özkul, M., Özel, Ç.A., Yüzbaşıoğlu, D., and Ünal, F., 2016. Does 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) induce genotoxic effects in tissue cultured *Allium* roots? **Cytotechnology**. 68(6):2395–2405.
- Pan, F., Malmberg, R.L., and Momany, M., 2007. Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. **BMC Evolutionary Biology**, 7: 1103.
- Paz-y-Miño, C., Bustamante, G., Sánchez, M.E., and Leone, P.E., 2002. Cytogenetic monitoring in a population occupationally exposed to pesticides in Ecuador. **Environmental Health Perspectives**, 110 (11): 1077–1080.

- Poüs, C., Klipfel, L., and Baillet, A., 2016. Cancer-related functions and subcellular localizations of septins. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, 4:126
- Preston, R.J., San Sebastian, J.R. and McFee, A.F., 1987. The in vitro human lymphocyte assay for assessing the clastogenicity of chemical agents. **Mutation Research**, 189 (2): 175–183.
- Priya, J.S., Purushothaman, P., Hannah, C., Matthew, S., and Thomas, S., 2014. Genotoxic effect of ethephon on the root meristems of *Allium cepa* L. **Communications in Plant Sciences**, 4(1–2):19–22.
- Rencüzoğulları, E., and Topaktaş, M., 1991. The relationship between quantities of bromodeoxyuridine and human peripheral blood with determination of the best differential staining of sister chromatids using chromosome medium-B. **Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi**, 5 (3): 19–24.
- Rodrigues, E.T., Alpendurada, M.F., Ramos, F., and Pardal, M.A., 2018. Environmental and human health risk indicators for agricultural pesticides in estuaries. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 150: 224–231.
- Sidhaye, V.K., Chau, E., Breysse, P.N., and King, L.S., 2011. Septin-2 mediates airway epithelial barrier function in physiologic and pathologic conditions. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, 45: 120–126.
- Sirajuddin, M., Farkasovsky, M., Hauer, F., Kühlmann, D., Macara, I.G., Weyand, M., Stark, H., and Wittinghofer, A., 2007. Structural insight into filament formation by mammalian septins. **Nature**, 449 (7160): 311–315.
- Smolka, M.B., Chen, S.H., Maddox, P.S., Enserink, J.M., Albuquerque, C.P., Wei, X.X., Desai, A., Kolodner, R.D., Zhou, H., 2006. An FHA domain-mediated protein interaction network of Rad53 reveals its role in polarized cell growth. **The Journal of Cell Biology**, 175(5):743–753. doi: 10.1083/jcb.200605081
- Sharma, S., Quintana, A., Findlay, G.M., Mettlen, M., Baust, B., Jain, M., Nilsson, R., Rao, A., Hogan, P.G., 2013. An siRNA screen for NFAT activation identifies septins as coordinators of store-operated Ca²⁺ entry. **Nature**, 499: 238–242.
- Shi, X., Jin, F., Huang, Y., Du, X., Li, C., Wang, M., Shao, H., Jin, M., Wang, J., 2012. Simultaneous determination of five plant growth regulators in fruits by modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe (QuEChERS) extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 60: 60–65.
- Shulewitz, M.J., Inouye, C.J., and Thorner, J., 1999. Hsl7 localizes to a septin ring and serves as an adapter in a regulatory pathway that relieves tyrosine phosphorylation of Cdc28 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, 19: 7123–7137.
- Spiliotis, E. T., Kinoshita, M., and Nelson, W. J. 2005. A Mitotic Septin Scaffold Required for Mammalian Chromosome Congression and Segregation. **Science**, 307(5716): 1781–1785.
- Su, L., Wang, M., Wang, Y., Sharif, R., Ren, N., Qian, C., Xu, J., Chen, X., and Qi, X., 2021. Forchlorfenuron Application Induced Parthenocarpic Fruit Formation without Affecting Fruit Quality of Cucumber. **Horticulturae**, 7(6):128. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7060128>
- Sun, L., Cao, X., Lechuga, S., Feygin, A., Naydenov, N.G., and Ivanov, A.I., 2020. A septin cytoskeleton-targeting small molecule, forchlorfenuron, inhibits

- epithelial migration via septin independent perturbation of cellular signaling. **Cells**, 9:84 doi:10.3390/cells9010084
- Te-chato, S., Hilae, A., and In-peuy K., 2008. Effects of cytokinin types and concentrations on growth and development of cell suspension culture of oil palm. **Journal of Agricultural Technology**, V. 4(2): 157–163.
- Tokhtaeva, E., Capri, J., Marcus, E.A., Whitelegge, J.P., Khuzakhmetova, V., Bukharaeva, E., Deiss-Yehiely, N., Dada, L.A., Sachs, G., Fernandez-Salas, E., and Vagin, O. 2015. Septin dynamics are essential for exocytosis. **The Journal of Biological Chemistry**, 290(9): 5280–5297.
- Toumi, K., Joly, L., Vleminckx, C., and Schiffers, B., 2018. Assessment of Belgian florists exposure to pesticide residues. **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences**, 83(3):355–368.
- USEPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2004. Pesticide Fact Sheet for new chemical: Forchlorfenuron; issued: September 2004. **United States Environmental Protection Agency**, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7501C). Erişim Linki: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_P_C-128819_01-Sep-04.pdf
- Vardi-Oknin, D., Golan, M., and Mabjeesh, N.J., 2013. Forchlorfenuron Disrupts SEPT9 il Filaments and Inhibits HIF-1. **PLoS ONE**, 8(8): e73179. doi:10.1371/journal.pone.0073179
- Vock, E.H., Lutz, W.K., Hormes, P., Hoffmann, H.D., and Vamvakas, S., 1998. Discrimination between genotoxicity and cytotoxicity in the induction of DNA double-strand breaks in cells treated with etoposide, melphalan, cisplatin, potassium cyanide, Triton X-100 and gamma-irradiation. **Mutation Research**, 413 (1): 83–94.
- Wang, K.S., Lu, C.Y., and Chang, S.H., 2011. Evaluation of acute toxicity and teratogenic effects of plant growth regulators by Daphnia magna embryo assay. **Journal of Hazardous Materials**, 190 (1-3): 520–528.
- Wang, Q., and Yang, Z., 2016. Industrial water pollution, water environment treatment, and health risks in China. **Environmental Pollution**, 218: 358-365.
- Weirich CS, Erzberger JP, and Barral Y (2008) The septin family of GTPases: architecture and dynamics. **Nature reviews Molecular cell biology** 9: 478–489.
- Zhang, N., Liu, L., Fan, N., Zhang, Q., Wang, W., Zheng, M., Ma, L., Li, Y., and Shi, L., 2016. The requirement of SEPT2 and SEPT7 for migration and invasion in human breast cancer via MEK/ERK activation. **Oncotarget**, 7: 61587–61600.
- Zhang, W., Jiang, F., and Ou, J., 2011. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. **Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences**, 1(2):125–144.
- Zhang, Z., Guo, K., Bai, Y., Dong, J., Gao, Z., Yuan, Y., Wang, Y., Liu, L., and Yue, T., 2015. Identification, synthesis, and safety assessment of forchlorfenuron (1-(2-chloro- 4-pyridyl)-3-phenylurea) and its metabolites in kiwifruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 63 (11): 3059–3066.
- Zhu, M., Wang, F., Yan, F., Yao, P. Y., Du, J., Gao, X., Wang, X., Wu, Q., Ward, T., Li, J., Kioko, S., Hu, R., Xie, W., and Yao, X. 2008. Septin 7 interacts with

centromere-associated protein E and is required for its kinetochore localization. **Journal of Biological Chemistry**, 283(27):18916–18925.

