

Rotenon'un İnsan Lenfositlerinde İn Vitro Genotoksisitesi In Vitro Genotoxicity of Rotenone in Human Lymphocytes

Dilek AŞCI ÇELİK^{1*}, Vehbi Atahan TOĞAY²

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Isparta, Türkiye

Ö Z E T

Giriş: Rotenon, bir taşıyıcıdan bağımsız olarak hücrel membranları kolayca geçen, lipofilik, geniş spektrumlu insektisit ve pisisit sınıfı bir pestisitir. Bu çalışmada Rotenon'un insan periferik kan lenfositlerinde DNA üzerine olan etkisi comet metodu ile değerlendirilmiştir.

Materyal-Metot: Çalışmada 4 erkek 4 kadın toplam 8 gönüllüden alınan periferik kan lenfositleri Rotenon ile 10, 50 veya 100 µM olmak üzere üç farklı dozda ve her bir doz için 1, 2 veya 4 saat olmak üzere üç farklı sürede muamele edilmiştir. Comet metodu uygulanmış ve kuyruk DNA yüzdesi parametresi DNA hasarının göstergesi olarak negatif ve pozitif kontrol grupları ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Bulgular: Rotenon uygulamaları inkübasyon saatine ve doza bağlı olarak farklı sonuçlar ortaya koymuştur. 10 veya 50 µM Rotenon ile 1 s ve 2 s inkübasyon uygulanan gruplar negatif kontrol gruplarına kıyasla DNA hasarında artışa sebep olmuş ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). 100 µM doz ile 1 ve 2 s inkübasyon uygulanan gruplar, kontrol gruplarına kıyasla DNA hasarında anlamlı artışa sebep olmuştur ($p<0,05$). 10, 50 veya 100 µM Rotenon ile 4 s inkübasyon uygulanan gruplarda negatif kontrol grubuna kıyasla DNA hasarında anlamlı seviyede artış tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Sonuç: Rotenon maruziyeti kısa süreli ve düşük dozlarda olduğunda DNA hasarında artış olmakla birlikte bu artış anlamlı değildir. Doz yükseldikçe, kısa maruziyet sürelerinde de anlamlı seviyede DNA hasarı oluşmaktadır. Uzun süreli Rotenon maruziyetinde ise doz bağımsız şekilde anlamlı seviyede DNA hasarı görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Comet metodu, DNA hasarı, Pestisit, Rotenon

Alınış / Received: 04.11.2022 Kabul / Accepted: 25.11.2022 Online Yayınlanma / Published Online: 20.12.2022



ABSTRACT

Objective: Rotenone is a lipophilic, broad-spectrum, insecticide and piscicide class pesticide that readily crosses cellular membranes. In this study, the effect of Rotenone on DNA of human peripheral blood lymphocytes was evaluated by the comet assay.

Material-Method: In the study, peripheral blood lymphocytes taken from 8 volunteers, 4 male and 4 female, were treated with Rotenone at three different doses as 10, 50 or 100 µM, and for three different time periods of 1, 2 or 4 hours for each dose. Comet assay was applied and tail DNA percentage parameter was chosen as measure of DNA damage and statistically compared with negative and positive control groups.

Results: Rotenone applications showed different results depending on incubation time and dose. Groups incubated with 10 or 50 µM Rotenone for 1 and 2 h caused an increase in DNA damage compared to the negative controls, but this increase was not statistically significant ($p>0,05$). There was a significant increase in DNA damage in the groups that were incubated with 10, 50 or 100 µM Rotenone for 4 h compared to the negative control group.

Conclusion: When Rotenone exposure is short-term and at low doses, there is an increase in DNA damage, but this increase is not statistically significant. As the dose increases, statistically significant DNA damage also occurs in short-term exposures. Long-term exposure to Rotenone, on the other hand, shows significant DNA damage regardless of dose.

Keywords: Comet assay, DNA damage, Pesticide, Rotenone



1. Giriş

Pestisitler, tarımsal zararlıları engellemek, zararlarını azaltmak ya da kontrol altına almak için kullanılan zirai ilaçlardır [1]. Tarımsal verimi arttırmak için önemli olsalar da, insanlar ve diğer canlılar için potansiyel toksisiteyi sebebiyle kullanımları çeşitli sorunlara neden olmaktadır [2]. Sağlık üzerindeki olumsuz etkileri konusunda tartışmalar devam etmektedir. Kanseri, solunum yolu hastalıkları ile immün sistem ve sinir sistemi bozukluklarına neden olabilecekleri bildirilmiştir [3].

Rotenon, Leguminosae familyasına ait Lonchocarpus ve Derris cinsi bitkilerin köklerinden elde edilen ve doğal olarak oluşan, insektisit ve pistisit grubu bir pestisittir [4]. Lipofildir ve bu nedenle kan-beyin bariyeri dahil tüm biyolojik zarları kolaylıkla geçer, taşıyıcılara ihtiyaç duymaz [5]. Rotenon toksisitesinin mekanizması henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır [6]. Mitokondriyal kompleks I inhibisyonuna sebep olarak elektron transferini ve dolayısı ile ATP üretilmesini engellediği [7, 8], ROS aktivitesini tetikleyerek mitokondriyal apoptotik yollar aracılığıyla oksidatif hasara ve DNA, protein ve lipid yapısında değişikliğe neden olduğu belirtilmektedir [9-11]. Bazı araştırmalar ise Rotenon'un pro-apoptotik etkilerinin kompleks I inhibisyonundan bağımsız olduğunu, ROS kaynaklı oksidatif stresin kaspaz bağımlı apoptotik yolağı indüklediğini göstermiştir. Ancak Rotenon'un kaspaz bağımsız apoptoza da neden olduğu gösterilmiştir [12]. DNA hasarı; kanser, bağışıklık sistemi bozuklukları ve nörodejeneratif hastalıklar gibi önemli sağlık problemlerinin gelişiminde rol oynayabilir [13]. Dolayısı ile genotoksisite biyobelirteçleri, pestisitlere maruz kalan insan popülasyonlarında incelenmektedir [14-16]. Sağlık risklerinin tespiti için sitogenetik yöntemlerden elde edilen sonuçlar, pestisitlerin etkilerinin ortaya konulmasında önem taşımaktadır [17] ve pestisitlerin DNA hasarına neden olabileceği de gösterilmiştir [18, 19]. Rotenon'un nörodejeneratif hastalıklara neden olmasından dolayı merkezi sinir sistemi hücrelerinde etkileri hala araştırılmaktadır. Bununla birlikte merkezi sinir

sistemi üzerindeki etkilerinin biyolojik olarak izlenmesi, biyolojik materyalin örneklenmesindeki problemlerden dolayı zordur. Bu nedenle, maruz kalma dozu ve süresinin etkisini değerlendirmek için aracı hücrelere ve analizlere de ihtiyaç duyulmaktadır. Dolayısı ile bu çalışmada, Rotenon'un insan lenfosit DNA'sına etkisinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu amaçla, farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerinde genotoksik etkisinin ortaya konulması için, hem in vivo hem de in vitro olarak farklı hücre tiplerinde DNA hasarını hızlı ve güvenilir bir şekilde ölçülebilen comet metodu [20, 21] kullanılarak DNA hasarının tespiti yapılmıştır.

2. Materyal ve Metot

Çalışma Dizayını

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan araştırma onayı alınmıştır (10.10.2022 tarih ve 284 sayılı karar). Gönüllülerden bilgilendirilmiş onay alınmış ve çalışma "Helsinki Deklarasyonuna" uygun olarak yürütülmüştür. Gönüllüler için katı dışlama kriterleri uygulanmıştır. Son 6 ayda radyolojik muayene geçirmemiş, bilinen hastalığı ya da sürekli ilaç kullanımı olmayan ve sigara içmeyen 18–45 yaş aralığında 4 erkek ve 4 kadın gönüllüden 15 mL kan alınmış ve her katılımcının kanı çalışma dizaynında yer alan tüm gruplar için kullanılmıştır. Gruplar Tablo 1'de görülmektedir. Buna göre her grup için 8 katılımcının tümü değerlendirilmiştir. Dozlar ve uygulama saatleri literatür taraması sonucunda seçilmiştir. Araştırmada kullanılan Rotenon (%95< saf, CAS No:83-79-4, MA: 394,42, Sigma-Aldrich, Missouri, ABD) yerel satıcılar aracılığı ile temin edilmiştir.

DNA Hasarının Tespiti

DNA hasar tespiti için comet metodu "OECD İn Vivo Memeli Alkalın Comet Metodu Kılavuzu" [22] uyarınca uygulanmıştır. Kullanılan tüm kimyasallar aksi belirtilmediği sürece Merck (Darmstadt, Almanya) veya Sigma (St. Louis, MO, US) firmalarından yerel satıcılar aracılığı ile temin edilmiştir.

Gönüllülerden heparinize tüplere 15 mL kan alınmış ve bekletmeden comet prosedürüne geçilmiştir. Lenfosit ayırıcı olarak histopak-1077 kullanılmış ve kanlar ile 1:1 oranında karıştırılarak 2000 RPM'de 20 dk santrifüj işlemi uygulanmıştır. Lenfositler ayrı bir tüpe alınarak 1:1 oranında PBS ile karıştırılmış ve tekrar 2500 RPM'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Yıkamanın ardından lenfositler tekrar ayrı bir tüpe alınmış %10 FBS içeren RPMI 1640 eklenerek son hacim 1 mL olacak şekilde Rotenon uygulamasına geçilmiştir. Rotenon lenfositlere 3 farklı dozda (10, 50 ve 100 µM) ve her bir doz için 3 farklı saatte (1, 2 veya 4 s) uygulanmıştır. İnkübasyon 37°C'de etüvde yapılmıştır. Her inkübasyon saati için ayrı ayrı internal kontrol grupları oluşturulmuş, hiçbir uygulama yapılmayan negatif kontrol ve 100 µM H₂O₂ uygulaması yapılan pozitif kontrol grupları karşılaştırma için kullanılmıştır. İnkübasyon sonrasında hücreler santrifüj ile dibe çöktürülerek ayrılmış ve PBS ile 2500 RPM'de 10 dk santrifüj edilerek tekrar yıkama yapılmıştır. Ardından tüm gruplar 37°C'de 1 s daha inkübe edilmiştir. Daha sonra 20 µL hücre süspansiyonu 100 µL % 0,7'lik düşük erime noktalı agaroz (LMA, Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) ile karıştırılmış ve daha önceden %1'lik normal erime noktalı agaroz (NMA, Serva Electrophoresis, Almanya) ile kaplanmış lamlara yayılmıştır. Lamlar taze soğuk lizis solüsyonunda (pH:10, 2,5 M NaCl, 100 mM Na₂-EDTA, 10 mM Tris, %10 DMSO ve %1 Triton X-100) karanlıkta ve +4 °C'de 90 dk bekletilmiştir. Ardından elektroforez aşamasına geçilmiştir. Örnekler taze, buz soğukluğunda elektroforez solüsyonunda (pH:13, 300 M NaOH, 1 mM EDTA) karanlıkta ve +4°C'de 30 dk bekletilmiştir. Daha sonra 25 V (1,02 V/cm) ve + 4°C 25 dk elektroforez işlemi uygulanmıştır. 25 dk sonunda elektroforez tankından dikkatlice çıkarılan lamlar nötralizasyon solüsyonu ile 3 kez 5 dk yıkanmış ve kurumaya bırakılmıştır. Kuruma sürecinin ardından örnekler preparat başına 20 µL etidyum bromür ile boyanmış ve karanlık odada floresan mikroskop (Zeiss Imager A1) altında görüntülenmiştir. Preparat başına 50 hücrenin fotoğrafı rastgele çekilmiştir (Axiocam Icc 1). Fotoğraflar OpenComet [23] programı aracılığı ile DNA hasarının tespit edilebilmesi için analiz edilmiştir. Kuyruk DNA Yüzdesi (TDNAP) parametresi DNA hasarının göstergesi olarak seçilmiştir.

İstatistik Analiz

Elde edilen sonuçlar SPSS v20 [24] programında tek – yönlü ANOVA (posthoc Tukey) kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar ortalama±standart hata olarak sunulmuş ve p<0,05 anlamlı kabul edilmiştir.

3. Bulgular

Her preperattan ortalama 50 hücrenin sonucunun rastgele değerlendirilmesi yapıldığında Rotenon ve H₂O₂ uygulamaları (pozitif kontrol) DNA hasarında internal negatif kontrol gruplarına kıyasla artışa sebep olmuştur (Tablo 1). DNA hasarında meydana gelen bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığının tespiti için saat ve doz uygulamaları tek - yönlü ANOVA ile karşılaştırılmış ve bazı anlamlı sonuçlar elde edilmiştir.

Pozitif kontrol grupları beklendiği gibi aynı inkübasyon süresine sahip gruplardan anlamlı şekilde yüksek DNA hasarına sebep olmuştur ($p<0,05$). Rotenon uygulamaları ise inkübasyon saatine ve doza bağlı olarak farklı sonuçlar ortaya koymuştur. Sırası ile 10 ve 50 μM doz ile 1 s inkübasyon uygulanan grup 7 ve 8 internal negatif kontrol grubuna (grup 1) kıyasla DNA hasarında artışa sebep olmuş ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Benzer şekilde sırası ile 10 ve 50 μM doz ile 2 s inkübasyon uygulanan grup 10 ve 11 internal negatif kontrol grubuna (grup 2) kıyasla DNA hasarında artışa sebep olmuş ancak bu artış da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Bunun aksine 100 μM doz ile 1 veya 2 s inkübasyon uygulanan grup 9 ve 12, internal negatif kontrol gruplarına kıyasla (sırası ile grup 1 ve 2) DNA hasarında anlamlı artışa sebep olmuştur ($p<0,05$). 10, 50 veya 100 μM dozlar ile 4 s Rotenon uygulanan grup 13, 14 ve 15'de ise internal negatif kontrol grubuna (grup 3) kıyasla anlamlı seviyede DNA hasarı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Hasar grup 13 ve 14'de benzer seviyede iken grup 15'de bu gruplara kıyasla daha yüksektir. Ancak grup 15'de, grup 13 ve 14'e kıyasla meydana gelen bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$). Benzer şekilde 1 ve 2 s inkübasyon sürelerinde de Rotenon uygulama dozu arttıkça DNA hasarlarında artış meydana geldiği ancak bu artışların anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0,05$).

Buna göre Rotenon maruziyeti kısa süreli ve düşük dozlarda olduğunda DNA hasarında artış olmakla birlikte bu artış anlamlı değildir. Doz yükseldikçe kısa maruziyet sürelerinde de anlamlı seviyede DNA hasarı oluşmaktadır. Uzun süreli Rotenon maruziyetinde ise doz bağımsız şekilde anlamlı seviyede DNA hasarı görülmektedir.

Tablo 1. Ortalama kuyruk DNA yüzdesi (DNA hasarı) değerleri

| Grup | Uygulama | Uygulama Süresi (Saat) | Doz | Kuyruk DNA Yüzdesi (Ortalama \pm Standart Hata) |
|------|--|------------------------|-------------------|---|
| 1 | Yok (Negatif Kontrol) | 1 | - | 2,14 \pm 0,11 |
| 2 | | 2 | - | 2,61 \pm 0,13 |
| 3 | | 4 | - | 2,79 \pm 0,14 |
| 4 | H ₂ O ₂ (Pozitif Kontrol) | 1 | 100 μM | 45,30 \pm 1,29 * |
| 5 | | 2 | 100 μM | 44,36 \pm 1,30 ** |
| 6 | | 4 | 100 μM | 41,77 \pm 1,35 *** |
| 7 | Rotenon | 1 | 10 μM | 3,68 \pm 0,38 |
| 8 | | 1 | 50 μM | 4,62 \pm 0,32 |
| 9 | | 1 | 100 μM | 6,22 \pm 0,46 # |
| 10 | | 2 | 10 μM | 4,32 \pm 0,35 |
| 11 | | 2 | 50 μM | 4,68 \pm 0,33 |
| 12 | | 2 | 100 μM | 6,36 \pm 0,52 ## |
| 13 | | 4 | 10 μM | 6,43 \pm 0,55 ### |
| 14 | | 4 | 50 μM | 6,43 \pm 0,39 ### |
| 15 | | 4 | 100 μM | 7,94 \pm 0,68 ### |

* Grup 1, 7, 8 ve 9 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$);

** Grup 2, 10, 11 ve 12 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$);

*** Grup 3, 13, 14 ve 15 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$);

Grup 1 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$);

Grup 2 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$);

Grup 3 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$)

4. Tartışma ve Sonuç

Pestisitlere maruz kalan insanlar üzerinde yapılan biyoizleme çalışmaları, maruziyetin genotoksisite ve sitotoksisiteye neden olduğunu göstermektedir [15-17, 25, 26]. Çeşitli pestisitlerin üretiminde çalışan işçilerin periferik kan lenfositlerinde DNA hasarı comet metodu ile kesitsel ve uzamsal olarak değerlendirilmiş ve DNA hasarında artış tespit edilmiştir. Pestisit maruziyeti olmadan geçen 6 ayın ardından, işçilerin DNA hasarının kontrole göre halen yüksek olduğu ancak ilk analize kıyasla önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir [16]. Benzer bir çalışmada tarımsal pestisit maruziyeti ve genotoksik hasar arasındaki ilişki periferik kan örneklerinde comet ve mikronükleus (MN) metotları ile araştırılmıştır. Tebuconazole, 2,4-D veya cyfluthrin'e yüksek oranda maruz kalan kişilerde genotoksik hasar seviyelerinde artış görülmüştür [15]. En az 1 yıl pestisitlere maruz kalan 33 işçinin lenfosit DNA hasarı yine comet metodu ile incelenmiş, işçilerin DNA hasarı, kontrol grubuna göre önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. Bireysel güvenlik önlemlerini uygulayan işçilerde ise DNA hasarının önemli ölçüde daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Pestisitlere maruz kalma süresi ile DNA hasarının derecesi arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır [17]. Araştırmamızda ise Rotenona maruz kalma süresi arttıkça DNA hasarında artışın olduğu tespit edilmiştir. Ancak çalışmamız in vitro olarak yapıldığından araştırılan maruziyet süreleri, işçilerin pestisite maruz kaldığı süreler ile kıyaslanmayacak kadar kısadır. Buradaki çalışmalara benzer birçok araştırma bulunmakla birlikte, birçok pestisit in vivo veya in vitro genotoksik potansiyeli hakkındaki bilgiler oldukça sınırlıdır.

Lenfositler tüm dokularda dolaşan, kolay elde edilebilen, uzun ömürlü, in vitro DNA hasarını tespit etmede sıklıkla kullanılan hücrelerdir [27, 28]. Çalışmamızda olduğu gibi lenfositlere in vitro pestisit uygulayarak genotoksisiteyi araştıran birçok araştırma olduğu görülmektedir. İnsan lenfositlerinde farklı pestisitlerin DNA'ya olan etkilerinin comet metodu ile incelendiği bir çalışmada, 37°C'de 30 dk süreyle 10, 50, 100 ve 200 µg/mL dozlarında inkübasyon uygulanmış ve önemli genotoksik etkiler gözlenmiştir. 100 ve 200 µg/mL'de dimethoat ve metil parathion; 50, 100 ve 200 µg/mL'de propoksür ve 200 µg/mL'de pirimicarb, cypermethrin ve permethrinin, DNA hasarını önemli ölçüde arttırmıştır [29]. İnsan lenfositlerinde α-cypermethrin pestisitinin genotoksisitesi, kardeş kromatid değişimi (SCE), kromozomal aberasyon (CA) ve mikronükleus (MN) testleri ile in vitro olarak incelenmiştir. İnsan lenfositleri, 24 ve 48 s boyunca 5, 10, 15 ve 20 µg/mL α-cypermethrin ile muamele edilmiştir. Tüm konsantrasyon ve sürelerde SCE ve CA'da artış gözlemlenirken MN sıklığı 5 ve 10 µg/mL dozlarında artış göstermiştir. Benzer şekilde proliferasyon indeksi, mitotik indeks ve nükleer bölünme indeksinde önemli ölçüde azalma görülmüştür [30].

Rotenon'un ise merkezi sinir sistemi hücrelerinde meydana getirdiği hasar detaylı olarak araştırılmıştır [31-33]. Örneğin Rotenon'un sıçan glioma hücrelerinden türetilen hücreler olan C6 hücrelerinde etkisi 4 s inkübasyon ve 0,1, 1 ve 10 µM dozlarında araştırılmıştır. Rotenon hücre sağ kalımının azalmasına, serbest radikal oluşumuna ve sonuçta DNA hasarında artışa neden olmuştur [34]. Buna rağmen Rotenon'un lenfositlerde doz ve/veya zamana bağlı etkilerini ortaya koyan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Rotenon'un, beyinde lipid peroksidasyonunu arttırdığı farklı organlarda ve lökositlerde DNA hasarında artışa neden olduğu bildirilmiştir [35]. Bir metabolik aktivatör varlığında ve yokluğunda insan lenfosit kültürlerinde Rotenon'un farklı dozlarda (0,1, 0,25, 0,50, 1 µg/ml) genotoksisitesi değerlendirilmiştir. Rotenon'un MN sıklığını arttırdığı ve hücre döngüsünü durdurucu etkiye neden olduğu ancak CA ve SCE sıklığını arttırmadığı bildirilmiştir [36]. Bir diğer çalışmada Rotenon'un, comet ve CA metotları ile farklı hücre döngüsü aşamalarında yer alan hücrelerdeki genotoksik ve klastojenik etkileri değerlendirilmiştir. Kültürleşmiş insan lenfositleri, hücre döngüsünün G1, G1/S, S (1 ve 6s) ve G2 fazları sırasında 1, 1,5 ve 2 µg/mL Rotenon ile muamele edilmiştir. Rotenon'un klastojenik etkiye ve DNA hasarına neden olduğu bildirilmiştir [10]. Rotenon'un, nükleer DNA'nın yanı sıra mitokondriyal DNA'ya hasar verdiği de bildirilmiştir [37].

Bu araştırmadaki veriler, literatürdeki bulguları desteklemekle birlikte farklı doz/zaman ve hücre döngüsünden bağımsız sürelerin seçilmesi nedeniyle farklılık göstermektedir. Bu çalışma, Rotenon'un doz ve zamana bağlı olarak lenfositlerde meydana getirdiği DNA hasarını ortaya koymaktadır. 10 ve 50 µM Rotenon ile 1 s ve 2 s inkübasyon uygulanan grup, kontrol grubuna kıyasla DNA hasarında artışa sebep olmuş ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 100 µM doz ile 1 ve 2 s inkübasyon uygulanan grup kontrol gruplarına kıyasla DNA hasarında anlamlı artışa sebep olmuştur. Hem doz hem de süre arttıkça DNA seviyesinde artış gözlenmekle birlikte anlamlı düzeyde artışın süre bağımlı olması Rotenon maruziyet süresinin önemini ortaya koymaktadır. 10, 50 ve 100 µM dozlar ile 4 s Rotenon uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla anlamlı seviyede DNA hasarı tespit

edilmiştir. Verilerimiz maruziyet süresi arttıkça düşük dozların da anlamlı düzeyde DNA hasarına neden olduğunu ortaya koymaktadır.

In vitro ve in situ çalışmalar, Rotenon maruziyetinin genotoksisiteye sebep olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada da Rotenon'un doza ve zamana bağlı olarak lenfositlerde DNA hasarına neden olduğu ortaya konulmuş ancak bu hasarın moleküler temeli araştırılmamıştır. Genotoksisitenin engellenmesi için Rotenon'un etki mekanizmalarını ortaya koyacak detaylı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Etik Beyanı

Bu çalışmada, "Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi" kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin "Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler" başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.

Kaynakça

- [1] Koureas M, Tsezou A, Tsakalof A, Orfanidou T, Hadjichristodoulou C. Increased levels of oxidative DNA damage in pesticide sprayers in Thessaly Region (Greece). Implications of pesticide exposure. *Science of the Total Environment*. 2014;496:358-64.
- [2] Mokarizadeh A, Faryabi MR, Rezvanfar MA, Abdollahi M. A comprehensive review of pesticides and the immune dysregulation: mechanisms, evidence and consequences. *Toxicology mechanisms and methods*. 2015;25(4):258-78.
- [3] Lee G-H, Choi K-C. Adverse effects of pesticides on the functions of immune system. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2020;235:108789.
- [4] Isman MB. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*. 2006;51:45-66.
- [5] Ramalingam M, Huh Y-J, Lee Y-I. The impairments of α -synuclein and mechanistic target of rapamycin in rotenone-induced SH-SY5Y cells and mice model of Parkinson's disease. *Frontiers in neuroscience*. 2019;13:1028.
- [6] Fitzmaurice AG, Bronstein JM. Pesticides and Parkinson's disease (Chapter) in: *Pesticides in The Modern World—Effects of Pesticides Exposure*. 2011:307. IntechOpen; London
- [7] Duty S, Jenner P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *British journal of pharmacology*. 2011;164(4):1357-91.
- [8] Kitamura Y, Inden M, Miyamura A, Kakimura J-i, Taniguchi T, Shimohama S. Possible involvement of both mitochondria-and endoplasmic reticulum-dependent caspase pathways in rotenone-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuroscience letters*. 2002;333(1):25-8.
- [9] Janelle D-O, Francesca C. Pesticides and Parkinson's disease (Chapter) in: *Pesticides - The Impacts Of Pesticide Exposure*. 2011:103. IntechOpen; London
- [10] de Lima PDL, Yamada ES, da Costa ET, Pessoa CdO, Rabenhorst S, Bahia MdO, et al. Genotoxic effects of rotenone on cultured lymphocytes. *Genetics and Molecular Research*. 2005;4(4):822-31.
- [11] Yarmohammadi F, Wallace Hayes A, Najafi N, Karimi G. The protective effect of natural compounds against rotenone-induced neurotoxicity. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2020;34(12):e22605.
- [12] Franco R, Li S, Rodriguez-Rocha H, Burns M, Panayiotidis MI. Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease. *Chemico-biological interactions*. 2010;188(2):289-300.
- [13] Toğay VA, Baş FY, Çelik DA, Özçelik N, Türel GY, Calapoğlu M, et al. Increased DNA Damage of Radiology Personnel Chronically Exposed to Low Levels of Ionizing Radiations. *Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2020;11(2):212-6.
- [14] Bolognesi C, Holland N. The use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for monitoring pesticide-exposed populations. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2016;770:183-203.

- [15] Barrón Cuenca J, Tirado N, Barral J, Ali I, Levi M, Stenius U, et al. Increased levels of genotoxic damage in a Bolivian agricultural population exposed to mixtures of pesticides. *Science of The Total Environment*. 2019;695:133942.
- [16] Garaj-Vrhovac V, Zeljezic D. Evaluation of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides using single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay: Pesticide genotoxicity revealed by comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2000;469(2):279-85.
- [17] Ündeğer Ü, Başaran N. Assessment of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures by the alkaline comet assay. *Archives of Toxicology*. 2002;76(7):430-6.
- [18] Celik DA, Togay VA, Turel GY, Tuluçeoğlu EE, Kosar PA. DNA Damages of Widely Used Pesticides; A Comet Assay Report for Chlorothalonil and Glyphosate Potassium Salt. *Fresenius Environmental Bulletin*. 2021;30(4 A):4170-6.
- [19] Yavuz Türel G, Toğay VA, Aşçı Çelik D. Genotoxicity of thiacloprid in zebrafish liver. *Archives of Environmental & Occupational Health*. 2022:1-6. DOI: 10.1080/19338244.2022.2118212
- [20] Aşçı Çelik D, Toğay VA, Karabacak P. DNA damage assessment in pneumonia patients treated in the intensive care unit. *Biologia*. 2022;(77): 1909 - 1913.
- [21] Karabacak P, Toğay VA, Çelik DA. Lymphocyte DNA damage in sepsis and septic-shock intensive-care patients: Damage is greater in non-intubated patients. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2022;879:503516.
- [22] OECD. Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay. OECD Publishing; Paris: 2016.
- [23] Gyori BM, Venkatachalam G, Thiagarajan P, Hsu D, Clement M-V. OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. *Redox biology*. 2014;2:457-65.
- [24] IBM. SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. IBM Corp, Armonk, NY: 2012.
- [25] Rupa D, Reddy P, Reddi O. Analysis of sister-chromatid exchanges, cell kinetics and mitotic index in lymphocytes of smoking pesticide sprayers. *Mutation Research/Genetic Toxicology*. 1989;223(2):253-8.
- [26] Au WW, Sierra-Torres CH, Cajas-Salazar N, Shipp BK, Legator MS. Cytogenetic effects from exposure to mixed pesticides and the influence from genetic susceptibility. *Environmental health perspectives*. 1999;107(6):501-5.
- [27] Lerda D, Bistoni MB, Peralta N, Ychari S, Vazquez M, Bosio G. Fumonisin in foods from Cordoba (Argentina), presence and genotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*. 2005;43(5):691-8.
- [28] Çelik DA, Toğay VA, Türel GY, Özçelik N. Gıda Katkı Maddesi Olarak Kullanılan Sitrik Asit, Askorbik Asit Ve Sodyum Sitratin İnsan Lenfosit Hücrelerinde Genotoksitesininin Değerlendirilmesi. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*. 2022;29(3):486-92.
- [29] Ündeğer Ü, Başaran N. Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes in vitro: induction of DNA damage. *Archives of Toxicology*. 2005;79(3):169-76.
- [30] Kocaman AY, Topaktaş M. The in vitro genotoxic effects of a commercial formulation of α -cypermethrin in human peripheral blood lymphocytes. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2009;50(1):27-36.
- [31] Alzahrani S, Ezzat W, Elshaer R, Abd El-Lateef A, Mohammad H, Elkazaz A, et al. Standardized Tribulus terrestris extract protects against rotenone-induced oxidative damage and nigral dopamine neuronal loss in mice. *J Physiol Pharmacol*. 2018;69(6):979-94.
- [32] El-Shamarka MEA, Hussein AMS, N. Sayed O, S Said E, Mwaheb MA. Spirulina Ameliorates Oxidative Damage and Inflammation in Rotenone-Induced Neurotoxicity in Male Mice. *International Journal of Medical Toxicology and Forensic Medicine*. 2022;12(1):35583.
- [33] Sun Z, Xue L, Li Y, Cui G, Sun R, Hu M, et al. Rotenone-induced necrosis in insect cells via the cytoplasmic membrane damage and mitochondrial dysfunction. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2021;173:104801.
- [34] Swarnkar S, Singh S, Goswami P, Mathur R, Patro IK, Nath C. Astrocyte Activation: A Key Step in Rotenone Induced Cytotoxicity and DNA Damage. *Neurochemical Research*. 2012;37(10):2178-89.

- [35] Kurpik M, Zalewski P, Kujawska M, Ewertowska M, Ignatowicz E, Cielecka-Piontek J, et al. Can Cranberry Juice Protect against Rotenone-Induced Toxicity in Rats? *Nutrients*. 2021;13(4):1050.
- [36] Guadaño A, González-Coloma A, de la Peña E. Genotoxicity of the insecticide rotenone in cultured human lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 1998;414(1):1-7.
- [37] Syromyatnikov MY, Gureev AP, Starkova NN, Savinkova OV, Starkov AA, Lopatin AV, et al. Method for detection of mtDNA damages for evaluating of pesticides toxicity for bumblebees (*Bombus terrestris* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2020;169:104675. DOI:10.1016/j.pestbp.2020.104675.