

**TRİFLURALİN VE ASKORBİK ASİT
KOMBİNASYONLARININ *OREOCHROMIS NILOTICUS*
ÜZERİNDEKİ GENOTOKSİK VE ANTİGENOTOKSİK
ETKİLERİNİN MİKRONÜKLEUS TESTİ
KULLANILARAK ARAŞTIRILMASI**

SERPİL KÖNEN

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MERSİN
HAZİRAN – 2007**

**TRİFLURALİN VE ASKORBİK ASİT
KOMBİNASYONLARININ *Oreochromis niloticus* ÜZERİNDEKİ
GENOTOKSİK VE ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİNİN
MİKRONÜKLEUS TESTİ KULLANILARAK ARAŞTIRILMASI**

SERPİL KÖNEN

**Mersin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Biyoloji
Ana Bilim Dalı**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Tolga ÇAVAŞ**

**MERSİN
Haziran - 2007**

Bu tezin gerek bilimsel içerik, gerekse elde edilen sonuçlar açısından tüm gerekleri sağladığı kanaatine ulaşan ve aşağıda imzaları bulunan biz jüri üyeleri, sunulan tezi oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul ediyoruz.



Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Tolga ÇAVAŞ



Jüri Üyesi
Prof. Dr. Serap ERGENE



Jüri Üyesi
Doç. Dr. Nurcan ARAS ATEŞ

Bu tezin Fen Bilimleri Enstitüsü yazım kurallarına uygun olarak yazıldığı Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../.....tarih ve/..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mahir TURHAN
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ÖZ

Bu çalışmada, yaygın biçimde kullanılan bir herbisit olan trifluralinin ve bu herbisitın ticari formu Treflan'ın ekonomik öneme sahip bir balık türü olan *Oreochromis niloticus* üzerindeki genotoksik etkileri mikronükleus testi ve morfolojik nükleus düzensizlik analizi kullanılarak laboratuvar şartları altında araştırılmıştır. Ayrıca bir antioksidan madde olan askorbik asit'in trifluralin, Treflan ve EMS (Etil metan sulfonat) tarafından oluşturulan genotoksisite üzerindeki indirgeyici etkileri araştırılmıştır.

Balıklar 1, 5 ve 10 µg/L'lik trifluralin ve Treflan dozlarına 3, 6 ve 9 gün süresince laboratuvar şartları altında maruz bırakılmışlardır. EMS (Etil metan sulfonat) 10 mg/L'lik tek bir dozda pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Askorbik asit (% 0.05) uygulamaları intraperitoneal enjeksiyon ile 0.1 ml/10g vücut ağırlığı olacak şekilde yapılmıştır.

Hem trifluralin hem de Treflan uygulamaları *O. niloticus* periferik eritrositlerinde mikronükleus ve morfolojik nükleus düzensizlik frekanslarını anlamlı oranda arttırmıştır. Ayrıca saf trifluralinin genotoksik etkilerinin ticari formülasyon Treflan'ından daha güçlü olduğu gözlenmiştir. Diğer taraftan askorbik asit uygulamalarının trifluralin, Treflan ve EMS tarafından oluşturulan mikronükleus ve morfolojik nükleus düzensizlik frekanslarını anlamlı oranda düşürdüğü belirlenmiştir. Bu sonuçlar trifluralinin balıklar üzerinde genotoksik etkiye yol açtığını ve askorbik asitin toksik kimyasallar tarafından oluşturulan genotoksisite üzerinde indirgeyici etkisinin olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Herbisit, Trifluralin, Treflan, genotoksisite, mikronükleus testi, morfolojik nükleus düzensizlikleri, askorbik asit, antigenotoksisite , *Oreochromis niloticus*.

ABSTRACT

In the present study, genotoxic effects of a widely used herbicide, trifluralin, and its commercial formulation Treflan were evaluated on a commercially important fish species, *Oreochromis niloticus*, using the micronucleus test and morphological nuclear abnormalities analyses, under laboratory conditions. Furthermore, ameliorating effects of ascorbic acid an antioxidant substance, treatment on the trifluralin, Treflan and EMS (Ethyl methane sulphonate) induced genotoxicity were investigated.

Fish were exposed to 1, 5 and 10 µg/L doses of Trifluralin and Treflan for 3, 6, and 9 days under laboratory conditions. Ethyl methane sulphonate at a single dose of 10 mg/L was used as positive control. Ascorbic acid (0.05 %) treatments were performed via intraperitoneal injection as 0.1 ml/10g body weight.

Both trifluralin and Treflan treatments significantly increased the micronucleus and nuclear abnormality frequencies in peripheral erythrocytes of *O. niloticus*. Furthermore, it was observed that the genotoxic effects of pure trifluralin were stronger than that of the commercial formulation Treflan. On the other hand, it was determined that ascorbic acid treatments significantly reduced the frequencies of Treflan, trifluralin and EMS induced micronuclei and nuclear abnormalities. These results indicated that trifluralin had genotoxic potential on fish and ascorbic acid had ameliorating effects on the genotoxicity of toxic chemicals.

Key Words: Herbicide, Trifluralin, Treflan, genotoxicity, micronucleus test, nuclear abnormalities, ascorbic acid, antigenotoxicity , *Oreochromis niloticus*.

TEŞEKKÜR

Tez alıŐmalarım sűresince beni yűnlendiren, bilimsel katkılarımı ve yardımlarımı esirgemeyen deęerli danıŐman hocam Yrd. Doç. Dr. Tolga ÇAVAŐ'a yakın ilgi, anlayıŐ ve desteęinden dolayı teŐekkűr ederim.

Tez çalıŐmalarım esnasında bilgi ve gűrűŐlerinden yararlandıęım sayın hocam Prof. Dr. Serap ERGENE'ye, deneylerimin yűrűtűlmesi esnasında űnerileri ile katkıda bulunan Doç. Dr. Ayla ÇELİK'e teŐekkűr ederim.

ÇalıŐmalarım sűresince maddi ve manevi desteęiyle daima yanımda olan sevgili aileme teŐekkűrű borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
2.1. GENETİK TOKSİKOLOJİ.....	4
2.1.1. Mikronükleus Testi.....	7
2.1.2. Morfolojik Nükleus Düzensizlikleri.....	9
2.2. GENETİK TOKSİKOLOJİ TESTLERİNDE MODEL ORGANİZMA OLARAK BALIKLAR.....	11
2.3. PESTİSİTLER	14
2.3.1. Sucul Ortamlarda Pestisitler.....	15
2.3.2. Pestisitlerin Genotoksik Etkileri.....	18
2.3.3. Trifluralin	21
2.3.3.1. Trifluralin'in genotoksik etkileri.....	23
2.4. ANTİGENOTOKSİK MADDELER (ANTİMUTAJENLER).....	25

2.4.1. Askorbik Asit (Vitamin – C).....	26
3. MATERYAL VE METOT.....	29
3.1. KULLANILAN KİMYASALLAR.....	29
3.2. TEST ORGANİZMASI OLARAK KULLANILAN BALIK TÜRÜ.....	29
3.3. DENEY PLANI.....	30
3.3.1. EMS, Trifluralin, Treflan’ın Genotoksik Etkilerinin İncelenmesi.....	30
3.3.2. Askorbik Asit’in Antigenotoksik Etkilerinin İncelenmesi.....	30
3.4. MİKRONÜKLEUS TESTİ.....	32
3.4.1. Mikronükleus Sayım Kriterleri.....	32
3.5. MORFOLOJİK NÜKLEUS DÜZENSİZLİK ANALİZİ.....	34
3.6. İSTATİSTİK ANALİZLER.....	34
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	36
4.1. BULGULAR.....	36
4.1.1. Etken Madde Trifluralin’in Genotoksik Etkileri.....	36
4.1.1.1. Mikronükleus verileri.....	36
4.1.1.2. Morfolojik nükleus düzensizlik verileri.....	38
4.1.2. Ticari Form Treflan’ın Genotoksik Etkileri.....	38
4.1.2.1. Mikronükleus verileri.....	38
4.1.2.2. Morfolojik nükleus düzensizlik verileri.....	42
4.1.3. Askorbik Asitin Antigenotoksik Etkileri.....	44

4.2. TARTIŞMA.....	53
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	61
KAYNAKLAR.....	64
ÖZGEÇMİŞ.....	77

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE	SAYFA
Çizelge 2.1. Türkiye’de yıllara göre pestisit tüketimi (kg veya L)*	15
Çizelge 2.2. Ege ve Akdeniz Bölgeleri ile Doğu Anadolu ve Güney Doğu Anadolu Bölgelerinin Türkiye pestisit tüketimindeki preparat olarak payları	15
Çizelge 2.3. Trifluralin’in bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	21
Çizelge 2.4. 1999 - 2002 yıllarında Türkiye’de en yoğun kullanılan herbisitler ve genel herbisit tüketimindeki payları	22
Çizelge 4.1. Trifluralin uygulanan <i>Oreochromis niloticus</i> örneklerinde belirlenen mikronükleus frekansları (%o Ortalama \pm S.H.).....	37
Çizelge 4.2. Trifluralin’e maruz bırakılan <i>O. niloticus</i> eritrositlerinde morfolojik nükleus düzensizlik frekansları (%o Ortalama \pm S.H.). (BN: binükleus, LN: loblu nükleus, TN: tomurcuklu nükleus, ÇN: Çentikli nükleus).....	39
Çizelge 4.3. Treflan herbisiti uygulanan <i>Oreochromis niloticus</i> örneklerinde belirlenen mikronükleus frekansları (%o Ortalama \pm S.H.)	40
Çizelge 4.4. Treflan herbisitine maruz bırakılan <i>O. niloticus</i> eritrositlerinde morfolojik nükleus düzensizlik frekansları (%o Ortalama \pm S.H.) (BN: binükleus, LN: loblu nükleus, TN: tomurcuklu nükleus, ÇN: Çentikli nükleus).....	43
Çizelge 4.5. Askorbik asit (AA) uygulanan <i>Oreochromis niloticus</i> örneklerinde belirlenen mikronükleus frekansları.....	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL	SAYFA
Şekil 2.1. Genotoksik maddelerin etkileşim yolları ve olası sonuçları	5
Şekil 2.2. Mikronükleus taşıyan bir hücrenin oluşum aşamaları.....	8
Şekil 2.3. Gen amplifikasyonu ve KBK döngüsü nükleus tomurcuklanması	10
Şekil 2.4. Pestisitlerin sucul ortamlarda izlediği yollar ve olası etkileşimleri	17
Şekil 2.5. Trifluralin'in kimyasal yapısı.....	21
Şekil 2.6. Askorbik asit'in kimyasal yapısı.....	26
Şekil 3.1. <i>Oreochromis niloticus</i> 'un genel görünümü	29
Şekil 3.2. <i>Oreochromis niloticus</i> 'larda negatif kontrol, metanol kontrol, trifluralin, Treflan ve EMS uygulama deneyleri.....	31
Şekil 3.3. <i>Oreochromis niloticus</i> 'larda askorbik asit ve trifluralin, Treflan ve EMS kombinasyonu deneyleri.....	33
Şekil 3.4. Periferel eritrositlerde mikronükleus ve morfolojik nükleus düzensizlikleri	35
Şekil 4.1. Trifluralin'e maruz bırakılan <i>O. niloticus</i> eritrositlerinde belirlenen mikronükleus (MN) frekansları.....	41
Şekil 4.2. Treflan'a maruz bırakılan <i>O. niloticus</i> eritrositlerinde belirlenen mikronükleus (MN) frekansları	41
Şekil 4.3. Askorbik asite (AA) maruz bırakılan <i>O. niloticus</i> 'larda belirlenen mikronükleus ve morfolojik nükleus düzensizlik frekansları.....	46
Şekil 4.4. Askorbik asitin Etil Metan Sulfonat (EMS) tarafından oluşturulan mikronükleus ve morfolojik nükleus düzensizlik frekansları üzerindeki etkileri.....	46
Şekil 4.5. Askorbik asitin Trifluralin herbisiti tarafından oluşturulan mikronükleus ve morfolojik nükleus düzensizlik frekansları üzerindeki etkileri.....	47
Şekil 4.6. Askorbik asitin Treflan herbisiti tarafından oluşturulan mikronükleus ve morfolojik nükleus düzensizlik frekansları üzerindeki etkileri.....	47
Şekil 4.7. <i>O. niloticus</i> 'da normal eritrosit hücreleri.....	49
Şekil 4.8. <i>O. niloticus</i> 'da mikronükleuslu eritrosit oluşumu.....	49

ŞEKİL

SAYFA

Şekil 4.9. <i>O. niloticus</i> eritrositlerinde binükleuslu, çentikli ve mikronükleus oluşumları.....	50
Şekil 4.10. <i>O. niloticus</i> eritrositlerinde çentik, tomurcuk ve mikronükleus oluşumları.....	50
Şekil 4.11. <i>O. niloticus</i> eritrositlerinde çentik ve tomurcuk oluşumları.....	51
Şekil 4.12. <i>O. niloticus</i> eritrositlerinde lob, tomurcuk, çentik ve tri nükleus oluşumları.....	51
Şekil 4.13. <i>O. niloticus</i> eritrositlerinde binükleus, tomurcuk ve çentik oluşumları.....	52
Şekil 4.14. <i>O. niloticus</i> eritrositlerinde lob, çentik ve mikronükleus oluşumları.....	52

KISALTMALAR DİZİNİ

MN: Mikronükleus

TN: Tomurcuklu nükleus

LN: Loblu nükleus

BN: Binükleus

ÇN: Çentikli nükleus

AA: Askorbik asit

EMS: Etil metan sulfonat

1. GİRİŞ

Günümüz dünyasının en önemli sorunlarından biri de hızla artan dünya nüfusunun ihtiyacını karşılayacak oranda gıda maddesinin elde edilememesidir. Gıda ve Tarım Örgütü'nün (FAO: Food and Agriculture Organisation) raporlarına göre her yıl insanlara yaklaşık 15-20 milyon ton zirai gıda maddesi gerekmektedir [1]. Dünyanın yüzölçümü sınırlı olduğundan giderek artan bu ihtiyacı karşılayacak üretim için yeni alanların tarıma açılması mümkün olamamaktadır. Bu nedenle, birim alandan elde edilen verimi arttırmak amacı ile pestisit adı altında gruplandırılan çeşitli kimyasallar kullanılmaya başlanmıştır. Pestisitler, modern tarımın tamamlayıcı bir bileşeni halindedir. Bugün tüm zirai ekosistemlerdeki üretim süreci en az bir ya da daha fazla sayıda pestisit uygulamasına gereksinim duymaktadır. Bu nedenle pestisitler tüm dünyada kullanımından vazgeçilemeyecek maddeler olarak kabul edilmektedir [1].

İdeal bir pestisit yalnızca hedef organizmayı etkileyen, ekosistemde uzun süreli olarak kalıcı olmayan ve zararlı çevresel etkileri olmayan kimyasal madde olarak tanımlanmasına rağmen, günümüzde birçok pestisit ekosistemler arasında taşındığı ve hedef olmayan organizmalarda direkt ya da dolaylı olarak çeşitli toksik etkilere yol açabildikleri bilinmektedir [2]. Bu toksik etkilerden özellikle kalıtım materyali DNA üzerinde ortaya çıkabilecek genotoksik hasarların belirlenmesi büyük önem taşımaktadır [3].

Doğada kimyasal kirlenmeye neden olan bu maddeler, canlılar arasındaki besin zincirini veya direkt kontaminasyon ile insan sağlığını tehdit etmektedir. Sucul ekosistemler aralarında pestisitlerin de bulunduğu çoğu kirleticilerin genel alıcısı konumundadırlar. Bu nedenle sucul ortamlarda bulunan ya da bu ortamları kirletme riski bulunan maddelerin genotoksik etkilerinin belirlenmesi için yapılan çalışmalar yoğun biçimde sürdürülmektedir [4]. Yenilenebilir bir kaynak olmasına rağmen, gün geçtikçe su rezervlerinin geri dönüşsüz bir şekilde kirletilmesi bu alandaki çalışmaların özellikle son yıllarda önem kazanmasına neden olmuştur.

Çevresel araştırma ve risk değerlendirme süreçlerinde genetik etkilerin incelenmesine olanak sağlayan ucuz ve hızlı sonuç veren testlerin kullanılması gereklidir. Bu amaçla; hem laboratuvar hem de doğal ortamlarda uygulanabilen ve düşük maliyetli bir teknik olan mikronükleus testi, yapısal DNA hasarlarının belirlenmesi amacı ile yaygın biçimde kullanılmaktadır [5]. Son yıllarda, mikronükleus yanında, diğer bazı morfolojik nükleus bozukluklarının da genetik toksikoloji göstergesi olarak kullanılabileceği öne sürülmektedir [6]. Bunlardan özellikle lob ve tomurcuklanma gibi bazı nükleus düzensizliklerinin genotoksik etkileşimler sonucu ortaya çıkabileceği ve hatta yeni bir mikronükleus oluşum mekanizması için temel oluşturabileceği öne sürülmektedir [7].

Sucul ekosistemlerle ilişkili genotoksik etkilerin çalışılmasında kullanılan çeşitli omurgasız ve omurgalı test organizmaları bulunmakla birlikte özellikle son 10 yılda model organizma olarak balık türlerinin kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır [5]. Bununla birlikte, balıkların antigenotoksisite çalışmalarında model organizma olarak kullanılabilirliğine dair yürütülen çalışmalar son derece sınırlıdır [8].

Trifluralin zirai mücadelede uzun yıllardan beri en yaygın kullanılan herbisitlerin başında gelen, geniş yapraklı bitkiler ve çimenlerin kontrolünde kullanılan bir dinitroanilin herbisittir [9]. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC: International Agency For Research on Cancer) tarafından grup 3 karsinojen olarak sınıflandırılan trifluralinin balıklar üzerindeki genotoksik etkileri henüz çalışılmamıştır [10].

Pestisitlerin gün geçtikçe artan oranda kullanımının beraberinde getirdiği genetik problemlerin araştırılmasında genellikle ya etken maddenin kendisi ya da ticari formunun tek başına test edilmesi, formülasyonlardaki farklılıklardan dolayı tartışmalı sonuçlara varılmasına neden olmaktadır. Genel olarak saf etken maddeler kimyasal isimleriyle bilinirken, genellikle çok yaygın kullanılan ticari isimleriyle de anılmaktadırlar. Bu nedenle bu çalışmada genotoksik etkileri tartışmalı bir herbisit olan trifluralinin hem saf etken madde olarak kendisinin hem de Treflan olarak adlandırılan bir ticari formülasyonunun, hedef olmayan ekonomik bir organizma olan

Oreochromis niloticus (Pisces: Perciformes) üzerindeki genotoksik etkilerinin mikronükleus ve morfolojik nükleus düzensizlik testleri kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır.

Askorbik asit ya da diğer adıyla vitamin-C çeşitli çalışmalarla antigenotoksik özelliğe sahip olduğu gösterilmiş olan ve suda çözünebilen bir antioksidan maddedir [11-12]. Balık yetiştiriciliğinde de yaygın olarak kullanılan önemli maddelerden biri olmasına rağmen askorbik asidin balıklar üzerindeki antigenotoksik etkilerinin belirlenmesine dair şu ana kadar yapılan çalışmalar son derece sınırlıdır. Bu çalışmada ayrıca, antioksidan bir madde olan askorbik asidin Treflan, trifluralin ve mutajenik bir madde olan etil metan sulfonata (EMS) maruz bırakılan balıklar üzerindeki antigenotoksik etkilerinin belirlenmesi ve balıkların antigenotoksisite çalışmalarında model olarak kullanılabilirliğinin test edilmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. GENETİK TOKSİKOLOJİ

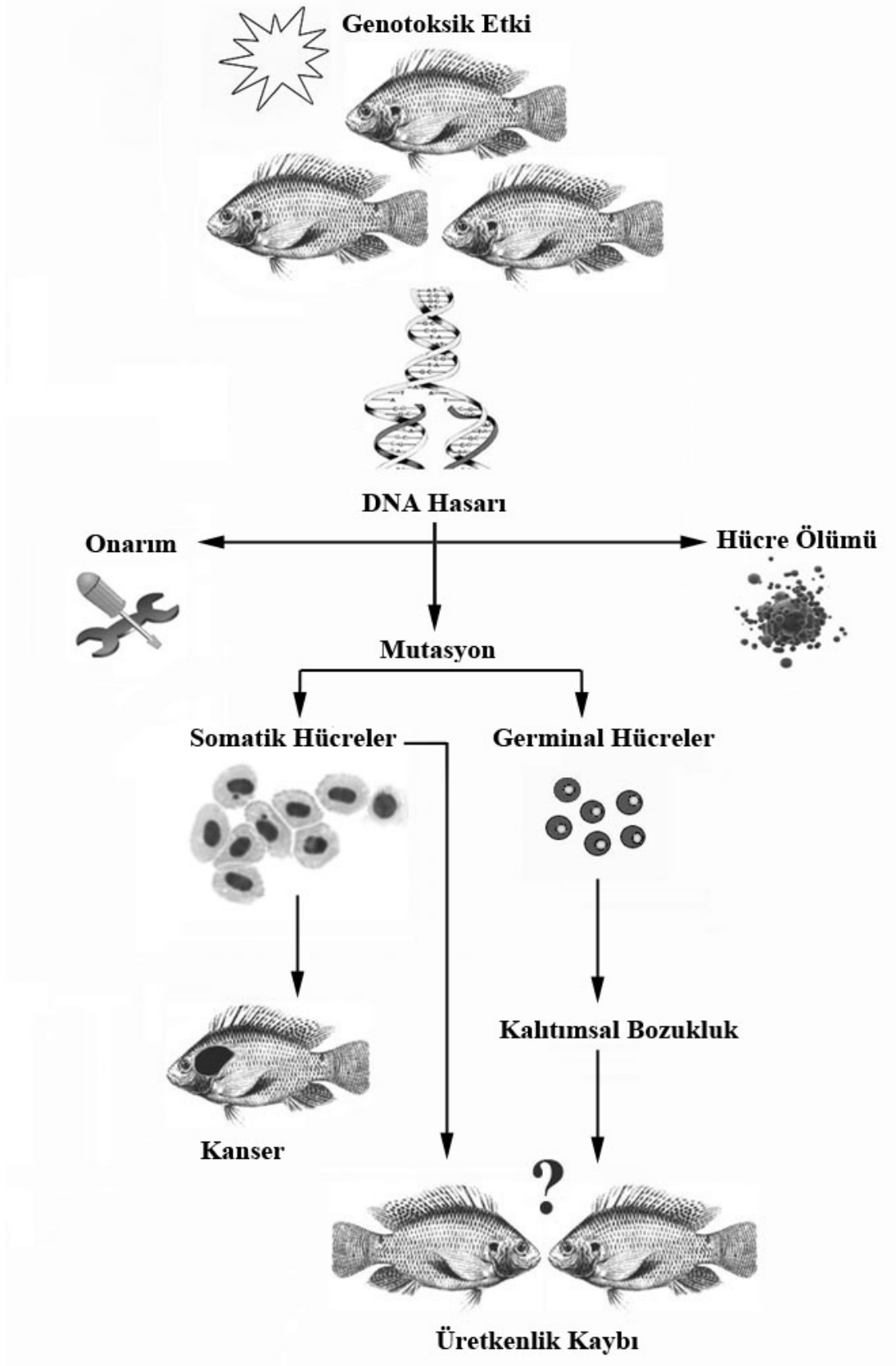
Özellikle son 100 yıldır yeryüzünde kullanılan genotoksik maddelerin miktarında önlenemez bir artış gerçekleşmiştir. Bu nedenle son zamanlarda habitat yıkımı, insan yapımı kimyasalların kullanımının artmasıyla yeni bir anlam kazanmıştır.

İlk olarak 1927’de X-ışınlarının *Drosophila*’da mutasyon oranlarını normalden 15.000 kat daha fazla arttırdığını belirleyen Muller’in [13] çalışmaları ile başlayan genetik toksikoloji bugün, gelişen teknoloji ile artan risk ve analiz yöntemlerine bağlı olarak en önemli araştırma dallarından biri haline gelmiştir [5].

Genetik toksikoloji, temel olarak kalıtım materyali olan DNA üzerinde meydana gelen toksik etkileri inceleyen bilim dalıdır. DNA içerisinde kimyasal olarak kodlanan genetik bilgi, replike edildikten sonra mümkün olduğunca aslına uygun bir biçimde oğul döllere aktarılmak zorundadır. Bu esnada, gerek normal biyolojik süreçler sonucu gerekse DNA’nın doğrudan ya da dolaylı olarak fiziksel, kimyasal ve biyolojik etmenlerle etkileşimi sonucu çeşitli bozulmalar meydana gelebilmektedir. İşte bu şekilde, kalıtım materyali olan DNA üzerinde hasarlara yol açan etmenleri tanımlamak için “genotoksik” terimi kullanılmaktadır [14]. Genotoksik maddelerin etkileşim yolları ve olası sonuçları Şekil 2.1’de gösterilmektedir.

Genotoksik maddeler etkilerini temel olarak iki yolla göstermektedirler;

- a) Ya doğrudan ya da dolaylı olarak DNA üzerinde hasarlar meydana getirebilirler.
- b) Ya da hücre içerisinde süregelen onarım mekanizmalarında bozukluklara neden olarak, kendiliğinden olan DNA hasarlarının frekansını yükseltebilirler.



Şekil 2.1. Genotoksik maddelerin etkileşim yolları ve olası sonuçları [5].

Diğer organizmalar gibi, balık türlerinin de maruz kaldığı farklı konsantrasyonlardaki genotoksik maddelerin DNA üzerinde oluşturabilecekleri hasarlar temel olarak üç farklı sonuca yol açabilir. Oluşan DNA hasarları tamir sistemleri tarafından onarılabileceği gibi, onarılmadan kalan mutasyonlar olarak hücrede varlıklarını sürdürebilirler. Şayet oluşan hasarlar onarılamayacak veya tolere edilemeyecek kadar büyük ise hücre ölümü ile sonuçlanacak bir sürece doğru girilebilir. Somatik hücrelerde gerçekleşen genetik bozulmalar kanser oluşumlarıyla sonuçlanabilirken germinal hücrelerde meydana gelecek genetik bozulmalar gelecek popülasyonlarda genetik yapının bozulmasına neden olma potansiyeline sahiptirler. Bu durum da genel olarak, popülasyonlarda üremeyle ilişkili olarak meydana gelebilecek bozukluklarla sonuçlanabilmektedir [15].

Genetik toksikoloji testlerinde ana hedef DNA molekülü olduğundan dolayı, elde edilen sonuçlar aynı zamanda insan sağlığı ile ilgili olarak ortaya çıkabilecek problemlerin tahmininde de kullanılmaktadır. Bu nedenle bir türde DNA hasarı oluşturduğu bilinen bir kimyasal maddenin, diğer türlerde de benzer etkiler gösterebileceğini söylemek mümkündür. Bugün genotoksik etkilerin incelenmesi amacı ile; mikroorganizmalar, böcekler, bitkiler ve omurgalı hayvanlar üzerinde uygulanabilecek olan 200'den fazla kısa-süreli test metodu bulunmaktadır [16].

Bir genotoksisite test yönteminde olması istenen temel özellikleri şöyle sıralayabiliriz;

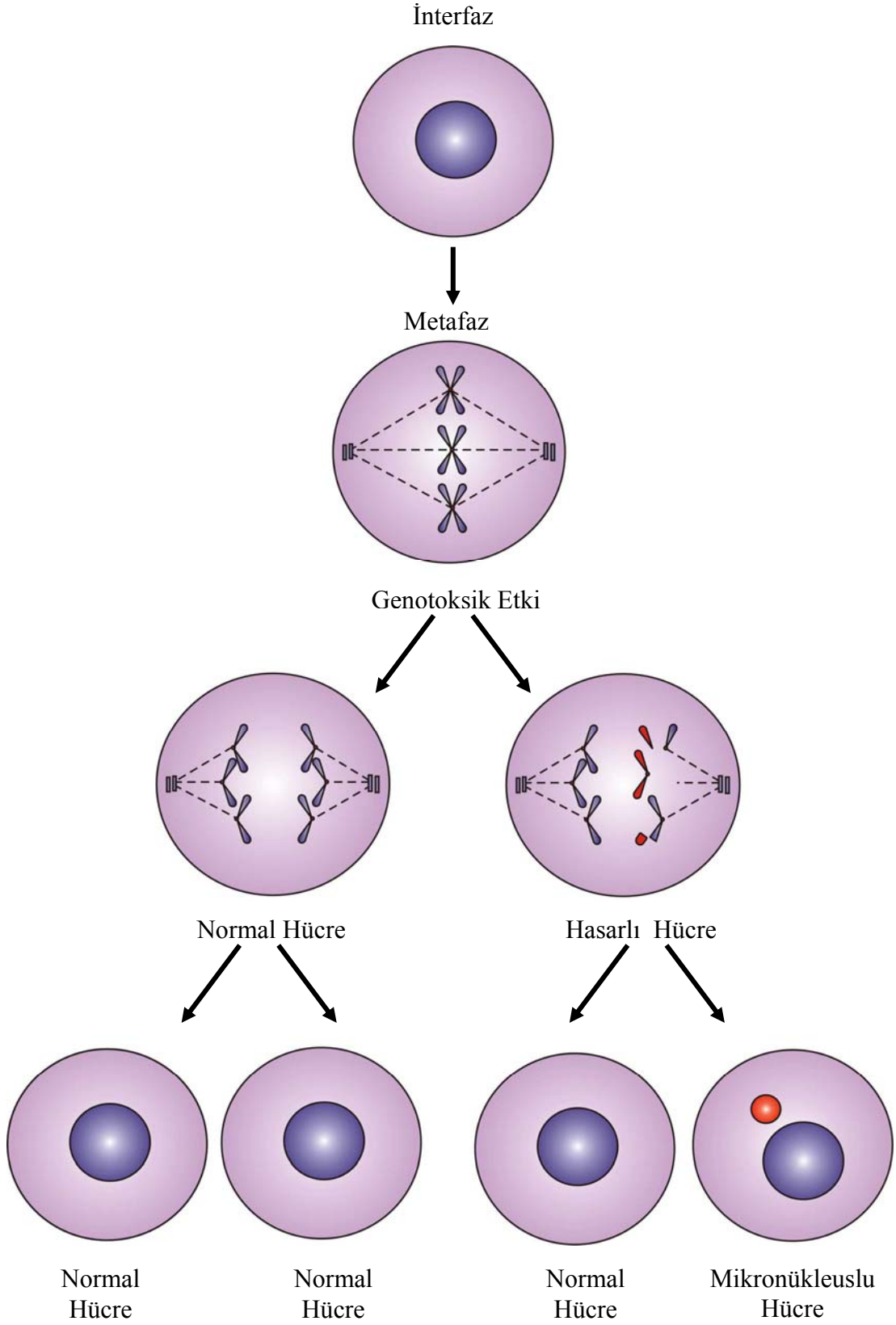
- Uygulama açısından basit olması.
- Genetik hasarları belirlemede etkin olması.
- Hızlı sonuç vermesi.
- Ekonomik açıdan ucuz olması.
- Analiz için az sayıda örneğin yeterli olması.

Günümüzde bu kriterleri sağlayan, birçok doku ve organizma üzerinde in vivo ve in vitro olarak en yaygın kullanılan test metodlarının başında mikronükleus testi gelmektedir [17-18].

2.1.1. Mikronükleus Testi

Mikronükleus test yöntemi ilk defa 1970'lerin ortalarında tanıtılmıştır [19]. Mitotik hücre bölünmesinin metafaz/anafaz geçiş safhaları esnasında klastojenik etki sonucu kromozomlardan kopmuş olan fragmentlerin ya da anojenik hatalara bağlı olarak ana nükleusa dahil olamayan tam kromozomlardan oluşan ve hücre bölünmesi sonucunda sitoplazma içerisinde ana nükleus yanında gözlenen ikinci bir küçük nükleus yapısı mikronükleus olarak adlandırılmaktadır [20]. Mikronükleus oluşumunu indükleyen her ajan klastojen veya anojen olmayabilir. Mikronükleus oluşumuna gen amplifikasyonu veya apoptozis gibi diğer bazı etkenlerde yol açabilmektedir. Şekil 2.2'de görüldüğü üzere genotoksik etkiler sonucunda metafazda gözlenen kromozomal fragmentler ya da tam kromozomlar, hücre bölünmesi bitiminde oluşan kardeş hücrelerden birinde tekrar kromatin halde kondanse olarak ana nükleus yanında küçük ikinci bir nükleus halinde kendilerini göstermektedir.

İlk olarak memeli sistemler için geliştirilmiş olan mikronükleus testi, farklı etmenlerin genotoksik etkilerinin araştırılmasında oldukça yaygın olarak kullanılan bir test metodu haline gelmiştir. İnterfaz hücrelerinde mikronükleus sayımı teknik açıdan metafaz analizlerine oranla çok daha kolay ve hızlı bir yöntemdir. Bu nedenle son yıllarda bir genotoksikite test metodu olarak mikronükleus testine olan ilgi artmış ve memeliler dışındaki diğer omurgalılar yanında bazı omurgasız hayvanlar ile bitkilere de uygulanmaya başlanmıştır [17-18].



Şekil 2.2. Mikronükleus taşıyan bir hücrenin oluşum aşamaları.

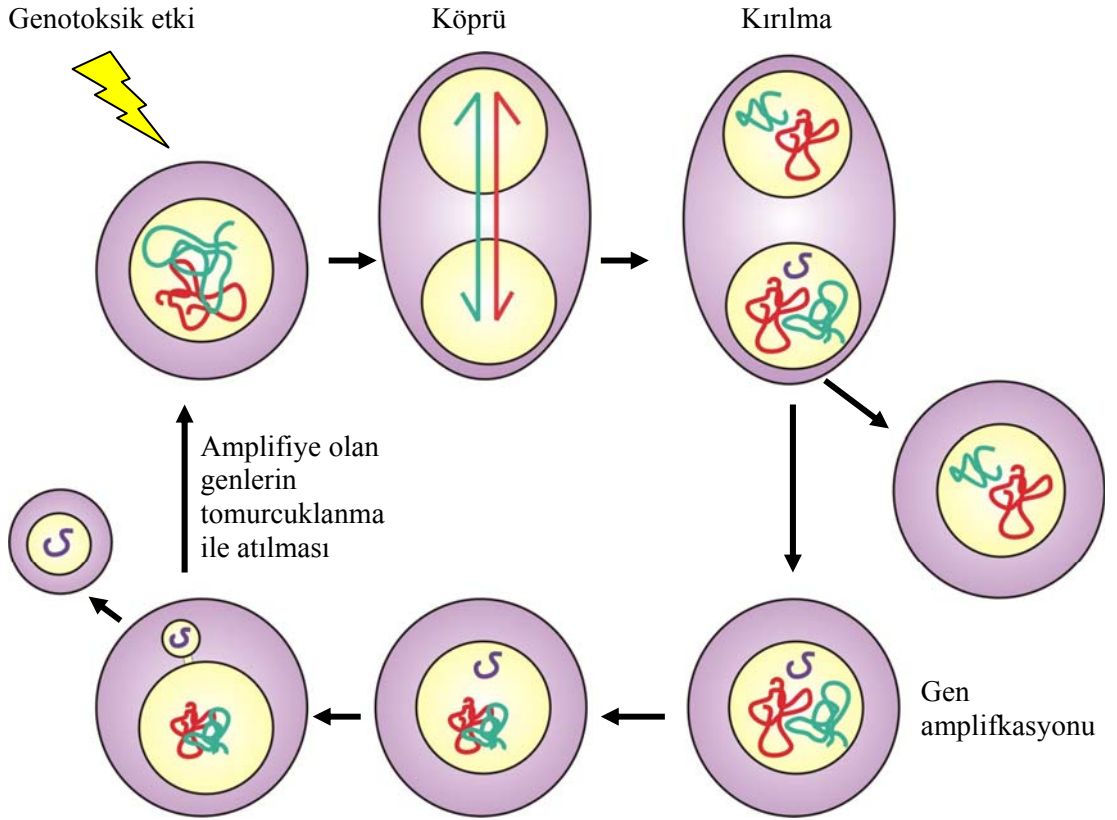
2.1.2. Morfolojik Nükleus Düzensizlikleri

Son yıllarda farklı organizma ve doku hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda genotoksik etkiler sonucunda ana nükleus şeklinde bazı morfolojik düzensizlikler olduğu belirlenmiştir. Bu düzensizlikler; binükleus, çentikli nükleus, tomurcuklu nükleus ve loplü nükleus olmak üzere başlıca dört grup altında toplanmışlardır. Bir hücre içerisinde çift nükleus bulunma durumu olan binükleus terimi, hücre bölünmesi esnasında ve başlıca sitokineze meydana gelen sitotoksik etkilerin göstergesi olarak kabul edilmektedir. Çentikli nükleus, içerisinde kromatin bulunmayacak şekilde çentik benzeri girintilere sahip nükleuslardır. Çentikli nükleus oluşum mekanizması ile ilgili olarak henüz ortaya atılmış bir görüş bulunmamaktadır.

Bununla birlikte tomurcuklanma veya lob oluşumu ile ilgili bazı olası mekanizmalar öne sürülmüştür. Shimizu ve ark. [7], amplifiye edilmiş DNA'nın hücre siklusunun S fazında nükleusun dış çevre kısımlarına doğru itilip, buradan nükleus tomurcuklanması ile bir mikronükleus oluşturmak üzere atıldığını göstermişlerdir. Bu araştırmacılar nükleusun bir şekilde temel nükleus alanı ile uyuşmayacak şekilde fazlalık oluşturan DNA'yı tanıma yeteneğine sahip olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu fazlalık DNA tomurcuklanma yolu ile bir mikronükleus oluşturmak suretiyle nükleustan dışarı atılmaktadır. Sonraki aşamada ise bu mikronükleus bir mini-hücre oluşturmak üzere sitoplazmadan uzaklaştırılır.

Nükleus tomurcuklanması mekanizması hücre siklusunun S fazında gerçekleşir ve oluşan tomurcuklar mikronükleus ile aynı morfolojik görünüme sahiptirler. Aradaki tek fark ise oluşan lob ve tomurcukların oluşum safhalarına bağlı olarak ana nükleusa kalınlığı ve büyüklüğü değişebilen bir nükleoplazmik sapla bağlı olmalarıdır. Nükleus tomurcuklanması ve oluşan mikronükleusun hücreden uzaklaştırılması işleminin ne kadar bir sürede gerçekleştiği henüz bilinmemektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucu ortaya atılmış yeni bir mekanizma bulunmaktadır. Kromozomal kırılma-birleşme-köprü (KBK) siklusu olarak adlandırılan bu mekanizmanın basamakları Şekil 2.3’de gösterilmiştir. Bu mekanizmaya göre, kardeş kromozomlarda meydana gelen kırılmalar sonucunda oluşan ve S fazında replike olan disentrik kromozomların anafaz safhasında kutuplara çekilirken merkezi olmayan bir noktada kırılmaları sonucunda oluşan yavru hücrelerden biri bazı genler açısından eksik olurken diğer hücre bazı genler açısından duplike olacaktır. Bu duplike olan dizilerden oluşan fazla DNA çekirdek zarında meydana gelen tomurcuklanma yolu ile uzaklaştırılmaktadır [19].



Şekil 2.3. Gen amplifikasyonu ve KBK döngüsü nükleus tomurcuklanması [19].

2.2. GENETİK TOKSİKOLOJİ TESTLERİNDE MODEL ORGANİZMA OLARAK BALIKLAR

Uzun zaman boyunca sadece fizyolojik ve biyokimyasal çalışmalarda kullanılan balıklar son yıllarda sitogenetik ve genetik toksikoloji araştırmalarında da model organizma olarak kullanılmaya başlanmıştır. Sucul ortamlarda besin zincirinde üst sıralarda bulunmaları yanında solunum için yüksek oranda su kullanmaları, kirleticilere maruz kalma oranlarını oldukça etkin kılmaktadır. Bu nedenle, özellikle son yıllarda balık doku ve hücrelerinin genetik toksikoloji alanında kullanımına ait çalışmalarda artış görülmüştür.

Laboratuvar koşullarında saklanabilmeleri ve kimyasallara maruz bırakılabilmeleri oldukça kolay olduğu için, diğer yüksek omurgalılar ve insan sağlığı için risk oluşturabilecek kimyasalların incelenmesinde balık türleri in-vivo genotoksisite testlerinde kullanılabilen önemli organizmalar haline gelmişlerdir. Bugüne kadar balıklar üzerindeki genotoksik etkiler farklı türlerde ve farklı dokularda farklı yöntemler kullanılarak incelenmiştir. Bunlar arasında karaciğer dokusunda aromatik DNA eklenti testleri [21], DNA iplik kırılma testleri (komet deneyi) [22] sayılabilir. Bununla birlikte yakın bir geçmişe kadar özellikle memeli türler için geliştirilmiş olan sitogenetik tekniklerin uygulanmasında görülen bazı zorluklar nedeni ile balıkların kimyasalların klastojenik etkilerinin belirlenmesinde kullanımına dair çalışmalar, kısıtlı bir alanda gerçekleştirilmiştir [23-24].

Kardeş kromatit değişimi (SCE) ve kromozomal aberasyon gibi metafaz tekniklerinin balıklarda uygulanması pratik açıdan çok kullanışlı değildir. Bunun sebebi balıkların memelilere göre çok daha küçük ve fazla sayıda kromozoma sahip olmaları ve balık karyotipinin daha düzensiz bir yapı içermesidir. Yalnızca birkaç balık türünün karyotipi metafaz analizler için uygundur. Bunlar arasında *Umbra limi* de kromozom sayısı ($2n=16$) ve yapısı metafaz analizleri ve genotoksisite çalışmaları için oldukça uygun olmakla beraber bu türün yayılım alanı fazla geniş olmadığından dolayı hem kullanımı kısıtlıdır hem de ekonomik açıdan öneme sahip değildir [25]. Bu nedenle geçerli sitogenetik metodlar arasında kolay ve ucuz olması yanında,

özellikle balıklar üzerinde kullanılabilirliğinin uygun olması nedeni ile mikronükleus testi son yıllarda giderek artan oranda kullanılan bir test metodu haline gelmiştir. Balık eritrositleri çekirdekli olduklarından dolayı, bu hücrelerin mikronükleus testinde kullanımı son derece kolaydır. Gerek in-situ gerekse laboratuvar koşullarında yapılan çalışmalarda genotoksik maddelere maruz kalan balıklarda mikronükleus frekanslarının anlamlı düzeyde arttığı gösterilmiştir.

Deguchi ve ark. [26], atık doldurma alanlarındaki sızıntı sularının mutajenik etkilerini belirlemek için *Carassius auratus* örneklerini 9 gün süresince su örneklerine maruz bırakmışlardır. Maruziyet sonrası oluşan genotoksik etkileri eritrosit ve solungaç dokularında mikronükleus testini kullanarak belirlemişlerdir.

Talapatra ve Banerjee [27], kanalizasyon atıklarına maruz bırakılmış *Labeo bata*'ların solungaç ve böbrek eritrositlerinde meydana gelen genotoksik hasarı mikronükleus testi ve morfolojik nükleus düzensizlik testini kullanarak belirlemişlerdir.

Bolognesi ve ark. [28], farklı sucul bölgelerdeki kimyasalların ve karışımların etkilerini kontrollü laboratuvar şartları altında belirlemek için balık eritrositlerinde mikronükleus testini kullanmışlardır.

Bianchini ve ark. [29], Brezilya'da bulunan Patos lagünü ağzında, kirli ve kirli olmayan alanlardaki mevsimsel genotoksik etkileri belirlemek için *Micropogonias furnieri* türü balıkların eritrositlerinde mikronükleus testini kullanmışlardır.

Bianchini ve ark. [30], Patos lagün ağzında yaşayan dilbalığı *Paralichthys orbignyanus* üzerinde kirleticilerin meydana getirdiği genetik hasarları belirlemek için mikronükleus testini kullanmışlardır.

Schiedek ve ark. [31], Baltık denizinin üç farklı alanındaki kirleticilerin etkilerini belirlemek için *Zoarces viviparus* üzerinde mevsimsel olarak mikronükleus analizleri yapmışlardır.

Gustavino ve ark. [32], sudaki klorlayıcı maddelerin *Cyprinus carpio*'da meydana getirdiği genotoksik etkiler üzerine, humik asidin etkilerini mikronükleus testi ve komet testini karşılaştırmalı olarak kullanarak araştırmışlardır.

Çavaş ve Ergene-Gözükara [33], petrol rafinerlerinde ve krom tesislerinde oluşturulan atık suların *Oreochromis niloticus* türünde genotoksik etkilerini solungaç ve periferik kan hücrelerini mikronükleus ve morfolojik nükleus düzensizlik testi kullanarak incelemişlerdir.

Arkhipchuk ve Garanko [34], çeşitli kimyasalların balıklar üzerindeki genotoksik etkilerini belirlemek için, *Cyprinus carpio*, *Saetherodon mosabmica*, *Carassius gibelio*'nun eritrosit, solungaç ve kuyruk yüzgeci epitelyum hücrelerinde mikronükleus testi kullanmışlardır.

Wirzinger ve ark. [35], Kuzey Almanya'da üç farklı alandan toplanan *Gasterosteus aculeatus* örnekleri üzerinde kanalizasyon atıklarından kaynaklanan genotoksik hasarı belirlemek için mikronükleus testini kullanmışlardır.

Pacheco ve Santos [36], kağıt endüstrisi atıklarının genotoksik etkilerini *Anguilla anguilla* üzerinde uyguladıkları eritrosit mikronükleus testini kullanarak belirlemişlerdir.

Marlasca ve ark. [37], laboratuvar şartları altında tekstil atıklarına maruz bıraktıkları *Oncorhynchus mykiss* örneklerinde eritrositlerde gerçekleşen mikronükleus frekanslarını incelemişlerdir.

Odeigah ve Osanyipeju [38], laboratuvar koşulları altında farklı konsantrasyon ve süre uygulamalarını kullanarak, bira ve tekstil fabrikası atıklarına

maruz bıraktıkları *Clarias lazera* örneklerinde mikronükleus frekanslarındaki değişimleri saptamışlardır.

Vigano ve ark. [39], *Platichthys flesus* örneklerini, farklı kökenden gelen bir çok kirletici madde ile kirletilmiş olan İtalyan nehirlerinin boşaldığı bir deniz olan Adriyatik denizinin kuzey bölgesinden alınan sediment örneklerine laboratuvar şartları altında maruz bırakmışlar ve hepatositlerdeki mikronükleus frekanslarındaki değişiklikleri analiz etmişlerdir.

Hayashi ve ark. [40], sucul organizmalarda mikronükleus testinin kullanımının, genotoksisitenin belirlenmesindeki güvenilirliğini araştırmışlardır.

Kohlpoth ve ark. [41], 11 farklı endüstri koluna ait 38 endüstriyel atık örneklerinin genotoksik etkilerini belirlemek için laboratuvar ortamında alabalık gonadlarından elde edilen bir hücre kültürü üzerinde in-vitro olarak test etmişlerdir. Bu hücrelerde oluşan mikronükleus frekanslarını flow-sitometri yöntemi ile belirlemişlerdir.

2.3. PESTİSİTLER

Pestisitler pest adı verilen zararlılarla mücadelede kullanılan kimyasal ve biyolojik maddeler olarak tanımlanmaktadır [42]. Pestisitlerin gerek çevre, gerek sağlık ve gerekse ekonomik açıdan getirebilecekleri olumsuzluklar gelişmiş ülkelerde gayet iyi bilinmektedir. Bunun için, başta AB olmak üzere, tüm gelişmiş ülkelerde tüketilecek tarım ürünleri çevre ve sağlık açısından sürekli denetlenmektedir. Türkiye’de pestisit tüketimi etken madde olarak 2002 yılında, 1979 yılına oranla % 45,29’luk bir artış göstermiştir. Bu artış oranı gelişmiş ülkelere göre daha düşük olmasına rağmen, birim alanda kullanılan pestisit miktarının küçümsenmeyecek kadar önemli olduğu görülmektedir (Çizelge 2.1).

Bununla birlikte, modern tarım yapılan Akdeniz, Ege gibi bölgelerin tüketimi Türkiye ortalamasının çok üzerindedir (Çizelge 2.2). Bu bölgelerde tüketilen pestisitler özellikle çevre ve sağlık açısından önemli riskler taşımaktadırlar [42].

Çizelge 2.1. Türkiye’de yıllara göre pestisit tüketimi (kg veya L)* [42].

Pestisit Grupları	1979	1987	1994	1996	2002
İnsektisitler	2.287.658	3.303.446	2.064.991	3.027.380	2.250.898
Herbisitler	2.451.977	3.495.044	3.902.588	3.643.971	3.697.397
Yağlar	1.594.526	2.147.106	2.147.106	2.871.160	2.428.238
Fungisitler	1.537.315	2.611.960	2.201.406	2.951.191	1.964.292
Nematisitler	315.665	322.227	530.738	1.076.661	1.559.489
Akarisitler	203.107	240.360	192.279	223.857	296.809
Rodentisit	5.600	2.124	2.509	3.268	1.794
TOPLAM	8.395.848	12.112.267	10.871.792	13.797.488	12.198.917

Çizelge 2.2. Ege ve Akdeniz Bölgeleri ile Doğu Anadolu ve Güney Doğu Anadolu Bölgelerinin Türkiye pestisit tüketimindeki preparat olarak payları [42].

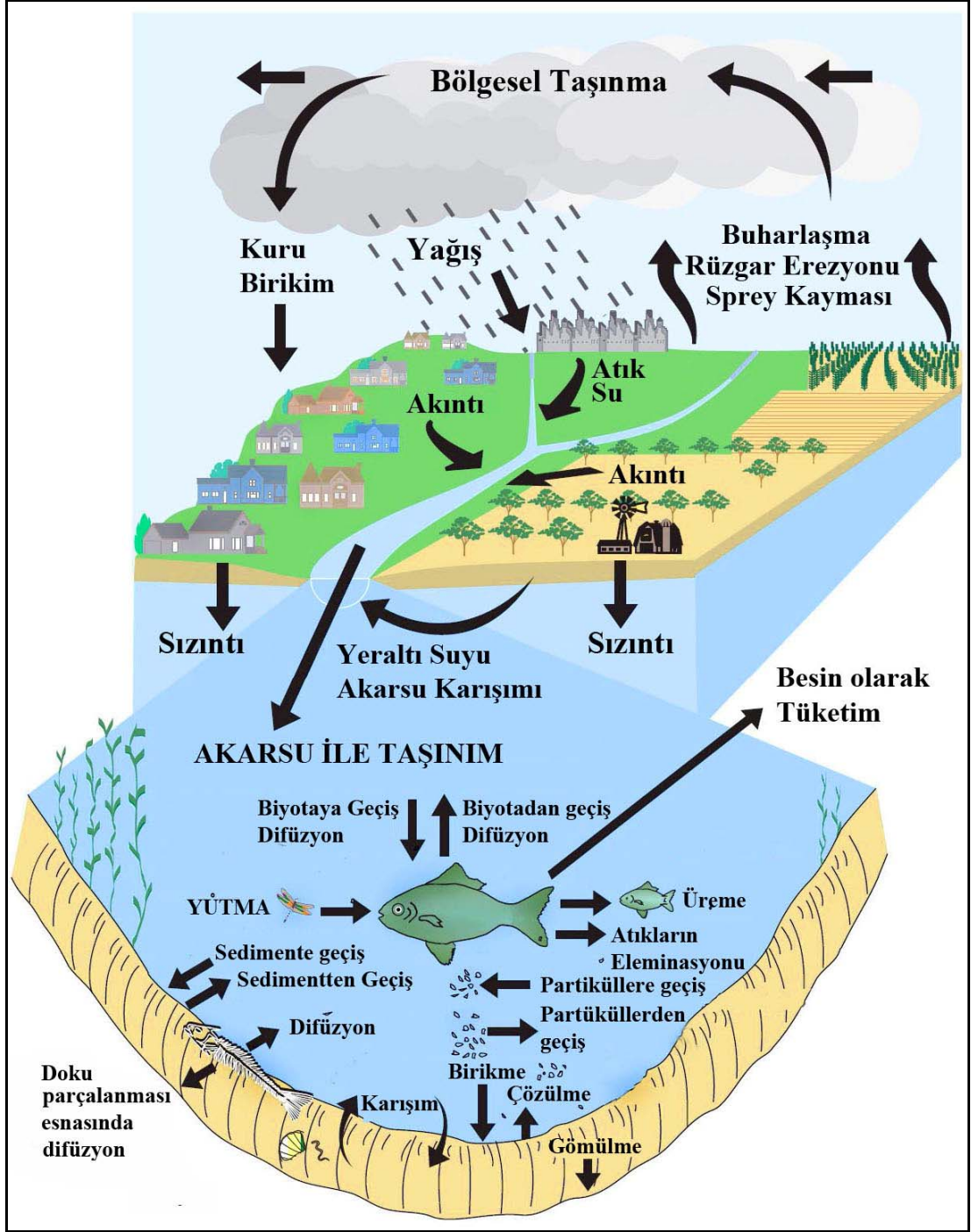
Bölgeler	Yıllar ve bölgelerin payları (%)				
	1994	1995	1996	1997	1998
Ege	19,37	19,04	15,51	18,56	17,10
Akdeniz	21,30	25,47	26,36	15,77	24,92
Doğu Anadolu	2,92	2,61	3,71	3,90	4,86
Güney Doğu Anadolu	8,70	6,93	7,58	6,64	7,10

2.3.1. Sucul Ortamlarda Pestisitler

Pestisitler, sucul ortamları farklı yolları izleyerek kirletebilirler. Bu yolların başında suda yaşayan canlılara karşı yapılan ilaçlamalar sonucunda kanalizasyon ve lağım sularına karışma veya pestisit imalat artıklarının direkt deşarjı sonucu kirlenme

gelmektedir. Pestisitler aynı zamanda yağmur suları, drenaj suları, yüzey akışları ve sulama sularına karışarak da bu suları kirletebilirler. Ayrıca doğrudan suya yapılan uygulamalar sonucunda pestisitler su bitkileri veya dip çamurları tarafından tutulabilmektedirler [43]. Pestisitlerin çevrede dağılışı ve sucul ortamlara giriş yolları genel olarak Şekil 2.4'de gösterilmiştir.

Pestisitlerin su içerisinde hareketliliği temelde suda eriyebilirlik ve formulasyonuna bağlıdır. Suda eriyebilen ya da suda eriyebilecek şekilde formüle edilen pestisitler su içerisinde kısa sürede dağılırlar. Fakat toz veya granül formda bulunanlar su içerisinde askıda kalarak uzun süre aktif maddelerinin yayılmasına neden olurlar. Balıklar solungaçları vasıtasıyla su ortamından bunları absorbe ederek ya da kirlenmiş materyallerin besin olarak tüketimi sonucu pestisite maruz kalabilir ya da zehirlenebilirler [44]. Temel mantık olarak canlı organizmaları öldürmek üzere üretildikleri ve kullanıldıkları için pestisitler sucul hayat için potansiyel bir tehlike olarak önem taşımaktadırlar [45]. Pestisitlerin balıklara etkileri değişik şekillerde görülür. Direkt olarak öldürme söz konusu olabileceği gibi yumurta bırakmayı ve üremeyi durdurmak suretiyle de balık popülasyonu üzerinde etkili olabilmektedirler. Ayrıca dokularda meydana getirdikleri hasarlar ile balıklarda duyarlılığa yol açarak mevsimlik ısı değişimlerinden ve geçici açlıktan daha yüksek oranda etkilenmelerine yol açabilirler. Yavru balıklar ise hassas oldukları için bu durumdan daha fazla zarar görmektedirler [44].



Şekil 2.4. Pesticitlerin sucul ortamlarda izlediği yollar ve olası etkileşimleri [46].

2.3.2. Pestisitlerin Genotoksik Etkileri

Herbisitlerin ve diğer pestisitlerin, ortamda ve dolayısıyla canlıda birikerek toksik, genotoksik veya kanserojenik etki gösterebildikleri bilinmektedir. Bu etkilerin bazıları organizma veya ekosistem üzerinde hemen görülebildiği halde, bazıları ise uzun bir zaman sürecinden sonra kendilerini gösterirler. Pestisitlerin genel olarak ekosistem içerisinde akut öldürücü etkisi olmadığı, ancak besin zinciri yoluyla organizmadan organizmaya geçerek miktarlarının yükseldiği ve belli düzeylerden sonra da toksik etki yaptığı bilinmektedir [47].

Örneğin, Mayon ve ark. [48], çevresel kirleticilerin balıklar üzerindeki etkilerini belirlemek için, *Leuciscus cephalus*'u kullanmışlardır. Pestisit (atrazin ve heksaklorosikloheksan) taşıyan akarsulardan topladıkları kefaller üzerindeki yaptıkları çalışmalarda karaciğer dokusu üzerinde önemli hasarların olduğunu bildirmişlerdir.

Loro ve ark. [49], güney Brezilya'da pirinç tarım alanlarında kullanılan dört herbisit (klomazon (isooxazolidinone), kuinklorac (quinoline), propanil (dichloropropionanilide) ve metsulforon metil (sulfonylurea)), *Leporinus obtusidens* üzerindeki toksik etkilerini asetilkolinesteraz ve katalaz enzimlerini analiz ederek incelemişlerdir. Adı geçen herbisitlerin yüksek oranda toksik etkiye sahip olduklarını belirlemişlerdir.

Fatima ve ark. [50], çeşitli herbisit karışımlarına (atrazin, simazin, diuron ve isoproturon) 12 hafta süresince maruz bırakılan *Carassius auratus* örneklerinde dalak, böbrek ve karaciğer dokularında meydana gelen immünolojik ve antioksidan değişiklikleri araştırmışlardır. Araştırmalar sonunda herbisitlere maruziyet sonunda süperoksit radikallerinin anlamlı derecede yükseldiklerini belirlemişlerdir.

Kennedy ve ark. [51], gökkuşuğu alabalığı *Oncorhynchus mykiss* üzerinde yaptıkları çalışmalarda üç pestisit (antisapstain, atrazin ve roundup) yüksek oranda nörotoksik etkiye yol açtıklarını belirlemişlerdir.

Pestisitlerin toksik etkileri yanında genotoksik etkilere yol açtıkları da bilinmektedir. Özellikle sucul organizmalardan balıklar üzerinde birçok pestisit genotoksik etkiye sahip oldukları çeşitli test sistemleri kullanılarak gösterilmiştir.

Ahmad ve ark. [52], pentaklorofenol (PCP) ve 2,4-diklorofenoksiasetik asitin (2,4-D) bir tatlı su balığı olan *Channa punctatus* üzerindeki genotoksik etkilerini mikronükleus testi kullanarak incelemişlerdir.

Ateeq ve ark. [53], 2,4-diklorofenoksiasetik asit ve butaklara maruz kalmış kedi balığı, *Clarias batrachus*, üzerindeki genotoksik etkileri eritrositlerde komet testi kullanarak araştırmışlardır.

Neuparth ve ark. [54], Atlantik ve Akdeniz sahilleri boyunca geniş bir alanda yayılım gösteren ve ekonomik öneme sahip olan bir balık türü olan *Sparus aurata* üzerinde endosülfan adlı insektisit genotoksik etkisini eritrosit mikronükleus testi, morfolojik nükleus düzensizlik testi ve çekirdek DNA içeriğindeki değişiklikleri kullanarak araştırmışlardır. Endosülfanın mikronükleus ve morfolojik nükleus düzensizlik frekanslarını anlamlı oranda arttırdığını belirlemişlerdir.

Nagpure ve ark. [55], kemikli bir balık olan *Channa punctatus*'u organoklorlu insektisit olan endosülfanın farklı akut dozlarına (19.67, 12.95, 10.15, and 7.75 ppb) maruz bırakmışlardır. Çalışmaları sırasında böbrek ve solungaç dokularında meydana gelen DNA hasarlarını tek hücre jel elektroforezini (komet testi) kullanarak belirlemişlerdir. Her iki dokuda da doza bağlı olarak DNA hasarları bulmuşlardır. Solungaç dokularının ise pestisit maruziyetine böbrek dokularından daha duyarlı olduklarını görmüşlerdir.

Martinez-Tabche ve ark. [56], geniş alanda kullanıma sahip olan iki herbisit, Parakuat (0.055, 0.066, 0.083, 0.116 ve 0.133 mg/L) ve 2,4-diklorofenoksiasetik asite (316, 346, 389, 436 ve 489 mg/L) maruz bırakılan gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) solungaç hücrelerinde meydana gelen genotoksik hasarları komet testini kullanarak araştırmışlardır.

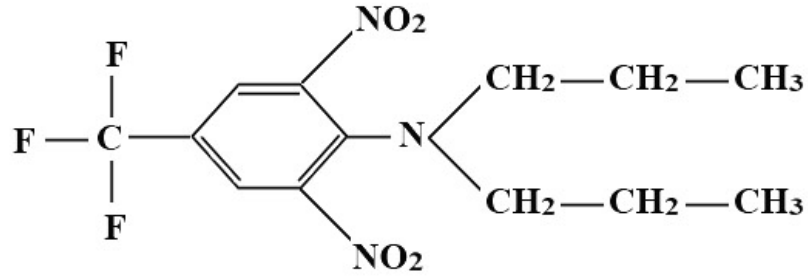
Whitehead ve ark. [57], 2000-2001 yılları arasında Sacramento'daki bir ırmağa (San Joaquin River) aşırı miktardaki zirai atıkların bu bölgede yaşayan yerli bir balık türü olan *Catostomus occidentalis* üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Genotoksisitenin belirlenmesinde komet testini, mutajenitenin belirlenmesinde ise Ames testini kullanmışlardır. 2000-2001 yılları arasında elde edilen veriler, referans alandan elde edilen verilerle karşılaştırdıklarında DNA hasarlarının miktarında artışlar olduğunu belirlemişlerdir.

Ahmad ve ark. [58], pentaklorofenolün in vivo genotoksik etkilerini kedibalığı *Heteropneustes fossilis* üzerinde çalışmışlardır. Çalışmaları sırasında pentaklorofenolün dört farklı subletal dozunu (0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4 ppm) üç süre (48, 72 ve 96 saat) boyunca uygulamışlar ve mikronükleusların belirlenmesinde, manuel ve otomatik metodu kullanmışlardır. Eritrositlerdeki mikronükleus frekansının 96 saat sonunda en yüksek noktaya ulaştığını belirlemişlerdir. Manuel sayım ile otomatik sayım arasında bir fark olmadığını rapor etmişlerdir.

Campana ve ark. [59], bir pyrethroid insektisit olan lambda-cyhalothrinin genotoksik etkilerini belirlemek için *Cheirodon interruptus interruptus*'un eritrositleri içinde mikronükleus testini uygulamışlardır. Örnekler pyrethroid lambda-cyhalothrinin üç farklı dozuna (0.05; 0.01; 0.001 ug/L) dokuz süre (24, 48, 72, 96 saat ve 8, 12, 15, 19 ve 23 gün) boyunca maruz bırakmışlardır. Pozitif kontrol olarak siklofosfamiiti kullanmışlardır. Farklı zamanlarda elde ettikleri mikronükleus çeşitliliğini ise kan hücre kinetiği ve eritrosit yenilenmesiyle ilişkilendirmişlerdir.

2.3.3. Trifluralin

Tarımsal üretim alanında, kültürü yapılan bitki haricinde doğal yollarla ortaya çıkmış ve yabancı ya da zararlı ot olarak adlandırılan bitkiler ile mücadele amacıyla kullanılan tarımsal ilaçlar herbisit olarak adlandırılır. Trifluralin, çıkış öncesi kullanılan, dinitroanilinli selektif bir herbisittir [60]. Moleküler formülü $C_{13}H_{16}F_3N_3O_4$ olan trifluralinin kimyasal yapısı Şekil 2.5’de gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Trifluralin’in kimyasal yapısı

Genel olarak ilaçlamadan sonra 6-8 saat içerisinde toprağın 5-6 cm derinliğine karıştırılarak uygulanan trifluralinin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri Çizelge 2.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Trifluralin’in bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri [61]

Özellik	Açıklama
CAS Numarası	1582-09-8
Görünümü	Sarı-turuncu renkli katı kristal
Kimyasal adı	a,a,a-trifluoro-2,6-dinitro-N,N-dipropyl-p-toluidine
Teknik form saflığı	% 96
Çözünürlüğü	
Suda	27 °C’de % 0.0024
Aseton	> 50 g/ 100ml
Metanol	2 g / 100 ml
Xylene	81 g / 100 ml
Kaynama Derecesi	139-140 °C

Trifluralin; sıvı, emülsiyon konsantrasyon (%3.9-50.8), tanecikli (%0.17-10), akışkan konsantrasyon (%10.9), doymuş materyal (%18.9), sıvıda çözülebilir konsantrasyon (%43.8), katıda çözülebilir konsantrasyon (%14) ve suda taneciklere dağılmış (%0.75-80) şekilde olmak üzere çeşitli ticari formülasyonlarda bulunabilmektedir. Trifluralin ayrıca; triallate, benfluralin, alachlor, clomazone, isoxaben, imazaquin, clopyralid, oxadiazon, imazethapyr ve flumetsulam içeren diğer birkaç herbisit ile formüle edilir. Trifluralin; uçak, püskürtücü, merkezden sulama, damlatma ile sulama, tepeden püskürtme ile sulama, granüler uygulama, elle dağıtma, sallayıcı ve gübre serpme makinesini içerisine alan zemin araçları ve hava tarafından uygulanabilir. Uygulama zamanı hedef organizmaya ve uygulama alanına göre farklılık gösterebilir. Bu nedenlerden dolayı kimyasal dört mevsim boyunca uygulanabilme özelliğine sahiptir. Tarımsal kullanımının çeşitliliğine rağmen her sezonda yalnız bir kez uygulanabilmektedir [62].

Trifluralin kullanımı ilk olarak ABD’de 1963 yılında kaydedilmiştir. 1998 yılı kayıtlarına göre dünya çapındaki satış tutarı 300 milyon dolar, üretim oranı ise 24 bin ton olarak rapor edilmiştir. Trifluralin günümüz itibarı ile 50’den fazla ülkede kayıtlı olup 80’den fazla zirai ürün için kullanılmaktadır [9]. Amerika’da en fazla kullanılan ilk 5 herbisit içerisinde yer almaktadır. Trifluralin ülkemizde zirai mücadelede uzun yıllardan beri en yaygın kullanılan herbisitlerin başında gelmektedir (Çizelge 2.4) [42].

Çizelge 2.4. 1999-2002 yıllarında Türkiye’de en yoğun kullanılan herbisitler ve genel herbisit tüketimindeki payları [42].

Herbisit	Yıllara göre herbisit tüketimindeki payları (%)			
	1999	2000	2001	2002
2,4-D	45,28	44,34	47,49	33,62
Trifluralin	27,02	27,86	20,21	24,60
Molinate	7,10	6,44	3,69	3,50
Propanil	4,54	3,62	-	-
Glyhposate	4,10	6,94	9,08	7,57
Chloridazon	-	-	5,38	-
Metalochlor	-	-	-	5,10

(-) ilk beş herbisit arasında değildir.

Trifluralin'in 1999-2002 yılları arasındaki kullanım oranlarına bakıldığında kullanım oranları yaklaşık olarak sabit olmakla birlikte 2,4-D'den sonra en fazla miktarda kullanılan herbisit olduğu görülmektedir [42].

Trifluralin'in genel olarak kullanıldığı alanlar buğday, arpa, lahana, havuç, marul, şeker pancarı ve baklagil üretimidir. Bunun yanında pamuk, soya, ayçiçeği, soya, domates ve kanola üretimi ile bağcılıkta da yaygın olarak kullanılmaktadır. Trifluralin ayrıca, bahçe bitkileri ve sera bitkileri üretimi alanlarında da uygulanmaktadır.

2.3.3.1. Trifluralin'in genotoksik etkileri

Trifluralin'in laboratuvar hayvanları ve in vitro test sistemleri üzerindeki; akut, subkronik ve kronik etkileri araştırıldığında toksik, embriyotoksik ve teratojenik etkilerine rastlanmıştır [60]. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC: International Agency For Research on Cancer) tarafından grup-3 karsinojen olarak sınıflandırılan trifluralinin çeşitli organizma ve test sistemleri kullanarak yapılan çalışmalarda genotoksik etkilere yol açıp açmadığı araştırılmıştır. Bununla birlikte bu herbisitinin gerek etken maddesi gerekse ticari formunun balıklar üzerindeki genotoksik etkileri henüz çalışılmamıştır.

Kaya ve ark. [63], trifluralin herbisitinin genotoksik etkilerini, iki farklı *Drosophila melanogaster* ırkının kanatlarında somatik mutasyon rekombinasyon testini (SMART) kullanarak araştırmışlardır.

Gebel ve ark. [64], trifluralin herbisitinin genotoksik etkilerini fare kemik iliği hücrelerinde in vivo mikronükleus testi kullanarak araştırmışlardır.

Ribas ve ark. [65], trifluralinin in vitro genotoksik etkilerini; insan lenfositlerinde S9 uygulaması ile kardeş kromatid değişimi, kromozom aberasyonu ve mikronükleus testi kullanarak araştırmışlardır.

Pilinskaia [66], trifluralinin iki farklı örneği (aktif madde olarak saf trifluralin ve %25'lik emülsiyon konsantre formu) ile sekiz metabolitinin genotoksik etkilerini, in vitro olarak insan lenfositlerinde ve in vivo olarak fare kemik iliği hücrelerinde kromozom aberasyon tekniğini kullanarak araştırmıştır.

Nehez ve ark. [67], Olitref firmasına ait %26'lık trifluralin formulasyonunun mutajenik etkilerini, in vivo olarak fare üreme hücrelerinde; spermatoisit kromozom inceleme, dominant letalite testi ve F₁-embriyonik kromozom inceleme tekniklerini kullanarak araştırmışlardır.

Kale ve ark. [68], Treflan'ın mutajenik etkilerini belirlemek için, *Drosophila* örneklerinde cinsiyete bağlı resesif letal mutasyon testini kullanmışlardır. .

Shahin ve El-Zahrani [69], trifluralinin *Vicia faba* üzerindeki genotoksik etkilerini kromozomal aberasyon testi kullanarak araştırmışlardır.

Hess ve Bayer [70], trifluralinin *Gossypium hirsutum*'un kök ucu meristem hücrelerinde hücre bölünmesi ve kromozomlar üzerine etkilerini araştırmışlardır.

Suralles ve ark. [71], insan lenfositlerinde trifluralinin genotoksik etkilerini mikronükleus testi ve eksizyon onarım mekanizmalarını kullanarak araştırmışlardır.

Grant ve Owens [72], trifluralin herbisitine maruz bırakılan *Pisum sativum*'lardaki genotoksik etkileri kromozomal aberasyon testi kullanarak araştırmışlardır.

Wu [73], Treflan'ın *Vicia faba* üzerindeki genotoksik etkilerini koromozom aberasyon testi kullanarak incelemiştir.

Ghiazza ve ark. [74] [1984], trifluralinin insan lenfosit kültürlerinde SCE üzerine etkilerini araştırmışlardır.

2.4. ANTİGENOTOKSİK MADDELER (ANTİMUTAJENLER)

DNA üzerinde hasarlara yol açan genotoksik maddelerin etkinliğini azaltan ya da tamamen yok eden maddeler genel olarak antijenotoksik ya da antimutajenik maddeler olarak adlandırılmaktadırlar. Antijenotoksik maddeler etki şekillerine göre desmutajenler ve biyoantimutajenler olarak iki grup altında toplanırlar. Desmutajenler genotoksik maddeleri kimyasal ya da enzimatik modifikasyonlara uğratmak suretiyle inaktive ederken, biyoantimutajenler DNA hasara uğradıktan sonra gerçekleşen mutasyon sürecini baskırlar [75].

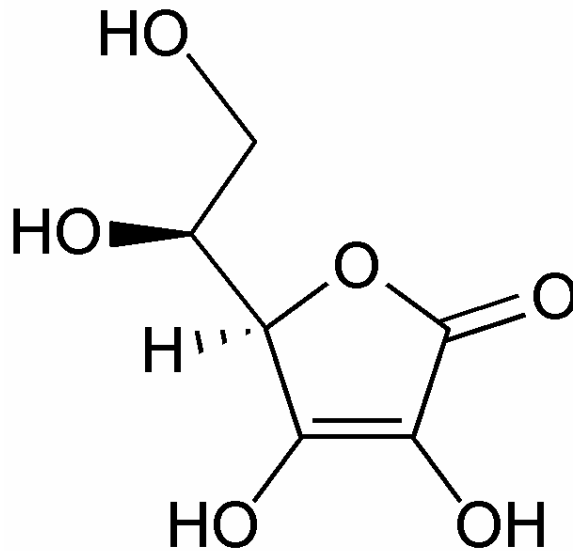
Biyoantimutajenler doğal olarak ortaya çıkan ve mutasyonu DNA onarımı ve replikasyonu sürecinde müdahale ederek baskırlayan maddelerdir. Örneğin bu maddeler bir DNA eklentisi oluştuktan sonra çalışmaya başlar ve oluşan DNA lezyonu mutasyona dönüşmeden önce görevlerini yaparlar. Biyoantimutajenler mutasyon sürecini değıştirdiklerinden dolayı gerçek antimutajenler olarak adlandırılırlar. Biyoantimutajenler yaygın olarak kullanılan bazı bakteriyal test sistemlerinde çeşitli etki mekanizmaları sergilemektedirler. Bunlar arasında DNA iplik onarımının inhibe edilmesi, mutasyon içeren hücrelerde hata okuma onarımının normal hücrelerdeki gibi yapılması ve rekombinasyon DNA iplik onarımı hızının arttırılması böylece de mutasyona uğramış iplik oranının azaltılması sayılabilir [76].

Desmutajenler mutasyon oranını DNA onarımı veya replikasyonu dışında kalan mekanizmalarla indirgeyen maddelerin tümü olarak tanımlanırlar. Bu mekanizmalar arasında enzim indüksiyonu, mutajen süpürülmesi veya mutajen aktivasyonunun baskılanması sayılabilir. Bilinen desmutajenlerin sayısı biyoantimutajenlere oranla çok daha fazladır. Desmutajenler de biyoantimutajenler gibi deney koşulları altında mutantların ortaya çıkmasını baskırlar ancak bu etkiyi biyoantimutajenlerin aksine genetik materyali etkilemeksizin gösterirler. Bu etki temel olarak normal hücrelere ulaşan mutajen miktarının düşürülmesi bunun sonucunda da hücre başına düşen hasarlı DNA oranının azaltılması ile gerçekleştirilir [77].

Canlılarda, kimyasal süreçler özellikle oksitlenme, serbest radikallerin oluşması gibi bazı istenmeyen sonuçlara da neden olmaktadır. Yüksek derecede reaktif olan serbest radikaller farklı moleküller ile kolayca reaksiyona girebilirler. Böylece hücrelere ve dolayısıyla da canlıya zarar verebilirler [78]. Serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmalarda kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan savunma mekanizmaları gelişmiştir. Antioksidanlar etkilerini genel olarak radyasyon ya da bir kimyasala maruz kalma sonucunda oluşan iç reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan düzensiz oksijen türevlerine elektron vermek suretiyle gösterirler [79]. Antioksidan desmutajenlerin en iyi bilinenlerinden biri de askorbik asit ya da diğer adıyla vitamin C'dir.

2.4.1. Askorbik Asit (Vitamin – C)

Askorbik asit ya da diğer adıyla vitamin-C çeşitli çalışmalarla antijenotoksik özelliğe sahip olduğu gösterilmiş olan ve suda çözünebilir bir antioksidan maddedir [11-12]. Askorbik asit'in kimyasal yapısı Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Askorbik asit'in kimyasal yapısı.

Hidrojen peroksitten oluşan hidroksil radikalleri gibi birçok oksidan madde (reaktif oksijen türevleri) eşleşmemiş bir elektron içerirler. Bu nedenle de yüksek oranda reaktifdirler. Oksidan maddeler organizmalarda nükleik asit, protein ve yağlar ile reaksiyona girerek moleküler düzeyde hasarlara yol açarlar. Reaktif oksijen türevleri elektronları almak sureti ile askorbatı oksitleyerek önce monodehidroaskorbata daha sonra da dehidroaskorbata çevirirler. Askorbatın oksitlenmiş formları daha stabil ve inaktif hale gelirken reaktif oksijen türevleri de suya indirgenir. Böylece askorbik asit serbest radikallerin zararlı etkilerini süpürme yöntemi ile indirgemiş olur [80].

Son yıllarda askorbik asitin genotoksik ve antigenotoksik etkilerine yönelik çeşitli araştırmalar yapılmıştır [80-81]. İn vitro ve in vivo ortamlarda insan lenfositleri [82], *Allium* mikronükleus testi [83] ve *Drosophila* wing spot testi [84] gibi farklı ökaryotik sistemlerde yapılan çalışmalardan elde edilen verilerin çoğu askorbik asitin antimutajenik olduğunu göstermiştir [85]. Oksidatif hasara karşı askorbik asit antioksidan koruma özelliği üstlenmesine rağmen, bazı durumlarda antioksidan işlevin yerine ko-genotoksik özelliğe sahip olduğu görülmüştür [86]. Bu nedenle de askorbik asitin antimutajenik veya ko-mutajenik özelliklerden hangisini gösterdiğini anlamak için daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç duyulmuştur.

Panda ve ark. [87], *Allium cepa*'da civa klorür ve maleik hidrazid herbisiti tarafından oluşturulan genotoksisite üzerine askorbik asitin antigenotoksik etkilerini mikronükleus testi kullanarak araştırmışlardır.

Prekumar ve Bowlus [88], askorbik asitin fare kemik iliği hücrelerinde demir uygulaması sonucu oluşan genotoksik hasarları azaltıcı etkilerini mikronükleus testi kullanarak incelemişlerdir.

Siddique ve ark. [89], megastrol-asetat tarafından fare kemik iliğinde oluşturulan genotoksik hasarlar üzerine askorbik asitin antigenotoksik etkilerini, kardeş kromatid değişimi ve kromozom aberasyonları testlerini kullanarak araştırmışlardır.

Misra ve Choudhury [90], swiss albino farelerde cisplatin tarafından kemik iliği ve spermatogonyum hücreleri üzerinde oluşturulan sito-genotoksik etkiler üzerine askorbik asitin baskılayıcı etkilerini araştırmışlardır.

Gajecka ve ark. [91], bir polisiklik aromatik hidrokarbon olan B(a)P'e maruz bırakılan insan lenfosit kültürlerindeki genotoksik etkileri üzerine askorbik asitin koruyucu antigenotoksik potansiyelini komet testi kullanarak incelemişlerdir.

Ahmad ve ark. [92], insan lenfosit kültürlerinde hidrokortizon tarafından oluşturulan genotoksosite üzerine askorbik asitin koruyucu etkisini kardeş kromatid değişimi ve kromozom aberasyon testleri kullanarak araştırmışlardır.

Kaya [86], *Drosophila melanogaster*'de "multiple wing hairs" (mwh, 3-0,3) ve "flare" (flr, 3-38,8) genleri bakımından transheterozigot olan 3-günlük larvalara etil metan sülfonat (EMS), metil metan sülfonat (MMS) ve N-nitrozo N-etilüre (ENU) gibi bilinen mutajenlerin uygulamasını yapmış ve bu üç mutajenik madde üzerine askorbik asitin anti-mutagenik etkisi olup olmadığını *wing spot* testini kullanarak incelemiştir.

Kaya ve ark. [11], üç farklı mutajene (kobalt klorid: $CoCl_2$, 4-nitrokuinolin 1-oksit:4-NQO, potasyum dikromat: $K_2Cr_2O_7$) maruz bırakılan *Drosophila melanogaster* larvalarında askorbik asitin antigenotoksik etkilerini SMART testi kullanarak analiz etmişlerdir.

Aly ve Donya [93], fare kemik iliğinde Rifampisin (tüberkiloz tedavisinde kullanılan bir ilaç) tarafından oluşturulan kromozom aberasyonları üzerinde askorbik asitin antigenotoksik etkilerini araştırmışlardır.

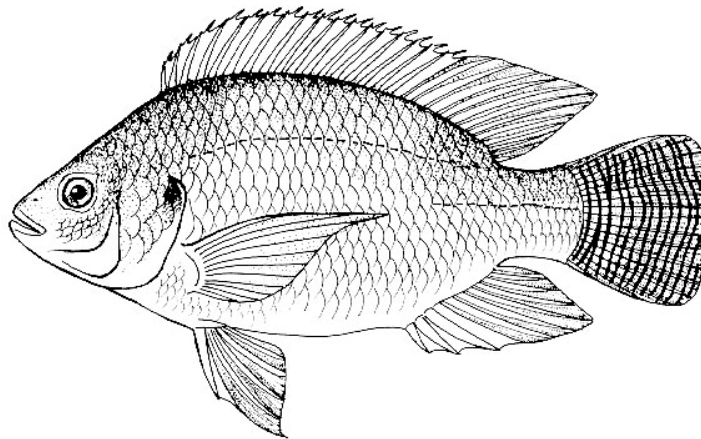
3. MATERYAL VE METOT

3.1. KULLANILAN KİMYASALLAR

Analitik standarttaki saf Trifluralin Riedel de Haen – PESTANAL firmasından temin edilmiştir. Trifluralin'in ticari formülasyonu olan ve 480 g/L formülasyonunda trifluralin içeren Treflan® EC ise Koruma firmasında elde edilmiştir. Deneylede pozitif kontrol olarak kullanılan etil metil sulfonat (EMS: Ethyl Methyl Sulphonate) Riedel firmasından, çözücü kontrol olarak kullanılan metanol ise Merck firmasından temin edilmiştir. Askorbik asit Riedel firmasından temin edilmiştir.

3.2. TEST ORGANİZMASI OLARAK KULLANILAN BALIK TÜRÜ

Deneysel çalışmalarda test organizması olarak Nil Tilapyası olarak da adlandırılan *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae) seçilmiştir (Şekil 3.1). Bu türün seçilmesinin nedenlerini ekonomik öneme sahip olması, yaygın olarak yetiştiriciliğinin yapılması, kolay temin edilebilen bir tür olması yanında düşük kromozom sayısına ($2n=44$) sahip olması [94] ve daha önceki çalışmalarda genotoksik ajanlara karşı hassasiyetinin gösterilmiş olması olarak sıralayabiliriz [95].



Şekil 3.1. *Oreochromis niloticus*'un genel görünümü [96].

Deneyde kullanılan balıklar Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri fakültesi yetiştiricilik bölümünden temin edilmişlerdir. Deney için ortalama 10 ± 2 g ve 5 ± 1 cm ebatlarındaki fingerlinkler seçilmiştir. Alınan balıklar 90 L'lik akvaryumlara yerleştirilerek 1 ay süresince laboratuvar şartlarına alıştırmışlardır. Deneye alınan balıklar 15'erli gruplar halinde 30x20x15 cm ebatlarındaki akvaryumlara yerleştirilmişlerdir. Akvaryum suları ve çözölen maddeler her üç günde bir tazelenmiştir. Balıklar 3 günde bir granöl yem ile beslenmişlerdir. Genotoksisite deneylerinde doz/süre grubu için 5, antigenotoksisite çalışmalarında 8 olmak üzere toplam 175 örnek kullanılmıştır.

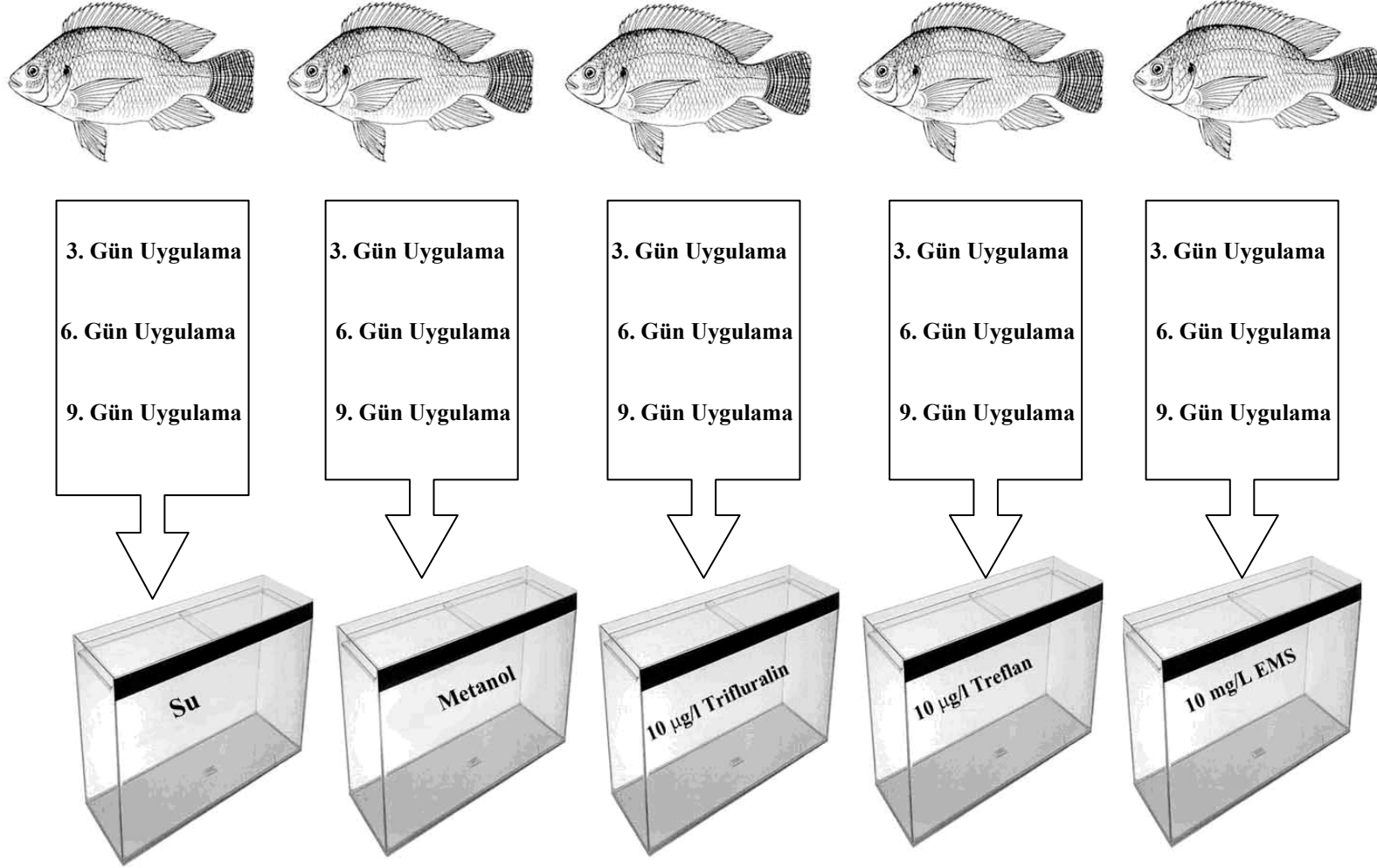
3.3. DENEY PLANI

3.3.1. EMS, Trifluralin, Treflan'ın Genotoksik Etkilerinin İncelenmesi

Deneylerde test edilmek üzere trifluralinin $1\mu\text{g/L}$, $5\mu\text{g/L}$ ve $10\mu\text{g/L}$ olmak üzere üç farklı dozu test edilmiştir. Dozların belirlenmesinde trifluralinin su ürünleri kontrol yönetmeliğinde $11\mu\text{g/L}$ olarak belirtilen limit değeri baz alınmıştır [97]. Trifluralin metanol içerisinde çözüldükten sonra uygulanmıştır. Treflan formulasyonu da aynı şekilde $1\mu\text{g/L}$, $5\mu\text{g/L}$ ve $10\mu\text{g/L}$ 'lik trifluralin konsantrasyonuna eş değer olacak şekilde sulandırıldıktan sonra uygulanmıştır. Pozitif kontrol EMS ise 10 mg/L 'lik tek dozda uygulanmıştır. Uygulamalar 3, 6 ve 9 günlük olmak üzere üç farklı sürede gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2).

3.3.2. Askorbik Asit'in Antigenotoksik Etkilerinin İncelenmesi

İlk seri deneylerden elde edilen sonuçlar ışığında genel olarak en yüksek mikronükleus ve morfolojik nükleus düzensizlik frekanslarının gözlemlendiği trifluralin uygulama doz ve uygulama süresi olan $10\mu\text{g/L}$ -6 gün, askorbik asit deneyleri için baz alınmıştır. Askorbik asitin uygulama dozu önceki çalışmaların ve *Oreochromis niloticus*'un günlük askorbik asit gereksinimi göz önüne alınarak belirlenmiş ve insülin iğnesiyle enjeksiyon yoluyla uygulanmıştır.



Şekil 3.2. *Oreochromis niloticus*'larda negatif kontrol, metanol kontrol, trifluralin, Treflan ve EMS uygulama deneyleri.

Buna göre % 0.05'lik askorbik asitten her 10g ağırlık için 0.1 ml enjekte edilmiştir. Askorbik asit enjekte edilen balıklar 8'erli gruplar halinde 10µg/L trifluralin, eşdeğer Treflan ve 10mg/L EMS içeren akvaryumlara yerleştirilmişlerdir. Askorbik asit enjeksiyonu 3 günde bir olmak üzere toplam 2 kez tekrarlanmış ve 6 gün boyunca uygulama yapılmıştır (Şekil 3.3).

3.4. MİKRONÜKLEUS TESTİ

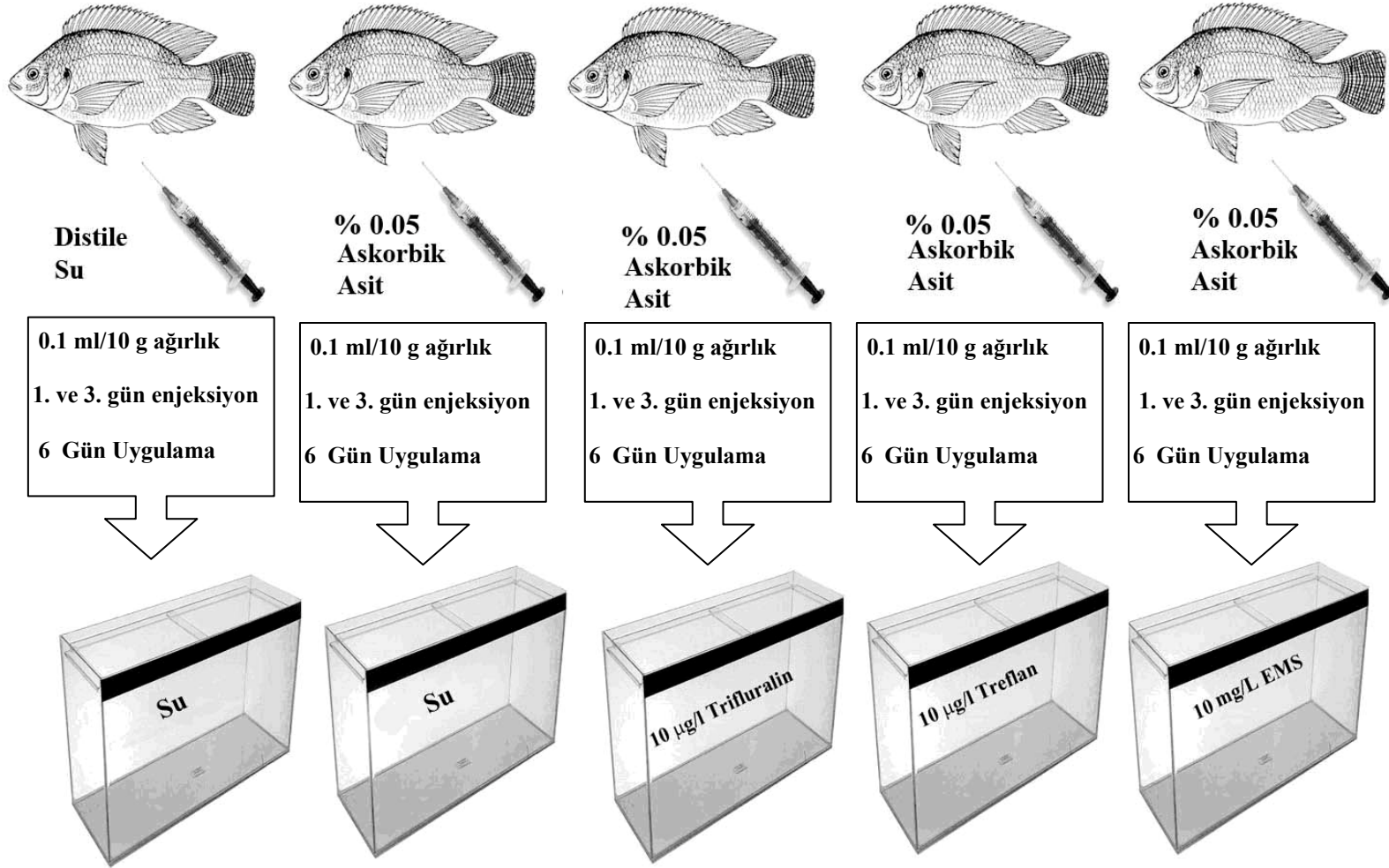
Mikronükleus analizleri periferal eritrositlerde gerçekleştirilmiştir. Uygulama süresi sonunda kan örnekleri balıkların kuyruk yüzgeç damarından elde edilmiştir. Alınan kan örnekleri, her örnek için önceden hazırlanmış olan üç temiz lama ince bir tabaka oluşturacak şekilde yayılmışlardır. Hazırlanan preparatlar havada kurutulduktan sonra %95'lik etanolde 20 dk süresince fikse edilmişlerdir. Fikse edilen preparatlar tekrar havada kurutulduktan sonra %5'lik Giemsa solüsyonunda 20 dk süresince boyanmışlardır. Boyama işleminden sonra preparatlar saf sudan geçirilerek fazla boyanın atılması sağlanmıştır. Daha sonra preparatlar mikroskop altında değerlendirmeye alınmışlardır.

3.4.1. Mikronükleus Sayım Kriterleri

Her preparattan 1000 hücre sayılarak mikronükleus değerlendirmesi yapılmıştır. Hazırlanan preparatlarda zaman zaman boya partikülleri ve/veya diğer bazı kirleticiler nedeniyle mikronükleus ile karıştırılabilen yapılarla karşılaşılabilir. Bu tip hataların elimine edilmesi için mikronükleus sayımlarında genel olarak standardize edilmiş bazı kriterler göz önüne alınmaktadır.

Bu kriterleri şöyle sıralayabiliriz;

- Mikronükleus ana nükleus ile aynı mikroskobik refle'yi vermelidir.
- Mikronükleus ana nükleus ile aynı boyama tonuna sahip olmalıdır.
- Mikronükleus ana nükleus yanında bulunmalıdır.
- Bir mikronükleus ana nükleus'un 1/3'ünden daha küçük olmalıdır.
- Mikronükleus sayılacak hücre diğer hücrelerden izole halde bulunmalıdır.



Şekil 3.3. *Oreochromis niloticus*'larda askorbik asit ve trifluralin, Treflan ve EMS kombinasyonu deneyleri.

3.5. MORFOLOJİK NÜKLEUS DÜZENSİZLİK ANALİZİ

Morfolojik nükleus düzensizlikleri periferik kan eritrositlerinde değerlendirilmiştir. Kuyruk damarından elde edilen kan, temiz preparatlara yayıldıktan sonra havada kurutulmuş, arkasından %95'lik etanolde 20 dk fikse edilmiştir. Hazırlanan yayma preparatlar daha sonra %5'lik Giemsa çözeltisinde 20 dk boyanmışlardır.

Morfolojik nükleus düzensizlikleri Carrasco ve arkadaşlarına [6] göre; çentikli nükleus, tomurcuklu nükleus, loblu nükleus ve binükleus olmak üzere başlıca dört grup altında toplanarak değerlendirilmiştir. Değerlendirmeler için her preparattan 1000 hücre sayılmıştır. Periferik eritrositlerdeki mikronükleus ve diğer nükleus düzensizlikleri şematik olarak Şekil 3.4'de gösterilmiştir.

a) Çentikli Nükleus: Nükleus zarında nükleus içerisine doğru oluşan, gözle belirgin bir biçimde ayırt edilebilen ve kromatin içermeyen çentik şeklindeki girintilere sahip nükleus yapısı.

b) Tomurcuklu Nükleus: Nükleus zarından dışarı doğru çıkıntılar yapan, kromatin içeren küçük tomurcuklanmalara sahip nükleus yapısı.

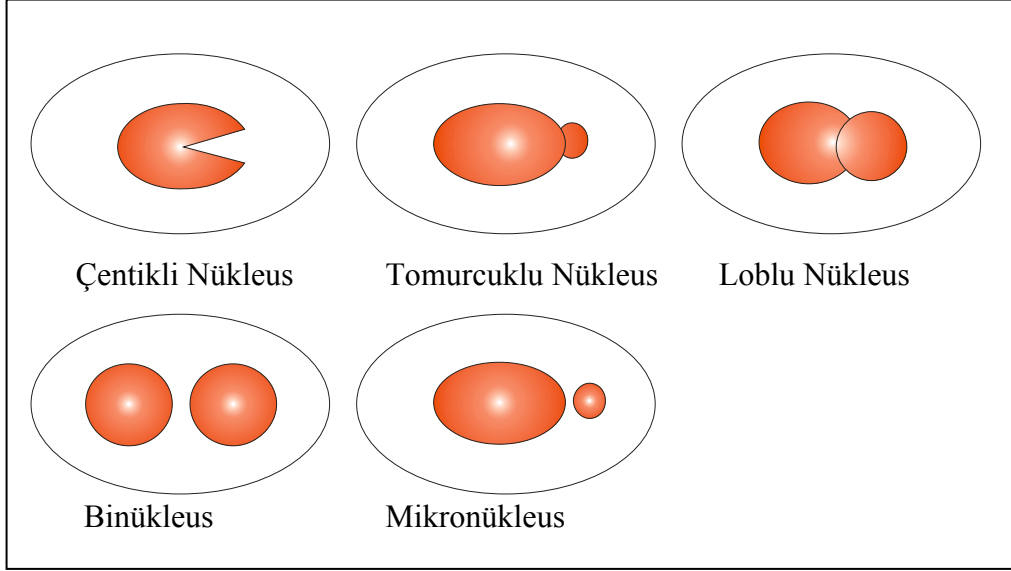
c) Loblu Nükleus: Tomurcuklara oranla daha büyük ve/veya daha fazla sayıda loblar içeren nükleus yapısı.

d) Binükleus: Bir hücre içerisindeki iki adet nükleus bulunma durumu.

3.6. İSTATİSTİK ANALİZLER

Kolmogorov–Smirnov testi verilerin normal dağılıma uyduklarını gösterdiğinden dolayı, mikronükleus verilerinin grup olarak değerlendirilmesinde parametrik bir test olan tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Doz ve uygulama süresi arasındaki etkileşimlerin karşılaştırılması için çift yönlü varyans analizi kullanılmıştır. Varyans analizindeki çoklu karşılaştırmalar için LSD (Least

Significant Difference) testi uygulanmıştır. Askorbik asit kombinasyonlarının ikili karşılaştırmaları için ise *student's t* - testi kullanılmıştır.



Şekil 3.4. Periferel eritrositlerde mikronükleus ve morfolojik nükleus düzensizlikleri [5].

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. BULGULAR

4.1.1. Etken Madde Trifluralin'in Genotoksik Etkileri

4.1.1.1. Mikronükleus verileri

Trifluralin'in 1µg/L, 5µg/L ve 10µg/L'lik dozlarına 3, 6 ve 9 günlük periyotlarla maruz bırakılan *Oreochromis niloticus* örneklerinde yapılan analizler sonucunda periferal kan eritrositlerinde belirlenen ortalama mikronükleus frekansları Çizelge 4.1'de ve Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Buna göre, trifluralinin 1, 5 ve 10µg/L'lik dozları her üç uygulama periyodu boyunca da negatif kontrole karşılaştırıldığında mikronükleus frekanslarında anlamlı derecede yükselmelere neden olmuşlardır (P<0.001). Bununla birlikte en yüksek mikronükleus frekansları 6 günlük uygulama grubunda belirlenmiştir. Buna göre 6 günlük uygulama sonunda kontrol grubundaki mikronükleus frekansı ‰ 3.23 iken bu oran 1, 5 ve 10µg/L'lik dozlarda sırasıyla ‰ 19.53, ‰ 22.06 ve ‰ 24.00 olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan EMS, negatif kontrol grubuna oranla her üç uygulama süresinde de mikronükleus frekanslarında anlamlı düzeyde artışa yol açmıştır (P < 0.001). 3, 6 ve 9 günlük uygulamalarda kontrol grubundaki mikronükleus frekansları ‰ 3.06, ‰ 3.23 ve ‰ 3.40 olarak belirlenirken bu oranlar pozitif kontrol EMS uygulanan gruplarda sırasıyla ‰ 23.33, ‰ 19.33 ve ‰ 22.93 olarak belirlenmiştir. Trifluralin için çözücü olarak kullanılan metanol kontrol grubunda negatif kontrol grubuna oranla bir miktar artış olduğu görülmekle birlikte bu artışların istatistik olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir (P > 0.05). Trifluralin uygulama gruplarında doz-süre etkileşimi istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır (P > 0.05). Uygulama süresindeki artışın mikronükleus frekansında bir artışa yol açmadığı, aksine 9 günlük uygulamada istatistiksel olarak anlamlı miktarda olmamakla birlikte bir düşüşe yol açtığı belirlenmiştir (P<0.001).

Çizelge 4.1. Trifluralin uygulanan *Oreochromis niloticus* örneklerinde belirlenen mikronükleus frekansları (% Ortalama \pm S.H.).

Uygulama Süresi	Negatif Kontrol	Metanol Kontrol	Pozitif Kontrol	Trifluralin		
				1 μ g/L	5 μ g/L	10 μ g/L
3 Gün	3.06 \pm 0.47	4.73 \pm 1.16	23.33 \pm 2.20 ***	18.73 \pm 2.82 ***	16.60 \pm 2.64 ***	21.60 \pm 1.30 ***
6 Gün	3.23 \pm 0.72	5.66 \pm 0.44	19.33 \pm 1.90 ***	19.53 \pm 2.79 ***	22.06 \pm 3.44 ***	24.00 \pm 3.36 ***
9 Gün	3.40 \pm 0.97	5.60 \pm 0.52	22.93 \pm 2.36 ***	16.46 \pm 1.90 ***	20.13 \pm 2.30 ***	18.13 \pm 0.93 ***

* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

4.1.1.2. Morfolojik nükleus düzensizlik verileri

Trifluralin'in üç farklı dozuna (1, 5 ve 10µg/L) üç farklı süre (3, 6 ve 9 gün) boyunca maruz bırakılan *Oreochromis niloticus* örneklerinin periferal kan eritrositlerinde yapılan morfolojik nükleus düzensizlikleri analizlerinin sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir. Çizelge 4.2'de görüldüğü üzere pozitif kontrol olarak kullanılan EMS, üç farklı dozda ve üç farklı uygulama süresinde farklı düzeylerde olmakla birlikte çoğunlukla anlamlı artışlara yol açmıştır ($P < 0.001$). Çözücü (Metanol) kontrol gruplarında 3. gündeki loblu nükleus frekansındaki artış ($P < 0.05$) dışındaki uygulama gruplarında anlamlı bir artışa rastlanmamıştır ($P > 0.05$). Trifluralin'in üç farklı dozundan elde edilen sonuçlara baktığımızda farklı anlam düzeylerinde olmakla birlikte tüm morfolojik nükleus düzensizliklerinde anlamlı artışlar meydana geldiği belirlenmiştir ($P < 0.001$). Morfolojik nükleus düzensizlik tipleri karşılaştırıldığında çentikli nükleus oluşumlarının en yüksek düzeyde artış gösteren grup olduğu belirlenmiştir. Örneğin 3 günlük uygulamada kontrol grubunda ‰ 1.73 olarak belirlenen çentikli nükleus frekansının 10 µg/L'lik uygulamadan sonra tam 22 kat artarak ‰ 38.06 yükseldiği tespit edilmiştir. Morfolojik nükleus düzensizlikleri açısından doz – süre etkileşimlerinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($P > 0.05$).

4.1.2. Ticari Form Treflan'ın Genotoksik Etkileri

4.1.2.1. Mikronükleus verileri

Treflan herbisitinin 1µg/L, 5µg/L ve 10 µg/L'lik trifluraline eşdeğer konsantrasyonlarına 3, 6 ve 9 günlük süreler ile maruz bırakılan *Oreochromis niloticus* örneklerinde yapılan analizler sonucunda periferal kan eritrositlerinde belirlenen ortalama mikronükleus frekansları Çizelge 4.3 ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Buna göre, 3 günlük uygulama gruplarında 5µg/L ve 10 µg/L'lik dozlara maruz kalan örneklerdeki mikronükleus frekansları anlamlı oranda artış gösterdiği belirlenmiştir ($P < 0.05$). Bunun yanında 6 ve 9 günlük uygulamalarda, her üç doz grubunda da farklı anlam düzeylerinde olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı artışların olduğu belirlenmiştir ($P < 0.001$).

Çizelge 4.2. Trifluralin'e maruz bırakılan *O. niloticus* eritrositlerinde morfolojik nükleus düzensizlik frekansları (% Ortalama \pm S.H.). (BN: binükleus, LN: loblu nükleus, TN: tomurcuklu nükleus, ÇN: Çentikli nükleus).

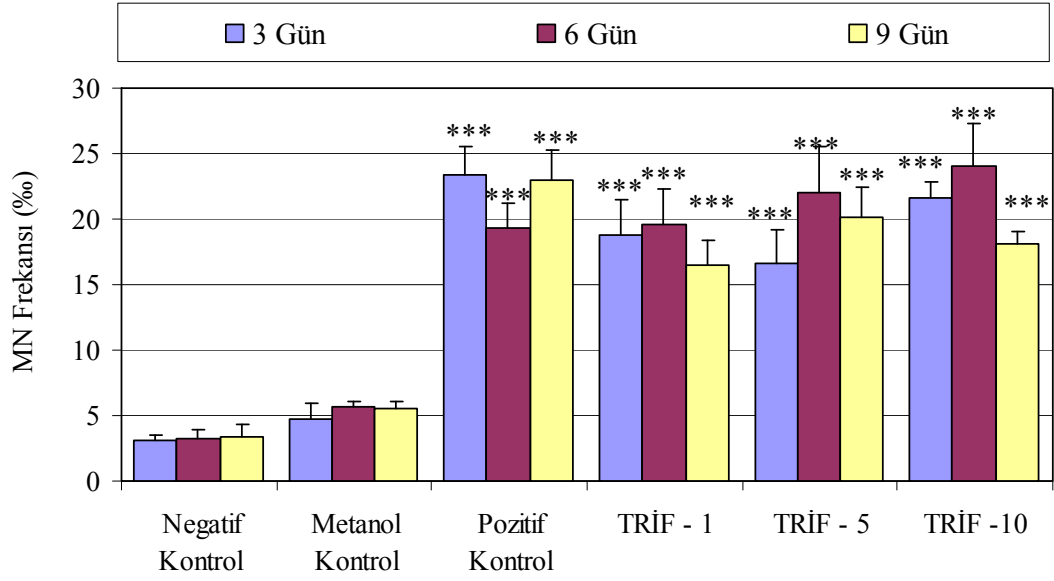
Nükleus Düzensizlikleri	Süre	Negatif Kontrol	Çözücü Kontrol	Pozitif Kontrol	Trifluralin		
					1 µg/L	5 µg/L	10 µg/L
BN	3 gün	1.47 \pm 0.17	4.53 \pm 0.98	12.66 \pm 2.70 ***	6.13 \pm 1.57	10.13 \pm 3.90 **	6.86 \pm 1.22 *
	6 gün	3.80 \pm 1.12	3.60 \pm 1.34	10.20 \pm 1.78 *	13.06 \pm 4.66 **	12.60 \pm 0.98 **	5.93 \pm 1.24
	9 gün	2.40 \pm 1.33	20.60 \pm 3.05	6.73 \pm 1.12 ***	14.00 \pm 2.10 **	11.40 \pm 3.52 *	10.93 \pm 3.21 *
LN	3 gün	0.46 \pm 0.19	3.33 \pm 0.42 *	10.40 \pm 0.82 ***	9.13 \pm 0.86 ***	6.80 \pm 1.37 ***	10.73 \pm 1.33 ***
	6 gün	1.40 \pm 0.13	1.86 \pm 0.23	10.60 \pm 1.76 ***	10.66 \pm 1.94 ***	11.80 \pm 1.95 ***	9.80 \pm 1.88 ***
	9 gün	1.66 \pm 0.72	2.33 \pm 0.37	13.00 \pm 1.55 ***	15.13 \pm 1.62 ***	11.86 \pm 1.28 ***	8.00 \pm 1.12 ***
TN	3 gün	0.33 \pm 0.15	0.53 \pm 0.13	1.46 \pm 0.30 *	1.53 \pm 0.42 *	3.00 \pm 0.60 ***	2.00 \pm 0.40 **
	6 gün	0.26 \pm 0.11	0.86 \pm 0.29	2.66 \pm 0.30 ***	4.33 \pm 0.59 ***	2.86 \pm 0.49 ***	3.40 \pm 0.51 ***
	9 gün	0.40 \pm 0.13	0.80 \pm 0.24	4.73 \pm 0.66 ***	5.53 \pm 0.59 ***	4.26 \pm 0.35 ***	5.06 \pm 0.70 ***
ÇN	3 gün	1.73 \pm 0.50	3.73 \pm 0.33	29.20 \pm 1.55 ***	30.60 \pm 2.30 ***	28.73 \pm 2.21 ***	38.06 \pm 2.17 ***
	6 gün	1.60 \pm 0.16	3.80 \pm 0.35	26.26 \pm 1.33 ***	24.60 \pm 1.81 ***	21.00 \pm 1.45 ***	32.60 \pm 1.82 ***
	9 gün	2.46 \pm 0.61	5.46 \pm 0.52	49.53 \pm 2.61 ***	46.06 \pm 2.92 ***	36.26 \pm 2.19 ***	37.53 \pm 2.73 ***

* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

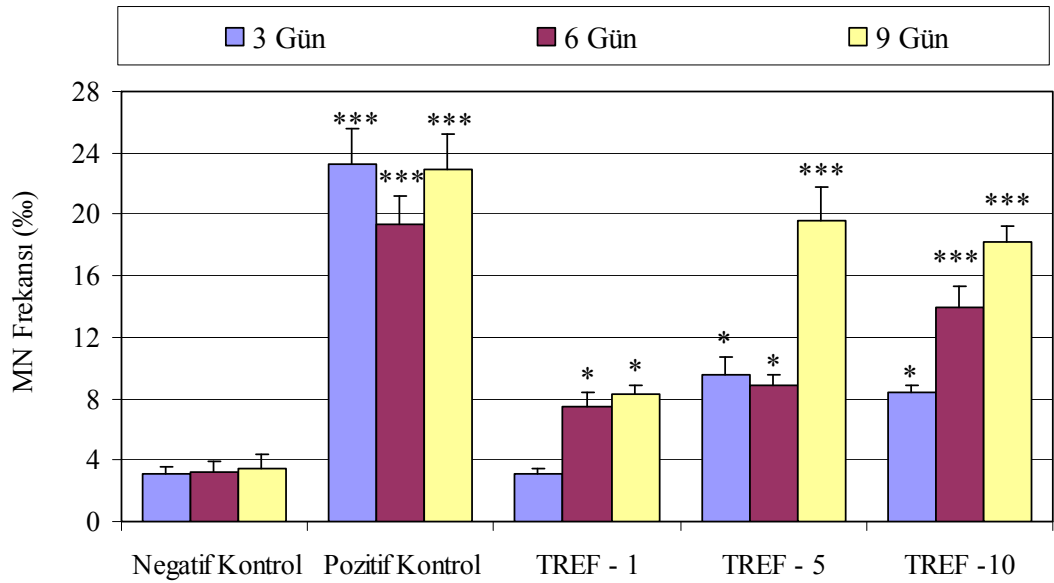
Çizelge 4.3. Treflan herbisiti uygulanan *Oreochromis niloticus* örneklerinde belirlenen mikronükleus frekansları (% Ort \pm S.H.).

Uygulama Süresi	Negatif Kontrol	Pozitif Kontrol	Treflan		
			1 μ g/L	5 μ g/L	10 μ g/L
3 Gün	3.06 \pm 0.47	23.33 \pm 2.20***	3.13 \pm 0.33	9.60 \pm 1.16 **	8.40 \pm 0.45 *
6 Gün	3.23 \pm 0.72	19.33 \pm 1.90***	7.46 \pm 0.90 *	8.86 \pm 0.68 *	13.93 \pm 1.39 ***
9 Gün	3.40 \pm 0.97	22.93 \pm 2.36***	8.33 \pm 0.56 *	19.6 \pm 2.14 ***	18.2 \pm 1.06 ***

* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001



Şekil 4.1. Trifluralin'e maruz bırakılan *O. niloticus* eritrositlerinde belirlenen mikronükleus (MN) frekansları (* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001).



Şekil 4.2. Treflan'a maruz bırakılan *O. niloticus* eritrositlerinde belirlenen mikronükleus (MN) frekansları (* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001).

En yüksek mikronükleus frekansları 9 günlük uygulama grubunda gözlenmiştir. Bu grupta kontrol grubu mikronükleus frekansı ‰ 3.40 olarak gözlenirken 1µg/L, 5µg/L ve 10 µg/L'lik doz gruplarında mikronükleus frekansları sırasıyla ‰ 8.33, ‰ 19.6 ve ‰ 18.2 olarak belirlenmiştir. Trifluralin ile kıyaslandığında Treflan'ın mikronükleus oluşturma potansiyelinin daha düşük olduğu görülmektedir. Doz - süre etkileşimlerinin ise anlamlı olduğu bulunmuştur (P<0.05).

4.1.2.2. Morfolojik nükleus düzensizlik verileri

Treflan herbisitinin üç farklı (1, 5 ve 10 µg/L) dozuna 3, 6 ve 9 gün boyunca maruz bırakılan *Oreochromis niloticus* periferik eritrositlerinde belirlenen morfolojik nükleus düzensizliklerinin frekansları Çizelge 4.4'de verilmiştir. Binükleus frekansları incelendiğinde Treflan uygulamasının hiçbir doz ve süre grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artışa yol açmadığı görülmüştür (P > 0.05). Loblu nükleus verileri incelendiğinde özellikle 5 µg/L ve 10 µg/L doz gruplarında istatistiksel olarak anlamlı artışların olduğu görülmektedir (P < 0.01). Tomurcuklu nükleus frekansları her üç doz ve süre grubunda da anlamlı oranda artmıştır (P < 0.01). Çentikli nükleus verileri bir önceki deney grubunda olduğu gibi en yüksek oranda artış gösteren grup olmuştur. Tüm doz ve uygulama sürelerindeki çentikli nükleus frekansları P<0.001 anlamlılık düzeyinde artış göstermiştir. Mikronükleus verilerinde olduğu gibi Treflan herbisiti tarafından oluşturulan nükleus düzensizlik frekanslarının da genel olarak saf etken madde trifluraline oranla daha düşük oranda olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.4. Treflan herbisitine maruz bırakılan *O. niloticus* eritrositlerinde morfolojik nükleus düzensizlik frekansları (% Ortalama \pm S.H.) (BN: binükleus, LN: loblu nükleus, TN: tomurcuklu nükleus, ÇN: Çentikli nükleus).

Nükleus Düzensizlikleri	Süre	Negatif Kontrol	Pozitif Kontrol	Treflan		
				1 μ g/L	5 μ g/L	10 μ g/L
BN	3 gün	1.47 \pm 0.17	12.66 \pm 2.70 ***	0.40 \pm 0.16	3.26 \pm 0.72	4.73 \pm 1.67
	6 gün	3.80 \pm 1.12	10.20 \pm 1.78 *	2.46 \pm 0.76	4.60 \pm 1.35	7.80 \pm 2.01
	9 gün	2.40 \pm 1.33	6.73 \pm 1.12 ***	4.40 \pm 0.59	3.06 \pm 0.38	3.46 \pm 0.55
LN	3 gün	0.46 \pm 0.19	10.40 \pm 0.82 ***	3.53 \pm 0.76 *	8.20 \pm 1.49 ***	6.46 \pm 1.33 ***
	6 gün	1.40 \pm 0.13	10.60 \pm 1.76 ***	2.66 \pm 0.85	5.80 \pm 0.51**	5.06 \pm 0.68 **
	9 gün	1.66 \pm 0.72	13.00 \pm 1.55 ***	2.80 \pm 0.40	6.86 \pm 0.95 ***	4.46 \pm 0.81 *
TN	3 gün	0.33 \pm 0.15	1.46 \pm 0.30 *	2.00 \pm 0.27 **	2.53 \pm 0.36 ***	2.06 \pm 0.58 **
	6 gün	0.26 \pm 0.11	2.66 \pm 0.30 ***	2.46 \pm 0.40 **	1.66 \pm 0.25 *	2.00 \pm 0.87 *
	9 gün	0.40 \pm 0.13	4.73 \pm 0.66 ***	2.20 \pm 0.43 *	1.86 \pm 0.58 *	2.13 \pm 0.53 *
ÇN	3 gün	1.73 \pm 0.50	29.20 \pm 1.55 ***	15.73 \pm 1.10 ***	17.73 \pm 0.89 ***	15.60 \pm 1.18 ***
	6 gün	1.60 \pm 0.16	26.26 \pm 1.33 ***	16.86 \pm 1.19 ***	20.53 \pm 1.26 ***	22.06 \pm 1.45 ***
	9 gün	2.46 \pm 0.61	49.53 \pm 2.61 ***	15.00 \pm 0.70 ***	15.93 \pm 1.39 ***	15.13 \pm 1.04 ***

* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

4.1.3. Askorbik Asitin Antigenotoksik Etkileri

Askorbik asit (% 0.05), etil metan sulfonat (10 mg/L) , trifluralin (10 µg/L) ve Treflan (10 µg/L) kombinasyonlarına 6 gün boyunca maruz bırakılan *Oreochromis niloticus* eritrositlerinde belirlenen mikronükleus ve morfolojik nükleus düzensizlik frekansları Çizelge 4.5’de verilmiştir. Kontrol amacı ile su enjeksiyonu uygulanan *O. niloticus*’larda mikronükleus ve morfolojik nükleus düzensizlik frekanslarında enjeksiyon yapılmayan kontrol grubuna oranla herhangi bir farklılık gözlenmemiştir (Çizelge 4.5).

Şekil 4.3’de görüldüğü üzere yalnızca askorbik asit uygulanan örneklerin eritrositlerindeki mikronükleus frekansları mikronükleus ve morfolojik nükleus düzensizlik frekanslarında düşüşe yol açmıştır. Bununla birlikte bu düşüş oranı yalnızca binükleus ($P < 0.05$) ve loblu nükleus ($P < 0.01$) frekanslarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Pozitif kontrol olarak kullanılan etil metan sulfonat uygulanan balıklarda ‰ 19.33 olarak belirlenen mikronükleus frekansının, askorbik asit ile kombine olarak EMS uygulanan balıklarda yaklaşık % 54 oranında azalarak ‰ 8.66’ya düştüğü belirlenmiştir ($P < 0.001$). Benzer şekilde morfolojik nükleus düzensizlik frekanslarında da % 40 ile % 90 arasında değişen ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($P < 0.001$) belirlenen düşüşler gözlenmiştir (Şekil 4.4).

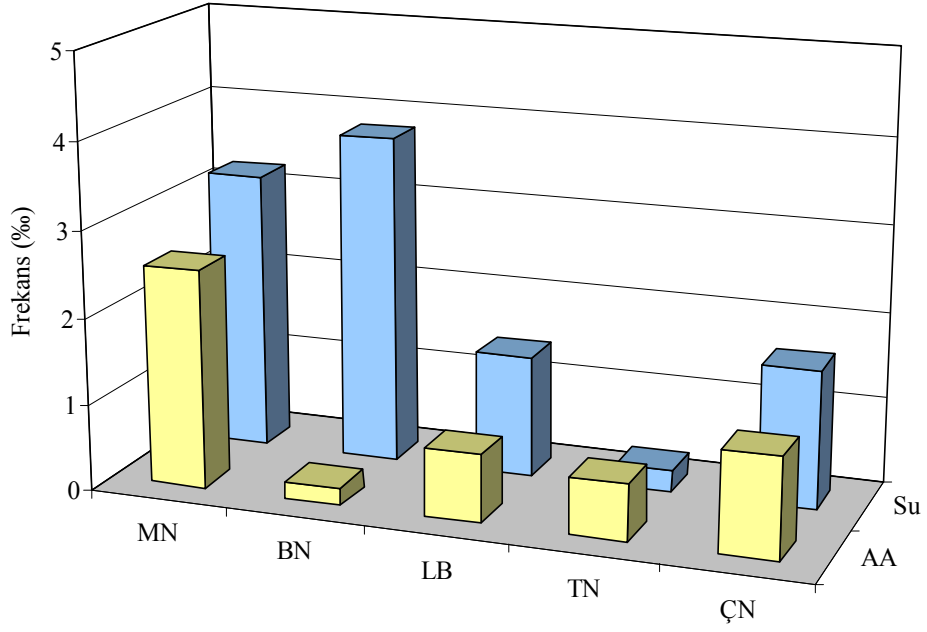
Trifluralin uygulanan *O. niloticus*’larda ‰ 24.00 olarak belirlenen mikronükleus frekansının askorbik asit ile kombine edilerek trifluraline maruz bırakılan balıklarda yaklaşık olarak % 68 oranında azalarak ‰ 7.66’ya düştüğü belirlenmiştir ($P < 0.001$). Benzer şekilde binükleus, tomurcuklu nükleus ve loblu nükleus frekanslarının da yaklaşık % 30 oranında azaldığı belirlenmiştir ($P < 0.01$). Çentikli nükleus frekansının ise askorbik asit uygulaması sonunda yaklaşık % 50 oranında düştüğü gözlenmiştir ($P < 0.001$) (Şekil 4.5).

Çizelge 4.5. Askorbik asit (AA) uygulanan *Oreochromis niloticus* örneklerinde belirlenen mikronükleus frekansları.

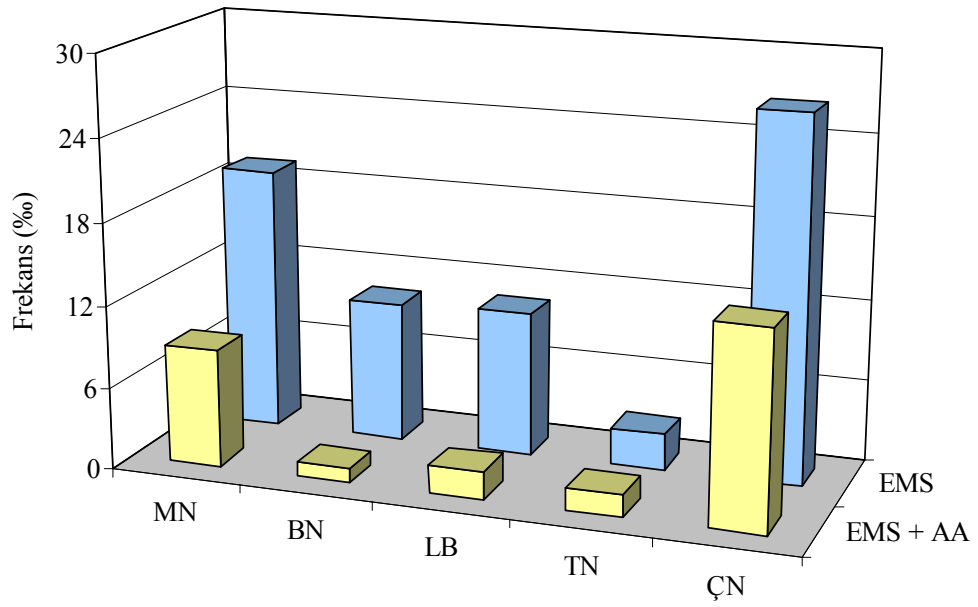
Deney Grupları	Mikronükleus Frekansları (‰)	Nükleus Düzensizlik Frekansları (‰)			
		BN	LN	TN	ÇN
Su (Negatif Kontrol)	3.23 ± 0.72	3.80 ± 1.12	1.40 ± 0.13	0.26 ± 0.11	1.60 ± 0.16
EMS (Pozitif Kontrol)	19.33 ± 1.90	10.20 ± 1.78	10.60 ± 1.76	2.66 ± 0.30	26.26 ± 1.33
Trifluralin	24.00 ± 3.36	5.93 ± 1.24	9.80 ± 1.88	3.40 ± 0.51	32.60 ± 1.82
Treflan	13.93 ± 1.39	7.80 ± 2.01	5.06 ± 0.68	2.20 ± 0.87	22.06 ± 1.45
Su Enjekte	3.33 ± 0.35	2.16 ± 0.27	0.87 ± 0.22	0.50 ± 0.12	1.45 ± 0.24
AA Enjekte	2.54 ± 0.37	0.20 ± 0.24 ^b	0.79 ± 0.24 ^a	0.66 ± 0.10	1.16 ± 0.17
EMS + AA Enjekte	8.66 ± 0.98 ***	1.00 ± 0.28***	2.04 ± 0.46 ***	1.60 ± 0.25 ***	14.37 ± 1.05 ***
Trifluralin + AA Enjekte	7.66 ± 1.23 ***	1.16 ± 0.38**	2.66 ± 0.36 **	1.05 ± 0.14 **	15.75 ± 1.36 ***
Treflan + AA Enjekte	8.37 ± 0.80 **	1.04 ± 0.22 **	1.25 ± 0.24 **	1.74 ± 0.15 *	18.54 ± 1.21 *

(* , ** , ***; Deney ve Enjeksiyon grubu farkları, a, b; AA enjekte grup ile Su (Negatif kontrol) farkları.

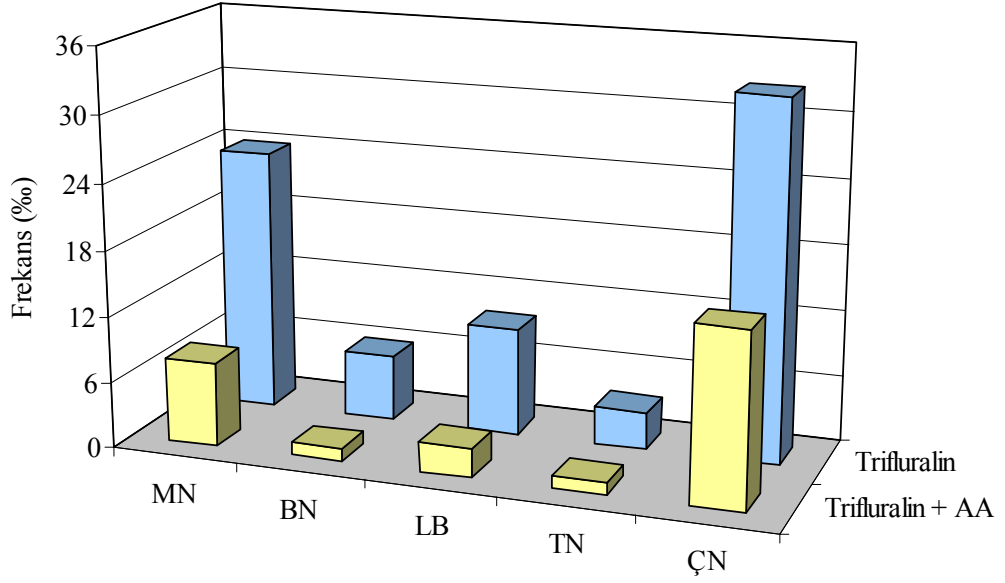
* P<0.05, *b* P<0.01, *** P<0.001, ^a P<0.05, ^b P <0.01.



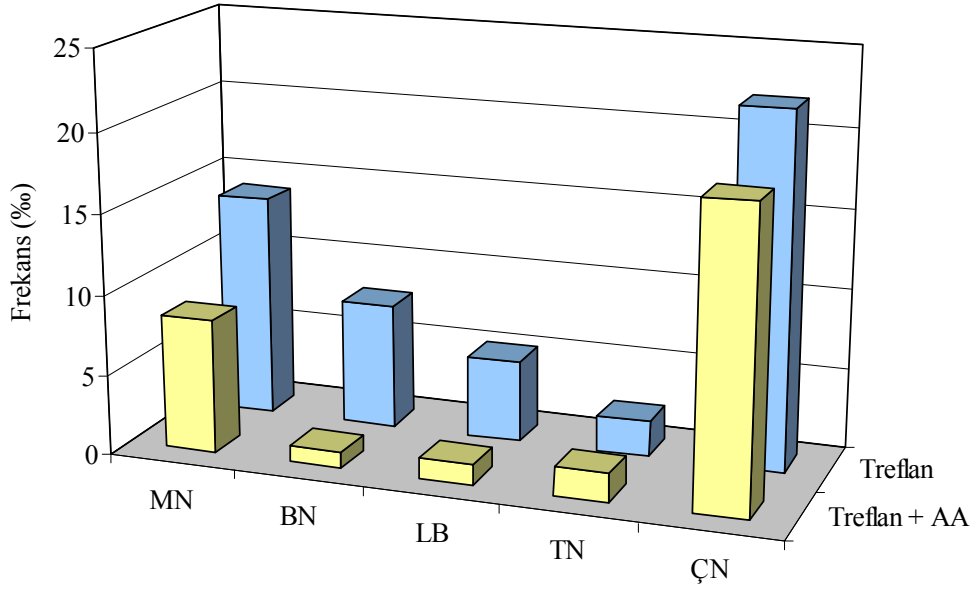
Şekil 4.3. Askorbik asit (AA)'e maruz bırakılan *O. niloticus*'larda belirlenen mikronükleus ve morfolojik nükleus düzensizlik frekansları.



Şekil 4.4. Askorbik asitin EMS (Etil Metan Sulfonat) tarafından oluşturulan mikronükleus ve morfolojik nükleus düzensizlik frekansları üzerindeki etkileri.



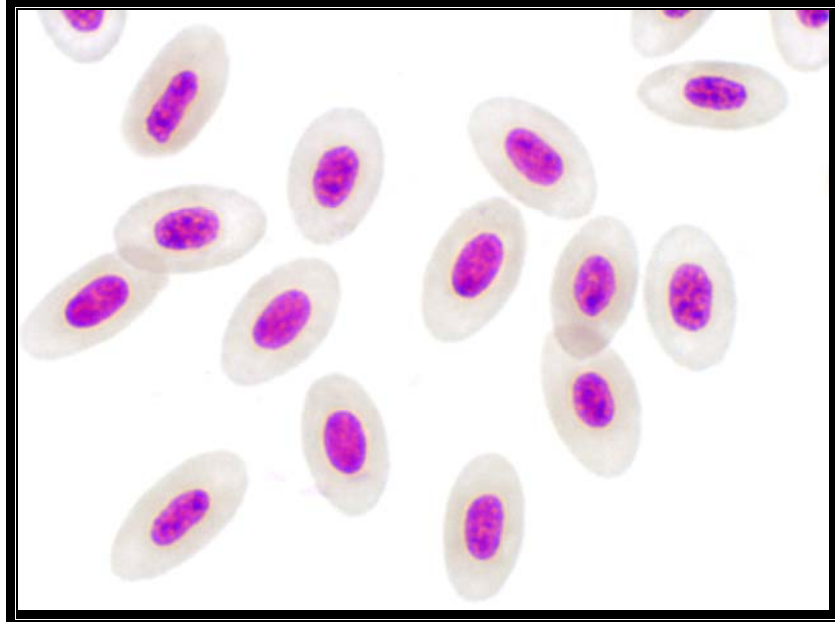
Şekil 4.5. Askorbik asitin Trifluralin herbisiti tarafından oluşturulan mikronükleus ve morfolojik nükleus düzensizlik frekansları üzerindeki etkileri.



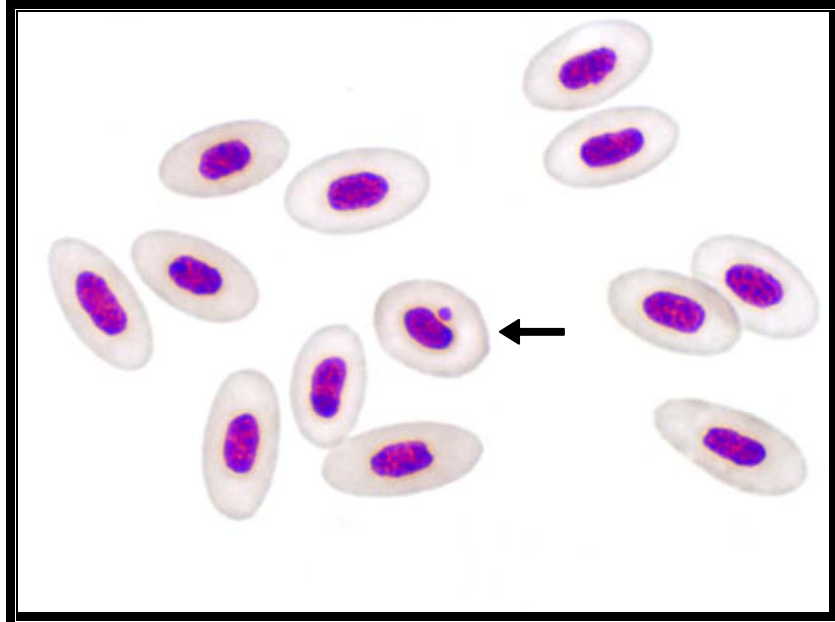
Şekil 4.6. Askorbik asitin Treflan herbisiti tarafından oluşturulan mikronükleus ve morfolojik nükleus düzensizlik frekansları üzerindeki etkileri.

Treflan uygulanan *O. niloticus*'larda ‰ 13.93 olarak belirlenen mikronükleus frekansının askorbik asit ile kombine edilerek Treflan uygulanan balıklarda yaklaşık olarak ‰ 40 oranında azalarak ‰ 8.37'ye düştüğü belirlenmiştir. Askorbik asit ile kombine edilerek Treflan uygulanan balıklardaki morfolojik nükleus düzensizlik frekansları incelendiğinde binükleus frekansının ‰ 87 ($P < 0.01$), loblu nükleus frekansının ‰ 75 ($P < 0.01$), tomurcuklu nükleus frekansının ‰ 20 ($P < 0.05$) ve çentikli nükleus frekansının da ‰ 15 oranında düştüğü belirlenmiştir ($P < 0.05$) (şekil 4.6).

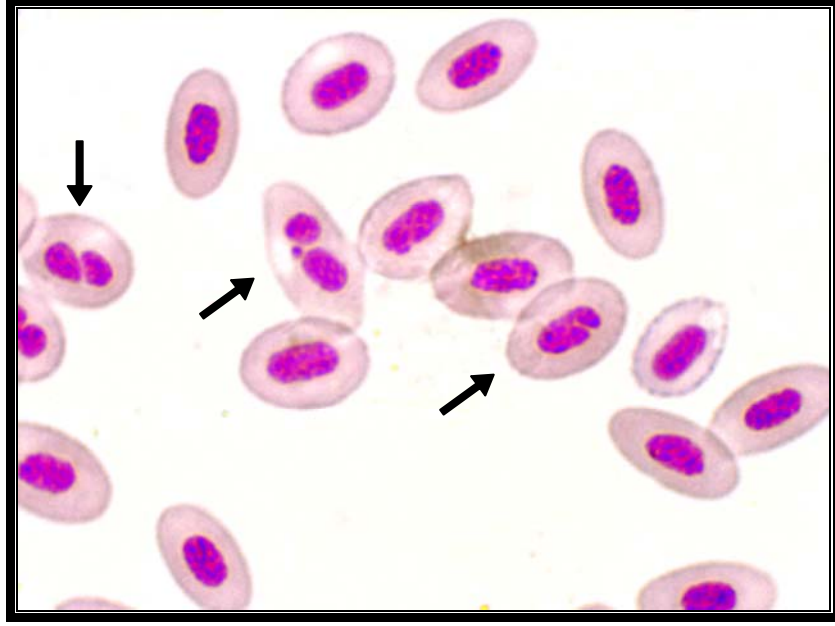
Oreochromis niloticus eritrositlerinde belirlenen çeşitli mikronükleus ve morfolojik nükleus düzensizlik oluşumlarının örnekleri şekil 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13 ve 4.14'de gösterilmiştir (Büyütme x1000).



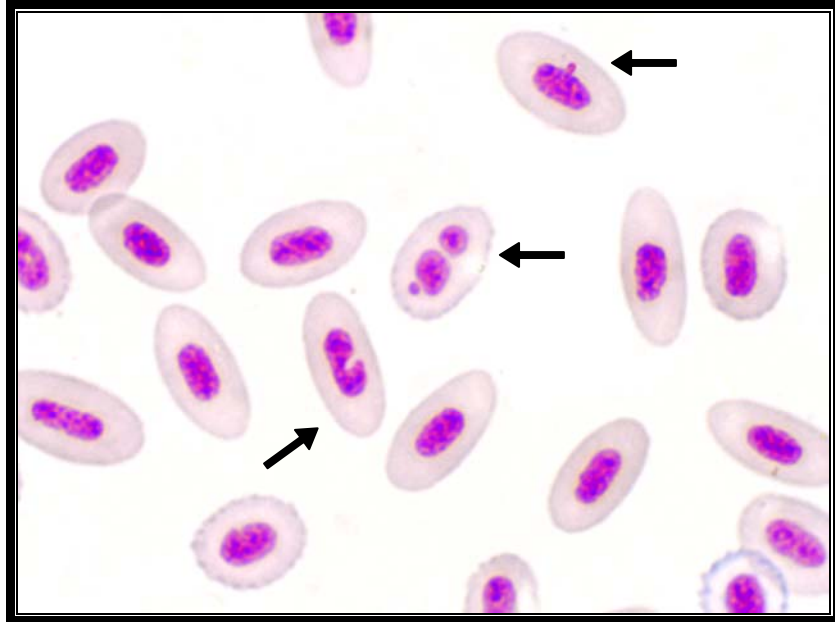
Şekil 4.7. *O. niloticus*'da normal eritrosit hücreleri.



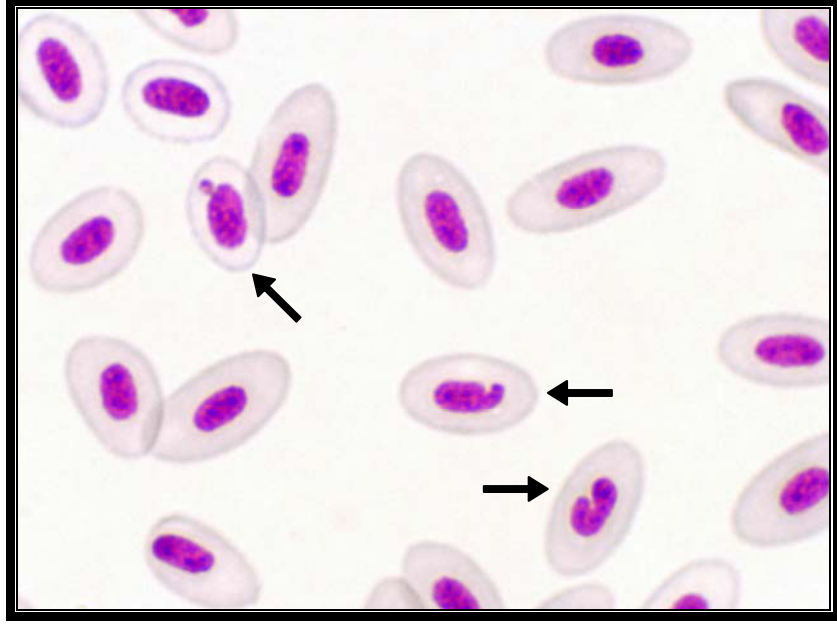
Şekil 4.8. *O. niloticus*'da mikronükleuslu eritrosit oluşumu.



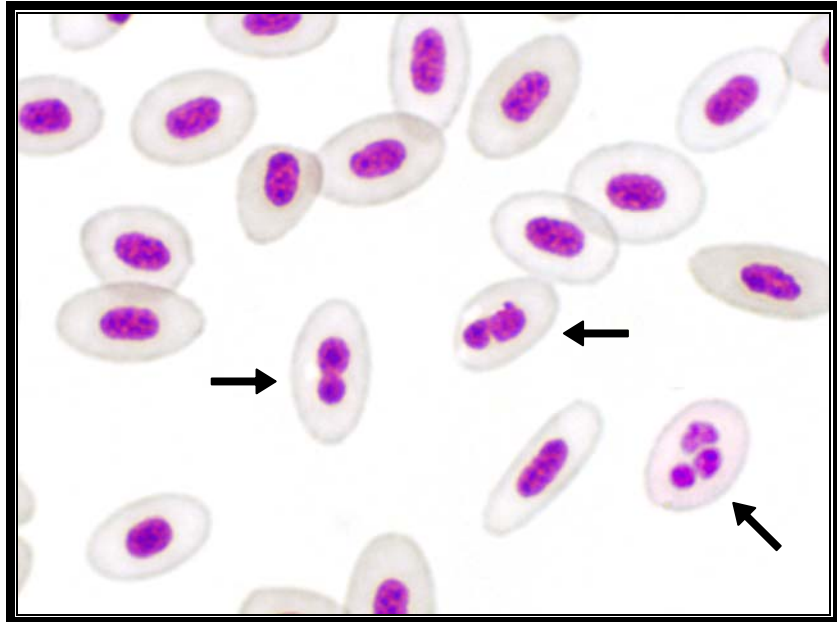
Şekil 4.9. *O. niloticus* eritrositlerinde binükleus, çentik ve binükleuslu mikronükleus oluşumları.



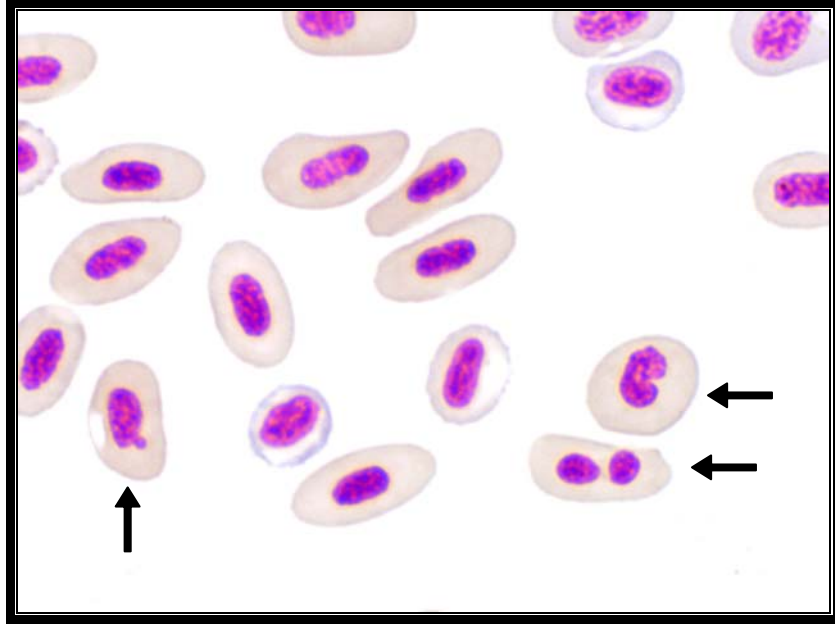
Şekil 4.10. *O. niloticus* eritrositlerinde çentik, tomurcuk ve binükleuslu mikronükleus oluşumları.



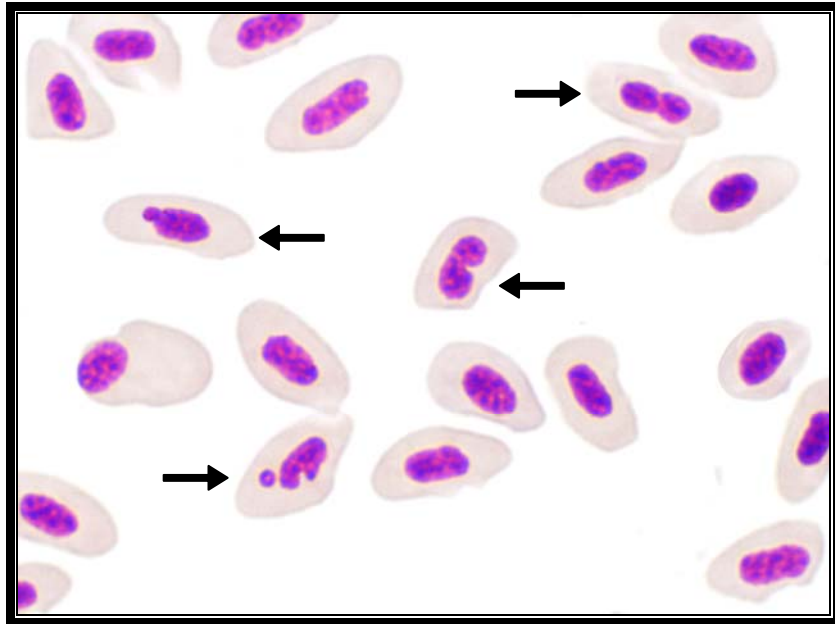
Şekil 4.11. *O. niloticus* eritrositlerinde çentik ve tomurcuk oluşumları.



Şekil 4.12. *O. niloticus* eritrositlerinde lob, tomurcuk, çentik ve tri nükleus oluşumları.



Şekil 4.13. *O. niloticus* eritrositlerinde binükleus, tomurcuk ve çentik oluşumları.



Şekil 4.14. *O. niloticus* eritrositlerinde lob, çentik tomurcuk ve mikronükleus oluşumları.

4.2. TARTIŞMA

Modern dünyada insan sağlığı ve çevre büyük önem kazanmış ve aralarında pestisitlerinde bulunduğu çevresel kirleticilerin olumsuz etkilerinin kontrolü zorunlu hale gelmiştir. Birçok gelişmiş ülkeye ciddi ölçülerde tarım ürünü dış satışımızın sürdüğü günümüzde, sağlığı, çevreyi ve ekonomimizi koruyabilmek amacıyla, tarım ilacı kullanımının gelişmiş ülkeler standartlarında, çok bilinçli ve kontrollü yapılması gerekmektedir. Diğer birçok çevresel kirletici gibi pestisitlerin de uygulama alanlarından çevrenin farklı alanlarına ulaşmasındaki başlıca yollardan biri sudur. Pestisitler en büyük çevresel etkilerini sucul ekosistemi kontamine ederek göstermektedirler. Günümüzde özellikle su rezervlerinin geri dönüşsüz bir şekilde kullanılması sucul ekosistemlerde yapılan çalışmaların yoğunluk kazanmasında etkili olmuştur.

Pestisitlerin sucul ortamlardaki genotoksik etkilerinin laboratuvar ortamında test edilmesinde balıkların etkin bir şekilde kullanılabileceği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Çavaş ve Ergene-Gözükara [98], bir insektisit olan lambda-cyhalorthin'in *Garra rufa*'da (Cyprinidae) eritrosit mikronükleus frekanslarını anlamlı oranda arttırdığını bildirmişlerdir. Neuparth ve ark. [54], tarım alanlarında geniş kullanıma sahip olan endosülfanı laboratuvar şartlarında *Sparus aurata* (Perciformes) üzerinde incelemişlerdir. Uygulama dozu ve süreye bağlı olarak eritrosit mikronükleus ve eritrosit morfolojik nükleus düzensizlik frekanslarında anlamlı oranda artışlar gözlediklerini bildirmişlerdir. Martinez-Tabche ve ark. [56], laboratuvar şartları altında parakuat ve 2,4-diklorofenoksiasetik asit isimli iki herbisitini farklı dozlarına maruz bıraktıkları *Oncorhynchus mikiss*'in (Salmonidae) solungaç hücrelerinde komet testini kullanarak genotoksik hasarın arttığını bildirmişlerdir. Farah ve ark. [52], 2,4-D'ye maruz bıraktıkları *Channa punctatus* (Perciformes) örneklerinde mikronükleus frekanslarının arttığını belirlemişlerdir. Çavaş ve Könen [99], glyphosat herbisitine maruz bırakılan *Carassius auratus* örneklerinin periferik eritrositlerindeki mikronükleus frekanslarında ve DNA iplik kırılmalarında artış meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Pestisitlerin genotoksik etkileri incelenirken yalnızca etken maddenin etkilerinin değerlendirilmesi yeterli olmamaktadır. Çünkü doğal ortama uygulanan pestisitler daima çeşitli şekillerde hazırlanan ticari formülasyonlarda kullanılmaktadırlar. Bu noktada ticari formülasyonun da etkilerinin incelenmesi doğal ortamlarda oluşacak risklerin belirlenmesi açısından daha doğru bilgiler sağlayacaktır. Bu nedenle en geçerli yöntem saf etken madde ve ticari formülasyonların toksik etkileri açısından karşılaştırılmaları olarak belirtilmektedir. Bu yöntem, diğer bireysel katkı maddeleri hakkında direkt olarak bilgi vermektense ziyade tüm katkı maddelerinin etkilerinin toplam olarak belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Bu yaklaşım tek tek tüm katkı maddelerini test etmektense daha yararlıdır. Çünkü bireysel içeriklerin tek tek test edilmesi ile gözlenemeyecek olan bazı aditif, antogonistik ya da sinerjistik etkilerin daha doğru olarak belirlenmesine olanak sağlamaktadır.

Bu çalışmada da dünyada geniş kullanım alanına sahip, dinitroanilin grubu bir herbisit olan trifluralinin hem saf etken madde olarak kendisinin hem de Treflan olarak adlandırılan % 45'lik ticari formülasyonunun, hedef olmayan ekonomik bir organizma olan *Oreochromis niloticus* (Pisces: Perciformes) üzerinde in vivo genotoksik etkileri mikronükleus testi ve morfolojik nükleus düzensizlik analizleri kullanılarak incelenmiştir.

Aralarında Türkiye'nin de bulunduğu birçok ülkede trifluralin kullanımı yoğun biçimde devam etmektedir. Buna rağmen bazı çalışmalardan elde edilen veriler ışığında bu herbisit kullanımı Danimarka, İsveç ve Norveç gibi ülkelerde tümüyle yasaklanmıştır.

Akut toksisite verileri saf trifluralinin tatlı su balıklarında orta-yüksek dereceli toksik, deniz balıklarında ise yüksek dereceli toksik etkilere sahip olduğunu göstermiştir [62]. Bununla birlikte trifluralinin % 46'lık ticari formülasyonlarının tatlısu balıkları üzerinde yüksek toksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Trifluralin'in balıklar üzerindeki genotoksik etkileri henüz çalışılmamış olmakla birlikte, trifluralinin diğer test sistemleri üzerindeki genotoksik etkilerinin incelendiği çeşitli araştırmalar bulunmaktadır.

Ribas ve ark. [71], in vitro olarak insan lenfosit kültüründe trifluralinin genotoksik etkilerini; CA, SCE ve MN testlerini kullanarak S9 varlığında araştırmışlardır. SCE değerlerinde anlamlı yükselmeler belirlemelerine rağmen, CA ve MN test sonuçlarında anlamlı yükselmeler belirlenmemiştir. Üreme hızı indeksi (Proliferative rate index = PRI) ve sitokinez bloke üreme indeksine (Cytokinesis block proliferation index = CBPI) bakıldığında ise trifluralinin zayıf sitotoksik etkileri olduğunu belirtmişlerdir. Sonuç olarak bu araştırmacılar trifluralinin insanlarda genotoksik olmadığını öne sürmüşlerdir. Gebel ve ark. [64], trifluralinin de içinde bulunduğu birkaç herbisitinin genotoksitesini belirlemek için dişi ve erkek fareleri bu herbisitlerin farklı konsantrasyonlarına maruz bırakarak mikronükleus frekansında meydana gelen değişiklikleri incelemişlerdir. Trifluralin'in sadece dişi farelerde ve 1.400mg/kg'lık dozunda mikronükleus frekanslarında anlamlı yükselmeler olduğunu bildirmişlerdir. Marine-Morales ve ark. [100], ticari trifluralinin (445g/L saflıkta) 0.42ppm, 0.84ppm, 1.67ppm ve 3.74ppm'lik konsantrasyonlarına 24 ve 48 saat süresince maruz bırakılan *Allium cepa* örneklerinde mikronükleus frekansındaki artışı, kromozomal hasarları ve morfolojik nükleus düzensizliklerini değerlendirmişlerdir. Çalışmada 3.74 ppm'lik değer *Allium cepa* için hücre bölünmesini durdurduğunu, diğer üç konsantrasyonun ise mutajenik etkilerinin olduğunu bildirmişler ve trifluralinin anojenik bir ajan olduğunu belirtmişlerdir.

Bu çalışmada, hem etken madde trifluraline hem de ticari formulasyon olan Treflan'a maruz bırakılan *Oreochromis niloticus*'larda mikronükleus ve morfolojik nükleus düzensizlik frekanslarında oldukça önemli miktarlarda artışların olduğu belirlenmiştir. Trifluralinin yer yer pozitif kontrol olarak kullanılan EMS tarafından oluşturulandan daha yüksek mikronükleus frekanslarına yol açtığı görülmüştür.

Yapılan çeşitli çalışmalarda dinitroanilin grubu herbisitlerin bitkilerin kök ucu hücrelerinde mikrotübül yapısını bozmak sureti ile hatalı mitoz bölünmelere yol açarak bitki büyümesini engellediği gösterilmiştir [101]. Mikrotübüller α ve β tübülün dimerlerinden oluşan polimerik yapılardır [102]. Bu yapılar ökaryotik hücrelerde iğ plikleri ve flagellum gibi yapıların oluşmasını sağlayan temel birimlerdir. Trifluralin gibi dinitroanilin grubu herbisitlerin mitoz esnasında

kromozomların stabilitesinden sorumlu olan mikrotübülün ana alt birimi olan tubulin proteini ile reaksiyona girdiği böylece de anojenik etki gösterdiği bildirilmektedir [103]. Ancak bu etkinin yalnızca bitki tubulinlerinde görüldüğü fakat hayvan ve fungus tübülünlerinde görülmediği belirtilmesine rağmen trifluralinin *Trypanosoma* sp., *Leishmania* sp., *Plasmodium falciparum* ve *Toxoplasma gondii* gibi parazitik protozoonlarda mikrotübül yapısını bozduğu gösterilmiştir [104]. Uzun yıllardan beri ticari herbisitler olarak kullanılmasına rağmen dinitroanilinlerin tubulin proteinleri ile nasıl etkileşime girdikleri, mikrotübül yapısını nasıl bozdukları ve neden özellikle bitki ve protozoon tübülünleri üzerine etkili oldukları henüz tam olarak belirlenememiştir.

Bu çalışmada elde edilen bulgular ayrıca etken madde trifluraline maruz bırakılan örneklerde belirlenen mikronükleus frekanslarının ticari formülasyonu Treflan'a maruz bırakılan balıklarda belirlenenlere oranla daha yüksek olduğunu göstermiştir. Ticari formülasyonda bulunan katkı maddeleri pestisit toksisitesini direkt olarak kimyasal yapısını değiştirmek veya çözünürlüğü etkilemek sureti ile arttırabilir ya da azaltabilirler [105]. Örneğin Pickering ve ark. [106], organofosfatlı insektisitlerin emulsiyon formülasyonlarının sazarlarda teknik etken maddeye oranla daha fazla toksik olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde, bazı herbisitlerin toz formlarının sıvı formülasyonlardan daha az toksik olduğu bildirilmiştir [107].

Etken madde ticari formülasyon arasındaki sucül toksik etkilere dair en kapsamlı çalışmalardan biri 1986 yılında Mayer ve Ellersieck [108] tarafından yürütülmüştür. Bu çalışmada etken madde ile formülasyonlar arasında toksisite açısından yüksek oranda varyasyonlar olduğu gözlenmiştir. Bu farklılıkların kullanılan test metoduna, seçilen test organizmalarına bağlı olabileceği bildirilmiştir. Bu sonuçlar ışığında da ticari formülasyonun toksik etkilerinin etken maddeye bakarak tahmin edilemeyeceği sonucuna varmışlardır. Sucül ortamlarda ticari formülasyonların toksisite açısından farklılıklar göstermesinin en önemli sebeplerinden biri de formülasyonlardaki maddelerin her zaman tümüyle suya ulaşmıyor olmasıdır. Aktif maddeler ve diğer katkı maddeleri genelde emilim ve biyotik-abiyotik parçalanma özellikleri açısından farklılık gösterirler bu nedenle de

genelde sucul ortama ulaşmadan önce ayrışma uğrayabilmektedirler. Schmuck ve ark. [109], balıklar üzerinde yaptıkları 273 pestisit etken madde ve ticari formulasyonun karşılaştırmalı toksisite çalışmaları sonucunda ticari formulasyonların % 75'inden fazlasının saf etken maddeden daha fazla toksik olmadığını belirlemişlerdir. Yine Bradbury ve ark. [110], prethroid grubu bir pestisit olan Fenvelerat'ın sıvı olarak formüle edilmiş formunun toksik etkisinde azalma olduğunu bildirmişlerdir. Bu durumun formulasyonda kullanılan çözücü maddelerin solungaç membranları ile interaksiyona girmeleri nedeni ile pestisit alımının azalmış olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Askorbik asit ya da diğer adıyla vitamin-C yaygın bir kullanım alanına sahip olan bir antioksidan maddedir. Askorbik asitin genotoksik özelliğe sahip olan maddelerin yol açtığı hasarları indirgelediği yani antigenotoksik özelliğe sahip olduğu çeşitli test sistemleri ve organizmaları kullanılarak gösterilmiştir.

Premkumar ve Bowlus [88], etkili bir oksidan olan demirin genotoksik etkilerini fare kemik iliği hücrelerinde, polikromatik eritrositlerde meydana gelen mikronükleus frekanslarını araştırarak incelemişlerdir. C3H/He farelerini önce 100mg/kg ve 300mg/kg demir içeren besinlere maruz bırakmışlardır. Ardından her iki gruba da 15mg/kg askorbik asitle birlikte, 100mg/kg ve 300mg/kg demir içerikli besinleri birlikte vermişlerdir. Çalışma sonunda 100mg/kg demir içeren gruba, 15mg/kg askorbik asit +100mg/kg demir içeren gruptaki mikronükleus frekanslarının benzer olduğunu belirlemişlerdir. 300mg/kg demir içeren gruba, 15mg/kg askorbik asit + 300mg/kg demir içeren gruplardan elde edilen veriler karşılaştırıldığında ise askorbik asitin mikronükleus frekanslarını düşürdüğünü gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak askorbik asitin demirin klastojenik etkilerine karşı koruyucu olduğunu bildirmişlerdir.

Başka bir çalışmada Ahmad ve ark. [92], 24, 48 ve 72 saat boyunca hidrokortizona maruz bırakılan insan lenfosit kültüründe, karotenoid (beta-karoten), kurkumin, askorbik asit ve flavonoid gibi bazı bitkisel ürünlerin antigenotoksik

etkisini araştırmışlardır. Askorbik asit ve kurkuminin, diğer iki antioksidanttan daha etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Surjyo ve Anisur [12], fareleri kansere neden olan % 0.06'lık p-dimetilaminoazobenzen (p-DAB) ve % 0.05'lik fenobarbital (PB) konsantrasyonlarına maruz bırakmışlardır. Ardından bu kimyasalların meydana getirdiği genotoksisite, sitotoksisite ve doku hasarlarına karşı % 1'lik askorbik asitin koruyucu etkisini araştırmışlardır. İstatistik verilerin ışığında askorbik asitin, p-DAB'ın genotoksisitesine karşı fareleri koruduğunu bildirmişlerdir.

Kaya [86], "multiple wing hairs" (mwh, 3-0,3) ve "flare" (flr, 3-38,8) genleri bakımından 3-günlük transheterozigot Drosophila larvalarını etil metansülfonat (EMS), metil metansülfonat (MMS) ve N-nitrozo N-etilüre (ENU) gibi mutajenlere maruz bıraktıktan sonra mutasyon ve rekombinasyon tekniğini kullanarak bu üç mutajenin genotoksik olduğunu bildirmiştir. Askorbik asitin tek başına uygulanması durumunda mutajenik bir etkiye yol açmadığını, yukarıda belirtilen üç mutajenle birlikte alındığında ise genotoksik etkileri azalttığını belirlemişler ve bu sonuçlar ışığında askorbik asitin antigenotoksik özelliğe sahip olduğunu bildirmiştir.

Antioksidanların kimyasalların neden olduğu mutasyonları farklı yollarla azaltabileceği belirlenmiştir. Bu yollar; 1) Elektrofilik mutajenlerin DNA üzerinde bağlanacağı alanlara bağlanırlar, 2) Oksidasyon uygulamasını durdurarak, promutajen bioaktivasyonunu inhibe ederler ve 3) Promutajenin elektrofolik metabolitleriyle reaksiyona girerler şeklinde [111].

Kaya [86], çalışmasında askorbik asit mekanizmasının bir nolu mekanizmaya göre işlediğini belirtmiştir. Yani EMS, MMS ve ENU'nun bağlanacağı yerlere askorbik asit bağlanmıştır. Yapılan diğer çalışmalarda; askorbik asitin N-nitrosa bileşenlerini, benzo(a)pyrene ve aflatoksinB1 gibi diğer mutajenlerin işlevlerini inhibe ettiği belirtilmiştir [112-113].

Bu çalışmada antigenotoksik özelliği çeşitli çalışmalarda gösterilmiş olan bir antioksidan madde olan askorbik asitin, ya da diğer adıyla vitamin C'nin, etil metan sulfonatın, trifluralinin ve Treflan'ın genotoksik etkisini düşürüp düşürmeyeceği araştırılmıştır. *Oreochromis niloticus* türü çalışılarak, bu türün antigenotoksisite test sistemlerinde de model olarak kullanılabilirliği incelenmiştir.

Balıklar askorbik asidi sentezleyemezler, dolayısıyla vitamin C'nin tek kaynağı yemdir. Bu nedenle askorbik asit balık yetiştiriciliğinde oldukça önemli yere sahip olan bir maddedir [114]. Balıklarda bu vitaminin önemli bazı fonksiyonları enzim ve hormonları oksidasyondan koruması, büyümenin düzenlenmesi, kolajen sentezi, eritrosit olgunlaşması gibi süreçlerde etkili olmaktadır. Vitamin C eksikliğinde balıklarda omurga deformasyonları (Lordosis, Skoliosis), kollajen teşkilinde bozulma, göz lezyonları, karaciğer, böbrek, ve bağırsaklarda hemoraji, renkte koyulaşma, deride hemoraji ve epitel kaybı gibi rahatsızlıklar meydana gelebilmektedir [115].

Bununla birlikte askorbik asitin balıklar üzerindeki antigenotoksik etkilerine dair yapılan çalışmalar son derece sınırlıdır.

Bibhas ve ark. [116], Hindistan'da endemik bir balık türü olan *Anabas testudineus*'da etil metan sülfonat (EMS) tarafından oluşturulan genotoksisite üzerine askorbik asit ve β -karoten uygulamasının etkilerini mikronükleus testi ve sperm baş düzensizlikleri analizini kullanarak araştırmışlardır.

Guha ve Khuda-Bukhsh [117], genotoksik etkiye sahip EMS uygulanan, *Oreochromis mossambicus* türü balıklarda askorbik asitin antigenotoksik etkilerini morfolojik nükleus düzensizlik analizi, kromozom düzensizlikleri ve sperm düzensizlikleri testlerini kullanarak incelemişlerdir.

Jiraungkoorskul ve ark. [118], kadmiyuma maruz kalan *Puntius altus* türü balıklarda askorbik asitin antigenotoksik etkisini mikronükleus ve morfolojik nükleus düzensizlik test sonuçlarını karşılaştırarak analiz etmişlerdir.

Bu çalışmada da, tek başına EMS, trifluralin ve Treflan uygulanan gruplarda gözlenen mikronükleus ve morfolojik nükleus düzensizlik frekanslarındaki artışların askorbik asit ile kombine edilerek uygulanan gruplarda anlamlı derecede düşüşe geçtiği görülmüştür. Askorbik asit tek başına uygulandığında ise kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak önemli herhangi bir genotoksisite artışına yol açmamıştır.

Genel olarak askorbik asit DNA, RNA ve proteinler gibi hücresel hedefleri maskeleyerek suretiyle mutajenlerin bu yapılara bağlanmasını engelleyerek antigenotoksik etkisini göstermektedir. Bu çalışmada da askorbik asit uygulamasının EMS tarafından oluşturulan mikronükleus frekansını düşürmesi EMS'nin direkt olarak DNA'ya bağlanmasını engellemek suretiyle gerçekleşmiş olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte askorbik asitin trifluralin ve Treflan tarafından oluşturulan mikronükleus frekanslarının azalmasını hangi mekanizma ile sağladığı konusunda kesin bir veri bulunmamaktadır. Ancak Landino ve ark. [119], askorbik asit uygulamasının in vitro olarak peroksinitrit anyonları tarafından oluşturulan tübül polimerizasyonu ile bağlantılı mikrotübül bozulmalarını normal düzeye düşürdüğünü göstermişlerdir. Benzer şekilde Pryzwansky ve ark. [120], askorbik asit uygulamasının mikrotübül polimerizasyonunu arttırdığını bildirmişlerdir. Ancak balıklarda trifluralin ve Treflan'ın mikrotübül yapılarını etkilediğine dair bir veri bulunmadığı için bu konuda ilave araştırmaların yapılması gerekmektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada öncelikle geniş alanda kullanılan bir herbisit olan trifluralinin ve ticari formülasyonu olan Treflan'ın balıklar üzerindeki genotoksik etkileri mikronükleus ve nükleus düzensizlik testi kullanılarak *Oreochromis niloticus* üzerinde incelenmiştir. Ek olarak bu maddelerin genotoksitesini üzerine askorbik asitin antijenotoksik etkisinin olup olmadığı; trifluralin, Treflan ve EMS ile askorbik asit kombinasyonlarına maruz bırakılan örnekler üzerinde mikronükleus ve nükleus düzensizlik testi kullanılarak incelenmiştir.

Çalışmada elde edilen sonuçları şöyle sıralayabiliriz;

- Trifluralin'in tüm uygulama dozu ve sürelerinde *O. niloticus* periferik eritrositlerinde mikronükleus ve nükleus düzensizlik frekanslarında önemli düzeylerde yükselmelere neden olduğu belirlenmiştir.
- Treflan'ın özellikle 10µg/L'lik dozunun 6 ve 9 günlük uygulamaları ile 5µg/L'lik dozun 9 günlük uygulamaları sonunda *O. niloticus* periferik eritrositlerinde mikronükleus frekansında anlamlı yükselmeler belirlenmiştir. Bu nedenle hem trifluralinin hem de ticari formülasyonu olan Treflan'ın balıklar üzerinde genotoksik etki gösterme potansiyeline sahip oldukları belirlenmiştir. Bununla birlikte trifluralinin genotoksik etkisinin ticari formülasyona göre yüksek olduğu görülmüştür.
- Askorbik asitin tek başına uygulandığında *O. niloticus* üzerinde herhangi bir genotoksitesine neden olmadığı, bunun aksine anlamlı olmamakla birlikte kendiliğinden varolan mikronükleus frekansında belirli bir düşüşe yol açtığı belirlenmiştir. Askorbik asitin, genotoksik etkileri gösterilmiş olan trifluralin, Treflan ve EMS ile birlikte uygulanması durumunda ise mikronükleus ve morfolojik nükleus düzensizlik frekanslarında anlamlı düşüşlere neden olduğu görülmüştür.

- Askorbik asitin genotoksik kimyasalların *O. niloticus* üzerinde oluşturduğu hasarları indirgemiş olması, diğer bir deyişle antigenotoksik etki göstermiş olması, genetik toksikoloji çalışmalarında model olarak kullanılan bu türün aynı zamanda antigenotoksisite çalışmalarında da model olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Çalışma ışığında ortaya çıkan öneriler şunlardır;

- Trifluralin'in sucul ortamlardaki genotoksik risklerinin daha iyi anlaşılabilmesi için diğer sucul canlılar üzerinde de genotoksisite çalışmaları yapılmalıdır.
- Omurgalı tübülünlerini etkilemediği için anojenik etkilere yol açmadığı öne sürülen trifluraline maruz kalan balıklarda belirlenen yüksek mikronükleus frekanslarının oluşum mekanizmalarını aydınlatacak çalışmalar yapılmalıdır.
- Su ürünleri kontrol yönetmeliğinde trifluralin herbisiti için belirtilen limit değerleri yeniden değerlendirilmelidir.
- Su kalitesi ve kirliliği değerlendirmelerinde limit değerleri belirlenirken sadece toksisite testleri değil genotoksisite testleri ve bu testlerden elde edilen veriler de yönetmelikler kapsamına alınmalıdır.
- Tarım alanlarına yakın olan sucul bölgelerden alınacak olan su örnekleri genotoksik pestisitlerin düzeyinin belirlenmesi için düzenli aralıklarla analiz edilmelidir.
- Gerekirse trifluralinin Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC: International Agency For Research on Cancer) tarafından belirtilen kanserojen potansiyeli ve hedef olmayan canlılar üzerinde yürütülen genotoksisite testlerinden elde edilen veriler göz önüne alınarak bu herbisitinin ülkemizdeki kullanımı da tümüyle yasaklanması göz önüne alınmalıdır.

- Zirai üreticiler kimyasal tarım yerine organik tarıma yönlendirilmelidir.
- Bir antioksidan olan Askorbik asitin balıklar üzerinde de antijenotoksik etkiye sahip olduğu gösterildiğinden dolayı balık yetiştiriciliğinde askorbik asitin genetik stabilite açısından sağlayacağı yararlar da değerlendirilmelidir.

KAYNAKLAR

- [1] Dağ, S.S., Aykaç, V.T., Gündüz, A., Kantarcı, M. ve Şişman, N. “Türkiyede tarım ilaçları endüstrisi ve geleceği”
ERİŞİM: <http://www.zmo.org.tr/etkinlikler/5tk02/40.pdf> 06.05.2007
- [2] Mansour, S.A. “Pesticide exposure--Egyptian scene”, *Toxicology*, **198(1-3):**91-115, (2004).
- [3] Madle, S., Von der-Hude, W., Broschinski, L. ve Janig, G. “Threshold effects in genetic toxicity: perspective of chemicals regulation in Germany”, *Mutation Research*, **464(1):**117-21, (2000).
- [4] Würgler, F.E. ve Kramers, P.G.N. “Environmental effects of genotoxins (ecogenotoxicology)”, *Mutagenesis*, **7 (5):** 321-327, (1992).
- [5] Çavaş, T. “Endüstriyel Atıkların Genotoksik Etkilerinin Mikronükleus ve AgNOR Analiz Teknikleri Kullanılarak İn-Situ ve Laboratuvar Koşulları Altında Araştırılması”, Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Çiftlikköy kampüsü, Mersin, (Ocak-2004).
- [6] Carrasco, K.R., Tilbury, K.L. ve Myers, M.S. “An assessment of the piscine micronucleus test as an in-situ biological indicator of chemical contaminant effects”, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **47:** 2723-2136, (1990).
- [7] Shimizu, N., Itoh, H., Utiyama, H. ve Wahl, G.M. “Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase”, *The Journal of Cell Biology*, **140:**1307-1320, (1998).
- [8] Guha, B. ve Khuda-Buksh, A.R. “Ameliorating effect of beta-carotene on ethylmethane sulphonate-induced genotoxicity in the fish *Oreochromis mossambicus*”, *Mutation Research.*, **542(1-2):**1-13, (2003).
- [9] Trifluralin. **ERİŞİM:** <http://www.pan-uk.org/pestnews/Actives/Triflura.htm>
- [10] IARC, “Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Volume 53. Occupational exposures in insecticide application, and some pesticides” IARC, Lyon. (1991).

- [11] Kaya, B., Creus, A., Velazquez, A., Yanikoğlu, A. ve Marcos, R. “Genotoxicity is modulated by ascorbic acid Studies using the wing spot test in *Drosophila*”, Mutation Research, **520**: 93–101, (2002).
- [12] Surjyo, B. ve Anisur, KB. “Protective action of an anti-oxidant (L-Ascorbic acid) against genotoxicity and cytotoxicity in mice during p-DAB-induced hepatocarcinogenesis”, Indian Journal of Cancer, **41(2)**: 72-80, (2004).
- [13] Muller, H.J. “Artificial transmutation of the gene”, Science, **66**:84-87, (1927).
- [14] Brusick, D. “Principles of genetic toxicology”, Plenum Press New York, USA, 284p, (1987).
- [15] “Environmental Mutagens by Dr. Michael Easton”.
ERİŞİM: <http://www.reflectiveimages.com/EnvironmentalMutagens.htm>
- [16] Waters, M.D., Stack, H.F., Brady, A.L., Lohman, P.H.M., Haroun, L. ve Vainio, H. “ Use of computerized data listings and activity profiles of genetic and related effects in the review of 195 compounds”, Mutation Research, **205**: 295-312, (1988).
- [17] Scarpato, R., Migliore, L. ve Barale, R. “The micronucleus assay in *Anadonta cygnea* for the detection of drinking water mutagenity”, Mutation Research, **245**: 231-237, (1990).
- [18] Ma, T.H. “Tredescantia micronucleus bioassay and polen tube chromatid aberration test for in situ monitoring and mutagen screening”, Environmental Health Perspective, **37**: 85-90, (1981).
- [19] Fenech, M. ve Crott, J.W. “Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay”, Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Mutation Research, **504**:131-136, (2002).
- [20] Heddle, J.A., Hite, M., Kirkhart, B., Mavourrn, K., Macgregor, J.T., Newell, G.W. ve Salamone, M.F. “The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program”, Mutation Research, **123**:61-118, (1983).

- [21] Ericson, G. ve Larsson, A. “DNA adducts in Perch (*Perca fluviatilis*) living in the coastal water polluted with bleached pulp mill effluents”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **46**: 167-173, (2000).
- [22] Sumathi, M., Kalaiselvi, K., Palanivel, M. ve Rajaguru, P. “Genotoxicity of textile dye effluent on fish (*Cyprinus carpio*) measured using the comet assay”, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **66**: 407-414, (2001).
- [23] Klinkhardt, M.B. “Fish chromosomes as sensitive toxicity indicators-possibilities and limits”, Braunbeck, T., Hanke, V. ve Segner, H. (eds) *Fish Ecotoxicology and Ecophysiology* Proceedings of an International symposium, Heidelberg, September, VCH Pres, Germany, (1991).
- [24] Ellingham, T.J., Christensen, E.A. ve Maddock, M.B. “In-vitro induction of sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of the oyster toadfish and american eel”, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **8**: 555-569, (1986).
- [25] Al-Sabti, K. ve Metcalfe, C.D. “Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water”, *Mutation Research*, **343**: 121-135, (1995).
- [26] Deguchi, Y., Toyozumi, T., Masuda, S., Yasuhara, A., Mohri, S., Yamada, M., Inoue, Y. ve Kinae, N. “Evaluation of mutagenic activities of leachates in landfill sites by micronucleus test and comet assay using goldfish”, *Mutation Research*, **627** : 178–185, (2007).
- [27] Talapatra, S.N. ve Banerjee, S.K. “Detection of micronucleus and abnormal nucleus in erythrocytes from the gill and kidney of *Labeo bata* cultivated in sewage-fed fish farms”, *Food and Chemical Toxicology*, **45**: 210–215, (2007).
- [28] Bolognesi, C., Perrone, E., Roggieri, P., Pampanin, D.M. ve Sciutto, A. “Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions”, *Aquatic Toxicology*, **78**: 93–98, (2006).
- [29] Amado, L.L., Rosa, C.E., Leite, A.M., Moraes, L., Pires, W.V., Grasiela, L., Pinho, L., Martins, C.M.G., Robaldo, R.B., Nery, L.E.M., Monserrat, J.M., Bianchini, A., Martinez, P.E. ve Geracitano, L.A. “Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei:Sciaenidae) from polluted and non-polluted

- areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): Evidences of genotoxic and immunological effects ”, *Marine Pollution Bulletin*, **52** : 199–206, (2006).
- [30] Amado, L.L., Robaldo, R.B., Geracitano, L., Monserrat, J.M. ve Bianchini, A. “Biomarkers of exposure and effect in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae) from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil)”, *Marine Pollution Bulletin*, **52**: 207–213, (2006).
- [31] Schiedek, D., Broeg, K., Barsiene, J., Lehtonen, K.K., Gercken, J., Pfeifer, S., Vuontisjärvi, H., Vuorinen, P.J., Dedonyte, V., Koehler, A., Balk, L. ve Schneider, R. “ Biomarker responses as indication of contaminant effects in blue mussel (*Mytilus edulis*) and female eelpout (*Zoarces viviparus*) from the southwestern Baltic Sea”, *Marine Pollution Bulletin.*, **53(8-9)**: 387-405, (2006).
- [32] Gustavino, B., Buschini, A., Monfrinotti, M., Rizzoni, M., Tancioni, L., Poli, P. ve Rossi, C. “ Modulating effects of humic acids on genotoxicity induced by water disinfectants in *Cyprinus carpi* ”, *Mutation Research*, **587**: 103–113, (2005).
- [33] Çavaş, T. ve Ergene-Gözükara, S. “ Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents ”, *Aquatic Toxicology*, **74**: 264–271, (2005).
- [34] Arkhipchuk, V.V. ve Garanko, N.N. “Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fishfin cells ”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **62**: 42–52, (2005).
- [35] Wirzinger, G., Weltje, L., Gercken, J. ve Sordyl, H. “ Genotoxic damage in field-collected three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.): A suitable biomonitoring tool? ”, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **628(1)**: 19-30, (2007).
- [36] Pacheco, M. ve Santos, M.A. “Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in the erythrocytes of *Anguilla anguilla* L. exposed either to cyclophosphamide or to bleached kraft pulp mill effluent”, *Fresenius Environmental Bulletin*, **5**: 746-751, (1996).
- [37] Marlasca, J., Sanpera, C., Riva, M.C., Sala, R. ve Crespo, S. “Hepatic tissue alterations and induction of micronuclei in rainbow trout (*Oncorhynchus*

- mykiss*) exposed to textile mill effluent”, *Histology and Histopathology*, **13**: 703-712, (1998).
- [38] Odeigah, P.G.C. ve Osanyipeju, A.O. “Genotoxic effects of two industrial effluents and ethyl methane sulphonate in *Clarias lazera*”, *Food and Chemical Toxicology*, **33**: 501-505, (1995).
- [39] Vigano, I., Arillo, A., Falugi, C., Melodia, F. ve Polesello, S. “Biomarkers of exposure and effect in flounder (*Platichthys flesus*) exposed to sediments of the adriatic sea”, *Marine Pollution Bulletin*, **42**: 887-894, (2001).
- [40] Hayashi, M., Ueda, T., Uyeno, K., Wada, K., Kinae, N., Saotome, K., Tanaka, N., Takai, A., Sasaki, Y.F., Asano, N., Sofuni, T. ve Ojima, Y. “Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms”, *Mutation Research*, **399(2)**:125-33, (1998).
- [41] Kohlpoth, M., Rusche, B. ve Nüsse, M. “Flow cytometric measurement of micronuclei in a permanent fish cell line as a possible screening test for the genotoxicity of industrial waste waters”, *Mutagenesis*, **14**: 397-402, (1999).
- [42] Delen, N., Durmuşoğlu, E., Güncan, A., Güngör, N., Turgut, C. ve Burçak, A. “Türkiye’de pestisit kullanımı, kalıntı ve organizmalarda duyarlılık azalışı sorunları” Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongre.
ERİŞİM: <http://www.agr.ege.edu.tr/~guncan/pdf/2005tzmtk.pdf> 06.04.2007
- [43] Tuncer, E. “Tarımsal ilaçların çevre kirliliği üzerine etkileri ve alınması gereken önlemler”, T.C. Tarım Bakanlığı Zirai Mücadele ve Karantina Genel Müd. Basılmamış seminer notları, Sivas, 5s., (1987).
- [44] Toros, S. ve S. Maden. “Tarımsal Savaşım Yöntem ve İlaçları”, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yay. No: 1222, Ders Kitabı No: 352, Ankara, (1991).
- [45] Lloyd R. “Pollution and freshwater fish”, Fishing News Books, Oxford, UK., pp. 192., (1992).
- [46] Majewski, M.S. ve Capel, P.D. “Pesticides in the atmosphere-distribution, trends, and governing factors”, Ann Arbor Press, Inc., Chelsea, Michigan, 228 p., (1995).
- [47] Kocataş, “Ekoloji ve Çevre Biyolojisi”, Ege Üniv., Su Ürünleri Fak. Yayınları, No:51.V. Baskı, Bornova-İzmir, Sayfa:442-443, (1991).

- [48] Mayon, N., Bertrand, A., Leroy, D., Malbrouck, C., Mandiki, S.N.M., Silvestre, F., Goffart, A., Thomé, J.P. ve Kestemont, P. “Multiscale approach of fish responses to different types of environmental contaminations: A case study”, *Science of the Total Environment*, **367**: 715–731, (2006).
- [49] Moraes, B.S., Loro, V.L., Gluszczak, L., Pretto, A., Menezes, C., Marchezan, E. ve Machado, S.O. “Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*)”, [doi:10.1016/j.chemosphere.2007.03.006](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.03.006)
- [50] Fatima, M., Mandiki, S.N.M., Douxfils, J., Silvestre, F., Coppe, P. ve Kestemont, P. “Combined effects of herbicides on biomarkers reflecting immune–endocrine interactions in goldfish Immune and antioxidant effects”, *Aquatic Toxicology*, **81**: 159–167, (2007).
- [51] Tierney, K.B., Singh, C.R., Ross, P.S. ve Kennedy, C.J. “Relating olfactory neurotoxicity to altered olfactory-mediated behaviors in rainbow trout exposed to three currently-used pesticides”, *Aquatic Toxicology*, **81**: 55–64, (2007).
- [52] Abul Farah, M., Ateeq, B., Niamat Ali, M. ve Ahmad, W. “Evaluation of genotoxicity of PCP and 2,4-D by micronucleus test in freshwater fish *Channa punctatus*”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **54**: 25–29, (2003).
- [53] Ateeq, B., Abul Farah, M., Ahmad, W. “Detection of DNA damage by alkaline single cell gel electrophoresis in 2,4-dichlorophenoxyacetic-acid- and butachlor-exposed erythrocytes of *Clarias batrachus*”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **62**: 348–354, (2005).
- [54] Neuparth, T., Bickham, W., Theodorakis, W., Costa, F.O. ve Costal, M.H. “Endosulfan-Induced Genotoxicity Detected in the Gilthead Seabream, *Sparus aurata* L., by Means of Flow Cytometry and Micronuclei Assays”, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **76**: 242-248, (2006).
- [55] Pandey, S., Nagpure, N.S., Kumar, R., Sharma, S., Srivastava, S.K. ve Verma, M.S. “Genotoxicity evaluation of acute doses of endosulfan to freshwater teleost *Channa punctatus* (Bloch) by alkaline single-cell gel electrophoresis”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **65**: 56–61, (2006).
- [56] Martinez-Tabche, L., Madrigal-Bujaidar, E. ve Negrete, T. “Genotoxicity and Lipoperoxidation Produced by Paraquat and 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in

- the Gills of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mikiss*)”, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, **73**: 146–152, (2004).
- [57] Whitehead, A., Kuivila, K.M., Orlando, J.L., Kotelevtsev, S. ve Anderson, S.L. “Genotoxicity in native fish associated with agricultural runoff events”, Environmental Toxicology Chemistry., **23(12)**: 2868-77, (2004).
- [58] Ahmad, W., Ali, M.N., Farah, M.A. ve Ateeq, B. “Computerized automated morphometric assay including frequency estimation of pentachlorophenol induced nuclear anomalies (micronucleus) in catfish *Heteropneustes fossilis*”, Chromosoma., **110(8)**: 570-4, (2002).
- [59] Campana, M.A., Panzeri, A.M., Moreno, V.J. ve Dulout, F.N. “Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish *Cheirodon interruptus interruptus*”, Mutation Research, **438(2)**: 155-61, (1999).
- [60] “Trifluralin in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality”, Health criteria and other supporting information, World Health Organization, (1996).
- [61] Kidd, H. ve James, D.R. “The Agrochemicals Handbook, Third Edition. Royal Society of Chemistry Information Services”, Cambridge, UK, Sayfa:10-12, (1991).
- [62] Patterson, A.S.M. “Trifluralin Analysis of Risks to Endangered and Threatened Pacific Salmon and Steelhead”, Ph.D. Environmental Field Branch Office of Pesticide Programs, (2004).
- [63] Kaya, B., Marcos, R., Yanikoglu, A. ve Creus, A. “Evaluation of the genotoxicity of four herbicides in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* using two different strains” Mutation Research, **557(1)**: 53-62, (2004).
- [64] Gebel, T., Kevekordes, S., Pav, K., Edenharder, R. ve Dunkelberg, H. “In vivo genotoxicity of selected herbicides in the Mouse bone-marrow micronucleus test”, Archivs of Toxicology., **71(3)**: 193-7, (1997).
- [65] Ribas, G.J.S., Carbonell, E.N.X, Creus, A. ve Marcos, R. “Genotoxic evaluation of the herbicide trifluralin on human lymphocytes exposed *in vitro*”, Mutation Research, **371**: 15–21, (1996).

- [66] Pilinskaia, M.A. "Evaluation of the cytogenetic effect of the herbicide treflan and of a number of its metabolites on mammalian somatic cells", *Tsitologia Genetica*, **21(2)**: 131-5, (1987).
- [67] Nehez, M., Paldy, A., Selypes, A., Körösfalvi, M., Lorinczi, I.L. ve Berencsi, G. "The mutagenic effect of trifluralin-containing herbicide on mouse germ cells *in vivo*", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **4(3)**: 263-6, (1980).
- [68] Kale, P.G., Petty, B.T., Walker, S., Ford, J.B., Dehkordi, N., Tarasia, S., Tasie, B.O., Kale, R. ve Sohni, Y.R. "Mutagenicity testing of nine herbicides and pesticides currently used in agriculture", *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **25(2)**:148-53, (1995).
- [69] Shahin, S.A. ve El-Zahrani, N.H. "Cytogenetic Studies on *Vicia faba* Using Some Herbicides Commonly Usel in Saudi Arabia", *Journal of King Abdulaziz University Sciences* **5**: 15-24, (1993).
- [70] Hess, D. ve Bayer, D. "The effects of trifluralin on the ultrastructure of dividing cells of the root meristem of cotton (*Gossypium hirsutum* L.)" *Journal of Cell Sciences* **15**: 429-441, (1974).
- [71] Ribas, G., Surralles, J., Carbonell, E., Xamena, N., Creus, A. Ve Marcos, R. "Genotoxic evaluation of the herbicide trifluralin on human lymphocytes exposed *in vitro*", *Mutation Research*, **371(1-2)**: 15-21, (1996).
- [72] Grant, W.F. ve Owens, E.T. "Chromosome aberration assays in *Pisum* for the study of environmental mutagens", *Mutation Research*, **188**: 93–118, (2001).
- [73] Wu, T.P. "Some cytological effects of treflan and mitomycin C on root tips of *Vicia faba*", *Taiwania*, **17**: 248–254, (1972).
- [74] Ghiazza, G., Zavarise, G., Lanero, M. ve Ferraro, G. "Sister chromatid exchanges induced in human lymphocyte chromosomes by trifluralin, atrazine and simazine", *Bollettino Della Societa Italiana di Biologia Sperimentale*, **11**:2149-2153, (1984).
- [75] Kohlmeier, L., Simonsen, N. ve Mottus, K. "Environmental Health Issues", *Environmental Health Perspectives Supplements*, (1995).
ERİŞİM: <http://www.ehponline.org/members/1995/Suppl-8/kohl-full.html>
- [76] Kuroda, Y. "Antimutagenesis studies", *Basic Life Sciences: Antimutagenesis and Anticarsinogenesis Mechanisms*, **52**: 1-22, (1990).

- [77] Ferguson, L.R. "Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet", *Mutation Research*, **307**: 395-410, (1994).
- [78] Soffler, C. "Oxidative stres", *The Veterinary clinics of North America, Equine practice.*, **23(1)**:135-57, (2007).
- [79] Somogyi, A., Rotsa, K., Pusztai, P., Tulassay, Z. ve Nagy, G. "Antioxidant measurements", *Physiological Measurements.*, **28(4)**:R41-55, (2007).
- [80] Hartman, P.E. ve Shankel, D.M. "Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules", *Environmental Molecular Mutagenesis*, **15**: 145-182, (1990).
- [81] Collins, A.R. "Oxidative DNA damage, antioxidants and cancer", *BioEssays.*, **21**: 238-246, (1999).
- [82] Susan, J.D., Ross, M. ve Collins, A.R. "The influence of smoking and diet on the hypoxanthine phosphoribosyltransferase (hprt) mutant frequency in circulating T lymphocytes from a normal human population", *Mutation Research.*, **331**: 55-64, (1995).
- [83] Panda, B.B., Subhadra, A.V. ve Panda, K.K. "Prophylaxis of antioxidant against the genotoxicity of methyl mercuric chloride and maleic hydrazide in allium micronucleus assay", *Mutation Research.*, **343**: 75-84, (1995).
- [84] Graf, U., Abraham, S.K. ve Guzman-Rincon J, et. al. "Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*", *Mutation Research.*, **402**: 203-209, (1998).
- [85] Konopacka, M., Widel, M., Rzeszowska-Wolnyl, J. " Modifying effects of vitamin C, E and beta-carotene against gamma-ray induced DNA damage in mouse cells", *Mutation Research.*, **417**: 85-94, (1998).
- [86] Kaya, B. "Anti-Genotoxic Effect of Ascorbic Acid on Mutagenic Dose of Three Alkylating Agents", *Turkish Journal of Biology*, **27**: 241-246, (2003).
- [87] Panda, B.B., Subhadra, A.V. ve Panda, K.K. "Prophylaxis of antioxidants against the genotoxicity of methyl mercuric chloride and maleic hydrazide in Allium micronucleus assay", *Mutation Research*, **343(2-3)**: 75-84, (1995).
- [88] Premkumar, K. ve Bowlus, C.L. "Ascorbic acid reduces the frequency of iron induced micronuclei in bone marrow cells of mice", *Mutation Research*, **542(1-2)**: 99-103, (2003).

- [89] Siddique, Y.H., Beg, T. ve Afzal, M. “Antigenotoxic effects of ascorbic acid against megestrol acetate-induced genotoxicity in mice”, *Human Experimental Toxicology*, **24(3)**:121-7, (2005).
- [90] Misra, S. ve Choudhury, R.C. “Vitamin C modulation ayarlama değiştirme of cisplatin-induced cytogenotoxicity in bone marrow, spermatogonia and its transmission taşınma nakil in the male germline of Swiss mice”, *Journal of Chemotherapy*, **18(2)**:182-7, (2006).
- [91] Gajecka, M., Kujawski, L.M., Gawecki, J. ve Szyfter, K. “The protective effect of vitamins C and E against B(a)P-induced genotoxicity in human lymphocytes”, *J Environmental Pathology Toxicology Oncolog.*, **18(3)**:159-67, (1999).
- [92] Ahmad, M.S., Sheeba ve Afzal, M. “Amelioration of genotoxic damage by certain phytoproducts in human lymphocyte cultures”, *Chemico-Biological Interactions*, **149(2-3)**:107-15, (2004).
- [93] Aly, F.A. ve Donya, S.M. “In vivo antimutagenic effect of vitamins C and E against rifampicin-induced chromosome aberrations in mouse bone-marrow cells”, *Mutation Research*, **518(1)**:1-7,(2002).
- [94] Ergene, S., Kaya, F., Pekcan, I. ve Oral, A. “ A Karyological analysis of *Oreochromis niloticus* L., 1758 (Pisces, Cichlidae) used in aquaculture”, Celikkale, M.S.,Duzgunes, E., Okumus, I. ve Mutlu, C., The Proceedings of the First International Symposium on Fisheries and Ecology: (FISHECO, 98), Trabzon, Turkey, Sayfa:191–195, (1998).
- [95] Cavas, T. ve Ergene Gozukara, S. “Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent”, *Mutation Research.*, **538(1-2)**:81-91, (2003).
- [96] Eli, A. (16 Ocak 2007) *Oreochramis niloticus*’un sistematiği,
ERİŞİM: <http://www.fishbase.org/Summary/SpeciesSummary.php?id=2>
[19 Nisan 2007].
- [97] Tarım ve Kőyiřleri Bakanlığı, Su Őrőnleri Yőnetmelięi, Resmi Gazete, Sayı: 22223, 10 Mart, (1995).

- [98] Çavaş, T. ve Ergene-Gözükara, S. “ evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cell”, *Mutation Research*, **534(1-2)**: 93-9, (2003).
- [99] Çavaş, T. ve Konen, S. “Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay”, *Mutagenesis*, (2007).
- [100] Marin-Morales, M.A., Mazzeo, D.E.C. ve Fernandes, T.C.C. “Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide”, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, doi:10.1016/j.pestbp.2006.12.003
- [101] Morrissette, N.S., Mitra, A., Sept, D. ve Sibley, L.D. “Dinitroanilines bind alpha-tubulin to disrupt microtubules”, *Molecular Biology of the Cell*, **15(4)**: 1960-1968, (2004).
- [102] Downing, K.H. ve Nogales, E. “Tubulin and microtubule structure”, *Current Opinions Cell Biology.*, **10**: 16–22, (1998).
- [103] Pavlica, M. ve Papes, D. “Trifluralin and thiram cause aneugenic effect in root-tip cells of shallot (*Allium ascalonicum auct.*)”, *Acta Biologica* ,**19**:p2, (1997).
- [104] Chan, M.M., Grogl, M., Chen, C.C., Bienen, E.J. ve Fong, D. “Herbicides to curb human parasitic infections: *in vitro* and *in vivo* effects of trifluralin on the trypanosomatid protozoans”, *Proceedings National Academy of Sciences USA*, **90**: 5657–5661, (1993).
- [105] Doull, J., Klaassen, C.D. ve Amdur, M.O. “Factors influencing toxicology”, *Toxicology: The basic science of poisons*, (1980).
- [106] Pickering, Q.H., Henderson, C. ve Lemke, A.E. “The toxicity of organic phosphorus insecticides to different species of warm water fishes”, *Transactions American Fisheries Society.*, **91**:175-184,(1962).
- [107] Hiltibran, R.C. “Effects of some herbicides on fertilized fish eggs and fry”, *Transactions American Fisheries Society.*, **96**:414-416, (1967).
- [108] Mayer F.L. ve Ellersieck, M.R. “Manual of Acute Toxicity: Interpretation and Data Base for 410 Chemicals and 66 Species of Freshwater Animals”, United

States Department of the Interior, U.S. Fish and Wildlife Service, Resource Publication 160, (1986).

- [109] Schmuck, R., Pflüger, W., Grau, R., Hollihn, U. ve Fischer, R. “Comparison of Short-Term Aquatic Toxicity: Formulation vs Active Ingredients of Pesticides”, *Archives of Environmental Contamination Toxicology.*, **26**:240-250,(1994).
- [110] Bradbury, S.P., Coats, J.R. ve McKim, J.M. “Differential toxicity and uptake of two fenvalerate formulations in fathead minnows (*Pimephales promelas*)”, *Environmental Toxicology Chemistry.*, **4**:533-541, (1985).
- [111] Goncharova, R.I. ve Kuzhir, T.D. “A comparative study of the antimutagenic effects of antioxidants on chemical mutagenesis in *Drosophila melanogaster*”, *Mutation Research*, **214**: 257-265, (1989).
- [112] Khudoley, V., Malaveille, C. ve Bartsch, H. “Mutagenicity studies in *Salmonella typhimurium*. On some carcinogenic N-nitramines in vitro and in the host-mediated assay in rats”, *Cancer Research*, **41**: 3205-3210, (1981).
- [113] Rains, V. ve Gurtoo, H.L. “Effects of vitamin A, C and E on aflatoxin-B induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA100”, *Teratogenesis Carcinogenesis*, **A5**: 29-40, (1985).
- [114] Ibiyo, L.M., Madu, C.T., Eze, S.S. “Effects of vitamin C supplementation on the growth of *Heterobranchus longifilis* fingerlings”, *Archives of Animal Nutrition.*, 60(4):325-32, (2006).
- [115] Halliwell, B. “Vitamin C and genomic stability”, *Mutat Res.*, **475**: 29- 35, (2001).
- [116] Guha, B., Das, J.K. ve Khuda-Bukhsh, A.R. “Ameliorative effects of vitamin supplementation on ethyl methane sulphonate-induced genotoxicity in a fish, *Anabas testudineus*”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, (2006).
- [117] Guha, B. ve Khuda-Bukhsh, A.R. “Efficacy of vitamin-C (L-ascorbic acid) in reducing genotoxicity in fish (*Oreochromis mossambicus*) induced by ethyl methane sulphonate”, *Chemosphere*, **47**: 49–56, (2002).
- [118] Jiraungkoorskul, W., Shaphong, S., Kosai, P. ve Kim, M.H. “Micronucleus Test:The Effect of AscorbicAcid on Cadmium Exposure in fish (*Puntius altus*)”, *Research Journal of Environmental Toxicology*, **1(1)**: 27-36, (2007)

- [119] Landino, L.M., Koumas, M.T., Mason, C.E. ve Alston, J.A. “Ascorbic Acid reduction of microtubule protein disulfides and its relevance to protein S-nitrosylation assays”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **340**: 347-352, (2006).
- [120] Pryzwansky, K.B., Schliwa, M. ve Boxer, L.A. “Microtubule Organization of Unstimulated and Stimulated Adherent Human Neutrophils in Chediak-Higashi Syndrome”, *Blood*, **66(6)**: 1398-1403, (1985).

ÖZGEÇMİŞ

15 Nisan 1983 yılında Mersin’de doğdu. 2000 yılında Tarsus Cengiz Topel Lisesinden, 2004 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji bölümünden mezun oldu. 2005 yılında Mersin Üniversitesi, Fen Bilimler, Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı. Halen aynı bölümde yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.

Yayımları:

Çavaş, T. ve **Konen, S.** “Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay”, *Mutagenesis*, (2007)
doi:10.1093/mutage/gem012