

**FATMA CEREN ANLAŞ**

**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.**

**DOKTORA TEZİ**

**İSTANBUL-2014**

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

**DOKTORA TEZİ**

**AMOKSİSİLİN'İN ALABALIKLARDA  
(ONCORHYNCHUS MYKISS) İN VİVO GENOTOKSİK  
AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**FATMA CEREN ANLAŞ**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. OYA ÜSTÜNER**

**FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI  
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ PROGRAMI**

**İSTANBUL-2014**

**TEZ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Farmakoloji ve Toksikoloji Programında Fatma Ceren ANLAŞ tarafından hazırlanan Amoksisilin'in Alabalıklarda (*Oncorhynchus mykiss*) İn Vivo Genotoksik Aktivitesinin Değerlendirilmesi başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

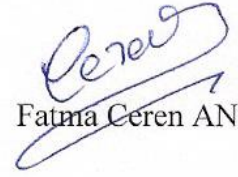
26 / 02 / 2014

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof. Dr. Oya ÜSTÜNER (Tez Danışmanı) (İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Abd.)	
2.Prof. Dr. Murat YILDIRIM (İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Abd.)	
3.Prof. Dr. Tülay BAKIREL ( Tez Komitesi Üyesi) (İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Abd.)	
4.Prof. Dr. Gülden Z. OMURTAG (Tez Komitesi Üyesi) (Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Abd.)	
5.Prof. Dr. Gülhan Türkay HOŞTÜRK (İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Abd.)	

**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

  
Fatma Ceren ANLAŞ

## İTHAF

Anneannem Nezahat MUĞAN ve büyükbabam Prof. Dr. Nuri MUĞAN'a  
ithaf ediyorum.

## TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında bana destek olan ve yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Oya ÜSTÜNER'e,

Değerli bilgi ve önerileriyle çalışmaya yön veren hocalarım Prof. Dr. Murat YILDIRIM, Prof. Dr. Tülay BAKIREL, Prof. Dr. Gülden OMURTAG ve Doç. Dr. Nagihan GÜLSOY'a,

Çalışmam süresince bilgisi ve yardımları ile yanımda olan Dr. Fulya ÜSTÜN ALKAN'a,

Çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. Ataman Bilge SARI, Cumali TÖLÜ ve Berk Özcan ATALAY'a,

İstatistiksel hesaplamalardaki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Bülent EKİZ'e,

Başta annem ve babam olmak üzere hayatımın her aşamasında beni destekleyen ve varlıklarıyla bana güç veren sevgili aileme,

Çalışmam süresince gösterdiği yardım, anlayış ve hoşgörü ile desteğini her zaman yanımda hissettiğim eşim Veteriner Hekim Tanju ANLAŞ'a teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 10947.

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	X
ÖZET .....	Xİ
ABSTRACT.....	Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Genetik Toksikoloji .....	3
2.1.1. Sucul Ekosistemde Genetik Toksikolojinin Önemi ve Değerlendirilmesi .....	4
2.1.1.1. Ames Testi .....	7
2.1.1.2. Escherichia coli WP2 Testi .....	8
2.1.1.3. Kromozom Aberasyon Testi .....	8
2.1.1.4. Kardeş Kromatid Değişim Testi.....	8
2.1.1.5. Comet Yöntemi .....	9
2.1.1.6. Mikronükleus Testi .....	15
2.2. Gökkuşuğu Alabalığı ( <i>Oncorhynchus mykiss Walbaum, 1972</i> ) .....	19
2.2.1. Gökkuşuğu Alabalığının Genel Özellikleri.....	19
2.2.2. Ülkemizde Yetiştiricilik Açısından Gökkuşuğu Alabalığının Önemi .....	21
2.3. Balıklarda Antibiyotik Kullanımı .....	21
2.3.1. Antibiyotiklerin Sucul Canlılar Üzerindeki Etkileri .....	24
2.3.2. Amoksisilin .....	26
2.3.2.1. Amoksisilin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri .....	26
2.3.2.2. Amoksisilin Etki Mekanizması .....	27
2.3.2.3. Balıklarda Amoksisilin Kullanımı .....	27
2.3.2.4. Amoksisilin Genotoksitesisi .....	28

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
3.1. Deney Hayvanları .....	31
3.2. Balık Tankları .....	31
3.3. Suyun Özellikleri .....	32
3.4. Balıklarda Gerçekleştirilen Uygulamalar .....	32
3.4.1. İlaçlı Yemin Hazırlanması .....	33
3.4.2. İlaçlı Yemin Uygulanması .....	34
3.4.3. Sedasyon Uygulanması .....	34
3.5. Comet Yöntemi.....	34
3.5.1. Kullanılan Aletler.....	34
3.5.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	35
3.5.3. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması .....	36
3.5.4. Lamaların Hazırlanması.....	37
3.5.5. Preparatların Hazırlanması.....	38
3.5.6. Preparatların Boyanması ve Değerlendirilmesi .....	38
3.5.7. İstatistiksel Değerlendirme .....	39
3.6. Mikronükleus Testi .....	39
3.6.1. Kullanılan Aletler.....	39
3.6.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	39
3.6.3. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması .....	39
3.6.4. Preparatların Hazırlanması.....	40
3.6.5. Preparatların Boyanması .....	40
3.6.6. Preparatların Değerlendirilmesi .....	40
3.6.7. İstatistiksel Değerlendirme .....	40
4. BULGULAR.....	41
4.1. Comet Yöntemi.....	41
4.2. Mikronükleus Testi .....	45
5. TARTIŞMA .....	50
KAYNAKLAR .....	60
ETİK KURUL KARARI .....	78
ÖZGEÇMİŞ .....	79



**TABLULAR LİSTESİ**

Tablo 2-1: Gökkuşığı alabalığının sistematikteki yeri .....	21
Tablo 2-2: Dünyada akuakültürlerde kullanımına izin verilen ilaç sayıları (119).....	23
Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan suyun fizikokimyasal özellikleri .....	32
Tablo 4-1: Gökkuşığı alabalıklarında ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) comet yöntemi ile elde edilen %DNA <sub>T</sub> değerleri .....	42
Tablo 4-2: Gökkuşığı alabalığı ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) eritrositlerinde tespit edilen MN frekansları (MN/2000 hücre) .....	47

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Comet görüntülerinin görsel analiz ile sınıflandırılması.....	13
Şekil 2-2: Balık eritrositlerinde mikronükleus görünümü .....	16
Şekil 2-3: Balık eritrositlerinde görülen nükleus anomalileri (77).....	17
Şekil 2-4: Gökkuşığı Alabalığı ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> Walbaum, 1972).....	20
Şekil 2-5: Amoksisilinin kimyasal yapısı .....	26
Şekil 2-6: Amoksisilin trihidratın kimyasal yapısı .....	26
Şekil 3-1: Çalışmada kullanılan balık tankları.....	32
Şekil 3-2: İlaçlı yemin hazırlanması .....	34
Şekil 3-3: Comet görüntülerinin değerlendirilmesi .....	38
Şekil 4-1: Negatif kontrol grubuna ait gökkuşığı alabalıklarında ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) elde edilen comet görüntüleri .....	43
Şekil 4-2: Siklofosamid uygulanan pozitif kontrol grubunda elde edilen comet görüntüleri.....	43
Şekil 4-3: 80 mg/kg amoksisilin uygulanan deney grubunda elde edilen comet görüntüleri.....	44
Şekil 4-4: 160 mg/kg amoksisilin uygulanan deney grubunda elde edilen comet görüntüleri.....	44
Şekil 4-5: 320 mg/kg amoksisilin uygulanan deney grubunda elde edilen comet görüntüleri.....	45
Şekil 4-6: Kontrol grubunda Gökkuşığı alabalığı ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) eritrositlerinin görünümü .....	48
Şekil 4-7: Uygulama gruplarında mikronükleus oluşumu .....	49

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

% DNA<sub>T</sub>: Kuyruktaki DNA yüzdesi

AGS: İnsan adenokarsinoma hücreleri

AMX: Amoksisilin

CA: Kromozom aberasyon

CHO: Çin hamster ovaryum

CP: Siklofosfamid

DLEC: Dicentrarchus Labrax embriyonik hücre serisi

DNA: Deoksiribonükleik asit

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

EtBr: Etidyum bromid

FAO: Food and Agriculture Organization of The United Nations, Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü

FDA: Food and Drug Administration, Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi

LC<sub>50</sub>: Letal konsantrasyon 50

LMA: Low melting agarose, Düşük erime dereceli agaroz

MN: Mikronükleus

NMA: Normal melting point agarose, Normal erime dereceli agaroz

RTG: Rainbow trout gonad

SCE: Kardeş kromatid değişimi

SCGE: Tek hücre jel elektroforez

UV: Ultraviyole

WHO: World Health Organisation, Dünya Sağlık Örgütü

## ÖZET

Anlaş FC. Amoksisilin'in Alabalıklarda (*Oncorhynchus mykiss*) İn vivo Genotoksik Aktivitesinin Değerlendirilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji ve Toksikoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2014.

Günümüzde bir çok ksenobiyotik başta ilaç uygulamaları olmak üzere çeşitli yollarla sucul ekosisteme ulaşmakta ve sucul organizmalar üzerinde mutasyon ve kansere sebep olabilecek genetik değişikliklere sebep olmaktadır. Amoksisilin geniş spektrumu nedeniyle veteriner hekimlikte sık kullanılan penisilin türevi bir antibiyotiktir. Balık yetiştiriciliğinde ise birçok bakteriyel enfeksiyonun sağaltımı ve kontrolü amacıyla kullanılmaktadır. Amoksisilin'in memeliler ve sucul canlılar üzerindeki genotoksik etkisi çeşitli test sistemlerinde değerlendirilmiş ve yapılan çalışmalarda tartışmalı sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Bu çalışmanın amacı, amoksisilin'in gökkuşuğu alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*) üzerindeki genotoksik etki potansiyelinin incelenmesidir. Bu amaç doğrultusunda, 10 gün süreyle oral yolla 80, 160 ve 320 mg/kg dozda amoksisiline maruz bırakılan balıklardan 3., 6., ve 10. günlerde kan alınarak mikronükleus ve comet testleri uygulandı. Her iki yöntemden elde edilen sonuçlar kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, 80 ve 160 mg/kg dozlarda amoksisilin uygulanan gruplardaki comet ve mikronükleus frekansları istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ( $P > 0,05$ ). İstatistiki değerlendirme sonucunda, 320 mg/kg dozda amoksisilin uygulanan grupta mikronükleus ve comet frekansında görülen artış ise anlamlı bulunmuştur ( $P < 0,001$ ). En yüksek DNA hasarı her iki test yönteminde de 6. günde saptanmıştır. Çalışmanın sonuçları, amoksisilin'in gökkuşuğu alabalıkları eritrositlerinde tedavi dozlarında genotoksik etki göstermediğine, yüksek dozda ise DNA hasarına sebep olduğuna işaret etmektedir.

**Anahtar Kelimeler :** Amoksisilin, Genotoksisite, Gökkuşuğu Alabalığı, Mikronükleus, Comet Yöntemi.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 10947

## ABSTRACT

Anlas FC. Evaluation of In Vivo Genotoxic Activity of Amoxicillin on Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmacology and Toxicology. Doctorate thesis. İstanbul. 2014.

Nowadays, many xenobiotics reach aquatic ecosystem via several reasons primarily drug administrations and these agents induce genetic alterations which can lead to mutation and cancer on aquatic organisms. Amoxicillin is a penicillin derivative antibiotic, frequently used in veterinary medicine due to its broad spectrum of activity. Also in aquaculture, amoxicillin is used for treat and control of several bacterial infections. Genotoxic effect of amoxicillin on mammals and aquatic organisms have been investigated by several genotoxicity test systems and controversial results have been reported in previous studies. The aim of the present study is to evaluate the genotoxic effect of amoxicillin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). According to this purpose, fish were orally exposed to amoxicillin at 80, 160 and 320 mg/kg during 10 days, afterwards samples of blood were taken on days 3<sup>rd</sup>, 6<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup> and micronucleus test and comet assay were applied. Micronucleus and comet frequency in 80 and 160 mg/kg amoxicillin administrated groups were found insignificant ( $P > 0.05$ ) when the results obtained with both test systems were compared with control group. According to statistical evaluation, the increase of micronucleus and comet frequency at 320 mg/kg administrated group was found significant ( $P < 0.001$ ). The highest DNA damage was determined on day 6, by both test systems. Results of the study indicated that amoxicillin has not genotoxic effect in rainbow trout erythrocytes at therapeutic dose however; amoxicillin leads to DNA damage at high concentration.

Key Words: Amoxicillin, Genotoxicity, Rainbow Trout, Micronucleus Test, Comet Assay.

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 10947

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Su ürünleri, dünyadaki besin ihtiyacını yüksek oranda karşılayan önemli bir hayvansal protein kaynağıdır. Birleşmiş milletlere göre yılda ortalama 78 milyon büyüyen dünya nüfusunun 2030 yılına kadar 8 milyara ulaşacağı ve buna bağlı olarak hayvansal ürün ihtiyacının iki kat artacağı düşünülmektedir (38). Dünya nüfusunun hızla artmasına paralel olarak, su ürünlerinin insan beslenmesinde temel protein kaynağı olarak kullanımı da önemini giderek arttırmaktadır. Yapılan çalışmalar, dünyadaki toplam su ürünlerinin %81'inin insanlar tarafından besin kaynağı olarak tüketildiğini ve hayvansal protein ihtiyacının %20'sini karşıladığını bildirmektedir (40, 52).

Endüstriyel gelişmenin bir sonucu olarak, günümüzde sucul ortamdaki kirliliğin önemli oranda arttığı ve bu kirlenmenin başta balıklar olmak üzere ekosistemdeki canlılar üzerinde kanserojenik ve mutajenik etkilere sebep olduğu bilinmektedir (78, 146). Genotoksisite araştırmaları, son yıllarda sucul ekosistemde gerçekleştirilen toksisite çalışmaları arasında araştırmacıların önemle üzerinde durdukları bir konu olmuştur. Sucul çevrenin genotoksik kimyasallar ile kontaminasyonu, ortamdaki canlı popülasyonu ve çevre sağlığının yanı sıra, su ürünlerinin insan gıdası olarak tüketimi sonucu toplum sağlığı yönünden de sakınca oluşturmaktadır (144). DNA molekülünün her canlıda benzer yapıda olması ve balıkların genotoksik ajanlara karşı yüksek omurgalılara benzer yanıtlar vermeleri nedeniyle bu türde DNA hasarına sebep olabilen bir bileşik insanlar ve diğer yüksek omurgalılarda da benzer etkiler gösterebilmektedir (17, 89). Bütün organizmalarda var olan türler arası genetik benzerlikler göz önüne alındığında, balıklarla yapılan çalışmaların sonuçlarının diğer türler için de veri kaynağı olabileceği düşünülmektedir (30).

Solunum için yüksek oranda su kullanan balıkların ekosistemdeki genotoksik bileşiklere yoğun olarak maruz kalmaları, sulardaki kirleticileri akümüle edebilme özellikleri ve besin zincirinde önemli rol oynamaları nedeniyle sucul ortamdaki genotoksisitenin izlenmesinde birçok balık türü biyo- indikatör canlılar olarak tercih edilmektedirler (100).

Dünyada ve ülkemizde 1970'li yıllardan beri hızlı bir gelişim gösteren su ürünleri yetiştiriciliği, Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından dünyada en hızlı büyüyen gıda üretim sektörü olarak bildirilmiştir (54). Su ürünleri yetiştiriciliğinin

büyümesine paralel olarak, sucul ekosistemde bakteriyel ve paraziter enfeksiyonların insidensindeki artış önemli bir sorun haline gelmiştir. Yetiştiricilikte stoklama yoğunluğunun fazla olması gibi olumsuz çevresel koşulların, balıklar için ciddi stres faktörü olduğu ve patojenlere karşı duyalılığı arttırdıkları saptanmıştır.

Kültür balıkçılığında antibakteriyel kemoterapinin 50 yılı aşkın süredir uygulanmasının, bu ilaçların ve metabolitlerinin sucul ekosistemde birikimine ve sistem organizmaları üzerinde çok yönlü olumsuz etkilere neden olduğu bilinmektedir (71). Yapılan çalışmalar balık hastalıklarının tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanların akut toksik etkilerinin yanı sıra, sucul canlıların DNA'ları üzerinde de hasara sebep olabileceğini göstermektedir (25, 74). Bu durum, endüstriyel atıklar ve tarımsal amaçla kullanılan bileşiklerin yanı sıra balıklarda kullanılan kemoterapötik bileşiklerin de genotoksik etki potansiyellerini değerlendirme zorunluluğunu doğurmuştur.

Amoksisilin, balıklardaki birçok sistemik bakteriyel enfeksiyonun sağaltımında kullanılan beta laktam türevi bir antibiyotiktir. Amoksisilinin memeliler üzerindeki genotoksik etkisi farklı organizmalarda gerçekleştirilen çeşitli genotoksisite testlerinde incelenmiş ve elde edilen sonuçların tartışmalı olduğu görülmüştür (8, 73, 90). Amoksisilinin balıklar üzerindeki genotoksisitesi ile ilgili veriler ise oldukça yetersizdir. Bu bilgiler doğrultusunda genotoksik etki potansiyeli hakkında farklı görüşler bildirilen amoksisilinin hedef tür olan gökkuşağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*) üzerindeki genotoksisitesinin *in vivo* koşullarda comet yöntemi ve mikronükleus testi ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Genetik Toksikoloji

Genetik Toksikoloji, kalıtım materyali olan DNA üzerinde fiziksel veya kimyasal ajanlar tarafından meydana getirilen hasarı inceleyen bilim dalıdır. İlk kez 1927 yılında Hermann Muller tarafından (97, 124) X ışınlarının meyve sineği (*Drosophila*) üzerinde mutasyona sebep olduğunun belirlenmesi ile başlayan genotoksisite çalışmaları, günümüzde ksenobiyotiklerin yaygınlığına bağlı olarak önemini giderek arttırmaktadır.

İnsanlarda genotoksik maddelere maruziyet ile genotoksik etkinin ortaya çıkması arasında uzun bir periyot vardır. Bu nedenle genotoksik bileşiklerin deney hayvanları aracılığıyla belirlenmesi, insanlarda risk tayini ve genotoksik bileşiklere maruziyetin önlenmesi açısından oldukça önemlidir (143).

Genetik Toksikoloji'nin araştırma alanları şu şekilde özetlenebilir (106):

- Olası kanserojen bileşiklere maruz kalma riskini azaltmak amacıyla mutajenik ve kanserojenik maddelerin belirlenmesi
- Üreme hücrelerinde mutasyonlara yol açarak kalıtsal anomalilere sebep olabilmeleri nedeniyle, genotoksik maddelerin teratojenik özelliklerinin belirlenmesi
- Ekosistemde bulunan genotoksik bileşikler ve bu bileşiklere maruz kalan bireylerde "Genotoksik Hastalık Sendromu" olarak adlandırılan yapısal çoğalma ve kayıpların araştırılması

Genotoksik bileşikler etkilerini doğrudan DNA üzerinde hasar oluşturarak gösterebilecekleri gibi, onarım mekanizmalarında bozukluklara sebep olarak da DNA hasarının frekansını arttırabilirler. DNA molekülünde meydana gelen hasar onarılmadığı takdirde kontrollü hücre ölümü olarak tanımlanan apoptozis, mutasyon veya kanser gibi kalıcı değişiklikler gözlemlenebilir (41). Ağır hasarlar apoptotik mekanizmaların uyarılmasıyla hücrenin ölümüne sebep olurken, orta dereceli hasarlar genellikle mutasyon ile sonuçlanmaktadır (58).

DNA üzerinde spontan olarak veya kimyasal ve fiziksel ajanların etkisiyle meydana gelen kalıcı değişikliklere "mutasyon" adı verilmektedir. Bu değişiklikler tek



bir geni veya gen bloğunu kapsayabileceği gibi tüm kromozomu da etkileyebilir. Kromozomların sayı ve yapısındaki değişiklikleri kapsayan mutasyonlar “kromozom mutasyonları” olarak adlandırılırken, kromozom seviyesinde gözlemlenemeyen fakat bireysel organizmalardaki fenotipik değişikliklerle saptanabilen mutasyonlara ise “nokta mutasyonları” adı verilmektedir (82). Mutasyonlar canlıların somatik veya gamet hücrelerinde meydana gelebilir. Gamet hücrelerinde meydana gelen mutasyonlar sonraki nesillere aktarılması açısından önemliken, somatik hücrelerde meydana gelen mutasyonların kansere sebep olabileceği bilinmektedir.

Genetik değişiklikler ile kanser arasında nedensel bir ilişkinin varlığı birçok deneysel ve epidemiyolojik veri ile desteklenmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, birçok kanserojen bileşiğin mutajenik etkisinin de bulunduğunu ortaya koymuştur (37, 105, 143). Mutajenite ile karsinogenite arasındaki bir diğer ilişki de DNA onarım mekanizmalarının etkilenmesi sonucunda görülmektedir. Tüm canlılar, genetik materyallerini çevresel tehditlere karşı korumak amacıyla DNA onarım mekanizmaları içerirler. Oluşan DNA hasarının onarılması, hücrenin genomik kararlılığını sürdürmesinde önemli rol oynar. Genotoksik ajanlara maruziyet sonucunda açığa çıkan onarım hatalarının kanser riskini arttırdığı bilinmektedir (37, 105). Bu doğrultuda, genotoksik etkinin saptanmasına yönelik çalışmalarla çok düşük konsantrasyonlarda bile etkili olabilen bu maddelerin kanserojen etki potansiyellerinin de değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

### **2.1.1. Sucul Ekosistemde Genetik Toksikolojinin Önemi ve Değerlendirilmesi**

Sucul ekosistemde, UV ışınları ve radyasyon gibi fiziksel faktörlerin yanı sıra endüstriyel atıklar, pestisitler ve ilaçlar gibi kimyasallar da DNA hasarına sebep olabilmektedir. Akuakültürlerdeki genotoksisite çalışmalarında başta balıklar olmak üzere diğer sucul organizmalar ve bitkilerden yararlanılmaktadır. Balıklar, genotoksik bileşiklere karşı yüksek omurgalılara benzer tepkiler vermeleri nedeniyle insanlar için olası kanserojen ve teratojen maddelerin belirlenmesine yönelik çalışmalarda tercih edilmektedirler (4). Genotoksik kimyasallarla kontamine olmuş içme sularının insanlarda oluşturabileceği hasarın önceden belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda da model organizma olarak balıkların kullanıldığı görülmektedir (33).

Genotoksik bileşikler, memelilerde olduğu gibi balık türleri üzerinde de farklı etkilere sebep olabilmektedirler. Oluşan hasar, DNA onarım mekanizmaları tarafından

tamir edilebileceği gibi, onarım gerçekleşmediği takdirde gamet hücrelerinde meydana gelen hasarlar gelişme bozuklukları, canlı embriyo, larva ve yetişkin sayısında azalmaya, somatik hücrelerdeki hasarlar ise kontrolsüz hücre proliferasyonuna yol açarak kanser oluşumunu indükleyen çok sayıda genetik değişikliğe sebep olmaktadır (59, 148). Yapılan çalışmalar, son yıllarda balıklarda ksenobiyotik kaynaklı tümör olgularında büyük artış olduğunu bildirmektedir. Ayrıca balıklarda görülen ksenobiyotik kaynaklı tümörlerde, ras geninde karakteristik mutasyonların bulunduğu saptanması, genotoksik bileşiklere maruziyet ile kanser oluşumu arasındaki bağlantıyı göstermesi açısından önemli bir bulgudur (125). Bunun yanı sıra, genotoksik kimyasallar yüksek aktiviteleri nedeniyle balıklarda teratojenik problemlere ve gamet hücrelerinde oluşturdukları mutasyonlar aracılığıyla kalıtsal defektlere de neden olabilmektedir. Balıklarda üremenin engellenmesi en az kanser oluşumu kadar önemli ve istenmeyen bir sonuçtur (95). Balıkların insan beslenmesindeki önemi göz önüne alındığında genotoksik maddelerin balık DNA'sı üzerindeki etkilerinin izlenmesi insan sağlığı açısından da büyük önem taşımaktadır.

Ekosistemdeki kirleticilere maruziyet sonucu sucul canlılarda görülen etkiler Kurelec (88) tarafından "Genotoksik Hastalık Sendromu" olarak tanımlanmıştır. Kurelec, balıklarda genotoksik etkinin sonucu olarak tümör oluşumunun yanı sıra protein yıkımına sebep olabilecek enzim fonksiyon bozuklukları, metabolik problemler, immunolojik etkiler, adaptasyon bozuklukları, üremenin azalması gibi çok sayıda fonksiyon bozukluğunun da görülebileceğini bildirmiştir. Genotoksik hastalık sendromu, DNA hasarına sebep olan bileşiklerin, ekosistem üzerinde geri dönüşümsüz toksik etkilere yol açabileceğini gösteren önemli bir bulgu kabul edilmektedir (35).

Sucul ekosistemdeki genotoksisitenin izlenmesinde, DNA hasarına yol açan bileşiklerin genotoksik etki mekanizmalarının anlaşılması da önemlidir. Bu amaçla genotoksik etkili bileşikler dört kategoride değerlendirilir (35):

1. Direkt olarak DNA'yı etkileyen bileşikler
2. Metabolitleri aracılığıyla DNA hasarına sebep olan bileşikler
3. Reaktif radikaller oluşumu gibi sekonder etkiler aracılığıyla DNA hasarını indükleyen bileşikler
4. DNA sentezini ve onarımını inhibe eden bileşikler

Genotoksik etki mekanizmaları temel olarak dört başlık altında değerlendirilse de, bir çok bileşiğin etkisi birden fazla mekanizmanın ortak sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Örneğin; iyonik yapılu civa bileşikleri direkt olarak DNA'yı etkileyerek zincir kırılmalarına neden olurken aynı zamanda DNA onarım mekanizmalarını da inhibe etmektedir.

Balıklarda genotoksisitenin doğru olarak değerlendirilebilmesi birçok faktöre bağlı olan zorlu bir süreçtir. Genotoksik ajanların DNA'da meydana getirdiği hasarlar; tek veya çift zincir kırılmaları, baz modifikasyonları veya kayıpları, DNA zincirleri arasındaki veya DNA ile proteinler arasındaki çapraz bağ oluşumlarıdır. Hasarın tipi ve şiddeti bileşiğe bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Ancak sucul ekosistem kapsamında değerlendirildiğinde, genotoksik bileşiklerin bireysel olarak DNA'da oluşturdukları hasar çeşidinin saptanabilmesi oldukça güçtür. Bunun nedeni sucul organizmaların bu kirleticilere genellikle katı- sıvı atıklar gibi kompleks karışımlar şeklinde maruz kalmalarıdır (35, 75, 84). Bunun yanı sıra, sucul ekosistemde "pro-genotoksikant" olarak tanımlanan krizoidin gibi çok sayıda bileşiğin metabolik aktivasyon sonucu genotoksik etki potansiyeli kazandığı bilinmektedir. Balıklarda biyotransformasyonla ilgili verilerin oldukça yetersiz olması nedeniyle, bu bileşiklerin genotoksik etki potansiyellerinin değerlendirilebilmesi de oldukça zordur. Ayrıca rasyondaki mevsimsel değişimler, çevresel koşullar ve hormonal durum gibi çeşitli faktörler biyotransformasyonda görevli enzim sistemlerini etkileyerek bileşiklerin biyoaktivasyon ve detoksifikasyonunu önemli ölçüde değiştirebilmektedir (35, 84).

Yapılan çalışmalar, sucul ekosistemde genotoksik etkinin değerlendirilmesinde tür duyarlılığının da önemli rol oynadığı göstermektedir. Siklofosamid ve mitomisin C gibi genotoksik etkili oldukları bilinen bileşiklere aynı koşullarda maruz bırakılan çeşitli balık türlerinde oluşan DNA hasarı incelendiğinde, bileşiklerin genotoksik etkilerine karşı *Tilapia rendalli* 'nin en duyarlı tür olduğu, *Cyprinus carpio* 'nun ise diğer türlere göre daha az duyarlılık gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır (64).

Bir bileşiğin balıklardaki genotoksisitesi hakkında kesin bir sonuca varabilmek ve güvenilir veriler elde edebilmek için (5):

- Bileşiğin genotoksik potansiyeli birkaç farklı balık türü üzerinde değerlendirilmelidir.

- Sonuçların değerlendirilmesinde doz- cevap ilişkisi göz önüne alınmalıdır.
- Elde edilen sonuçlar hayvan, bitki ve insan hücreleriyle gerçekleştirilen çalışmaların sonuçları ile karşılaştırılmalıdır.
- Çalışmada negatif ve pozitif kontroller kullanılmalıdır.

Genotoksik kontaminantlardan kaynaklanan hasarların saptanmasında DNA eklentisi oluşumu, kromozom aberasyonları, DNA zincir kırılmaları ve mikronükleus frekansının ölçülmesi gibi parametreler değerlendirilmektedir (77). Sucul ekosistemdeki genotoksisite çalışmalarında, memeliler için hazırlanmış olan genotoksisite testleri çeşitli şekillerde modifiye edilerek *in vivo* ve *in vitro* koşullarda uygulanmaktadır. Memelilerde DNA hasarının incelenmesinde en çok tercih edilen ve balıklarda da uygulanabilirliği olan bu yöntemler mikronükleus testi, kardeş kromatit değişim testi (SCE), kromozom aberasyon testi (CA), tek hücre jel elektroforezis yöntemi (SCGE) olarak da bilinen comet yöntemi ile Ames testi, *Escherichia coli* WP2 testi gibi bakteriyel test sistemleridir.

#### 2.1.1.1. Ames Testi

Ames testi ilk kez 1973 yılında Dr. Bruce N. Ames tarafından geliştirilmiş olan bir yöntemdir (6). Salmonella/ Mikrozoom test sistemi olarak da adlandırılan yöntem, kimyasal maddelerin mutajenik etkilerinin araştırılmasında yaygın olarak kullanılan, kısa süreli bakteriyel test sistemlerinden biridir.

Ames Testi, *Salmonella typhimurium*'un mutant suşları (TA 98 ve TA 100) ile gerçekleştirilmektedir. Bu suşlar, histidin aminoasidinin biyosentezinden sorumlu olan genin özel bir mutasyonunu içerirler. Testin prensibi, mutant bakterilerin maruz kaldıkları genotoksik bileşikler aracılığıyla geri mutasyona uğramaları ve histidin sentezleme yeteneklerini geri kazanmalarına dayanır. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan test bileşiklerinin sebep olduğu geri mutasyon sonucu oluşan bakteri üremesi negatif kontrol grupları ile karşılaştırılarak bileşiğin genotoksisitesi yorumlanır (6, 7).

Ames testi sucul organizmalarda (87) ve sedimentte (114) mutajenitenin ve karsinojenitenin belirlenmesi amacıyla uygulanmıştır. Ancak balıklarda son yıllarda daha pratik, hızlı ve kolay sonuç veren genotoksisite testleri tercih edilmektedir.

### 2.1.1.2. Escherichia coli WP2 Testi

Prensip olarak Ames testi ile benzerdir. Testin uygulanmasında, üremeleri için triptofana ihtiyaç duyan bakteri suşları kullanılır. Triptofan biyosentezini gerçekleştiremeyen mutant *E. Coli WP2* suşları test bileşiğine maruz bırakılır. İnkubasyon periyodunun ardından geri mutasyon geçirerek üreme yeteneğini geri kazanmış suşlar kontrol grupları ile karşılaştırılır (96).

Bakteriyel test sistemleri genotoksisitenin saptanmasında her zaman yeterli duyarlılığa sahip olmayabilir. Escherichia coli WP2 testi ile sucul ekosistemde atık sulardaki genotoksisitenin değerlendirildiği sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

### 2.1.1.3. Kromozom Aberasyon Testi

Kromozom aberasyon testinde öncelikle hücre kültürlerine mitoz bölünmeyi uyaran fitohemaglutinin ve benzeri spesifik bir antijen ilave edilerek inkubasyona bırakılır. Değerlendirme kromozomların en rahat gözlemlenebildiği metafaz aşamasında yapılacağından, genotoksik etkisi incelenecek olan bileşik uygulandıktan sonra kolşisin gibi metafaz durdurucu bir madde de uygulanmalıdır. Boyama işleminin ardından hücreler kromozom aberasyonları yönünden incelenir. Her konsantrasyon için en az 200 metafaz hücresi analiz edilir (102).

Genotoksik etkinini bir göstergesi olan kromozom aberasyonları genellikle kromatid açıklığı (gap), kromatid kırığı (break), asentrik ve disentrik fragment, ring kromozom, kromatid değişimi, poliploidi ve translokasyonlar şeklinde görülmektedir. Kromozom aberasyon testi daha çok Çin hamster ovarium ve Çin hamster akciğer hücreleri ile insan periferik kan hücrelerinde uygulanmaktadır.

### 2.1.1.4. Kardeş Kromatid Değişim Testi

İlk kez 1938 yılında McClintock tarafından tanımlanmıştır (93). Testin prensibi bir kromozomu oluşturan iki kromatid kolunda meydana gelen kırılmayı takiben, kırılan parçaların karşılıklı değişiminin saptanması esasına dayanır. Hücre kültürlerine fitohemaglutinin eklenerek mitoz bölünmenin uyarılmasının ardından hücreler test bileşiğine maruz bırakılır. Kromatidlerin ayrılmasını kolaylaştırmak amacıyla ortama bromodeoksiuridin eklenir. İki hücre siklusunun ardından metafaz durdurucu bir bileşik uygulanır ve hazırlanan preparatlardaki hücreler kardeş kromatid değişimi yönünden incelenir (48).

Yöntem balıklar ve midyeler gibi farklı sucul canlılarda uygulanmış olsa da, kardeş kromatid değişim testi ve kromozom aberasyon testi gibi metafaz analizleri, sucul ortamdaki genotoksisitenin izlenmesinde pratik yöntemler değildir. Bunun nedeni, balıkların fazla sayıda ve küçük yapıda kromozomlara sahip olmaları ve balık karyotiplerinin memelilere göre düzensiz yapıda olmasıdır (**69, 80**). Sadece *Umbra limi* gibi birkaç balık türünün kromozom yapısı metafaz analizleri için uygunsa da bu türün ekonomik öneminin bulunmaması ve geniş bir dağılım göstermemesi nedeniyle genotoksisite çalışmalarında tercih edilmemektedir (**3**). Buna karşılık, balık eritrositlerinin oldukça iri ve nükleus yapılarının büyük olması mikronükleus incelemelerini kolaylaştırmaktadır. Sahip oldukları avantajlar nedeniyle balıklarda DNA hasarının belirlenmesinde daha çok, yeterli duyarlılığa sahip olan aynı zamanda kısa sürede sonuç veren mikronükleus ve comet yöntemleri tercih edilmektedir.

#### **2.1.1.5. Comet Yöntemi**

Tek hücre jel elektroforezi olarak da bilinen comet yöntemi, standart genotoksisite test sisteminde yer almamasına rağmen ökaryotik hücrelerdeki DNA hasarını tek tek, hücre bazında saptayabilen ve genotoksisite çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Kolay ve hızlı olmasının yanı sıra kısa sürede güvenilir sonuçlar vermesi nedeniyle de günümüzde sitogenetik metodlara alternatif olarak tercih edilmektedir.

Yöntemin avantajları kısaca şu şekilde sıralanabilir (**51, 130, 134**):

- Çok çeşitli doku ve hücre tiplerinde uygulanabilir olması
- Düşük dozlardaki DNA hasarını saptamadaki duyarlılığı
- Hassas, hızlı, düşük maliyetli, kolay uygulanabilir ve güvenilir bir yöntem olması
- Hücrelerdeki DNA kırıklarının görsel olarak da izlenebilmesi

Comet yöntemi günümüzde genotoksik ve sitotoksik maddelerin belirlenmesi, DNA onarım çalışmaları, çevresel toksikoloji çalışmaları, kanser araştırmaları gibi pek çok alanda uygulanmaktadır (**46, 91**).

İlk olarak 1978 yılında Rydberg ve Johanson tarafından (**121**) geliştirilen comet yöntemi, agaroz içerisinde gömülmüş olan hücrelerin alkali koşullarda lize edilerek proteinlerden ayrılması ve DNA'nın açığa çıkarılması esasına dayanmaktaydı. Bu

yöntemde hücreler nötralizasyon işleminin ardından akrinin oranj ile boyanmakta ve DNA hasarı, kırmızı (tek sarmal) ve yeşil (çift sarmal) floresanların oranı baz alınarak fotometre aracılığı ile saptanmaktaydı. 1984 yılında Ostling ve Johanson (107), yöntemin duyarlılığını arttırarak mikrojel elektroforez tekniğini geliştirmişlerdir. Buna göre agaroz jel içerisinde fikse edilip lam üzerine aktarılmış hücreler, deterjanlar ve yüksek tuz konsantrasyonları ile parçalandıktan sonra, açığa çıkan DNA'ya nötral şartlarda elektroforez işlemi uygulanmaktaydı. Elektroforez sonunda ise DNA etidyum bromid (EtBr) gibi floresan özellikli bir boya ile boyanarak DNA hasarı değerlendirilmekteydi. Ancak bu yöntem, nötral koşullarda DNA'nın çift iplikçikli olmasından dolayı sadece çift zincirli DNA'daki kırıkların tespitine olanak sağlamaktaydı. Oysa DNA'da hasar oluşturan çoğu ajan, DNA çift sarmalından çok tek sarmalında hasar meydana getirmektedir. Bunun yanı sıra nötral koşullar, proteinlerin DNA'dan tam olarak uzaklaştırılmasını engellemektedir.

Bu nedenle Singh ve ark. (130) günümüzde de DNA hasarının saptanması amacıyla kullanılan protokol olan alkali comet tekniğini geliştirmişlerdir. Alkali koşullarda DNA'nın tek iplikçikli olması nedeniyle, bu yöntemle tek zincir DNA kırıkları ve alkali labil bölgeler kolaylıkla tespit edilebilmektedir (46). Singh ve ark. tarafından geliştirilen protokol günümüzde küçük değişikliklerle en çok kullanılan comet yöntemidir.

Yöntemin esası alkali şartlar altında ( $\text{pH} > 13$ ) izole edilen DNA'nın elektroforezi prensibine dayanmaktadır. Çekirdek içerisindeki DNA, agaroz jel içerisinde fikse edilerek elektroforetik ortamda yürütülür. Genotoksik ajanlara bağlı olarak kırılan DNA molekülleri elektroforez sırasında farklı hızlarda göç ederler. Anoda hareket eden DNA, hasarın derecesine bağlı olarak değişen bir kuyruklu yıldız görüntüsü oluşturur. DNA hasarıyla doğru orantılı olarak kuyruk uzunluğunda artış gözlemlenirken sağlam DNA'da ise kuyruk oluşumu görülmez (103).

Comet yönteminin basamakları aşağıda açıklanmıştır:

**Lamların hazırlanması:** İlk basamak çalışmada kullanılacak olan lamların hazırlanmasıdır. Bu amaçla tek tabakalı lam modeli kullanılabileceği gibi günümüzde daha çok iki veya üç aşamalı lam modellerinin hazırlanması tercih edilmektedir. Tek tabakalı modelde düşük erime dereceli agaroz (LMA) içerisinde süspanse edilmiş hücreler direkt olarak lamın üzerine yayılır. İki tabakalı modelde ise, lamın üzeri ilk olarak düz bir zemin sağlaması ve hücrelerin daha sağlam bir şekilde tutunması

amacıyla normal erime dereceli agaroz (NMA) ile kaplanır. Lamların kaplanma işlemi çalışmanın başlamasından bir gün önce gerçekleştirilir ve agaozun lam üzerine yayılarak kuruması sağlanır. İkinci tabakayı çalışma sırasında LMA içerisinde süspanse edilmiş hücreler oluşturur. Bu aşamada hücre yoğunluğunun fazla olması görüntüleme işlemini zorlaştıracığından agaroz içerisindeki hücre miktarının fazla olmamasına dikkat edilmelidir. Hücrelerin yoğun olması, özellikle DNA göçünün fazla olduğu durumlarda cometlerin üst üste gelmesine neden olarak analiz işlemini zorlaştırır. Üç tabakalı modelde ise bu işlemlere ek olarak lamlar tekrar LMA ile kaplanarak hücrelerin korunması sağlanır. Hazırlanan lamlar jelin katılaşması için +4 °C’ de bekletilir (**42, 134**).

**Lizis aşaması:** Lizis işleminin gerçekleştirilmesindeki amaç hücre zarlarının ortamdaki uzaklaştırılmasıdır. Hücrelerin lize olması için lamlar yüksek tuz ve deterjan içeren alkali lizis solüsyonu içerisinde ve +4 °C’ de en az 1 saat süreyle bekletilir. Daha önce de belirtildiği gibi nötral solüsyonlar çift zincir kırıklarının tespitine olanak sağlarken, alkali solüsyonlar kullanılarak tek zincir kırıklarının belirlenmesi mümkündür. Lizis işlemi sırasında serbest hale geçen DNA ışığa karşı duyarlı olduğundan, bu aşamadan sonraki işlemlerin yarı karanlık ortamda gerçekleştirilmesi gerekmektedir (**42**).

**DNA sarmalının çözülmesi ve elektroforez aşaması:** Elektroforez öncesinde lamlar çift sarmal DNA yapısının çözülmesi için yüksek alkali özellikteki (pH 13), soğuk elektroforez solüsyonu içerisinde 20 dakika bekletilir. Bu işlem şale içerisinde gerçekleştirilebileceği gibi lamlar direkt olarak elektroforez tankı içerisinde de inkube edilebilir. “Dengeleme” adı verilen bu aşamanın süresi uzadıkça yöntemin duyarlılığı da artmaktadır (**46**). Bu işlemin ardından elektroforez aşamasına geçilir. Hücre tipine göre değişiklik göstermekle beraber Singh ve ark. (**130**) elektroforez işleminin 25 V, 300 mA koşullarda yaklaşık 20 dakika süreyle gerçekleştirildiğini bildirmiştir. Gerek elektroforez gerekse dengeleme işlemi sırasında sıcaklığın sabit tutulması önemlidir.

**Nötralizasyon aşaması:** Yüksek alkali koşullardaki elektroforez işleminin ardından lamlar, alkali ortamın uzaklaştırılması amacıyla nötralizasyon solüsyonu ile 5’er dakika, 3 kez yıkanır. Nötralizasyon süresinin uzaması artifakt yoğunluğunu da azaltmaktadır (**120**).

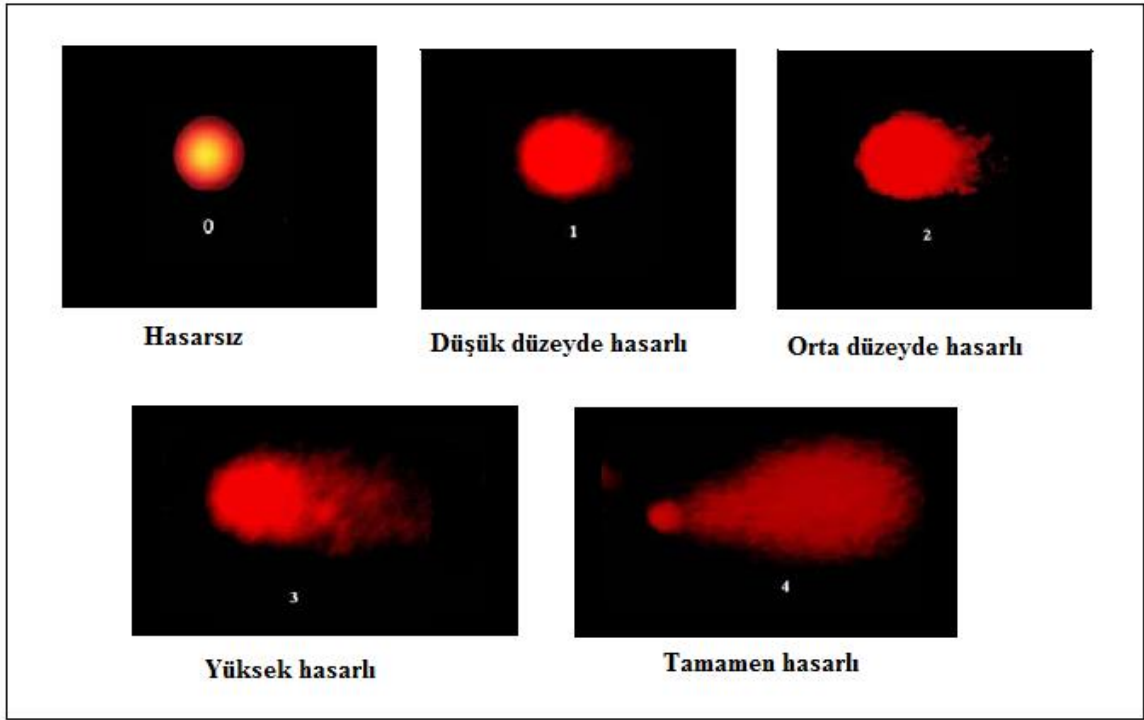
**Boyama aşaması:** Comet yönteminin son basamağı boyama ve görüntülemedir. Nötralizasyon solüsyonundan çıkarılan lamlar çok kısa bir süre içerisinde DNA’ya



spesifik bir boya ile boyanarak bekletilmeden floresan mikroskop altında incelenmelidir. Analiz işlemi hemen gerçekleştirilmeyecekse, lamalar nötralizasyonun ardından yaklaşık beş dakika süreyle saf etanol veya metanol içerisinde fikse edilerek kuruduktan sonra saklanabilir (134).

**Görüntülerin değerlendirilmesi:** Comet yönteminin değerlendirilmesinde hasar görmeyen hücreler yuvarlak, kenarları daha az yoğun, ortaları ise daha parlak bir şekilde görülürler. Bu hücreler, elektroforez sırasında DNA göçü gerçekleşmemiş olan “hasarsız hücreler” veya “nonmigration” olarak isimlendirilir. DNA’da meydana gelen kırılmaların artmasıyla, DNA parçacıkları çekirdek dışına göç ederek belli bir yöne doğru saçılırlar ve yöntem adı verilen kuyruklu yıldız benzer bir görüntü meydana getirirler. Yüksek hasarlı olan apoptotik hücrelerde ise baş ve kuyruk kısımlarının tamamen dağıldığı görülmektedir. Comet sayımı sırasında, lamın ortasında bulunan hücreler değerlendirilmeli, kenar kısmındaki hücreler sayıma dahil edilmemelidir (42).

DNA’ da oluşan hasarın değerlendirilmesinde görsel analiz ve bilgisayarlı görüntü analizi olmak üzere iki farklı yol izlenir. Görsel analiz, cometlerin herhangi bir analiz programı kullanılmaksızın gözle belirlenmesi ve hasarın derecesine göre gruplandırılmasıdır. Bu tip değerlendirmede DNA hasarı hücrelerdeki kuyruk uzunluğu ile ilişkilendirilir ve buna göre beş kategoride değerlendirilir. Görsel analiz ile comet görüntülerinin sınıflandırılması Şekil 2-1’ de gösterilmiştir:



**Şekil 2-1: Comet görüntülerinin görsel analiz ile sınıflandırılması**

Her bir preparat için rastgele seçilen hücreler sayılarak içinde buldukları kategoriye göre sınıflandırılır. Ardından her bir kategorideki comet sayısı belirlenerek DNA hasarı saptanır (42).

Görüntüleme programları aracılığıyla yapılan analizlerde ise, comet oluşumları mikroskop üzerine monte edilen dijital kameralar aracılığıyla saptanmaktadır. Bu programlar aynı zamanda, hasar görmüş hücrelerdeki baş ve kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti, baş ve kuyruktaki DNA yüzdesi gibi parametrelerin ölçülmesine de olanak sağlamaktadır.

Comet yönteminin duyarlılığı, elektroforeze bağlı şartlar (süresi ve voltajı), lizing işleminin süresi ve lizis solüsyonunun pH ve tuz konsantrasyonu gibi faktörlerden etkilenmektedir. Bu nedenle çalışma sırasında deney koşullarının sabit tutulması sonuçların güvenilirliği açısından oldukça önemlidir (151).

Comet yöntemi laboratuvar koşullarında çeşitli kimyasallara maruz bırakılan balıklardaki DNA hasarının saptanması amacıyla birçok çalışmada uygulandığı gibi sucul ekosistemdeki kirliliğin izlenmesinde de biyogösterge olarak kullanılmaktadır. İnsanlarda comet yöntemi ile yapılan çalışmalarda çekirdekli ve çok sayıda

olmalarından dolayı lenfositlerden yararlanılırken, balıklarda eritrositlerin kan hücrelerinin %97'sini oluşturmaları nedeniyle yöntemin uygulanmasında eritrositler tercih edilmektedir (95).

Yöntemin avantajlarından biri de çok çeşitli hücre tiplerinde uygulanabilir olmasıdır. Bu özelliği ile comet yöntemi memeliler dışında balıklar, algler, kabuklular, amfibiler gibi sucul organizmalarda da geniş kullanım alanı bulmaktadır (112).

Comet yöntemi ile sucul canlılar üzerinde yapılan çalışmalardan bazıları şöyledir:

Sipermetrin'in üç farklı konsantrasyonuna (0,300, 0,150, 0,075 µg/ L) maruz bırakılan *Prochilodus lineatus* türünün eritrositlerindeki DNA hasarını alkali comet yöntemi ile incelenmiştir (129). Elde edilen veriler negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, sipermetrinin uygulanan tüm dozlarda genotoksik etkili olduğu saptanmıştır. Bu çalışma aynı zamanda, balık eritrositlerindeki genotoksisitenin değerlendirilmesinde comet yönteminin etkinliğini bir kez daha ortaya koymuştur.

Yüzey sularında yoğun olarak saptanan non steroid antiinflamatuvar bir ajan olan dipironun sucul canlılar üzerindeki toksik etkisi Brezilya'daki yerel bir balık türü olan *Rhamdia quelen* üzerinde incelenmiştir (109). Bu amaçla 0,5, 5 ve 50 µg/L konsantrasyonda dipiron içeren sulara 15 gün süreyle maruz bırakılan balıklardan kan alınarak hematolojik, biyokimyasal, morfolojik ve genetik değişimler değerlendirilmiştir. Genotoksik etkinin comet yöntemi kullanılarak değerlendirildiği çalışmada, dipironun söz konusu balık türünde en düşük konsantrasyonda bile DNA hasarına sebep olduğu görülmüştür.

Bir diğer çalışmada ise, organik klorlu bir pestisit olan endosülfanın *Mystus vittatus* türünün çeşitli dokularında sebep olduğu genotoksik hasar alkali comet yöntemi ile incelenmiştir (126). Çalışmada öncelikle endosülfanın LC<sub>50</sub> değeri esas alınarak subletal ve non letal konsantrasyonları belirlenmiştir. Belirlenen 3 farklı konsantrasyonda endosülfana maruz bırakılan balıkların kan, böbrek, solungaç gibi farklı dokularından 7 günlük aralıklarla örnekler alınmış ve comet yöntemi uygulanmıştır. Veriler kuyruktaki DNA yüzdesi esas alınarak değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre grupların hepsinde yüksek DNA hasarı tespit edilirken, tüm dokularda ve tüm konsantrasyonlarda en yüksek hasarın birinci günde görüldüğü bildirilmiştir.

Sulardaki kirliliğin biyogöstergesi olarak comet yönteminin kullanıldığı bir çalışmada, farklı mevsimlerde Brezilya'daki Sinos Nehri'nin 3 farklı bölgesinden toplanan su numuneleri analiz edilerek sulardaki alüminyum, demir, krom, kurşun, bakır, nikel ve çinko düzeyleri saptanmış ve bu sulara maruz bırakılan balıklardaki genotoksik hasar incelenmiştir (123). Çalışmanın sonuçları Sinos Nehri'nin içerdiği söz konusu bileşiklerin, balıklar için genotoksik etkili olduğunu ancak DNA hasarının mevsimlere ve numune alınan bölgelere göre önemli farklılıklar göstermediğini ortaya koymuştur.

Gökkuşluğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* W. 1792) comet yöntemi ile yapılan bir çalışmada ise, çörek otunun (*Nigella sativa* L.) cinsiyet hücreleri üzerindeki toksik etkisi incelenmiştir. Farklı oranlarda çörek otu özütü eklenmiş yem ile beslenen balıklarda spermatolojik parametreler ve spermatozoadaki DNA hasarı değerlendirilmiştir (43). Elde edilen verilere göre, üreme dönemi ortasında ve sonunda alabalıklara verilen çörek otu miktarının artması ile hasarlı DNA miktarında da artış olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma balıklarda comet yönteminin eritrositler dışındaki farklı dokularda da uygulanabilir olduğunu göstermektedir.

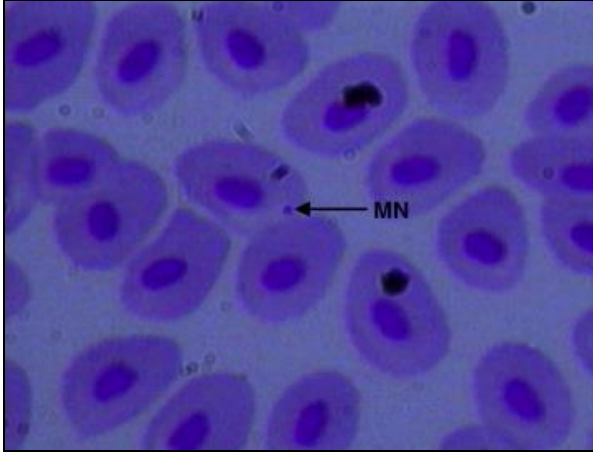
#### 2.1.1.6. Mikronükleus Testi

Yöntem ilk kez 1950'lerde bitki hücrelerinde (50), ardından 1970'li yıllarda hayvan hücrelerinde ve daha sonraki yıllarda insan lenfositlerinde DNA hasarının tespiti amacıyla kullanılmıştır. Öncelikle memelilerde uygulama alanı bulmuş olan mikronükleus testi daha sonraki yıllarda Hooftman ve Raat (69) tarafından modifiye edilerek, balıklarda kimyasal ve fiziksel ajanlar tarafından oluşturulan genotoksik hasarın değerlendirilmesi amacıyla uygulanmıştır. *Oncorhynchus mykiss* ve *Salmo trutta* gibi birçok tatlı su balığı mikronükleus testinin uygulanması için uygun organizmalar olarak bildirilmiştir (11, 36, 122, 132).

Yöntem, uygun koşullarda test bileşiğine maruz bırakılmış balıklardan kan alınarak ince yayma kan preparatlarının hazırlanması ve boyanan preparatların mikroskop altında mikronükleus oluşumu yönünden incelenmesi prensibine dayanmaktadır.

Mikronükleus, hücrede mitoz bölünmenin anafaz evresinde ortaya çıkan, ana çekirdeğe dahil olmayıp kromozomların geri kalmalarından veya kromozom parçacıklarından köken alan ve mikroskop altında net bir şekilde görülebilen kromozom

veya asentrik kromozom fragmenti olarak tanımlanır (4). Hücre sitoplazması içinde ana nükleusun yanında yer alan mikronükleuslar, ana nükleus ile aynı şekil, yapı ve boyanma özelliğine sahiptirler. Memelilerde mikronükleus çapı ana nükleusun 1/6 ile 1/3'ü arasındayken, balıklarda ana nükleustan yaklaşık 1/10- 1/30 oranında daha küçük görülebilir (2).



**Şekil 2-2: Balık eritrositlerinde mikronükleus görünümü**

Fenech ve ark. (57) eritrositlerde mikronükleus oluşumunu saptama kriterlerini şu şekilde açıklamışlardır:

- Mikronükleus ana nükleusun en az 1/3'ünden küçük olmalıdır.
- Ana nükleusun yanında bulunmalı ancak ana nükleustan kesin olarak ayrılmış olmalıdır.
- Ana nükleus ile aynı renk ve boyanma özelliğine sahip olmalıdır.

Bir hücrede mikronükleus görülmesi, o hücredeki sayısal ve yapısal bir genetik hasarı işaret eder (68). Bunun yanı sıra kanser oluşumu ile mikronükleus frekansı arasındaki bağlantı çok sayıda çalışma ile desteklenmektedir (45, 58). Kromatin kaybı sonucu oluşan mikronükleus, tümör baskılayıcı gen gibi kanser gelişiminde rol oynayan bir gen içeriyorsa meydana gelen bu tip kromozomal hasarlar kanser oluşumu için risk oluşturmaktadır (1). Gene-Tox Karsinojenite Çalışma Grubu tarafından, mikronükleus sonuçları ile karsinojenite verileri arasında yapılan karşılaştırmalar sonucunda 51 karsinojenin mikronükleus testinde pozitif sonuç verdiği buna karşılık sadece 5 karsinojenin mikronükleus oluşturmadığı saptanmıştır (92).

Mikronükleus sayısındaki artış genotoksik bileşiklerin sebep olduğu hasarın göstergesi olarak kabul edildiğinden mikronükleus testi genotoksik etkinin saptanması amacıyla tercih edilen yöntemlerden biridir. Mikronükleus oluşumu dışında diğer morfolojik nükleus anomalileri de genotoksik hasarın göstergesi olarak kabul edilebilir. Bazı araştırmacılar lob oluşumu ve tomurcuklanma gibi nükleus anomalilerinin de genotoksik etkiye bağlı olarak ortaya çıktığını ve mikronükleus oluşumunda temel oluşturabileceğini ifade etmişlerdir (128).

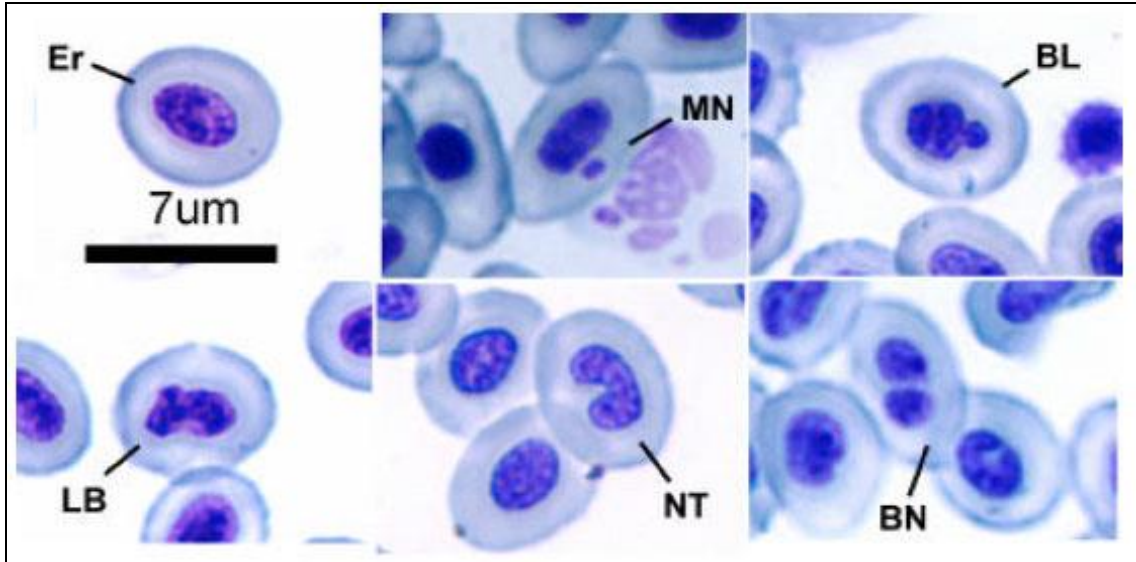
Morfolojik nükleus anomalileri Carasso ve ark. (24) tarafından başlıca dört grup altında değerlendirilmiştir:

**Çentikli nükleus:** Nükleus zarında nükleus içerisine doğru oluşan, kromatin içermeyen, girintilere sahip nükleuslardır.

**Tomurcuklu nükleus:** Nükleus zarından dışarıya doğru çıkıntılar şeklinde oluşan, kromatin içeren nükleus yapısıdır.

**Loblu nükleus:** Tomurcuklara oranla daha büyük olan ve fazla sayıda lob içeren nükleus yapısıdır.

**Binükleus:** Bir hücre içerisinde çift nükleus bulunma durumudur.



**Şekil 2-3: Balık eritrositlerinde görülen nükleus anomalileri (77)**

MN: Mikronükleus, BL: Tomurcuklu nükleus, LB: Loblu nükleus, NT: Çentikli nükleus, BN: Binükleus

Genotoksisitenin değerlendirilmesinde mikronükleus testi, basit, güvenilir, hassas ve balıklarda uygulanabilirliği kanıtlanmış bir metot olmasından dolayı sucul canlılarda genotoksik ajanlar tarafından indüklenen DNA hasarının belirlenmesinde

önemli bir yere sahiptir. Yöntem ayrıca kolay uygulanması, fazla sayıda hücrenin sayılabilmesi ve istatistiksel olarak daha anlamlı sonuçlar vermesi nedeniyle kromozom analizlerine tercih edilmektedir (39).

Balıklarda mikronükleus frekansının tespiti amacıyla yapılan çalışmalarda böbrek, solungaç, hepatik hücreler ve periferik eritrositler gibi birçok farklı hücre tipi kullanılmıştır (3, 9). Bronş epitel hücreleri, su kaynaklı kirleticiler için primer hedeftir ve çevresel kontaminantlar tarafından indüklenen sitogenetik hasara karşı yüksek duyarlılık göstermektedir. Ancak mikronükleus analizleri için solungaç hücrelerinin izolasyonu karmaşık bir prosedürdür ve uygulama esnasında balığın ölümüne yol açabilir. Mikronükleus testinin hepatositlerde uygulanması ise karaciğer hücrelerinin eritrositlere göre daha düşük mitotik indekse sahip olmaları nedeniyle sınırlı bir uygulamadır. Diğer hücrelere alternatif olarak balıklarda mikronükleus çalışmalarında en sık tercih edilen hücre tipi eritrositlerdir (17).

Çalışmaya başlamadan önce balıkların laboratuvar ortamına adaptasyonları için en az iki haftalık adaptasyon dönemi geçirilmelidir. Test bileşiği tek doz olarak uygulanabileceği gibi, tekrarlanan dozlar veya ksenobiyotiğin devamlı suda olması gibi sürekli şekilde de uygulanabilir. Aynı şekilde kan alma işlemi de tek seferde veya tekrarlı olarak yapılabilir. Yapılan çalışmalarda genotoksik bileşiklere maruz kalan çeşitli balık türlerinde, mikronükleus oluşumunun uygulamadan sonraki 1. ve 5. günler arasında en yüksek düzeyde saptandığı görülmüştür (138).

Mikronükleus testi ile balıkların direkt veya dolaylı yollarla maruz kaldıkları çok sayıda bileşiğin genotoksik etki potansiyeli değerlendirilmiştir:

Könen ve Çavaş (83) tarafından, sık kullanılan bir herbisid olan trifluralin ve ticari preparatı Treflan'ın *Oreochromis niloticus* türü üzerindeki genotoksik etkisi değerlendirilmiştir. Bu amaçla söz konusu bileşiklerin farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılan balıklardan 3., 6. ve 9. günlerde kan alınarak mikronükleus testi uygulanmıştır. Elde edilen verilere göre her iki bileşiğin de mikronükleus frekansını önemli ölçüde arttırdığı ve bu türde trifluralinin genotoksik etki gücünün Treflan'dan yüksek olduğu görülmüştür.

Benzer şekilde, kadmiyumun *Puntius altus* türü balıklar üzerindeki genotoksik etkisinin incelendiği bir çalışmada, mikronükleus oluşumu yanında loblanma, tomurcuklanma ve diğer nükleus anomalileri de değerlendirilmiştir. Çalışmada

kadmiyumun genotoksik etkisinin yanı sıra askorbik asidin kadmiyum uygulanan balıklardaki antigenotoksik etkisi de incelenmiş ve askorbik asit uygulanan gruplarda genotoksik etkinin azaldığı bildirilmiştir (76).

Gökkuşığı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*) üzerinde mikronükleus testi ile gerçekleştirilen bir diğer çalışmada, bakır ve çinkonun genotoksik potansiyeli incelenmiştir. Söz konusu bileşiklerin üç farklı konsantrasyonuna 96 saat süreyle maruz bırakılan balıklarda, mikronükleus frekansının kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak arttığı saptanmıştır. Ancak mikronükleus frekansının konsantrasyona bağlı olarak artan bir seyir izlemediği bildirilmiştir (14).

Organikfosforlu bir bileşik olan klorprifos- etil'in *Capoeta trutta* (Heckel, 1843) türü balıklardaki genotoksik potansiyelinin incelendiği çalışmada ise, klorprifos- etil'in 5 farklı konsantrasyonuna (125- 150- 175- 200- 225 ppm) maruz bırakılan balıklardan 96 saat sonunda kan örnekleri alınarak mikronükleus testi uygulanmıştır. Elde edilen verilere göre, en yüksek mikronükleus frekansının 225 ppm konsantrasyonda saptandığı ve doz artışına bağlı olarak mikronükleuslu eritrosit sayısında da artış olduğu bildirilmiştir (150).

Mikronükleus testi *in vitro* koşullarda balık hücre serileri üzerinde de uygulanmıştır. Trimetoprimin genotoksik ve sitotoksik etkisinin memeli ve balık hücre serilerinde mikronükleus, nötral kırmızı ve comet testleri ile incelendiği çalışmada, *Oncorhynchus mykiss* türü balıklardan elde edilen RTG-2 (Rainbow trout gonad ) hücre serisi, memelilerde ise CHO-K1 (Çin hamster ovaryum ) hücreleri kullanılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre trimetoprimin yüksek dozlarda her iki hücre serisinde de mikronükleus oluşumunu indüklediği bildirilmiştir (110).

## **2.2. Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1972)**

### **2.2.1. Gökkuşığı Alabalığının Genel Özellikleri**

Kuzey Amerika kökenli bir balık türü olan gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1972), Avrupa'ya 1880, ülkemize ise 1970'li yıllarda getirilmiştir. Gökkuşığı alabalığının taksonamik sınıflandırılması ile ilgili olarak 30'dan fazla tür ismi tanımlanmış olup, 1988 yılına kadar *Salmo gairdneri* olarak adlandırılmıştır. 1988 yılında "Amerika Balıkçılık Derneği Balık İsimlendirme Komitesi" kararıyla bütün pasifik alabalık ve salmonları için *Oncorhynchus* cins isminin kullanılmasına karar



verilmiş ve bugün uluslararası düzeyde de kabul gören *Oncorhynchus mykiss*, tür ismi olarak kullanılmaya başlanmıştır (47).



**Şekil 2-4: Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1972)**

Vücutları uzamış ve az miktarda basık olan gökkuşığı alabalıklarının sırtlarında bir yağ yüzgeci bulunur. Sırt yüzgeci 10- 12, anal yüzgeci ise 8- 12 yumuşak ışına sahiptir. Pulları sikloit ve küçüktür. Yanal çizgi tam, öne doğru 100- 150 pulla kaplanmıştır. Kafanın üst kısmı ve arkası mavi, mavi- yeşil, sarı- yeşil ve kahverengi renklerde. Vücut kenarları gümüş rengi, beyaz veya soluk sarı- yeşilden griye doğru renklerde. Karın kısmı beyaz veya sarıdır. Vücut kenarlarında bulanık pembe, mavi bir bant ile çok sayıda ufak lekeler bulunur (47). Derisinde çok sayıda renk barındırması nedeniyle gökkuşığı alabalığı adını almıştır.

Gökkuşığı alabalıkları soğuk su balıklarıdır. FAO (Food and Agriculture Organization of The United Nations) alabalık yetiştiriciliğinde optimum su sıcaklığının 7- 18 °C arasında olması gerektiğini bildirmiştir. Daha yüksek sıcaklıklar alabalıklar için stres faktörü kabul edilmekte ve enfeksiyonlara karşı duyarlı hale gelmelerine sebep olmaktadır. Ayrıca su sıcaklığının artması sudaki oksijen miktarını da düşürmektedir. Yetiştiricilikte kabul edilen oksijen miktarı 9 ppm, optimum pH değeri ise 6,5- 8 arasındadır. Nötr veya hafif bazik sularda yaşayabilen alabalıklar için pH'ın 5'in altına inmesi veya 9'un üzerine çıkması öldürücü olabilir (53).

**Tablo 2-1: Gökkuşuğu alabalığının sistematikteki yeri**

Şube:	<i>Chordata</i>
Alt Şube:	<i>Vertebrata</i>
Sınıf:	<i>Osteichthyes</i>
Alt Sınıf:	<i>Actinoptergii</i>
Üst takım:	Teleostei
Takım:	<i>Salmoniformes</i>
Familya:	<i>Salmonidae</i>
Cins:	<i>Oncorhynchus</i>
Tür:	<i>Oncorhynchus mykiss</i> W., 1972

### 2.2.2. Ülkemizde Yetiştiricilik Açısından Gökkuşuğu Alabalığının Önemi

Gökkuşuğu alabalıkları, yemden iyi yararlanabilmeleri, hızlı gelişmeleri, çevre koşullarına karşı adaptasyon kabiliyetleri, yüksek su sıcaklıklarını ve düşük çözünmüş oksijen içeriğini tolere edebilmeleri, kuluçka sürelerinin kısalığı ve hastalıklara karşı dayanıklılıkları nedeniyle yetiştiricilikte tüm dünyada tercih edilen bir balık türüdür (127). Ülkemizde yetiştirilen su ürünleri arasında da ekonomik değerinin yüksek olması ve uygun su kaynaklarının bulunması nedeniyle önemli bir yere sahiptir. Kültür balıklarının türlere göre dağılımı incelendiğinde, Türk İstatistik Kurumu'nun 2012 yılı verilerine göre iç sularda en yüksek oranda yetiştiriciliği yapılan balık türü olup, toplam su ürünleri yetiştiriciliğinin % 52,42'sini oluşturmaktadır. Bunu denizlerde % 30,84 ile levrek ve % 14,47 ile çipura izlemektedir (136).

### 2.3. Balıklarda Antibiyotik Kullanımı

Kültür balıkçılığının hızlı gelişimine paralel olarak işletmelerde bakteriyel, viral ve paraziter hastalıkların görülme insidensi de artmıştır. Balıklarda görülen bu hastalıklar; çevresel koşullara, bakım ve besleme koşullarına, mikroorganizmaların

virülensine, sayısına ve giriş yoluna bağlı olarak değişiklik göstermektedir (49). Yetiştiricilik şartlarında balıkların havuzlarda bir arada tutulmaları hastalıkların hızlı bir şekilde yayılmasına ve ciddi ekonomik kayıpların görülmesine neden olabilmektedir.

Türkiye’de su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılabilir ilaçlara yönelik kontrol ve düzenlemelerin yetersizliği nedeniyle işletmelerde başta antibiyotikler olmak üzere birçok ilaç bilinçsizce tüketilmektedir (44). Balıklarda bilinçsiz ilaç kullanımı genotoksik ve nefrotoksik etkiler, dirençli suşların gelişimi, bağışıklık sisteminin baskılanması veya kalıntı sorunu gibi istenmeyen sonuçları da beraberinde getirmektedir. Balıkların besin kaynağı olarak tüketimi yoluyla insanlara da yansıyabilen bu etkiler, insan sağlığını da olumsuz yönde etkilemektedir.

Dünyada balık hastalıklarının tedavisinde kullanılan antibiyotikler ülkere göre değişiklik göstermekle beraber genel olarak oksitetrasiklin, oksolinik asit, amoksisilin, sülfadiazin, sülfametazin- trimetoprim, flumequin gibi etken maddeler bakteriyel enfeksiyonların sağaltımında kullanılmaktadır (44, 135). Tablo 2-2’de dünyada akuakültürlerde kullanımına izin verilen ilaç sayısı bildirilmiştir. Buna göre Avrupa’da kullanımına izin verilen antibiyotikler amoksisilin, oksitetrasiklin, oksolinik asit, florfenikol, flumequin, sarafloksasin ve sülfadiazin- trimetoprim kombinasyonudur (119). Türkiye’de ise 2012 yılı verilerine göre oksitetrasiklin, amoksisilin trihidrat, oksolinik asit, florfenikol, enrofloksasin, sülfadiazin- trimetoprim gibi etken maddeleri kapsayan 40’in üzerinde ruhsatlı antibakteriyel balık preparatı bulunmaktadır (61).

Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından yayınlanan su ürünleri yetiştiriciliği modülünde, antibakteriyel amaçla kullanılan ilaçların nitrofuran türevleri, malaşit yeşili gibi triarilamin boyalar, kloramfenikol gibi maddeleri içermemesi gerektiği bildirilmiştir (133).

**Tablo 2-2: Dünyada akuakültürlerde kullanımına izin verilen ilaç sayıları (119)**

	Avusturalya	Kanada	Avrupa	Japonya	Amerika
Antibiyotikler	-	4	7	27	3
Mikrobisidaller	-	4	6	3	1
Anestezikler	1	2	1	2	1
Hormonlar	3	-	-	-	-

Balıklarda antibiyotik uygulamaları farklı yollarla yapılabilmektedir:

**Parenteral yol:** Parenteral yolla ilaç uygulanırken genellikle kas içi veya periton içi uygulamalar tercih edilmektedir. İlaçların direkt olarak kan dolaşımına geçmesi ve doz ayarlamasının daha sağlıklı yapılabilmesi parenteral yolun avantajlarıdır. Ancak parenteral yolla ilaç uygulaması iş gücü gerektirmesinin yanı sıra, hayvanların yakalanmaları ve enjeksiyon sırasında strese girmelerine sebep olabileceğinden pek tercih edilmemektedir (19, 71, 149).

**İlaçlı yem:** Balıklardaki sistemik enfeksiyonların tedavisinde en etkili yol, ilaçların yeme katılarak verilmesidir (19). Bu yolla ilaç uygulanırken öncelikle balıkların günlük olarak tüketmeleri gereken yem miktarı hesaplanır. Sonrasında havuzlardaki balık sayısı ve ortalama ağırlık esas alınarak belirlenen dozlarda ilaç, yem ile karıştırılır ve yüzeyi yağ veya jelatin gibi bağlayıcı bir madde ile kaplanarak pelet haline getirilir. İlacın yeme karıştırılarak verilmesi, hasta hayvanların yeme karşı isteksiz olabilmeleri, ilacın yem içerisinde homojen dağılım göstermemesi gibi risklerine rağmen hayvanlarda stres oluşturmaması ve işletme açısından ekonomik olması nedeniyle tercih edilen bir uygulamadır (71, 149).

**İmmersiyon – banyo:** Genellikle ektoparaziter ilaç uygulamaları ile sistemik enfeksiyonların yüzgeç, solungaç ve deriye yerleşen formları için tercih edilen bir uygulama yoludur. Pratik bir yöntem olarak görülmesine rağmen fazla miktarda ilaç gerektirmesi, masraflı olması, emilim oranının balığa ve ilaca göre değişiklik gösterebilmesi gibi nedenlerden dolayı, balığın yeme karşı isteksiz olduğu durumlarda

tercih edilmektedir. Bu yolla ilaç uygulanırken, ilaç balıkların bulunduğu havuz içerisine eklenebileceği gibi balıklar bir ağ içerisinde kısa süreli olarak antibiyotikli solüsyon içerisine de bekletilebilirler (19, 71, 149).

### 2.3.1. Antibiyotiklerin Sucul Canlılar Üzerindeki Etkileri

Balıklar, ilaç uygulamalarının yanı sıra beşeri ve veteriner hekimlikte kullanıldıktan sonra atık sulara karışan ksenobiyotiklerin sucul ortama ulaşması sonucunda da antibakteriyel ilaçların etkilerine maruz kalmaktadır. Yapılan çalışmalar atık sularda ve içme sularında 30'un üzerinde antibiyotiğin saptandığını bildirmektedir. Buna göre atık sularda en yüksek konsantrasyonda saptanan antibiyotikler; tetrasiklinler, sülfonamidler ve makrolitlerdir (79). Sucul ekosistemde bulunan antibiyotiklerin ve metabolitlerinin balıklar üzerindeki etkileri günümüzde halen daha çok yönlü olarak araştırılmamış bir konudur (104).

Bu amaçla gerçekleştirilen çalışmada, 96 saat süreyle oksitetrasiklin ve amoksisiline maruz bırakılan zebra balıkları (*Danio rerio*) ve embriyoları üzerinde söz konusu bileşiklerin etkileri incelenmiştir. Her iki bileşiğin de zebra balıklarında katalaz ve glutatyon S- transferaz enzim aktivitesini inhibe ettiği, oksisetrasiklinin aynı zamanda laktat dehidrojenaz aktivitesini de arttırdığı saptanmıştır. Embriyonik gelişim yönünden değerlendirildiğinde ise, amoksisilin yumurtanın erken dönemde çatlamasına sebep olduğu, oksitetrasiklin ise bu süreyi geciktirdiği bildirilmiştir. Kontrol grubunda 48. saatteki embriyo çatlama oranı % 18,2 olarak saptanırken, yüksek dozda (221 mg/l- 1125 mg/l) amoksisilin uygulanan grupta bu oran % 80'in üzerinde bulunmuştur. Amoksisilin aynı dozlarda, ödem ve kuyruk deformasyonları gibi malformasyonlara da sebep olurken oksitetrasiklin uygulanan grupta bu etki saptanmamıştır. Araştırmacılar bu sonuçlara dayanarak her iki bileşiğin de sucul canlılar üzerindeki kronik etkilerinin araştırılması gerektiğini bildirmişlerdir (104).

Bir diğer çalışmada ise, eritromisin, oksitetrasiklin, sülfametoksazol, ofloksasin, linkomisin ve klaritromisininin *Danio rerio*, *Daphnia magna*, *Thamnocephalus platyurus* gibi hedef olmayan sucul organizmalar üzerindeki toksik ve genotoksik etkileri incelenmiştir. Genotoksik etkinin değerlendirilmesinde Ames testi ve SOS chromotest kullanılmıştır. Elde edilen verilere göre, ofloksasinin söz konusu türler üzerinde genotoksik etki gösterdiği, sülfametoksazol ve linkomisinin ise mutajenik ekili olduğu bildirilmiştir. Eritromisin, oksitetrasiklin ve klaritromisinin DNA hasarına sebep

olmadığı saptanırken, akut ve kronik toksisite çalışmalarından elde edilen veriler de göz önüne alınarak sucül organizmalar için en toksik bileşiklerin makrolitler olduğu sonucuna ulaşılmıştır (72).

Oksitetrasiklin ve flumequinin sucül ortamdaki genotoksik etkisi bir diğer çalışmada 6 farklı model organizma (*V. fischeri*, *P. putida*, *P. subcapitata*, *L. minor*, *D. magna*, *E. coli*) üzerinde incelenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre oksitetrasiklinin söz konusu türler üzerinde DNA hasarına sebep olmadığı, flumequinin ise 0,25 mg/L konsantrasyonda genotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir (153).

Genotoksik etkinin incelendiği bir diğer çalışmada ise, Napoli'deki atık sularda en yaygın antibakteriyel kontaminasyon unsuru olarak saptanan eritromisin ve linkomisin'in ayrı ayrı ve bir arada oluşturdukları DNA hasarı *Danio rerio* türünün eritrositleri ve hepatositleri üzerinde comet yöntemi ve mikronükleus testi ile incelenmiştir (118). Çalışmanın sonuçlarına göre, söz konusu iki antibiyotığın yüksek dozlarının gerek bireysel gerekse bir arada uygulandıklarında, hücrelerin kuyruk momentlerinde (tail moment) ve mikronükleus frekansında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa sebep oldukları görülmüştür. Aynı koşullar altında eritromisin'in *Danio rerio* üzerindeki genotoksik etki gücü linkomisinden daha yüksek bulunmuştur.

Benzer amaçla gerçekleştirilen bir diğer çalışmada, iki antibakteriyel ajan olan triklosan ve trimetoprimin hedef olmayan organizmalar üzerindeki genotoksik etkisi *in vitro* koşullarda *Dreissena polymorpha* (zebra midyesi) türünün hematositleri üzerinde comet yöntemi ile incelenmiştir. Elde edilen verilere göre, triklosanın genotoksik etkisi doza bağlı artan bir seyir göstermekte ve yüksek DNA hasarına bağlı olarak hematosit fonksiyonları çok düşük dozlarda bile etkilenebilmektedir. Trimetoprimin genotoksik etki gücünün ise triklosandan daha düşük olduğu saptanmış ve etkinin daha çok yüksek konsantrasyonlarda görüldüğü belirtilmiştir (16).

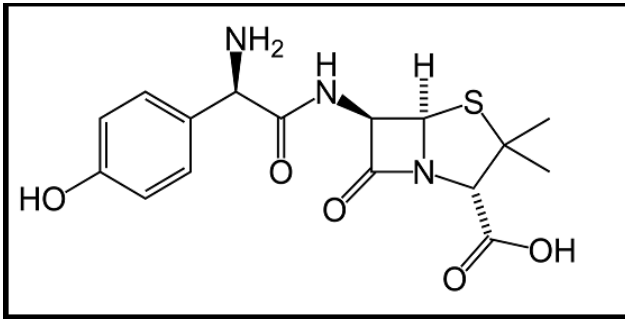
İnsanlarda ve sıçanlarda gerçekleştirilen genotoksisite çalışmalarının sonuçlarına göre genotoksik etkisinin tartışmalı olduğu bildirilen ve balıklarda antiprotozoal olarak kullanılan metronidazolün *Oreochromis niloticus* türü balıklar üzerindeki genotoksik etkisi akridin oranj mikronükleus testi ile incelenmiştir. Elde edilen verilere göre, yüksek konsantrasyonda metronidazolün söz konusu balık türünün eritrositlerinde DNA hasarına sebep olduğu bildirilmiştir (25).

Akuakültürlerdeki protozoal ve bakteriyel enfeksiyonların sağaltımında kullanılan formaldehit ve oksitetrasiklinin genotoksitesi ise *Dicentrarchus labrax* türünün eritrositlerinde incelenmiştir. Genotoksik etkinin değerlendirilmesinde mikronükleus testi kullanılmıştır. Her iki bileşiğin de gerek bireysel gerekse bir arada kullanıldıklarında genotoksik etkili olduğu ve zamana bağlı artan bir seyir izleyerek eritrositlerdeki mikronükleus frekansını arttırdığı bildirilmiştir (74).

### 2.3.2. Amoksisilin

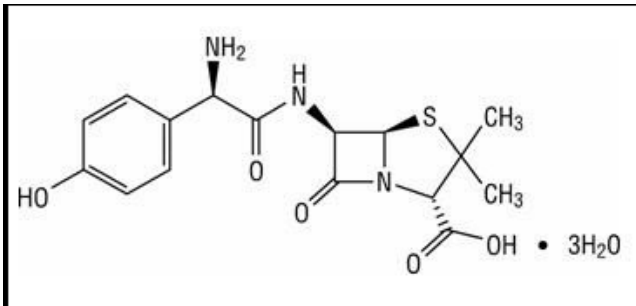
#### 2.3.2.1. Amoksisilin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Amoksisilin kokusuz, beyaz, toz halinde ve suda az çözünen bir bileşiktir. Gıda değeri olan hayvanlarda amoksisilin trihidrat şeklinde kullanılmaktadır (145). Amoksisilin ve amoksisilin trihidratın kimyasal yapıları Şekil 2-5 ve Şekil 2-6'da gösterilmiştir.



Şekil 2-5: Amoksisilin kimyasal yapısı

Kimyasal adı (2S, 5R,6R)- 6-[(R)-(-)-2-Amino-2-(p-hydroxyphenyl)acetamido]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid olan amoksisilin kimyasal formülü  $C_{16}H_{19}N_3O_5S$  ve molekül ağırlığı 365,4 g/mol'dür.



Şekil 2-6: Amoksisilin trihidratın kimyasal yapısı

Amoksisilin trihidratın ise kimyasal adı (2S, 5R,6R)- 6-[(R)-(-)-2-Amino-2-(p-hydroxyphenyl)acetamido]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid, kimyasal formülü  $C_{16}H_{19}N_3O_5S \cdot 3H_2O$  ve molekül ağırlığı 419,4 g/mol'dür.

### 2.3.2.2. Amoksisilin Etki Mekanizması

Yapısında biri azot, üçü karbon olmak üzere dört üyeli heterosiklik  $\beta$  laktam halkası içeren antibiyotikler  $\beta$ - laktam antibiyotikler olarak adlandırılmaktadır. Ampisilin p- hidroksi analogu olan amoksisilin, birçok gram negatif ve gram pozitif bakteri üzerinde bakterisidal etki gösteren, geniş spektrumlu  $\beta$ - laktam türevi bir antibiyotiktir. Aminopenisilin grubuna dahildir. Bu gruptaki penisilinler, benzilpenisilin yan zincirinin  $\alpha$  karbonu üzerine amino grubu getirilmesi sonucu oluşan türevleridir.

$\beta$ - laktam antibiyotikler etkilerini bakterinin hücre duvarı sentezinde görev alan transpeptidaz ve karboksipeptidazlara bağlanıp peptidoglikan yapısını bozarak gösterirler. Böylelikle hücre duvarı sentezi gerçekleşemez ve bakteri lize olur (66). Amoksisilin etki spektrumu klavulanik asit gibi beta laktamaz inhibitörleriyle kombine edilerek genişletilebilmektedir. Bu kombinasyon amoksisilin  $\beta$ - laktamaz üreten bakteriler üzerindeki etkinliğini arttırmaktadır.

### 2.3.2.3. Balıklarda Amoksisilin Kullanımı

Amoksisilin balık yetiştiriciliğinde genellikle *streptokok* etkenleri ile frunkulozis gibi bakteriyel enfeksiyonların sağaltımı ve kontrolü amacıyla kullanılmaktadır (31, 117, 149). Özellikle diğer antibiyotiklere karşı direnç gelişmiş mikroorganizmalarda amoksisilin tedavisinde başarılı sonuçlar elde edilmektedir. Alabalık yetiştiriciliğinde sık karşılaşılan ve ciddi ekonomik kayıplara neden olan yavru gökkuşağı alabalığı sendromu (RTFS- Rainbow Trout Fry Syndrome) gibi bakteriyel kökenli hastalıkların sağaltımında etkili olarak kullanılmaktadır (29). Ayrıca ülkemizde ilk kez 2001 yılında Ege Bölgesi'nde ortaya çıkarak birçok alabalık işletmesine yayılan, *Lactococcus garviea* isimli bakterinin sebep olduğu Lactococcosis hastalığının kontrolü ve tedavisinde de etkili olduğu bildirilmiştir (108). Yapılan çalışmalarda antibiyogram testi uygulanan *Lactococcus garviea* suşlarının birçok antibiyotiğe karşı direnç gösterirken amoksisiline duyarlı oldukları saptanmıştır (85, 137).



Balıkların intestinal sisteminden zor emilmesi nedeniyle etkin kan yoğunluğuna ulaşması için amoksisilin balıklara memelilere oranla 2- 5 kat yüksek dozda uygulanır (20). Amoksisilinin balıklardaki terapötik dozu oral yolla 80- 160 mg/kg canlı ağırlık/gün olarak bildirilmiştir (10, 21, 55).

Günümüzde birçok ülkede yaygın kullanıma sahip olan amoksisilin Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından su ürünlerinde kalıntı kontrolü yapılması gereken antibiyotikler sınıfında değerlendirilmektedir (56). Hızlı direnç gelişimi, balıklar aracılığıyla insanlarda da direnç gelişimine sebep olabilmesi ve kalıntı sorunu balıklarda amoksisilin kullanımının istenmeyen sonuçları olarak sayılabilir. Ancak ülkemizde özellikle gökkuşuğu alabalıkları gibi gıda değeri olan hayvanlarda kullanılmak üzere piyasaya sürülmüş ticari amoksisilin preparatları bulunmaktadır. İngiltere’de ise amoksisilin, balık hastalıklarının tedavisinde ruhsatlı olarak kullanılan dört antibiyotik preparatından biridir (144).

#### 2.3.2.4. Amoksisilinin Genotoksitesi

Amoksisilinin genotoksik etkisi, farklı organizmalar üzerinde ve çoğunlukla moleküler düzeyde gerçekleştirilen çalışmalarla değerlendirilmiş ve tartışmalı sonuçlar elde edildiği görülmüştür.

*In vitro* koşullarda comet yöntemi ile gerçekleştirilen çalışmada, amoksisilinin genotoksitesi insan periferik lenfositlerinde, sağlıklı gastrik mukoza hücrelerinde ve *Helicobacter pylori* ile enfekte olan gastrik mukoza hücrelerinde araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre amoksisilinin 5 mmol/L konsantrasyonda, hücrelerde DNA zincir kırılmalarına ve baz modifikasyonuna neden olabileceği bildirilmiştir. DNA hasarı *Helicobacter pylori* ile enfekte olan hücrelerde diğer hücelere oranla daha belirgin olarak saptanmıştır. Bu çalışmada amoksisilinin oksidatif strese neden olan serbest radikaller oluşumuna yol açarak DNA hasarına neden olabileceği sonucuna ulaşılmış ve DNA hasarının indüklenmesi için ilacın hücresel aktivasyonunun gerekli olduğu bildirilmiştir (8).

Amoksisilinin genotoksik etkisinin moleküler düzeyde, nükleer ekstrakt inkübasyonlu comet yöntemi ile değerlendirildiği bir diğer çalışmada, amoksisilinin AGS (insan adenokarsinoma hücreleri) hücre serisi üzerinde düşük konsantrasyonlarda bile (5 mM) genotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışmada DNA hasarının oldukça hızlı şekillendiği ve onarımın AGS hücre serisinde 4 saat içerisinde

tamamlandığı saptanmıştır. Araştırmacıların CHO- K1 ve UV24 hücreleri ile yaptıkları onarım kinetiği çalışmalarının sonuçlarına göre, baz kesip çıkarma onarım mekanizmasının DNA hasarının giderilmesinde etkili olabileceği bildirilmiştir (90).

Diğer beta laktam türevi antibiyotiklerle gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalarda da yüksek konsantrasyonlarda genotoksik etkinin saptandığı ve bileşiklerin DNA hasarına reaktif oksijen türevleri aracılığıyla sebep olabileceği belirtilmiştir (115, 116).

Amoksisilin- klavulanik asit kombinasyonu ise *in vitro* koşullarda Ames testi ile negatif sonuç verirken, fare lenfoma testi ile yapılan çalışmalarda sitogenetik konsantrasyonda zayıf genotoksik özellik gösterdiği saptanmıştır (139).

İstifli ve Topaktaş (73), amoksisilinin farklı konsantrasyonlarda insan periferik lenfositleri üzerindeki genotoksik etkisini kardeş kromatit değişim testi, kromozom aberasyon yöntemi ve mikronükleus testi ile incelemişlerdir. Her üç yöntemin sonuçlarına göre, amoksisilin gerek metabolik aktivatör varlığında gerekse aktivasyonsuz ortamda lenfositler üzerinde genotoksik etki göstermemiştir. Ancak yüksek konsantrasyonda amoksisilin uygulanan hücrelerde metabolik aktivatör varlığında kromozom aberasyonlarında önemli olmayan bir artış saptanmış, araştırmacılar söz konusu artışın yüksek konsantrasyonda amoksisilinin reaktif oksijen radikallerini fazla miktarda uyarması sonucunda şekillenebileceğini bildirmişlerdir.

Amoksisilinin sucul canlılar üzerindeki genotoksik etkisinin değerlendirildiği çalışmalar ise oldukça sınırlıdır. Bu amaç doğrultusunda gerçekleştirilen çalışmada, çeşitli amoksisilin türevlerinin sitotoksik ve genotoksik etkileri sazangiller familyasına ait bir tatlı su balığı olan *Rutilus rubilio* türünün kromozomları üzerinde incelenmiştir. Çalışma *in vivo* koşullarda ve iki farklı kromozom boyama tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Çeşitli amoksisilin türevlerine maruz bırakılan gruplardan elde edilen sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, kromozom anomalilerinde istatistiksel yönden anlamlı bir artış tespit edildiği bildirilmiştir (141).

Amoksisilinin genotoksik etkisinin *Dicentrarchus labrax* embriyonik hücre serisi (DLEC) üzerinde incelendiği bir diğer çalışma ise comet yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar kuyruktaki olive kuyruk momenti esas alınarak değerlendirilmiştir. Kontrol ve uygulama gruplarından elde edilen veriler karşılaştırıldığında, amoksisilinin 100 mg/L konsantrasyonda DNA hasarına sebep

olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Araştırmacılar elde edilen bulguların *in vivo* alışmalarla desteklenmesi gerektiğini bildirmışlerdir **(140)**.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, balık hastalıklarının tedavisinde kullanılan antibakteriyel bir bileşik olan amoksisilin'in gökkuşığı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*) üzerindeki potansiyel genotoksik etkisi *in vivo* koşullarda mikronükleus testi ve comet yöntemi ile incelendi.

#### 3.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi bünyesindeki Sapanca İç Su Ürünleri Üretimi ve Araştırma Birimi'nden temin edilen, 40- 60 gram ağırlığında, 150 adet gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) kullanıldı. Balıkların çalışma öncesinde bir ay süreyle laboratuvar ortamına adaptasyonları sağlandı. Bu süre içerisinde ticari alabalık yetiştirme yemi ile ad libitum beslenen balıklara, çalışma süresince 12 saat aydınlık/ karanlık aydınlatma düzeni uygulandı.

Balıklar üzerinde yapılan tüm uygulamalar, İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu' nun 30.09.2010 tarih ve 136 sayılı kararı ile etik kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

#### 3.2. Balık Tankları

Balıklar, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında bulunan 500 litrelik fiberglass tanklara her bir tankta 30 adet balık bulunacak şekilde yerleştirildi. Balık tankları içerisine yerleştirilen dış filtreler ve hava motorları aracılığıyla suyun düzenli olarak temizlenmesi ve havalandırılması sağlandı.



**Şekil 3-1: Çalışmada kullanılan balık tankları**

### 3.3. Suyun Özellikleri

Tanklarda, içerisindeki klorun uzaklaştırılması amacıyla 48- 72 saat süreyle bekletilerek dinlendirilmiş çeşme suyu kullanıldı. Çalışma süresince suyun fizikokimyasal özellikleri su analiz kitleri (Visocolor Eco Test) ile ölçülerek kaydedildi.

**Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan suyun fizikokimyasal özellikleri**

Sıcaklık (°C)	12- 18
pH	7,4- 7,8
Çözülmüş oksijen (mg/L)	8- 9
Total sertlik (CaCO <sub>3</sub> )	160- 170

### 3.4. Balıklarda Gerçekleştirilen Uygulamalar

Balıklar çalışma öncesinde cinsiyet ayrımı gözetilmeksizin 3 uygulama ve 2 kontrol grubu olmak üzere 5 gruba ayrıldı. Uygulama gruplarında doz ve sürenin belirlenmesinde balıklarda amoksisilinle tedavi protokolü esas alındı (20, 34). Buna göre uygulama gruplarından ikisine amoksisilin balıklardaki terapötik doz aralığı olan 80 ve 160 mg/kg dozlarda hesaplanan amoksisilin trihidrat (CAS 61336-70-7) yemlerle

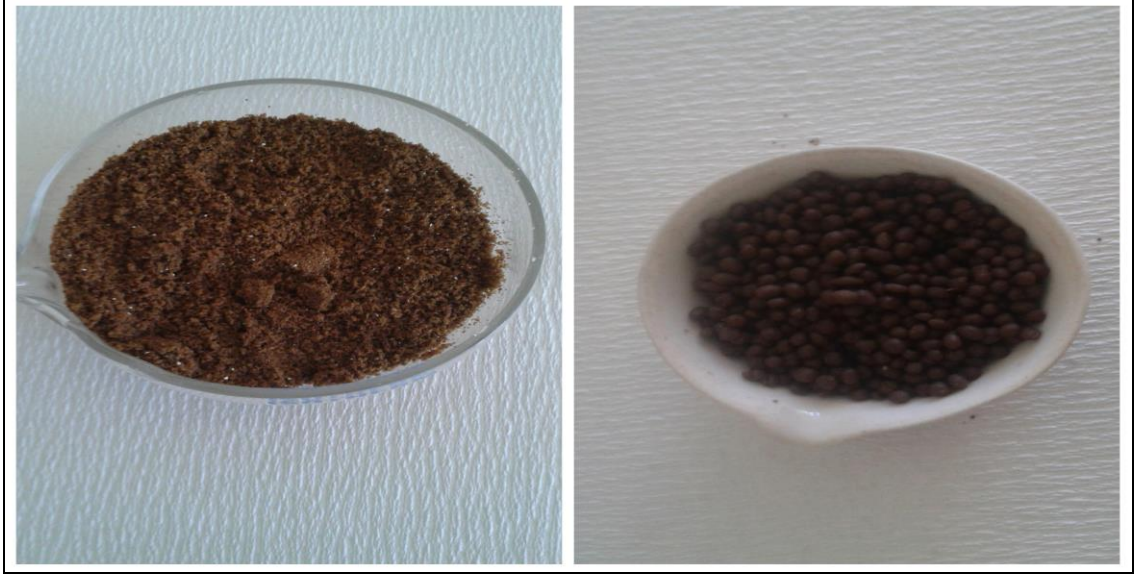
pelet haline getirilerek 10 gün süreyle verildi. Üçüncü gruba ise, tedavi dozunun üzerinde olan ancak balıklarda amoksisilin toksisitesinin değerlendirildiği çalışmaların sonuçlarına göre toksik olmadığı bildirilen (101) ve LC<sub>50</sub> değerinin (>1000 mg/L) altında olan (111) 320 mg/kg dozda hesaplanan amoksisilin trihidrat yine aynı koşullarda uygulandı. Negatif kontrol grubuna herhangi bir ilaç uygulaması yapılmazken, pozitif kontrol grubuna sucul ekosistemde genotoksisite çalışmalarında sık kullanılan ve genotoksik etkisi bilinen bir bileşik olan siklofosfamid (CAS 6055-19-2) 4 mg/L dozda suya katılarak uygulandı. Oksijen azalması, metabolik ürün artışı ve test bileşiğindeki azalma gibi olumsuzlukları ortadan kaldırmak amacıyla tanklardaki sular iki günde bir değiştirilerek tazelendi.

Çalışma, balıkların yeme karşı isteksiz olabilmeleri veya ilacın yem içerisinde yeterince homojen dağılmaması gibi olumsuz faktörleri uzaklaştırmak amacıyla iki kez tekrarlandı. 3.,6. ve 10. günlerin sonunda her bir grup için toplam 10 balığın kaudal veninden kan alınarak comet ve mikronükleus testleri uygulandı.

#### **3.4.1. İlaçlı Yemin Hazırlanması**

İlaçlı yem uygulaması öncesinde, yemleme oranı ve balıkların günlük yem ihtiyaçları hesaplanmalıdır. Alabalıkların yemlenmesinde yemleme oranı, balıkların ağırlığı ve su sıcaklığına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Tanklardaki ortalama su sıcaklığı ve balıkların canlı ağırlıkları esas alınarak yemleme oranı canlı ağırlığın % 2'si olarak belirlendi (70). İlaç uygulaması öncesinde balıklar tartılarak her bir tanktaki canlı ağırlık kaydedildi. Buna göre balıkların günlük yem ihtiyacı ve belirlenen dozlara göre yem içerisinde verilecek ilaç miktarı hesaplandı.

İlaçlı yem hazırlanırken öncelikle ticari gökkuşacağı alabalığı pelet yemleri öğütücü ile toz haline getirildi. Günlük verilecek yem miktarı tartılarak, her bir uygulama grubu için hesaplanan miktarda amoksisilin trihidrat ile karıştırıldı. İlacın yem içerisinde homojen bir dağılım göstermesine özen gösterildi. İlacın yeme bağlanması amacıyla mısır yağı ve su ile az miktarda nemlendirilen yem-ilaç karışımı yeniden pelet haline getirilerek şekillendirildi.



**Şekil 3-2: İlaçlı yemin hazırlanması**

### 3.4.2. İlaçlı Yemin Uygulanması

İlaçlı yem uygulaması öncesinde balıklar 12 saat süreyle aç bırakıldı. 80, 160 ve 320 mg/ kg günlük dozlarda amoksisilin içeren ilaçlı yemler, uygulama gruplarına 10 gün süreyle uygulandı. Çalışma süresince aynı koşulların sağlanabilmesi için, pozitif ve negatif kontrol gruplarına da öğütücüde toz haline getirildikten sonra mısır yağı ve su ile yeniden şekillendirilmiş pelet yem verildi.

### 3.4.3. Sedasyon Uygulaması

Kan alma işlemi öncesi balıklarda hareketliliğin azaltılması ve stresin engellenmesi amacıyla sedasyon işlemi uygulandı. Bu amaçla, balıklar üzerindeki çalışmalarda güvenli bir şekilde kullanılan ve genotoksisite test sonuçlarını değiştirmedeği bildirilen (94) benzokain (CAS 94-07-07, Sigma) kullanıldı. Çalışmanın hemen öncesinde, % 10'luk hazırlanan stok benzokain çözeltisinden 25mg/L konsantrasyonda suya eklenerek balıkların sakinleşmesi sağlandı.

## 3.5. Comet Yöntemi

### 3.5.1. Kullanılan Aletler

- Hassas terazi

Libror AEL-40 SM

- pH metre

Orion SA 720

- Ultrasonik banyo	Nersectech NRS 50-2
- Elektroforez tankı	Cleaver Scientific CSL- Com20
- Güç kaynağı	Cleaver Scientific CS- 300 V
- Mikrodalga fırın	Beko MD1610
- Otomatik mikro pipetler	Thermo Scientific
- Floresan Ataçmanlı Mikroskop	Olympus BX51
- Mikroskop Kamerası	BAB, TCC-5.0 ICE
- Buzdolabı	Arçelik
- Mikrosantrifüj tüp	Eppendorf, 1,5 ml
- Rodajlı lam	Isolab Objektträger
- Lamel	Isolab, 24x50
- Plastik pastör pipeti	Isolab, 3 ml
- Cam şale	

### 3.5.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Düşük erime dereceli agaroz (LMA)	Sigma, A9414
- Normal erime dereceli agaroz (NMA)	Sigma, A5093
- Fosfat tampon tabletleri (PBS)	Amresco, E404
- Sodyum hidroksit (NaOH)	Himedia, RM1183
- Hidroklorik asit (HCl)	Carlo Erba, 70- 302626
- Trizma base	Bioshop, TRS001
- EDTA	Sigma, ED5134
- Sodyum klorür (NaCl)	Sigma, S7653
- Triton- X- 100	Sigma, T8787
- Dimetilsülfoksit (DMSO)	Molekula, 67- 68- 5
- Etidyum bromid	Sigma, E7637
- Metanol	Carlo Erba, 414816



### 3.5.3. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

Agarozlar dışında, comet yönteminde kullanılan solüsyonların hepsi çalışma öncesinde taze olarak hazırlanmıştır.

#### **Düşük erime dereceli agaroz (LMA):**

- 0,65 g LMA
- 100 ml PBS

Çalışmada % 0,65'lik LMA kullanıldı. 0,65 g LMA tartılarak 100 ml PBS içerisinde mikrodalga fırında çözdürülerek hazırlandı.

#### **Normal erime dereceli agaroz (NMA):**

- 1 g NMA
- 100 ml PBS

Çalışmada % 1'lik NMA kullanıldı. 1 g NMA tartılarak 100 ml PBS içerisinde mikrodalga fırında çözdürülerek hazırlandı.

#### **Lizis solüsyonu:**

##### **Stok lizis solüsyonu:**

- 2,5 M NaCl      146,1 g
- 100 mM EDTA    37,2 g
- 10 mM Tris      1,2 g
- NaOH            8 g

Solüsyon içeriği, 700 ml distile su içerisinde çözdürülerek hazırlandı. pH'ı 10 M NaOH ile 10'a ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 900 ml'e tamamlandı. Hazırlanan stok lizis solüsyonu kullanılabildiği kadar +4 °C' de saklandı.

##### **Çalışma lizis solüsyonu:**

- Stok lizis solüsyonu
- DMSO
- Triton X 100

Her şale için 70 ml stok lizis solüsyonu üzerine 8 ml DMSO ve 800 µl Triton X-100 ilave edildi.

#### **Elektroforez solüsyonu:**

Elektroforez solüsyonunun hazırlanması için öncelikle aşağıdaki solüsyonlar hazırlandı:

**10 M NaOH:** 400 g NaOH, 1000 ml distile su içerisinde çözdürülerek hazırlandı. Kullanılana kadar +4 °C' de saklandı.

**200 mM EDTA:** 14,9 g EDTA, 200 ml distile su içerisinde çözdürülerek hazırlandı. Kullanılana kadar +4 °C' de saklandı.

Hazırlanan 10 M NaOH solüsyonundan 30 ml, 200 mM EDTA solüsyonundan 5 ml alınarak 1000 ml distile su içerisine eklendi ve elektroforez solüsyonu çalışma öncesinde taze olarak hazırlandı.

#### **Nötralizasyon solüsyonu:**

- 0,4 M Tris            48,5 g
- Distile su            800 ml

48,5 g tris, 800 ml distile su içerisinde çözdürüldü. pH'ı HCl ile 7,5'e ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 1000 ml' e tamamlandı.

#### **Stok etidyum bromid solüsyonu:**

- EtBr            10 mg
- Distile su            50 ml

Stok etidyum bromid solüsyonu karanlıkta ve +4 °C' de saklandı. Kullanmadan önce 1:10 oranında dilüsyon yapıldı ve her preparat 75 µl etidyum bromid solüsyonu ile boyandı.

#### **3.5.4. Lamların Hazırlanması**

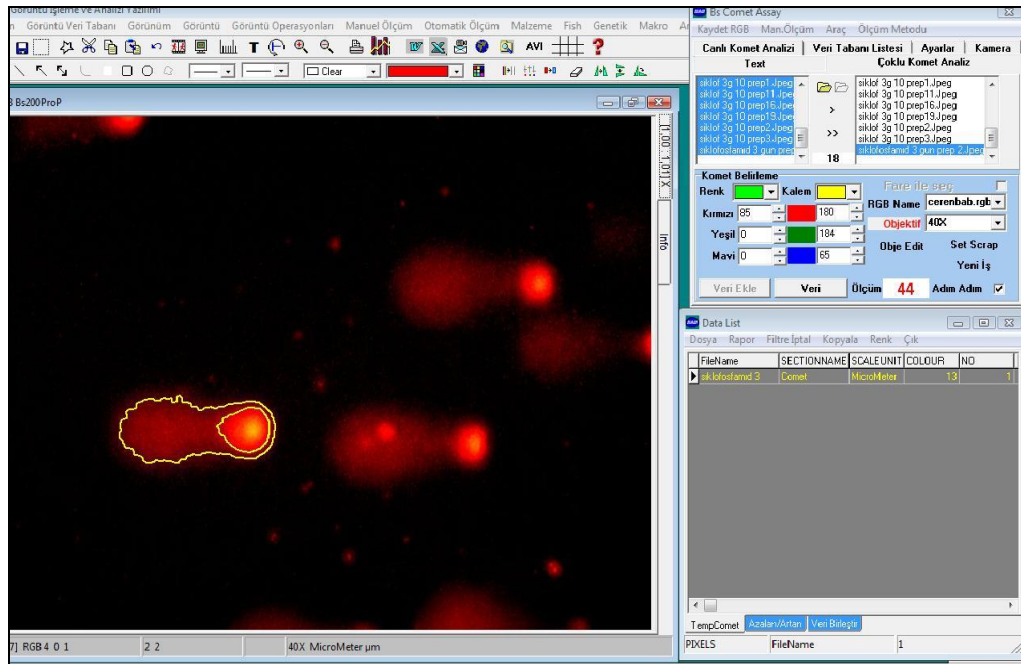
Çalışmanın bir gün öncesinde etanol ile temizlenen lamlar % 1'lik NMA içeren şaleye daldırılarak kaplandı ve oda ısısında kurutuldu. Her balık için 3 adet lam hazırlandı.

### 3.5.5. Preparatların Hazırlanması

Balıklardan alınan kan numuneleri, 1000 µl soğuk PBS içeren mikrosantrifüj tüplerine aktatılarak PBS ile karıştırıldı ve hücrelerin çökmesi için 5-10 dakika buz içerisinde bekletildi. Hücre süspansiyonundan 60 µl alınarak, 200 µl % 65'lik LMA ile karıştırıldı. Bu karışımdan 75 µl alınarak önceden %1'lik NMA ile kaplanarak kurutulmuş lamlar üzerine yayıldı ve lamel kapatıldı. Lamlar agarozun katılaşması için yaklaşık 10-15 dakika +4 °C' de bekletildi. Ardından lamel dikkatlice kaldırıldı ve lamlar taze olarak hazırlanmış soğuk lizis solüsyonu içerisinde yerleştirilerek +4 °C' de 1 saat süreyle bekletildi. Lizis solüsyonundan çıkarılan lamlar, soğuk elektroforez solüsyonu ile doldurulmuş elektroforez tankında 20 dakika inkube edildi ve ardından 30 dakika süreyle 25 V, 300mA' de elektroforez işlemi uygulandı. Elektroforezin ardından nötralizasyon tamponu içerisinde 5'er dakika süreyle 3 kez yıkanan lamlar, bir süre metanol içerisinde bekletilerek fikse edildi (25).

### 3.5.6. Preparatların Boyanması ve Değerlendirilmesi

Floresan renk vermesi amacıyla lamaların üzerlerine 75'er µl etidyum bromid solüsyonu damlatılarak lamel kapatıldı. Boyanan lamlar, Olympus BX51 floresan mikroskop altında incelendi ve hücrelerin görüntüleri kaydedildi. Kaydedilen görüntüler "Comet Görüntü İşleme ve Analiz Sistemi (BAB Bs 200 Pro)" programı kullanılarak comet oluşumu yönünden değerlendirildi.



Şekil 3-3: Comet görüntülerinin değerlendirilmesi

### 3.5.7. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel verilerin elde edilmesinde “Comet Görüntü İşleme ve Analiz Sistemi (BAB Bs 200 Pro)” kullanılmıştır. Sonuçların genel değerlendirilmesi ve her bir grup için ölçüm zamanının etkisinin belirlenmesi amacıyla tekrarlı ölçüm varyans analizi (repeated measurements of ANOVA), her bir ölçüm zamanı için gruplar arası karşılaştırma amacıyla ise tek yönlü varyans analizi (one way ANOVA) ve Duncan Testi kullanılmıştır.

### 3.6. Mikronükleus Testi

#### 3.6.1. Kullanılan Aletler

- Mikroskop	Olympus CX31
- Rodajlı lam	Isolab Objektträger
- Lamel	Isolab 24x50 mm
- Plastik pastör pipeti	Isolab 3ml
- Cam şale	

#### 3.6.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Etanol	Merck, 1009672500
- Giemsa	Carlo Erba, 453613
- İmmersiyon yağı	Merck, 104699
- Entellan	Merck, 100869
- Fosfat tampon tabletleri (PBS)	Amresco, E404

#### 3.6.3. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

Tüm solüsyonlar preparatlar hazırlanmadan hemen önce taze olarak hazırlandı.

##### **Fosfat tampon solüsyonu (PBS):**

100 ml distile suda 1 adet fosfat tampon tableti çözdürülerek hazırlandı.

##### **Giemsa solüsyonu:**

PBS içerisinde % 10'luk olarak hazırlandı.

#### **3.6.4. Preparatların Hazırlanması**

Mikronükleus testi için balıkların kaudal venlerinden 3., 6. ve 10. günlerin sonunda kan örneği alındı. Alınan kan örnekleri, her bir balık için önceden hazırlanmış olan 3 adet lam üzerine damlatılarak sürme preparatlar hazırlandı. Preparatlar havada kurutulduktan sonra 20 dakika süreyle saf etanolde fikse edildi (3).

#### **3.6.5. Preparatların Boyanması**

Fikzasyon işleminin ardından kurutulan preparatlar % 10'luk Giemsa solüsyonu ile 25 dakika süreyle boyandı. Boyanan preparatlar distile su ile yıkanarak üzerlerindeki fazla boyanın uzaklaştırılması sağlandı. Kurutulan preparatların üzerine 1-2 damla entellan damlatılarak lamel kapatıldı.

#### **3.6.6. Preparatların Değerlendirilmesi**

Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu altında mikronükleus oluşumu yönünden incelendi. Her balık için 2000 adet eritrosit değerlendirildi ve ana nükleus yanında mikronükleus içeren hücrelerin sayısı kaydedildi. Sayım sırasında, boya partikülleri gibi yapıların mikronükleus ile karışmasını engellemek amacıyla mikronükleus sayım kriterlerine (boyanma özelliği, boyutu, ana nükleustan kesin sınırlarla ayrılmış olması) dikkat edildi ve mikrovida ile gerekli kontroller yapıldı.

#### **3.6.7. İstatistiksel Değerlendirme**

Mikronükleus testinde elde edilen verilerin değerlendirilmesinde SPSS istatistiksel analiz 11.5 paket programı kullanılmıştır. Sonuçların genel değerlendirilmesi ve her bir grup için ölçüm zamanının etkisinin belirlenmesi amacıyla tekrarlı ölçüm varyans analizi (repeated measurements of ANOVA), her bir ölçüm zamanı için gruplar arası karşılaştırma amacıyla ise tek yönlü varyans analizi (one way ANOVA) ve Duncan Testi kullanılmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Comet Yöntemi

Floresan mikroskop altında yapılan değerlendirmede, hasarsız hücreler ortası parlak ve kenarları daha az yoğun olarak görülürken, zarar gören hücrelerde hasarın derecesine göre değişen kuyruk oluşumları izlendi.

Sonuçların değerlendirilmesinde kuyruktaki DNA yüzdesi (% DNA<sub>T</sub>) esas alındı. İstatistiksel analizler sonucunda her bir deney grubu için farklı uygulama zamanlarında elde edilen % DNA<sub>T</sub> değerleri Tablo 4-1'de, deney gruplarından elde edilen görüntüler ise Şekil 4-1 ,4-2, 4-3, 4-4 ve 4-5'de gösterilmiştir.

Deney grupları ile negatif kontrol grubuna ait veriler karşılaştırıldığında, yem ile 80 ve 160 mg/kg dozlarda amoksisilin uygulanan gruplarda elde edilen % DNA<sub>T</sub> değerleri her üç uygulama periyodunda da istatistiksel bir önemlilik göstermemiştir (P> 0,05). Yem ile 320 mg/kg dozda amoksisilin uygulanan gruba ait ortalama % DNA<sub>T</sub> değerleri ise üç uygulama periyodunda da negatif kontrol grubuna kıyasla istatistiksel yönden anlamlı bulunmuştur (P< 0,001).

Farklı dozlarda amoksisiline maruz kalan deney grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, sadece 320 mg/kg doz grubunda farklı zamanlarda elde edilen % DNA<sub>T</sub> değerleri, diğer amoksisilin gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş, diğer gruplar arasında ise önemlilik saptanmamıştır.

Pozitif kontrol grubu olan siklofosamid grubunda ise 3., 6. ve 10. günlerdeki ortalama % DNA<sub>T</sub> değerleri tüm diğer deney gruplarına göre istatistiki önem göstermiştir (P< 0,001).

Tüm amoksisilin gruplarında, % DNA<sub>T</sub> değerlerinin uygulama süresine bağlı değişimi incelendiğinde, 320 mg/kg dozda 3- 6. günler arasında saptanan artış ile 6- 10. günler arasında saptanan azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P< 0,01). Diğer gruplarda ise 3.,6. ve 10. günler arasında % DNA<sub>T</sub> değerlerindeki değişimin istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür.

Comet yönteminden elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde amoksisilin tedavisi dozlarında gökkuşağı alabalıklarında DNA hasarına sebep olmadığı, yüksek dozda uygulandığında ise comet oluşumunu indüklediği ve % DNA<sub>T</sub> değerinde önemli

artışa sebep olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Oluşan hasarın 6. günde en yüksek seviyeye ulaştığı, 10. günde ise hasar düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir.

**Tablo 4-1: Gökkuşuğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) comet yöntemi ile elde edilen %DNA<sub>T</sub> değerleri**

Ölçüm zamanı	Negatif Kontrol	CP (4 mg/ L)	AMX (80 mg/kg)	AMX (160 mg/kg)	AMX (320 mg/kg)	Önemlilik
	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	
3. gün	18,35 ± 2,09 <sup>c</sup>	65,40 ± 3,45 <sup>a,y</sup>	20,54 ± 3,89 <sup>c</sup>	23,05 ± 5,11 <sup>c</sup>	37,80 ± 1,67 <sup>b,y</sup>	***
6. gün	17,87 ± 3,38 <sup>c</sup>	68,70 ± 2,93 <sup>a,xy</sup>	23,92 ± 2,73 <sup>c</sup>	22,06 ± 2,21 <sup>c</sup>	47,78 ± 2,93 <sup>b,x</sup>	***
10. gün	18,23 ± 3,92 <sup>c</sup>	71,30 ± 2,61 <sup>a,x</sup>	19,97 ± 3,62 <sup>c</sup>	21,67 ± 3,35 <sup>c</sup>	35,31 ± 3,06 <sup>b,y</sup>	***
<b>Önemlilik</b>	Ö.D.	*	Ö.D.	Ö.D.	**	

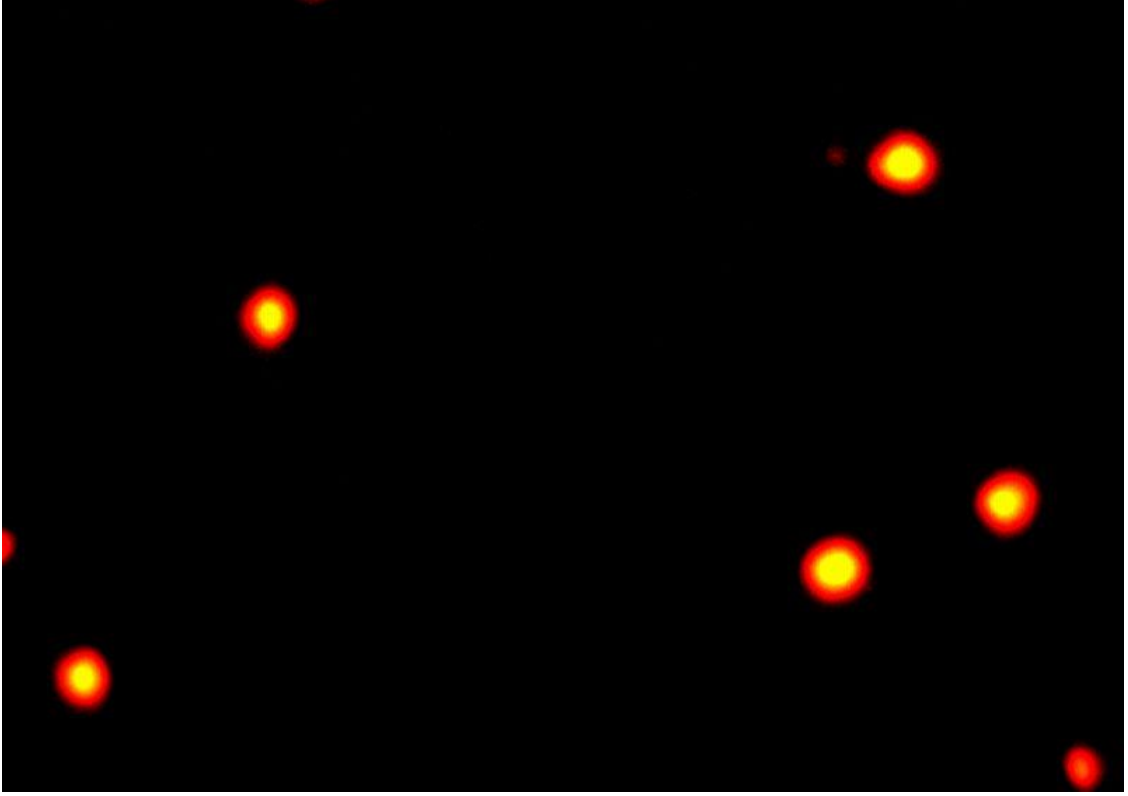
AMX= amoksisilin, CP= siklofosfamid, %DNA<sub>T</sub>= kuyruktaki DNA yüzdesi

$\bar{x}$  : Ortalama değer,  $S_{\bar{x}}$  : Standart hata

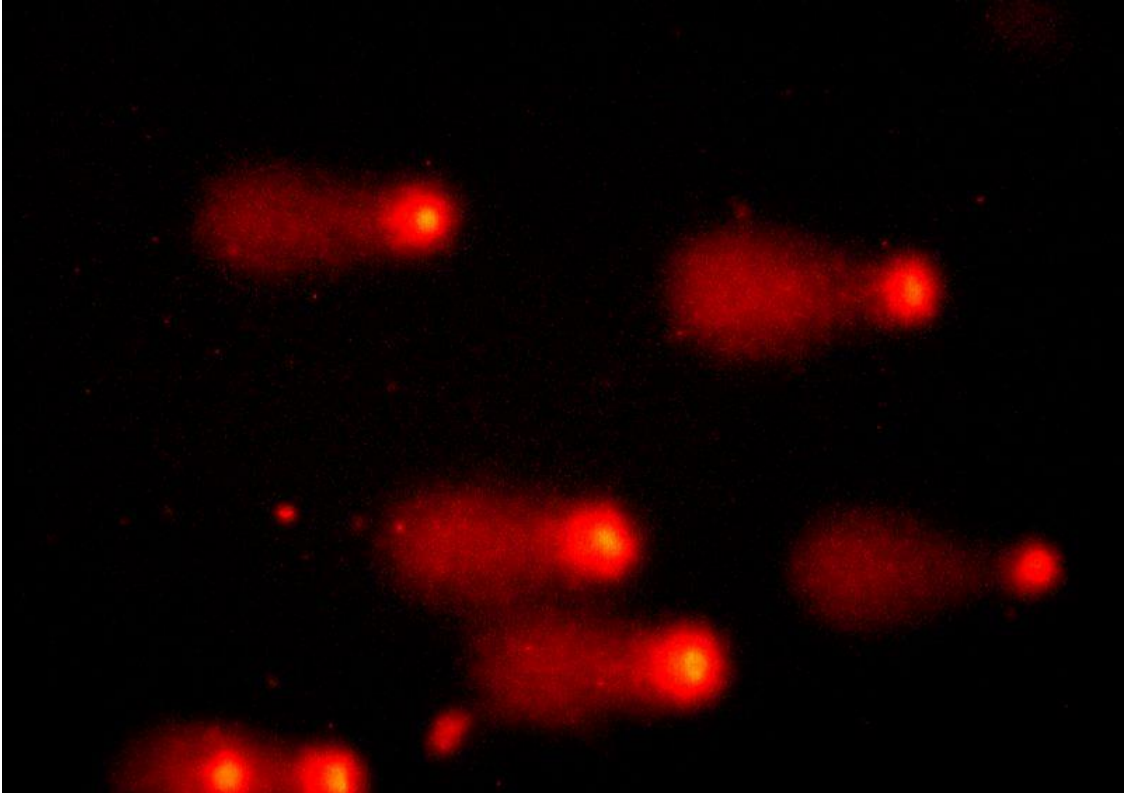
<sup>a,b,c</sup> : Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar önemli (\*\*\* P <0,001), aynı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar ise önemsizdir.

<sup>x,y</sup> : Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar önemli (\*P<0,05; \*\* P<0,01); aynı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar ise önemsizdir.

Ö.D: Önemlilik yok, (P>0,05)



**Şekil 4-1:** Negatif kontrol grubuna ait gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) elde edilen comet görüntüleri

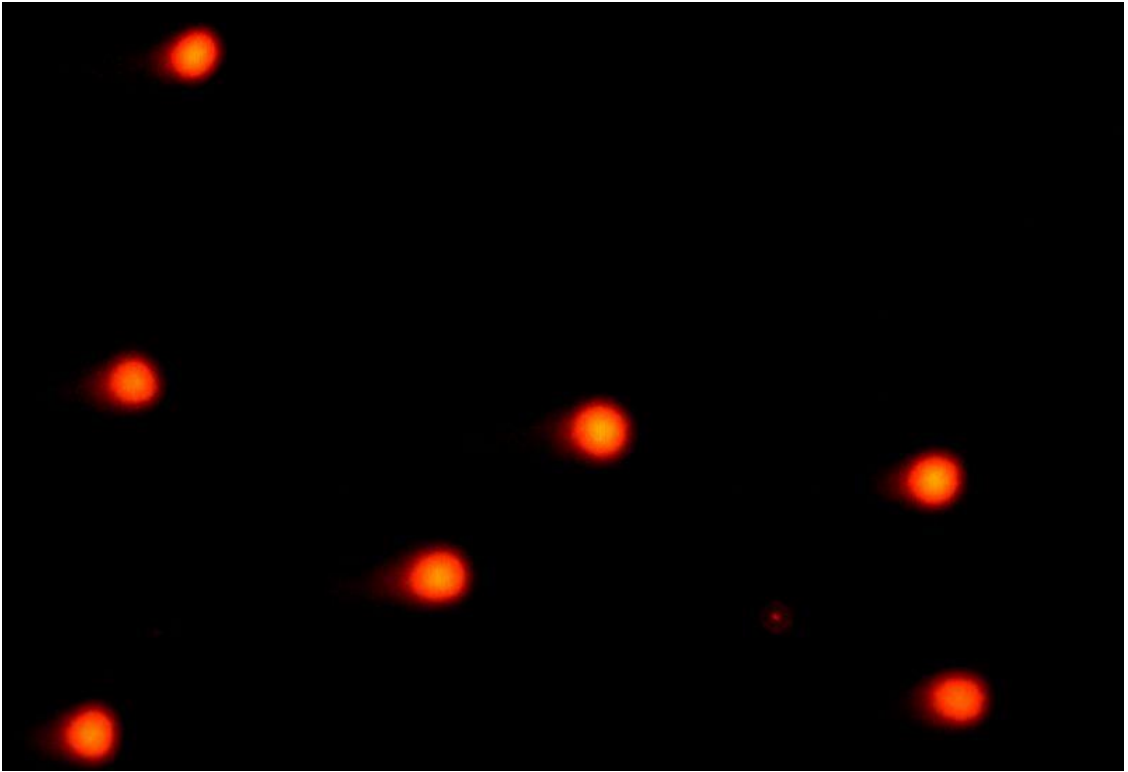


**Şekil 4-2:** Siklofosfamid uygulanan pozitif kontrol grubunda elde edilen comet görüntüleri

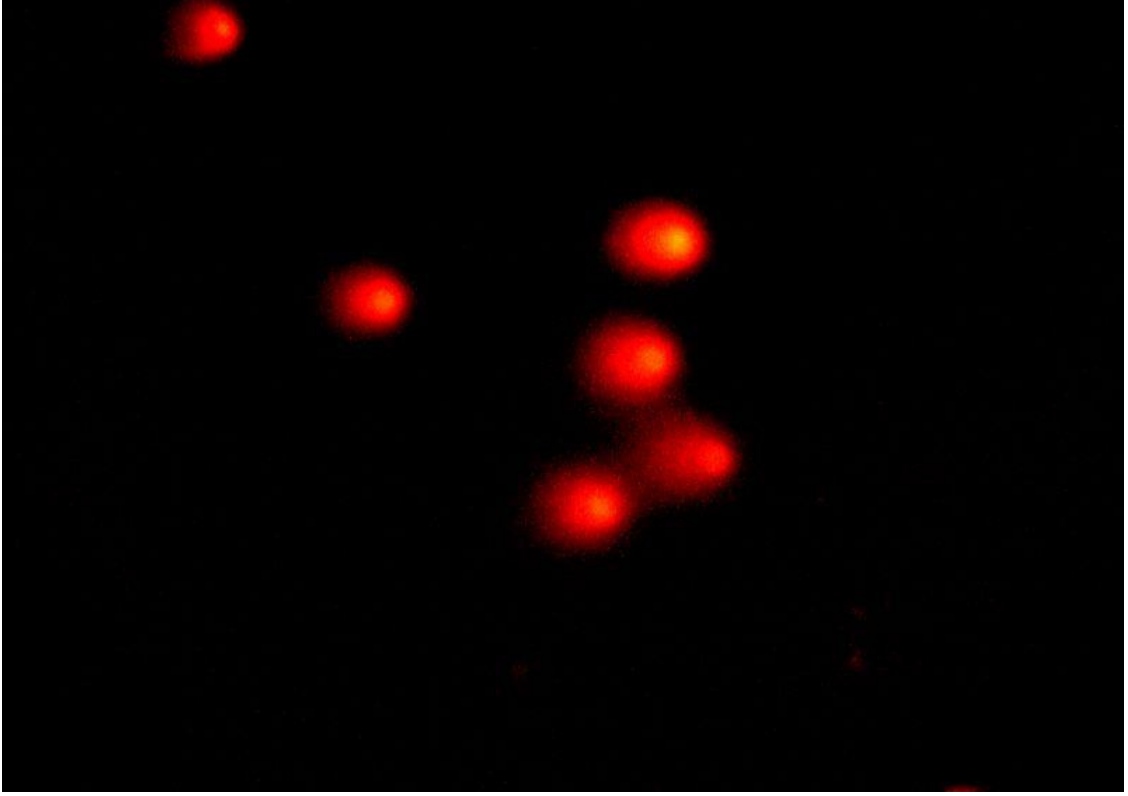




**Şekil 4-3: 80 mg/kg amoksisilin uygulanan deney grubunda elde edilen comet görüntüleri**



**Şekil 4-4: 160 mg/kg amoksisilin uygulanan deney grubunda elde edilen comet görüntüleri**



**Şekil 4-5: 320 mg/kg amoksisilin uygulanan deney grubunda elde edilen comet görüntüleri**

#### **4.2. Mikronükleus Testi**

Çalışmada amoksisilin terapötik dozu esas alınarak belirlenen üç farklı dozuna 3., 6. ve 10 günlük periyotlarla maruz bırakılan gökkuşağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*) eritrositlerindeki mikronükleus oluşumları incelendi. Bu amaçla uygulama periyotları sonunda, her bir grup için 10 balıktan kan alınarak preparatlar hazırlandı. Her balık için 3 preparat incelendi ve 2000 eritrosit hücresi sayıldı. Deney gruplarında farklı uygulama zamanlarında elde edilen mikronükleus frekansları Tablo 4-2’de, mikroskopik inceleme sırasında elde edilen görüntüler ise Şekil 4-6 ve 4-7’de gösterilmiştir.

Genel değerlendirme sonucunda, ölçüm zamanının etkisi önemsiz, grubun etkisi ise yüksek düzeyde önemli bulunmuştur ( $P < 0,001$ ). Ölçüm zamanı- grup interaksyonu ise önemsizdir.

Deney gruplarından elde edilen veriler negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, balıklardaki terapötik doz olan 80 ve 160 mg/kg dozda amoksisilin uygulanan gruplarda her üç uygulama periyodunda da mikronükleus sayısında

istatistiksel yönden önemli bir artış tespit edilmemiştir ( $P > 0,05$ ). Buna karşın terapötik dozun üzerinde (320 mg/kg) amoksisilin uygulanan grupta görülen mikronükleus frekansı, kontrol grubuna kıyasla her üç uygulama periyodunda da istatistiksel yönden anlamlı bulunmuştur ( $P < 0,001$ ).

Farklı dozlarda amoksisilin uygulanan deney grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, 80 mg/kg doz grubu ile 160 mg/kg doz grubu arasında mikronükleus frekansı açısından önemli bir değişiklik saptanmamıştır. Yem ile 320 mg/kg dozda amoksisilin verilen gruptaki mikronükleus artışının ise her üç uygulama periyodunda da diğer amoksisilin gruplarına göre istatistiksel açıdan önemli olduğu görülmüştür ( $P < 0,001$ ).

Pozitif kontrol olarak siklofosfamid uygulanan grupta, siklofosfamidin 3., 6. ve 10 günlük uygulamalarda mikronükleus frekansında ciddi oranda artışa sebep olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak tüm uygulama gruplarına göre önemli olduğu görülmüştür ( $P < 0,001$ ).

Mikronükleus oluşumunun zamana bağlı değişimi değerlendirildiğinde, tüm uygulama gruplarında 3. ve 6. günler arasında mikronükleus sayısında artış gözlemlenirken, 6. ve 10. günler arasında mikronükleus sayısının azaldığı görülmüş ancak söz konusu değişimler istatistiksel yönden anlamlı bulunmamıştır ( $P > 0,05$ ).

Bu verilere dayanarak amoksisilinin gökkuşacağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) tedavi dozunda mikronükleus oluşumuna sebep olmadığı ancak yüksek konsantrasyonlarda mikronükleus oluşumunu indüklediği sonucuna ulaşılmıştır. Mikronükleus frekansının zamana bağlı artan bir seyir izlemediği görülmüştür.

**Tablo 4-2: Gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) eritrositlerinde tespit edilen MN frekansları (MN/2000 hücre)**

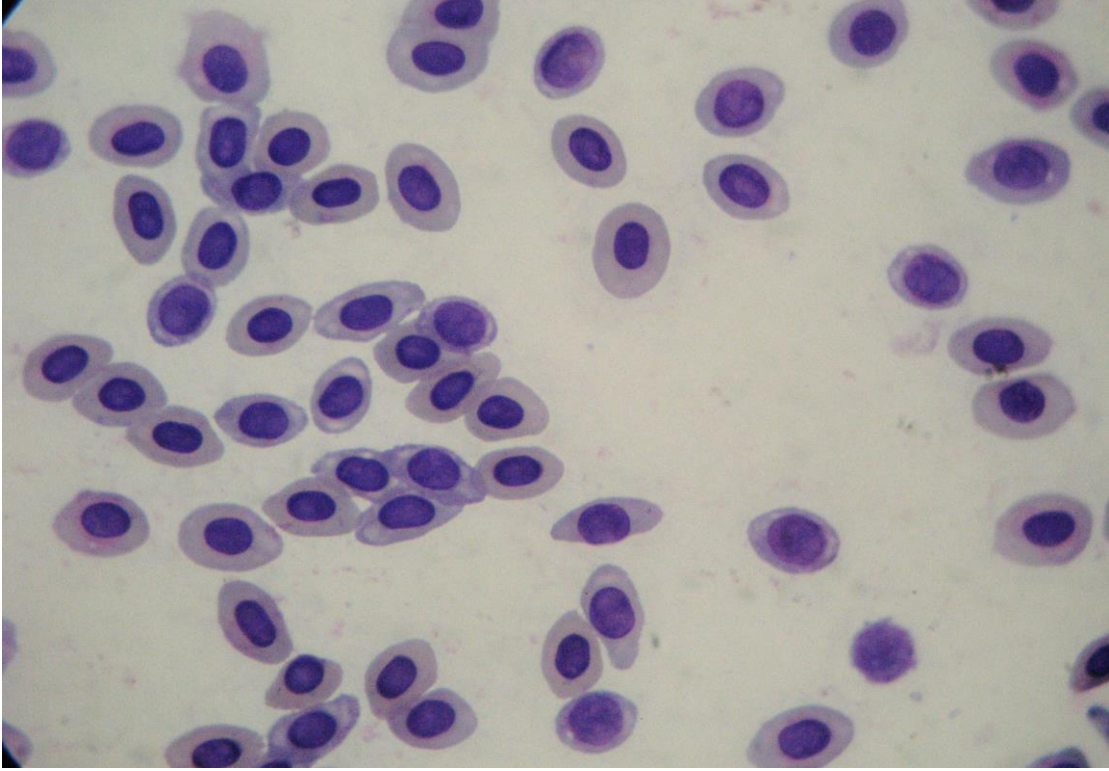
Ölçüm zamanı	Negatif Kontrol	CP (4 mg/ L)	AMX (80 mg/kg)	AMX (160 mg/kg)	AMX (320 mg/kg)	Önemlilik
	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	
3. gün	5,07 ± 0,77 <sup>c</sup>	27,73 ± 1,01 <sup>a</sup>	4,77 ± 1,0 <sup>c</sup>	5,97 ± 0,83 <sup>c</sup>	15,80 ± 0,49 <sup>b</sup>	***
6. gün	4,46 ± 0,80 <sup>c</sup>	28,26 ± 1,24 <sup>a</sup>	5,83 ± 1,12 <sup>c</sup>	6,97 ± 1,13 <sup>c</sup>	16,33 ± 0,53 <sup>b</sup>	***
10. gün	4,63 ± 0,73 <sup>c</sup>	25,90 ± 1,13 <sup>a</sup>	5,33 ± 0,96 <sup>c</sup>	6,33 ± 0,65 <sup>c</sup>	15,90 ± 0,48 <sup>b</sup>	***
<b>Önemlilik</b>	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	

AMX= amoksisilin, CP= siklofosfamid, MN= mikronükleus

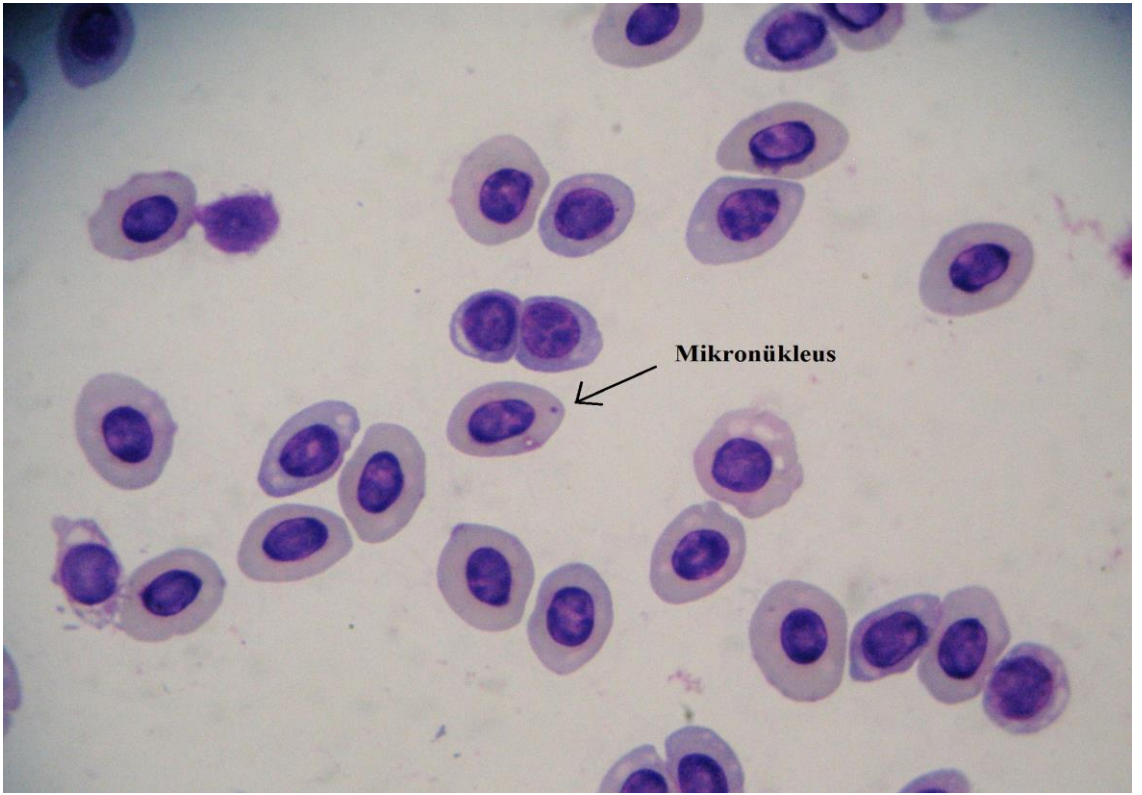
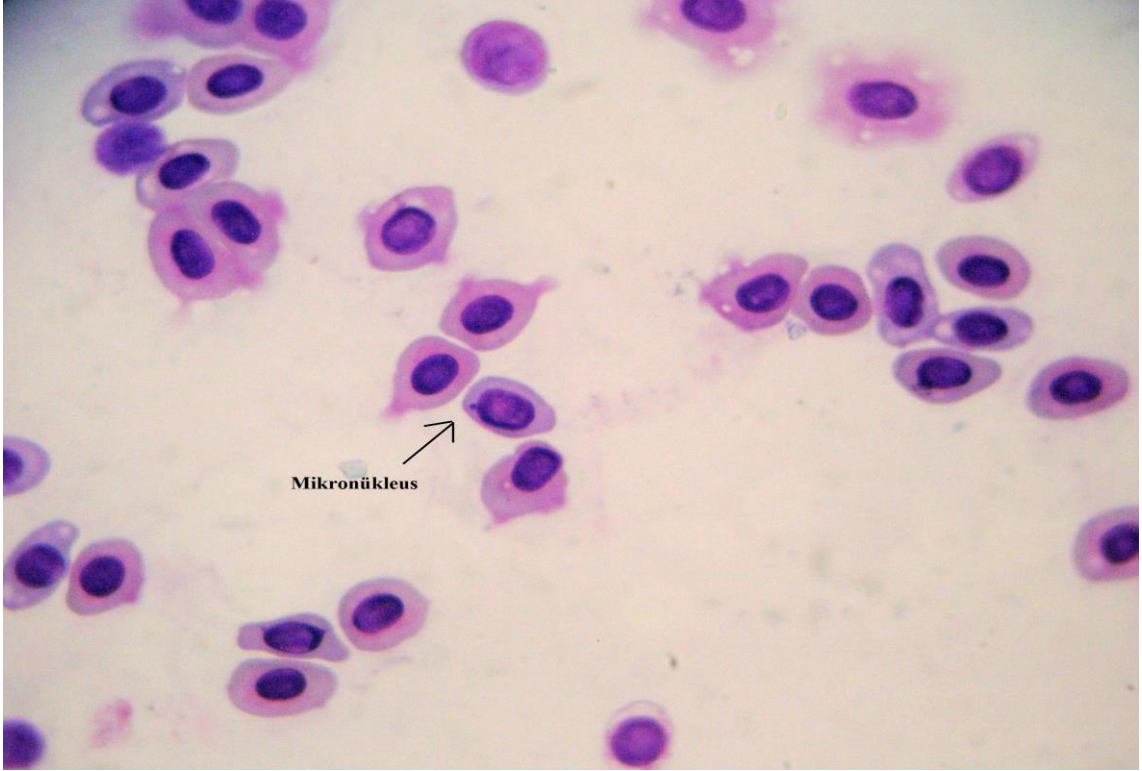
$\bar{x}$  : Ortalama değer,  $S_{\bar{x}}$ : Standart hata

<sup>a,b,c</sup> : Aynı satırda ve sütunda farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar önemli (\*\*\*) P <0,001), aynı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar ise önemsizdir.

Ö.D: Önemlilik yok, (P >0,05)



**Şekil 4-6: Kontrol grubunda Gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) eritrositlerinin görünümü**



**Şekil 4-7: Uygulama gruplarında mikronükleus oluşumu**

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamızda gökkuşağı alabalıklarındaki (*Oncorhynchus mykiss*) RTFS ve Lactococcosis gibi sistemik bakteriyel enfeksiyonların sağaltımında etkili olduğu bildirilen amoksisilin, terapötik doz aralığında ve daha yüksek konsantrasyondaki genotoksik etki potansiyeli araştırılmıştır. Deney protokolü, balıklarda tedavi amacıyla kullanılan bileşiklerin genotoksisitesini değerlendirmeye yönelik çalışmalar incelenerek oluşturulmuştur. Bu amaçla balıklara hem terapötik dozlarda (80 ve 160 mg/kg) hem de yüksek dozda (320 mg/kg) amoksisilin yemlerle pelet haline getirilerek verilmiştir. Tedavi süresi olan 10 günlük süre içerisinde 3 farklı zamanda balıklardan kan alınarak comet yöntemi ve mikronükleus testi uygulanmıştır.

Sucul ekosistemde gerçekleştirilen toksisite çalışmalarında *Oncorhynchus mykiss* (11, 36, 132), *Oreochromis niloticus*, *Danio rerio* (118), *Cyprinus carpio* (22, 65) gibi birçok farklı balık türü ile çalışılmıştır. Bailey ve ark. (15), karsinojenite üzerine gökkuşağı alabalıklarında gerçekleştirdikleri çalışmada, alabalıkların bu tür çalışmalarda yüksek omurgalılara alternatif bir model olabileceklerini bildirmişlerdir. Gökkuşağı alabalıkları üzerinde gerçekleştirilen bir diğer çalışmada, intraperitoneal enjeksiyon yoluyla uygulanan ksenobiyotiklere bağlı oluşan mikronükleus ve diğer nükleus anomalileri incelenmiştir (11). Bu çalışma ile söz konusu bileşiklerin genotoksik potansiyellerinin değerlendirilmesinin yanı sıra, sucul ekosistemdeki genotoksisite çalışmalarında gökkuşağı alabalıklarının model organizma olarak kullanılabilceği de bildirilmektedir. Çalışmamızda da ülkemizdeki ekonomik değerinin yüksek olmasının yanı sıra, kolay temin edilebilmesi ve sucul ekosistemdeki genotoksisite çalışmalarında model organizma olarak bildirilmesi nedeniyle gökkuşağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*) kullanılmıştır.

Balıklardaki *in vivo* genotoksisite çalışmalarında test bileşiği enjeksiyon yoluyla uygulanabileceği gibi, suya ve yeme karıştırılarak da verilebilmektedir (32). İntraperitoneal enjeksiyon, genotoksisite çalışmalarında sık kullanılan bir uygulama yolu olmakla beraber, hayvanların strese girmelerine ve strese bağlı bazı metabolik değişikliklerin gerçekleşmesine sebep olabilmektedir. Stres faktörünün memelilerde mikronükleus frekansı ve kromozom aberasyonları gibi genotoksik etkinin değerlendirilmesinde kullanılan bazı parametreleri arttırdığı bilinmektedir. Bu bilgiye

dayanarak stres oluşumunun balıklarda genotoksisitenin yanlış değerlendirilmesine sebep olabileceği söylenebilir (12). Bu nedenle genotoksik etkisi değerlendirilecek bileşiğin yeme veya suya karıştırılarak verilmesi tercih edilen bir uygulama yoludur. Çalışmamızda da belirlenen konsantrasyonlarda amoksisilin gökkuşağı alabalıklarına yemlerle pelet haline getirilerek verilmiş, böylece balıklarda uygulama yoluna bağlı stres oluşumu engellenmiştir.

Balıklarda farklı test yöntemleri ile gerçekleştirilen genotoksisite çalışmalarında pozitif kontrol kullanım prosedürleri ile ilgili farklı görüşler bildirilmiştir. Özellikle çalışmamızda olduğu gibi test bileşiğinin yeme katılarak uygulandığı bazı çalışmalarda pozitif kontrol grubu oluşturulmadığı (99, 152), bazı çalışmalarda ise pozitif kontrol ile test bileşiğinin farklı uygulama yolları ile verildiği görülmektedir. Yadav ve Trivedi tarafından (147) Krom (VI)'un *Channa punctata* türü balıklardaki genotoksik potansiyelinin değerlendirildiği çalışmada, pozitif kontrol bileşiği olan mitomisin C enjeksiyon yolu ile uygulanırken, test bileşiği suya katılarak uygulanmıştır. Memelilerde gerçekleştirilen çalışmalarda da benzer uygulamalar görülmektedir. Çelik ve ark. (28), kurşun asetatın sıçanlardaki genotoksik etkisini mikronükles testi ile araştırdıkları çalışmada, test bileşiğini gavaj yoluyla uygularken pozitif kontrol bileşiğini periton içi enjeksiyon yolu ile uygulamışlardır. Pozitif kontrol bileşiğinin test bileşiğine göre farklı yollarla uygulanması, bir çok araştırmacı tarafından kabul edilebilir bir uygulama olarak bildirilmiştir (13).

Bu bilgiler doğrultusunda, çalışmamızda pozitif kontrol bileşiği olarak, alkilleyici bir ajan olan ve DNA replikasyonu sırasında hatalı kodlamaya sebep olarak DNA hasarını indüklediği bilinen siklofosfamid kullanılmıştır. Siklofosfamid gerek memelilerde gerekse sucul organizmalardaki çalışmalarda genotoksik etkinin oluşturulması amacıyla kullanılan standart bir bileşiktir. Siklofosfamidin uygulama yolu ve dozunun belirlenmesinde balıklarda daha önce yapılan genotoksisite çalışmaları esas alınarak, 4 mg/L dozda siklofosfamid suya katılarak uygulanmıştır.

Akuakültürlerdeki genotoksisite çalışmalarında genellikle, en yaygın kontaminasyon kaynakları olan ve evrensel nitelik taşıyan pestisitlerin, deniz ve göllerdeki kirliliğin veya balıkların atık sular aracılığıyla maruz kaldıkları bileşiklerin DNA üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Balıklarda kullanılan kemoterapötik sayısının fazla olmaması nedeniyle, terapötik ve profilaktik amaçla kullanılan bu



bileşiklerin, önerilen veya yüksek dozlarda DNA üzerinde oluşturdukları hasarın değerlendirildiği çalışmalar oldukça sınırlıdır.

Bu amaçla gerçekleştirilen çalışmada, akuakültürlerde protozoal ve bakteriyel enfeksiyonların sağaltımında kullanılan formaldehit ve oksitetrasiklinin genotoksisitesini *Dicentrarchus labrax* türünün eritrositlerinde incelenmiştir. Uygulanacak ilaç miktarının belirlenmesinde her iki bileşik için de en yüksek tedavi dozu esas alınmış, balıklar 40 g/m<sup>3</sup> dozda oksitetrasiklin ve 200 ml/m<sup>3</sup> dozda formaldehite maruz bırakılmıştır. Uygulamaya 15 gün boyunca devam edilmiş, 5.- 10. ve 15. günlerde balıklardan kan alınarak genotoksik etki mikronükleus testi ile değerlendirilmiştir. Her iki bileşiğin de gerek bireysel gerekse bir arada kullanıldıklarında genotoksik etkili olduğu ve zamana bağlı artan bir seyir izleyerek eritrositlerdeki mikronükleus frekansını arttırdığı bildirilmiştir (74).

Benzer amaçla gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise, akuakültürlerde kullanılan antiprotozoal bir ajan olan metronidazolün genotoksisitesi değerlendirilmiştir. Dozun belirlenmesinde metronidazolün balıklardaki terapötik dozu esas alınmış, *Oreochromis niloticus* türü balıklar hem terapötik dozda (5 mg/L), hem de daha yüksek konsantrasyonlarda (10-15 mg/L) metronidazole maruz bırakılmıştır. 24., 48. ve 72. saatlerde kuyruk venasından kan alınarak floresan bir boyama tekniği olan akridin oranj mikronükleus testi gerçekleştirilmiştir. Metronidazolün yüksek konsantrasyonda *Oreochromis niloticus* eritrositlerinde mikronükleus frekansını önemli ölçüde arttırdığı bildirilmiştir (25).

Balıklarda tedavi ve profilaktik amaçla kullanılan bileşiklerin genotoksisitelerinin incelendiği çalışmalarda, genotoksik etkinin terapötik dozun yanı sıra daha yüksek konsantrasyonlarda da değerlendirildiği görülmektedir. İşletmelerde tedavi amacıyla yüksek dozlarda ilaç kullanılabileceği de göz önüne alınarak çalışmamızda amoksisilinin tedavi dozunun yanı sıra daha yüksek dozlardaki genotoksik potansiyeli de incelenmiştir. Uygulanacak doz, amoksisilinin balıklardaki toksisitesine ilişkin veriler dikkate alınarak belirlenmiştir. Bu amaçla gerçekleştirilen bir çalışmada, 10 gün süreyle 80- 400 mg/kg arasındaki dozlarda amoksisilin uygulanan balıkların yeme karşı ilgileri, davranış özellikleri ve gelişim düzeylerinin yanı sıra hematolojik ve histopatolojik parametreler de incelenmiştir. Amoksisilinin 400 mg/kg dozda, dalaktaki makrofaj hücrelerinde eritrofagositoz aktivitesini arttırdığı ancak

incelenen diğ er tüm parametrelerin normal sınırlarda saptandığı bildirilmiştir. Buna göre amoksisilinin 400 mg/kg ve altındaki dozlarda toksik etki göstermediğı sonucuna ulaşılmıştır (**101**). Akuakültürlerde kullanılan çeşitli antibiyotiklerin sucul canlılar üzerindeki toksik etkilerinin değerlendirildiğı bir diğ er çalışmada da amoksisilinin 96 saat LC<sub>50</sub> değeri 1000 mg/ L olarak saptanmış ve akut toksisitesinin oldukça düşük olduğu bildirilmiştir (**111**).

Çalışmamızda her bir uygulama grubunda, ortalama ağırlıkları 40- 60 gram olan 30 adet gökkuşağı alabalığı kullanılmıştır. Tedavi dozunun üzerinde seçilen 320 mg/kg'lık dozun uygulanmasında, ortalama canlı ağırlık göz önüne alınarak balıkların bulunduğu 500 litrelik fiberglass tanklar içerisine yaklaşık 500 mg amoksisilin trihidrat yemlerle pelet haline getirilerek eklenmiştir. Amoksisilinin balıklardaki toksisitesine ilişkin veriler değerlendirildiğinde, bu çalışmada balıkların maruz kaldıkları amoksisilin miktarının toksik değerlerin oldukça altında olduğu görölmektedir.

Çalışmamızda, DNA hasarını farklı parametrelerle ortaya koyan comet yöntemi ve mikronükleus testi kullanılmıştır. Comet yöntemi, standart genotoksisite test sisteminde yer almamasına rağmen günümüzde tercih edilen ve hücrelerin DNA'larını tek tek inceleyerek genotoksik ajanlar tarafından oluşturulan DNA hasarını analiz etme imkanı veren bir yöntemdir. Yöntemin uygulanmasında standart bir protokol bulunmasına rağmen, uygulama basamaklarında araştırmacılara göre bazı farklılıklar görölebilmektedir. Örnekle olarak; lamaların kaplanması aşamasında bazı araştırmacılar hücreleri korumak amacıyla üç tabakalı lam modelini tercih ederken, yapılan çalışmalar lamın üzerininin üçüncü bir tabaka ile kaplanmasının gerekli bir aşama olmadığını ve çalışmanın sonuçlarını değiştirmedini göstermiştir (**62, 81**). Lizis solüsyonunun içeriği de çalışmalar arasında farklılık gösterebilmektedir. Bazı araştırmacılar lizis solüsyonu içerisine N- laurilsarkozin gibi maddeler ilave ederek comet yöntemini uygulamışlar ancak bu durumun sonuçlar üzerinde herhangi bir değişikliğe sebep olmadığını bildirmişlerdir (**91**). Preparatların boyanma aşamasında ise bazı çalışmalarda propidium iodit, DAPI (4,6- diamid-ino-2-phenylindole) (**60**), YOYO-1 (benzoxazolium-4-quinolinum oxazole yellow homodimer) (**131**) gibi farklı boyalar kullanılmışsa da yapılan çalışmalar, çalışmamızda da kullanılan etidyum bromidin boya maddesi olarak tercih edildiğini göstermektedir.

Comet yönteminin sonuçları değerlendirilirken görüntü analiz programları aracılığıyla kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti, kuyruktaki DNA yüzdesi gibi farklı parametreler belirlenebilmektedir. Çalışmamızda sonuçlar değerlendirilirken, oluşan hasarın şiddeti ile doğru orantılı olduğu ve diğer parametrelere göre doz- cevap ilişkisini daha iyi yansıttığı bildirilen kuyruktaki % DNA değeri esas alınmıştır (98, 103).

Benzer şekilde, mikronükleus testinin uygulanması sırasında da kullanılan boyama solüsyonu veya sayım kriterleri gibi aşamalar yönünden çalışmalar arasında farklılıklar görülebilmektedir. Bu çalışmada boyama amacıyla fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış % 10'luk giemsa solüsyonu kullanılmıştır. Giemsa solüsyonu, hücreler içerisinde mikronükleusları sitoplazmik materyalden daha koyu renkte boyadığı için tercih edilen bir boya maddesidir. Bazı çalışmalarda giemsa solüsyonunun sorenson tampon çözeltisi veya distile su içerisinde hazırlanabileceği bildirilmiştir (3). Boyama amacıyla genellikle giemsa boyası kullanılsa da son yıllarda akridin oranj gibi DNA'ya reaktif floresan boyaların kullanılması ile küçük mikronükleuslar da tespit edilebilmektedir (25).

Mikronükleus frekansının değerlendirilmesi amacıyla 500-5000 arasında hücre sayılabilmektedir. Ancak yapılan çalışmaların çoğunda değerlendirme aşamasında 1000-2000 hücre sayıldığı görülmektedir (4, 26, 27, 76). Farklı balık türlerinde mikronükleus testi ile gerçekleştirilen genotoksisite çalışmalarının sonuçları incelendiğinde, 1000 eritrosit hücresinde 0,1 mikronükleuslu hücre görülebildiği gibi 10'un üzerinde mikronükleus oluşumu da izlenebilmektedir (65). Bu bilgiler doğrultusunda, çalışmamızda her bir balık için 2000 eritrosit değerlendirilmiştir. En yüksek mikronükleus frekansı, siklofosfamid uygulanan grupta 6. günde, 2000 hücrede ortalama 28,26 olarak saptanmıştır.

Sucul organizmalar üzerinde gerçekleştirilen birçok genotoksisite çalışmasında mikronükleus ve comet yöntemlerinin bir arada uygulandığı ve sonuçların her iki yöntemden elde edilen veriler göz önüne alınarak değerlendirildiği görülmektedir (27, 80, 86). Gerek comet gerekse mikronükleus testleri, sucul ortamdaki genotoksisitenin değerlendirilmesinde yüksek duyarlılığa sahip olmalarına rağmen, araştırmacılar hangi yöntemin daha duyarlı olduğu konusunda farklı görüşler bildirmişlerdir.

Mikronükleus testi balıklarda kromozom analizlerine göre tercih edilen bir yöntem olmasına rağmen Carasso ve ark. (24), çekirdek morfolojisinde zaten var olan

düzensizliklerin mikronükleus ile karışabileceğini ve bu nedenle yöntemin genotoksisitenin kesin değerlendirilmesi konusunda yetersiz kalabileceğini ifade etmişlerdir.

Yılın farklı mevsimlerinde Sava nehrindeki kirliliğin *Squalius cephalus L.* türü üzerindeki genotoksik etkisi comet ve mikronükleus testleri ile değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda, biyoizleme çalışmalarında comet ve mikronükleus testlerinin birlikte kullanılabilir olduğu ancak DNA hasarının saptanmasında comet yönteminin mikronükleus testine kıyasla daha duyarlı bir yöntem olduğu sonucuna ulaşılmıştır **(113)**.

Sucul organizmalar üzerinde iki testin sonuçlarının beraber değerlendirildiği bir diğer çalışma da Bücken ve ark. **(23)** tarafından gerçekleştirilmiştir. *Apteronotus bonapartii* türü balıklarda benzen tarafından indüklenen DNA hasarının incelendiği çalışmada, comet oluşumunun daha erken dönemde şekillendiği ve düşük dozlarda bile comet frekansının mikronükleusa göre daha yüksek görüldüğü belirtilmiştir. Benzenin 10 ppm konsantrasyonda comet frekansını arttırdığı ancak mikronükleus oluşumuna sebep olmadığı saptanmıştır. Araştırmacılar, elde ettikleri sonuçlar doğrultusunda comet yönteminin erken dönemdeki DNA hasarının saptanmasında daha etkili bir yöntem olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Farklı bir çalışmada ise bu verilere paralel olarak, mikronükleus oluşumunun birçok balık türünde genotoksik ajanlara maruz kaldıktan sonraki 2. veya 3. günlerde gerçekleştiği bildirilmiştir **(67)**.

Comet ve mikronükleus testlerinin sonuçlarının karşılaştırıldığı bir diğer çalışma da, genotoksik etkisi bilinen çeşitli bileşiklere maruz bırakılan *Cyprinus carpio*, *Oncorhynchus mykiss* ve *Spisula sachalinensis* türleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, comet yönteminin sonuçlarındaki istatistiksel önemlilik mikronükleus testine göre daha yüksek bulunmuştur. Aynı şekilde konsantrasyon- genotoksik etki arasındaki korelasyon da comet testinde daha belirgin olarak saptanmıştır. Araştırmacılar, her iki yöntemin bir arada uygulanmasının genotoksisite açısından daha güvenilir sonuçlar sağlayacağını bildirmişlerdir **(80)**.

İki yöntemin duyarlılığı memeliler üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarla da değerlendirilmiştir. Direkt ve indirekt etkili mutajen olduğu bilinen bileşiklere maruz bırakılan *mus domesticus* türü farelerde comet ve mikronükleus testlerinin duyarlılığı incelenmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda, comet yönteminin direkt etkili

mutajenler tarafından indüklenen hasarın saptanmasında etkili olduğu ancak yüksek konsantrasyonlarda bile mitomisin C gibi indirekt mutajenlerden kaynaklanan hasarı saptayamadığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu çalışmada, mikronükleus testi DNA hasarının saptanmasında daha duyarlı bir yöntem olarak tanımlanmıştır (142).

Görüldüğü gibi mikronükleus ve comet testlerinin duyarlılığı konusundaki görüşler tartışmalıdır ve elde edilen sonuçlar her zaman birbirini tamamen destekler nitelikte değildir. Ancak araştırmacılar, iki yöntemin duyarlılığı ve performansı değerlendirilirken, DNA'daki farklı tip hasarları yansıttıklarının göz önüne alınması gerektiğini belirtmektedir (22, 23). Mikronükleuslar hücrelerde mitoz bölünme sırasında ortaya çıkan oluşumlardır. Dolayısıyla mikronükleus frekansında anlamlı bir artış görülebilmesi, hücre siklusu ve hücre bölünmesi ile yakından ilişkilidir. Comet yöntemi ise hücre siklusu ile ilişkili olmayıp genotoksik ajanlar tarafından indüklenen DNA hasarını direkt olarak ortaya koyan bir parametredir. Çalışmamızda her iki yöntemde de 320 mg/kg doz grubunda 3. ve 6. günler arasında DNA hasarında artış saptanmıştır. Ancak comet oluşumu yönünden bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ( $P<0,01$ ), mikronükleus frekansı açısından istatistiksel bir önemlilik göstermemiştir. Bu durum mikronükleus oluşumunun eritrositlerin mitotik aktivitelerine bağlı olması ve balık eritrositlerinde mitotik indeksin düşüklüğü ile açıklanabilir (63).

Amoksisilinin genotoksik etkisinin, farklı canlı türlerinde ve çoğunlukla *in vitro* koşullarda değerlendirildiği bir çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Memelilerde gerçekleştirilen çalışmalarda elde edilen sonuçların birbirleriyle çelişkili olduğu görülmektedir. Bileşiğin balıklar üzerindeki genotoksik etkisinin araştırıldığı çalışmalar ise oldukça eski ve sayıca yetersizdir.

*In vitro* koşullarda comet yöntemi ile gerçekleştirilen çalışmada, amoksisilinin genotoksitesisi insan periferik lenfositlerinde, sağlıklı gastrik mukoza hücrelerinde ve *Helicobacter pylori* ile enfekte olan gastrik mukoza hücrelerinde araştırılmıştır (8). Elde edilen sonuçlara göre amoksisilinin 5 mmol/L konsantrasyonda, hücrelerde DNA zincir kırılmalarına ve baz modifikasyonuna neden olabileceği bildirilmiştir. Daha düşük konsantrasyonlarda ise DNA hasarı meydana gelmemiştir. DNA hasarı *Helicobacter pylori* ile enfekte olan hücrelerde diğer hücrelere oranla daha belirgin olarak saptanmıştır. Çalışmada, DNA onarımında görevli enzim sistemlerinin etkinliği de değerlendirilmiş ve oluşan hasarın, bileşiğin ortamdan uzaklaştırılmasını takiben

yaklaşık 1 saat içerisinde tamamen onarıldığı görülmüştür. DNA hasarının indüklenmesi için bileşiğin hücrel aktivasyonunun gerekli olduğu bildirilmiştir.

Amoksisilinin genotoksik etkisinin moleküler düzeyde değerlendirildiği bir diğer çalışmada, insan (AGS ve NB4) ve hamster (UV24 ve CHO-K1) hücre serilerinde gerçekleştirilmiştir (90). Nükleer ekstrakt inkübasyonlu comet yöntemi ile yapılan çalışmada, değişen konsantrasyonlarda (0- 10 mM) amoksisiline maruz bırakılan hücrelerde düşük konsantrasyonlarda bile DNA lezyonlarının arttığı görülmüştür. Bu çalışmada amoksisiline bağlı oluşan DNA hasarının oldukça hızlı şekillendiği ve onarımın AGS hücre serilerinde 4 saat içerisinde tamamlandığı bildirilmiştir. Araştırmacılar baz kesip çıkarma onarım mekanizmasının hasarın giderilmesinde etkili olabileceğini bildirmişlerdir.

Amoksisilin- klavulanik asit kombinasyonu ise *in vitro* koşullarda Ames testi ile negatif sonuç verirken, fare lenfoma testi ile yapılan çalışmalarda sitogenetik konsantrasyonda zayıf genotoksik etki görüldüğü saptanmıştır (139).

Amoksisilinin farklı konsantrasyonlarda insan periferik lenfositleri üzerindeki genotoksik etkisi kardeş kromatit değişim testi, kromozom aberasyon yöntemi ve mikronükleus testi ile incelenmiştir (73). Yüksek konsantrasyondaki amoksisilinin 48 saatlik muamelede ve metabolik aktivasyonsuz ortamda kromozom aberasyonlarını indüklediği tespit edilmiş ancak sonuçlar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Araştırmacılar söz konusu artışın yüksek konsantrasyonda amoksisilinin reaktif oksijen radikallerini fazla miktarda uyarmasına bağlı olarak şekillenebileceğini bildirmişlerdir. Her üç yöntemin sonuçlarına göre, amoksisilin gerek metabolik aktivatör varlığında gerekse aktivasyonsuz ortamda lenfositler üzerinde genotoksik etki göstermemiştir. Çalışmanın sonuçları, penisilin türevi ve farklı gruplardan antibiyotiklere ait genotoksikite verileri ile de karşılaştırmış ve elde edilen farklı bulgular göz önüne alınarak herhangi bir antibiyotik grubunun genotoksisitesi hakkında kesin bir fikir yürütmenin mümkün olmadığı bildirilmiştir.

Diğer beta laktam türevi antibiyotiklerle gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalarda da yüksek konsantrasyonlarda genotoksik etkinin saptandığı ve bileşiklerin DNA hasarına reaktif oksijen türevleri aracılığıyla sebep olabileceği belirtilmiştir (115, 116).

Amoksisilinin sucul canlılar üzerindeki genotoksik etkisinin değerlendirildiği çalışmalar ise oldukça sınırlıdır. Bu amaçla gerçekleştirilen çalışmada, çeşitli

amoksisilin türevlerinin sitotoksik ve genotoksik etkilerini sazangiller familyasına ait bir tatlı su balığı olan *Rutilus rubilio* türünün kromozomları üzerinde incelenmiştir (141). Çalışma *in vivo* koşullarda ve iki farklı kromozom boyama tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Çeşitli amoksisilin türevlerine maruz bırakılan gruplardan elde edilen sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, kromozom anomalilerinde istatistiksel yönden anlamlı bir artış tespit edildiği görülmüştür.

Amoksisilinin genotoksik etkisinin *Dicentrarchus labrax* embriyonik hücre serisi (DLEC) üzerinde comet yöntemi ile incelendiği bir diğer çalışmada ise, kontrol ve uygulama gruplarından elde edilen veriler karşılaştırıldığında 100 mg/ L dozda amoksisilinin bu türde DNA hasarına sebep olduğu bildirilmiştir (140).

Çalışmamızda amoksisilin gökkuşağı alabalıklarında terapötik dozda genotoksik etkili olmadığı ancak yüksek dozlarda uygulandığında mikronükleus ve comet frekansında artışa sebep olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Elde edilen bulgular balıklarda amoksisilinin genotoksitesinin değerlendirildiği diğer çalışmaları destekler niteliktedir. Amoksisilinin memelilerdeki genotoksik etkisinin değerlendirildiği çalışmaların tümünde, amoksisilinin DNA üzerinde direkt etkili olmadığı ancak oksidatif strese neden olan serbest radikaller aracılığıyla indirekt olarak DNA hasarına sebep olduğu belirtilmiştir. Oksidatif DNA hasarı, normal metabolizma sırasındaki tepkime basamaklarında oluşan oksijen radikalleri aracılığıyla endojen olarak şekillenebileceği gibi, eksojen kaynaklı çeşitli bileşikler tarafından da oluşturulabilmektedir. Serbest oksijen radikalleri oldukça reaktif moleküllerdir ve DNA ile kolayca etkileşime girerek oksidatif baz modifikasyonu ve DNA zincir kırılmalarına sebep olabilirler (42). Yapılan çalışmalar amoksisilinin memelilerde olduğu gibi balıklarda da oksidatif hasar oluşumunu indüklediğini bildirmektedir. 96 saat süreyle 100 mg/L konsantrasyonda amoksisiline maruz bırakılan zebra balıklarında, hücre içi antioksidan etkileri nedeniyle eritrositleri oksidatif hasara karşı koruyan katalaz ve glutatyon S-transferaz enzim düzeylerinin önemli ölçüde düştüğü saptanmıştır (104). Memelilerde gerçekleştirilen çalışmalarda, serbest radikallerin ömürlerinin kısa olması ve DNA onarım mekanizmalarının devreye girmesi ile, oluşan DNA hasarının kısa sürede tamir edildiği belirtilmiştir (8, 90). Ancak balıklarda DNA onarım kapasitesinin değerlendirildiği bir çok çalışma, onarım mekanizmalarının memelilerdeki kadar etkili olmadığını ve bu nedenle yüksek verimde bir onarım gerçekleşmediğini göstermektedir.

Çalışmamızda da gökkuşuğu alabalığı eritrositlerinde amoksisilin tarafından oluşturulan DNA hasarının, memelilere kıyasla daha uzun süreli bir etkiye yol açtığı görülmektedir. Comet yöntemiyle elde edilen istatistiksel veriler göz önüne alındığında, genotoksik etkinin seyrinde 6. günden sonra belli bir azalma saptandığı ancak DNA hasarının tamamen ortadan kalkmadığı görülmektedir. Bu durumun, yem alımının azalması ve onarım mekanizmalarının devreye girmesi, ancak balıklardaki onarım mekanizmalarının yüksek dozda amoksisilin tarafından oluşturulan hasarın tamamen giderilmesinde yetersiz kalması sonucu oluşabileceği düşünülmektedir. Uzun süreli genotoksisite araştırmaları ile organizmaların DNA onarım kapasitelerinin daha detaylı olarak değerlendirilebileceği öngörülmektedir. Çalışmamızdan elde edilen sonuçların, balık hastalıklarının tedavisinde kullanılan ilaçların genotoksik etkilerinin değerlendirilmesine yönelik çalışmalara katkı sağlayacağı umut edilmektedir.



## KAYNAKLAR

1. Aardema JM, Kirsch- Volders M. The in vitro micronucleus assay. İçinde Choy, W.N. (Ed), *Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment*. New York : Marcel Dekker ; 2001. 163-186.
2. Al- Sabti K, Hardig J. Micronucleus test in fish for monitoring the genotoxic effects of industrial waste products in the Baltic Sea, Sweden. *Comp Biochem Physiology Part C*. 1990; **97**: 179-182. Erişim: 18.02.2012, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/074284139090189G>
3. Al-Sabti K, Metcalfe CD. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat Res*. 1995; **343**: 121–135.
4. Ali FK, El- Shehawi AM, Seehy MA. Micronucleus test in fish genome: A sensitive monitor for aquatic pollution: *Afr. J. Biotechnol*. 2008; **7 (5)**: 606- 612. Erişim 25.09.2013, <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/viewFile/58485/46829>
5. Alink GM, Frederix- Wolters EMH, Van der Gaag MA, Van Kerkhoff JFJ, Poels CLM. Induction of sister chromatid exchanges in fish exposed to Rhine water. *Mutat. Res*. 1980; **78**: 369- 374
6. Ames BN, Lee FD, Durston WE. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1973; **70(3)**: 782-786.
7. Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian- microsome mutagenicity test. *Mutat Res*. 1975; **31**: 347-364.
8. Arabski M, Kazmierczak P, Wisniewska- Jarosinska M, Poplawski T, Klupinska G, Chojnacki J, Drzewoski J, Blasiak J. Induction of amoxicillin with DNA in human lymphocytes and *H. Pylori*- infected gastric mucosa cells. *Chemico- Biol Inter*. 2005; **152(1)**: 13-24. Erişim: 14.08.2011, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15766919>

9. Arkhipchuk VV, Garanko NN. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2005; **62 (1)**: 42–52. Erişim: 15.06.2013, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15978290>
10. Armstrong SM, Hargrave BT, Haya K. Antibiotic use in finfish aquaculture: Modes of action, environmental fate and microbial resistance. *Hdb Env Chem.* 2005; **5**: 341-357. Erişim: 14.08.2011, <http://link.springer.com/chapter/10.1007%2Fb136017>
11. Ayllon F, Garcia- Vazquez E. Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2001; **49(3)**: 221-225. Erişim: 15.06.2013, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651301920652#>
12. Ayllon F, Garcia- Vazquez E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and *Poecilia latipinna*: An assessment of the fish micronucleus test. *Mutat Res- Gen Tox En.* 2000; **(467)**: 177-186. Erişim: 15.06.2013, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383571800000334#>
13. Bacani PMC, Reis MB, Serpeloni JM, Calvo TR, Vilegas W, Varanda EA, Colus IMS. Mutagenicity and genotoxicity of isatin in mammalian cells *in vivo*. *Mutat Res.* 2011; **719**: 47-51. Erişim: 25.09.2013, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21111845>
14. Bagdonas E, Vosyliene MZ. A study of toxicity and genotoxicity of copper, zinc and their mixture to Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Biologija.* 2006 ; **1** : 8-13.
15. Bailey G, Hendricks J, Dashwood R. Anticarcinogenesis in fish. *Mutat Res.* 1992; **267**: 243-250.
16. Binelli A, Cogni D, Parolini M, Riva C, Provini A. Cytotoxic and genotoxic effects of in vitro exposure to triclosan and trimetoprim on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) hemocytes. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2009; **150**: 50-56. Erişim: 25.09.2013, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19232398>

17. Bolognesi C, Hayashi M. Micronucleus assay in aquatic animals: *Mutagenesis* 2011; **26**: 205-213.
18. Branson E. Rainbow trout fry syndrome. *Fish Vet J.* 1995; **1**: 1-7.
19. Burgu İ. *Balık hastalıkları- Kültür balıkçılığında yemleme kasetlerde balık yetiştiriciliği, balıklarda bakteri, parazit ve mantar hastalıkları* [web page on the Internet] Erişim: 11.09.2013, Ankara Üniversitesi Dergiler Veritabanı: <http://dergiler.ankara.edu.tr/dergiler/11/580/7394.pdf>
20. Burka JF, Hammell KL, Horsberg TE, Johnson GR, Rainnie DJ, Speare DJ. Drugs in salmonid aquaculture- A review. *J Vet Pharmacol Therap.* 1997; **20**: 333-349.
21. Burrige L, Weis JS, Cabello F, Pizarro J, Bostick K. Chemical use in aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture.* 2010; 306: 7-23. Erişim: 25.09.2013, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848610003297>
22. Buschini A, Martino A, Gustavino B, Monfrinotti M, Poli P, Rossi C, Santoro M, Dörr AJM, Rizzoni M. Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. *Mutat Res.* 2004; **557**: 119-129. Erişim: 15.06.2013, <http://art.torvergata.it/bitstream/2108/30790/1/carpe%2520trasimeno.pdf>
23. Bucker A, Carvalhol MS, Conceição MB, Alves- Gomes JA. Micronucleus test and comet assay in erythrocytes of the Amazonian electric fish *Apteronotus bonapartii* exposed to benzene. *J Braz Soc Ecotoxicol.* 2012; **7(1)**: 65-73. Erişim: 15.06.2013, <http://www6.univali.br/seer/index.php/eec/article/view/3710>
24. Carasso KR, Tilbury KL, Myers MS. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Can J Fish Aquat Sci.* 1990; **47**: 2123- 2136.
25. Cavas T, Ergene- Gozukara E. Genotoxicity evaluation of metronidazole using the piscine micronucleus test by acridine orange fluorescent staining. *Environ*

- Toxicol Pharmacol.* 2005; **19(1)**: 107-111. Erişim: 14.08.2011, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668904000900>
26. Cavas T, Ergene- Gozukara E. Micronucleus test in fish cells: A bioassay for In situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environ Mol Mutagen.* 2005; **46**: 64-70. Erişim: 14.08.2011, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15880416>
27. Cavas T, Könen S. In vivo genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay. *Aqua Toxicol.* 2008; **90**: 154-159. Erişim: 14.08.2011, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18922590>
28. Celik A, Ögenler O, Çömelekoğlu Ü. The evaluation of micronucleus frequency by acridine orange staining in peripheral blood of rats treated with lead acetate. *Mutagenesis.* 2005; **20**: 411-415.
29. Cipriano RC. Flavobacterium psychrophilum, cause of Bacterial Cold-Water Disease and Rainbow Trout Fry Syndrome [web page on the Internet]. 2005. Erişim: 25.09.2013, Fish Disease Leaflet No. 86: [http://www.extension.org/mediawiki/files/8/80/USFWS\\_Coldwater\\_disease.pdf](http://www.extension.org/mediawiki/files/8/80/USFWS_Coldwater_disease.pdf)
30. Collins FS, Patrinos A, Jordan E, Chakravarti A, Gesteland R, Walters L. New Goals for the U.S. Human Genome Project: 1998-2003. *Science*, 282:682- 689.
31. Costello MJ, Grant A, Davies IM, Cecchini S, Papoutsoglou S, Quigley D, Saroglia M. The control of chemicals used in aquaculture in Europe. *Journal of Applied Ichthyology.* 2001; **17**: 173- 180.
32. Cotelle S, Ferard JF. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environ mol mutagen.* 1999; **(34)**: 246-255. Erişim: 25.09.2013, [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(1999\)34:4%3C246::AID-EM4%3E3.0.CO;2-V/pdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1098-2280(1999)34:4%3C246::AID-EM4%3E3.0.CO;2-V/pdf)
33. Da Rocha CAM, Dos Santos R, Bahia MDO, Da Cunha LA, Ribeiro HF, Burbano RMR. The micronucleus assay in fish species as an important tool for xenobiotic exposure risk assesment- a brief review and an example using

neotropical fish exposed to methylmercury: *Rev Fish Sci.* 2009; **17 (4)**: 478-484.  
Erişim 25.09.2013

<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/10641260903067852>

34. Darwish AM, Ismaiel AA. Laboratory efficacy of amoxicillin for the control of *Streptococcus iniae* infection in sunshine bass. *J Aquat Animal Health.* 2003; **15(3)**: 209- 214.
35. David RM. Xenobiotic metabolism and markers of genotoxicity in regulatory nonvertebrate ecotoxicological test species. The University of Birmingham for the degree of Doctor Philosophy. Ağustos 2009.
36. De Flora S, Vigano L, D'Agostini F, Camoriano A, Bagnasco M, Bennicelli C, Melodia F, Arillo A. Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. *Mutat Res.* 1993; **319**: 167-177.
37. Debeleş- Bütüner B, Kantarcı G. Mutasyon, DNA hasarı, onarım mekanizmaları ve kanserle ilişkisi. *Ankara Ecz Fak Derg.* 2006; **35(2)**: 149-170. Erişim: 25.09.2013, <http://dergiler.ankara.edu.tr/dergiler/24/536/6656.pdf>
38. Demir O. Türkiye su ürünleri yetiştiriciliği ve yem sektörüne genel bakış II, [web page on the Internet]. Erişim: 10.10.2013; <http://esuf.sdu.edu.tr/tr/genel/su-urunleri-yetistiriciligi-2848s.html>
39. Demirel S, Zamani AG. Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Derg.* 2012; **12(3)**: 123-127. Erişim: 25.09.2013, <http://www.geneltip.org/upload/sayi/32/GTD-00230.pdf>
40. Deutsch L, Graslund S, Folke C, Troell M, Huitric M, Kautsky N, Lebel L. Feeding Aquaculture Growth Through Globalization: Exploitation of Marine Ecosystems for Fishmeal. *Global Environmental Change.* 2007 ; 17 : 238–249.
41. Dikilitaş M, Koçyiğit A. Canlılarda “Tek hücre jel elektroforez” yöntemi ile DNA hasar analizi (Teknik not): Comet assay yöntemi: *HR.Ü.Z.F. Dergisi.* 2010; **14(2)**: 77-89.
42. Dinçer Y, Kankaya S. DNA hasarının belirlenmesinde comet assay: *Türkiye Klinikleri J Med Sci.* 2010; **30(4)**: 1365- 1373.

43. Doğu Z. Farklı oranlarda çörek otu (*Nigella Sativa L.*) özütü ilave edilmiş pelet yemle beslenen gökkuşacağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*; W., 1972) üreme mevsimi boyunca bazı spermatolojik parametrelerin, spermatozoadaki DNA hasarının ve seminal plazma kompozisyonundaki değişimlerin belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Ankara, 2011.
44. DPT: *İlaç sanayii özel ihtisas komisyonu raporu*. Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Planı (İnternette) 2001, Erişim: 15.06.2013, [www.dpt.gov.tr/DocObjects/Download/3442/oik556.pdf](http://www.dpt.gov.tr/DocObjects/Download/3442/oik556.pdf)
45. Duffaud F, Orsiere T, Villani P, Pelissier AL, Volot F, Favre R, Botta A. Comparison between micronucleated lymphocytes rates observed in healthy subject and cancer patients. *Mutagenesis*. 1997; **12**: 227-231.
46. Durmaz A, Dikmen N, Gündüz C. DNA hasar analizinde tek hücre jel elektroforez (Komet yöntemi). *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 2010; **19(4)**: 236-243. Erişim: 15.06.2013, <http://www.scopemed.org/fulltextpdf.php?mno=19510>
47. Emre Y. *Alabalık Yetiştiriciliği*. TC Başbakanlık Güneydoğu Anadolu Projesi Bölge Kalkınma İdaresi Başkanlığı. [web page on the Internet] 2004. Erişim: 25.08.2013, <http://includes.gap.gov.tr/files/ek-dosyalar/proje-ve-faaliyetler/Tar%C4%B1m,%20Orman%20Ve%20K%C4%B1rsal%20Kalk%C4%B1nma/alabalik.pdf>
48. EPA: Health effects test guidelines OPPTS 870.5900 *In vitro* sister chromatid exchange assay, 1996. Erişim: 25.09.2013, [http://www.epa.gov/opptsmnt/pubs/frs/publications/Test\\_Guidelines/series870.htm](http://www.epa.gov/opptsmnt/pubs/frs/publications/Test_Guidelines/series870.htm)
49. Erer H. *Balık Hastalıkları*. Konya: Selçuk Üniversitesi Basımevi 2. Baskı; 2002.
50. Evans HJ, Neary GJ, Williamson FS. The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and x rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen, Part II chromosome damage: The production of micronuclei. *Int J Radiat Biol*. 1959; **3**: 216-229.

51. Fairbairn DW, Olive PL, O'Neil KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res.* 1995; **339**: 37-59. Erişim: 15.06.2013, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0165111094000133>
52. FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome, FAO Fisheries and Aquaculture Department, 2010.
53. FAO: *Small- scale rainbow trout farming*. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper: 561 (İnternette) 2011, Erişim: 15.06.2013, <http://www.fao.org/docrep/015/i2125e/i2125e.pdf>
54. FAO: *Yearbooks of Fishery Statistics Summary Tables 2006*. (İnternette) Erişim: 06.09.2013, [ftp://ftp.fao.org/fi/stat/summary/summ\\_06/default.htm](ftp://ftp.fao.org/fi/stat/summary/summ_06/default.htm)
55. FDA: 10-02-03 Phis.Pharm Database. (İnternette) Erişim: 14.08.2011, <http://www.fda.gov/downloads/animalveterinary/scienceresearch/toolsresources/phish-pharm/ucm153252.xls>.
56. FDA: Animal Husbandry and Disease Control: Aquaculture. (İnternette) Erişim: 14.08.2011, <http://www.fda.gov/animalveterinary/safetyhealth/antimicrobialresistance/ucm082099.htm>
57. Fenech M, Chang WP, Kirsch- Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. HUMN project: detailed description of the strong criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res.* 2003; **534**: 65-75. Erişim tarihi: 08.04.2010, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12504755>
58. Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S. The Human micronucleus project: An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res.* 1999; **428**: 271-283. Erişim: 18.02.2012, [http://ehs.sph.berkeley.edu/holland/humn/ documents/mutationresearch\\_428\\_1999.pdf](http://ehs.sph.berkeley.edu/holland/humn/ documents/mutationresearch_428_1999.pdf)

59. Galindo RJG, Leyva NR, Millan OA, Lazcano GA. Effects of pesticides on DNA and protein of shrimp larvae *Litopenaeus stylirostris* of the California Gulf. *Exotoxicol Environ Saf.* 2002; **53 (2)**: 191-5.
60. Gedik CM, Ewen SWB, Collins AR. Single cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *Int J Radiat Biol.* 1992; **62**: 313-320.
61. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Ruhsatlı Veteriner Ürünler [web page on the Internet] Erişim: 11.09.2013, <http://www.gkgm.gov.tr/vtu/>
62. Gichner T, Patkova Z, Szakova J, Demnerova K. Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage somatic mutations or homologous recombinations in tobacco leaves. *Mutat Res.* **2004**; 559: 49-57.
63. Grisolia CK, Cordeiro CMT. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. *Genet Mol Biol.* 2000; **23(1)**: 235- 239.
64. Grisolia CK, Rivero CLG, Starling FLRM, Silva ICR, Barbosa AC, Dorea JG. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. *Genet Mol Biol.* 2009; **32(1)**: 138-143. Erişim: 15.06.2013, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3032960/>
65. Gustavino B. Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (teleostei, pisces) by X-rays and colchicine. *Mutat Res.* 2001; **494**: 151-159.
66. Gülay Z. Hücre duvar sentezini etkileyen antibakteriyeller. *ANKEM Derg.* 2003; **17(3)**: 192-204. Erişim: 10.09.2013, [http://www.ankemdernegei.org.tr/ANKEMJOURNALPDF/ANKEM\\_17\\_3\\_192\\_204.pdf](http://www.ankemdernegei.org.tr/ANKEMJOURNALPDF/ANKEM_17_3_192_204.pdf)
67. Hartmann A, Elhajouji A, Kiskiinis E, Poetter F, Martus H, Fjalman A, Frieauff W, Suter W. Use of alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. *Food Chem Toxicol.* 2001; **39(8)**: 843- 858.



68. Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavourin K, MacGregor JT, Newell GW, Salamon MF. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. *Mutat Res.* 1983; **12**: 61-118.
69. Hoofman RN, De Raat WK. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in peripheral blood erythrocytes of Eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. *Mutat Res.* 1982; **104**: 147-152.
70. Iglar K. Forellen- Zucht. Leopold Stocker Verlag. Graz- Stuttgart, 1990, 127s.
71. Inglis V. Antibacterial chemotherapy in aquaculture: review of practice, associated risks and need for action [web page on the Internet]. 2000. Erişim: 06.09.2013, SEAFDEC/AQD Institutional Repository (SAIR): [http://repository.seafdec.org.ph/bitstream/handle/10862/611/9718511490\\_p007-022.pdf](http://repository.seafdec.org.ph/bitstream/handle/10862/611/9718511490_p007-022.pdf)
72. Isidori M, Lavorgna M, Nardelli A, Pascarella L, Parrella A. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non- target organisms. *Sci Total Environ.* 2005; **346**: 87- 98.
73. İstifli ES, Topaktas M. Cytogenetic genotoxicity of amoxicillin. *Environ Mol Mutagen.* 2010; **51(3)**: 222-228. Erişim: 25.09.2013, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19790260>
74. Jerbi MA, Ouanes Z, Besbes R, Achour L, Kacem A. Single and combined genotoxic and cytotoxic effects of two xenobiotics widely used in intensive aquaculture. *Mutat Res.* 2011; **724**: 22-27. Erişim: 15.06.2013, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21621636>
75. Jha NA. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. *Mutat Res.* 2004; **552**: 1-17.
76. Jiraungkoorskul W, Sahaphong S, Kasai P, Kim MH. Micronucleus test: The effect of ascorbic acid on cadmium exposure in fish (*Puntius altus*). *Res J Environ Toxicol.* 2007; **1**: 27-36.
77. Jiraungkoorskul W, Sahaphong S. Efficacy of ascoric acid reducing waterborne copper toxicity in Butterfish (*Poronotus triacanthus*). *J Biol Sci.* 2007; **7(4)**: 620-

625. Erişim: 15.06.2013,  
<http://scialert.net/qredirect.php?doi=jbs.2007.620.625&linkid=pdf>
78. Kayjan FE, Muşlu MN, Koç ND. Bazı ağır metallerin sucul organizmalar üzerinde yarattığı stres ve biyolojik yanıtlar. *J fisheriessciences.com*. 2009; **3(2)**: 153- 162.
79. Kemper N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*. 2008; **8**: 1-13.
80. Kim YI, Hyun CK. Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2006; **64**: 288-297. Erişim: 25.09.2013,  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651305001387>
81. Kocyigit A, Keles H, Selek S, Guzel S, Celik H, Erel O. Increase DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis. *Mutat Res*. 2005; **585**: 71-78. Erişim: 14.08.2011,  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383571805001294>
82. Konuk M, Liman R. Mutasyon ve mutajenler, [web page on the Internet] Erişim: 25.09.2013, <http://www2.aku.edu.tr/~mkonuk/mutasyonvemutajenler.pdf>
83. Könen S, Cavas T. Genotoxicity testing of the herbicide trifluralin and its commercial formulation Treflan using the piscine micronucleus test. *Environ Mol Mutagen*. 2008; **49(6)**: 434-438. Erişim: 14.04.2010,  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18449930>
84. Krishnaja AP. Genotoxicity assesment in the marine environments, [web page on the Internet]. Erişim tarihi: 05.05.2010,  
<http://www.scribd.com/doc/7454177/Genotoxicity-Assessment-in-the-Marine-Environments>
85. Kubilay A, Altun S, Uluköy G, Diler Ö. *Lactococcus garvieae* suşlarının antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesi. *S.D.Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*. 2005; **11**: 39-48. Erişim: 25.09.2013,  
<http://edergi.sdu.edu.tr/index.php/esufd/article/viewFile/1474/1547>

86. Kumar R, Nagpure NS, Kushwaha B, Srivastava SK, Lakra WS. Investigation of the genotoxicity of malathion to freshwater teleost fish *Channa punctatus* (Bloch) using the micronucleus test and comet assay. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2010; **58**: 123-130. Erişim: 25.09.2013, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19557474>
87. Kurelec B, Matijasevic Z, Rijavec M, Alacevic M, Britvic S, Müller WEG, Zahn RK. Induction of Benzo(a)pyrene monooxygenase in fish and the salmonella test as a tool for detecting mutagenic/carcinogenic xenobiotics in the aquatic environment. *Bull Environm Contam Toxicol.* 1979; **21**: 799-807.
88. Kurelec B. The genotoxic disease syndrome. *Marine Environmental Research.* 1993 ; **35** : 341-348.
89. Landolt ML, Kocan RM. Fish cell cytogenetics: A measure of the the genotoxic effects of environmental pollutants. *Aquatic Toxicology.* 1983; 336-353
90. Li PY, Chang YC, Tzang BS, Chen CC, Liu YC. Antibiotic amoxicillin induces DNA lesions in mammalian cells possibly via the reactive oxygen species. *Mutat Res.* 2007; **629**: 133-139. Erişim: 14.08.2011, <http://www.ufpi.br/subsiteFiles/ppgcf/arquivos/files/Antibiotic%20amoxicillin%20induces%20DNA%20lesions%20in%20mammalian.pdf>
91. Martin JV, Green MHL, Schmezer P, Zobel BL, De Meo MP, Collins A. "The single cell gel electrophoresis assay (comet assay)" A European Review. *Mutat Res.* 1993; **288 (1)**: 47-63.
92. Mavournin HK, Blakey HD, Cimino CM, Salamone FM, Heddle AJ. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene- Tox Program. *Mutat Res.* 1990 ; **239** : 29-80.
93. McClintock B. The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of the aberrant mitotic behavior of ring- shaped chromosomes. *Genetics.* 1938; **23**: 315-376.
94. Miranda Cabral Gontijo AM, Barreto RE, Speit G, Valenzuela Reyes VA, Volpato GL, Favero Salvadori DM. Anesthesia of fish with benzocaine does not

- interfere with comet assay results. *Mutat Res.* 2003; **534**: 165-172. Erişim: 14.08.2011, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12504765>
- 95.** Mitchelmore CL, Chipman JK. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat. Res.* 1998; **(399)**: 135- 147. Erişim: 25.09.2013, [http://snhs-plin.barry.edu/Research/Mitchelmore\\_DNA\\_strand\\_breakage\\_aquatic\\_organisms\\_comet\\_assay\\_environmental\\_monitoring\\_1998.pdf](http://snhs-plin.barry.edu/Research/Mitchelmore_DNA_strand_breakage_aquatic_organisms_comet_assay_environmental_monitoring_1998.pdf)
- 96.** Mortelmans K, Riccio ES. The bacterial tryptophan reverse mutation assay with *Escherichia coli* WP2. *Mutat Res.* 2000; 455: 61-69.
- 97.** Muller HJ. Artificial transmutation of the gene: *Science.* 1927; **66**: 84-87.
- 98.** Muller WU, Bauch T, Streffer C, Niedereichholz F, Bocker W. Comet assay studies of radiation- induced DNA damage and repair in various tumor cell lines. *Int J Radiat Biol.* 1994; **65**: 315-319.
- 99.** Naccial DE, Cayulab S, Jackim E. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aqua Toxicol.* 1996; **35**: 197-210.
- 100.** Nagpure NS, Sharma S, Pandey S, Kumar R, Srivastava SK, Verma MS, Kapoor D. Use of comet assay for genotoxicity assessment in fishes from Gomti River. *Indian J Fish.* 2008; **55(3)**: 285-288. Erişim: 10.10.2012, <http://epubs.icar.org.in/ejournal/index.php/IJF/article/view/6904/2641>
- 101.** Nakauchi R, Miyazaki T. Toxicity of amoxicillin to yellowtail. *Fish Pathology.* 1988; **23 (4)**: 251-255.
- 102.** OECD: In vitro mammalian chromosome aberration test. OECD Guideline For Testing of Chemicals 473, 1997; Erişim: 25.09.2013, <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948434.pdf>
- 103.** Olive PL, Banath JP, Durand RE. Heterogeneity in radiation induced DNA damage and repair in tumour and normal cells using the “Comet” assay. *Radiat Res.* 1990; **122**: 86-94.

- 104.** Oliveira R, McDonough S, Ladewig JC, Soares AM, Nogueira AJ, Domingues I. Effects of oxytetracycline and amoxicillin on development and biomarkers activities of zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol Pharmacol.* 2013; **36(3)**: 903-912. Erişim : 25.09.2013, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668913001816>
- 105.** Onur E, Tuğrul B, Bozyiğit F. DNA hasarı ve onarım mekanizmaları. *Türk Klinik Biyokimya Derg.* 2009; **7(2)**: 61-70. Erişim: 25.09.2013, [http://tkb.dergisi.org/pdf/pdf\\_TKB\\_120.pdf](http://tkb.dergisi.org/pdf/pdf_TKB_120.pdf)
- 106.** OSPAR: *Survey on Genotoxicity Test Methods for the Evaluation of Waste Water within Whole Effluent Assesment.* OSPAR Comission (İnternette) 2002, Erişim: 17.10.2013, [http://www.ospar.org/documents/dbase/publications/p00156/p00156\\_genotoxicity%20test%20methods%20for%20the%20evaluation%20of%20waste%20water.pdf](http://www.ospar.org/documents/dbase/publications/p00156/p00156_genotoxicity%20test%20methods%20for%20the%20evaluation%20of%20waste%20water.pdf)
- 107.** Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation- induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984; **123**: 291-298.
- 108.** Öztürk T, Didinen BI, Doğan G, Özer A, Bircan R. Lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) in the middle Black Sea Region in Turkey and antimicrobial susceptibility of the aetiological agent, *Lactococcus garvieae*. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg.* 2013; **24**: 7-12. Erişim: 25.09.2013, <http://www.etlikvet.gov.tr/public/files/Etlik-c24s1.pdf>
- 109.** Pamplona JH, Oba ET, Da Silva TA, Ramos LP, Ramsdorf WA, Cestari MM, Oliveira Ribeiro CA, Zampronio AR, Silva de Assis HC. Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*. *Exotoxicol Environ Saf.* 2011; **74(3)**: 342-349. Erişim: 15.06.2013, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651310002800#>
- 110.** Papis E, Davies SJ, Jha AN. Relative sensitivity of fish and mammalian cells to the antibiotic trimetophrim: cytotoxic and genotoxic responses as determined by neutral red retention, Comet and micronucleus assays. *Ecotoxicology.* 2011;

**20(1):** 208-217. Erişim: 15.06.2013,  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21104197>

- 111.** Park S, Choi K. Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. *Ecotoxicology*. 2008 **17 (6)**: 526-538.
- 112.** Parlak H, Çakal- Arslan Ö, Boyacıoğlu M, Karaaslan MA. *Ekotoksikoloji Ders Kitabı*. İzmir: Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, No: 79, 2009.
- 113.** Pavlica M, Stambuk A, Malovic L, Mladinic M, Klobucar GIV. DNA integrity of chub erythrocytes (*Squalius Cephalus L.*) as an indicator of pollution- related genotoxicity in the River Sava. *Environ Monitor Assess*. 2011; **177**: 85-94. Erişim: 15.06.2013, <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10661-010-1620-3>
- 114.** Perovic A, Perovic S, Erdinger L, Hollert H. Assessment of the genotoxic potential of Lake Skadar sediments using ames test and comet assay on fish cell line RTL-W1. *Arch Biol Sci, Belgrade*. 2012; **64(1)**: 249-256.
- 115.** Quinlan GJ, Gutteridge JM. DNA base damage by beta- lactam, tetracycline, bacitracin and rifamycin antibacterial antibiotics. *Biochem Pharmacol*. 1991; **42**: 1595-1599.
- 116.** Quinlan GJ, Gutteridge JM. Oxidative damage to DNA and deoxyribose by beta- lactam antibiotics in the presence of iron and copper salts. *Free Radic Res Commun*. 1988; **5(3)**: 149-158.
- 117.** Roccaa GD, Zaghinib A, Zanonib R, Sanguinettib V., Zanchettac S, Di Salvoa A, Malvisia J. Seabream (*Sparus aurata L.*): Disposition of amoxicillin after single intravenous or oral administration and multiple dose depletion studies. *Aquaculture*. 2004; **232**: 1-10.
- 118.** Rocco L, Peluso C, Stingo V. Micronucleus test and comet assay for the evaluation of zebrafish genomic damage induced by erythromycin and lincomycin. *Environ Toxicol*. 2011; **27 (10)**: 598-604. Erişim: 18.02.2012, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/tox.20685/pdf>
- 119.** Rodgers CJ, Furones MD. *Antimicrobial agents in aquaculture. Practice, needs and issues* [web page on the Internet] 2009. Erişim: 15.06.2013, CIHEAM:

International Centre for Advanced Mediterranean Agronomic Studies:  
<http://om.ciheam.org/om/pdf/a86/00801061.pdf>

120. Rojas E, Lopes MC, Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J Chromatogr.* 1999; **722**: 225-254.
121. Rydberg B, Johanson KJ. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. İçinde Hanawalt PC, Friedberg EC, Fox CF, editör. *DNA Repair Mechanisms*. New York: Academic Press; 1978. pp. 465- 468.
122. Sanchez-Galan S, Linde AR, Izquierdo JI, Garcia-VE. Micronuclei and fluctuating asymmetry in brown trout (*Salmo trutta*): complementary methods of biomonitor freshwater ecosystems. *Mutat Res.* 1998; **412 (3)**: 219-225.
123. Scalon MCS, Rechenmacher C, Siebel AM, Kayser ML, Rodrigues MT, Maluf SW, Rodrigues MAS, Silva LB. Evaluation of Sinos River water genotoxicity using the comet assay in fish. *Braz J Biol.* 2010; **70**: 1217:1222. Erişim: 25.09.2013, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21225163>
124. Schaeken RAG, Joke JFA, Logie C. Synthetic point mutagenesis [web page on the Internet]. Erişim: 17.10.2013, <http://www.intechopen.com/download/get/type/pdfs/id/33183>
125. Schlenk D, Benson WH, editor. *Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts*. London, UK: Taylor & Francis; 2001.
126. Sharma S, Nagpure NS, Kumar R, Pandey S, Srivastava SK, Singh PJ, Mathur PK. Studies on the genotoxicity of endosulfan in different tissues of fresh water *Mystus vittatus* using the comet assay. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2007; **53**: 617-623. Erişim: 26.04.2010, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17713809>
127. Shepherd J, Bromage N. *Intensive fish farming*. Oxford: Blackwell Science; 1988.
128. Shimizu N, Itoh H, Utiyama H, Wahl GM. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *J Cell Biol.* 1998; **140**: 1307-1320.
129. Simoniella MF, Gigena F, Poletta G, Loteste A, Kleinsorge E, Campana M, Scagnetti J, Parma MJ. Alkaline comet assay for genotoxic effect detection in

- Neotropical Fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). *Bull Environ Contam Toxicol.* 2009; **83**: 155-158. Erişim: 08.04.2010, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19466374>
- 130.** Singh NP, Mccoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for the quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988; **175**: 184-191.
- 131.** Singh NP, Stephens RE, Schneider EL. Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. *Int J Radiat Biol.* 1994; **66**: 23-28.
- 132.** Strunjak- Perovic I, Coz- Rakovac R, Popovic Topic N. Micronucleus occurrence in diploid and triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet Med Czech.* 2003; **48**: 215-219. Erişim: 25.09.2013, <http://vri.cz/docs/vetmed/48-8-215.pdf>
- 133.** Su ürünleri yetiştiriciliği modülü [web page on the Internet] Erişim: 11.09.2013, T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, [www.tarim.gov.tr/.../su\\_urunleri\\_yetistiriciligi\\_modulu.pdf](http://www.tarim.gov.tr/.../su_urunleri_yetistiriciligi_modulu.pdf)
- 134.** Tice RR, Aquarell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/ comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 2000; **35** (3): 206-221. Erişim: 25.09.2013, [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3%3C206::AID-EM8%3E3.0.CO;2-J/pdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3%3C206::AID-EM8%3E3.0.CO;2-J/pdf)
- 135.** Treves F, Brown M. Applied Fish Pharmacology. Klewer Academic Publication, Aquaculture Series 3; 2000.
- 136.** TÜİK: Türkiye İstatistik Kurumu: *Su Ürünleri İstatistikleri*. (İnternette) Erişim: 25.09.2013, [http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt\\_id=1005](http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1005)
- 137.** Türe M, Altınok İ, Işıdan H, Savaş H, Kutlu İ. PFGE metodu kullanılarak *Lactococcus garvieae*'nin genetik çeşitliliğinin ve yayılımının belirlenmesi [web page on the Internet]. 2012. Erişim: 06.09.2013, TC. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü Proje Sonuç Raporu: [http://www.sumae.gov.tr/uploads/Dosya\\_SOTAG\\_37.pdf](http://www.sumae.gov.tr/uploads/Dosya_SOTAG_37.pdf)



138. Udroui I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aqua Toxicol.* 2006; **79**: 201-204. Erişim: 14.04.2010, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16846653>
139. USFDA: Prescribing information for Augmentin ES-600 (amoxicillin/clavulanate potassium) powder for oral suspension. United States Food and Drug Administration (İnternette) 2006, Erişim: 14.08.2011, [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2011/050755s016s018lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/050755s016s018lbl.pdf)
140. Valentino V, Anlas C, Rocco L. Evaluation of genotoxic effects of amoxicillin on embryonic cell line from sea bass (*dicentrarchus labrax l*). *8th Joint Scientific Symposium of the veterinary faculties of Istanbul Üniversitesi and Ludwig-Maximilians- Universität München*, 2013; 64.
141. Vitturi R, Zava B, Colomba SM, Pellerito A, Maggio F, Pellerito L. Organometallic complexes with biological molecules: V. In vivo cytotoxicity of diorganotin (IV)- amoxicillin derivatives in mitotic chromosomes of *rutilus rubilio* (pisces, cyprinidae). *App Organomet Chem.* 1995; **9(7)**: 561-566.
142. Vrzoc M, Petras ML. Comparison of alkaline single cell gel comet and peripheral blood micronucleus assays in detecting DNA damage caused by direct and indirect acting mutagens. *Mutat Res.* 1997; **381**: 31-40.
143. Vural N. *Toksikoloji*. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No: 73; 2005.
144. WHO: *Food Safety Issues Associated With Products From Aquaculture*. WHO Technical Report Series 883 (İnternette) 1999, Erişim: 10.08.2013, [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/aquaculture.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/aquaculture.pdf)
145. WHO: *Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food*. WHO food additives series: 66 (İnternette) 2012, Erişim: 11.09.2013, [http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241660662\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241660662_eng.pdf)
146. Winter MJ, Ellis LCJ, Hutchinson TH. Formation of micronuclei in erythrocytes of the fathead minnow (*Pimephales promelas*) after acute treatment with mitomycin C or cyclophosphamide: *Mutat. Res.* 2007; **629**: 89-99.

147. Yadav KK, Trivedi SP. Evaluation of genotoxic potential of chromium (VI) in *channa punctata* fish in terms of chromosomal aberrations. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2006; 7(3): 472-476. Erişim: 15.06.2013, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17059348>
148. Yang X, Meier J, Chang L, Rowan M, Baumann PC. DNA damage and external lesions in brown bullheads (*Ameiurus Nebulosus*) from contaminated habitats: *Environ Toxicol Chem.* 2006; **25 (11)**: 3035-8.
149. Yanong RPE. *Use of antibiotics in ornamental fish aquaculture* [web page on the Internet] Erişim: 11.09.2013, University of Florida, IFAS Extension: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/FA/FA08400.pdf>
150. Yılayaz Ö. Chlorpyrifos ethyl (insektisit)'in *Capoeta trutta* (Heckel, 1843) üzerindeki genotoksik etkisinin eritrosit mikronükleus testi ile belirlenmesi. Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları, 2008.
151. Yılmaz S, Aksoy H, Ünal F, Çelik M, Yüzbaşıoğlu D. Genotoxic action of fungicide Conan 5FL (hexaconazole) on mammalian cells *in vivo* and *in vitro*. *Russ J Genet.* 2008; **44(3)**: 273-278.
152. Yousef HA, Afify A, Hasan HM, Meguid AA. DNA damage in hemocytes of *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae) exposed to contaminated food with cadmium and lead. *Natural Science.* 2010; **2(4)**: 292-297. Erişim: 25.09.2013, <http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=1722>
153. Zounkova R, Klimesova Z, Nepejchalova L, Hilscherova K, Blaha L. Complex evaluation of ecotoxicity and genotoxicity of antimicrobials oxytetracycline and flumequine used in aquaculture. *Environ Toxicol Chem.* 2011; **30 (5)**: 1184-1189.

## ETİK KURUL KARARI



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 136

30/09/2010

Sn. Prof. Dr. Oya ÜSTÜNER KELEŞ  
İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Karar No: 136  
Başvuru Tarihi: 01/09/2010

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, Araş. Gör. F. Ceren İSLAMOĞLU'na ait "Amoksisilinin Alabaklılarda (*Oncorhynchus mykiss*) In Vivo Genotoksik Aktivitesinin Değerlendirilmesi" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul İlkelerine uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Alay A. KAYMAZ  
I. Ü. HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Müjdat UYSAL  
Üye

Prof. Dr. Gülderen SAHİN  
Üye

Prof. Dr. Nuriye AKEV  
Üye

Prof. Dr. Alper YILMAZ  
Üye

Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK  
Üye

Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ  
Üye

Avukat Safiye ALTUN  
Üye

Mak. Müh. Seyferin AVCI  
Üye

İstanbul Üniversitesi  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı  
İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü 34119 Beyazıt-İSTANBUL  
TEL : (0 212) 440 00 00- 10013  
E mail : hadyek@istanbul.edu.tr

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Fatma Ceren	<b>Soyadı</b>	ANLAŞ
<b>Doğ.Yeri</b>	İstanbul	<b>Doğ.Tar.</b>	10.01.1984
<b>Uyruğu</b>	T.C	<b>TC Kim No</b>	37700037074
<b>Email</b>	cerenis@istanbul.edu.tr	<b>Tel</b>	0 212 473 70 70/ 17143

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>	İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2014
<b>Yük.Lis.</b>		
<b>Lisans</b>	İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2007
<b>Lise</b>	Arnavutköy Korkmaz Yiğit Lisesi	2000

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	İ.Ü. Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı	2008-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi	ÜDS/ 55	

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>ALES Puanı</b>	78,151	80,432	83,266
<b>(Diğer) Puanı</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Programları	Çok iyi

## Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

### Yayınlarda/ Tebliğler:

1. YILDIRIM M, İSLAMOĞLU C. Veteriner Pratikte Yeni Antibiyoterapi Yaklaşımları. 4. KHVHD Anadolom Sürekli Eğitim Kongresi, İstanbul. 23- 24 Ekim 2009, 87-90.
2. YILDIRIM M, İSLAMOĞLU C. Veteriner Farmakovijilans. 5. KHVHD Anadolom Sürekli Eğitim Kongresi, İstanbul. 15- 16 Ekim 2010.
3. İSLAMOĞLU C, ŞAHİN E. Importance of Genotoxicity Studies In Aquaculture. Bosnian- Turkish Scientific Days, Saraybosna. 14- 17 Nisan 2011.
4. ÜSTÜN ALKAN F, ANLAŞ C, BAKIREL T, ÜSTÜNER O. Cytotoxic effects of curcumin on canine mammary tumour cell lines. 8th Joint Scientific Symposium of the Veterinary Faculties of T.C. Istanbul University and Ludwig-Maximilians- Universitat München. 9 – 12 Nisan 2013, 83
5. VALENTINO V, ANLAŞ C, ROCCO L. Evaluation of the genotoxic effects of amoxicillin on embryonic cell line from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) 8th Joint Scientific Symposium of the Veterinary Faculties of T.C. Istanbul University and Ludwig-Maximilians- Universitat München. 9 – 12 Nisan 2013, 64.
6. ÜSTÜN ALKAN F, ÇINAR S, ANLAŞ C, BAKIREL T, ÜSTÜNER O. Curcumin synergistically enhances anti-proliferative activity of cytophosphamide in canine mammary tumour cells. 2nd Bosnian- Turkish Scientific Days, İstanbul. 9- 11 Mayıs 2013.

### Sertifikalar:

1. “Programlı Hücre Ölümü Sempozyumu” ( İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ve Sürekli Eğitim Komisyonu, Sabancı Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi ve Türk Elektron Mikroskopisi Derneği) 09.04.2008
2. “Farmakoloji ve Toksikolojide Kromatografik Teknikler ve Analiz Öncesi Örnek Hazırlama Yöntemleri” (3. Ulusal Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi) 30.09.2010
3. “Balık Hastalıkları Çalıştayı” (3. Ulusal Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi) 30.09.2010
4. “Method Validation for Testing Laboratories accredited under the Standart ISO 17025” (Strengthenin Quality Infrastructure in Turkey Project- TR 0707.12.01/001) 28.09.2011
5. “Accreditation Standart ISO 17025” (Strengthenin Quality Infrastructure in Turkey Project- TR 0707.12.01/001) 26- 27.09.2011

6. “Measurement Uncertainty for Testing Laboratories” (Strengthenin Quality Infrastructure in Turkey Project- TR 0707.12.01/001) 29 –30.09.2011

**Burs:** Tinçel Kùltür Vakfı Yurtdışı Araştırma Bursu, 2012.

**Özel İlgi Alanları (Hobileri):** Fotoğraf