

173942

**PIRIDİNİN *Allium cepa* KÖK  
HÜCRELERİNİN MITOTİK İNDEKS VE  
KROMOZOMLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

**Sevim Gökbayrak  
Yüksek Lisans Tezi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Ağustos 2003**

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Sevim Gökbayrak'ın 'Piridinin *Allium cepa* Kök Hücrelerinin Mitotik İndeks ve Kromozomları Üzerine Etkisi' başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 11.09.2023 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Yard.Doç.Dr. Hülya Zeytinoğlu	
Üye	: Yard.Doç.Dr. Berrin Tüylü	
Üye	: Yard.Doç.Dr. Mediha Canbek	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 11.09.2023... tarih ve ...29/1... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü  
Prof. Dr. Ömer ÖZER  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
M ü d ü r ü

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### PIRIDİNİN *Allium cepa* KÖK HÜCRELERİNİN MITOTİK İNDEKS VE KROMOZOMLARI ÜZERİNE ETKİSİ

SEVİM GÖKBAYRAK

Anadolu Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yard.Doç.Dr. Hülya Zeytinoğlu  
2003, 44 sayfa

Bu tezde Piridin *Allium cepa* kök hücreleri üzerine olan etkileri incelenmiştir. Piridin, yanıcı pis kokulu, renkli bir bileşiktir. Günümüz teknolojisinde, çözücü olarak, ilaç, vitamin, pestisit, herbisit, insektisit yapımında, yiyeceklerde tat verici olarak, boya ve lastik sanayiide yaygın kullanılmaktadır. Bu çalışmada, piridin *Allium cepa* kök hücreleri üzerine olan etkileri incelenirken, genotoksikite belirlenmesinde, c-metafaz, yapışkanlık, kromozom köprüsü, bozulmuş metafaz-anafaz, binükleer hücre, mikro çekirdek, mitotik indeks değerlerine bakılmıştır. Sonuçta yüksek dozlarda *Allium cepa* kök hücrelerinde mitotik aktivitenin oldukça azaldığı, kromozom anomalilerinin arttığı gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Piridin, Genotoksik etki, Mitotik İndeks, *Allium Test*.

**ABSTRACT****Master of Science Thesis****THE EFFECTS OF PYRIDINE ON MITOTIC INDEX AND  
CHROMOSOMES OF *Allium cepa* ROOT MERISTEM CELLS****SEVİM GÖKBAYRAK****Anadolu University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Biology Program****Advisor: Assistant Professor Hülya Zeytinoglu  
2003, 44 pages**

In this work, some effects of pyridine on the root tip cells were investigated. Pyridine is a flammable, colorless liquid with an unpleasant smelling. Pyridine is used as a solvent and to make many different products such as medicines, vitamins pesticides, herbicides, paints, dyes, rubber products, adhesives and food flavorings. For assessing genotoxic effects of pyridine; c-metaphase, stickiness, chromosome bridge, disturbed metaphase-anaphase, binucleate cells, micro nuclei and mitotic index were used as endpoints of genotoxicity. Thus, if it is excess doses, it prevents the mitotic activity on the root tip cells of onion plant, it depending on increase in concentration, importantly it suppressed mitotic division and induced some chromosomal abnormalities.

**Keywords:** Pyridine, Genotoxic effect, Mitotic index, *Allium* test.

## TEŞEKKÜR

Bu tez alıőması esnasında beni yönlendiren, benden ilgi ve yardımlarını esirgemeyen ,bana karşı her zaman sabırla yaklaşan danışman hocalarım Prof.Dr. Muhsin KONUK, Yard.Doç.Dr. Hülya ZEYTİNOĞLU, dayılarım Yard.Doç.Dr Halil BERBER ve Yard.Doç.Dr Hüseyin BERBER'e, her zaman manevi desteğini hissettiğim eőim Serhat GÖKBAYRAK' a çok teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
GRAFİKLER DİZİNİ.....	viii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1 Piridin Nedir?.....	2
1.2. Piridinin Kullanıldığı Alanlar.....	4
1.3. Piridinin Biyolojik Etkileri.....	4
1.4. Amaç.....	7
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>8</b>
2.1. Materyal.....	8
2.2. Metod.....	8
2.2.1 Kök Uçlarının Eldesi.....	8
2.2.2. Preparatların Yapılışı.....	9
2.2.2.1. Asetokarmin Boyasının Hazırlanışı.....	9
2.2.2.2. Asetokarmin Boyama Yöntemi İle Preparatın Yapılışı.....	9
2.2.3. Morfolojik İnceleme.....	10
2.2.4. Mitotik İndeksin Belirlenmesi.....	10
2.2.5. Mitoz ve Kromozom Anomalilerinin Belirlenmesi.....	10
2.2.6. İstatistiksel Değerlendirme.....	11
<b>3. BULGULAR.....</b>	<b>12</b>
3.1. Sitolojik Gözlemler.....	15
3.1.1. Saf Suda Hazırlanan Hazırlanan Kök Uçlarının Sitolojik	

	<u>Sayfa</u>
Özelliği.....	15
3.1.2. 0.01'lik Sodyum Azid'de Hazırlanan Kök Uçlarının Sitolojik Özelliği.....	17
3.1.3. 125 ppm'lik Piridin Çözeltelerinden Hazırlanan Kök Uçlarının Sitolojik Özelliği.....	23
3.1.4. 250 ppm'lik Piridin Çözeltelerinden Hazırlanan Kök Uçlarının Sitolojik Özelliği.....	27
3.1.5. 500 ppm'lik Piridin Çözeltelerinden Hazırlanan Kök Uçlarının Sitolojik Özelliği.....	31
3.1.6. 1000 ppm'lik Piridin Çözeltelerinden Hazırlanan Kök Uçlarının Sitolojik Özelliği.....	33
3.1.7. 2000 ppm'lik Piridin Çözeltelerinden Hazırlanan Kök Uçlarının Sitolojik Özelliği.....	36
<b>4. TARTIŞMA.....</b>	<b>39</b>
<b>5. KAYNAKLAR.....</b>	<b>41</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
3.1. 15. günün sonunda soğan köklerinin çimlenme durumları.....	14
3.2. Saf suda Çimlendirilen kök uçlarında mitolojik evreleri (x20'lik büyütme).....	15
3.3 ve 3.4. Sodyum Azid'de Çimlendirilen Kök Uçlarında Yapışkanlık (x20 ve x40'lık Büyütme).....	18
3.5 ve 3.6. Sodyum Azid'de Çimlendirilen Kök Uçlarında Yapışkanlık ve C-Mitozis (x20 ve x40'lık Büyütme)....	19
3.7 ve 3.8. Sodyum Azid'de Çimlendirilen Kök Uçlarında Mikro Çekirdek (x40'lık büyütme).....	20
3.9 ve 3.10. Sodyum Azid' de Çimlendirilen Kök Uçlarında İleri Giden Kromozom ve Bozulmuş Anafaz-Telofaz (x40'lık Büyütme).....	21
3.11 ve 3.12. Sodyum Azid'de Çimlendirilen Kök Uçlarında Şekilleri Bozulmuş Çekirdekler (x20 ve x40'lık Büyütme).....	22
3.13 ve 3.14. 125 ppm'lik Piridin Çözeltilerinde Çimlenen Kök Uçlarında Bozulmuş Anafaz-Telofaz (x20 ve x40'lık Büyütme).....	24
3.15 ve 3.16. 125 ppm'lik Piridin Çözeltilerinde Çimlenen Kök Uçlarında Yapışkanlık (x20 ve x40'lık Büyütme)...	25
3.17 ve 3.18. 125 ppm'lik Piridin Çözeltilerinde Çimlenen Kök Uçlarında Kromozom Köprüsü (x20 ve x40'lık Büyütme).....	26
19 ve 3.20. 250 ppm'lik Piridin Çözeltilerinde Çimlenen Kök Uçlarında Bozulmuş Anafaz-Telofaz (x20 ve x40'lık Büyütme).....	28
3.21 ve 3.22. 250 ppm'lik Piridin Çözeltilerinde Çimlenen Kök Uçlarında C-Metafaz (x20 ve x40'lık Büyütme).....	29

**Sayfa**

3.23 ve 3.24. 250 ppm'lik Piridin Çözeltilerinde Çimlenen Kök Uçlarında Yapışkanlılık (x20 ve x40'lık Büyütme).....	30
3.25. 500 ppm'lik Piridin Çözeltilerinde Çimlenen Kök Ucu Hücreleri (x40'lık Büyütme).....	31
3.26 ve 3.27. 500 ppm'lik Piridin Çözeltilerinde Çimlenen Kök Ucu Hücreleri (x20'lik Büyütme).....	32
3.28. 1000 ppm'lik Piridin Çözeltilerinde Çimlenen Kök Ucu Hücrelerinde Mikro çekirdek (mç) (x20'lik Büyütme) .....	33
3.29 ve 3.30. 1000 ppm'lik Piridin Çözeltilerinde Çimlenen Kök Ucu Hücrelerinde Çekirdek Deformasyonu (x40 ve x20'lik Büyütme).....	34
3.31 ve 3.32. 1000 ppm'lik Piridin Çözeltilerinde Çimlenen Kök Ucu Hücreleri (x20'lik büyütme).....	35
3.33 ve 3.34. 2000 ppm'lik Piridin Çözeltilerinde Çimlenen Kök Ucu Hücrelerinde Binükleer Hücre (bnh) ve Çekirdek Deformasyonu (x20'lik büyütme).....	37
3.35 ve 3.36. 2000 ppm'lik Piridin Çözeltilerinde Çimlenen Kök Ucu Hücrelerinde Mikro çekirdek (mç) ve Binükleer hücre (bnh) (x20'lik Büyütme).....	38

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

	<u>Sayfa</u>
3. 1. 15 Gün Sonunda Ölçülen Kök Uzunlukları.....	12
3.2. <i>Allium Cepa</i> da Piridin Tarafından İndüklenen Kromozom Aberasyon oranı ve MI .....	16

**GRAFİKLER DİZİNİ**

	<u>Sayfa</u>
3.1. Piridin Konsantrasyonlarının Kök Uçları Uzunluğu Üzerine Olan Etkisi.....	13

## 1. GİRİŞ

İnsanoğlu ekosistemin bir parçasıdır. Bu nedenle ekosistemin sağlığı insan sağlığı ile uyumludur. Günüümüzün en önemli problemlerinden olan çevre kirliliği çeşitli yönlerden yaşam kalitesini etkilediği gibi yaşam süresini ve dolayısıyla insan sağlığını da tehdit eder hale gelmiştir. Çeşitli bölgelerden kaynaklanan atık sular, tarımsal ilaçlar, nükleer enerji santralleri, otomobillerden çıkan dumanlar, çöp toplama ve yakılma merkezlerinden çıkan çeşitli gazlar başlıca kirleticici kaynakları oluşturmaktadır (Gopalan 1999 ve http-1).

Herhangi kimyasal bir madde, endüstriyel tesis gibi büyük bir alandan çevreye yayılabilir. Böyle bir kimyasal yayılma sonucunda, bulunan çevre içerisinde, bu kimyasalı içeren maddelerin solunması, yenilmesi veya deriye teması sonucu çeşitli reaksiyonlar oluşabilir. Örneđin; piridin; piridin üreten veya piridini başka bir madde üretmek için kullanan fabrikaların içinde ve çevresinde görölmektedir. Eđer bu tür fabrikaların birisinde çalışılıyor veya bu tür maddeyi yayan tehlikeli atıkların yakınında bulunuluyor ya da çalışılıyorsa piridine maruz kalınılabılır (http-2).

Çevresel kirleticilerin genotoksisite ve sitotoksisite tespitinde çok duyarlı olan bitki biyodeneşleri, yaşamın temel elementleri olan toprak, su, ve hava içerisindeki çevresel tehlikelerin varlığını tespit etmede ilk sinyal olarak hizmet verebilir. Yüksek yapılı bitkiler; su, toprak ve havadaki kirleticilerin mutajenik ve sitogenetik araştırmaları için mükemmeldir ve *in situ* incelemeler için eşsiz bir avantaj sağlar (Gopalan 1999).

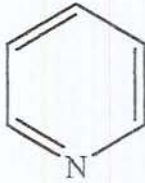
Bitkisel test sistemleri ilk kez 1930'lu yılların başında iyonize radyasyonun mutajenik etkilerinin çalışmalarında kullanılmıştır. 1970'li yıllardan itibaren de çevresel etkilerle oluşturulan mutajenik özelliklerin ve genotoksisitenin belirlenmesinde Royal Swedish Academy of Sciences, Comitte 17 of Environmental Organization ve National Swedish Environmental Protection Board 1989 tarafından hassas ve etkili bir test sistemi oldukları kabul edilmiştir (http-1).

Test bitkisi olarak bitkiler arasında *Allium cepa*, *Crepis capillaris*, *Hordeum vulgare*, *Pisum sativum*, *Tradescantia sp.*, *Vicia faba*, *Zea mays*,

*Lycopersicum aesculentum* ve *Arabidopsis thaliana* sayılabilir. Bütün bu bitkiler test bitkisi olarak kullanılsa da potansiyel olarak mutajenik etkilerin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan 3 tane test sistemi vardır. Bunlar; *Tradescantia mikronukleus*, *Tradescantia stamen hair* mutasyon ve *Allium cepa* root meristem testleridir (http-1).

Bütün bu çalışmalarda, bitkisel test sistemlerinin yaygın bir şekilde kullanılmasının amacı; kimyasal maddelerin mutajen olup olmadığının ve kromozom hasarı oluşturup oluşturmadığının belirlenmesinde oldukça hızlı sonuç vermesi, etkili, güvenilir ve ekonomik olması ve elde edilen sonuçların memeli hücreleri ve bakterilerle yapılan testlerle de uyum içinde olmasıdır (Gopalan 1999; http-1; http-2; Marco ve ark. 1996; Fiskesjö 1988; Fiskesjö 1985).

### 1.1 Piridin Nedir?



Piridin

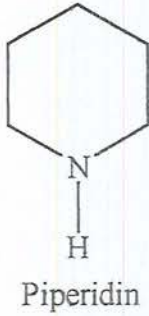
Piridin; e.n,  $-42^{\circ}\text{C}$  ve k.n,  $115^{\circ}\text{C}$  olan heterosiklik aromatik bir bileşiktir. Pis ve karakteristik bir kokusu vardır. Su ile her oranda karışır ve bir çok organik bileşik için, iyi bir çözücüdür.

İlk defa 1851' de kemik yağından ve daha sonra 1954'te taş kömürü katranından izole edilmiştir. Taş kömürü katranı % 0.1 den daha az piridin içermesine rağmen 1950'ye kadar piridin için tek kaynaktı. Katrandan izole edilmesi zayıf bir baz oluşuna ve asitlerle piridinyum tuzları oluşturmasına dayanır. Aromatik karakteri belirgindir (Ün 1977 ve İkizler 1985).



## 1.2. Piridin'in Kullanıldığı Alanlar

Piridin; alkolün denaturasyonunda, boya ve lastiğin hazırlanmasında çözücü olarak kullanılır. Şu anda üretilen piridin'in yarısı fungusit, herbisit ve insektisitlerin üretiminde ara madde olarak kullanılır. Hemen hemen piridin'in % 20'si piperidin üretiminde kullanılır. Piperidin lastiğin sertleştirilmesinde ve tarımda kimyasalların hazırlanmasında önemli bir ticari değere sahiptir. Piridin, ilaç (antihistaminler, steroidler, antibiyotikler), vitamin, boya ve polikarbonat resinlerin yapımında aracı olarak ve yiyeceklerde tat verici olarak kullanılır (http-2; http-4; Kaiser ve ark. 1996).



## 1.3. Piridin'in Biyolojik Etkileri

Piridin'in insan sağlığı üzerindeki olası etkilerini belirlemek için bazı çalışmalar yapılmıştır. İnsanlar üzerindeki raporlar ve hayvanlar üzerindeki çalışmalara dayanarak, piridine maruz kalındığında ortaya çıkan en önemli sağlık sorununun karaciğer üzerine olduğu bulunmuştur. Diğer etkiler ise nörolojik ve böbreklerle ilgilidir. Hepatik etkiler, piridine maruz kalındığında sağlık açısından kaygı verecek en büyük potansiyele sahiptir. Piridine maruz kalındığında insan üzerinde oluşacak hepatik etkilerle ilgili açık bir kanıt yoktur. Ancak fareler üzerine yapılan çalışmalar sonucunda; karaciğer ağırlığında artış, ağırlı hepatik lezyonlar, safra kanalı hücrelerinin bölünmesinde artış ve çok büyük vakuollü hepatositler bulunmuştur (Anderson 1987).

İnsanların piridine maruz kalındığında renal etkilerin ortaya çıkabileceği konusunda herhangi bir bilgi yoktur. Erkek farelere 4 ay boyunca uygulanan

uygulanan piridin sitrat çalışmasından sonra renal tüp epitelinde dejenerasyon gözlenmiştir (Baxter 1948; Baxter ve Mason 1947; Coulson ve Brazda 1948). Eldeki mevcut verilerden, piridine maruz kalınmasıyla insanda renal etkilerin ortaya çıkmasına işaret etmektedir.

Herhangi bir yolla piridine maruz kalan insanlar ve hayvanlar üzerinde ortaya çıkabilecek nörolojik etkileri gösteren birkaç çalışma vardır. Piridin merkezi sinir sistemi depressantıdır. Hasta olmayan erkekler üzerindeki piridin nörolojik etkileri Pollock (1943) ve Neff (1986) tarafından tespit edilmiştir. Yavaş ve karışık şekilde konuşma, yavaş refleksler ve uyuşukluk hali, piridin ve diğer ilaçları alan epilepsi hastalarında gözlenmiştir. Sağlıklı yetişkin kişilerin, kaza sonucu bilinmeyen miktarda piridin buharına maruz kalmasıyla; geçici baş ağrıları, baş dönmesi, uyuma isteği, nabzın ve solunumun artması gibi semptomların ortaya çıktığı tespit edilmiştir (Neff 1986). Günde 50 mg/kg ' a kadar 90 gün boyunca piridine maruz kalan farelerin beyinde herhangi bir morfolojik etki görülmemiştir (Anderson 1987). Ancak piridin alan bütün erkek fare guruplarında uykusuzluk ve yorgunluk hali olduğu gözlenmiştir. Bu etkiler dişi farelerde gözlenmemiştir. 3 ay boyunca günde 380 mg/kg' a kadar piridini suyla alan farelerde beyin seçilen bölgelerinde lipid peroksidasyonu gözlemlenmiştir. Araştırmacı bu lipid peroksidasyonunun bölgesel olarak nörotoksitesiye sahip olabileceğini öngörmektedir.

Gelişme ile ilgili olarak civcivler üzerinde yapılan deneyde; yumurtalara yüksek miktarda piridin (10-20 mg/yumurta) enjekte edilmesi sonucu normal olmayan civciv gelişimi ortaya çıkmıştır. Düşük doz seviyelerinde bu oran % 15 , yüksek dozda ise % 67 çıkmaktadır. Buna ek olarak yüksek doz kullanan yumurtalarda % 4.9 oranındaki civcivler hatalı gagalara sahipken, % 1.1' i ise kısa ve eğri boyunlara sahiptir (http-2).

F344/N sıçanlarında 13 haftalık çalışma yapılmış, buna göre; 10 erkek ve 10 dişi keme 0, 50, 100, 250, 500 ya da 1000 ppm'lik içme sularına maruz bırakılmıştır. 1000 ppm'e maruz kalan 2 dişi 1. haftada ölmüştür. Sonuçta, 1000 ppm' e maruz kalan erkek ve dişiler ile 500 ppm'e maruz kalan dişilerin vücut ağırlıkları, kontrollere göre oldukça azalmış olduğu görülmüştür. 1000 ppm'e maruz kalan dişi sıçanlarda su tüketimi kontrollerden daha az olmuştur. Çalışma

sonucunda tüm guruplardaki dişi sıçanların hepsi, erkek kemelerin 1000 ve 500 ppm'e maruz kalanlarında anemi görülmüştür. 250 ppm ve üzerine maruz kalan erkek ve dişilerin karaciğer ağırlığı kontrolden oldukça fazladır. Bu hayvanların karaciğerlerinde sentrilobular dejenerasyon, hipertrofi, kronik inflamasyon ve pigmentasyon, genel olarak kontrol gurubuna paralel bulunmuştur. Böbreklerde; 500 ppm de daha yavaş, 1000 ppm de daha hızlı bir artışla, hıyalin dejenerasyonu ve granüler artıklar görülmüştür. Bunlara ilaveten, kronik varyasyonlar ve protein atıklarının şiddetinde artışa rastlanmıştır (http-4).

Piridin (100-10 000 µg /plate), *S. typhimurium* un TA98, TA100, TA1535 yada TA1537 strainlerinde S9 lu ve S9 suz deneylerde mutajenik bulunmamıştır (Haworth ve ark. 1983). Daha sonraları, L51784 fare lenfosit hücrelerinde, mutasyon frekansında etkili bir artış gözlenmemiştir (Mc Gregar ve ark. 1988). Sitogenetik testlerde CHO (Chinese hamster ovary) hücreleri S9'lu ve S9'suz olarak kültür edilmiştir. Sonuçta piridinin SCEs indüklediği görülmüştür En yüksek doz olarak 1.673 µg / ml SCE indüksiyonu için test edilmiş (S9 yokluğunda) ve piridinin hücrelerde hücre siklusunu geciktirdiği gözlenmiştir. Bu çalışmada en geniş kültür zamanı olarak 31 saat uygulanmıştır (http-4).

Piridin, 3 farklı gende, *D. melanogaster* yetişkin erkeklerinde SLRL (sex-linked ressesive lethal) mutasyonunu indükleyip indüklediği araştırılmış ve karışık sonuçlar elde edilmiştir (Mason ve ark 1992). İlk denemede % 0.7 tuz solüsyonunda 7000 ppm piridin enjeksiyonu sonucunda negatif sonuç elde edilmiştir (p=0.225). Ancak % 5 sükröz solüsyonunda 600 ve 700 ppm piridin ile besleme sonucunda resesif lokal mutasyonda bir artış gözlenmiştir (p=0.043). İkinci deneme ise hem enjeksiyon (500 ppm) hem de besleme (729 ppm) sonucunda negatif sonuç elde edilmiştir (Fouremant ve ark. 1994). Üçüncü denemede (Mason ve ark. 1992), besleme uygulamaları (500 ppm) sonucu negatif çıkmış (p=0.998), ancak enjeksiyon sonucunda (4300 ppm) SLRL mutasyon frekansında önemli bir artış gözlenmiştir (p=0.008). Bütün bunlar düşünüldüğünde, piridin SLRL testinde; besleme söz konusu olduğunda negatif, enjeksiyon söz konusu olduğunda ise Mason'un 4300 ppm lik denemesinde pozitif bulunmuştur. SLRL test sonuçlarının pozitif olmasından *D. melanogaster* erkek deneklerinin germ hücrelerinde RTs' nin indüksiyonu için bir testin

yapılmasına sebep olmuştur (Mason ve ark. 1992). Bu testin sonucu negatif çıkmıştır.

Kromozomal etkiler için erkek fareler kullanılarak *iv vivo* testler yapılmıştır. 400-600 mg / kg piridinin tek enjeksiyonu ile yapılan 2 örnekte, her ikisinde de kemik iliği hücrelerinde aberasyon indüksiyonu gerçekleşmemiştir, ayrıca 24 saat aralıklarla 3 kez 500 mg / kg a kadar piridin, peritona enjekte edilmiştir ve sonuçta kemik iliği hücrelerinde mikronukleuslu PCEs frekansında bir artışa rastlanmamıştır. Özet olarak tek pozitif sonuç *D. melanogaster* SLRL deneyinde elde edilmiştir. Piridinin mutajenik aktivitesini tayin etmek için yapılan çeşitli *in vitro* ve *in vivo* kromozomal hasar ve gen mutasyon deneylerinde, yalnızca *D. melanogaster* SLRL deneyinde elde edilen tek pozitif sonuç kabul edilmiştir (http-4).

#### 1.4. Amaç

Piridin; endüstriyel ürünlerde, tıpta, çeşitli yiyeceklerde geniş bir alanda kullanıldığı için muhtemel toksik etkileri açısından çalışılmasına gerek vardır. *Allium* testi; soğanların kolayca depolanması, elle tutulabilmesi, köklerin hem mikroskobik parametrelere (c-mitozis, yapışkanlık, kromozom kırılması) hem de makroskobik çalışmalara (kök uzunluğu, şekli, EC50 değeri) elverişli olması sebebi ile aynı zamanda soğan köklerinin büyümesini inhibe eden kimyasalların sebep olduğu toksisite derecesinin ölçülmesinde oldukça duyarlı ve kolay bir metottur. Bu nedenle bu test oldukça geçerli olup birçok laboratuvarında kullanılmaktadır (http-2; Ateeq ve ark. 2002; Fiskesjö 1993; Cabrera ve ark. 1999 ve Gopalan 1999; Kaiser ve ark. 1996, Monarka ve ark. 2000; Te-Hsiu Ma 1999; Rank ve Nielsen 1997; Grover ve Kaur 1999; Abraham 1997; Sahi ve Singh 1996; Gömürgen 2000; Kaymak 1996; Brown ve ark. 2001; http-3).

Çalışmamızda; *Allium cepa* kökleri değişik konsantrasyonlardaki piridine 3 ile 15 gün arasında maruz bırakılarak, piridinin mitotik indeks üzerine etkileri, muhtemel mutajenik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Materyal

Araştırmada model organizma olarak *Allium cepa* L. (Soğan) (2n= 16) kullanılmıştır. Önceden bir kimyasal maddeye maruz kalmamış soğanlar köklendirilmek için seçilmiştir. Soğanların kurumuş dış kabukları ve kurumuş kökleri, kök pirimordiyalarını zedelemekten dikkatlice uzaklaştırılmıştır.

Bu çalışmamızda; test materyali olarak piridin (Sigma), pozitif kontrol için Sodyum azid (Riedel), kontrol için saf su kullanılmıştır. Çalışmalarda piridin'in 5 konsantrasyonu kullanılmış olup bunlar; 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 2000 ppm dir. Sodyum azid; % 0.01 lik konsantrasyonda kullanılmıştır.

### 2.2. Metod

#### 2.2.1 Kök Uçlarının Eldesi

Soğanlar, saf su ile doldurulmuş 50 ml'lik beherlerin ağız kısmına kökleri aşağıya doğru su ile film oluşturacak şekilde yerleştirilmiştir. Beherdeki sular 24 saatte bir değiştirilmiştir. Köklendirme oda ısısında (20-22°C) gerçekleştirilmiştir. Çimlenen kök uçları 1-3 cm ye ulaştıktan sonra, piridin'in her dozu için 6'şar tane kök boyları ve yoğunluğu eşit soğanlar seçilerek 3 ila 15 gün bekletilmek sureti ile muamele (uygulama) görmüşlerdir. Bu süre boyunca test sıvıları 24 saatte bir değiştirilmiştir. Aynı işlem pozitif kontrol (sodyum azid) ve negatif kontrol (saf su) için de gerçekleştirilmiştir.

3 gün (72 saat) uygulama süresi sonunda kök uçları saf su ile yıkandıktan sonra, 1-2 cm boyunda kesildi ve küçük şişeler içerisinde bulunan Farmer (3 kısım alkol, 1 kısım asetik asit) çözeltisinde 24 saat bekletilmek sureti ile tespit (fikse) işlemi yapıldı. Daha sonra küçük şişelerde bulunan % 70'lik alkole alınan materyal gerektiğinde kullanılmak üzere -4 °C de buzdolabında saklandı.

15 gün uygulama süresi sonunda köklerin uzunlukları cm olarak ölçüldü ve soğanların total fotoğrafları çekildi (Elçi 1994; Jones ve Rickards 1992).

## 2.2.2.Preparatların Yapılışı

### 2.2.2.1.Asetokarmin Boyasının Hazırlanışı

Mitoz kromozomlarının özelliklerini incelemek için Asetokarmin boyası kullanıldı. Asetokarmin çok fazla kullanma yeri bulunan bir boyadır. Kromozom morfololisi ve sayımı için kök uçlarında ve embriyonik yaprak ve tomurcuklardaki bitki dokularında elverişli bir şekilde kullanılır. Karmin, homopter'den *Coccusacti*'nin bir ekstresinden hazırlanmıştır. Karminik asit ona aktivitesini veren esas maddedir. Alkali bir çözeltide (karmin boraks) negatif olarak yüklüdür. Böylece, bir asit boya maddesi gibi etki eder. Boya aşağıdaki şekilde hazırlandı (Elçi 1994).

- a) 100 cm<sup>3</sup> %45'lik asetik asit hazırlanıp ve bir cam balona konuldu.
- b) Bu cam balon, bir kapta kaynayan su içine oturtuldu. 10 dakika ısıtılarak %45'lik asetik asidin sıcaklığı kaynayan suyun sıcaklığına ulaştırıldı.
- c) 1 g toz karmin alınarak kaynayan aside yavaşça katıldı. Bir yandan da cam çubuk ile karıştırıldı.
- d) 2 tane paslı çivi kaynayan karışıma ilave edildi. 10 dakika ısıtılmaya devam edildi.
- e) Boya soğuduktan sonra bir kaba aktarıldı. Dipteki tortular atıldı.
- f) 12 saat beklenildikten sonra süzülde ve boyama için elverişli hale getirildi.

### 2.2.2.2. Asetokarmin Boyama Yöntemi İle Preparatın Yapılışı

%70'lik alkolden çıkarılan kök uçları, %45'lik asetik asit içine alındı. Bu çalışmada hidroliz ile boyama birlikte yapıldı. Bunun için kök uçları hızlı bir şekilde kurutma kağıdında kurutulduktan sonra; saat camı içersine alındı. Üzerine bir miktar asetokarmin boyası ve bir iki damla 1 M HCL (yaklaşık 10 hacim boya + 1 hacim HCL) eklendi.

Bek alevi üzerinde boya kaynamaya başlayana dek ısıtıldı. Üzerine bir cam kapatılarak soğuması beklendi. Bu işleme, materyale bağlı olarak birkaç kez

devam edildi. Yeterli boyama sağlandıktan sonra kök uçları, içinde % 45 asetik asit bulunan petri kabı içine alındı. Preparat hazırlanmayacak ise % 80 alkolde saklandı. Preparat bu şekilde yapıldı. Kök uçlarının boyama işlemi tamamlandıktan sonra büyüme meristemlerinin daha koyu boyandığı görüldü. Kök uçlarının, sadece bu kısımları kesilerek lam üzerine alındı ve 1 damla %45 asetik asit içinde jilet ile iyice parçalandı. Üzerine lamel kapatılarak ezme preparatları hazırlandı. Lamellerin etrafı parafin yada tırnak cilası ile etrafı kapatılarak yarı daimi preparat haline getirildi. Bu şekilde hazırlanan preparatlarda mikroskop altında gerekli incelemeler yapıldı.

Her doz uygulaması için Aseto-carmin ile boyanmış 10-20 kök ucundan ezme preparat hazırlandı ve BX50 Olympus Araştırma mikroskopunda incelendi. Her preparatta değişik görüş alanlarındaki hücreler sayılıp değerlendirildi ve fotoğraflar x20 ve x40 objektifte çekildi (Jones ve Rickards 1992).

### 2.2.3. Morfolojik İnceleme

15. günün sonunda, tüm konsantrasyonlar için soğan köklerinin boyları ölçüldü ve morfolojik yapıları için fotoğrafları çekildi.

### 2.2.4. Mitotik İndeksin Belirlenmesi

Mitotik indeks, bölünen hücrelerin incelenen hücrelerin toplam sayısına oranı olarak tespit edildi ve aşağıdaki formülle belirlendi.

$$MI = \frac{\text{Mitotik hücre sayısı}}{\text{Toplam hücre sayısı}} \times 100$$

### 2.2.5. Mitoz ve Kromozom Anomalilerinin Belirlenmesi

Mitoz hücre bölünmesinde, kromozom yapışmaları ve kümeleşmeleri (stickiness), anafaz ve telofaz köprüleri, kutuplara zamanında çekilmemiş olan kromozomlar (laggardlar), metafaz- anafaz safhaları arasında meydana gelen

düzensizlikler (disturbed metafaz-anafaz), mikroçekirdek gibi kromozom anomalileri göz önüne alınıp değerlendirildi.

#### **2.2.6. İstatistiksel Değerlendirme**

Sonuçların değerlendirilmesi SPSS 11.0 for windows paket programında Kruskal-Wallis testi ile yapılmış olup, ikili karşılaştırmalarda Duncan testi kullanılmıştır.

### 3. BULGULAR

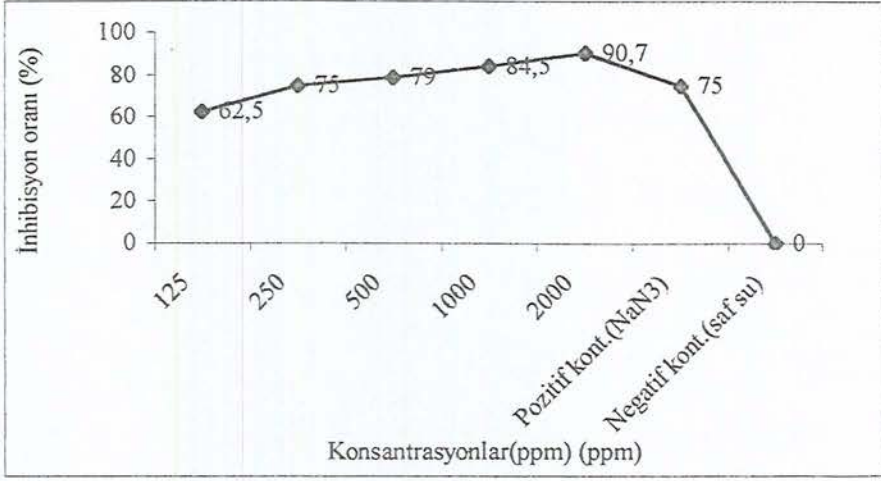
Piridin'in farklı konsantrasyonlarında çimlenmeye maruz bırakılan soğanların kök uçlarının uzunlukları doza bağlı olarak önemli derecede etkilenmiştir. 15. günün sonunda, kök uzunlukları ölçülmüştür. Buna göre, 125-2000 ppm aralıkları içerisinde büyüyen kök uçlarının saf sudakine oranla %37'den %9.3 oranlarına kadar inhibe edildiği gözlenmiştir (Tablo 3.1). Ayrıca büyümenin, negatif kontrole göre inhibisyon yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmış, şekil 2 de grafikte gösterilmiştir.

$$\text{İnhibisyon oranı} = \frac{\text{Negatif kontrol kök uzunluğu} - \text{Kök uzunlukları}}{\text{Negatif kontrol kök uzunluğu}} \times 100$$

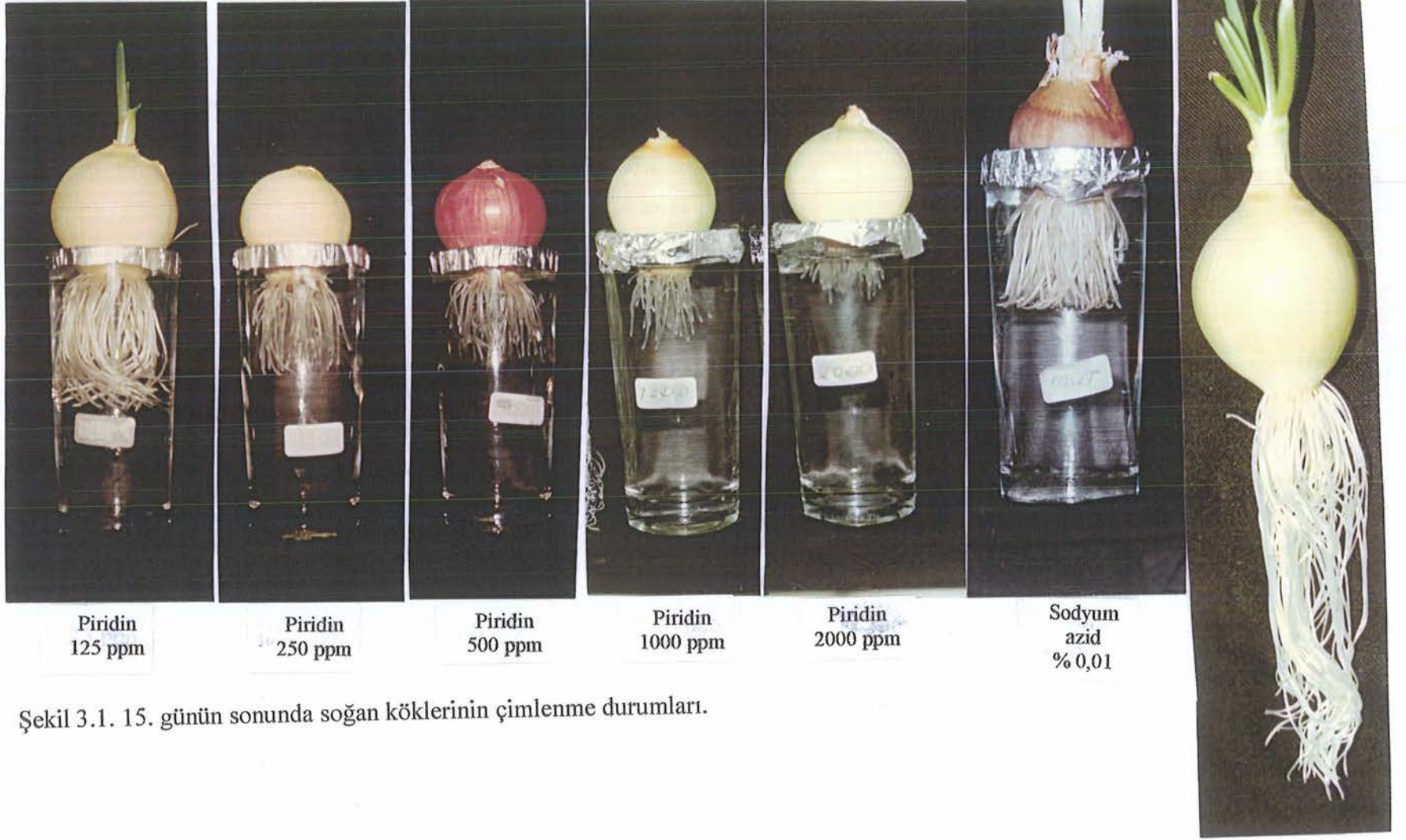
Kök uçlarının morfolojileri gözlemlendiğinde (Şekil 3.1), son üç yüksek konsantrasyon olan 500, 1000 ve 2000 ppm piridin'in varlığında, kontrole göre saçak köklerin renginin koyulaştığı kalınlıklarının arttığı ve jelimsi yapı kazandıkları gözlenmiştir.

Tablo 3.1. 15 Gün Sonunda Ölçülen Kök Uzunlukları

Piridin konsantrasyonları (ppm)	Kök uzunlukları (cm)	İnhibisyon oranı (%)
125	6	62.5
250	4	75
500	3.5	79
1000	2.5	84.5
2000	1.5	90.7
Pozitif kontrol (NaN <sub>3</sub> )	4	75
Negatif kontrol (Saf su)	16	0



Grafik 3.1. Piridin konsantrasyonlarının kök uçları uzunluğu üzerine olan etkisi.



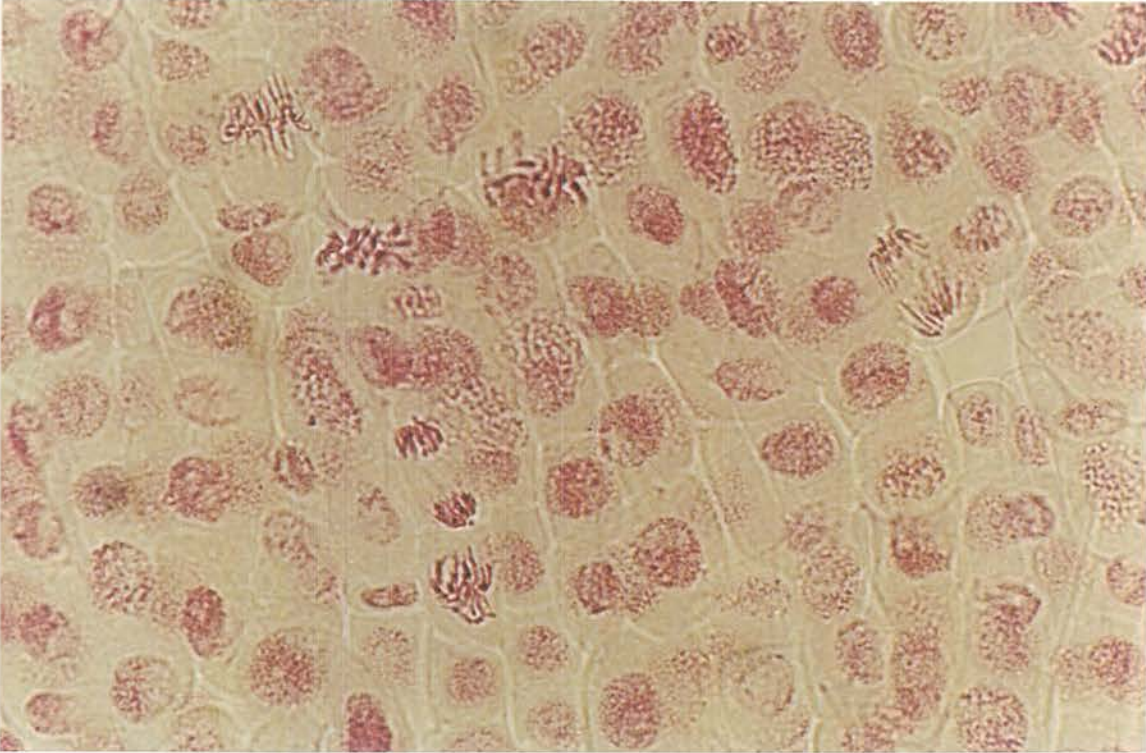
Şekil 3.1. 15. günün sonunda soğan köklerinin çimlenme durumları.

### 3. 1. Sitolojik Gözlemler

Soğan kök ucu hücrelerine uygulanan değişik piridin konsantrasyonları, mitoz bölünmenin tüm evrelerini olumsuz yönde etkilemiştir. Bu etkiler uygulanan dozlara bağlı olarak farklılıklar göstermektedir. Doz artışına paralel olarak anormal hücre sayısı artarken bölünen hücre sayısının da azaldığı gözlenmiştir. Negatif kontrol gurubunda ise anormal hücre oranı yok denecek kadar azdır. Ölçüm sonuçları tablo haline getirilmiş ve Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

#### 3. 1. 1.Saf Suda Hazırlanan Hazırlanan Kök Uçlarının Sitolojik Özelliği

Saf sudaki köklerle hazırlanan preparatlardaki hücrelerin şekillerinde dejenerasyon yoktur. Hücre membranları düzgün ve çekirdekleri merkezdedir. Her hücrede tek çekirdek vardır. Bu hücrelerde mitoz bölünmenin tüm evrelerine normal bir şekilde rastlanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Saf suda Çimlendirilen kök uçlarında mitolojik evreleri (x20’lik büyütme).

Tablo 3.2. *Allium Cepa* da Piridin Tarafından İndüklenen Kromozom Aberasyon Oranı ve MI (Mitotik İndeks).

Kimyasallar	Kons (ppm)	Sayılan top. hücre	Bölünen top. hücre	MI ± S.D	Anomaliler						Aberant hücre yüzdesi (%) ± S.D
					Kromozom Köprüsü	Yapışkanlık	Bozulmuş metafaz- anafaz	c-metafaz	Mikro çekirdek	Binükleer hücre	
Piridin	125	6102	3647	59,69 ± 0,54 <sup>a</sup>	13	17	8	7	-	-	0,71 ± 0,11 <sup>cd</sup>
	250	5790	3330	57,65 ± 1,49 <sup>a</sup>	6	12	9	8	-	-	0,59 ± 0,10 <sup>bce</sup>
	500	6039	2960	49,10 ± 8,53 <sup>b</sup>	6	17	5	5	-	-	0,53 ± 0,06 <sup>bce</sup>
	1000	5554	2640	4,87 ± 0,90 <sup>c</sup>	-	2	4	6	3	9	0,45 ± 0,14 <sup>b</sup>
	2000	3768	1320	3,49 ± 0,20 <sup>c</sup>	-	3	3	7	3	10	0,67 ± 0,27 <sup>bedef</sup>
Negatif kontrol		8522	6740	79,06 ± 2,18 <sup>e</sup>	-	-	2	-	-	-	0,046 ± 0,04 <sup>a</sup>
Pozitif kontrol		4884	3556	72,77 ± 3,15 <sup>d</sup>	5	15	7	3	13	-	0,88 ± 0,02 <sup>d</sup>

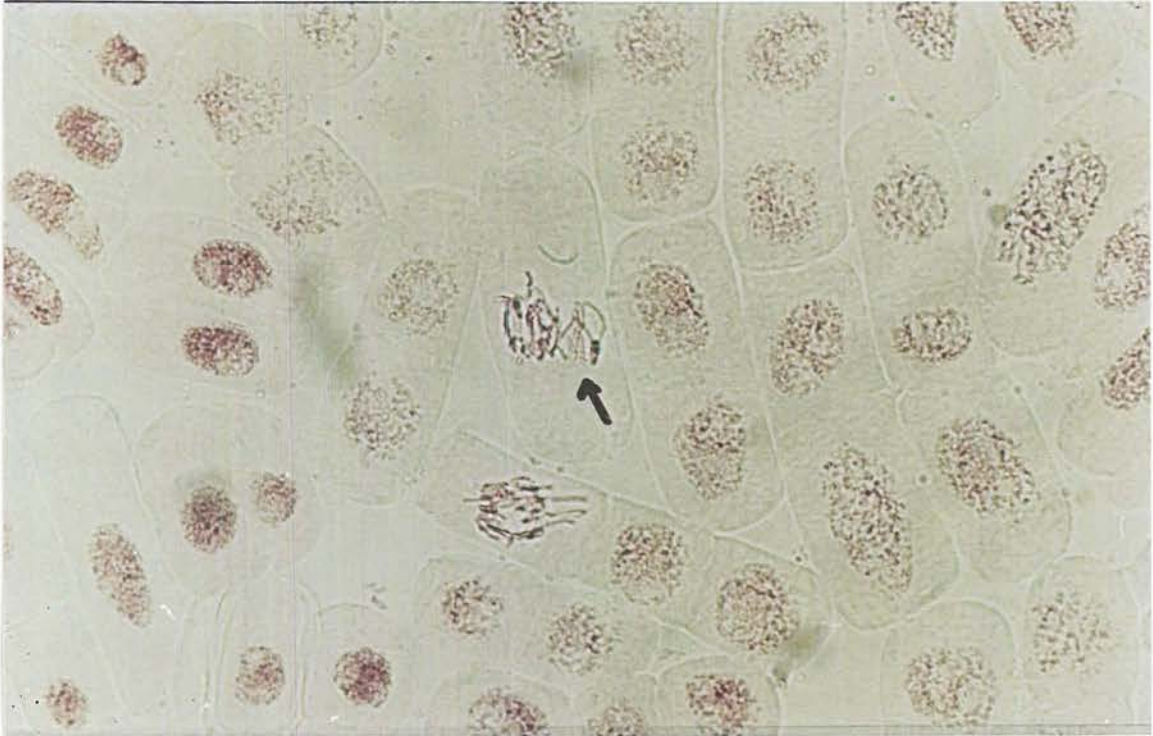
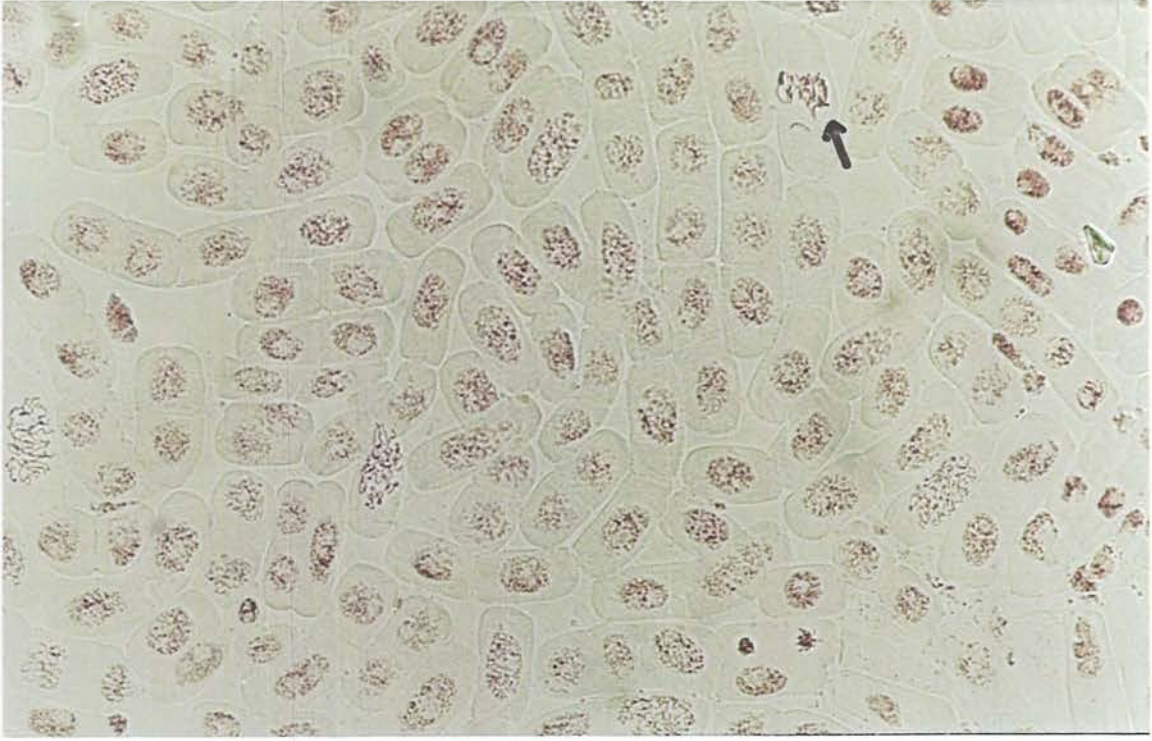
Ngatif kontrol: Saf su; pozitif kontrol: %0.01 NaN<sub>3</sub>

Aynı sütunda değişik harfleri taşıyan gruplar arasındaki fark, istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05).

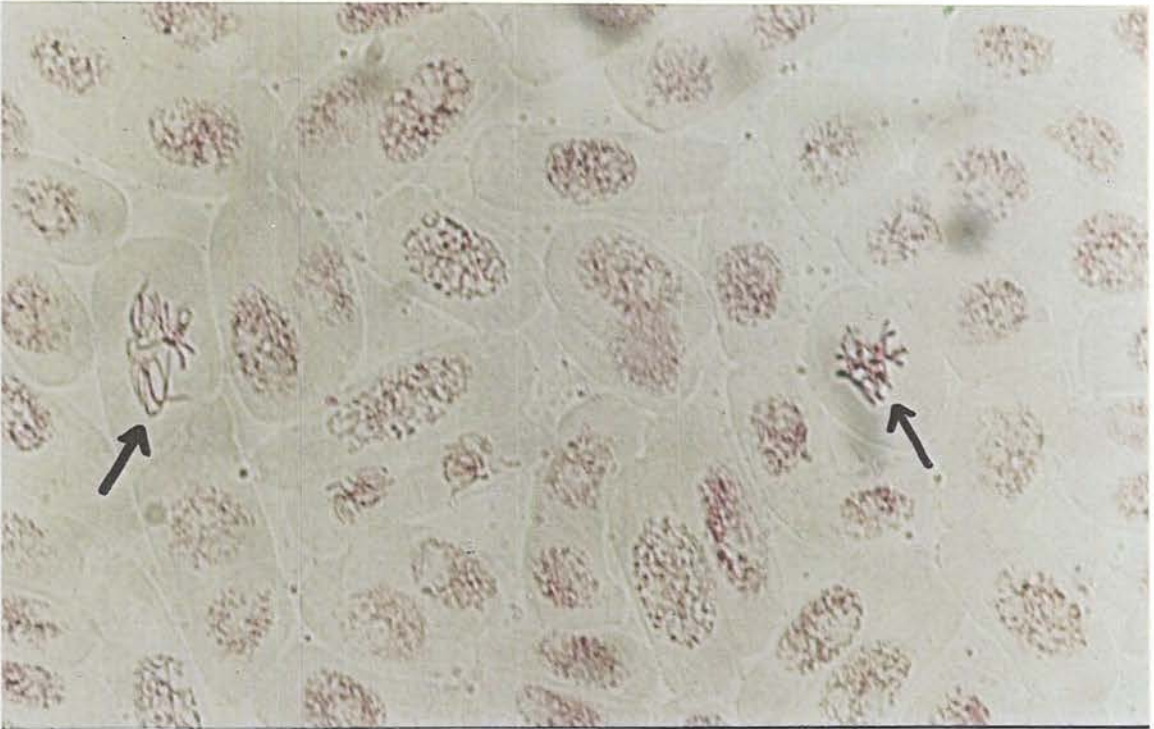
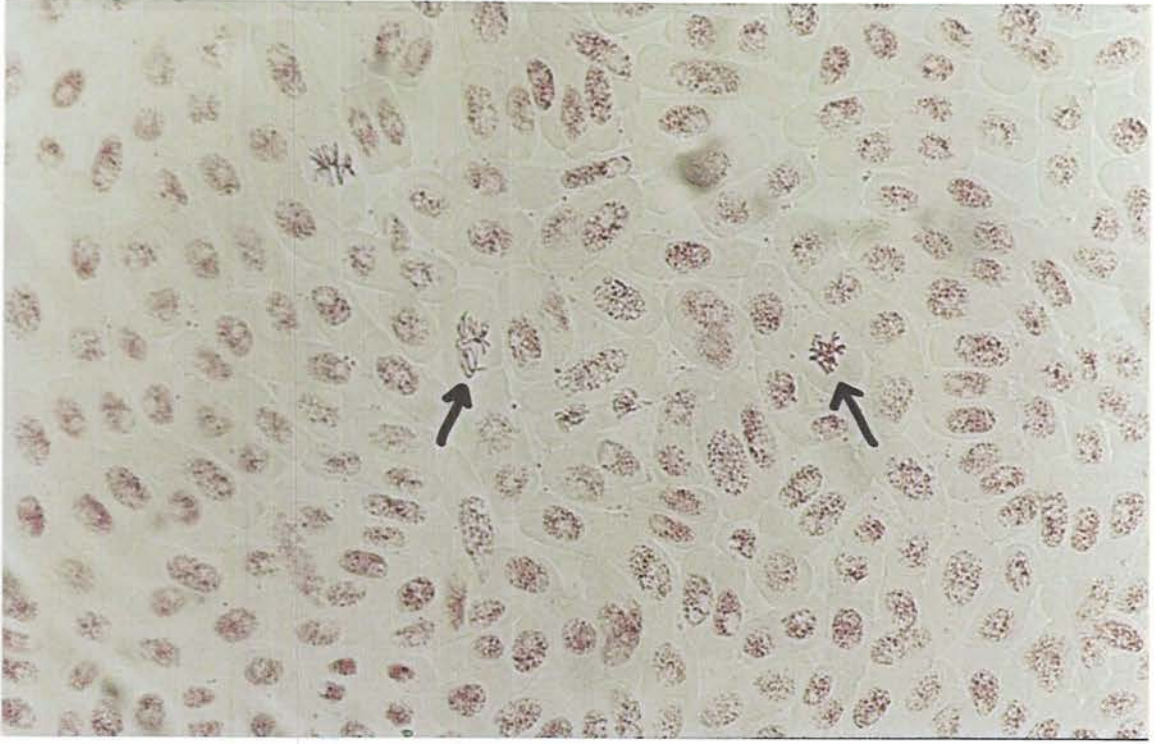
### 3. 1. 2. 0.01'lik Sodyum Azid'de Hazırlanan Kök Uçlarının Sitolojik Özelliği

Soğan kök ucu meristem hücrelerine uygulanan 0,01 lik  $\text{NaN}_3$ , saf suya oranla hücre bölünmesinde azalmaya neden olmuştur. Bölünme evrelerine az sayıda rastlanmış olup en fazla profaz evresi görülmüştür. Hücre ve çekirdeklerin şekillerinde deformasyon gözlenmemiştir.

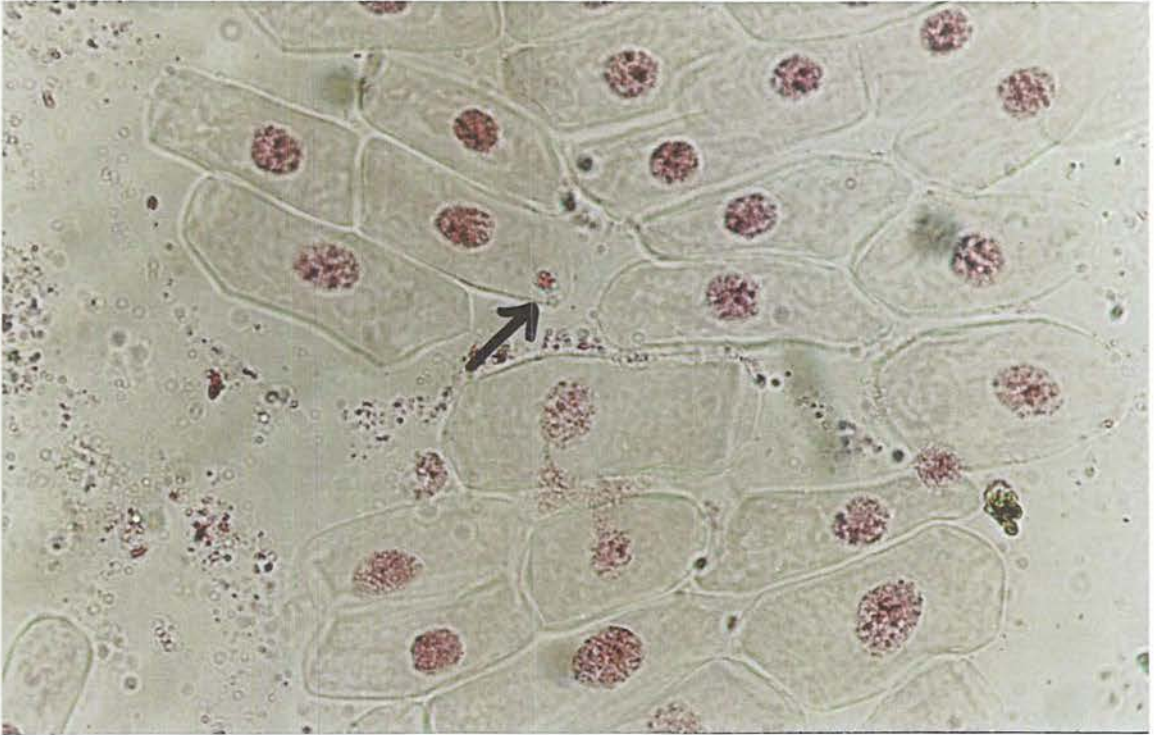
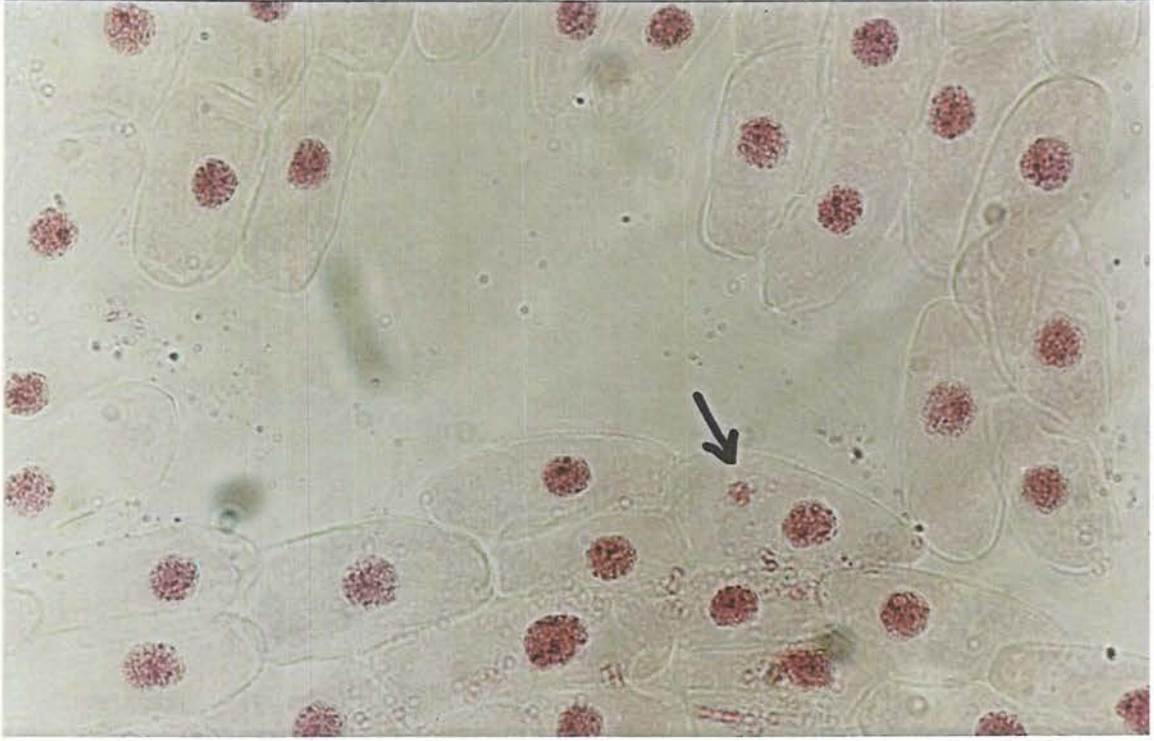
Tablo 3.2'de belirtildiği üzere; kromozom köprüsü, yapışkanlık, bozulmuş metafaz-anafaz, c-metafaz, mikro çekirdek gibi anomalilere yol açmıştır (Şekil 3.3-3.12). MI;  $72.77 \pm 3.15$  bulunmuştur. Aberasyon yüzdesi  $0,88 \pm 0.02$  bulunmuştur.



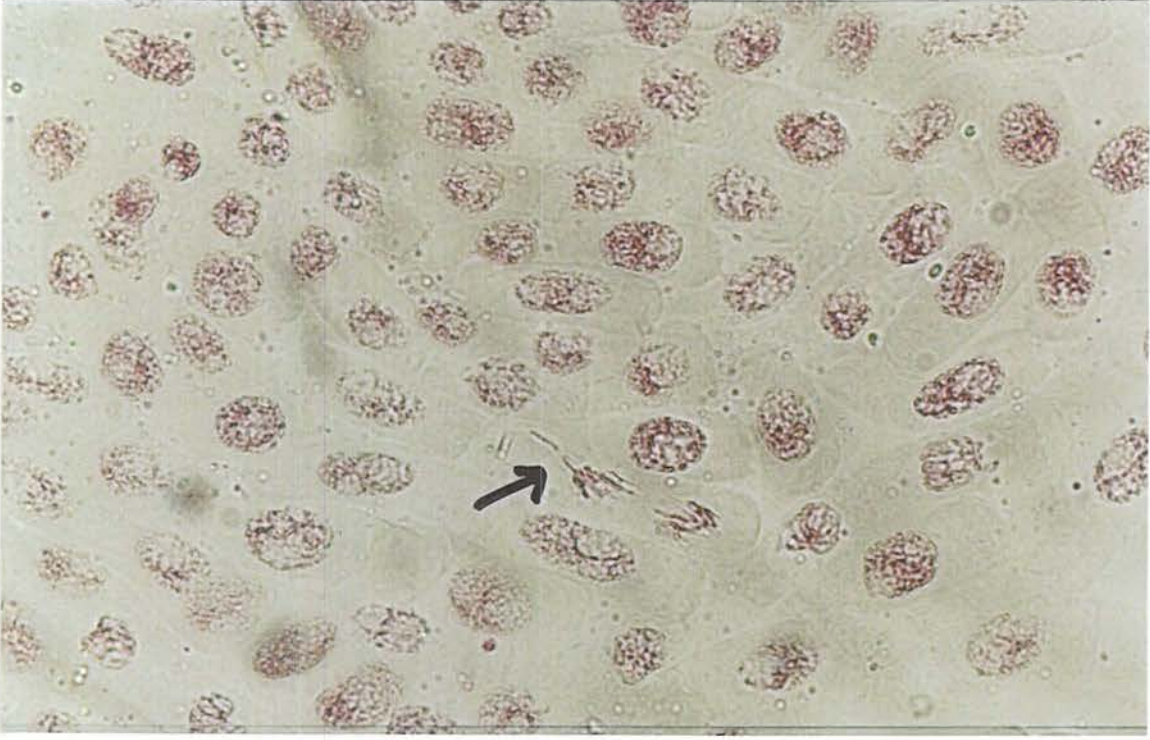
Şekil 3.3 ve 3.4. Sodyum Azid'de Çimlendirilen Kök Uçlarında Yapışkanlık (x20 ve x40'lık Büyütme).



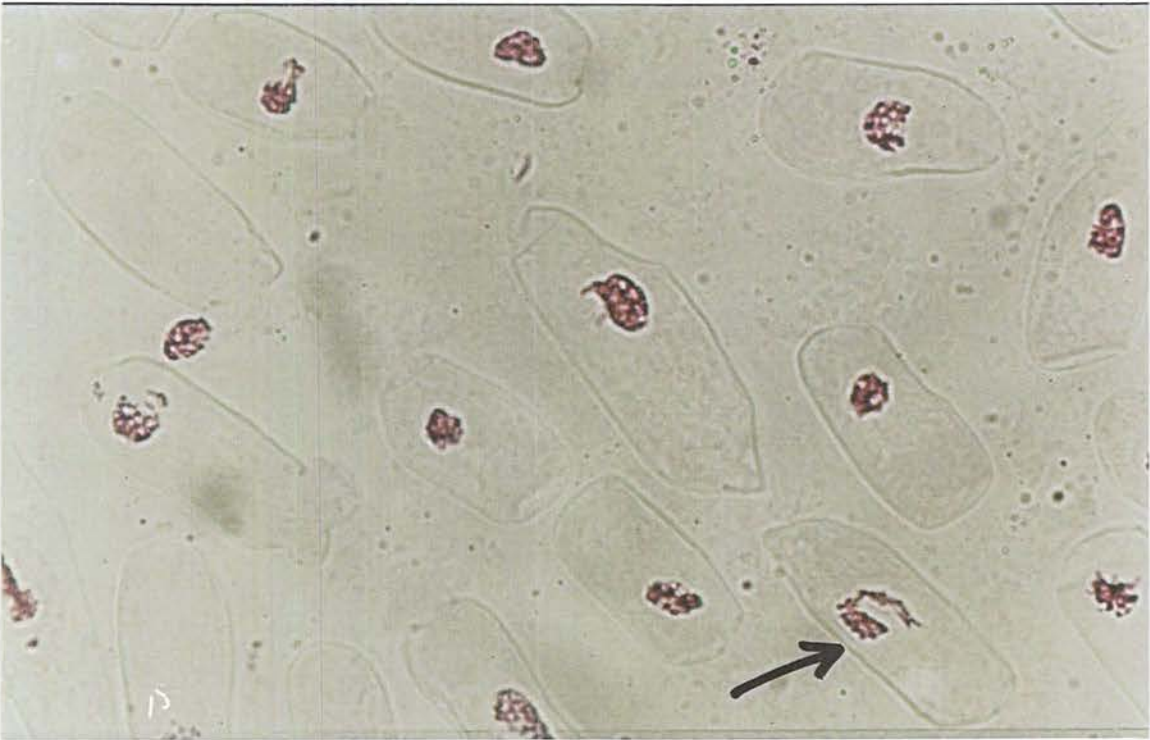
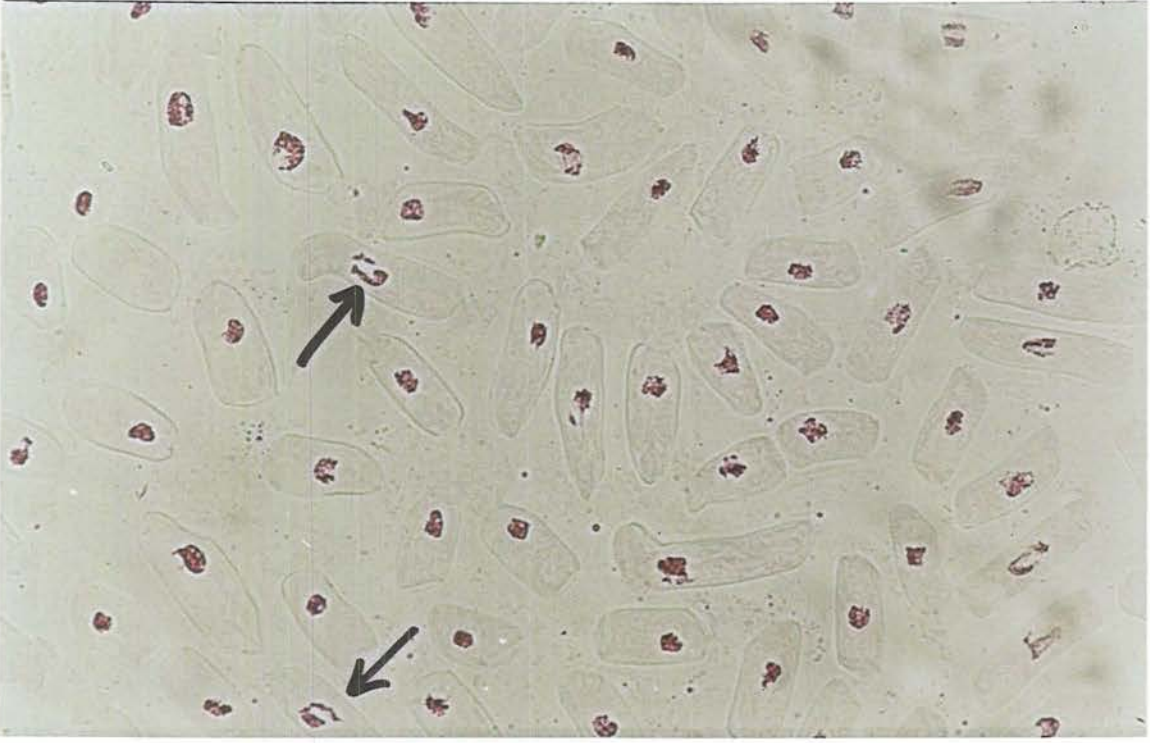
Şekil 3.5 ve 3.6. Sodyum Azid'de Çimlendirilen Kök Uçlarında Yapışkanlık ve C-Mitozis (x20 ve x40'lık Büyütme).



Şekil 3.7 ve 3.8. Sodyum Azid'de Çimlendirilen Kök Uçlarında Mikro Çekirdek (x40'lık büyütme).



Şekil 3.9 ve 3.10. Sodyum Azid' de Çimlendirilen Kök Uçlarında İleri Giden Kromozom ve Bozulmuş Anafaz-Telofaz (x40'lık Büyütme).

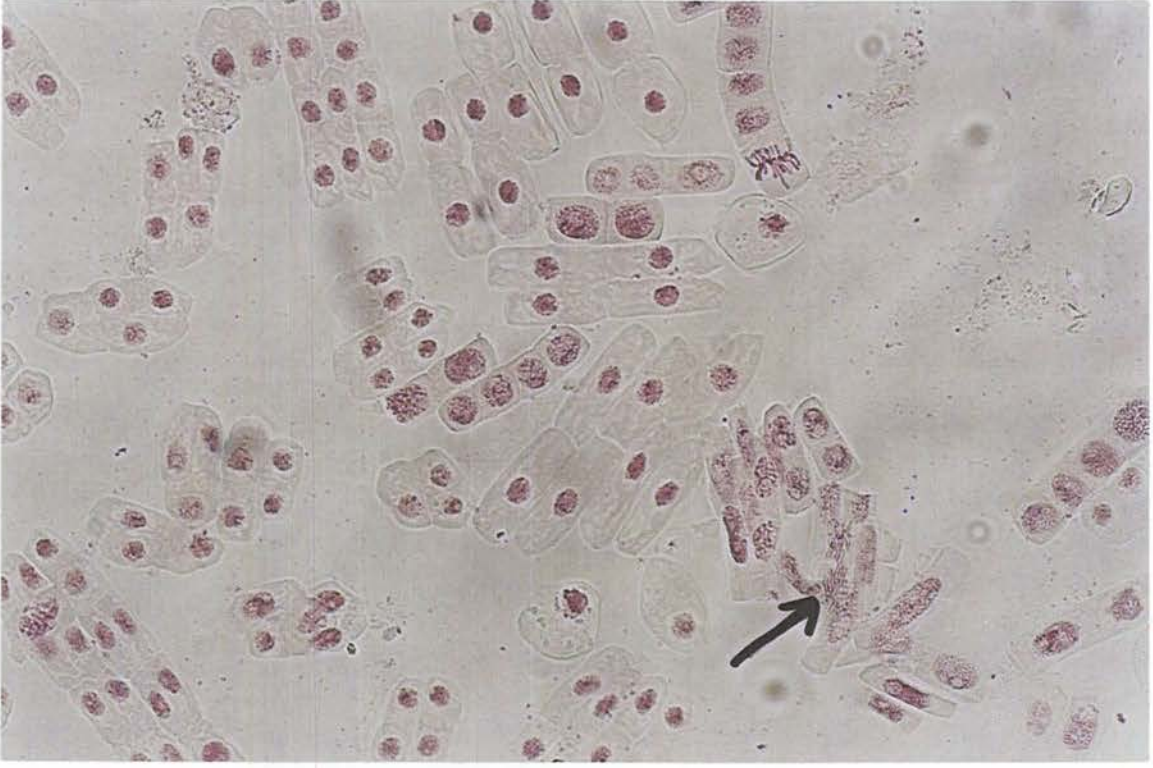


Şekil 3.11 ve 3.12. Sodyum Azid'de Çimlendirilen Kök Uçlarında Şekilleri Bozulmuş Çekirdekler (x20 ve x40'lık Büyütme).

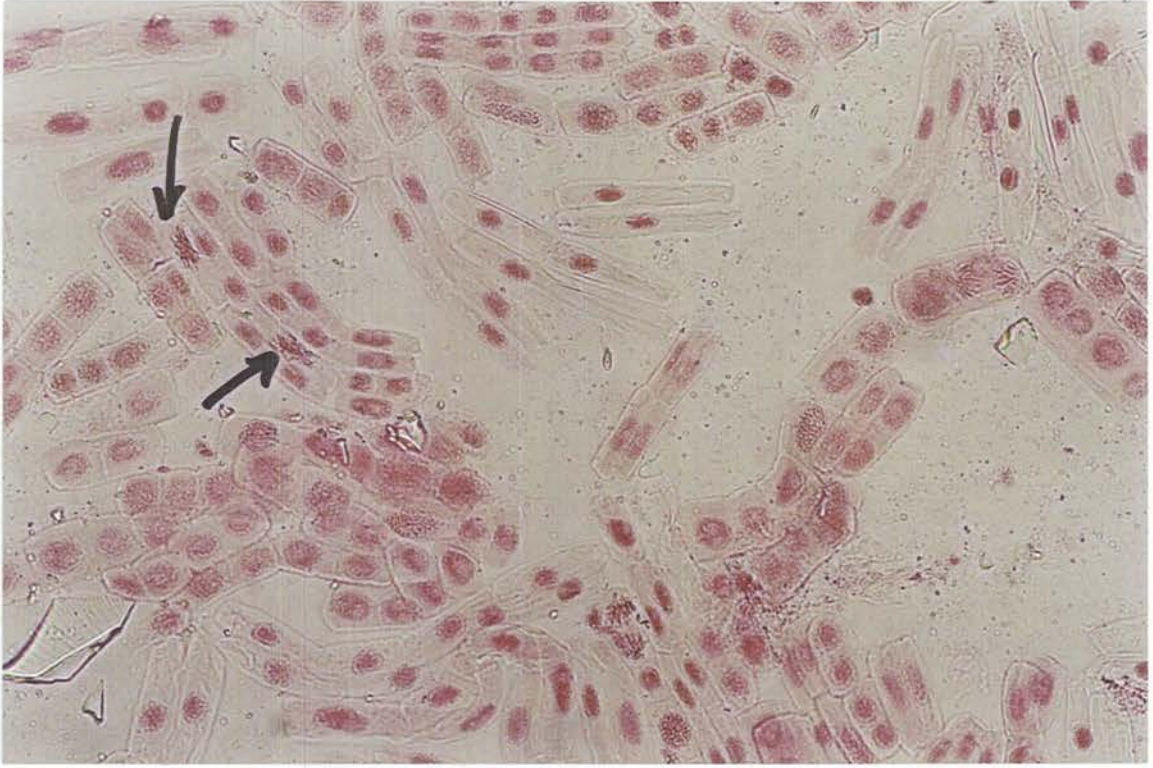
### 3. 1. 3. 125 ppm'lik Piridin Çözeltilerinden Hazırlanan Kök Uçlarının Sitolojik Özelliği

Soğan kök ucu meristem hücrelerine uygulanan 125 ppm'lik piridin hücre bölünmesinde azalmaya neden olmuştur. Preparatlarda bölünme evrelerinin tümüne rastlanmıştır. Hücre ve çekirdek şekillerinde deformasyon gözlenmemiştir.

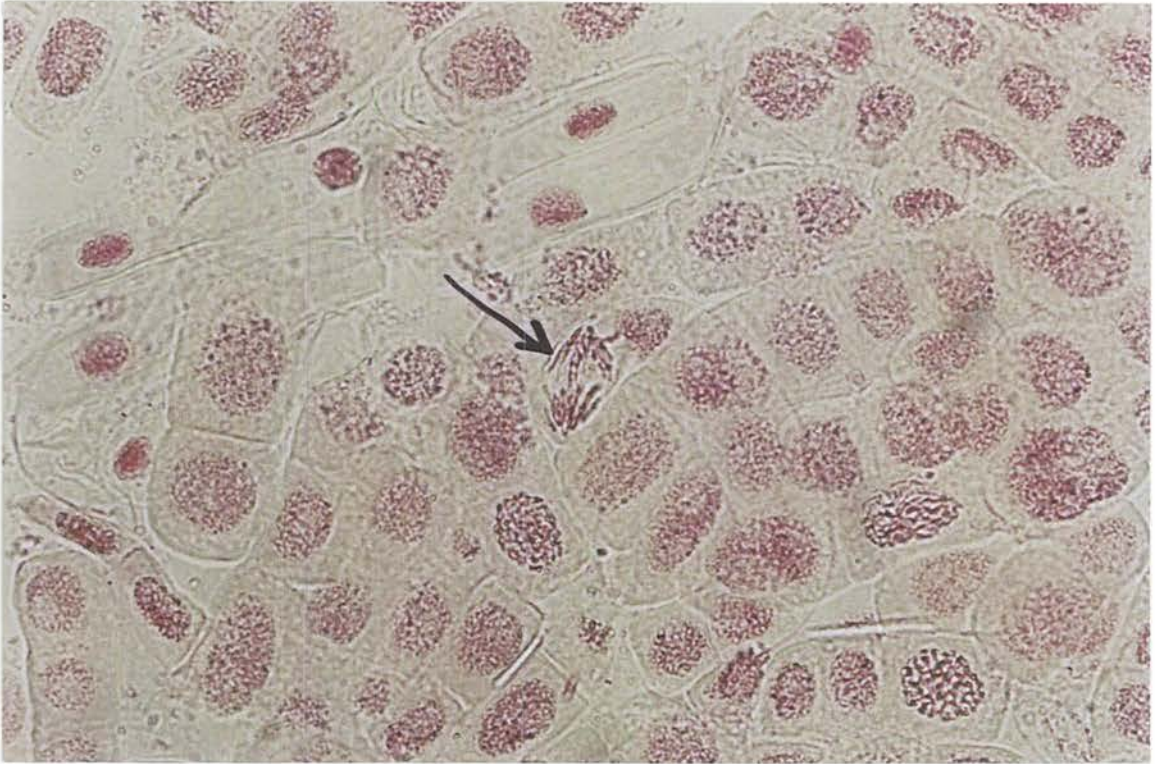
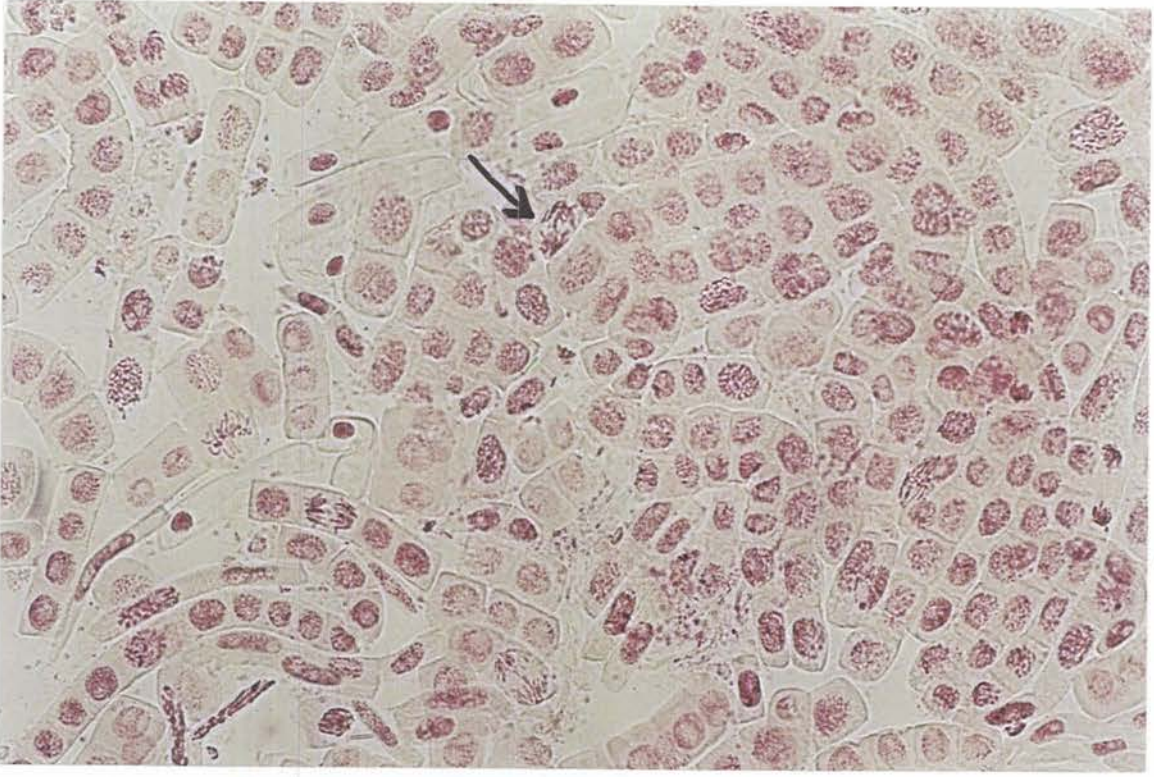
Tablo 3.2 de belirtildiği gibi, kromozom köprüsü, yapışkanlılık, bozulmuş metafaz-anafaz, c-metafaz gibi anomalilere rastlanmış olup, mikro çekirdek ve binükleer hücrelere rastlanmamıştır (Şekil 3.13-3.18). MI;  $59.69 \pm 0.54$  bulunmuştur. Aberasyon yüzdesi ise  $0.71 \pm 0.11$  bulunmuştur.



Şekil 3.13 ve 3.14. 125 ppm'lik Piridin Çözeltilerinde Çimlenen Kök Uçlarında Bozulmuş Anafaz-Telofaz (x20 ve x40'lık Büyütme).



Şekil 3.15 ve 3.16.125 ppm'lik Piridin Çözeltilerinde Çimlenen Kök Uçlarında Yapışkanlılık (x20 ve x40'lık Büyütme).

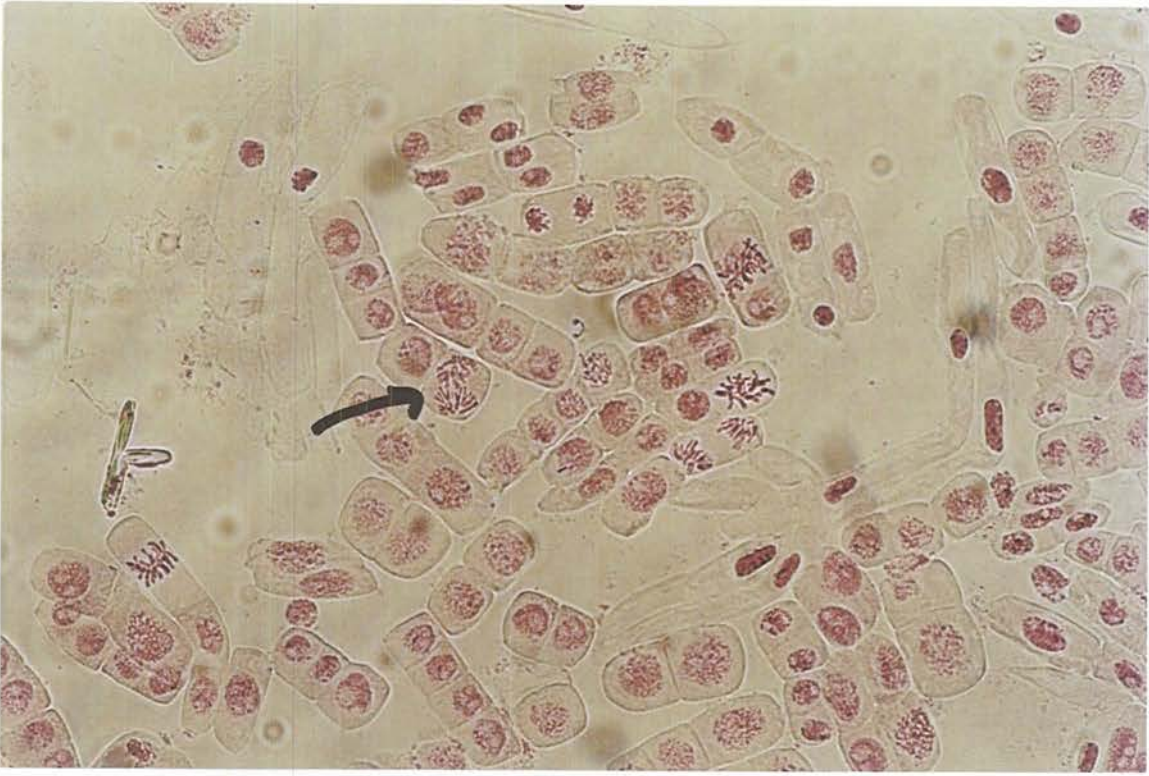


Şekil 3.17 ve 3.18. 125 ppm'lik Piridin Çözeltilerinde Çimlenen Kök Uçlarında Kromozom Köprüsü (x20 ve x40'lık Büyütme).

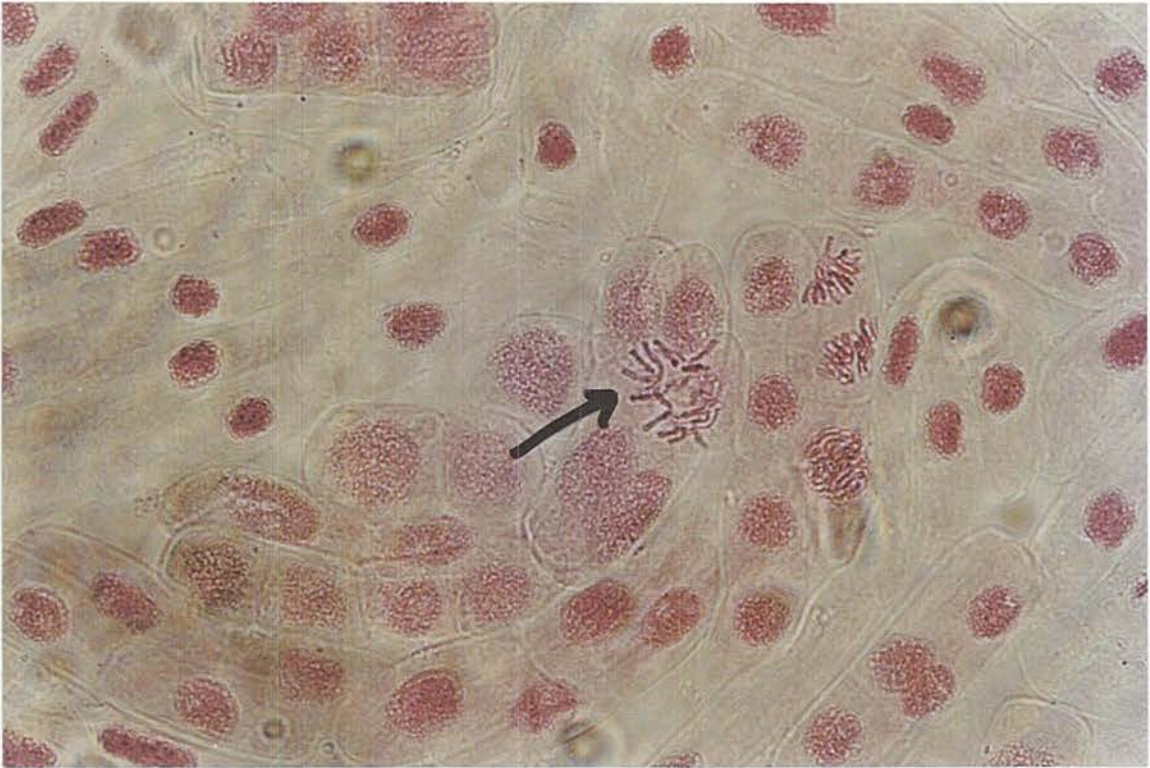
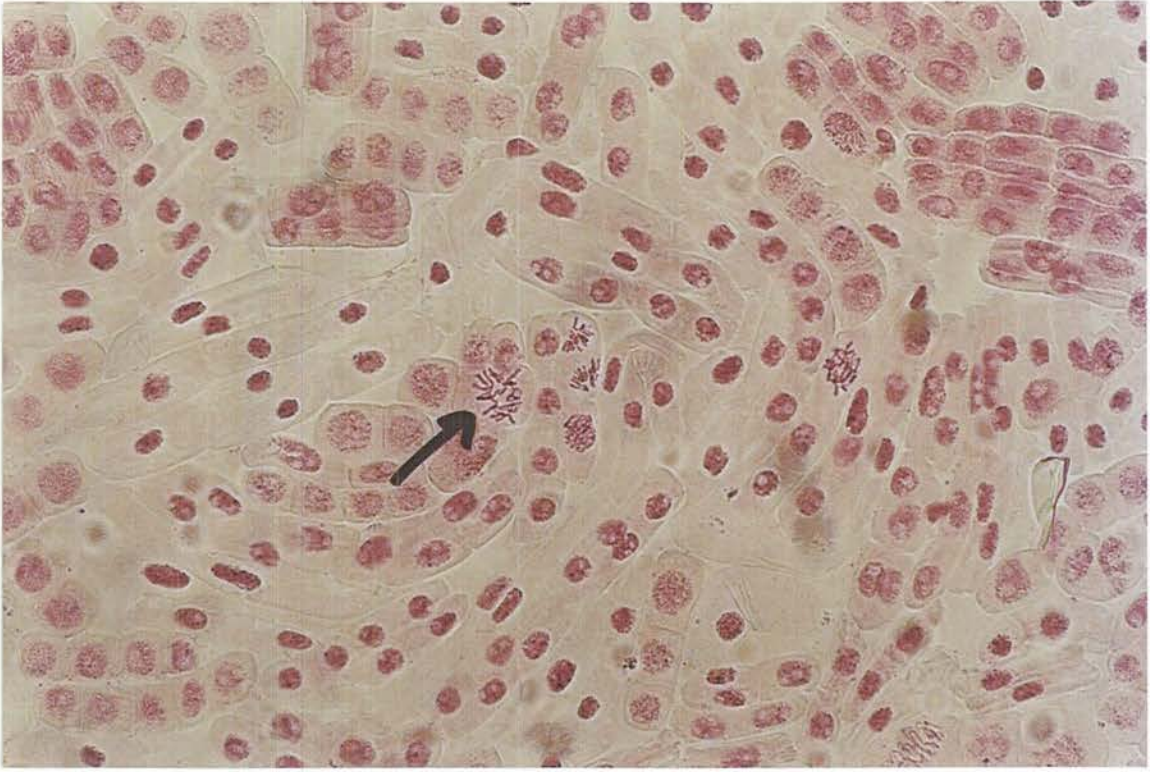
### 3. 1. 4. 250 ppm'lik Piridin Çözeltilerinden Hazırlanan Kök Uçlarının Sitolojik Özelliği

Soğan kök ucu meristem hücrelerine uygulanan 250 ppm'lik piridin hücre bölünmesinde azalmaya neden olmuş olup preparatlarda bölünme evrelerinin tümüne rastlanmıştır. Bazı hücrelerin çeperlerinde yırtılmalar, çekirdeklerinde ise parçalanmalar gözlenmiştir.

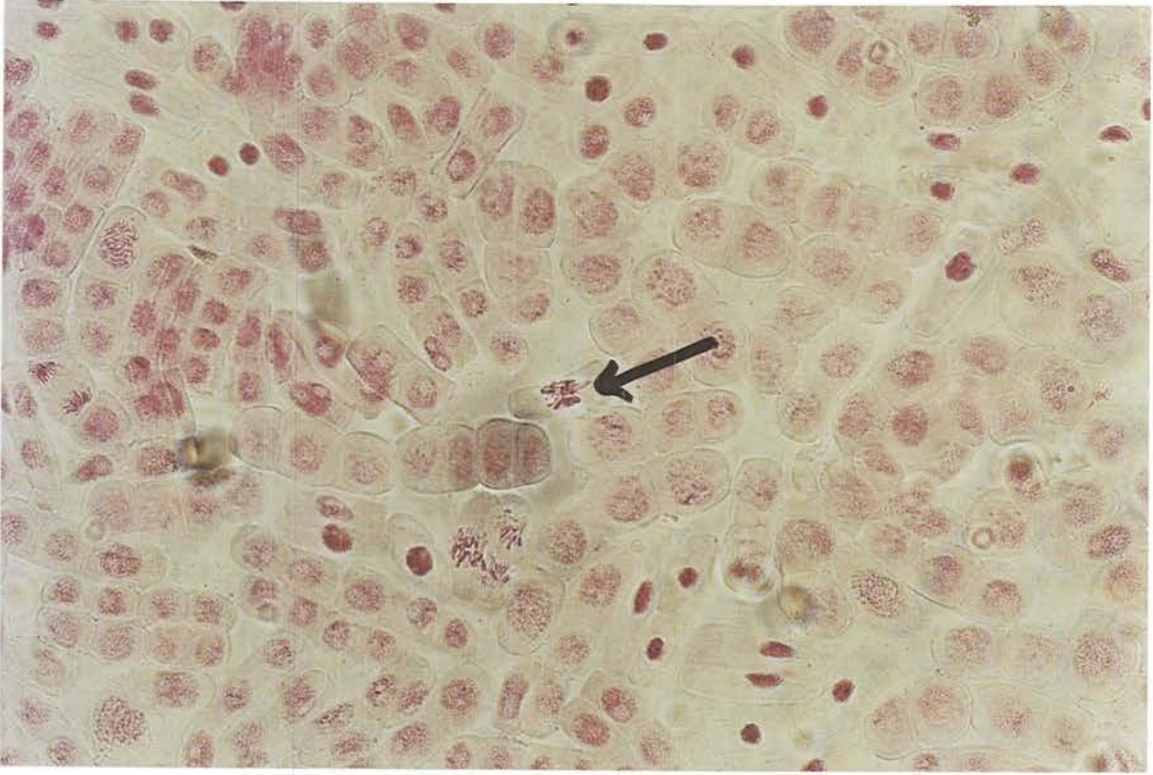
Tablo 3.2 de belirtilen anomalilerden mikro çekirdek ve binükleer hücre dışındaki tüm anomalilere rastlanmıştır. (Şekil 3.19 ve 3.24) MI;  $57.65 \pm 1.49$ , aberasyon yüzdesi ise  $0.59 \pm 0.10$  bulunmuştur.



Şekil 3.19 ve 3.20. 250 ppm'lik Piridin Çözeltilerinde Çimlenen Kök Uçlarında Bozulmuş Anafaz-Telofaz (x20 ve x40'lık Büyütme).



Şekil 3.21 ve 3.22. 250 ppm'lik Piridin Çözeltilerinde Çimlenen Kök Uçlarında C-Metafaz (x20 ve x40'lık Büyütme).

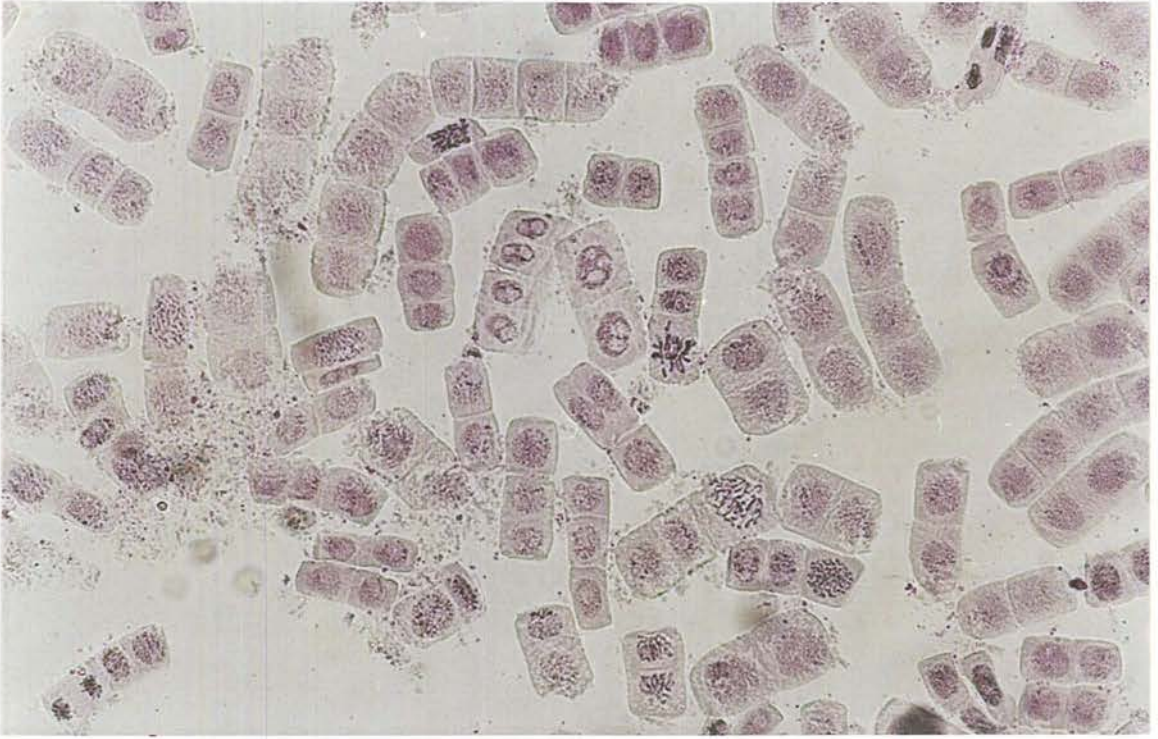


Şekil 3.23 ve 3.24. 250 ppm'lik Piridin Çözeltilerinde Çimlenen Kök Uçlarında Yapışkanlıklar (x20 ve x40'lık Büyütme).

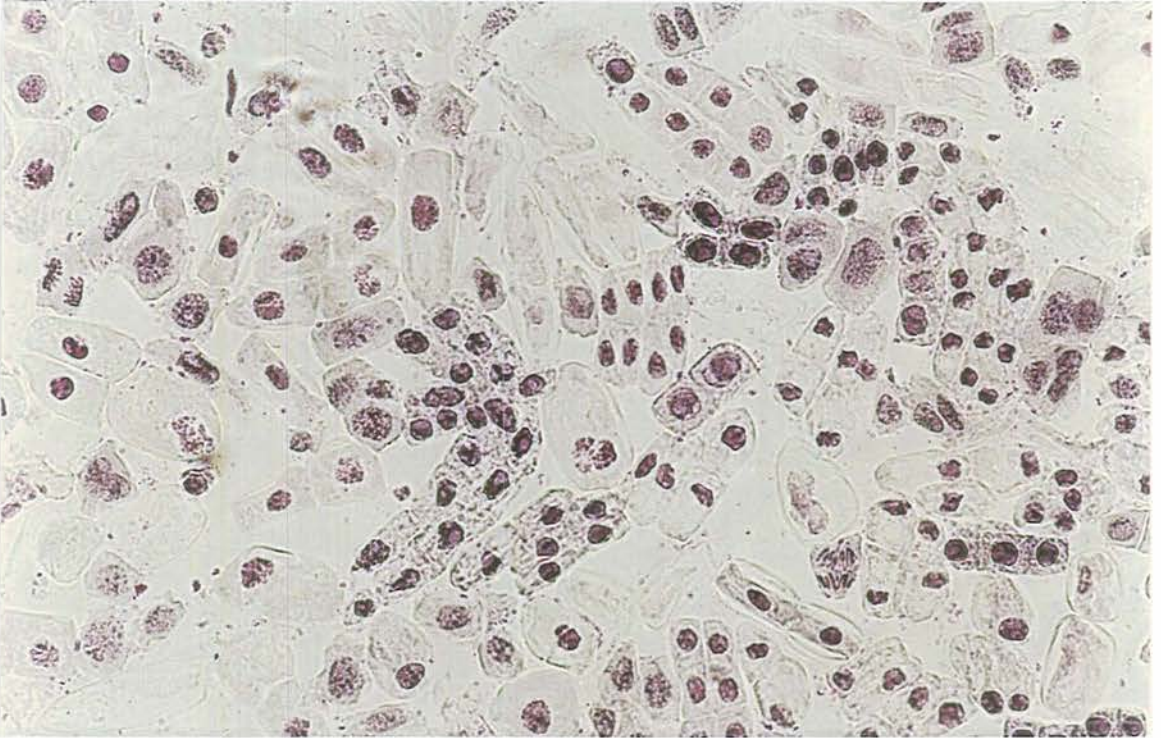
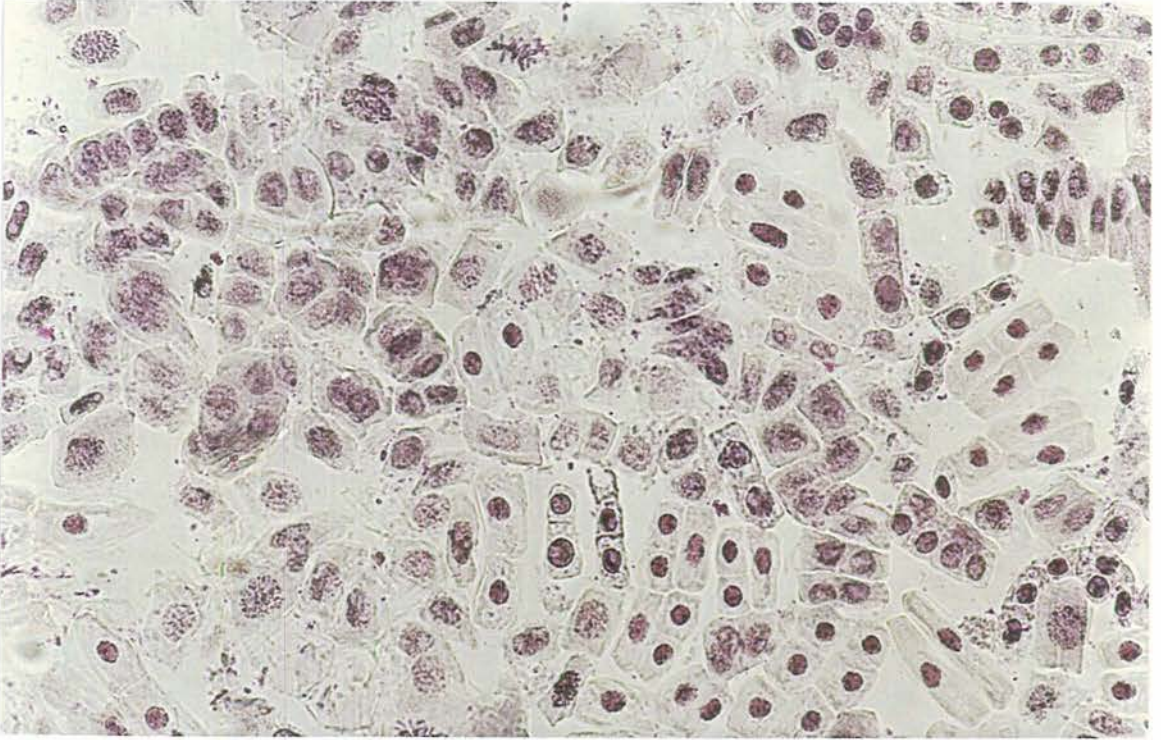
### 3. 1. 5. 500 ppm'lik Piridin Çözeltilerinden Hazırlanan Kök Uçlarının Sitolojik Özelliği

500 ppm'lik piridin çözeltisinde yetiştirilen soğanların kök uçlarından hazırlanan preparatlarda da hücre bölünmesinde azalma gözlenmiştir. Bölünme evrelerine oldukça az rastlanmış olup, en çok profaz evresi gözlenmiştir. Bazı hücrelerde çekirdeklerin hücre merkezinden bir kutba kaydığı gözlenmiştir. Ayrıca, bu hücrelerin çekirdeklerinin şekillerinde bozulmaların meydana geldiği görülmüştür. Yine bazı hücrelerde çekirdeklerin parçalandığı ve ortama gelişigüzel dağıldığı gözlenmiştir.

Tablo 3. 2'de belirtilen anomalilerden mikro çekirdek ve binüklear hücre dışında diğer tüm anomalilere rastlanmıştır (Şekil 3.25-3. 27). MI;  $49.10 \pm 8.53$ , anomali yüzdesi ise  $0.53 \pm 0.06$  bulunmuştur.



Şekil 3.25. 500 ppm'lik Piridin Çözeltilerinde Çimlenen Kök Ucu Hücreleri (x40'lık büyütme).



Şekil 3.26 ve 3.27. 500 ppm'lik Piridin Çözeltilerinde Çimlenen Kök Ucu Hücreleri (x20'lik büyütme).

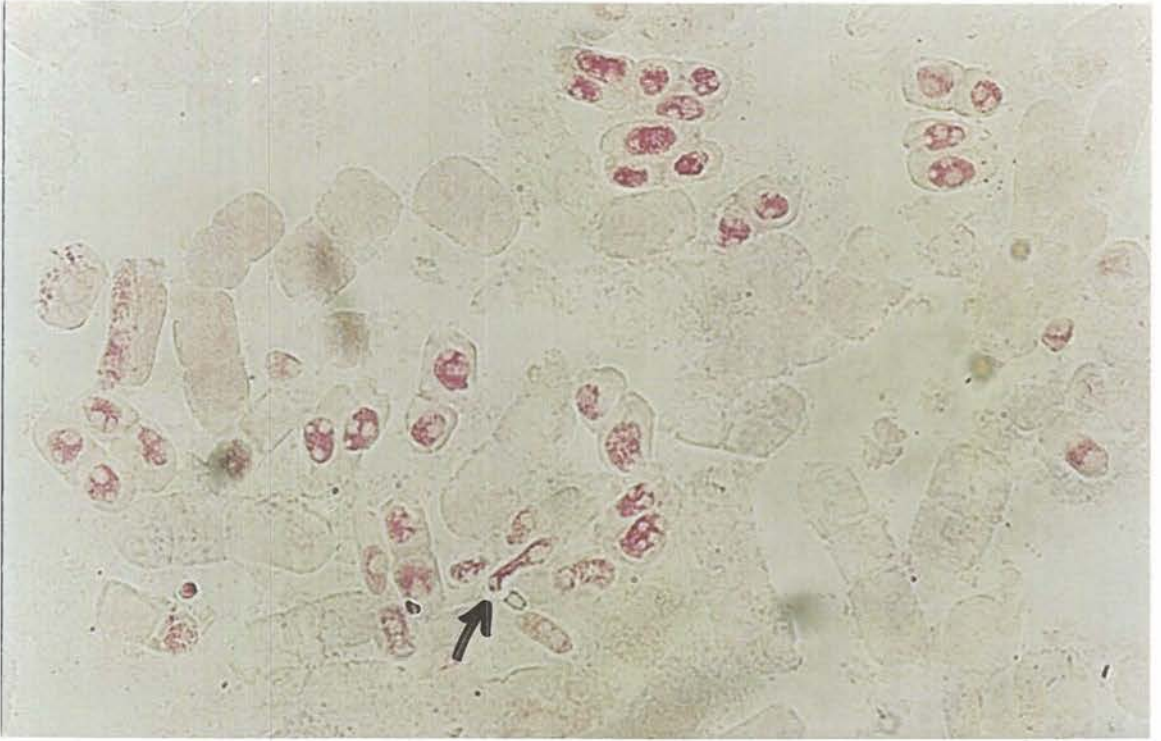
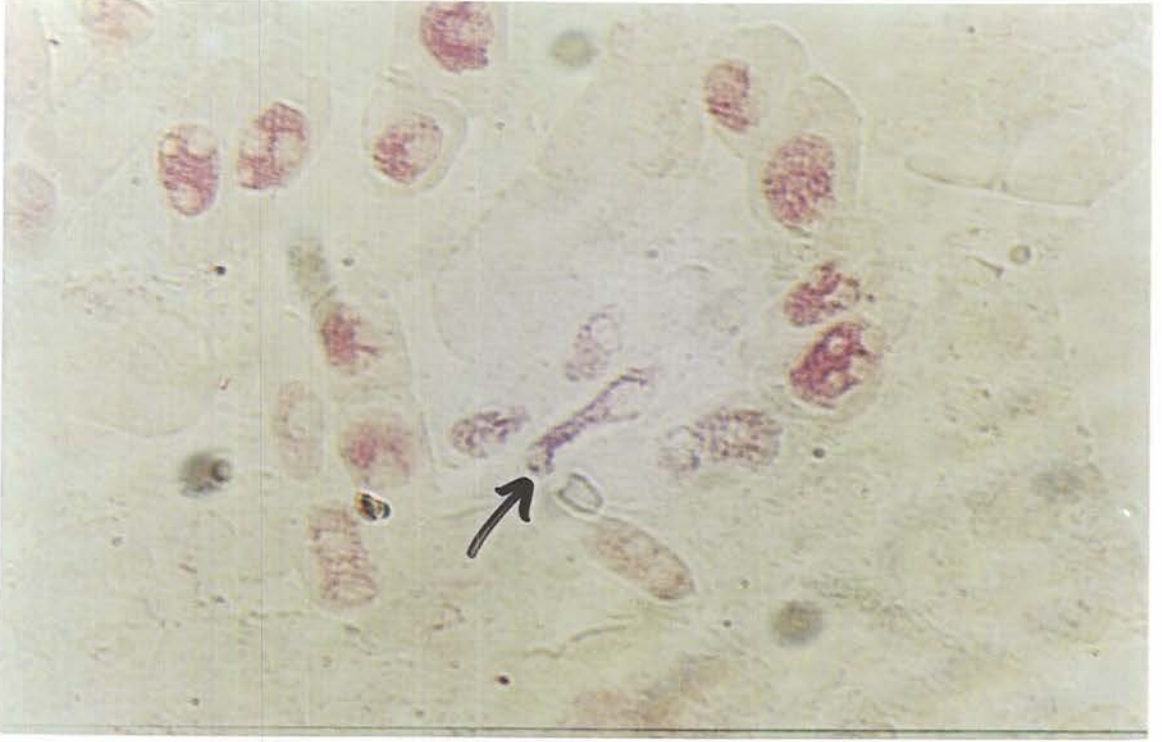
### 3. 1. 6. 1000 ppm'lik Piridin Çözeltilerinden Hazırlanan Kök Uçlarının Sitolojik Özelliği

1000 ppm'lik piridin çözeltisinde yetiştirilen soğanların kök uçlarından hazırlanan preparatlarda hücre bölünmesine oldukça azalmış olup, erken profaz ve interfaz dışında hemen hemen hiçbir evreye rastlanmamıştır. Birçok hücrede normalde hücrelerin merkezinde olması gereken çekirdeklerin, hücrenin bir kutbuna kaydığı ve şekillerinin deforme olduğu gözlenmiştir. Hücrelerin bazılarında sitoplazmik kitlelerinde bozulmalar gözlenmiştir. Birçok hücrenin çekirdek taşımadığı ve çekirdek taşımayan hücrelerin boyutlarının yüksek oranda artış gösterdiği izlenmiştir.

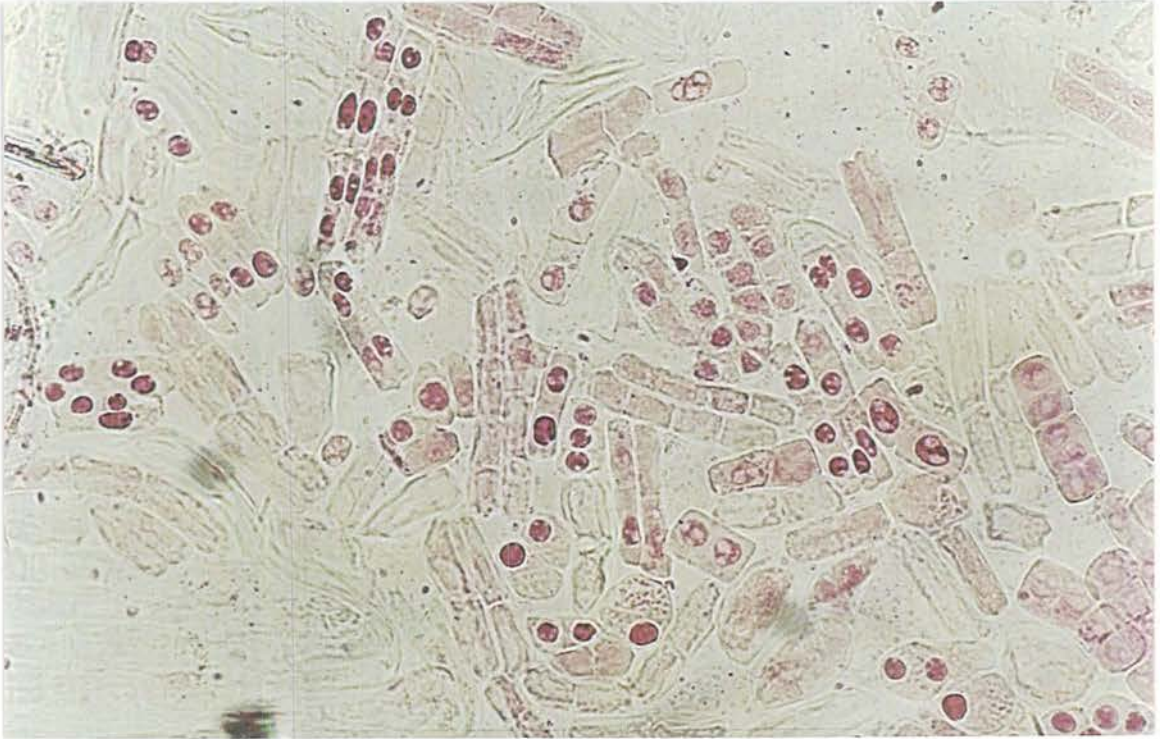
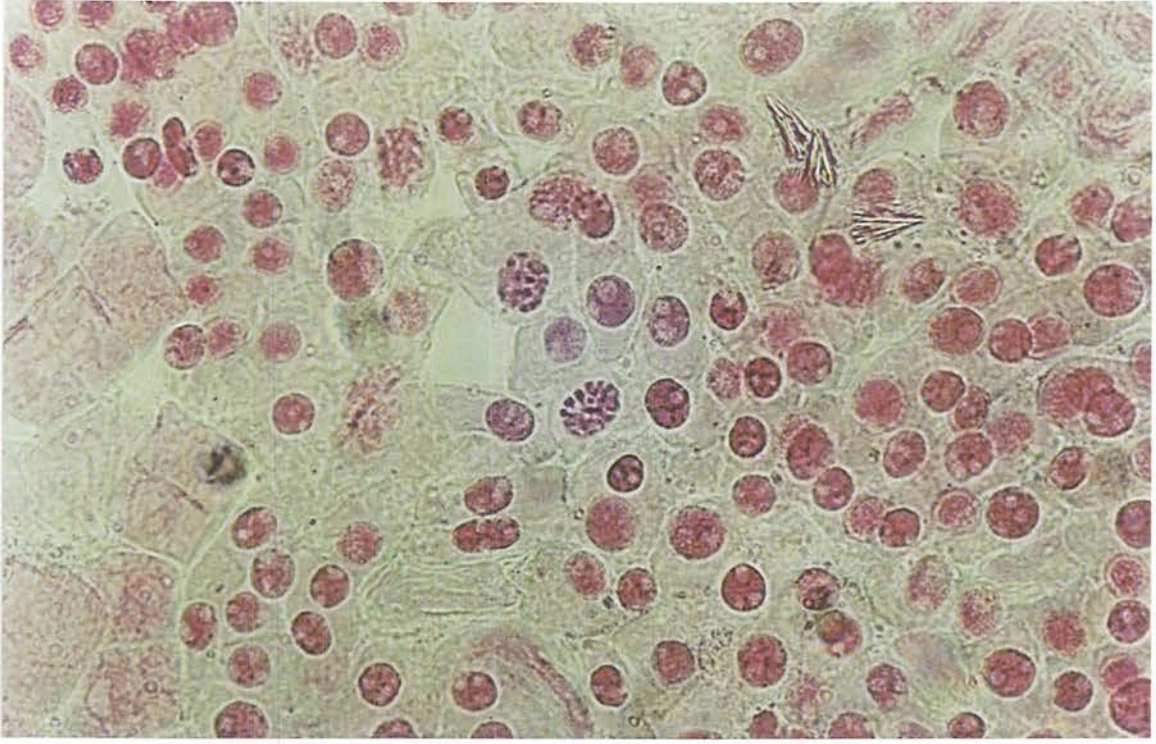
Tablo 3.2'de belirtilen anomalilerden; yapışkanlılık, bozulmuş metafaz-anafaz, c- metafaz, mikro çekirdek, binüklear hücre gözlenmiştir (Şekil 3. 28-3. 32). MI;  $4.87 \pm 0.90$ , aberasyon yüzdesi ise  $0.45 \pm 0.14$  bulunmuştur.



Şekil 3.28. 1000 ppm'lik Piridin Çözeltilisinde Çimlenen Kök Ucu Hücresinde Mikro çekirdek (mç) (x20'lik büyütme).



Şekil 3.29 ve 3.30. 1000 ppm'lik Piridin Çözeltilerinde Çimlenen Kök Ucu Hücrelerinde Çekirdek Deformasyonu (x40 ve x20'lik büyütme).

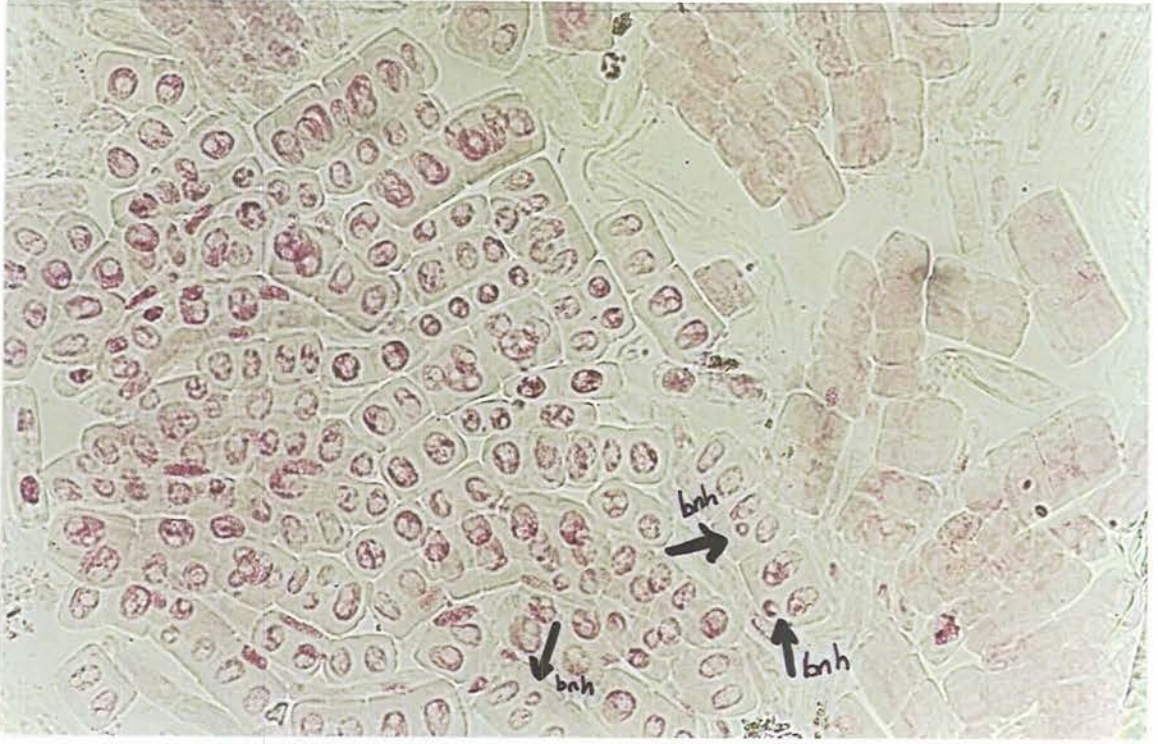


Şekil 3.31 ve 3.32. 1000 ppm'lik Piridin Çözeltilerinde Çimlenen Kök Ucu Hücreleri (x20'lik büyütme).

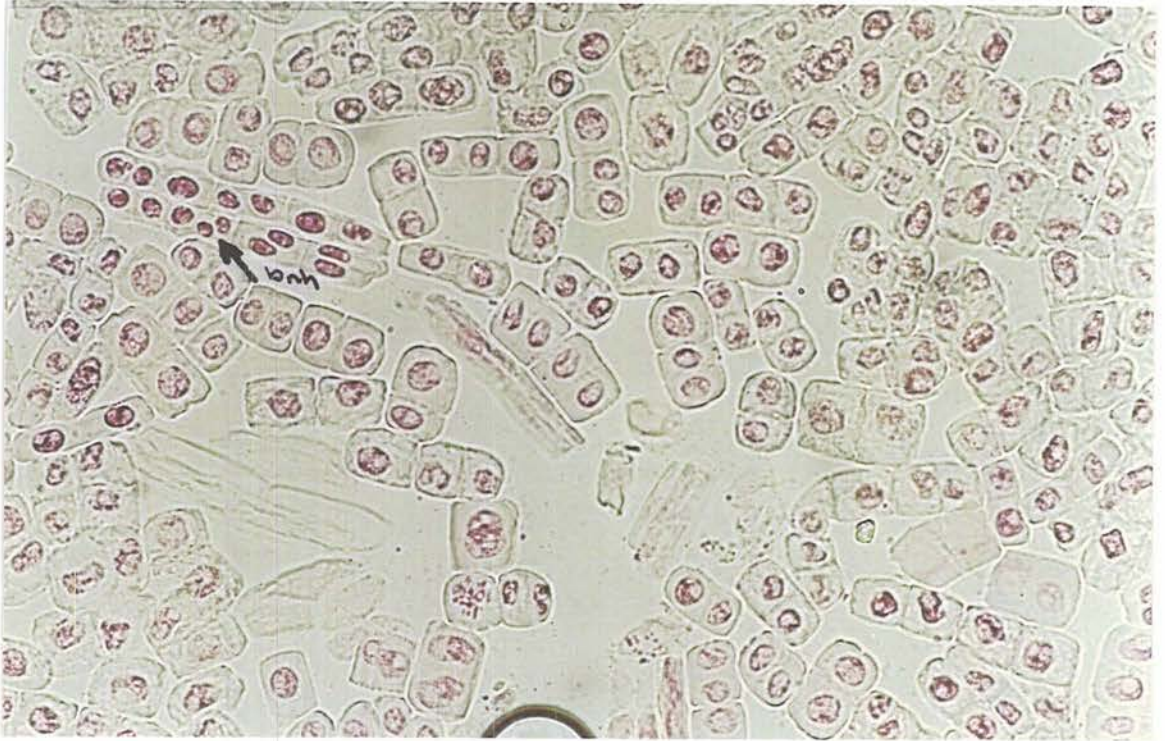
### 3. 1. 7. 2000 ppm'lik Piridin Çözeltilerinden Hazırlanan Kök Uçlarının Sitolojik Özelliği

2000 ppm'lik piridin çözeltisinde yetiştirilen soğanların kök uçlarından hazırlanan preparatlarda gözlenenler, 1000 ppm'lik piridin çözeltisinden hazırlanan preparat gözlemlerine oldukça benzemektedir. Yine hücre bölünmesine oldukça azalmış olup, erken profaz ve interfaz dışında hemen hemen hiçbir evreye rastlanmamıştır. Birçok hücrede nükleer materyalin çepere çok yakın olmak üzere belirli bölgelerde yoğunlaştığı ve merkezden uzaklaştığı gözlenmiştir.

2000 ppm de, 1000 ppm de gözlenen anomaliler gözlenmiştir (Şekil 3.33-3.36). MI;  $3.49 \pm 0.20$ , anomali yüzdesi ise  $0.67 \pm 0.27$  bulunmuştur.



Şekil 3.33 ve 3.34. 2000 ppm'lik Piridin Çözeltilerinde Çimlenen Kök Ucu Hücrelerinde Binükleer hücre (bnh) ve Çekirdek Deformasyonu (x20'lik büyütme).



Şekil 3.35 ve 3.36. 2000 ppm'lik Piridin Çözeltilerinde Çimlenen Kök Ucu Hücrelerinde Mikro çekirdek (mç) ve Binükleer Hücre (bnh) (x20'lik büyütme).

#### 4. TARTIŞMA

Bu çalışmamızda; günümüz teknolojisinde, alkol denaturasyonunda, boya ve lastik sanayisinde, fungusit, herbisit, pestisit üretiminde, tıpta ilaç yapımında, yaygın olarak kullanılan ve biyolojik etkileri *in vivo* ve *in vitro* olarak araştırılmış olan piridinin *Allium cepa*'nın büyümesi ve kök ucu hücrelerindeki olası toksik etkisi araştırılmıştır.

Çalışmamızda doz tespiti yapılırken, 2000 ve üzerinin oldukça toksik olmasından dolayı test solüsyonu olarak piridinin bu değer altında iki kat aralıklı konsantrasyonları seçtik. Seçilen bu değerler, literatürde kullanılan doz değerlerinin arasında bulunmaktadır (Riebe ve ark. 1982; Florin ve ark. 1980).

Farklı konsantrasyonlarda büyütülen soğanların kök uzunlukları doza bağlı olarak önemli derecede uzunluk bakımından azalmıştır. Aynı zamanda, çap olarak daha kalın ve jelimsi yapılar olarak gözlenen kök morfolojisi piridinin önemli derecede, *Allium cepa* kökleri üzerine etkili olduğunu göstermektedir. Literatüre baktığımızda, piridinin bitkiler üzerine etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmazken, *in vivo* ve *in vitro* çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Bakteri ve hayvan hücresi ile yapılan bu çalışmalarda piridinin bakterilerde büyümeyi yavaşlatıcı bir etkisinin olmadığı ancak hayvan hücrelerinde büyümeyi yavaşlattığı görülmüştür. (Florin ve ark. 1980; Kawachi ve ark. 1980; Riebe ve ark. 1982; Haworth ve ark.1983).

Zimmerman ve ark. (1986)'da % 1.1'lik piridinin *S.cerevisiae*' da aneuploidiye neden olduğu ve muhtemelen bunun, mikrotübül oluşumunun bozduğu için meydana geldiğini ileri sürdüler. Bizim elde ettiğimiz bulgular, piridinin her dozu için önemli derecede, c-metafaz, uyardığını göstermesinden dolayı, Zimmerman ve arkadaşlarının bulgularını farklı organizmalarda olsa desteklemektedir. Piridin, soğan kök ucu hücrelerinde de mikrotübül oluşumunu engellemiş olabilir.

Literatüre baktığımızda bizim belirlediğimiz piridin dozları, literatürde belirtilen dozlar arasında kalmaktadır (Florin ve ark. 1980; Riebe ve ark. 1982; Haworth ve ark.1983). Ama yalnızca 4300 ppm'lik piridinin, sekse bağlı çekinik öldürücü (sex-linked ressesive lethal-SLRL) testinde pozitif sonuç elde edilmiştir

(Mason ve ark. 1992). Bu pozitif sonucun dışında ise çok az olarak piridin metabolitlerinin mutajenik etkisi rapor edilmiştir (Nagao ve ark. 1972). Bu çalışmada kullanılan dozlar, daha düşük olmasına rağmen, şimdiye kadar denenmemiş olan *Allium cepa* kök uçlarında önemli derecede toksik etkisi gözlenmiştir. Gözlenen bu etki özellikle mitotik indeksin düşmesi, kromozom köprüsü, yapışkanlılık, bozulmuş anafaz-telofaz, c-metafaz oluşması gibi genellikle mitoz anomalisi şeklinde ve bazı kromozom anomalisi şeklinde gözlenmiştir.

Çalışmamızda, genel olarak piridinin doza bağlı etkisi gözlenmiştir. Doz arttıkça özellikle kromozom köprüsü, yapışkanlılık, bozulmuş anafaz-telofaz, c-metafaz oluşması azalmıştır. Bu azalma muhtemelen mikrotübül sentez inhibisyonundan kaynaklanmaktadır. En yüksek 2 dozda mitotik indeks düştüğü için yukarıdaki anomaliler gözlenememiş az sayıda mikro çekirdek ve binükleer hücre gözlenmiştir. Binükleer hücre görülmesi, protein sentezinin durması sonucu hücre bölünmesinin tamamlanamaması veya çeper kaynaşması sebebi ile olabilir. Pozitif kontrole göre c-metafaz evresi tüm konsantrasyonlarda yüksektir. Bu da iğ ipliklerinin inhibe edildiği anlamına gelebilir.

Mikro çekirdek oluşumunun diğer anomalilere göre az ya da hiç olmaması, daha önce genotoksik etkisinin belirlenmesi için yapılan araştırmalar ile örtüşmektedir. Böylece bu sonuçlar, piridinin etkisinin DNA düzeyinden çok sitoplazma ve çekirdekteki protein ve yapısal elemanlar üzerine olduğunu düşündürmektedir.

Sonuç olarak, çok geniş alanlarda yaygın olarak insanın karşı karşıya kaldığı bir kimyasal olan piridin, bu güne kadar yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda genellikle negatif sonuç vermesine karşın, bu çalışmada *Allium cepa* üzerine genotoksik etkiden ziyade sititoksik açıdan oldukça etkili bulunmuştur. Bu bulgular, piridin ile daha fazla ve farklı sistemlerde araştırmalar yaparak toksik etkisinin araştırılmasını öngörmektedir.

## 5. KAYNAKLAR

ABRAHAM, S., *Studies on cytological changes induced by muriate of potash in Allium cepa*, Cytologia, **62**, 291-294 (1997).

ANDERSON, R.C., *90 day sub chronic oral toxicity in rats*, **1**, Report to Dynamac Corporation, Rockville, M.D., by Arthur D. Little, Inc., Cambridge (1987).

ATEEQ, B., ABDUL, F.M., NIAMAT, M., AHMAD, W., *Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by Allium root tip test*, Mutation Research **514**, 105-113 (2002).

BAXTER, J.H. ve MASON, M.F., *Studies of the mechanisms of the liver and kidney injury comparison of the effects of pyridine and methyl piridinium chloride in the rat*, J. Pharmacol Exp, **91**, 350-356 (1947).

BAXTER, J.H., *Hepatic and renal injury with calcium deposits and cirrhosis produced in rats by pyridine*, Am. J. Pathol, **24**, 503-525 (1948).

BROWN, B., AVALOS, J., LEE, C. ve DOOLITTLE, D., *Effect of tobacco smoke, nicotine and cotinin on the mutagenicity of 4-(metilnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL)*, Mutation Research, **498**, 21-22 (2001).

CABRERA, G.L. ve RODRÍGUEZ, D.M.G., *Genotoxicity of leachates from a landfill using three bioassays*, Mutation Research, **426**, 207-210 (1999).

COULSON, R.A. ve BRAZDA, F.G., *Influences of chlorine, cystine, and methionine on toxic effects of pyridine and certain related compounds*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **69**, 480-487 (1948).

ELÇİ Ş. 'Sitogenetikte araştırma yöntemleri ve gözlemler', 100. Yıl Üniversitesi yayınları, No:18, Van 1994

FISKESJÖ, G., *The Allium test an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions*, Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, **197**, 243-260 (1988).

FISKESJÖ, G., *The allium test as a standard in environmental monitoring*, Hereditas, **102**, 99-112 (1985).

FISKESJÖ, G., *Allium test I: a 2-3 day plant test for toxicity assessment by measuring the root growth of onions, environmental toxicology and water quality*, **8**, 461-470 (1993).

FLORIN, I., RUTBERG, L., CURVALL, M. ve ENZELL, C.R., *Screening of tobacco smoke constituents for mutagenicity using the ames test*, Toxicology, **15**, 219-232 (1980).

GOPALAN, H.N.B., *Ecosystem health and human Well being: the mission of the international programme on plant bioassays*, Mutation Research, **426**, 99-102 (1999).

GÖMÜRGEN, A.N., *Cytological Effect of the Herbicide 2,4-D isooctylester 48% on root Mitosis of Allium cepa*, Cytologia, **64**, 383-388 (2000).

GROVER, I.S. ve KAUR, S., *Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the Allium root anaphase aberration and micronucleus assays*, Mutation Research, **462**, 183-188 (1999).

HAWORTH, S., LAWLOR, T., MORTELMANS, K., SPECK, W. ve ZEIGER, E., *Salmonella mutagenicity test results for 250 chemicals*, Environ. Mutagen., **5** (suppl. 1), 3-142 (1983).

http-1: <http://www.biyolojiplatformu.org/kongre/8kon2001/summ.html>

http-2: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp52-c1.pdf>

http-3: <http://www.apvma.gov.au/publications/prspic.pdf>

http-4: [http://ntp-server.niehs.nih.gov/htdocs/LT\\_rpts/tr470.pdf](http://ntp-server.niehs.nih.gov/htdocs/LT_rpts/tr470.pdf)

İKİZLER, A., *Heterohalkalı bileşikler*, Karadeniz Üniversitesi, Karadeniz Üniversitesi Basım Evi (1985).

JONES, R.N.ve RICKARDS, G.K., *Practical genetics*, John wile & Sons, New York (1992).

KAISER, J.P., FENG, Y. ve BOLLAG, J.M., *Microbial metabolism of pyridine, quinoline, acridine and their derivatives under aerobic and anaerobic conditions*, Microbiological Reviews, **60**, 483-493 (1996).

KAWACHI, T., KOMATSU, T., KADA, T., ISHIDATE, M., SASAKI, M., SUGIYAMA, T. ve TAZIMA, Y., *Results of recent studies on the relevens of various short-term screening tests in Japan, in the predictive value of short term screening tests in carcinogenicity evaluation*, Elsevier/North Holland Biomedical Press, New York (1980).

KAYMAK, F., *Effects of aluminium ( $Al^{3+}$ ) on the root meristem cells of Allium cepa L. and Allium sativum L.* Tr. J. Of Biology, **20**, 139-145 (1996)

MARCO, A.D., ROMANELLI, M., STAZI, A. ve VITAGLIANO, E., *Introduction of micronucleated cells in Vicia faba and Allium cepa root tips treated with nitroliacetic acid (NTA)*, Mutation Research/Genetic Toxicology, **171**, 145-148 (1986).

MASON, J.M., VALENCIA, R. ve ZIMMERING, S., *Chemical mutagenesis testing in Drosophila: VIII. Reexamination of equivocal results*. Environ. Mol. Mutagen., **19**, 227-234 (1992).

MCGREGOR, D.B., BROWN, A., CATTANACH, P., EDWARDS, I., MCBRIDGE, D., RIACH, C. ve CASPARY, W.J., *Responses of the L5178Y tk<sup>+</sup>/tk mouse lymphoma cell forward mutation assay: III. 72 coded chemicals*, Environ. Mol. Mutagen., **12**, 85-154 (1988).

MONARCA, S., FERETTI, D., COLLIVIGNARELLI, C., GUZELLA, L., ZEBRINI, I., BERTANZA, G. ve PEDRAZZANI, R., *The influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban wastewater*, Wat. Res. **34**, 4261-4269 (2000).

NAGO, M. ve SUGIMURA, T., *Sensitivity of repair-deficient mutants and similar mutants to 4-nitroquinoline 1-oxide, 4-nitropyridine 1-oxide, and their derivatives*, Cancer Res., **31**, 2369-2374 (1972).

NEFF, J.S., *Pyridine and other coal tar constituents as free radical-generating environmental neurotoxins*, Mol. Cell. Biochem., **84**, 217-222 (1986).

ÖZTÜRK, S., GÜVENÇ, S., ARIKAN, N. ve YILMAZ, Ö., *Effect of usnic acid on mitotic index in root tips of Allium cepa*, Lagasalia, **21**, 47-52 (1999)

POLLOCK, L.J., FINKELMAN, I. ve ARRIEF, A.J., *Toxicity of pyridine in man*, Arch. Intern. Med., **71**, 95-106 (1943).

RANK, J. ve NIELSEN, M.H., *Allium cepa anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosurea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate*, Mutation Research, **390**, 121-127 (1997).

RIEBE, M., WESTPHAL, K., FORTNAGEL, P., *Mutagenicity testing, in bacterial test systems, of some constituents of tobacco*, Mutat. Res., **101**, 39-43 (1982).

SAHİ, A.N. ve SINGH, R.N., *Fly-ash induced chromosomal aberrations in Allium cepa*, Cytobios, **86**, 23-28 (1996).

TE-HSIU M.A., *The International program on plant bioassays and the report of the follow-up study after the hands-on workshop in China*, Mutation Research, **426**, 103-106 (1999).

ÜN, R., *Organik halkalı bileşikler*, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul (1977).

ZIMMERMANN, F.K., HENNING, J.H., SCHEEL, I. ve DEHLER, M., *Genetic and anti-tubulin effects induced by pyridine derivatives*, Mutat. Res., **163**, 23-31 (1986).