

154992

**ENDÜSTRİYEL ATIKLARIN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN  
MİKRONÜKLEUS TESTİ VE AgNOR ANALİZ TEKNİKLERİ  
KULLANILARAK İN-SİTU VE LABORATUVAR  
KOŞULLARI ALTINDA ARAŞTIRILMASI**

**TOLGA ÇAVAŞ**

**Mersin Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Biyoloji  
Ana Bilim Dalı**

**DOKTORA TEZİ**

**Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Serap ERGENE-GÖZÜKARA**

**MERSİN  
OCAK – 2004**

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 Doktora Tezi olarak kabul ediyoruz.

Tez Danışmanı

**Doç. Dr. Serap ERGENE GÖZÜKARA**

Jüri Üyesi

**Prof. Dr. Mustafa KURU**

Jüri Üyesi

**Prof. Dr. Gürkan EKİNGEN**

Jüri Üyesi

**Doç. Dr. M. Emin ERDAL**

Jüri Üyesi

**Doç. Dr. Yasemin KAÇAR**

Bu tezin Fen Bilimleri Enstitüsü yazım kurallarına uygun olarak yazıldığı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 23.10.2024 tarih ve 2024.102-140 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, endüstriyel atıkların genotoksik etkileri mikronükleus testi ve interfaz AgNOR analiz teknikleri kullanılarak in-situ ve laboratuvar koşulları altında araştırılmıştır. Petrol rafinerisi ve krom sanayi tesislerinden alınan atık örneklerinin etkileri laboratuvar koşulları altında incelenmiştir. İn-situ çalışmalar ise iki kirli (Karaduvar ve Mersin Limanı) ve göreceli olarak daha temiz bir bölgede (Erdemli), dört farklı mevsimde gerçekleştirilmiştir. Model test organizması olarak laboratuvar çalışmaları için *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae), in-situ çalışmalar için de *Mugil cephalus* (Pisces: Mugilidae) seçilmiştir. Mikronükleus analizleri periferik eritrositler ve solungaç epitel hücreleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Mikronükleus yanında eritrositlerde binükleus, loblu, tomurcuklu ve çentikli nükleus gibi çeşitli anomaliler de analiz edilmişlerdir. İnterfaz AgNOR analizleri ise (heteromorfik çift nükleolus yüzdesi, hücre başına düşen nükleolus sayısı ve tek nükleolus hacmi) kuyruk epitel hücreleri üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Laboratuvar çalışmaları sonucunda, krom sanayi atıklarının yalnızca en yüksek konsantrasyon ve uygulama süresinde genotoksik etkisinin olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında petrol rafinerisi atığının krom sanayi atığına göre çok daha yüksek oranda genotoksik potansiyele sahip olduğu gözlenmiştir. İn-situ analizlerde Karaduvar ve Mersin Limanından yakalanan örneklerdeki mikronükleus ve nükleus anomali frekanslarının, referans bölge olan Erdemli'den yakalanan örneklere oranla çok daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında, interfaz AgNOR parametrelerine ait değerlerin kirli bölgelerden yakalanan örneklerde daha yüksek olduğu saptanmıştır. Mevsimsel analizlerde ise, incelenen anomali frekanslarının yaz mevsiminde en yüksek, kış mevsiminde ise en düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir. Balıklarda interfaz AgNOR parametrelerinin in-situ toksisite analizinde kullanımı ilk kez bu çalışmada gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada elde edilen bulgular AgNOR analizlerinin, özellikle mikronükleus ve nükleus anomalileri testleri ile kombine edildiğinde, gerek laboratuvar gerekse in-situ çalışmalarda kullanışlı bir test yöntemi olduğu gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Endüstriyel atıklar, genotoksisite, mikronükleus testi, nükleus anomalileri, AgNOR'lar, *Mugil cephalus*, *Oreochromis niloticus*.

## ABSTRACT

In this study, genotoxic effects of industrial effluents were investigated using the micronucleus test and interphase AgNOR analysis methods, under both in-situ and laboratory conditions. Effects of effluents obtained from a petroleum refinery and a chromium industry plant, were investigated under laboratory conditions. In-situ analyses were carried out on two polluted (Karaduvar and Mersin Harbour) and a relatively clean reference area (Erdemli), at four different seasons. *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae) for laboratory studies and *Mugil cephalus* (Pisces: Mugilidae) for in-situ studies, were selected as model test organisms. Micronuclei analyses were performed on perihel erythrocytes and on gill epithelial cells. In addition to micronuclei, some other nuclear abnormalities such as binuclei, lobbed, blebbed and notched nuclei, were also analysed on peripheral erythrocytes.

As a result of laboratory studies, it was determined that chromium industry effluents cause genotoxic effects only at the highest concentration and exposure duration. On the other hand, it was determined that genotoxic potential of petroleum effluents has considerably higher when compared to chromium industry effluents. In-situ analyses have shown that the frequencies of micronuclei and other nuclear abnormalities in specimens obtained from Karaduvar and Mersin Harbour, were much more higher than that of the samples obtained from Erdemli. Furthermore, interphase AgNOR parameters were found to be higher in polluted areas than in clean area. Seasonal analyses have shown that the frequencies of abnormalities appeared at higher values in summer season and lower values in winter season. This is the first study concerning the use of fish AgNOR parameters in assessment of in-situ toxicity. Results of this study have shown that AgNOR analysis is a useful biomarker in assessment of toxicity under both field and laboratory conditions, especially when combined with the micronucleus and nuclear abnormality tests.

**Key Words:** Industrial effluents, genotoxicity, micronucleus test, nuclear abnormalities, AgNORs, *Mugil cephalus*, *Oreochromis niloticus*.

## TEŞEKKÜR

Akademik alıŐmalarım sűresince yardımlarını esirgemeyen deęerli danıŐman hocam Do. Dr. Serap ERGENE GÖZÜKARA'ya yakın ilgi, anlayıŐ ve desteęinden dolayı teŐekkűr ederim. Ayrıca alıŐmalarımın ve sonuçların deęerlendirilmesinde gűrűŐ ve űnerilerinden yararlandıęım sayın Prof. Dr. Gűrkan EKİNGEN'e, ve Doç. Dr. Emin ERDAL'a teŐekkűr ederim.

Ukrayna A.V. DUMANSKY Institute of Water and Colloid Chemistry'de AgNOR analizleri űzerine yűrűttűęűm çalıŐmalar esnasındaki destek ve yardımlarından dolayı Dr. Victor ARKHIPCHUK ve Dr. Mariya MALINOVSKA'ya ve tűm çalıŐma arkadaŐlarımın teŐekkűr ederim.

ÇalıŐmalarım sűresince maddi ve manevi destekleri ile daima arkamda olan sevgili Aileme teŐekkűrű borç bilirim.

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
2.1. GENETİK TOKSİKOLOJİ.....	4
2.2. DENİZ ORTAMINDA GENOTOKSİK MADDELER.....	6
2.1.1. Doğa Kökenli Maddeler.....	4
2.1.2. Antropojenik Kökenli Maddeler.....	5
2.2.3. Endüstriyel Atıklar.....	8
2.3. DENİZ ORTAMINA GİREN KİRLİTİCİLERİN DEĞİŞİMLERİ.....	9
2.4. AKDENİZDE KİRLİLİK.....	11
2.5. GENOTOKSİKOLOJİK ANALİZ YÖNTEMLERİ.....	9
2.5.1 Genotoksisite Testlerinde Model Organizma Olarak Balıklar.....	15
2.5.2. Mikronükleus Testi.....	16
2.5.3. Nükleus anomalileri.....	23

2.5.4. Nükleolus.....	27
2.5.4.1. Nükleolus organizatör bölgeler (NOR'lar).....	29
2.5.4.2. AgNOR'lar.....	30
2.5.4.3. İnterfaz AgNOR'ları ve hücresele aktivite.....	31
2.5.4.4. Toksisite indikatörü olarak AgNOR'lar.....	33
<b>3. MATERYAL ve METOT.....</b>	<b>36</b>
3.1. LABORATUVAR ÇALIŞMALARI.....	37
3.2. IN-SITU ARAZİ ÇALIŞMALARI.....	37
3.3. DENEYLERİN YAPILIŞI.....	40
3.3.1. Mikronükleus Analizleri.....	40
3.3.1.1. Periferale eritrositlerde mikronükleus testi.....	40
3.3.1.2. Solungaç epitel hücrelerinde mikronükleus testi.....	40
3.3.1.3. Mikronükleus sayım kriterleri.....	40
3.3.2. Nükleus Anomalileri Analizi.....	41
3.3.3. İnterfaz AgNOR Analizleri.....	42
3.3.3.1. Kuyruk epitel hücrelerinin preparasyonu.....	42
3.3.3.2. Gümüş boyama yöntemi.....	43
3.3.3.3. İncelenen AgNOR parametreleri.....	44
3.3.4. İstatistik Analizler.....	45
<b>4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....</b>	<b>46</b>
4.1. BULGULAR.....	46
4.1.1. Kontrollü Laboratuvar Çalışmaları .....	46
4.1.1.1. Krom fabrikası atıklarının genotoksik etkileri.....	46
4.1.1.2. Petrol rafinerisi atıklarının genotoksik etkileri.....	51

4.1.2. İn Situ Çalışmalar.....	58
4.2. TARTIŞMA.....	70
4.2.1. Kontrollü laboratuvar çalışmaları.....	70
4.2.1.1. Krom fabrikası atıklarının genotoksik etkileri.....	70
4.2.1.2. Petrol rafinerisi atıklarının genotoksik etkileri.....	74
4.2.2. İn Situ Çalışmalar.....	77
<b>5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....</b>	<b>85</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>88</b>
<b>EK. Farklı balık türlerinde ve dokularında, in-situ ve laboratuvar şartları altında yapılan mikronükleus analizleri.....</b>	<b>105</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>108</b>



## ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE	SAYFA
Çizelge 2.1. IARC verilerine göre karsinojen maddelerin sınıflandırılması.....	7
Çizelge 2.2. Deniz ortamında bulunan çeşitli karsinojenlerin gruplandırılması.....	8
Çizelge 4.1. Krom fabrikası endüstriyel arıtma çıkış suyu analiz değerleri.....	46
Çizelge 4.2. Krom fabrikası atıklarına maruz bırakılan <i>O. niloticus</i> eritrosit ve solungaç epitel hücrelerinde mikronükleus frekansları.....	48
Çizelge 4.3. Krom fabrikası atığına maruz bırakılan <i>O. niloticus</i> eritrositlerinde nükleus anomalileri .....	49
Çizelge 4.4. Krom fabrikası atığına maruz bırakılan <i>O. niloticus</i> kuyruk epitel hücrelerinde belirlenen interfaz AgNOR parametreleri.....	51
Çizelge 4.5 . Petrol rafinerisi atık suyu analiz değerleri.....	52
Çizelge 4.6. Petrol rafinerisi atıklarına maruz kalan <i>O. niloticus</i> eritrosit ve solungaç epitel hücrelerinde mikronükleus frekansları.....	55
Çizelge 4.7. Petrol rafinerisi atığına maruz bırakılan <i>O. niloticus</i> eritrositlerinde nükleus anomalileri .....	56
Çizelge 4.8. Petrol rafinerisi atığına maruz bırakılan <i>O. niloticus</i> kuyruk epitel hücrelerinde interfaz AgNOR parametreleri.....	58
Çizelge 4.9. <i>Mugil cephalus</i> eritrositlerinde ve solungaç hücrelerinde belirlenen mikronükleus frekanslarının bölge ve mevsime göre değişimi.....	59
Çizelge 4.10. <i>Mugil cephalus</i> eritrosit ve solungaç hücreleri arasındaki toplam mikronükleus frekanslarında görülen farklılıklar.....	59
Çizelge 4.11. <i>Mugil cephalus</i> örneklerinde eritrosit mikronükleus frekanslarının mevsimsel farklılıkları.....	61

<b>Çizelge 4.12.</b> <i>Mugil cephalus</i> örneklerinde solungaç mikronükleus frekanslarının mevsimsel farklılıkları.....	<b>61</b>
<b>Çizelge 4.13.</b> <i>Mugil cephalus</i> eritrositlerinde toplam nükleus anomalileri.....	<b>62</b>
<b>Çizelge 4.14.</b> <i>Mugil cephalus</i> örneklerinde belirlenen nükleus anomalileri.....	<b>63</b>
<b>Çizelge 4.15.</b> <i>Mugil cephalus</i> örneklerinde toplam nükleus anomali frekansların mevsimlere göre gösterdikleri istatistiksel farklılıklar.....	<b>63</b>
<b>Çizelge 4.16.</b> <i>Mugil cephalus</i> kuyruk epitel hücrelerinde belirlenen interfaz AgNOR parametreleri.....	<b>66</b>
<b>Çizelge 4.17.</b> <i>Mugil cephalus</i> örneklerinde toplam interfaz AgNOR parametrelerinde mevsimlere göre gözlenen istatistiksel farklılıklar.....	<b>68</b>
<b>Çizelge 4.18.</b> Farklı mevsimlerde yakalanan <i>Mugil cephalus</i> örneklerinde belirlenen toplam interfaz AgNOR parametrelerinde bölgelere göre gözlenen istatistiksel farklılıklar.....	<b>68</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL	SAYFA
Şekil 2.1. Genotoksik maddelerin etkileşim yolları ve olası sonuçları.....	5
Şekil 2.2. Genotoksisite testlerinde kullanılan canlı tiplerinin dağılımı.....	13
Şekil 2.3. Balıkların model organizma olarak genotoksisite testlerindeki yeri.....	16
Şekil 2.4. Mikronükleus taşıyan bir hücrenin oluşum aşamaları.....	18
Şekil 2.5. Mikronükleus oluşumuna yol açabilen kromozom anomalileri.....	19
Şekil 2.6. Balıklarda mikronükleus testi ile ilgili makalelerin sayısının dağılımı.....	20
Şekil 2.7. Gen amplifikasyonu ve KBK siklusu ile nükleus tomurcuklanması.....	26
Şekil 2.8. Yüksek ökaryotik organizmalarda nükleolus yapısı.....	28
Şekil 3.1. İn-situ çalışmaların yapıldığı örnekleme istasyonları.....	39
Şekil 3.2. Periferel eritrositlerde mikronükleus ve nükleus anomalileri.....	42
Şekil 3.3. İnterfaz AgNOR parametrelerinin şematik olarak gösterimi.....	45
Şekil 3.4. İnterfaz AgNOR parametrelerinin mikroskopik görüntüsü (1000x).....	45
Şekil 4.1. <i>O.niloticus</i> eritrositlerinde mikronükleus ve nükleus anomalileri.....	54
Şekil 4.2. <i>O.niloticus</i> solungaç hücrelerinde mikronükleus oluşumları.....	54
Şekil 4.3. <i>M. cephalus</i> eritrositlerinde mikronükleus frekanslarının dağılımı.....	60
Şekil 4.4. <i>M. cephalus</i> solungaç epitelinde mikronükleus frekanslarının dağılımı...	60
Şekil 4.5. <i>M. cephalus</i> eritrositlerinde loblu nükleus frekanslarının dağılımı.....	64
Şekil 4.6. <i>M. cephalus</i> eritrositlerinde tomurcuklu nükleus frekanslarının dağılımı..	64
Şekil 4.7. <i>M. cephalus</i> eritrositlerinde çentikli nükleus frekanslarının dağılımı.....	65
Şekil 4.8. <i>M. cephalus</i> eritrositlerinde binükleus frekanslarının dağılımı.....	65
Şekil 4.9. <i>M. cephalus</i> kuyruk epitel hücrelerinde interfaz AgNOR parametrelerinin dağılımı.....	69

## KISALTMALAR DİZİNİ

**MN:** Mikronükleus

**BN:** Binükleus

**ÇN:** Çentikli nükleus

**TM:** Tomurcuklu nükleus

**LB:** Loblu nükleus

**ÇNhet:** Heteromorfik nükleolus çifti

**Ns:** Hücre başına düşen ortalama nükleolus sayısı

**1Nh:** Ortalama tek nükleolus hacmi



## 1. GİRİŞ

Modern toplumlarda gelişen teknolojiye dayalı faaliyetlerin birçoğu zararlı sonuçları da beraberinde getirebilmektedir. Günümüzde doğal ortamlar giderek artan sanayileşme ve kentleşmeye bağlı olarak ortaya çıkan bir çok kimyasal madde ile kirletilmiş durumdadır. Bunun yanında yine her yıl 1000'den fazla kimyasal madde, çoğunun çevre üzerindeki olası etkileri tam olarak bilinmeksizin piyasaya sürülmektedir. Bu maddelerin de büyük çoğunluğunun doğrudan ya da dolaylı yollarla akarsu, göl ve deniz ortamlarına taşınmaları sonucunda söz konusu ortamlar kirletici maddelerle kontaminasyona uğramaktadırlar.

Sucul ortamlardaki kirlilik uzun yıllardan beri bakteriyolojik açıdan çalışılmış olmakla birlikte, artan sanayileşmeye bağlı olarak ortaya çıkan kimyasal kirlilik, giderek üzerinde daha fazla durulması gereken bir konu haline gelmiştir. Gerek dünyadaki toplam su rezervlerinin büyük bir kısmının deniz ve okyanuslarda bulunması, gerekse gelişen bilimsel teknoloji ve izleme metotlarına paralel olarak deniz kirliliği, özellikle son yıllarda artan oranda dikkat çeken konulardan birisi haline gelmiştir. Buradan hareketle özellikle endüstrileşmenin yoğun olduğu bölgelerde başta deniz biyotası ve buna bağlı olarak insan sağlığı üzerinde ortaya çıkabilecek olası etkilerle bu etkilerin sonuçları izlenmeye başlanmıştır.

Sucul ortamlar genellikle değişik kaynaklardan gelen birçok farklı yapı ve özelliğe sahip kimyasalların oluşturduğu bir karışım halindedir. Bu nedenle de, söz konusu ortamlarda bulunan canlılar çeşitli reaksiyonlardan geçen kompleks kimyasal karışımlara maruz kalmak durumundadırlar. Doğal ortamlarda, bu tip kimyasallara maruziyet kronik ve düşük dozlarda gerçekleştiğinden dolayı, günümüzde biyolojik izleme çalışmaları akut toksisiteden ziyade karsinojenite ve mutajenite etrafında yoğunlaştırılmıştır. Akdeniz açısından ele alındığında, kıyı bölgeleri başta olmak üzere sanayi ve tarımsal atıkların gerek akarsular ile taşınması, gerekse doğrudan denize deşarjı nedeniyle genotoksik ve karsinojenik maddeler ile yoğun oranda kontaminasyona uğradığı bilinmektedir [1].

Gerek sucul ortamlardaki in-situ çalışmalarda gerekse laboratuvar ortamlarındaki genotoksisite çalışmalarında omurgalılar için iyi bir model oluşturmaları nedeniyle son yıllarda alternatif test organizması olarak balık türlerinden yararlanılmaktadır. Çevresel araştırma ve risk değerlendirme süreçlerinde kirleticilerin genetik etkilerinin incelenmesine olanak sağlayan ucuz ve hızlı sonuç veren testlerin kullanılması gerekmektedir. Bu amaçla kullanılan sitogenetik tekniklerin başında metafaz kromozom analiz yöntemleri gelmektedir. Ancak balıkların kromozom yapılarının oldukça değişken olması, sayılarının fazla ve boyutlarının küçük olmaları nedeniyle metafaz kromozom analiz tekniklerinin uygulanabilirliği kısıtlıdır. Diğer taraftan, hem laboratuvar hem de doğal ortamlarda uygulanabilen ve düşük maliyetli bir teknik olan mikronükleus testi, son yıllarda yapısal DNA hasarların belirlenmesi amacı ile balıklar üzerinde de etkin bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Bir mikronükleus doğrudan DNA'da ya da iğipliklerinde oluşan hasarlara bağlı olarak, hücre bölünmesi sonunda ana nükleusa dahil olmayan kırık kromozom fragmentlerinden ya da tüm bir kromozom'un kromatin hale dönüşmesi ile oluşur. Bir hücre içerisinde mikronükleus'un varlığı yapısal bir genetik hasarın varlığına işaret etmektedir [2].

Son yıllarda, mikronükleus yanında, diğer bazı morfolojik nükleus anomalilerinin de genetik toksikoloji indikatörü olarak kullanılabileceği öne sürülmektedir [3]. Bunlardan özellikle lob ve tomurcuklanma gibi bazı nükleus anomalilerinin genotoksik etkileşimler sonucu ortaya çıkabileceği ve hatta yeni bir mikronükleus oluşum mekanizması için temel oluşturabileceği öne sürülmektedir [4].

Yapısal genomik hasarların gösterilmesinde kullanılan mikronükleus testi ve nükleus anomalileri yanında, hücre metabolik aktivitesinin göstergesi olarak kullanılan nükleolus analiz yöntemi de genotoksisite araştırmalarında kullanılmaya başlanan oldukça yeni bir test yöntemidir. Gümüş boyama teknikleri ile incelenebilen büyüklük sayı ve heteromorfizm gibi interfaz kantitatif AgNOR'larının incelenmesi hücrede rRNA gen aktivitesi ve protein sentez hızı konusunda bilgi elde edilmesine olanak sağlamaktadır.

Mikronükleus, nükleus anomalisi ve İnterfaz AgNOR testlerinin kombinasyonu ise, yapısal ve fonksiyonel genotoksik etkilerin incelenmesinde oldukça kullanışlı bir yöntem olarak görülmektedir. Bu çalışmada Mersin bölgesinde gerçekleştirilen yoğun endüstriyel faaliyetler sonucu ortaya çıkan ve sucul ortamlara deşarj edilen atıkların genotoksik etkilerinin, balıklarda mikronükleus testi ve İnterfaz AgNOR parametreleri kullanılarak hem in-situ hem de laboratuvar koşulları altında araştırılması, doğal ortamlardaki sürekli ve laboratuvar ortamındaki kısa süreli etkilerin karşılaştırmalı olarak ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, Mersin bölgesinde sanayileşmenin ve kirliliğin fazla olduğu iki bölge olan Karaduvar ve Mersin limanı ile bu tip deşarjlar olmadığı için göreceli olarak daha temiz olan referans bölge Erdemli'den yakalanan *Mugil cephalus* örneklerinde periferik eritrositleri ve solungaç epitel hücrelerinde mikronükleus ve nükleus anomalileri frekansları ile kuyruk yüzgeci epitel hücrelerinde interfaz AgNOR parametreleri bölgelere ve mevsimsel değişime bağlı olarak incelenmiştir. Bunun yanında daha önce herhangi bir genotoksik etkiye maruz kalmamış olan *Oreochromis niloticus* örnekleri laboratuvar ortamında krom ve petrol sanayi atıklarına maruz bırakılarak mikronükleus frekansları ve AgNOR parametrelerindeki değişimler incelenmiştir.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. GENETİK TOKSİKOLOJİ

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

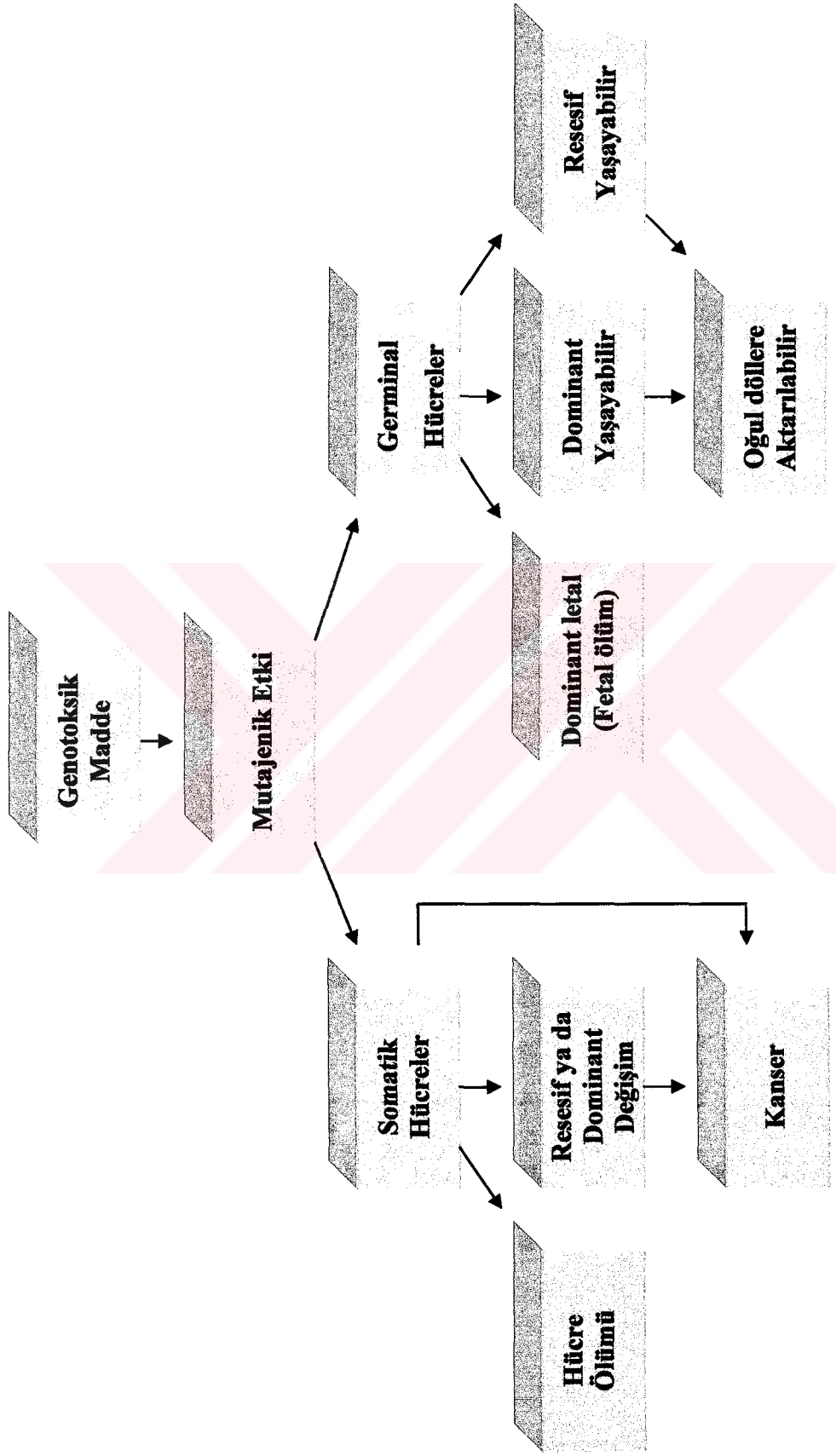
Genetik toksikoloji, temel olarak kalıtım materyali olan DNA üzerinde meydana gelen toksik etkileri inceleyen bilim dalıdır. DNA içerisinde kimyasal olarak kodlanan genetik bilgi, replike edildikten sonra mümkün olduğunca aslına uygun bir biçimde oğul döllere aktarılmak zorundadır. Bu esnada, gerek normal biyolojik süreçler sonucu gerekse DNA’nın doğrudan ya da dolaylı olarak fiziksel, kimyasal ve biyolojik etmenlerle interaksiyonları sonucu çeşitli bozukluklar meydana gelebilmektedir. İşte bu şekilde, kalıtım materyali olan DNA üzerinde hasarlara yol açan etmenleri tanımlamak için “genotoksik” terimi kullanılmaktadır [6].

Genotoksik maddeler kendilerini başlıca iki yolla göstermektedirler;

- Ya doğrudan ya da dolaylı olarak DNA’nın kendisi üzerinde , yani kimyasal yapısı üzerinde hasarlar meydana getirebilirler.
- Ya da hücre içerisinde süregelen onarım mekanizmalarında bozukluklara neden olarak, varolan spontane DNA hasarlarının frekansını yükseltebilirler.

Genotoksik etmenler tarafından oluşturulan hasarlar hücre ölümünden, kansere kadar varan ve oğul döllere aktarılabilen etkilere yol açabilmektedir. Şekil 2.1’de gösterildiği üzere somatik hücrelerde meydana gelebilecek genetik hasarlar bireysel düzeyde hücre ölümü ya da kanserleşmeye yol açabilirken, germinal hücrelerde meydana gelebilecek genetik hasarlar oğul döllere aktarılabilecek dominant ya da resesif genetik etkilere yol açabilmektedirler [7].





Şekil 2.1. Genotoksik maddelerin etkileşim yolları ve olası sonuçları

## 2.2. DENİZ ORTAMINDA GENOTOKSİK MADDELER

Deniz ortamlarında bulunan genotoksik maddeler temel olarak ortaya çıkış mekanizmalarına göre doğa ve antropojenik kökenli maddeler olarak iki grupta incelenmektedirler.

### 2.2.1. Doğa Kökenli Maddeler

Deniz kirliliği de dahil olmak üzere, çevre kirliliğine yol açan pek çok madde antropojenik kaynaklı olmakla birlikte, genotoksik, karsinojenik ve teratojenik etkilere sahip olan ve bazı doğal reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan kimyasalların da var olduğu bilinmektedir. Örneğin doğal pestisitlerin, karsinojenik etki açısından insan yapımı pestisitlere göre çok daha fazla riskli olduğu öne sürülmektedir [8]. Buna benzer değerlendirmeler deniz ortamları için de yapılmıştır. Bazı deniz bitkileri bromoform ve dibromoklorometan gibi mutajenik etkiye sahip olan maddeler yanında kloroform gibi karsinojenik etkiye sahip kimyasal maddeler de üretebilmektedirler. Ayrıca bir deniz alg'inden izole edilen polihalojenli bileşiklerin mutajenik etkiye sahip olduğu ve hatta bunlardan birinin EMS (ethyl methanesulfonate) gibi tipik bir sentetik mutajen maddeden 200 kat daha etkili olduğu belirlenmiştir [9]. Bunun yanında, aralarında Kaliforniya körfezi, Karayipler, Hawaii ve Akdeniz'in İspanya kıyılarının da bulunduğu çeşitli bölgelerinden toplanan *Asparagopsis* cinsine dahil bazı deniz yosunlarının yapısında da bazı olası genotoksik maddelerin varlığı da gösterilmiştir [10].

Doğa kökenli genotoksik maddeler hakkında son zamanlarda ortaya çıkarılan ilginç bulgulardan bir tanesi de  $^{32}\text{P}$  işaretleme tekniği ile gerçekleştirilen DNA adduct testi kullanılarak elde edilmiştir. Aralarında tatlı su balıklarından *Leuciscus cephalus*, *Barbus barbus*, *Abramis brama*, *Vimba vimba varinata* ve *Cyprinus carpio* ile deniz balıklarından *Mugil auratus*'un bulunduğu türlerin karaciğerlerinde birbirleri ile benzerlik gösteren yaklaşık 4 - 9 arası DNA adduct'ının var olduğu ortaya çıkartılmıştır [11]. Bu karsinojen DNA adduct'ları gerek temiz gerekse kirli bölgelerden yakalanan balıklarda yaklaşık olarak aynı miktarlarda bulunmuştur. Kurelec ve ark. [11] bu bulgular ışığında doğal ortamlardaki DNA

modifikasyonlarının insan yapımı kimyasallar yanında doğal olarak ortaya çıkan faktörler ile de oluşturulabileceğini öne sürmüştür.

### 2.2.2. Antropojenik Kökenli Maddeler

Deniz kirliliğine yol açan karsinojenik ya da mutajenik maddelerin tam bir listesini çıkartmak neredeyse olanaksızdır. Genel olarak bu kimyasalların araştırılması oldukça zor ve çoğunlukla da bilimsel açıdan tartışmalıdır. Çünkü sucul ortamlardaki kirletici maddeler genellikle toksik etkilerinin tahmini oldukça zor olan, yapısal olarak birbiri ile ilişkili ve oldukça fazla çeşitlilik gösteren kimyasallardan oluşmaktadırlar.

Uluslar arası Kanser Araştırma Grubu (IARC) tarafından oluşturulan veritabanına dayanılarak deniz ortamlarında bulunan karsinojenlerin bir listesi hazırlanmıştır. İnsanlarda yapılan epidemiolojik çalışmalar, hayvan modeller üzerinde yapılan karsinojenite araştırmaları ve kısa-sürelili test sonuçlarından elde edilen verilerin ışığında karsinojen maddeler IARC [1] tarafından üç ana grup altında toplanmıştır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. IARC verilerine göre karsinojen maddelerin sınıflandırılması

Grup 1	Kesinlikle karsinojen olanlar
Grup 2 (A)	Büyük olasılıkla karsinojen olanlar
Grup 2 (B)	Muhtemelen karsinojen olanlar
Grup 3	Yeterli veri bulunmayan maddeler

Burada bu sınıflandırmanın söz konusu kimyasalların sadece insanlar üzerindeki karsinojenik etkilerinin şiddetlerine dayanılarak yapıldığını belirlemekte fayda vardır. Bu nedenle bu sınıflandırma, genel anlamda karsinojenik etki potansiyellerinin düzeyini gösteren bir tablo olarak ele alınmaktadır. Bununla birlikte yine IARC verilerine dayanılarak deniz ortamında bulunabilen ve karsinojenik etki gösterebilen maddelere verilebilecek bazı örnekler çizelge 2.2’de gösterildiği üzere gruplandırılmışlardır. Bugün bilinen deniz kirleticileri arasında en

önemlileri, 2A grubuna dahil olan PCB (poliklorinli bifeniller), krom +6, kadmiyum ve kadmiyum bileşikleri ile PAH (polisiklik aromatik hidrokarbon)'lardır.

Çizelge 2.2. Deniz ortamında bulunan çeşitli karsinojenlerin gruplandırılması.

1. Grup	Arsenik, Nikel.
a)	Kadmiyum, Benz[ <i>a</i> ]anthrasen, Krom +6, Benzo[ <i>a</i> ]piren Poliklorinli Bifeniller. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH)
2. Grup	Kurşun, Benz[ <i>b</i> ]fluoranthrene, Benz[ <i>k</i> ]fluorantrene, indeno[1. 2. b) 3- <i>cd</i> ]piren, DDT, 1. 2-dikloretan, lindan, tetraklorometan, trichlorometan, toksafen.
3. Grup	Antrasen, benzo[ <i>ghi</i> ]perilen, benzo[ <i>e</i> ]piren, krizen, fenantren, piren, triphenilen, aldrin, chlordan, dieldrin, heptaklor, trichloroetilen, vinyliden klorid.

Bazı durumlarda deniz kirliliğini önlemek üzere kullanılan bazı maddeler de genotoksik etkiler gösterebilmektedirler. Buna örnek olarak çeşitli yüzey aktif madde karışımları, hidrokarbon çözücüleri ve stabilize edici ajanlardan oluşan ve yağların çözülmesinde kullanılan maddeler gösterilebilir [1].

### 2.2.3. Endüstriyel Atıklar

Endüstriyel atıklar, ekonomik gelişme ve teknolojik ilerleme ile birlikte ortaya çıkan istenmeyen ürünlerdir. Bu atıklar, standartlar uygun olarak işlenmediği ya da depolanmadığı durumlarda hem çevre hem de insan sağlığı üzerinde olumsuz etkilere yol açmaktadırlar. Bunun sebebi bu atıkların bir çok farklı kimyasal ve bu kimyasalların kompleks karışımlarını içeriyor olmasıdır.

Mesleki ya da mesleki olmayan yollardan endüstriyel atıklara maruz kalma, insanlarda baş ağrısı, bulantı ve çeşitli cilt hasarları gibi hafif etkilerden ciddi karaciğer ya da sinir bozukluklarına varabilen ciddi etkilere yol açabilmektedir. Bunun yanında kanser ve teratojeniz gibi genotoksik etkilerin de ortaya çıkabildiği

bilinmektedir. Endüstriyel atıklar içerisinde özellikle genetik hasar oluşturma potansiyeline sahip, nikel, kadmiyum, krom(VI), fenol, PCB'ler ve PAH'lar gibi maddelerin varlığı bu atıkların genotoksik etkileri konusunda çalışma gerekliliğini doğurmuştur.

Endüstriyel atıklarla kontamine olmuş doğal ortamlarda yaşayan bitki ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar bu atıkların olası genotoksik etkileri konusunda veri sağlamaktadırlar. Endüstriyel atıkların, hem sucul hem de karasal canlı türleri üzerinde genotoksik etkiye yol açabileceğinin gösterilmesinden sonra özellikle son 10 yılda bu konu ile ilgili olarak yoğun oranda çalışmalar gerçekleştirilmeye başlanmıştır. Bu alandaki esas ilerleme ise, araştırma tekniklerindeki gelişmelere bağlı olarak kısa-sürelili genotoksikite testlerinin yaygınlaşmaya başlaması ile gerçekleşmiştir.

### 2.3. DENİZ ORTAMINA GİREN KİRLİTİCİLERİN DEĞİŞİMLERİ

Kirletici maddeler denize ulaştıktan sonra çeşitli faktörlere bağlı olarak aktivasyon ya da çoğu durumda olduğu gibi detoksifikasyon sürecine maruz kalmak durumundadırlar. Her şeyden önce, kirleticinin stabilitesi kimyasalın moleküler yapısına bağlıdır. Genel olarak, direkt etki gösteren genotoksinler reaktif moleküllerdir ve kimyasal, biyokimyasal ya da fotokimyasal bozulma gibi süreçler ile kolaylıkla parçalanma eğilimindedirler. Promutajen ya da prokarsinojenler ise çok daha stabil bir yapıya sahiptirler. Bu öncül moleküller aktivite gösterebilmeleri için çeşitli dönüşümlere maruz kalmaları gerekmektedir. Bu dönüşümler genellikle konak organizmada hücre içinde gerçekleşirler. Deniz ortamına giren genotoksik maddelerin uğrayabilecekleri değişimler ise başlıca dört yolla gerçekleşebilmektedir.

Bunlardan ilki mikrobiyal transformasyonlardır. Bazı kirleticiler deniz suyunda veya sedimentlerde yaşayan bakterilerde birikmekte ve intraselüler olarak transformasyona maruz kalmaktadırlar. Bu değişimler genellikle detoksifikasyon yönünde olmaktadır. Ancak bazı durumlarda söz konusu bakteri hücrelerinin

parçalanması sonucu ortama salınan bazı kimyasal maddeler yüksek organizmalar için genotoksik etki gösterebilmektedirler [1].

Deniz ortamında kimyasal maddelerde görülen diğer bir değişim yolu da ışığa bağlı dönüşümlerdir. Işığa bağlı dönüşümlerin kaynağında güneş ışığında bulunan ultraviyole (UV) ışınları yatmaktadır. Ancak bilindiği üzere su ortamında, DNA ya zarar verebilecek dalga boyundaki ışınlar belli bir derinliğe kadar geçebildiklerinden, güneş ışığının deniz ortamında doğrudan bir zarar oluşturmadığı söylenebilir. Çünkü, güneş ışığı daha çok deniz suyu yüzeyinde bulunan kirleticilerle reaksiyona girerek moleküler yapılarında dolayısıyla da biyolojik aktivitelerinde değişikliklere yol açarak dolaylı yoldan etki göstermektedir [1].

Yukarıda belirtilen dönüşümlerden sonra oluşan maddelerin uğradığı en önemli aşamalardan biride canlı bünyelerde gerçekleşen birikim sürecidir. İçerisinde genotoksik maddelerinde bulunduğu bir çok kimyasal, besin zincirine bağlı olarak, yüksek organizmaların bünyesinde birikebilmektedir. Özellikle göçmen balıklar, sucül birikime dayalı olarak, bünyelerinde bulundurdıkları maddelerin kirli ortamdan daha uzaklara yayılmasına neden olabilmektedirler. Bununla birlikte, bazı durumlarda birikim ile ortaya çıkan toksisite, direkt maruz kalma durumu kadar etkili olamamaktadır. Bu durum genel olarak kirleticinin suda veya yağda çözünebilme gibi kimyasal özelliklerine ve doğal ortamda bulunma konsantrasyonlarına bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Örneğin, petrol hidrokarbonlarının su veya sedimentten direkt olarak alınması, birikim yolu ile yayılmadan daha önemli ve etkilidir. Öte yandan, organoklorlu pestisitler su ortamında çok az miktarda bulduklarından dolayı birikim yolu ile ortaya çıkardıkları etkiler daha önemlidir [1].

## 2.4. AKDENİZDE KİRLİLİK

Akdenizdeki kirlilik bu denizin gerek nüfus yoğunluğu gerekse endüstriyel atık açısından hızla gelişen ülkeler tarafından çevrelenen yarı kapalı bir deniz olmasından kaynaklanmaktadır.

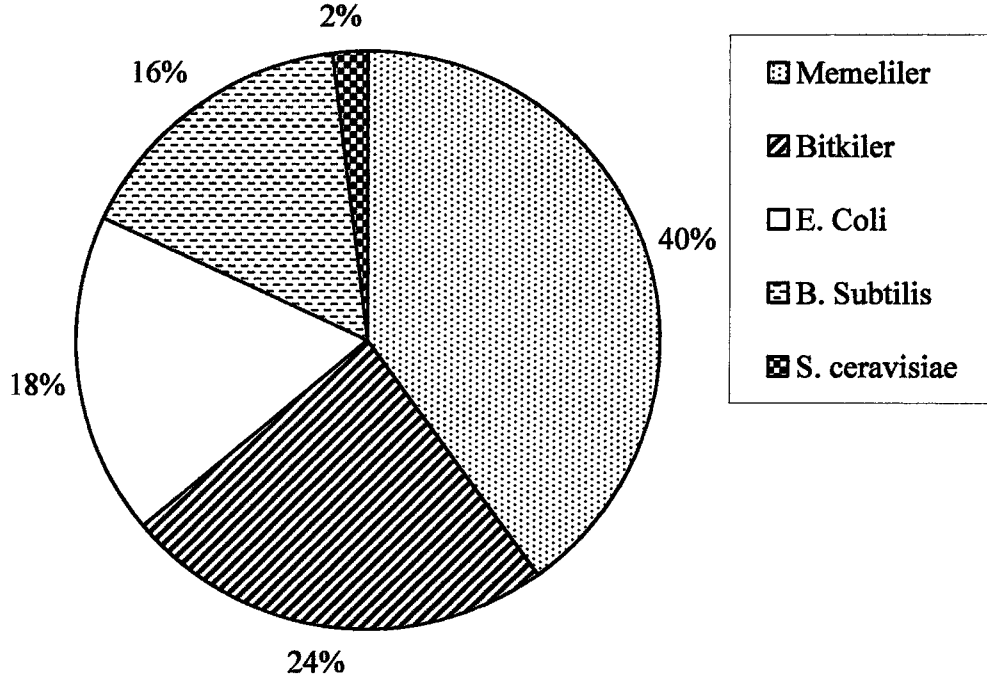
Akdenizde gözlenen kirliliğinin temel kaynakları ise çeşitli ana başlıklar altında toplanmıştır. Bunlardan ilki doğal sızıntılar ile sediment ve kayaçların erozyonudur. Jeolojik yapıya bağlı olarak krom gibi çeşitli kimyasalların erozyon yolu ile denize ulaşması mümkün olabilmektedir. Ana kirlilik kaynaklarından birisi de kıyı bölgelerinde kurulu petrol fabrikalarının deşarjlarıdır. Endüstriyel faaliyetler sonucunda oluşan özellikle sıvı atıklar doğrudan ya da dolaylı yollarla deniz ortamlarına atılmaktadır. Özellikle çeşitli rafinerilerden oluşan yağ ve gres gibi atıklar deniz ortamında önemli kirleticiler arasındadırlar. Yine deniz taşımacılığı ve buna bağlı olarak tanker deşarjları önemli kirlilik kaynaklarıdır. Belediye atık suları da deniz kirliliği açısından önemli bir diğer kaynağı oluşturduğu gibi farklı kaynaklar ile kirlenen akarsular aracılığı ile gerçekleşen taşınım ve yağışlar yolu ile oluşan çökelmeler de kirlilik kaynakları arasında yer almaktadır [1].

Bununla birlikte kimyasal içerik açısından incelendiğinde Akdenizde “genotoksik” kirliliğe yol açan en önemli kaynakların başında endüstriyel atıklar ve tanker deşarjlarının geldiği söylenebilir. Deniz ortamında bulunan genotoksik kirleticilerin en önemlilerinden olan petrol hidrokarbonlarının Akdenize giren miktarının 635.000 ton/yıl olduğu tahmin edilmektedir. Bunun yarısından fazlasının (330.000 ton) petrol tankerlerinden yükleme ve boşaltma ve bakım esnasında yayıldığı bildirilmiştir. Belediye ve diğer endüstriyel kaynaklardan gelen miktar ise yaklaşık olarak sırasıyla 160.000 ve 110. 000 tondur. Atmosferik kaynaklı polisiklik aromatik hidrokarbon girişinin ise yaklaşık 35. 000 ton olduğu tahmin edilmektedir [12].

## 2.5. GENOTOKSİKOLOJİK ANALİZ YÖNTEMLERİ

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. Genetik hasar terimi temelde çeşitli etkilere bağlı olarak DNA üzerinde meydana gelen özgün hasarları tanımlamak için kullanılmaktadır. Bu etkilerin sınıflandırılmasında temel olarak 3 terim kullanılmaktadır. Bunlardan ilki olan “mutajenik” kelimesi DNA üzerindeki bir gende meydana gelen nokta mutasyonları tanımlamaktadır. İkinci terimimiz olan klastojenik kelimesi ise kromozom yapısında meydana gelen değişimleri tanımlamak için kullanılırken, tam kromozom kayıplarını için ise üçüncü bir diğer terim olan aneuploidi terimi kullanılmaktadır. DNA üzerindeki hasarlar hedef büyüklüğüne bağlı olarak; kromozom düzeyinde görülebilen (makro ölçekli) etkiler ve gen düzeyinde gözlenebilen (moleküler) etkiler olmak üzere iki kısımda incelenmektedir. Ancak bilindiği üzere kromozom düzeyinde gözlenen hasarlar, DNA düzeyinde meydana gelen hasarların bir yansıması olduğundan bu sentetik bir ayırmadır. Bununla birlikte kromozom düzeyinde ve DNA düzeyinde oluşan hasarların incelenmesi için kullanılan teknikler genellikle farklı olduklarından, bu tip bir ayırımın yapılması pratik açıdan faydalıdır. Genotoksik etkilerin incelenmesi amacı ile, mikroorganizmalar, böcekler, bitkiler ve omurgalı hayvanlar üzerinde uygulanabilecek olan 200 den fazla kısa-süreli test metodu bulunmaktadır [13]. Ökaryotik sistemler üzerinde yapılan deneyler (fungal testler, bitki deneyleri, memeli ve diğer omurgalılar üzerinde yapılan testler) ise gen mutasyonlarından, yapısal ve sayısal kromozom hasarlarına kadar oldukça geniş bir spektrumu içeren etkileşimlerin araştırılmasında kullanılmaktadırlar (Şekil 2.2).





Şekil 2.2. Genotoksisite testlerinde kullanılan canlı tiplerinin dağılımı [13].

Bir genotoksisite araştırmasında kullanılacak test metodlarının seçimi ise çeşitli kriterlere bağlıdır [6]. Bunlar:

- Test edilecek madde ya da etkenin özelliğine uygun olması
- Kullanılacak test sisteminin geçerliliğinin gösterilmiş olması
- Test sisteminin kullanımı ile ilgili yeterli veri birikiminin olması
- Test metodunun kompleks çevresel karışımlar için de uygun olması

Test sistemleri arasında hasar belirleme kapasitesi yönünden farklılıklar olabildiğinden dolayı, genetik toksikoloji çalışan araştırmacılar bir etkeni test ederken birkaç farklı yöntem kullanabilirler. Birkaç test grubunun bir arada kullanımı sayesinde bir etkenin olası etkilerini farklı açılardan izlemek mümkün olabilir.

Bir genotoksisite test yönteminde olması istenen temel özellikler ise:

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

Yukarıda sayılan özelliklere sahip olan test yöntemlerinin geliştirilmesi ile birlikte, özellikle eko-genetik-toksikoloji alanında yapılan çalışmalarda bir patlama gerçekleşmiştir.

Bugün endüstriyel atıkların genotoksik etkilerinin araştırılmasında kullanılmış veya kullanılmakta olan bir çok test metodu bulunmakla birlikte en yaygın kullanılan yöntemlerin başında Salmonella mutajenite testi ya da genel olarak bilinen adı ile AMES testi gelmektedir [14]. AMES testi dünyada son 20 yıldan beri gerek saf kimyasalların gerekse kompleks karışımların mutajenik etkilerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bazı kimyasal grupları için AMES testinde elde edilen sonuçlarla fare testlerinden elde edilen sonuçlar arasında yüksek bir korelasyon bulunmasına rağmen, organik klorlular, çeşitli çözücüler ve metaller açısından Salmonella testinin duyarlılığı düşüktür. Bu ve benzeri maddeler bazı endüstriyel atıkların en önemli bileşenlerinden olduklarından dolayı daha farklı test sistemlerinin kullanılması gerekli hale gelmektedir.

Makro ölçekli genotoksisite testleri arasında ise, kromozom sayı ve yapısındaki değişimleri gösteren yöntemler gelmektedir. Bunlar arasında kromozom bozuklukları, kardeş kromatid değişimleri ve mikronükleus testleri farklı organizmalar üzerinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar [15, 6]. Klastojenik etkilerin belirlenmesinde ise en çok uygulanan yöntemlerden biri olan Çin hamsteri ovaryum hücreleri (CHO) testi de su ve atık örneklerinin test edilmesinde kullanılmaktadır. CHO testi kimyasal madde üreten fabrikaların, petrol rafinerinin

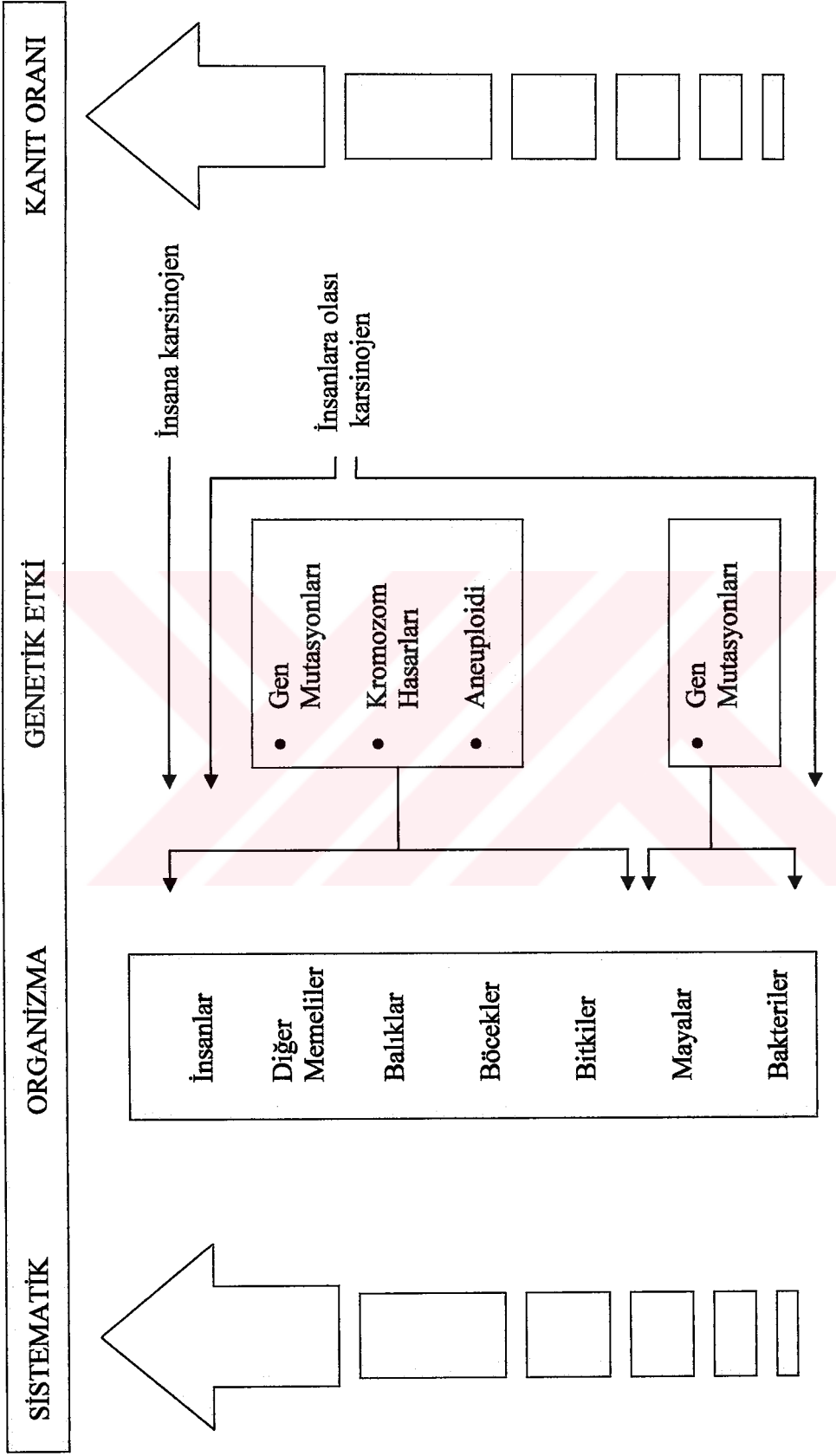
ve kağıt fabrikalarının atıklarının genotoksik etkilerinin incelenmesinde kullanılmıştır.

Endüstriyel atıkların genotoksik etkilerinin incelenmesinde kullanılan diğer yöntemler arasında Allium, Tredescantia ve Vicia gibi farklı türlerin bulunduğu bitkisel test sistemleri sayılabilir. Oldukça ucuz, uygulaması kolay ve kromozom anomalileri açısından etkin sonuçlar veren bitkisel test sistemleri de endüstriyel atıkların potansiyel etkilerinin belirlenmesinde oldukça kullanışlıdır.

#### 2.5.1. Genetik Toksikoloji Testlerinde Model Organizma Olarak Balıklar

Balıklar, sadece fizyolojik ve biyokimyasal araştırmalarda değil, sitotoksik, sitogenetik ve genotoksik araştırmalarında da uygun bir model organizma olarak kullanılabilirler. Sucul ortamlarda besin zincirinde üst sıralarda bulunmaları yanında solunum için yüksek oranda suyu kullanmaları, kirleticilere maruz kalma durumlarını oldukça etkin kılmaktadır. Bu nedenle, özellikle son yıllarda balık doku ve hücrelerinin genetik toksikoloji alanında kullanımına ait çalışmalar son derece artmıştır.

Farklı yapıdaki kirletici maddelerin balıklar üzerindeki genotoksik etkilerinin araştırılmasına yönelik çalışmalar temelde söz konusu kimyasalların karsinojenik etkilerin belirlenmesini amaçlamaktadır. Şekil 2.3'de görüldüğü üzere sistematik olarak yüksek organizmalarda yapılan genotoksisite testlerinden alınan sonuçların özellikle insanlar üzerinde oluşacak etkilerin tahmin edilmesinde daha etkili olduğu görülmektedir. Balıkların 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 balıklarda genotoksik etkiler farklı türlerde, farklı dokularda ve farklı yöntemler kullanılarak incelenmiştir. Bunlar arasında karaciğer dokusunda aromatik DNA adduct testleri [16], DNA iplik kırılma testi (Comet deneyi) [17], gibi teknikler sayılabilir. Bununla birlikte yakın bir geçmişe kadar özellikle



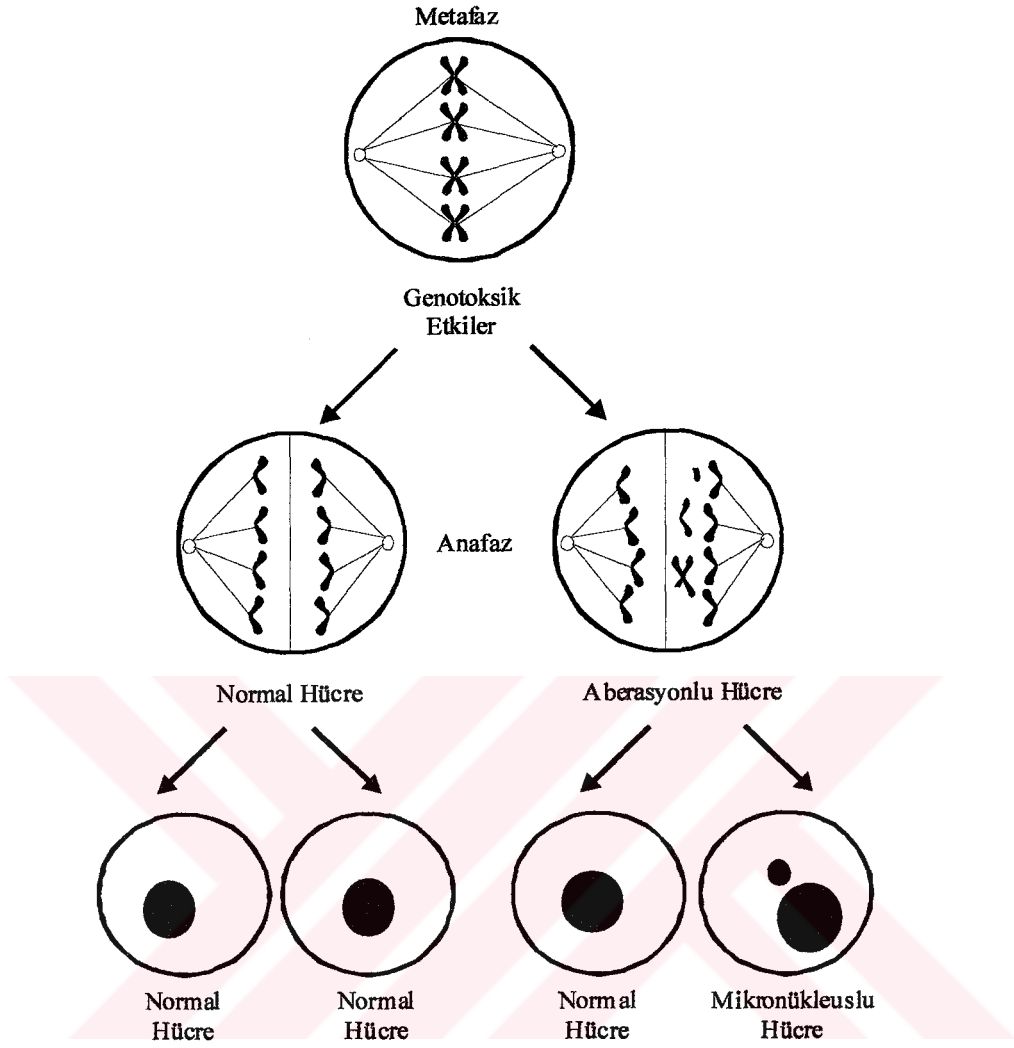
Şekil 2.3. Balıkların model organizma olarak genotoksisite testlerindeki yeri.

memeli türler için geliştirilmiş olan in-vivo sitogenetik tekniklerin uygulanmasında görülen bazı zorluklar nedeni ile balıkların kimyasalların klastojenik etkilerin belirlenmesinde kullanımına dair çalışmalar, kısıtlı bir alanda gerçekleştirilmiştir. [18-21].

Kardeş kromatid değişimi (SCE) ve kromozomal aberasyon gibi metafaz teknikleri'nin 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. Bu nedenle de ancak birkaç balık türünün karyotipi sitogenetik analizler için uygundur. Bunlar arasında *Umbra limi* de kromozom sayısı ve yapısı metafaz analizleri ve genotoksisite çalışmaları için oldukça uygun olmakla beraber bu türün yayılım alanı fazla geniş olmadığından hem in-situ çalışmalarda kullanımı ile ilgili literatür çok kısıtlıdır hem de ekonomik açıdan bir öneme sahip değildir. Bu nedenle geçerli sitogenetik metodlar arasında kolay ve ucuz olması yanında, özellikle balıklar üzerinde uygulanabilirliğinin kolay ve etkin olması nedeni ile mikronükleus testi son yıllarda giderek artan oranda önem kazanmaya başlamıştır [22].

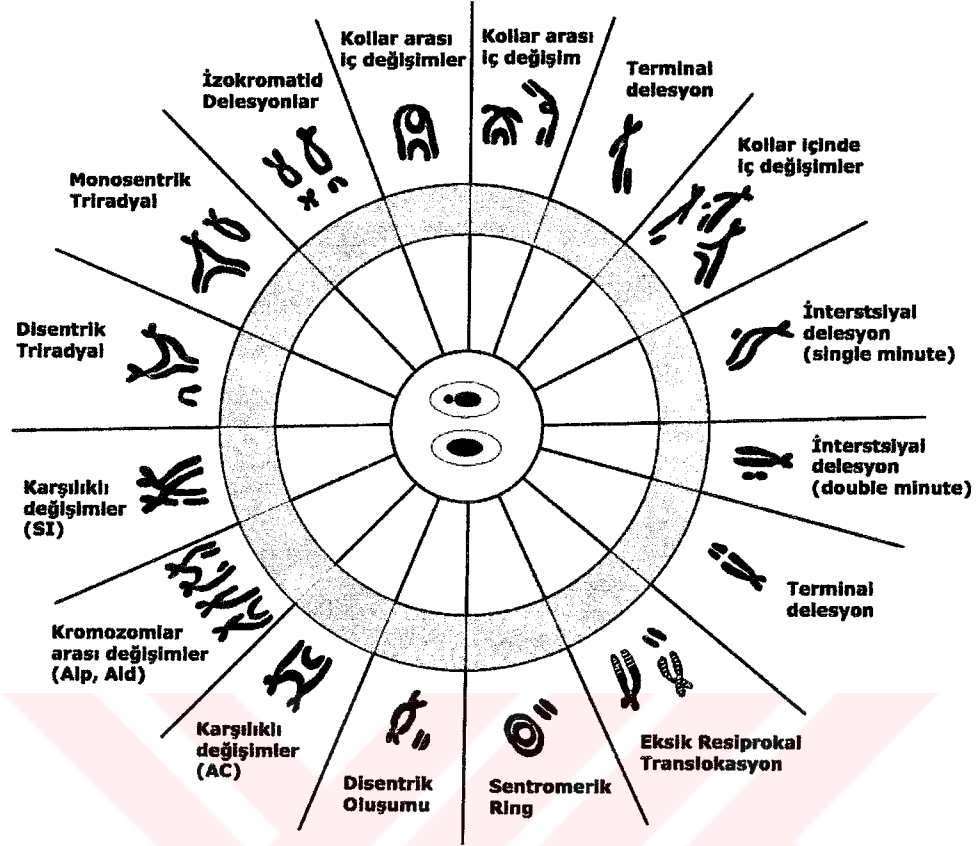
#### 2.5.2. Mikronükleus Testi

Mikronükleus ana kromozomdan kopmuş olan fragmentlerden ya da anafaz esnasındaki hatalara bağlı olarak ana nükleusa dahil olamayan tam kromozomlardan oluşan ve sitoplazma içerisinde ana nükleusa ilaveten görülebilen küçük bir ikinci nükleustur [2]. Mikronükleus oluşumunu indükleyen her ajan klastojen olmayabilir. Mikronükleus oluşumuna iş ipliklerinin inhibisyonu ve apoptozis gibi diğer etkenler de yol açabilmektedir. Şekil 2.4'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. Mikronükleus oluşumuna yol açabilen kromozom anomalilerinin çeşitleri şekil 2.5'de gösterilmiştir. Görüldüğü üzere metafaz kromozomlarındaki kırılmalar sonucunda oluşan fragmentler ve deforme kromozomlar mitoz bölünme sonunda oluşan hücrelerde mikronükleus formasyonlarına yol açmaktadırlar.



Şekil 2.4. Mikronükleus taşıyan bir hücrenin oluşum aşamaları.

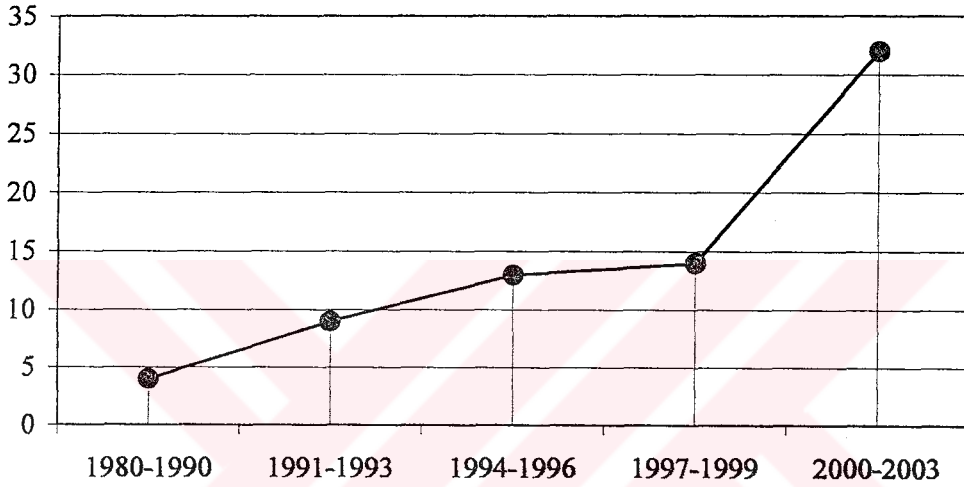
İlk olarak memeli sistemler için geliştirilmiş olan mikronükleus testi, farklı etmenlerin genotoksik etkilerinin araştırılmasında oldukça yaygın olarak kullanılan bir test metodudur. İnterfaz hücrelerinde mikronükleus sayımı teknik açıdan metafaz analizlerine oranla çok daha kolay ve hızlı bir yöntemdir. Bu nedenle son yıllarda bir genotoksisite test metodu olarak mikronükleus testine olan ilgi artmış ve memeliler dışındaki diğer omurgalılar yanında bazı omurgasız hayvanlar ile bitkilere de uygulanmaya başlanmıştır [23-26].



Şekil 2.5. Mikronükleus oluşumuna yol açabilen kromozom anomalileri

Balık eritrositleri çekirdekli olduğundan, bu hücrelerde klastojenik etkilerin belirlenmesi için mikronükleus testi uygulanması son derece kolaydır. Gerek in-situ gerekse laboratuvar koşullarında yapılan çalışmalarda genotoksik maddelere maruz kalan balıklarda eritrosit mikronükleus frekanslarının anlamlı düzeyde arttığı gösterilmiştir (EK). Mikronükleus ilk hücre siklusundan önce görülemeyeceği için, bir hücre popülasyonunda gözlenen mikronükleus frekansının hücre çoğalması kinetiği ile oldukça yakından ilişkili olduğu belirtilmektedir. Hücre proliferasyon oranı ise balık türüne, hedef dokuya ve çevresel koşullara bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Balıklarda da diğer organizmalarda olduğu gibi mikronükleus oluşumu belirli bir oranda spontan olarak gerçekleşmektedir. Fakat balıklardaki spontan mikronükleus frekansları memelilerdekine oranla daha düşüktür [27]. Yine spontan mikronükleus frekansları da türe, metoda ve dokuya bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir (EK).

Bununla birlikte balıklar üzerinde uygulanan mikronükleus testi, evsel ve endüstriyel atıkların genotoksik etkilerinin araştırılmasında in-situ olarak oldukça etkin bir biçimde kullanılmaktadır ve özellikle son on yılda bu konuda yürütülen çalışmalarda gözle görülür bir artış meydana gelmiştir. 1980-1990 tarihlerini kapsayan 10 yıllık ve 1991-2003 yıllarını kapsayan 12 yıllık zaman diliminde her 3 yılda yayınlanan ve balıklarda mikronükleus testinin kullanıldığı makale sayısındaki artış Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Balıklarda mikronükleus testi ile ilgili makalelerin sayısının dağılımı.

De Flora ve ark. [28], laboratuvar ortamında yetiştirilen ve herhangi bir genotoksik etkene maruz kalmamış olan *Oncorhynchus mykiss* örneklerini, İtalya'da evsel ve endüstriyel atıklarla kirlenmiş olan Po nehrine kafesler ile yerleştirerek 7-15 ve 30 gün süresince in-situ olarak maruz bırakmak suretiyle periferik eritrositlerdeki mikronükleus frekanslarında oluşan değişimleri incelemişlerdir.

Pietrapiana ve ark. [29], İtalya'da yoğun oranda petrol atıkları ile kontamine olmuş olan Ligurian denizinde yaşayan demersal balıklardan *Lepidorhampus boscii*, *Merluccius merluccius*, ve *Mullus barbatus*'da, yeni geliştirdikleri bir teknik ile karaciğer hücrelerinde (hepatositlerde) mikronükleus frekanslarındaki değişiklikleri incelemişlerdir.



Grisola ve Starling [30], Brezilya'da yoğun oranda atık artım tesisi deşarjına maruz kalan Paranoa gölünde yaşayan *Tilapia rendalli*, *Oreochromis niloticus* ve *Cyprinus carpio* türlerinde periferik eritrositlerinde mikronükleus frekanslarını karşılaştırmalı olarak incelemiştir.

Ayylon ve ark. [31], İspanya'da askeri tesislerin atıklarına maruz kalan Trubia nehrinin aşağı ve yukarı kısımlarından yakalanan *Salmo trutta* örneklerinde mikronükleus frekanslarını karşılaştırarak bu atıkların genotoksik potansiyele sahip olup olmadıklarını incelemiştir.

Al-Sabti [32], İsveç'te radyoaktif maddeler ile kontamine olmuş göllerden yakalanan *Esox lucius*, *Perca fluviatilis*, *Rutilus rutilus* ve *Abramis brama* örneklerinde mikronükleus frekanslarını incelemiştir.

Bombail ve ark. [33], İskoçya'da uzun yıllardan beri başta petrokimya sanayi olmak üzere değişik tipteki endüstriyel atıklarla kontamine olmuş olan Firth of Forth adlı bölgeden yakalanan *Pholis gunnellus* örneklerinde oluşan genotoksik hasarları eritrosit mikronükleus testi kullanarak araştırmışlardır.

Hughes ve Hebert, [34], Amerika'da çeşitli kirleticilerle kontamine olmuş Long Island kıyıları boyunca belirlenen istasyonlardan yakalanan demersal bir tür olan *Pseudopleuronectes americanus* örneklerinde eritrosit mikronükleus frekanslarını bölgesel ve mevsimsel olarak incelemiştir.

Poongnathi ve ark. [35], Hindistan'da Coimbatore şehrinin belediye atık sularında yaşayan *Tilapia mossambicus*, *Lepidocephalus thermalis*, *Clarias batrachus*, *Labeo rohita* ve *Opicephalus punctatus* türlerindeki eritrosit mikronükleus frekanslarını aynı şehirde bulunan akarsudan yakalanan türler ile kıyaslayarak söz konusu atıkların genotoksik potansiyele sahip olup olmadığını araştırmışlardır.

Pacheco ve Santos [36], Portekiz’de kağıt sanayi atıklarının deşarj edildiği Vouga nehri boyunca yakalanan *Anguilla anguilla* örneklerinde mikronükleus frekanslarını incelemişlerdir.

Rao ve ark. [37], Kanada’da Ontario gölüne deşarj yapan endüstriyel tesislerin bulunduğu bölgelerden yakalanan *Ameiurus nebulosus* örneklerinden alınan karaciğer örneklerinde mikronükleuslu hepatosit frekanslarını incelemişlerdir.

Hayashi ve ark. [38], Japonya’da Tomio nehrinden yakalanan *Carrassius sp.*, *Zacco platypus*, *Misgurnus anguillcaudatus* ve *Odontobutis obscura obscura* örneklerinde periferik eritrosit ve solungaç epitel hücrelerinde mikronükleus frekanslarını acridine orange boyama yöntemi kullanarak mevsimsel olarak araştırmışlardır.

Russo ve ark. [39], İtalya’da yoğun oranda kirli olduğu bilinen Sarno nehrinden yakaladıkları *Gambusia holbrooki* örneklerinin periferik eritrositlerindeki mikronükleus frekanslarını incelemişlerdir.

Rodriguez-Cea ve ark. [40], İspanya’da kirli olduğu bilinen nehirlerden yakaladıkları *Salmo trutta*, *Anguilla anguilla* ve *Phoxinus phoxinus* örneklerinin böbrek eritrositlerinde mikronükleus frekanslarını incelemişlerdir.

Yukarıda adı geçen in-situ çalışmalar yanında balık hücrelerinde mikronükleus testi, değişik kökenli atıkların genotoksik etkilerinin test edilmesi amacı ile laboratuvar koşulları altında da başarı ile kullanılmaktadır.

Pacheco ve Santos [41], kağıt endüstrisi atıklarının genotoksik etkilerini *Anguilla anguilla* üzerinde uyguladıkları eritrosit mikronükleus testini kullanarak belirlemişlerdir.

Marlasca ve ark. [42], laboratuvar şartları altında tekstil atıklarına maruz bıraktıkları *Oncorhynchus mykiss* örneklerinde eritrositlerde gerçekleşen mikronükleus indüklenmelerini incelemiştir.

Odeigah ve Osanyipeju [43], laboratuvar koşulları altında farklı konsantrasyon ve sürelerde bira ve tekstil fabrikası atıklarına maruz bıraktıkları *Clarias lazera* örneklerinde mikronükleus frekanslarındaki değişimleri saptamışlardır.

Vigano ve ark. [44], *Platichthys flesus*, örneklerini, farklı kökenden gelen bir çok kirletici madde ile kontamine olmuş olan İtalyan nehirlerin boşaldığı bir deniz olan Adriyatik denizi'nin kuzey bölgesinden alınan sediment örneklerine laboratuvar şartları altında maruz bırakmışlar ve hepatositlerdeki mikronükleus frekanslarındaki değişiklikleri analiz etmişlerdir.

Kohlpoth ve ark. [45], 11 farklı endüstri koluna ait 38 endüstriye atık örneklerinin genotoksik etkilerini belirlemek için laboratuvar ortamında alabalık gonadlarından elde edilen bir hücre kültürü üzerinde in-vitro olarak test etmiş ve bu hücrelerde oluşan mikronükleus frekanslarını flow-cytometry yöntemi ile belirlemiştir.

### 2.5.3. Nükleus Anomalileri

Son yıllarda farklı organizma ve doku hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda genotoksik etkileşimler altında nükleus şeklinde bazı anomaliler olduğu belirlenmiştir. Bu anomaliler, binükleus, çentikli nükleus, tomurcuklu nükleus ve loblu nükleus olmak üzere başlıca dört grup altında toplanmışlardır (Şekil 3.2). Bir hücre içerisinde çift nükleus bulunma durumu olan binükleus terimi, hücre bölünmesi esnasında ve başlıca sitokinezde meydana gelen sitotoksik etkilerin göstergesi olarak kabul edilmektedir. Çentikli nükleus, adından da anlaşılacağı üzere içerisinde kromatin bulunmayacak şekilde çentik benzeri girintilere sahip nükleuslardır. Çentikli nükleus oluşumu mekanizması ile ilgili olarak henüz ortaya

atılmış bir görüş bulunmamaktadır. Bununla birlikte tomurcuklanma ve lob oluşumu ile ilgili bazı olası mekanizmalar ortaya öne sürülmüştür.

Bu mekanizmalar özellikle, belirli koşullar altında yetiştirilen ve gen amplifikasyonunun indüklenmesine dayalı hücre kültürlerinde gösterilmiştir [46, 47]. Shimizu ve ark. [4] amplifiye edilmiş DNA'nın hücre siklusunun S fazında nükleus'un dış çevre kısımlarına doğru itilip, buradan nükleus tomurcuklanması ile bir mikronükleus oluşturmak üzere atıldığını göstermişlerdir. Bunun yanında hidroksiüre gibi DNA sentez inhibitörlerinin de amplifiye edilmiş DNA'yı bu mekanizma ile attığı belirlenmiştir. Bu araştırmacılar nükleusun bir şekilde temel nükleus alanı ile uyuşmayacak şekilde fazlalık oluşturan DNA'yı bir şekilde tanıma yeteneğine sahip olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Shimizu ve ark. [4], nükleusun fazla miktarda bulunan amplifiye edilmiş DNA'yı bir seri aktif süreçler ile nükleus periferinde biriktirmek suretiyle elemine ettiğini öne sürmüşlerdir. Bu fazlalık DNA tomurcuklanma yolu ile bir mikronükleus oluşturmak sureti ile 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 sap ile bağlı olmalarıdır. Nükleus tomurcuklanması ve oluşan mikronükleus'un hücreden uzaklaştırılması işleminin ne kadar bir sürede gerçekleştiği henüz bilinmemektedir.

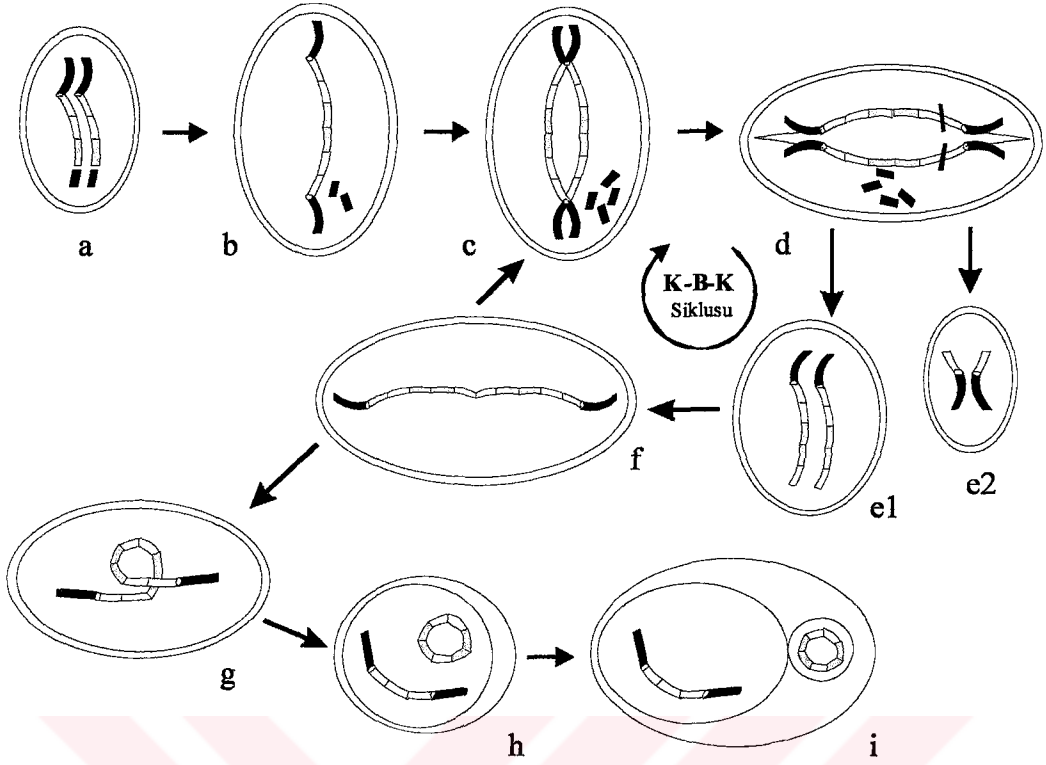
Balık eritrositlerindeki nükleus anomalilerinin sınıflandırılması ve genetik toksisite testinde bir indikatör olarak kullanılabilirliklerine dair yorumlar ilk olarak Carrasco ve ark. [3] tarafından yapılmıştır.

Sonraki yıllarda Pacheco ve Santos [41], siklofosfamid ve kağıt sanayi atıklarının genotoksik etkilerini yılan balıkları üzerinde test ederken mikronükleus testi yanında diğer nükleus anomalilerini de değerlendirmişlerdir.

Ayylon ve Garcia-Vazquez [48, 49], yaptıkları çalışmalarda balık eritrositlerinde nükleus anomalilerinin çoğu durumda genotoksik etkilere mikronükleus ile birlikte oldukça açık bir korelasyon içerisinde yanıt verdiklerini belirlemişlerdir.

Folik asit eksikliği olan hücre kültürlerinde yürütülen çalışmalarda tomurcuk lob ve mikronükleus oluşumlarının arttığı gösterilmiştir. Folik asit eksikliğinin gen amplifikasyonuna ve çift iplik kırılmaları gibi DNA ve kromozom hasarlarına yol açtığı bilinmektedir. Dolayısıyla bu olayların mikronükleus ve nükleus tomurcuklanması oluşumunda etkili olmaları mümkün olabileceği belirtilmektedir [50].

Bu konuda yapılan çalışmalar sonucunda ortaya atılmış yeni bir mekanizma bulunmaktadır. Kromozomal kırılma-birleşme-kırılma (KBK) siklusu olarak adlandırılan bu mekanizmanın basamakları Şekil 1.7'de gösterilmiştir. KBK siklusunun, folik asit eksikliği olan hücre kültürlerinde nükleus tomurcuklanması ve mikronükleus oluşumunu paralel olarak artışına yol açan olası bir mekanizma olacağı öne sürülmüştür [50]. Benzer şekilde Yokote [51], balık eritrositlerinde belirledikleri lob oluşumlarının folik asit eksikliğinden kaynaklanan nükleus anomalileri olabileceğini bildirmiştir. 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 dizilerdeki homolog rekombinasyonlar sonucu oluşacak olan fazlalık halkasal DNA fragmenti tomurcuklanma çekirdek zarında meydana gelen tomurcuklanma yolu ile uzaklaştırılmaktadır.



Şekil 1.7. Gen amplifikasyonu ve KBK döngüsü nükleus tomurcuklanması [50].

- a) Kardeş kromozomlarda kırılma
- b) Yapışkan uçların birleşmesi ile disentrik kromozom oluşumu
- c) Disentrik kromozomun S fazında replikasyonu
- d) Anafazda kutuplara çekilmesi  
Merkezi olmayan bir noktadan kırılma sonucunda oluşan hücrelerden biri sarı ve kırmızı genlerin ikişer kopyasını alırken (e1) diğer hücre bu genleri alamaz (e2).
- f) Çoklu gen kopyası içeren hücrede oluşan ikinci bir birleşme ile c) safhasından itibaren gen amplifikasyonu siklusuna girebilirler.
- g) Ya da alternatif olarak homolog diziler arasında bir rekombinasyon oluşabilir.
- h) Halkasal bir asentrik DNA fragmenti ya da double minute olumu.
- i) Oluşan fazla DNA'nın nükleustan tomurcuklanma ile atılımı.

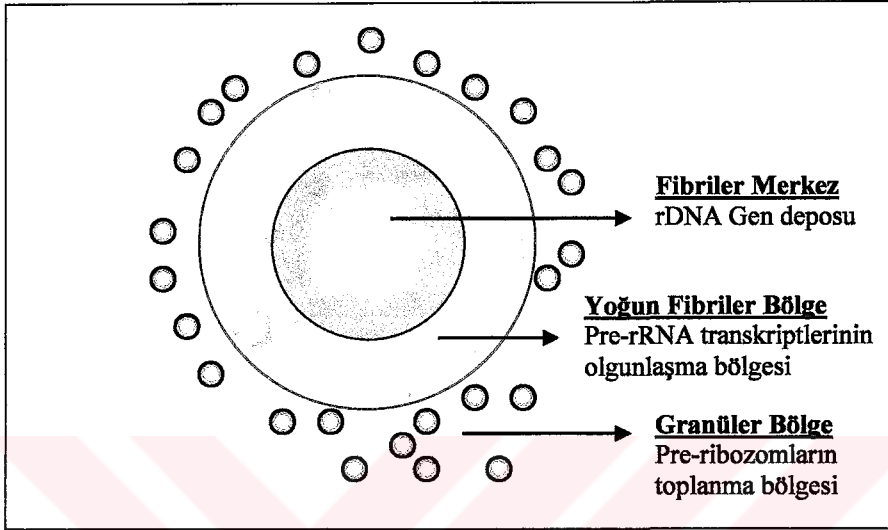
#### 2.5.4. Nükleolus

Yüksek orandaki yoğun ve koyu renkli yapısından dolayı, nükleolus 19. yüzyıl araştırmacıları tarafından mikroskop altında ilk belirlenen hücre yapılarından birisidir [52]. Daha sonraları gelişen histolojik boyama ve inceleme tekniklerinin kullanımı, nükleolus'un kendisini çevreleyen nükleoplazmadan daha farklı bir kimyasal yapıya sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. 1960'lı yılların ortalarında ise nükleolus'un ribozomal RNA'ların sentezlendiği merkez olduğu kanıtlanmıştır [53].

Elektron mikroskobu ile incelendiğinde, yüksek ökaryotlarda nükleolusların morfolojik olarak başlıca üç ana bölgeden oluştuğu görülmektedir. Bu bölgeler merkezden dışarı doğru sırasıyla: fibriler öz, yoğun fibriler bölge ve granüler bölge olarak adlandırılmaktadır (Şekil 1.8). Son zamanlarda yapılan otoradyografik çalışmalar bu üç bölge arasında sıkı bir korelasyon olduğunu ve ribozom biyogenezinin bu üç bölge arasında vektörel olarak işleyen mekanizmalarla gerçekleştiğini ortaya çıkarmıştır. Fibriler merkezler, nükleolus organizatör bölge (NOR) olarak adlandırılan kromozom bölgelerinde lokalize olmuş olan rRNA genlerinin yaklaşık 200-300 kopyasını içermektedirler. Tüm bu rRNA kopyalarının ise sadece belirli bir kısmı aktif haldedir ve aktif olarak transkribe edilen diziler, daha periferde bulunurlar ve yoğun fibriler bölgeye doğru uzantılar yaparlar. Ancak, rDNA transkripsiyonunun gerçekleştiği noktanın, fibriler merkez ve yoğun fibriler bölge arasındaki sınırın hangi bölgesinde olduğu hala tartışma konusudur [54, 55]. Transkribe edilmiş ancak henüz olgunlaşmamış olan RNA'lar kalıp DNA'dan ayrılıp uzaklaşmaya başladıktan sonra ilk olarak yoğun fibriler bölgeye daha sonra da granüler bölgeye geçmektedirler. Başlangıçtaki ilk oluşan pre-rRNA'lar yoğun fibriler bölgede kümelenedikleri, daha sonraki olgunlaşma basamaklarının ise granüler bölgede gerçekleştiği gösterilmiştir. Son olarak da oluşan öncül ribozomlar çekirdek porlarından sitoplazmaya geçmektedirler [55].

Nükleoluslar şekil ve büyüklük bakımından, buldukları hücre tipine göre büyük oranda çeşitlilik göstermektedirler. Örneğin maya'larda nükleolus tek bir hilal şeklindedir, direkt olarak çekirdek zarının yanında bulunur ve çekirdeğin yaklaşık olarak 1/3'ünü oluşturur. Maya'lar üzerinde yapılan elektron mikroskobik

incelemelerde omurgalı nükleuslarında bulunan üç morfolojik bölge gözlenememiştir, ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda *Saccharomyces cerevisiae*'nin yüksek ökaryotlara benzer olan alt birimler içerdiği gösterilmiştir [56, 57].



Şekil 1.8. Yüksek ökaryotik organizmalarda nükleolus yapısı.

Bitki ve hayvan hücrelerinde ise nükleoluslar, işleyiş ve metabolik aktivitelere bağlı olarak oldukça fazla oranda farklılık gösterebilen dinamik yapılar halinde bulunmaktadır. Tam anlamıyla aktif durumda bulunan nükleoluslar, fibriler öz, yoğun fibriler bölge ve granüler bölgelerin iç içe karışmasıyla, daha geniş bir hacime sahip olurlar. Bunun tam aksine, inaktif hücrelerdeki nükleoluslar transkripsiyon aktivitesindeki düşüğe bağlı olarak daha küçük ve yoğun bir yapı haline geçerler. İnaktif nükleoluslarda ve üç ana bölge belirgin bir biçimde sınır oluşturacak şekilde yan yana dizili durumda bulunurlar [54].

Maya'larda nükleolus mitoz esnasında bütün yapısını korumasına karşın çok hücreli organizmalarda nükleoluslar görünür yapılarını kaybederler. Bu süreçte nükleolus proteinleri belirli bir düzen içerisinde ana yapıdan uzaklaşırlar. İlk olarak granüler bölgeler ve daha sonra da yoğun granüler bölgeler görünmez hale gelirler.



Bunu nükleolus organizatör bölgelerin (NOR'lar) kromozomlar üzerinde görünür hale gelmesi izler. Bu yapıların elektron mikroskobu altında morfolojik açıdan fibriler merkezlere benzedikleri görülmüştür. Mitoz sonunda ise transkripsiyonun başlamasından önce, yeniden oluşacak olan nükleoluslar içerisinde pre-nükleolus cisimcikleri (PNB'ler) olarak adlandırılan küçük yuvarlak yapılar görülmeye başlar. RNA polimeraz I ile transkripsiyonun başlaması da PNB'lerin tekrar tam bir nükleolus yapısını oluşturmak üzere tekrar NOR'lara bağlanmasını sağlar. Bu veriler bize interfaz nükleolus'unun yeniden oluşması için bir rRNA sentezi sürecinin olması gerektiğini göstermektedir [58].

Son yıllarda, aktiviteleri nükleolus tarafından kontrol edilen üç farklı hücre siklusu regülatörü belirlenmiştir. Bunlardan ilki mitozdan çıkışı kontrol eden ve anafaza kadar nükleolus içerisinde saklanarak mitozdan vaktinden önce çıkışı engelleyen bir protein fosfataz olan Cdc14'dür [59-63]. Tümör supresor proteini p53, DNA hasarlarına yanıt olarak hücre siklusunu beklemeye alır. Bir p53 inhibitörü olan Mdm2 ise p53'ü aktif hale getirmek üzere nükleolus tarafından alıkonulur [64, 65]. Rekombinasyon ve sinapsis bozuklukları durumunda mayotik hücre siklusunun ilerlemesini durdurmak için gerekli olan Pch2 proteini de nükleolus içerisinde lokalize olmuş durumdadır [66]. Sonuç olarak Cdc14, Mdm2 ve Pch2 proteinlerini içerisinde barındırması, nükleolus'un hücre-siklusu regülasyonunda da görev aldığına işaret etmektedir.

#### 2.5.4.1. Nükleolus organizatör bölgeler (NOR'lar)

İlk olarak Heitz [67] ve McClintock [68] tarafından nükleolus içerisinde bulunan ve mitoz bölünme sırasında kaybolup telofaz sonunda tekrar ortaya çıkan ve koyu boyanan bölgeler olarak tanımlanan nükleolus organizatör bölgelerin (NOR'lar), bugün temel olarak ribozomal RNA'yı kodlayan genleri içerdiği bilinmektedir. Ribozomal transkripsiyon için gerekli olan tüm bileşenler interfaz NOR sınırları içerisinde lokalize olmuş durumdadır. Bu bileşenler genel olarak; nükleozom halinde bulunmayan ve transkripsiyona hazır durumda olan rRNA genleri, RNA polimeraz I, RNA polimeraz upstream bağlayıcı faktör ve topoizomeraz olarak sıralanabilir [69]. rRNA transkripsiyonu sadece fibriler

bölgelerin etrafında gerçekleşirken yeni sentezlenen 45S pre-rRNA molekülleri fibriler bölge içerisinde biriktirilirler. Nükleolar granüler bölgeler ise 45S RNA'ların işlenmesi ile oluşan rRNA moleküllerini içerirler.

Yapılan bazı ultrastrüktür çalışmaları interfaz NOR'larının nükleolus'un fibriler bölgesinde bulunduğunu ve metafaz NOR'larının temsilcileri olduklarını göstermiştir [70, 71]. Gerçekten de fibriler merkez ve bunun etrafında bulunan fibriler bazı bileşenlerin, gümüş boyama yöntemleri ile metafaz kromozomlarında gözlenen ve ribozomal genleri içeren bölgeleri içeren tek nükleolus bölgesi olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır. Metafaz ve interfaz NOR'ları arasında sayısal bir ilişki bulunmamaktadır. Örneğin, bir metafaz NOR'u birkaç interfaz NOR'una bölünebilirken, birkaç metafaz NOR'u tek bir interfaz NOR'u halinde kümelenebilmektedir [72].

#### 2.5.4.2. AgNOR'lar

Yüksek oranda argirofilik özellik gösteren bir takım asidik proteinler de NOR'lar ile aynı bölgede bulunmaktadırlar. Bu proteinler, gümüş boyama teknikleri sayesinde NOR'ların hızlı ve kolay bir biçimde görülmelerine olanak sağlamaktadırlar [73]. Gümüş boyanmış NOR'lar terminolojik olarak AgNOR olarak adlandırılmaktadırlar.

İnterfaz NOR'larının en önemli bileşenleri AgNOR proteinleridir. AgNOR proteinlerinin yokluğunda rRNA sentezi hiçbir şekilde gerçekleşmemektedir. AgNOR proteinlerinin (özellikle interfaz esnasında en yoğun olarak sentezlenenlerin) tanımlanmaları oldukça yakın bir zamanda gerçekleştirilebilmiştir [74]. Bunlardan en önemlileri rRNA moleküllerinin transkripsiyonunda önemli rol oynayan ve 105kDa'luk bir fosfoprotein olan Nucleolin ile pre-ribozomal partikül oluşumunun ileri safhalarında ortaya çıkan 38-29 kDa'luk bir protein olan nucleofosmin (B23 proteini)'dir. Bunların yanında, RNA polimeraz I ve UBF (Upstream bağlanma faktörü) alt birimleri de AgNOR proteinleri olarak tanımlanmışlardır.

İnterfaz nükleusundaki AgNOR'larının sayısı ve büyüklüğü rRNA transkripsiyonu aktivitelerine bağlı olarak değişiklik göstermektedirler. Gümüş nitrat boyama teknikleri sayesinde interfaz AgNOR'ları ışık mikroskobu altında büyüklük ve sayıları kolayca ayırt edilebilen küçük siyah noktalar halinde gözlenebilmektedirler. Nükleolus içerisinde gümüş boyalı interfaz NOR'ları tarafından kapsanan bölgelerin büyüklüğü toplam Nükleolus büyüklüğü ve ribozom biyogenezi seviyesi ile yakından ilişkilidir. Rutin sitolojik örneklerdeki gümüş boyalı interfaz NOR'larının görüntü olarak analizi sayesinde nükleolus büyüklüğü ve fonksiyonu hakkında kesin bilgiler elde edilebilmektedir.

#### 2.5.4.3. İnterfaz AgNOR parametreleri ve hücresel aktivite

Temel olarak NOR'lar rDNA olarak da adlandırılan ve RNA-polimeraz-1 enzimini kullanarak ribozomal RNA (rRNA)'nın transkripsiyonundan sorumlu olan özel DNA dizileridir. Bu rRNA'lar ribozom içerisinde hücrenin protein sentezinden sorumludurlar. Protein sentezi ise hücre proliferasyonu için gerekli en önemli basamaklardan biridir. Buradan hareketle NOR'lar ile hücre proliferasyonu arasında bir ilişkinin olduğu öne sürülmüştür.

NOR'ların hücre çekirdeği içerisindeki varlığı sitogenetikçiler tarafından uzun zamandan beri bilinmektedir. Bu NOR-DNA'lar oldukça etkili ancak bir o kadar da uzun zaman alan bir teknik olan radyoaktif-işaretlenmiş rRNA'lar kullanılarak gösterilmiştir. Daha sonraki yıllarda Goodpasture ve Bloom [73] tarafından bulunan ve Platon ve ark. [75] tarafından modifiye edilerek kullanılan kolloidal gümüş tekniği ile NOR'lar çok daha kolay bir biçimde tanımlanmaya başlamışlardır. Gümüş boyama tekniği kullanılarak NOR'ların sayısı, büyüklük ve şekilleri kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. Hücre içerisinde bağlanan gümüş miktarı, protein sentezine katılmakta olan NOR miktarını yansıtmaktadır.

Bölünme halindeki hücrelerde interfaz AgNOR sayısının G1 fazının erken safhalarından itibaren artmaya başladığı, S fazının sonunda maksimum seviyeye ulaştığı ve G2 safhasının sonuna kadar sabit bir halde kaldığı kanıtlanmıştır. Bunun yanında elde edilen diğer bir bulgu da interfaz AgNOR miktarlarının hücre çoğalma

hızı ile yakından ilişkili olduğudur. İn vitro koşullar altında yapılan insan tümör hücre kültürlerinde kısa sürede bölünme yeteneğine sahip hücrelerin daha fazla sayıda interfaz AgNOR'a sahip olduğu gözlenmiştir [76]. İnterfaz AgNOR sayısı ile tümör hücre kitlesinin çoğalması arasındaki ilişki fareler üzerinde de in-vivo olarak gösterilmiştir [77]. İnterfaz AgNOR'ları ile hücre bölünme aktivitesi arasındaki ilişki temelde, metabolik olarak daha aktif olan mitotik hücrelerin yeni oluşturulacak olan kardeş hücreler için yeterli sayıda ribozomal bileşen oluşturmak zorunda olması ile veya hücre siklusu süresini kısa olduğunda birim zamanda daha fazla ribozom üretilmesi ile açıklanabilir. Bunun yanında İnterfaz AgNOR'ların miktarı rRNA transkripsiyon aktivitesi ile yakından ilişkilidir.

NOR'lar ile ilişkili olan proteinler gümüş ile oldukça iyi bir şekilde bağ oluşturma yeteneğindedirler [78]. Bu gümüş afinitesi, nükleolin protein'in (protein C23) fosforilasyonu basamağı ile ilişkilidir. Bu esnada protein aktive olur ve rDNA'nın transkripsiyonu gerçekleşebilir. Nükleolin bu aşamada gümüş afinitesi gösteren esas proteindir. Nükleolin temel olarak rDNA transkripsiyonunu kontrol ettiği düşünülen 92 Kd'luk bir nükleolus proteindir. Nükleolin yanında diğer bir NOR proteini de protein B23'dür. Aynı hücre içerisinde ortalama AgNOR sayımı ile nükleolin ve protein B23 miktarı arasında oldukça iyi bir ilişkinin var olduğu gösterilmiştir [79].

Şu anda kadar, tümör araştırmalarında bölünmekte olan hücrelerin yüzdesi (büyüme fraksiyonu) hakkında bilgi veren bir çok teknik bulunmasına rağmen bunların hiçbiri hücrelerin çoğalma hızı (proliferasyon oranı) hakkında bilgi vermemektedir. AgNOR'ların kantitatif analizi ise, hücrelerin proliferatif aktiviteleri hakkında bilgi edinebilmek için oldukça özgün bir yöntemdir. Son yıllarda özellikle tıbbi araştırmalarda tümör dokularından hazırlanan rutin histolojik preparatlarda interfaz AgNOR'larının dağılımının incelenmesi sayesinde hücrelerin metabolik aktiviteleri hakkında bilgiler elde edilmeye başlanmıştır. Hücre proliferasyonu, protein sentezi ve AgNOR ekspresyonu arasındaki ilişki henüz tam olarak kesin bir biçimde aydınlatılabilmemiş değildir. Ancak, AgNOR'ların durumu doğrudan ya da dolaylı bir biçimde DNA sentezine bağlı olduğu bilindiğinden dolayı, AgNOR'lar bir

çeşit hücre proliferasyon marker'ı olarak kullanılmaktadır. Özellikle son yıllarda AgNOR boyama ve analiz yöntemi histopatologlar arasında teşhis amaçlı olarak yoğun oranda kullanılan bir metod haline gelmiştir.

#### 2.5.4.4. Toksikite indikatörü olarak AgNOR'lar

Nükleolusların yapı ve fonksiyonları hakkında elde edilen veriler ışığında, kantitatif AgNOR parametreleri medikal teşhis yanında toksisite araştırmalarında da kullanılmaya başlanmıştır. Bu araştırmalar temelde toksik etkiye maruz kalan hücrelerde interfaz AgNOR'ların sayı, büyüklük ve şekil açısından gösterdikleri değişimler incelenmek suretiyle, maruz kalınan toksik etki sonucu nükleolus metabolizmasında ortaya çıkan olası gerilemelerin incelenmesine dayanmaktadır.

Balık türleri üzerinde yapılan çalışmalarda AgNOR analizleri genellikle metafaz kromozomları üzerindeki lokalizasyonları incelenmiştir. Metafaz AgNOR'larının kromozomlar üzerindeki dağılımlarının çalışılmasındaki başlıca amaç ise türler arasındaki sistematik farklılıkların ortaya çıkartılmasıdır. Bunun yanında nükleolus özelliklerinin gösterdiği bireysel ya da populasyon bazında değişik yaşam evrelerinde ya da farklı koşullar altında gösterdikleri dinamik değişimler bu sınıfa dahil olan türlerde 90'lı yılların başlarına kadar detaylı olarak incelenmemişlerdir.

Romanenko ve ark. [80] Cyprinidae familyasına dahil olan balıklarda yaptıkları çalışmalarda ovaryum, kas, karaciğer, kan ve yumurta hücrelerinde nükleolus aktivitelerinin protein, lipid ve enerji metabolizmaları ile yakından ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

Arkhipchuk, [81] *Cyprinus carpio* dalak hücrelerinde RNA/DNA oranları, nükleolus aktivitesi ve RNA içeriği arasında pozitif korelasyon bulunduğunu bildirmişlerdir. Nükleolus aktivitesi ile RNA/DNA oranları arasındaki ilişki bize ribozomal genlerin transkripsiyon aktivitelerinin başlıca kantitatif nükleolus özelliklerindeki değişimlerle bağlantılı olduğunu göstermektedir. Bunun yanında

soğukkanlı omurgalılarda nükleolus büyüklüğünde gözlenen polimorfizmlerin rRNA gen kopyası sayısı ile bağlantılı olduğunu göstermiştir [82].

Shukla ve Pandey [83], 30 gün süreyle 14 mg/L dozunda Arsenik (III) okside maruz bırakılan tatlı su balığı *Colisa fasciatus* ovaryumlarında hücre başına düşen nükleolus sayısı ve ortalama nükleolus hacminde anlamlı oranda bir azalma olduğunu bildirmişlerdir.

McNulty [84] 7 gün süresince devamlı olarak ışığa maruz bırakılan *Carassius auratus* fotoreseptör hücrelerinde nükleolusların hacimsel olarak kontrol grubuna göre daha büyük olduğunu belirlemişlerdir. Buradan hareketle metabolik aktiviteye bağlı olarak nükleolus büyüklüğünde artış olduğu sonucuna varılmıştır.

Wistar ratlarında yassı epitel hücrelerinde X-ışınlarına maruz kalma sonucunda nükleolus parametrelerinde ortaya çıkan değişiklikleri incelemişler ve uygulamadan 8 saat sonra bile AgNOR parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler olduğunu belirlenmiştir. İlk etapta AgNOR hacminde % 46 oranında bir artış olduğu gözlenirken hücre başına düşen AgNOR sayısında % 46 oranında bir azalma olduğunu bildirilmiştir [85].

Kısmi hepatektomi yapılan fare karaciğerlerinde RNA sentezinin arttığı buna bağlı olarak da nükleolus hacminde bir artış olduğu bildirilmiştir [86].

Gabara ve ark. [87] farklı konsantrasyonlarda kadmiyum, krom ve kurşuna maruz bıraktıkları *Pisum sativum* korteks hücrelerindeki nükleolusları morfoloji, sayı ve hacim yönünden incelemişlerdir. Kadmiyum ve krom uygulanan örneklerde 2 ya da 3 nükleolus taşıyan hücrelerin sayısında ve ortalama nükleolus hacminde azalma olduğunu bildirmişlerdir.

Jiang [88] alüminyum klorid ile muamele ettikleri *Hordeum vulgare* kök ucu hücrelerinde nükleolus materyalinin çekirdekten sitoplazmaya kayacak şekilde

anormal bir parçalanma ve dağılma gösterdiğini bildirmişlerdir. Benzer etkiler  $Cu^{+2}$  ile muamele edilen *Helianthus annuus* köklerinde de gözlenmiştir.

Dudnik ve ark. [89], % 20 oranında hanks solüsyonuna maruz bırakılan kültüre edilmiş domuz embriyo hücrelerindeki nükleoluslarda oldukça kısa sürede hem yapısal hem de fonksiyonel değişimlerin gerçekleştiğini belirlemişlerdir. Hanks uygulamasının başlamasından sonraki ilk 10-15 dk içerisinde nükleoluslar ışık mikroskobu altında görünmez hale geçmişlerdir. İncelenen kesitlerde sadece fibriler merkezlerin ve yoğun fibriler bölgelerin bulunduğu gözlenmiştir. Bunun yanında normal ortama döndürüldükten 30-120 dk sonra nükleoluslar morfolojik olarak en baştaki normal yapılarına geri dönmüşlerdir.

Heinisch ve Wozel [90] farklı anti-proliferatif maddeler uyguladıkları farelere epidermal AgNOR parametrelerindeki değişiklikleri incelemişlerdir. % 0. 025'lik fluocinolone aseton uygulanan farelerde kuyruk epidermis hücrelerinde AgNOR aktivitesinin en düşük düzeye ulaştığını gözlemişlerdir. Benzer şekilde % 0. 2'lik anthralin, % 1'lik propil gallat uygulamaları da AgNOR aktivitesini anlamlı ölçüde düşürmüştür. Bu araştırmacılar yaptıkları çalışmada en etkin AgNOR parametresinin hücre başına düşen AgNOR sayısı olduğunu bildirmişlerdir.

Kawamoto ve Tamai [91], rat prolaktin hücrelerinde bir inhibitör olan östrojen uygulaması sonucunda AgNOR sayı ve hacminde artış olduğunu, bunun aksine bir inhibitör olan dopamine agonist uygulanması sonucunda hücre başına düşen AgNOR sayısı ve hacminde azalma olduğunu bildirmişlerdir.

Arkhipchuk ve Malinovskaya [92] çeşitli organik ve inorganik toksik maddelerin, *Allium cepa*, *Lactuca sativa* ve *Hydra attenuata* hücreleri üzerindeki etkilerini mikronükleus testi ve interfaz AgNOR analiz tekniği kullanılarak araştırmışlardır. Çalışmalarında kullanılan maddelerden özellikle lindane ve metolachlor'un her iki bitki hücrelerindeki nükleolus sayısı ve hacminde önemli ölçülerde düşüşe yol açtığını belirlemişlerdir.

Arkhipchuk ve Garanko [93], aynı organizmalarda yaptıkları başka bir çalışmada mercury ve 4-nitroquinoline uygulamasının ortalama nükleolus hacmi ve heteromorfik çiftli nükleolus yüzdesinde düşüşe yol açtığını belirlemişlerdir.

Hammer ve ark. [94] farinks kanserli 30 hastada yaptıkları çalışmada kemoterapi uygulanması sonucunda AgNOR sayılarında kontrol grubuna oranla anlamlı bir düşüş olduğunu belirlemişler ve AgNOR sayımlarının sitotoksik etkilerin belirlenmesinde kullanışlı bir metod olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Gyesko ve Holczinger [95], Actinomycin D uygulanan tümör hücrelerinde nükleolus sayısında 24 saat içerisinde % 20 oranında bir azalma olduğunu bildirmişlerdir.





### 3. MATERYAL ve METOT

#### 3.1. LABORATUVAR ÇALIŞMALARI

Krom sanayi ve petrol rafinerisi atıkları direkt olarak söz konusu tesislerin sıvı atık deşarj borularından alınarak laboratuvar ortamına getirilmiştir. Her iki atık su örneği % 5, % 10 ve % 20 oranlarında seyreltilerek kullanılmışlardır. Uygulamalar 3 - 6 ve 9 günlük periyotlarda yapılmıştır. Deneylede pozitif kontrol olarak cyclophosphamide (4 mg/L) kullanılmıştır. Laboratuvar analizlerinde, test organizması olarak *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae) seçilmiştir. Bu türün seçilmesindeki neden hem ekonomik öneme sahip olması nedeniyle bulunması kolay olan hem de genetik toksikoloji testlerinde daha önceden de kullanılmış bir tür olmasıdır. Her doz/süre başına 5 adet, toplamda ise 120 *O. niloticus* örneği kullanılmıştır.

Denyde kullanılan atıkların kimyasal özellikleri ve bileşimlerinde bulunan maddeler, örneklerin alındığı sanayi kuruluşların kendi laboratuvarlarında yapılan analizlerle belirlenmiştir.

#### 3.2. IN-SITU ARAZİ ÇALIŞMALARI

Arazi çalışmalarında mersin il sınırları dahilinde Akdeniz sahilinde belirlenen istasyonlardan yakalan *Mugil cephalus* (Pisces: Mugilidae) örneklerinde mikronükleus, nükleus anomalisi ve interfaz AgNOR parametrelerindeki değişimler hem bölgesel hem de mevsimsel açıdan değerlendirilmiştir. Bu amaçla kirlilik açısından olası deşarj kaynakları göz önüne alınarak 3 farklı örnekleme istasyonu seçilmiştir (Şekil 3.1). Bunlar sırasıyla:

Karaduvar sahili: Karaduvar sahili özellikle bu bölgede yoğunlaşan endüstriyel kuruluşların potansiyel deşarj bölgesi olması nedeniyle oldukça farklı yapıdaki kompleks kimyasal kirleticilerin oluşturduğu karışımlara maruz kalan bir bölgedir. Bu bölgede bulunan başlıca endüstriyel kuruluşlar arasında petrol rafinerisi, krom bileşikleri fabrikası, gübre fabrikası, soda sanayi gelmektedir.

Mersin limanı: Mersin limanı balıkçı ve yük gemileri yanında özel teknelerin de yoğun oranda giriş çıkış yaptığı bölgenin en büyük limanı olma özelliğindedir. Kapalı bir bölge olma durumundaki bu istasyondaki yoğun deniz trafiği beraberinde özellikle yoğun orandaki polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) kirliliğini de beraberinde getirmektedir.

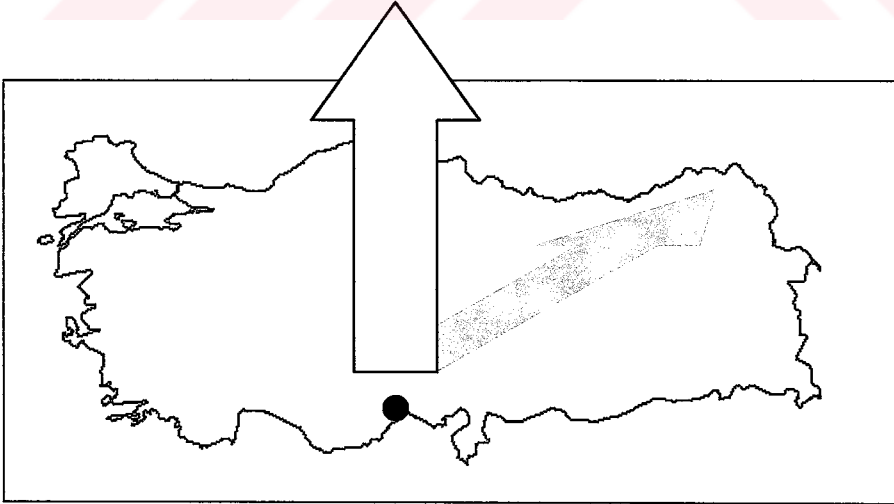
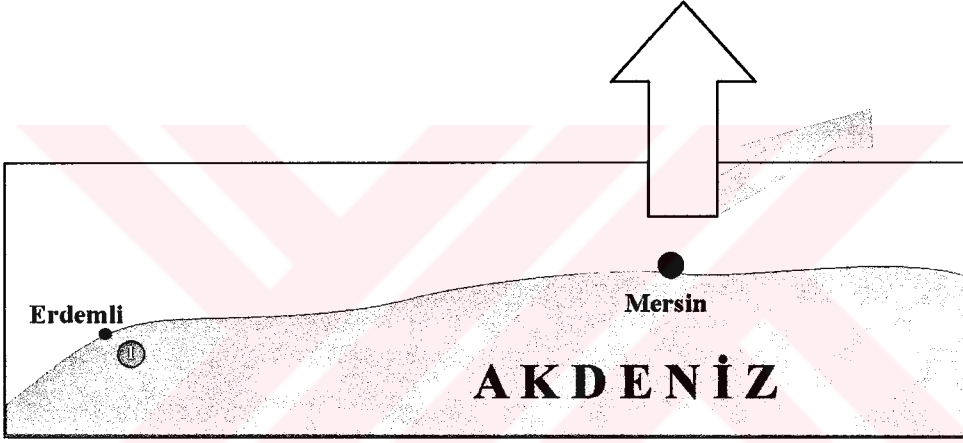
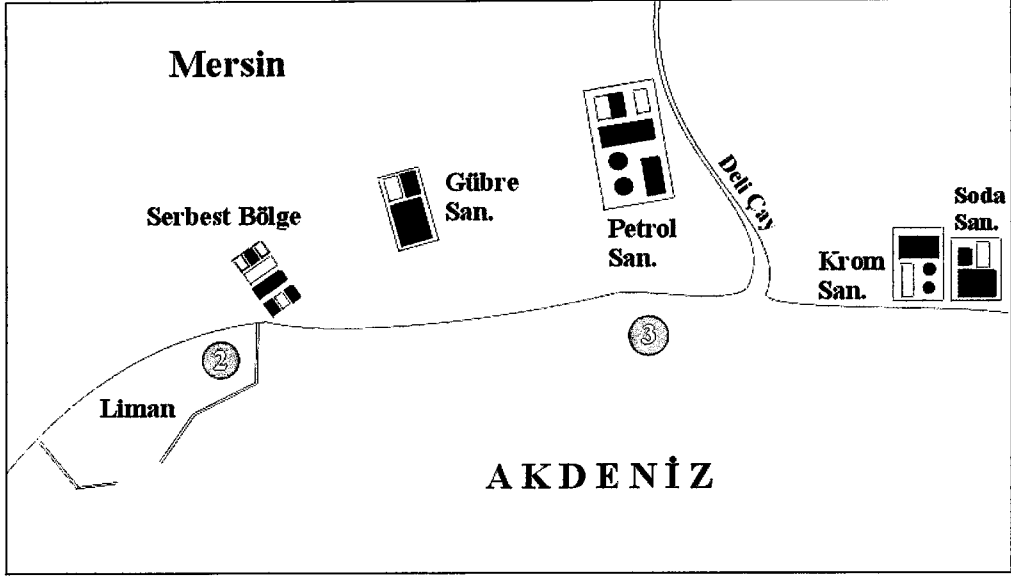
Erdemli sahili: Özellikle endüstriyel deşarjlar açısından Mersin limanı ve Karaduvar sahiline oranla göreceli olarak daha az kirli olan Erdemli sahili bu çalışmada referans bölge olarak kullanılmıştır.

Arazi örnekleme Karaduvar, Mersin ve Erdemli istasyonlarından bir yıllık süre içerisinde dört farklı mevsimde gerçekleştirilmiştir. Örnekleme zamanları:

- İlkbahar örnekleme (Mayıs)
- Yaz örnekleme (Temmuz)
- Sonbahar örnekleme (Ekim)
- Kış örnekleme (Şubat) olarak belirlenmiştir.

İn-situ çalışmalarda test organizması olarak yine ekonomik önemi olması yanında temin edilmesi kolay bir tür olan *Mugil cephalus* (Pisces: Mugilidae) seçilmiştir. Bunun yanında bu türün en kirli bölgelerde bile rahatlıkla yaşayabilen bir tür olması, vücudunda bulundurduğu kan miktarının fazla olması gibi diğer özellikleri de bu türü in-situ mikronükleus testi için avantajlı bir hale getirmektedir.

Mevsimsel örneklemede belirlenen her istasyondan 10'ar *Mugil cephalus* örneği yakalanmıştır. Her balıktan solungaç ve kan örnekleri alınmıştır. Kan örnekleri balıklar yakalanır yakalanmaz kuyruk damarından alınarak lamlara yayılmıştır. Solungaç ve kuyruk epitel örnekleri ise laboratuvara getirilerek gerekli preparasyon aşamalarından geçirilmişlerdir. Yakalanan her balıktan 5 adet kan, 5 adet solungaç ve 5 adet AgNOR preparatı hazırlanmıştır. Her preparatta ise Mikronükleus ve nükleus anomalileri için 1500 hücre değerlendirilmiştir. Arazi örneklemeinde toplam olarak 120 balık örneği analiz edilmiştir.



Şekil 3.1. İn-situ çalışmaların yapıldığı örnekleme istasyonları.

### 3.3. DENEYLERİN YAPILIŞI

#### 3.3.1. Mikronükleus Analizleri

Mikronükleus analizleri periferik kan eritrositlerinde ve solungaç epitel hücrelerinde olmak üzere iki farklı tipte hücre üzerinde gerçekleştirilmiştir.

##### 3.3.1.1. Periferik eritrositlerde mikronükleus testi

Kan örnekleri balıkların kuyruk yüzgeç damarlarından elde edilmiştir. Alınan kan örnekleri önceden hazırlanmış olan temiz lamlara ince bir tabaka oluşturacak şekilde yayılmışlardır. Hazırlanan preparatlar havada kurutulduktan sonra % 95'lik etanolde 30 dk süresince fikse edilmişlerdir. Fikse edilen preparatlar tekrar kurutulduktan sonra % 5'lik Giemsa solüsyonunda 20 dk süresince boyanmışlardır. Boyama işleminden sonra preparatlar saf sudan geçirilerek fazla boyanın atılması sağlanarak mikroskop altında değerlendirmeye alınmışlardır.

##### 3.3.1.2. Solungaç epitel hücrelerinde mikronükleus testi

Solungaç yayları bir pens yardımı ile alındıktan sonra 10 dk süresince % 15'lik asetik asit çözeltisi içerisinde bekletilmiştir. Epitel hücreleri bir bisturi yardımı ile solungaç yaylarından uzaklaştırılarak bir saat camı içerisine toplanmışlardır. Daha sonra tüplere aktarılan hücreler 10 dk. süresince distile su ile santrifüj edilmişlerdir. Bir sonraki aşamada hücreler 3:1 oranındaki metanol asetik asit karışımından oluşan karnoy çözeltisinde fikse edilmişlerdir. Son olarak fikse edilen hücreler temiz lamlara yayıldıktan sonra havada kurutulan preparatlar % 5'lik Giemsa çözeltisinde 30 dk süresince boyanmışlardır.

##### 3.3.1.3. Mikronükleus sayım kriterleri

Hazırlanan preparatlarda zaman zaman boya partikülleri ve/veya diğer bazı kontaminant'lar nedeni ile mikronükleus ile karıştırılabilen yapılar ile

karşılaşılabilmektedir. Bu tip hataların elimine edilmesi için mikronükleus sayımlarında genel olarak standardize edilmiş bazı kriterler göz önüne alınmaktadır.

Bu kriterleri şöyle sıralayabiliriz;

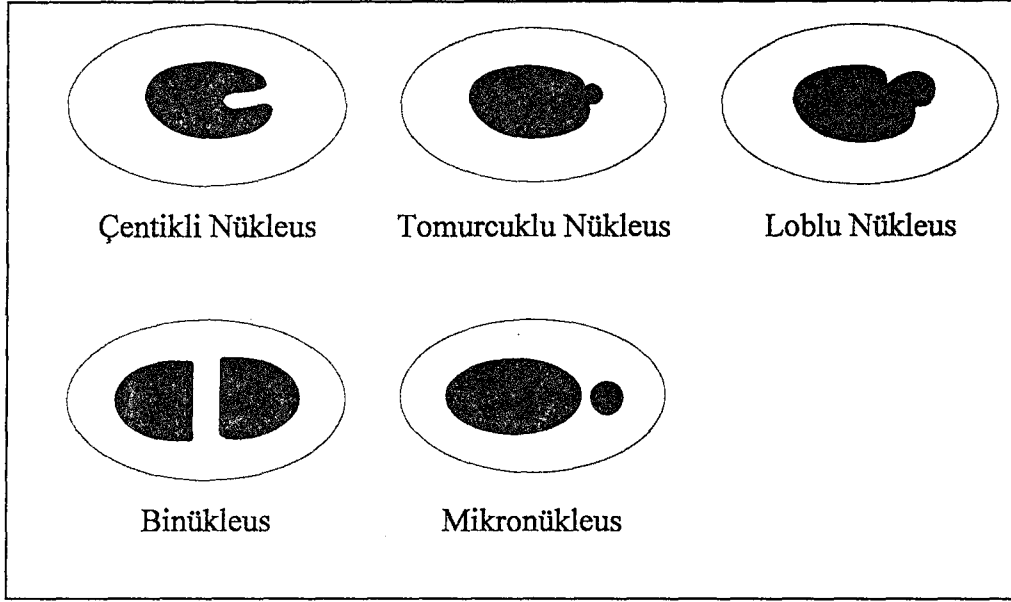
- Mikronükleus ana nükleus ile aynı mikroskopik refle'yi vermelidir.
- Mikronükleus ana nükleus ile aynı boyama tonuna sahip olmalıdır.
- Mikronükleus ana nükleus yanında bulunmalıdır.
- Bir mikronükleus ana nükleus'un 1/3'ünden daha küçük olmalıdır.
- Mikronükleus sayılacak hücre diğer hücrelerden izole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

### 3.3.2. Nükleus Anomalileri Analizi

Nükleus anomalileri periferik kan eritrositlerinde değerlendirilmiştir. Kuyruk damarından elde edilen kan, temiz preparatlara yayıldıktan sonra havada kurutulmuş, arkasından % 95'lik etanol'de 30 dk fikse edilmiştir. Hazırlanan yayma preparatlar daha sonra % 5'lik Giemsa çözeltisinde 30 dk boyanmışlardır.

Nükleus anomalileri Carrasco ve ark. [3]'a göre çentikli nükleus, tomurcuklanmış nükleus, loblu nükleus ve binükleus olmak üzere başlıca dört grup altında toplanarak değerlendirilmişlerdir. Mikronükleus ve diğer nükleus anomalileri şematik olarak Şekil 3.2'de gösterilmiştir.

- Çentikli Nükleus:** Nükleus zarında nükleus içerisine doğru oluşan, gözle belirgin bir biçimde ayırt edilebilen ve kromatin içermeyen çentik şeklindeki girintilere sahip nükleus yapısı.
- Tomurcuklu nükleus:** Nükleus zarından dışarı doğru çıkıntılar yapan, kromatin içeren küçük tomurcuklanmalara sahip nükleus yapısı.
- Loblu nükleus:** Tomurcuklara oranla daha büyük ve/veya daha fazla sayıda loblar içeren nükleus yapısı.
- Binükleus:** Bir hücre içerisinde iki adet nükleus bulunma durumu.



Şekil 3.2. Periferel eritrositlerde mikronükleus ve nükleus anomalileri.

### 3.3.3. İnterfaz AgNOR Analizleri

#### 3.3.3.1. Kuyruk epitel hücrelerinin preparasyonu

Balıkların kuyruk ucundan makas yardımı ile alınan epitel dokusu 3:1 metanol asetik asit karışımından oluşan karnoy fiksatif içeren 5 ml'lik şişelere aktarılmışlardır. Yarım saat sonra fiksatif değiştirilerek taze fiksatif eklenmiş ve şişeler analiz zamanına kadar buzdolabında saklanmışlardır.

Boyamadan kısa bir süre önce kuyruk epitel örnekleri fiksatiften çıkarılarak 30 dk için % 45'lik asetik asit çözeltisi içerisine aktarılmışlardır. Bu süre zarfında kimyasal olarak ayrıştırılan kuyruk epitel dokusu daha sonra temiz bir lam üzerine aktarılmış ve bir pens yardımı ile mekanik olarak parçalanarak hücrelerin tek bir tabaka halinde lam üzerine yayılması sağlanmıştır. Daha sonra havada kurutulan preparatlar boyama işlemi yapılana kadar saklanmışlardır.

### 3.3.3.2. Gümüş boyama yöntemi

İnterfaz AgNOR parametreleri kuyruk ucu epitel hücrelerinden elde edilen preparatlarda incelenmişlerdir. Bu amaçla nükleoluslar Howell ve Black [96]'in tekniğine göre gümüş nitrat ( $\text{AgNO}_3$ ) ile boyanmışlardır. Bu metod temelde iki farklı çözeltinin (gümüş nitrat ve jelatin) reaksiyona girmeleri sonucu interfaz nükleusundaki proteinlerin boyanmalarına dayanmaktadır

#### **Çözelti 1.** % 50'lik gümüş nitrat solüsyonu

50 mg  $\text{AgNO}_3$  + 100 ml distile su

Oldukça stabil bir yapıya sahip olan bu gümüş nitrat çözeltisi koyu renkli bir şişe içerisinde saklanmak koşulu ile yaklaşık olarak 4 hafta süresince kullanılabilir.

#### **Çözelti 2.** % 2'lik jelatin çözeltisi

2 mg Jelatin + 100 ml distile su + 2 ml formik asit

2 mg jelatin 100 ml su içerisine eklendikten sonra hot plate üzerinde yaklaşık 60 °C'ye kadar karıştırılarak ısıtılmak suretiyle jelatin tamamen eritilir. Bu elde edilen çözelti soğutulduktan sonra üzerine 2 ml formik asit eklenir. Hazırlanan çözelti stabil olmadığından dolayı birkaç gün içerisinde tüketilmeli ya da her seferinde taze olarak hazırlanmalıdır.

Hazırlanan preparatlar boyamadan önce 30°C sıcaklığa ayarlanmış olan hot plate üzerine yerleştirilmişlerdir. Daha sonra önce bir damla boyama çözeltisi 1'den daha sonra da üzerine bir damla boyama çözeltisi 2 den damlatılmıştır. Her iki boya çözeltisinin karışması için preparat üzerine bir lamel kapatılmıştır. Boya çözeltileri birbirine karıştıktan sonra ısı etkisiyle bir renk değişimi reaksiyonu gerçekleşmeye başlar ve bu süreçte nükleoluslardaki proteinler gümüş nitrat ile reaksiyona girerek boyanma işlemi gerçekleştirilmiş olur. Boya çözeltisi karışımının rengi yaklaşık olarak koyu yeşil-siyah arasında bir ton aldığında preparatlar çeşme suyundan

geçirilerek lam ve fazla boya uzaklaştırıldıktan sonra hücreler mikroskop altında incelenir. Eğer boyama yeteri kadar iyi değil ise aynı boyama işlemi tekrarlanabilir.

### 3.3.3.3. İncelenen AgNOR parametreleri

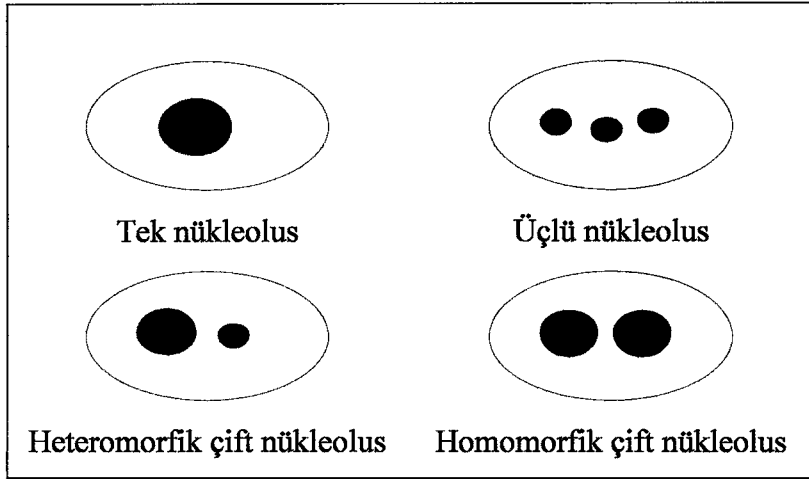
Gümüş nitrat ile boyanan kuyruk epitel hücrelerinin interfaz nükleuslarında incelenen morfolojik AgNOR parametreleri Arkhipchuk ve Garanko [93]'ya göre sınıflandırılarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.3, Şekil 3.4) Bu parametreler ;

Heteromorfik çift nükleolus (ÇNhet): Çift nükleolus içeren interfaz hücrelerinde nükleoluslar görsel olarak eşit büyüklükte ya da farklı büyüklükte olup olmamalarına bakılarak sınıflandırılmışlardır. Farklı büyüklükte olan çift nükleoluslar heteromorfik, yaklaşık olarak eşit büyüklükte olan çift nükleoluslar ise homomorfik olarak değerlendirilmiştir. Toplam sayımda da heteromorfik çift nükleolusların yüzde cinsinden oranı istatistiksel olarak değerlendirmeye alınmıştır.

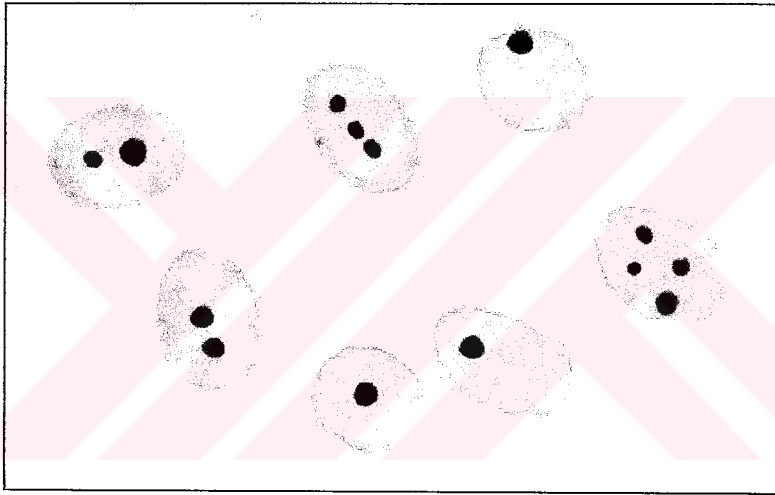
Hücre başına düşen nükleolus sayısı (Ns): Balıklarda kuyruk epitel hücreleri hücre başına yaklaşık olarak 1-4 arasında değişen sayıda nükleolus içermektedir. Bir nükleus içerisindeki AgNOR sayısı aktif haldeki nükleolus sayısının bir göstergesidir. Hücre başına düşen ortalama nükleolus sayısını belirlemek için sayılan toplam nükleolus sayısı incelenen nükleus sayısına bölünmektedir. Bu çalışmada her preparat başına ortalama 600 nükleus analiz edilmiştir.

Tek nükleolus hacmi (1Nh): Bir nükleolus içeren hücrelerde nükleolusun hacimsel büyüklüğü bize o nükleolusun aktivasyon durumu hakkında bilgi vermektedir. Ortalama tek nükleolus hacminin belirlenebilmesi için her preparattan yaklaşık olarak 200 civarında tek nükleolus taşıyan nükleus analiz edilmiştir. Bir oküler mikrometresi yardımı ile nükleolusların çapları mikrometre düzeyinde ölçüldükten sonra bu değer mikrometreküp ( $\mu\text{m}^3$ ) cinsinden hacim değerine çevrilmiştir.





Şekil 3.3. İnterfaz AgNOR parametrelerinin şematik olarak gösterimi.



Şekil 3.4. İnterfaz AgNOR parametrelerinin mikroskopik görüntüsü (1000x).

#### 3.3.4. İstatistik Analizler

Elde edilen bulguların istatistiksel değerlendirilmesinden önce Kolmogorov–Smirnov testi kullanılarak verilerin normal dağılıma uyup uymadıkları incelenmiştir. Normal dağılıma uyan verilerin grup olarak değerlendirilmesinde 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. Ortalama değerlerin ikili karşılaştırması için de t-testi kullanılmıştır.

## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1. BULGULAR

#### 4.1.1. Kontrollü Laboratuvar Çalışmaları

##### 4.1.1.1. Krom fabrikası atıklarının genotoksik etkileri

Bu çalışmada kullanılan krom sanayi atık su numunelerinin fabrikanın kendisinden temin edilen kimyasal analiz sonuçları, su kirliliği kontrol yönetmeliği değerleri ile karşılaştırmalı olarak çizelge 4.1'de verilmiştir. Elde edilen değerler karşılaştırıldığında atık su değerlerinin yönetmeliklerde belirlenen limit değerlerin altında olduğu görülmektedir. Kimyasal içerik açısından değerlendirildiğinde ise yağ, gres ve krom genotoksik potansiyele sahip bileşenler arasında sayılabilir.

Çizelge 4.1. Krom fabrikası endüstriyel arıtma çıkış suyu analiz değerleri.

Analiz Edilen Parametreler	Su Kirliliği Kontrol Yönetmeliği Değerleri	Ortalama Analiz Sonuçları
PH	6-9	7.3
BOI, mg/L	200	20
KOI, mg/L	400	150
Top. AKM mg/L	200	40
Yağ ve gres mg/L	20	6
Cr (VI) mg/L	0.5	(0)
Cr (III) mg/L	2	0.7
Fe, mg/L	10	1

Krom sanayi atıklarının %5, % 10 ve % 20 oranında seyreltilmiş dozlarına 3, 6 ve 9 günlük süreler ile maruz bırakılan *Oreochromis niloticus* örneklerinde yapılan analizler sonucunda periferik kan eritrositlerinde ve solungaç epitel hücrelerinde belirlenen ortalama mikronükleus frekansları çizelge 4.2'de verilmiştir. Buna göre, krom sanayi atıkları hem eritrositlerde hem de epitel hücrelerinde benzer şekilde, yalnızca % 20'lik dozda yapılan 6 ve 9 günlük uygulamalar sonucunda mikronükleus

frekanslarında anlamlı düzeyde bir artışa yol açmışlardır ( $P<0.05$ ). Buna göre 9 günlük uygulama için kontrol grubunda eritrosit mikronükleus frekansı ‰ 1.58 ve solungaç mikronükleus frekansı ‰ 1.84 iken bu oranlar % 20'lik dozdaki krom atığına maruz kalan örneklerde sırasıyla ‰ 2.91 ve ‰ 3,82 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Pozitif kontrol olarak kullanılan cyclophosphamide (CP) negatif kontrol grubuna oranla her üç doz ve sürede her iki dokuda da mikronükleus frekanslarında anlamlı düzeyde artışa yol açmıştır ( $P<0.001$ ). 9 günlük uygulama grubunda ‰ 1.84 olarak belirlenen solungaç mikronükleus frekansları, CP uygulanan gruplarda ‰ 9.09'a yükselmiştir. Gerek kontrol gerekse deney gruplarında solungaç epitel hücrelerindeki mikronükleus frekanslarının eritrositlerdekilere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Krom sanayi atıklarının uygulanması sonucunda *O. niloticus* periferik eritrositlerde belirlenen nükleus anomalilerinin frekansları Çizelge 4.3'de verilmiştir. Çizelge 4.3.'de görüldüğü üzere pozitif kontrol olarak kullanılan cyclophosphamide gerek ayrı ayrı tüm nükleus anomalileri, gerekse toplam nükleus anomalileri açısından anlamlı düzeyde bir artışa yol açmıştır. 6 günlük uygulamalarda ‰ 3.00 olarak belirlenen toplam nükleus anomali frekansı, cyclophosphamide uygulanması sonucunda ‰ 4.92'ye yükselmiştir. Krom sanayi atıkları ise sadece 6 günlük uygulamada kontrol grubunda ‰ 1.67 olarak belirlenen binükleuslu hücre frekansı, % 5 ve % 20'lik konsantrasyonlarda sırasıyla ‰ 2.75 ve ‰ 2.42'ye yükselmiştir. Ancak loblu, çentikli ve tomurcuklu nükleus frekanslarında anlamlı bir değişiklik belirlenmemiştir ( $P>0.05$ ).

Çizelge 4.2. Krom fabrikası atıklarına maruz bırakılan *O. niloticus* eritrosit ve solungaç hücrelerinde mikronükleus frekansları.

Uygulama grubu	Konsantrasyon	MN Frekansları (%)					
		3 gün		6 gün		9 gün	
		Eritrosit	Solungaç	Eritrosit	Solungaç	Eritrosit	Solungaç
Kontrol	-	1.72 ± 0.16	1.93 ± 0.12	1.42 ± 0.23	1.87 ± 0.19	1.58 ± 0.17	1.84 ± 0.22
Pozitif kontrol (CP)	4 mg/L	4.12 ± 0.28 <sup>b</sup>	9.84 ± 0.69 <sup>b</sup>	6.74 ± 0.46 <sup>b</sup>	7.24 ± 0.40 <sup>b</sup>	5.90 ± 0.83 <sup>b</sup>	9.09 ± 0.44 <sup>b</sup>
Krom sıvı atığı (v/v)	5 %	1.21 ± 0.12	1.54 ± 0.22	1.67 ± 0.11	2.10 ± 0.15	1.44 ± 0.17	1.80 ± 0.31
	10 %	1.84 ± 0.21	2.29 ± 0.41	1.54 ± 0.17	1.80 ± 0.21	1.62 ± 0.15	1.78 ± 0.76
	20 %	1.61 ± 0.24	2.05 ± 0.33	2.28 ± 0.23 <sup>a</sup>	3.25 ± 0.34 <sup>a</sup>	2.91 ± 0.33 <sup>a</sup>	3.82 ± 0.67 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> p<0.05; <sup>b</sup> p<0.001

Çizelge 4.3. Krom fabrikası atığına maruz bırakılan *O. niloticus* eritrositlerinde nükleus anomalileri (%). (BN: binükleus, LB: loblu nükleus, TM: tomurcuklu nükleus, ÇN: Çentikli nükleus; Toplam NA: Toplam nükleus anomalisi)

Nükleus Anomalileri	Süre	Kontrol	Pozitif Kontrol (CP)	Krom Sanayi Atığı (v/v)		
				5 %	10 %	20 %
BN	3 gün	1.56 ± 0.11	3.33 ± 0.18 <sup>c</sup>	1.40 ± 0.30	1.26 ± 0.12	1.66 ± 0.24
	6 gün	1.67 ± 0.09	4.59 ± 0.40 <sup>c</sup>	2.75 ± 0.11 <sup>a</sup>	1.70 ± 0.32	2.42 ± 0.29 <sup>a</sup>
	9 gün	1.25 ± 0.18	4.45 ± 0.60 <sup>c</sup>	1.17 ± 0.14	1.98 ± 0.22	1.35 ± 0.31
LB	3 gün	2.89 ± 0.23	2.76 ± 0.12	2.30 ± 0.28	2.47 ± 0.34	2.64 ± 0.42
	6 gün	2.25 ± 0.24	6.57 ± 0.74 <sup>c</sup>	2.74 ± 0.15	1.90 ± 0.26	1.80 ± 0.22
	9 gün	1.92 ± 0.67	6.51 ± 0.28 <sup>c</sup>	1.80 ± 0.21	2.17 ± 0.18	1.69 ± 0.25
TM	3 gün	2.06 ± 0.34	3.02 ± 0.62 <sup>a</sup>	2.01 ± 0.10	1.78 ± 0.22	2.54 ± 0.23
	6 gün	1.33 ± 0.05	1.95 ± 0.17 <sup>a</sup>	1.17 ± 0.17	1.42 ± 0.18	1.50 ± 0.32
	9 gün	2.08 ± 0.09	3.13 ± 0.42 <sup>b</sup>	1.72 ± 0.10	1.60 ± 0.31	2.41 ± 0.12
ÇN	3 gün	7.39 ± 0.31	8.97 ± 0.43 <sup>a</sup>	5.11 ± 0.62	6.10 ± 0.84	7.01 ± 1.41
	6 gün	6.75 ± 0.27	6.59 ± 0.50	5.27 ± 0.41	6.88 ± 0.31	7.20 ± 1.14
	9 gün	7.08 ± 0.14	8.24 ± 0.86	7.66 ± 1.13	6.48 ± 1.07	7.13 ± 0.23
Toplam NA	3 gün	3.48 ± 1.33	4.52 ± 1.49 <sup>c</sup>	2.71 ± 0.82	2.90 ± 1.09	3.46 ± 1.20
	6 gün	3.00 ± 1.26	4.92 ± 1.10 <sup>c</sup>	2.98 ± 0.85	2.98 ± 1.31	5.73 ± 3.83
	9 gün	3.08 ± 1.34	5.58 ± 1.13 <sup>c</sup>	3.09 ± 1.50	3.07 ± 1.14	3.15 ± 1.35

<sup>a</sup> p<0.05 <sup>b</sup> p<0.01 <sup>c</sup> p<0.001

Kontrol gruplarında belirlenen nükleus anomali kendi aralarında karşılaştırıldığında çentikli nükleus frekansı'nın en yüksek, binükleus frekansının ise en düşük oranda gerçekleştiği belirlenmiştir. Loblu ve tomurcuklu nükleus anomalileri ise yaklaşık olarak eşit oranda ve binükleus ile çentikli nükleus frekansı arasında yer almışlardır. Bu oranlar deney gruplarında da benzer şekilde belirlenmiştir.

Yine aynı dozlarda krom sanayi atıklarına maruz bırakılan *O. niloticus* kuyruk epitel hücrelerinde, belirlenen heteromorfik çift nükleolus (ÇNhet), hücre başına düşen nükleolus sayısı (Ns) ve ortalama tek nükleolus hacmi (1Nh) değerleri Çizelge 4.4.'de verilmiştir. Krom sanayi atıklarına 90 ve 180 dk maruz kalan *O. niloticus*'ların interfaz safhasındaki kuyruk epitel hücrelerinin AgNOR parametreleri incelendiğinde, ÇNhet, Ns ve 1Nh oranlarında en yüksek doz olan % 20'lik konsantrasyon dışında bir etkileşim olmadığı görülmektedir. Kontrol grubunda % 52.15 olan ÇNhet oranı % 20'lik dozda ve 180 dk'luk uygulama sonunda % 45.04'e düşmüştür ( $P<0.05$ ). Ns sayısı açısından bakıldığında kontrol grubunda 1.61 olarak belirlenen değer, 180 dk ve % 20'lik doz grubunda 1.31'e gerilemiştir ( $P<0.001$ ). 1NH değeri de benzer şekilde kontrol grubunda 5.07 iken yine 180 dk ve % 20'lik doz grubunda 3.01'e düşmüştür ( $P<0.001$ ). Pozitif kontrol olarak kullanılan Cyclophosphamide ise her üç AgNOR parametresinde de oldukça yüksek oranda düşüşe yol açmıştır ( $P<0.001$ ). Kontrol grubunda 52.15, 1.61 ve 5.07 olarak belirlenen ÇNhet, Ns ve 1NH değerleri 180 dk cyclophosphamide uygulaması sonucunda sırasıyla 38.83, 1.34 ve 4.00'a gerilemiştir ( $P<0.01$ ).

Çizelge 4.4. Krom fabrikası atığına maruz bırakılan *O.niloticus* kuyruk epitel hücrelerinde belirlenen interfaz AgNOR parametreleri (ÇNhet: Heteromorfik çift nükleolus, Ns; hücre başına düşen nükleolus sayısı, 1Nh; tek nükleolus hacmi).

Nükleolus Parametreleri	Süre (dk)	Kontrol	Pozitif Kontrol	Krom sanayi atığı (v.v.)		
				% 5	10 %	20 %
ÇNhet (%)	90	52.75 ± 1.21	43.66 ± 1.01 <sup>b</sup>	50.45 ± 1.27	55.12 ± 1.56	49.85 ± 1.75
	180	52.15 ± 1.29	38.83 ± 1.41 <sup>c</sup>	54.66 ± 2.29	50.24 ± 2.10	45.04 ± 1.43 <sup>a</sup>
Ns	90	1.60 ± 0.0	1.23 ± 0.04 <sup>c</sup>	1.54 ± 0.21	1.61 ± 0.10	1.42 ± 0.20 <sup>b</sup>
	180	1.61 ± 0.06	1.34 ± 0.02 <sup>c</sup>	1.66 ± 0.02	1.58 ± 0.02	1.31 ± 0.19 <sup>c</sup>
1Nh (µm <sup>3</sup> )	90	5.07 ± 0.16	3.27 ± 0.51 <sup>c</sup>	5.15 ± 0.22	4.90 ± 0.18	4.92 ± 0.10
	180	5.07 ± 0.14	4.00 ± 0.11	4.80 ± 0.04	3.75 ± 0.25 <sup>b</sup>	3.01 ± 0.08 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> P<0.05; <sup>b</sup> P<0.01; <sup>c</sup> p<0.001

#### 4.1.1.2. Petrol rafinerisi atıklarının genotoksik etkileri

Bu çalışmada genotoksik etkileri test edilen petrol rafinerisi atık su numunelerinin rafinerinin kendisinden temin edilen kimyasal analiz sonuçları, su kirliliği kontrol yönetmeliği değerleri ile karşılaştırmalı olarak çizelge 4.5'de verilmiştir. Çizelge 4.5'te de görüldüğü üzere ölçülen tüm kimyasal parametrelerin petrol atıkları yönetmeliğinde belirtilen limit değerlerin altındadır. Kimyasal içerik açısından bakıldığında petrol rafinerisi atıklarında genotoksik etki gösterebilecek olan başlıca bileşenler arasında fenol, krom, hidrokarbonlar sayılabilir.

Çizelge 4.5. Petrol rafinerisi atık suyu analiz değerleri.

Analiz Edilen Parametreler	Su Kirliliği Kontrol Yönetmeliği Değerleri	Ortalama Analiz Sonuçları
PH	6-9	8
BOI, mg/L	100	10.5
Top. AKM mg/L	120	29
Yağ ve gres mg/L	20	3.29
Cr (VI) mg/L	0.2	0.03
NH4-N mg/L	40	1.36
Fenol mg/L	2	0.07
Toplam siyanür mg/L	2	0.004
Kükürt mg/L	2	0.06
Total Hidrokarbon	15	2

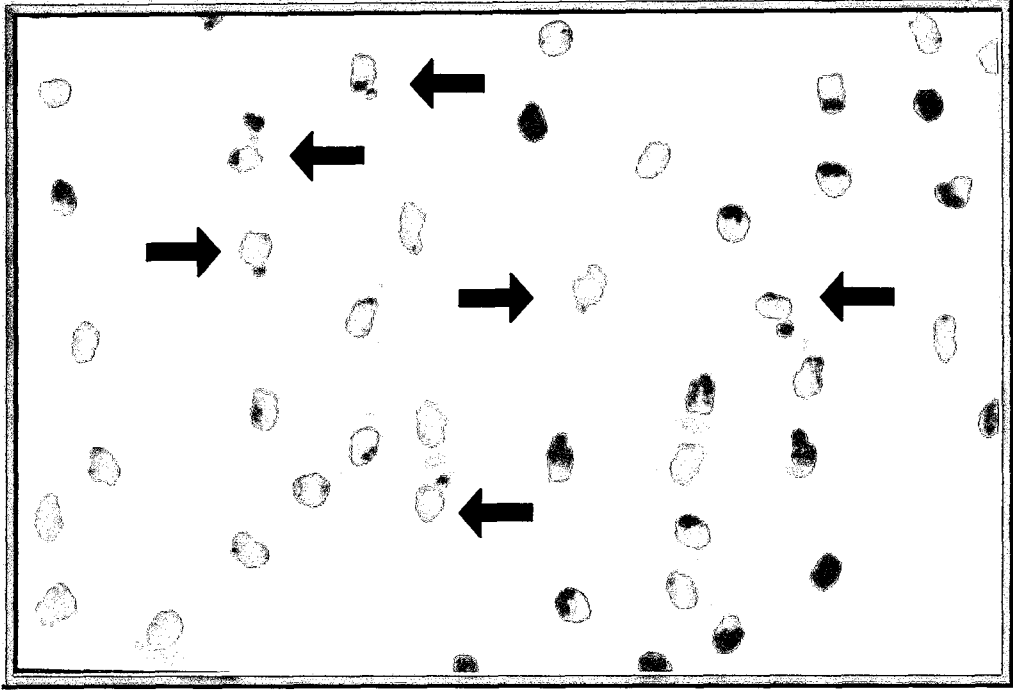
Petrol rafinerisi atıklarının %5, % 10 ve % 20 oranında seyreltilmiş dozlarına 3, 6 ve 9 günlük süreler ile maruz bırakılan maruz bırakılan *O. niloticus* örneklerinde yapılan analizler sonucunda periferik kan eritrositlerinde ve solungaç epitel hücrelerinde ortalama belirlenen mikronükleus frekansları Çizelge 4.6.'da verilmiştir. Çizelgede 4.6'da görüldüğü üzere, petrol rafinerisi atıkları en düşük doz olan % 5'lik konsantrasyonda, kontrol grubu (% 1.84) ile karşılaştırıldığında 9 gün sonunda solungaç epitel hücrelerindeki mikronükleus frekanslarında (% 2.6) anlamlı bir artışa yol açmıştır ( $P<0.05$ ). Bu konsantrasyon için diğer sürelerde anlamlı bir artışa rastlanmamıştır. %10'luk konsantrasyondaki 3 ve 6 günlük uygulamalarda ise eritrositlerde mikronükleus frekansında anlamlı bir farklılık oluşmazken, kontrol grubunda belirlenen orana (% 1.58) göre 9 günlük uygulamada eritrosit mikronükleus frekansında (% 2.29) istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). Aynı konsantrasyonda solungaç epitel hücreleri incelendiğinde ise kontrol gruplarına göre (% 1.93, % 1.87 ve % 1.84) hem 3 (% 2.86) hem de 6 (% 3.40) ve 9 (%3.41) günlük uygulamalarda istatistiksel olarak anlamlı artışların olduğu belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). En yüksek doz olan % 20'lik konsantrasyonda ise petrol rafineri atıkları hem eritrositlerde hem de solungaç epitel



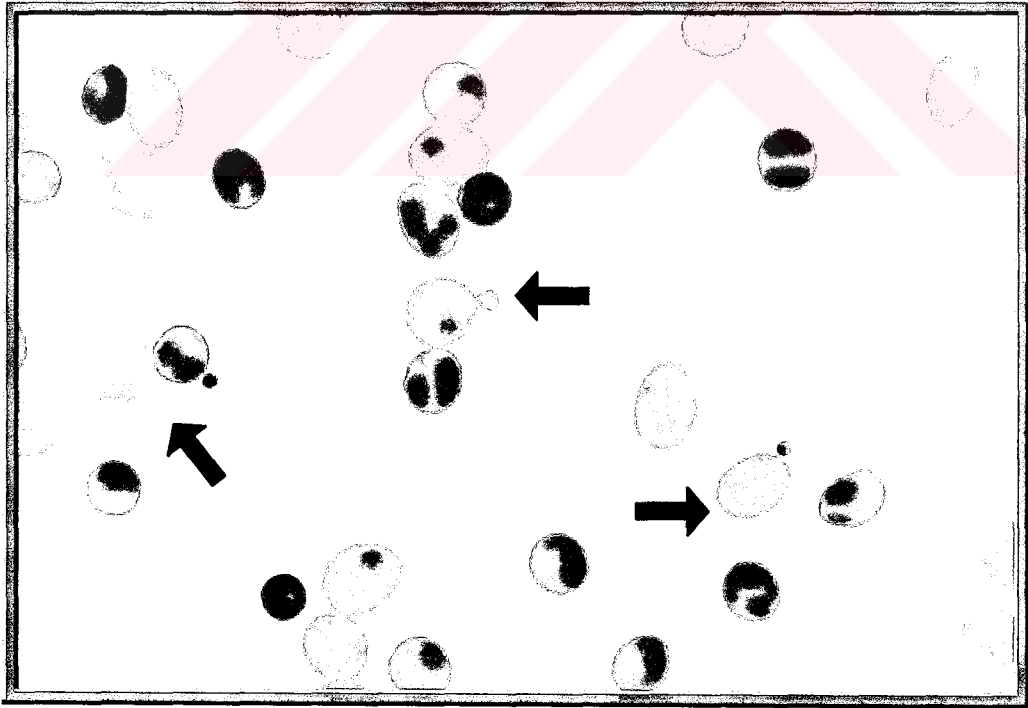
hücrelerinde her üç uygulama süresinde de istatistiksel olarak anlamlı artışlara yol açmıştır. Bu artışlar solungaç epitel hücrelerinde ( $P<0.01$ ) periferik kan eritrositlerine oranla ( $P<0.05$ ) daha yüksek olarak gerçekleşmiştir. Kontrol grubunda ‰ 1.58 ve ‰ 1.84 olarak belirlenen eritrosit ve solungaç mikronükleus frekansları en yüksek doz ve uygulama süresi olan % 20'lik konsantrasyonda sırasıyla ‰ 2.36 ve ‰ 3.83 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Kontrol grubunda solungaç epitel hücrelerindeki mikronükleus frekanslarının gerek kontrol gerekse deney gruplarında eritrosit hücrelerindekiyle daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu farklılığın özellikle doz uygulama gruplarında daha yüksek olduğu görülmektedir.

Petrol rafinerisi atıklarına maruz bırakılan *O. niloticus*'ların periferik kan eritrositlerinde belirlenen nükleus anomalilerinin frekansları çizelge 4.7'de verilmiştir. Nükleus anomalileri toplam olarak değerlendirildiğinde ise kontrol grubunda belirlenen ‰ 3.08'lik oranın, en yüksek doz olan % 20'lik konsantrasyonda ve 9 günlük uygulama süresinde ‰ 3.82'ye yükseldiği belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan cyclophosphamide uygulaması ise 9 gün sonunda toplam nükleus anomali frekansının ‰ 3.08 den ‰ 5.58'e çıkmasına yol açmıştır. Nükleus anomalileri ayrı ayrı değerlendirildiğinde de petrol rafineri atıklarının 9 günlük uygulamasında % 10 ve % 20'lik konsantrasyonda binükleuslu (BN) hücre frekansında anlamlı bir artışın olduğu belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). Loblu nükleus (LB) taşıyan hücre frekanslarında ise 3 günlük uygulamada yine % 10 ve % 20'lik dozlarda anlamlı bir artış belirlenmişken ( $P<0.05$ ), 6 günlük uygulamada yalnızca % 20'lik dozda anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir ( $P<0.01$ ). Dokuz günlük uygulamada ise hem % 10'luk ( $P<0.01$ ) hem de % 20'lik ( $P<0.05$ ) dozlarda anlamlı artış olduğu gözlenmiştir.

Petrol rafinerisi atıklarına maruz bırakılan *Oreochromis niloticus* periferik eritrositlerinde mikronükleus ve nükleus anomalileri, şekil 4.1'de, solungaç epitel hücrelerinde mikronükleus oluşumları şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. *O. niloticus* eritrositlerinde mikronükleus ve nükleus anomalileri (1000x).



Şekil 4.2. *O. niloticus* solungaç epitel hücrelerinde mikronükleus oluşumları (1000x).

Çizelge 4.6. Petrol rafinerisi atıklarına maruz bırakılan *O. niloticus* eritrosit ve solungaç hücrelerinde mikronükleus frekansları.

Uygulama grubu	Konsantrasyon	MN Frekansları (%)					
		3 gün		6 gün		9 gün	
		Eritrosit	Solungaç	Eritrosit	Solungaç	Eritrosit	Solungaç
Kontrol	-	1.72 ± 0.16	1.93 ± 0.12	1.42 ± 0.23	1.87 ± 0.19	1.58 ± 0.17	1.84 ± 0.22
Pozitif kontrol (CP)	2 mg/L	4.12 ± 0.28 <sup>c</sup>	9.84 ± 0.69 <sup>c</sup>	6.74 ± 0.46 <sup>c</sup>	7.24 ± 0.40 <sup>c</sup>	5.90 ± 0.83 <sup>c</sup>	9.09 ± 0.44 <sup>c</sup>
Petrol sıvı atığı (v/v)	5 %	1.78 ± 0.16	2.44 ± 0.12	1.74 ± 0.24	2.35 ± 0.19	1.81 ± 0.20	2.56 ± 0.18 <sup>a</sup>
	10 %	2.10 ± 0.11	2.86 ± 0.32 <sup>a</sup>	1.96 ± 0.20	3.40 ± 0.11 <sup>b</sup>	2.29 ± 0.13 <sup>a</sup>	3.41 ± 0.19 <sup>b</sup>
	20 %	2.70 ± 0.26 <sup>a</sup>	3.05 ± 0.30 <sup>b</sup>	2.68 ± 0.32 <sup>a</sup>	3.88 ± 0.41 <sup>b</sup>	2.36 ± 0.24 <sup>a</sup>	3.83 ± 0.57 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> p<0.05 <sup>b</sup> p<0.01 <sup>c</sup> p<0.001

Çizelge 4.7. Petrol rafinerisi atığına maruz bırakılan *O. niloticus* eritrositlerinde nükleus anomalileri (%). (BN: binükleus, LB: loblu nükleus, TM: tomurcuklu nükleus, ÇN: Çentikli nükleus; Toplam NA: Toplam nükleus anomalisi)

Nükleus Anomalileri	Süre	Kontrol	Pozitif Kontrol (CP)	Petrol Rafinerisi Atığı (v/v)		
				5 %	10 %	20 %
BN	3 gün	1.56 ± 0.11	3.33 ± 0.18 <sup>c</sup>	1.65 ± 0.24	1.62 ± 0.10	1.70 ± 0.27
	6 gün	1.67 ± 0.09	4.59 ± 0.40 <sup>c</sup>	1.60 ± 0.17	1.78 ± 0.30	1.80 ± 0.30
	9 gün	1.25 ± 0.18	4.45 ± 0.60 <sup>c</sup>	1.40 ± 0.22	2.11 ± 0.24 <sup>a</sup>	1.91 ± 0.24 <sup>a</sup>
LB	3 gün	2.89 ± 0.23	2.76 ± 0.12	3.41 ± 0.18	3.67 ± 0.22 <sup>a</sup>	3.84 ± 0.33 <sup>a</sup>
	6 gün	2.25 ± 0.24	6.57 ± 0.74 <sup>c</sup>	2.63 ± 0.21	2.45 ± 0.31	3.70 ± 0.12 <sup>c</sup>
	9 gün	1.92 ± 0.67	6.51 ± 0.28 <sup>c</sup>	2.25 ± 0.30	3.33 ± 0.28 <sup>c</sup>	2.84 ± 0.14 <sup>a</sup>
TM	3 gün	2.06 ± 0.34	3.02 ± 0.62 <sup>a</sup>	2.91 ± 0.19 <sup>a</sup>	2.45 ± 0.20	3.20 ± 0.28 <sup>b</sup>
	6 gün	1.33 ± 0.05	1.95 ± 0.17 <sup>a</sup>	1.85 ± 0.18	2.22 ± 0.22 <sup>a</sup>	2.54 ± 0.21 <sup>b</sup>
	9 gün	2.08 ± 0.09	3.13 ± 0.42 <sup>b</sup>	2.12 ± 0.14	2.60 ± 0.27	2.77 ± 0.15 <sup>a</sup>
ÇN	3 gün	7.39 ± 0.31	8.97 ± 0.43 <sup>a</sup>	6.24 ± 0.42	7.80 ± 0.51	7.66 ± 0.71
	6 gün	6.75 ± 0.27	6.59 ± 0.50	6.28 ± 0.91	6.95 ± 0.44	6.88 ± 0.67
	9 gün	7.08 ± 0.14	8.24 ± 0.86	7.05 ± 1.21	7.48 ± 0.87	7.76 ± 0.42
Toplam NA	3 gün	3.48 ± 1.33	4.52 ± 1.49 <sup>c</sup>	3.56 ± 1.25	3.89 ± 0.93 <sup>a</sup>	4.10 ± 1.15 <sup>a</sup>
	6 gün	3.00 ± 1.26	4.92 ± 1.10 <sup>c</sup>	3.08 ± 0.95	3.35 ± 1.02	3.73 ± 1.06 <sup>a</sup>
	9 gün	3.08 ± 1.34	5.58 ± 1.13 <sup>c</sup>	3.21 ± 0.73	3.88 ± 1.09 <sup>a</sup>	3.82 ± .69 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> p<0.05 <sup>b</sup> p<0.01 <sup>c</sup> p<0.001

Tomurcuklu nükleus taşıyan hücre frekansları 3 günlük uygulamada % 5 ( $P<0.05$ ) ve % 20'lik ( $P<0.01$ ), dozlarda, 6 günlük uygulamada % 10 ( $P<0.05$ ) ve % 20'lik ( $P<0.01$ ) dozlarda, 9 günlük uygulamada ise yalnızca % 20'lik dozda ( $P<0.05$ ) istatistiksel olarak anlamlı oranda artışların gerçekleştiği gözlenmiştir. Petrol rafinerisi atıklarının uygulanması eritrositlerde çentikli nükleus oluşumu üzerinde hiçbir doz ve uygulama süresinde anlamlı bir artışa yol açmamıştır ( $P>0,05$ ).

Petrol rafinerisi atıklarına maruz bırakılan *O. niloticus* kuyruk epitel hücrelerinde belirlenen interfaz AgNOR parametrelerine ait değerler Çizelge 4.8'de verilmiştir. Petrol rafinerisi atığı uygulaması hem 90 hem de 180 dk'lık uygulamalarda heteromorfik çift nükleolus yüzdesinde (ÇNhet) % 10 ve % 20'lik konsantrasyonlarda anlamlı oranda bir düşüşe yol açmıştır ( $P<0.05$ ). Kontrol grubunda 180 dk da belirlenen ÇNhet değeri % 52.15 iken bu değer % 20'lik petrol rafineri atığına maruz kalma sonucunda % 40.14'e düşmüştür. Benzer şekilde Hücre başına düşen ortalama nükleolus sayısında her iki uygulama süresinde de en yüksek iki doz olan %10 ve % 20'lik konsantrasyonlarda anlamlı oranda bir azalma olduğu gözlenmiştir ( $P<0.05$ ). Kontrol grubunda 1.61 olan Ns değeri % 20'lik uygulamada 1.40'a düşmüştür. Ortalama tek nükleolus hacminde ise 90 dk'lık uygulamalarda yalnızca en yüksek doz olan % 20'lik konsantrasyonda anlamlı bir azalma olduğu gözlenirken ( $P<0.01$ ), 180 dk'lık uygulamada hem % 5'lik konsantrasyonda ( $P<0.05$ ) hem de % 10 ve % 20'lik konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı oranda azalmaların olduğu belirlenmiştir ( $P<0.001$ ). 180 dk boyunca %20'lik dozda uygulama sonunda 1NH değeri 5.07 den 3.21'e düşmüştür.

Çizelge 4.8. Petrol rafinerisi atığına maruz bırakılan *O. niloticus* kuyruk epitel hücrelerinde interfaz AgNOR parametreleri. (ÇNhet: Heteromorfik çift nükleolus, Ns; hücre başına düşen nükleolus sayısı, 1Nh; tek nükleolus hacmi).

Nükleolus Parametreleri	Süre (dk)	Kontrol	Pozitif Kontrol	Krom sanayi atığı (v.v.)		
				% 5	10 %	20 %
ÇNhet (%)	90	52.75 ± 1.21	43.66 ± 1.01 <sup>b</sup>	50.24 ± 1.10	45.10 ± 1.86 <sup>a</sup>	46.35 ± 2.92 <sup>a</sup>
	180	52.15 ± 1.29	38.83 ± 1.41 <sup>c</sup>	50.10 ± 1.85	44.19 ± 1.91 <sup>a</sup>	40.14 ± 2.21 <sup>b</sup>
Ns	90	1.60 ± 0.0	1.23 ± 0.04 <sup>c</sup>	1.50 ± 0.20	1.40 ± 0.14 <sup>a</sup>	1.41 ± 0.17 <sup>a</sup>
	180	1.61 ± 0.06	1.34 ± 0.02 <sup>c</sup>	1.53 ± 0.11	1.43 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.40 ± 0.20 <sup>a</sup>
1Nh (µm <sup>3</sup> )	90	5.07 ± 0.16	3.27 ± 0.51 <sup>c</sup>	5.00 ± 0.21	4.60 ± 0.21	4.30 ± 0.20 <sup>b</sup>
	180	5.07 ± 0.14	4.00 ± 0.11 <sup>b</sup>	4.41 ± 0.13 <sup>a</sup>	3.33 ± 0.25 <sup>c</sup>	3.21 ± 0.19 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> P<0.05; <sup>b</sup> P<0.01; <sup>c</sup> p<0.001

#### 4.1.2. İn Situ Çalışmalar

Arazi çalışmalarında Karaduvar, Mersin Limanı ve referans bölge olarak kullanılan Erdemli'den ilkbahar, yaz, sonbahar ve kış sezonlarında yakalanan *Mugil cephalus* örneklerinin, solungaç ve eritrosit hücrelerinde belirlenen mikronükleus frekansları çizelge 4.9'da verilmiştir. Karaduvar ve Mersin limanından alınan örneklerdeki mikronükleus frekansları, referans bölge Erdemliden alınan örneklerden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (P<0.001). Buna göre yaz sezonunda Erdemli'den alınan örneklerdeki mikronükleus frekansları eritrositler için ‰ 2.07 ve solungaç hücreleri için ‰ 2.91 iken bu değerler eritrositler için Karaduvar'da ‰ 7.05 ve Mersin limanında ‰ 6.56, solungaç hücreleri içinse Karaduvar'da ‰ 6.69 Mersin limanında ‰ 10.52 olarak belirlenmiştir. Mikronükleus frekanslarının mevsimsel değişimleri şekil 4.3 ve 4.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. *Mugil cephalus* eritrositlerinde ve solungaç hücrelerinde belirlenen mikronükleus frekanslarının bölge ve mevsime göre değişimi.

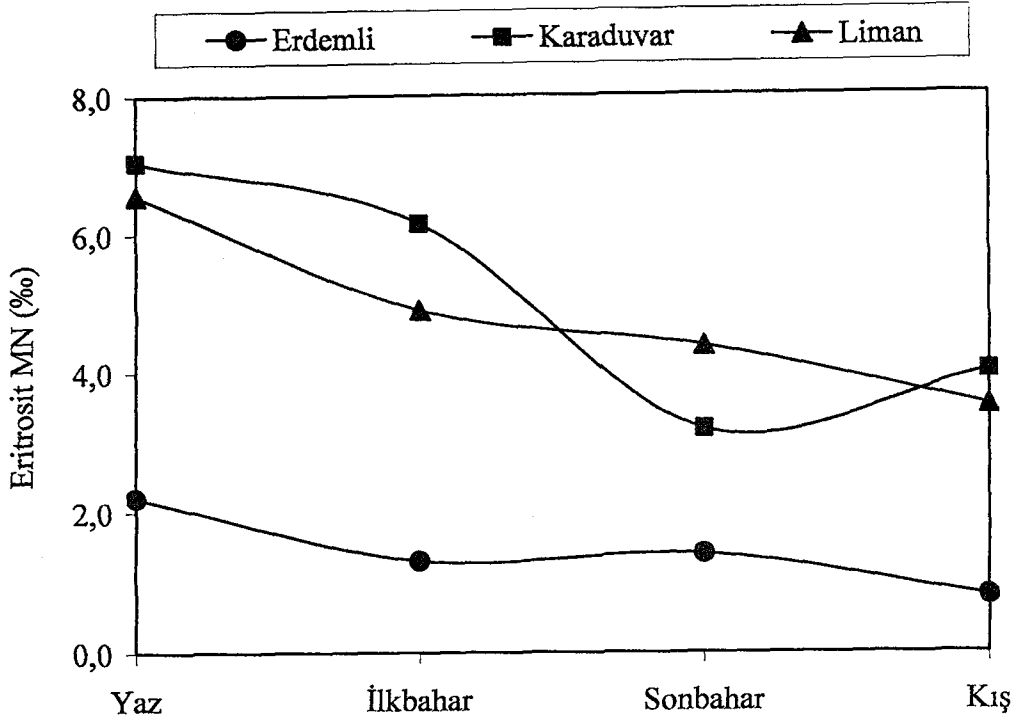
Bölge	Mevsim	Mikronükleus Frekansları (‰)	
		Eritrosit	Solungaç
Erdemli	Yaz	2,07 ± 0,16	2,91 ± 0,18
	İlkbahar	1,31 ± 0,10	2,51 ± 0,26
	Sonbahar	1,17 ± 0,08	1,84 ± 0,21
	Kış	0,82 ± 0,08	2,12 ± 0,26
Karaduvar	Yaz	7,05 ± 0,26 <sup>c</sup>	6,69 ± 0,30 <sup>c</sup>
	İlkbahar	6,23 ± 0,42 <sup>c</sup>	6,10 ± 2,42 <sup>c</sup>
	Sonbahar	3,17 ± 0,38 <sup>b</sup>	4,93 ± 0,37 <sup>c</sup>
	Kış	4,01 ± 0,44 <sup>c</sup>	5,02 ± 1,35 <sup>c</sup>
Mersin Limanı	Yaz	6,56 ± 0,19 <sup>c</sup>	10,52 ± 0,54 <sup>c</sup>
	İlkbahar	4,93 ± 0,25 <sup>c</sup>	8,91 ± 0,85 <sup>c</sup>
	Sonbahar	4,37 ± 0,18 <sup>c</sup>	6,07 ± 0,37 <sup>c</sup>
	Kış	3,52 ± 0,35 <sup>c</sup>	5,54 ± 0,53 <sup>c</sup>

<sup>b</sup> P<0,01; <sup>c</sup> P<0,001

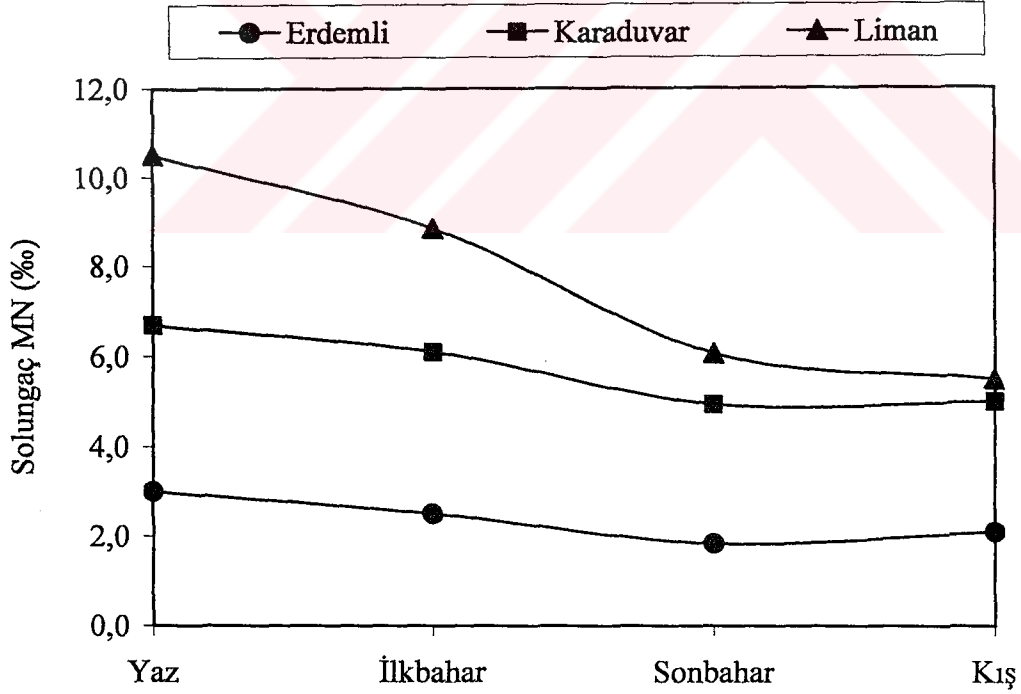
Her üç çalışma bölgesinde yakalanan *Mugil cephalus* örneklerinde belirlenen eritrosit ve solungaç mikronükleus frekansları toplam olarak kendi aralarında karşılaştırıldığında ise solungaç epitellerindeki mikronükleus frekanslarının eritrosit hücrelerindekiyle oranla anlamlı oranda yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. *Mugil cephalus* eritrosit ve solungaç epitel hücreleri arasındaki toplam mikronükleus frekanslarında görülen farklılıklar. (*a* *p*<0,05; *c* *p*<0,001)

Total MN (‰)	Erdemli	Karaduvar	Mersin Limanı
Eritrosit – Solungaç	1,34 – 2,35 <i>c</i>	5,11 – 5,70 <i>a</i>	4,85 – 7,76 <i>c</i>



Şekil 4.3. *Mugil cephalus* eritrositlerinde mikronükleus frekanslarının dağılımı.



Şekil 4.4. *Mugil cephalus* solungaç epitelinde mikronükleus frekanslarının dağılımı.



Eritrosit ve solungaç hücrelerinde belirlenen mikronükleus frekansları mevsimsel olarak karşılaştırıldıklarında ise, farklı anlam düzeylerinde olmakla birlikte, en yüksek mikronükleus frekansları yaz mevsiminde en düşük mikronükleus frekanslarının ise kış mevsiminde olduğu belirlenmiştir. Mevsimler kendi aralarında karşılaştırıldığında, özellikle eritrosit hücreleri açısından anlamlı farklılıkların olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.11). Mevsimler arası farklılıkların özellikle yaz - kış sezonu karşılaştırmalarında en yüksek ( $P < 0.001$ ), sonbahar – kış sezonları arasında en düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir. Solungaç epitel hücreleri açısından bakıldığında ise mevsimler arasındaki farklılıkların düzensiz olduğu ancak en yüksek farklılıkların yine yaz–kış ve yaz–sonbahar sezonları arasında olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.11. *Mugil cephalus* örneklerinde eritrosit mikronükleus frekanslarının mevsimsel farklılıkları (*a*  $p > 0,05$ ; *b*  $p < 0,01$ ; *c*  $p < 0,001$ ).

Eritrosit MN	Erdemli	Karaduvar	Mersin Limanı
Yaz – İlkbahar	<i>b</i>	-	<i>c</i>
Yaz – Sonbahar	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>
Yaz – Kış	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>
İlkbahar – Sonbahar	-	<i>c</i>	<i>a</i>
İlkbahar – Kış	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>
Sonbahar – Kış	<i>a</i>	-	-

Çizelge 4.12. *Mugil cephalus* örneklerinde solungaç mikronükleus frekanslarının mevsimsel farklılıkları (*a*  $p < 0,05$ ; *b*  $p < 0,01$ ; *c*  $p < 0,001$ ).

Solungaç MN	Erdemli	Karaduvar	Mersin Limanı
Yaz – İlkbahar	-	-	-
Yaz – Sonbahar	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>
Yaz – Kış	-	<i>b</i>	<i>c</i>
İlkbahar – Sonbahar	<i>a</i>	-	<i>a</i>
İlkbahar – Kış	-	-	<i>b</i>
Sonbahar – Kış	-	-	-

Nükleus anomalileri bölgesel toplam olarak incelendiğinde loblu nükleus frekanslarının Erdemli istasyonunda ‰ 0.34, Karaduvar'da ‰ 0.56, Mersin Limanında ise ‰ 0.73 olarak belirlenmiştir. Tomurcuklu nükleus frekansları, Erdemli'de ‰ 0.19, Karaduvar'da ‰ 0.62 ve Mersin Limanında ‰ 0.59 olarak belirlenmiştir. Çentikli nükleus frekansları Erdemli'de ‰ 0.48, Karaduvar'da ‰ 1.19 ve Mersin limanında ‰ 1,05 olarak belirlenmiştir. Binükleus frekansları incelendiğinde Erdemlide ‰ 0.71, Karaduvar'da ‰ 1.43 ve Mersin limanında ‰ 1.02 şeklindeki değerler elde edilmiştir. Eritrosit nükleus anomalilerinde örnekleme mevsimlerine ve bölgelere göre gözlenen değişiklikler Şekil 4.5, 4.6, 4.7 ve 4.8.'de gösterilmiştir (Çizelge 4.13).

*Mugil cephalus* eritrositlerinde mevsime ve çalışma istasyonlarına göre belirlenen ortalama loblu nükleus, tomurcuklu nükleus, çentikli nükleus ve binükleus frekansları Çizelge 4.14'de verilmiştir. Karaduvar ve Mersin Limanı bölgesinden yakalanan örneklerde, Karaduvar ilkbahar loblu nükleus frekansı hariç tüm nükleus anomalilerinin frekanslarının referans bölge olan Erdemli'den yakalanan örneklere göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek olduğu belirlenmiştir

*Mugil cephalus* eritrositlerindeki nükleus anomalileri toplam olarak mevsimlere göre karşılaştırıldıklarında yaz mevsimindeki frekansların diğer üç mevsime göre daha yüksek olduğu ve aradaki farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.15). Bu farklılıkların her üç örnekleme istasyonunda da özellikle yaz ve kış mevsimleri arasında en yüksek düzeyde olduğu görülmektedir ( $P<0.001$ ).

Çizelge 4.13. *Mugil cephalus* eritrositlerinde toplam nükleus anomalileri

Bölge	Toplam Eritrosit Nükleus Anomalileri (‰)			
	Loblu	Tomurcuklu	Çentikli	Binükleus
Erdemli	0.34	0.19	0.48	0.71
Karaduvar	0.56 <sup>a</sup>	0.62 <sup>c</sup>	1.19 <sup>c</sup>	1.43 <sup>c</sup>
Mersin Limanı	0.73 <sup>b</sup>	0.59 <sup>c</sup>	1.05 <sup>c</sup>	1.02 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>  $P<0,05$ ; <sup>b</sup>  $P<0,01$ ; <sup>c</sup>  $P<0,001$

Çizelge 4.14. *Mugil cephalus* eritrositlerinde belirlenen nükleus anomalileri.

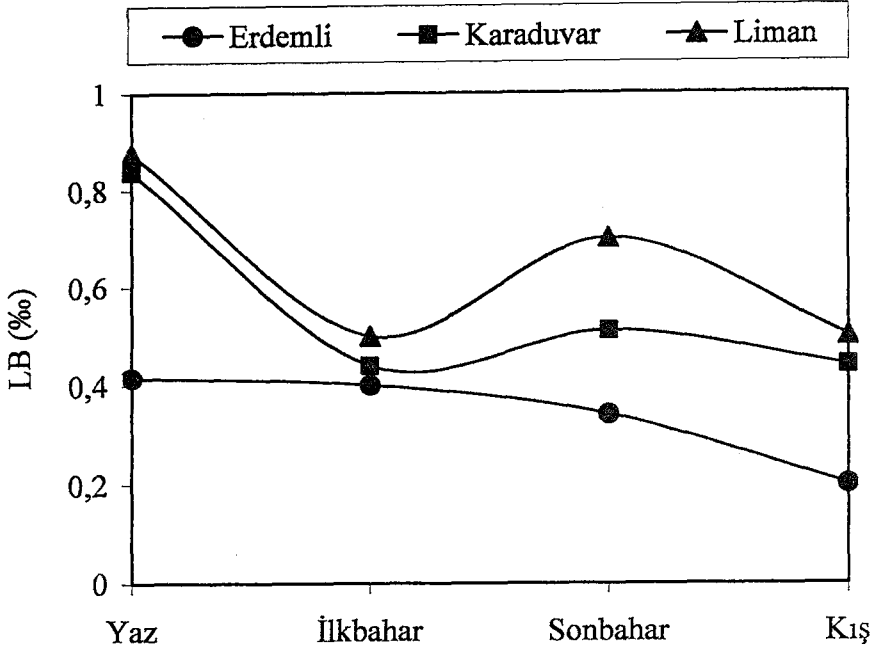
Bölge	Mevsim	Eritrosit Nükleus Anomalileri (%)			
		Loblu	Tomurcuklu	Çentikli	Binükleus
Erdemli	Yaz	0,42 ± 0,17	0,25 ± 0,14	1,33 ± 0,13	0,78 ± 0,13
	İlkbahar	0,40 ± 0,13	0,10 ± 0,03	0,08 ± 0,03	0,80 ± 0,21
	Sonbahar	0,34 ± 0,06	0,20 ± 0,09	0,45 ± 0,18	0,75 ± 0,23
	Kış	0,20 ± 0,07	0,20 ± 0,06	0,05 ± 0,02	0,50 ± 0,13
Karaduvar	Yaz	0,84 ± 0,14 <sup>b</sup>	0,80 ± 0,20 <sup>c</sup>	1,70 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,75 ± 0,52 <sup>b</sup>
	İlkbahar	0,44 ± 0,21	1,10 ± 0,05 <sup>c</sup>	0,73 ± 0,21 <sup>c</sup>	1,00 ± 0,02
	Sonbahar	0,51 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,11	1,33 ± 0,33 <sup>c</sup>	1,96 ± 0,21 <sup>b</sup>
	Kış	0,44 ± 0,10 <sup>b</sup>	0,36 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,00 ± 0,03 <sup>c</sup>	1,02 ± 0,04 <sup>b</sup>
Mersin Limanı	Yaz	0,88 ± 0,28 <sup>b</sup>	0,64 ± 0,07 <sup>b</sup>	1,58 ± 0,11	1,57 ± 0,58 <sup>b</sup>
	İlkbahar	0,80 ± 0,15 <sup>b</sup>	0,60 ± 0,22 <sup>c</sup>	0,60 ± 0,31 <sup>c</sup>	0,90 ± 0,36
	Sonbahar	0,75 ± 0,25 <sup>b</sup>	0,68 ± 0,14 <sup>c</sup>	1,20 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,70 ± 0,19
	Kış	0,50 ± 0,14 <sup>b</sup>	0,45 ± 0,18 <sup>b</sup>	0,80 ± 0,36 <sup>c</sup>	0,90 ± 0,27 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P<0,05; <sup>b</sup>P<0,01; <sup>c</sup>P<0,001

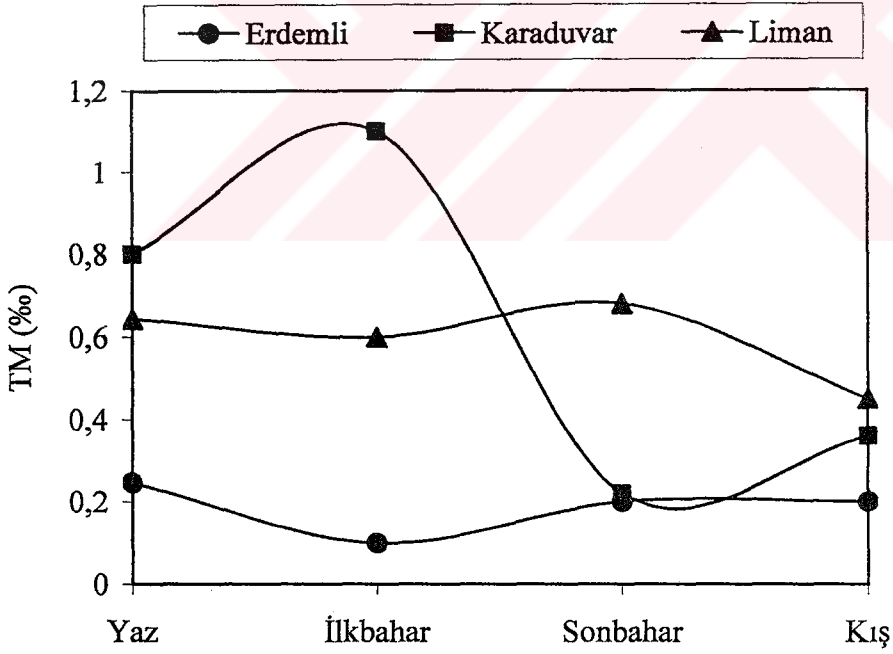
Çizelge 4.15. *Mugil cephalus* örneklerinde toplam eritrosit nükleus anomali frekanslarının mevsimlere göre gösterdikleri istatistiksel farklılıklar.

Mevsim Eşleşmeleri	Toplam Nükleus Anomalisi (LB+TM+ÇN+BN) (%)		
	Erdemli	Karaduvar	Mersin Limanı
Yaz – İlkbahar	2.78 – 1.38 <sup>b</sup>	5.09 – 3.27 <sup>b</sup>	4.67 – 2.90 <sup>b</sup>
Yaz – Sonbahar	2.78 – 1.74 <sup>a</sup>	5.09 – 4.02 <sup>a</sup>	4.67 – 3.33 <sup>a</sup>
Yaz – Kış	2.78 – 0.98 <sup>c</sup>	5.09 – 2.82 <sup>c</sup>	4.67 – 2.65 <sup>c</sup>
İlkbahar – Sonbahar	1.38 – 1.74	3.27 – 4.02	2.90 – 3.33
İlkbahar – Kış	1.38 – 0.98	3.27 – 2.82	2.90 – 2.65
Sonbahar – Kış	1.74 – 0.98 <sup>a</sup>	4.02 – 2.82 <sup>a</sup>	3.33 – 2.65

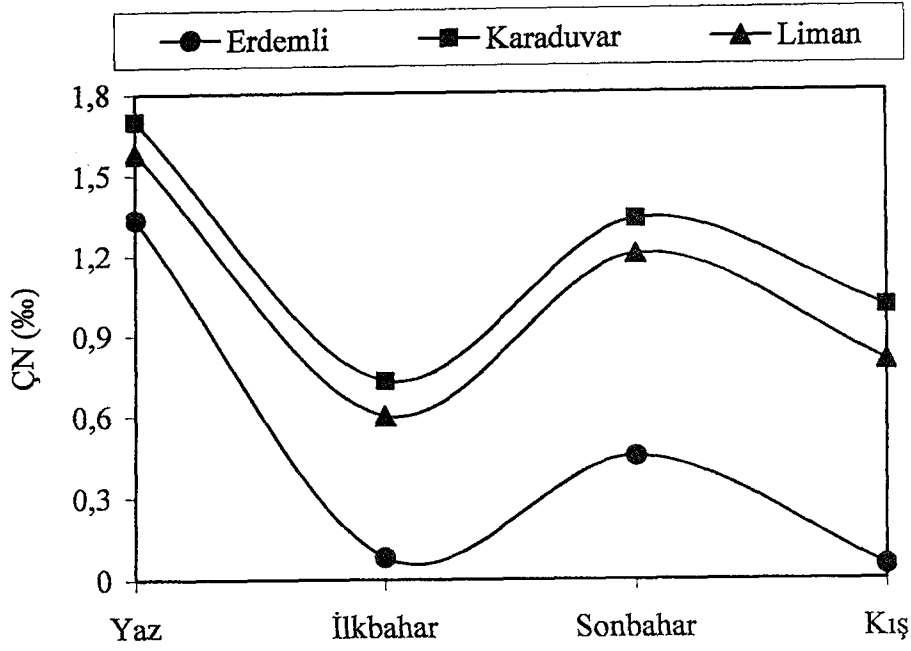
<sup>a</sup>p<0.05; <sup>b</sup>p<0.01; <sup>c</sup>p<0.001



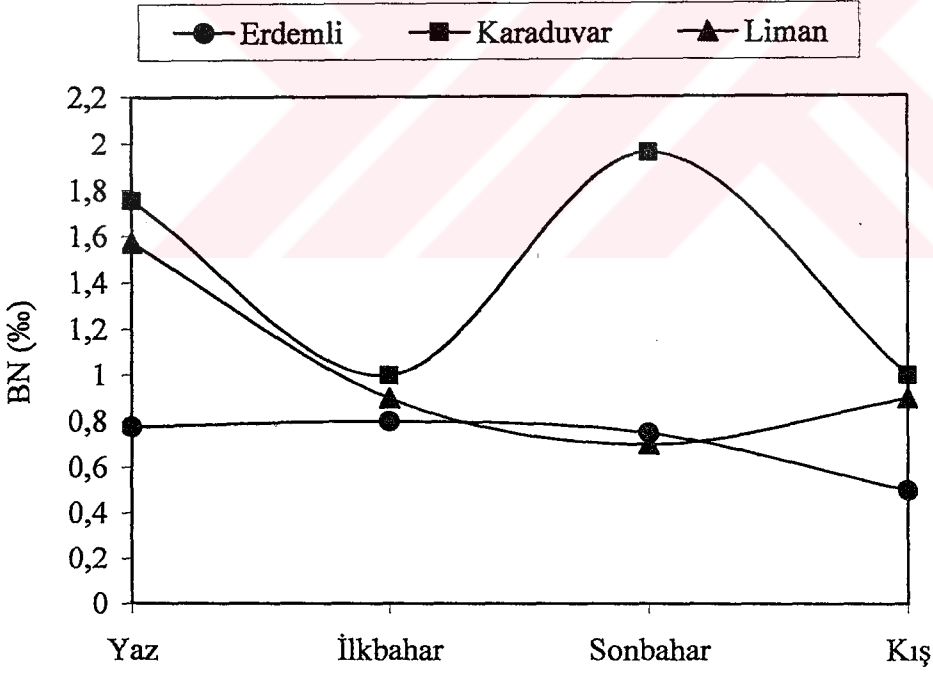
Şekil 4.5. *Mugil cephalus* eritrositlerinde loblu nükleus frekanslarının dağılımı.



Şekil 4.6. *Mugil cephalus* eritrositlerinde tomurcuklu nükleus frekanslarının dağılımı.



Şekil 4.7. *Mugil cephalus* eritrositlerinde çentikli nükleus frekanslarının dağılımı.



Şekil 4.8. *Mugil cephalus* eritrositlerinde binükleus frekanslarının dağılımı.

Erdemli, Karaduvar ve Mersin Limanından yakalanan *Mugil cephalus* örneklerinin kuyruk epitel hücrelerinde ilkbahar, yaz sonbahar ve kış mevsimlerinde belirlenen ortalama interfaz AgNOR parametreleri Çizelge 4.16’da verilmiştir. Heteromorfik çift nükleolus (ÇNhet) oranları incelendiğinde, Mersin Limanından yakalanan örneklerde yaz (% 72.21) ilkbahar (% 67.41) ve sonbahar (% 47.25) mevsimlerinde belirlenen değerlerin referans bölge olan Erdemliden yakalanan örneklere göre (yaz: % 62.12, ilkbahar: % 51.24, sonbahar: % 56.37) anlamlı oranda yüksek olduğu belirlenmiştir (P<0.05). Karaduvar bölgesinden yakalanan *Mugil cephalus* örneklerinin ise Erdemli örneklerine oranla ilkbahar (62,18) ve kış (50,22) mevsimlerinde anlamlı oranda yüksek değerlere gösterdiği belirlenmiştir (P<0.05). Bununla birlikte her üç bölgede de en yüksek düzeylerin yaz mevsiminde, en düşük yüzde değerlerin ise kış mevsiminde ortaya çıktığı görülmektedir.

Çizelge 4.16. *Mugil cephalus* kuyruk epitel hücrelerinde belirlenen interfaz AgNOR parametreleri (ÇNhet: Heteromorfik çift nükleolus, Ns; hücre başına düşen nükleolus sayısı, 1Nh; tek nükleolus hacmi).

Nükleolus Parametreleri	Mevsim	Bölge		
		Erdemli	Karaduvar	Mersin Limanı
ÇNhet	Yaz	62,12 ± 2,21	67,21 ± 2,36	72,21 ± 2,12 <sup>a</sup>
	İlkbahar	51,24 ± 3,25	62,18 ± 4,12 <sup>a</sup>	67,41 ± 1,25 <sup>a</sup>
	Sonbahar	56,37 ± 2,36	62,33 ± 3,33	66,29 ± 1,12 <sup>a</sup>
	Kış	40,25 ± 4,40	50,22 ± 3,25 <sup>a</sup>	47,25 ± 2,34
Ns	Yaz	1,56 ± 0,06	1,73 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,64 ± 0,04
	İlkbahar	1,40 ± 0,04	1,70 ± 0,09 <sup>b</sup>	1,71 ± 0,09 <sup>b</sup>
	Sonbahar	1,35 ± 0,06	1,60 ± 0,07 <sup>c</sup>	1,56 ± 0,05 <sup>b</sup>
	Kış	1,13 ± 0,04	1,22 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,30 ± 0,07 <sup>b</sup>
1Nh	Yaz	4,39 ± 0,25	5,51 ± 0,17 <sup>b</sup>	6,58 ± 0,27 <sup>c</sup>
	İlkbahar	5,12 ± 0,33	5,61 ± 0,35	5,66 ± 0,32 <sup>a</sup>
	Sonbahar	4,30 ± 0,24	5,50 ± 0,33 <sup>b</sup>	4,15 ± 0,28
	Kış	3,51 ± 0,24	4,22 ± 0,20 <sup>a</sup>	3,36 ± 0,17

<sup>a</sup> p<0,05; <sup>b</sup> p<0,01; <sup>c</sup> p<0,001

Hücre başına düşen ortalama nükleolus sayısı (Ns) açısından incelendiğinde ise, Karaduvar bölgesinden yakalanan örneklerdeki ortalama sayının hem yaz (1.73) ve ilkbahar (1.70), hem de sonbahar (1.60) ve kış (1.22) sezonlarında Erdemli bölgesinden yakalanan örneklerde belirlenenlere (1.56, 1.40, 1.35 ve 1.13) göre anlamlı oranda yüksek olduğu belirlenmiştir. Mersin Limanından alınan örneklerde belirlenen değerler de yaz mevsimi hariç diğer tüm mevsimlerde Erdemli örneklerine oranla anlamlı oranda yüksek olarak bulunmuşlardır ( $P<0,01$ ).

Ortalama tek nükleolus hacmi (1Nh) açısından yapılan değerlendirmelerde, Karaduvar bölgesinde belirlenen ortalama değerlerin yaz ( $5,51 \mu\text{m}^3$ ), sonbahar ( $5,53 \mu\text{m}^3$ ) ve kış ( $4,22 \mu\text{m}^3$ ) mevsimlerinde Erdemli’de belirlenen değerlere ( $4,39, 4,30$  ve  $3,51 \mu\text{m}^3$ ) oranla anlamlı düzeyde yüksek olduğu ortaya çıkarılmıştır ( $P<0,01$ ). Mersin Limanında belirlenen değerlerin ise yaz ( $6,58 \mu\text{m}^3$ ) ve ilkbahar ( $5,66 \mu\text{m}^3$ ) mevsimlerinde, referans bölge Erdemli’den elde edilen değerlere oranla anlamlı olarak yüksek olduğu belirlenmiştir ( $P<0,05$ ).

*Mugil cephalus* kuyruk epitel hücrelerinde belirlenen heteromorfik çift nükleolus yüzdesi, hücre başına düşen ortalama nükleolus sayısı ve ortalama tek nükleolus hacmi değerlerinin örnekleme bölgeleri ve örnekleme mevsimlerine göre değişimleri şekil 4.9’da gösterilmiştir.

Nükleolus parametreleri toplam olarak mevsimlere göre karşılaştırıldıklarında elde edilen veriler çizelge 4.17’de verilmiştir. Heteromorfik çift nükleolus yüzdesi açısından yaz-kış ( $P<0.001$ ), ilkbahar-kış ( $P<0.01$ ) ve sonbahar-kış ( $P<0.01$ ) mevsimleri arasındaki anlamlı farklılıkların olduğu belirlenmiştir. Hücre başına düşen ortalama nükleolus sayısı açısından değerlendirildiğinde yaz-kış ( $P<0.001$ ), yaz-sonbahar ( $P<0.05$ ) sezonları ile ilkbahar-kış ( $P<0.001$ ) ve sonbahar-kış ( $P<0.01$ ) sezonları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Hücre başına düşen ortalama nükleolus sayısı açısında karşılaştırıldığında ise yaz-kış ( $P<0.001$ ), ilkbahar-sonbahar ( $P<0.05$ ), ilkbahar-kış ( $P<0.001$ ) ve sonbahar-kış ( $P<0.01$ ) mevsimleri arasındaki farklılıkların anlamlı olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.17. *Mugil cephalus* örneklerinde toplam interfaz AgNOR parametrelerinde mevsimlere göre gözlenen istatistiksel farklılıklar.

Mevsim	ÇNhet	Ns	1Nh
Yaz – İlkbahar	67.18 – 60.28	1.64 – 1.61	5.49 – 5.46
Yaz – Sonbahar	67.18 – 61.66	1.64 – 1.50 <sup>a</sup>	5.49 – 4.65
Yaz – Kış	67.18 – 45.91 <sup>c</sup>	1.64 – 1.22 <sup>c</sup>	5.49 – 3.70 <sup>c</sup>
İlkbahar – Sonbahar	60.28 – 61.66	1.61 – 1.50	5.46 – 4.65
İlkbahar – Kış	60.28 – 45.91 <sup>b</sup>	1.61 – 1.22 <sup>c</sup>	5.46 – 3.70 <sup>c</sup>
Sonbahar – Kış	61.66 – 45.91 <sup>b</sup>	1.50 – 1.22 <sup>b</sup>	4.65 – 3.70 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> p<0,05; <sup>b</sup> p<0,01; <sup>c</sup> p<0,001

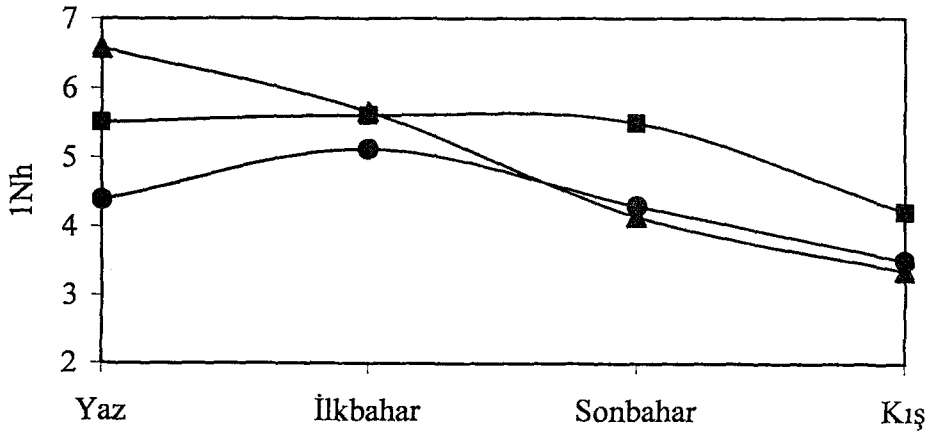
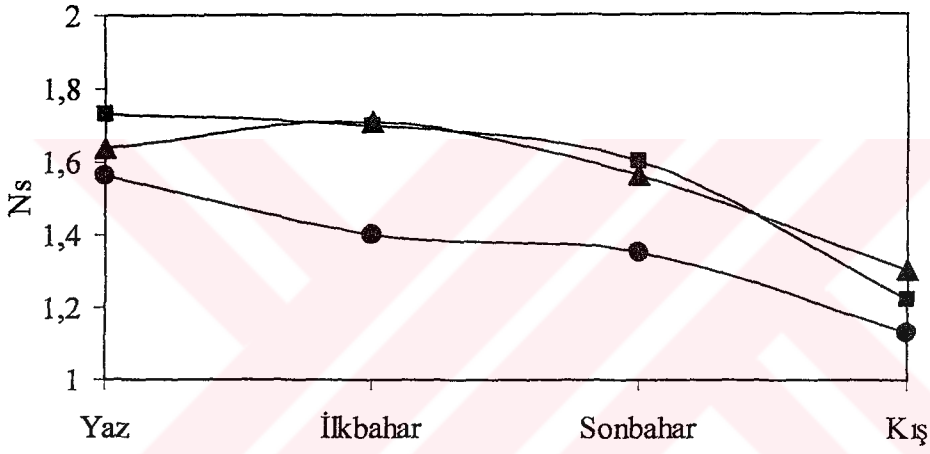
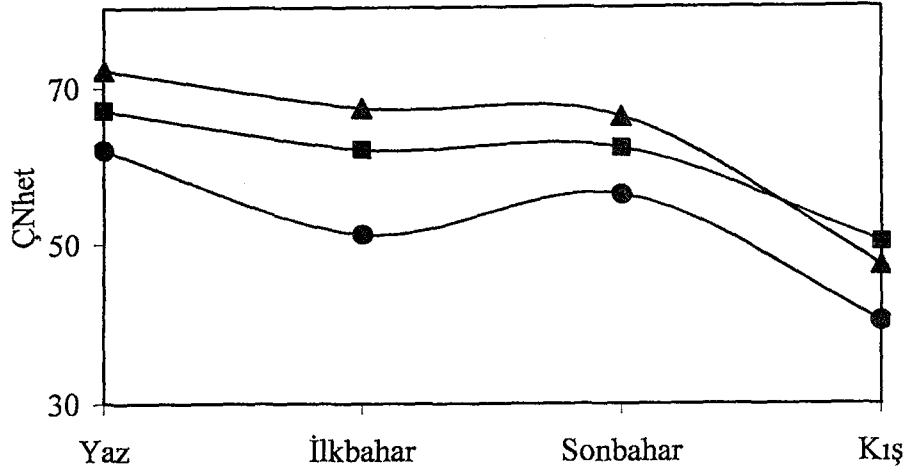
Nükleolus parametrelerinin toplam olarak bölgelere göre karşılaştırılması ile elde edilen veriler ise çizelge 4.18’de verilmiştir. Buna göre her üç AgNOR parametreside farklı düzeylerde olmakla birlikte, Karaduvar ve Mersin Limanlarında, referans bölge olan Erdemliye göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksektir. Bununla birlikte iki deney bölgesi olan Karaduvar ve Mersin Limanı bölgeleri interfaz AgNOR kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemektedirler.

Çizelge 4.18. Farklı mevsimlerde yakalanan *Mugil cephalus* örneklerinde belirlenen toplam interfaz AgNOR parametrelerinde bölgelere göre gözlenen istatistiksel farklılıklar.

Mevsim Eşleşmeleri	ÇNhet	Ns	1Nh
Erdemli – Karaduvar	52.50 – 60.49 <sup>a</sup>	1.36 – 1.56 <sup>b</sup>	4.33 – 5.21 <sup>a</sup>
Erdemli – Mersin L.	52.50 – 63.29 <sup>a</sup>	1.36 – 1.55 <sup>b</sup>	4.33 – 5.94 <sup>b</sup>
Karaduvar – Mersin L.	60.49 – 63.29	1.56 – 1.55	5.21 – 5.94

<sup>a</sup> p<0,05; <sup>b</sup> p<0,01





—●— Erdemli    —■— Karaduvar    —▲— Liman

Şekil 4.9. *Mugil cephalus* kuyruk epitel hücrelerinde interfaz AgNOR parametrelerinin dağılımı.

## 4.2. TARTIŞMA

### 4.2.1. Kontrollü Laboratuvar Çalışmaları

Kontrollü laboratuvar çalışmalarında, endüstriyel kuruluşların atık borularından direkt olarak alınan örnekler laboratuvar koşulları altında standart şartlar sağlanarak ve kontrol grubu oluşturularak test edilmişlerdir. Endüstriyel atıkların genotoksik etkilerinin laboratuvar ortamında test edilmesinde balıkların etkin bir şekilde kullanılabileceği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Pacheco ve Santos [36], kağıt endüstrisi atıklarını laboratuvar şartlarında *Anguilla anguilla* üzerinde incelemiş ve uygulama dozu ve süreye bağlı olarak eritrosit mikronükleus frekanslarında anlamlı oranda artışın gözlemlendiğini bildirmiştir. Başka bir çalışmada Marlasca ve ark. [42], yine laboratuvar şartlarında tekstil sanayi atıklarına maruz bıraktıkları *Oncorhynchus mykiss* örneklerinde periferik eritrositlerinde mikronükleus frekanslarının arttığını bildirmiştir. Yine bira ve tekstil atıklarına maruz bırakılan *Clarias lazera* örneklerinin periferik eritrositlerdeki mikronükleus frekanslarında artış olduğu bildirilmiştir [43]. Yapılan çalışmalarda test organizması olarak kullanılan balıkların iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada ise metal ve petrol sanayi tesislerine ait sıvı atıkların *Oreochromis niloticus* üzerindeki genotoksik etkileri incelenmiş ve bu türün laboratuvar çalışmalarında kullanışlı ve genotoksik etkilere duyarlı bir test organizması olduğu ortaya çıkarılmıştır.

#### 4.2.1.1. Krom fabrikası atıklarının genotoksik etkileri

Bu çalışmada krom bileşikleri üreten bir sanayi kuruluşunun deşarj borularından alınan sıvı atıkların, farklı konsantrasyon ve sürelerde *Oreochromis niloticus* örneklerine uygulanması ile periferik eritrositlerde mikronükleus ve nükleus anomalilerinde, solungaç epitel hücrelerinde mikronükleus frekanslarında ve kuyruk epitel hücreleri nükleoluslarında interfaz AgNOR parametrelerinde meydana gelen değişimler incelenmiştir.

Krom, bugüne kadar üzerinde en çok durulan ağır metallere biri olmuştur. Bunun sebebi, gerek çevresel açıdan gerekse mesleki açıdan kromun, özellikle de altı değerlikli krom olarak adlandırılan Cr(VI)'nın, oldukça önemli bir mutajen ve

karsinogen madde olmasıdır [97]. Kanser oluşturabileceği ilk kez 1890 yılında belirlenen Cr(VI), kanserojen olarak tanımlanan ilk kimyasallardan biridir [98]. Yapılan çalışmalar Cr(VI)'ya maruz kalma durumunda akciğer kanseri riski'nin 18 ila 80 kat arttırdığını göstermiştir. Laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan toksikoloji çalışmalarında da Cr(VI)'nın tümör oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir [99]. Bunun yanında yapılan in-vivo ve in-vitro genotoksisite çalışmalarında, Cr(VI)'nın kromozom aberasyonu, mikronükleus, kardeş kromatid değişimi (SCE), DNA iplik kırıkları gibi genetik hasarların oluşumunu indüklediği ortaya konulmuştur [100-102].

Hücre içerisine kolayca geçebilmesi ve Cr(III)'e indirgenme reaksiyonları nedeni ile krom genotoksisitesine yönelik çalışmalar genelde Cr(VI) bileşikleri üzerinde yürütülmektedir. Hücresel düzeyde Cr(VI) bir kromat oksid-anyonu olarak bulunur ( $CrO_4^{2-}$ ), hücre içerisine sülfat iyon taşıyıcısı aracılığı ile girer ve plazma membranını geçtikten sonra, Cr(VI) en stabil hali olan üç değerlikli krom'a yani Cr(III) formuna dönüşmek üzere hızlı bir şekilde metabolik indirgenme reaksiyonuna girer [103, 104]. Cr(VI) direkt olarak nükleik asitlere karşı fazla bir yönelim göstermediği için, hücre içerisindeki bu indirgenme reaksiyonu krom genotoksisitesinin temelini teşkil etmektedir [104]. Cr(VI)'nın aksine Cr(III) hem nükleik asitlere hem de şeker fosfat iskeletine karşı yüksek bir çekime sahiptir. Cr(III)'ün direkt olarak DNA'ya bağlanmak suretiyle DNA adduct'ları ile DNA-DNA ya da DNA-protein çapraz bağlantıları (cross-links) oluşturabildiği gösterilmiştir [105-110]. Yani krom tarafından neden olunan DNA hasarlarında esas etkiyi hücre içerisinde oluşan Cr(III) göstermektedir. Bununla birlikte hücre dışından direkt olarak Cr(III)'ün yüksek konsantrasyonlara ulaştığında pasif difüzyonla hücre içerisine girebileceği ve genotoksik etkiler gösterebileceği bildirilmiştir [111, 112].

Krom bileşiklerinin sucul organizmalar üzerindeki genotoksik etkileri aralarında kerevit, *Procambarus clarkii* ve semender larvalarının da bulunduğu organizmalar üzerinde araştırılmış ve hemolenf ile eritrosit hücrelerinde mikronükleus oluşumunu indüklediği bildirilmiştir [112, 113]. Balıklar üzerinde

yapılan çalışmalarda da krom bileşiklerinin genotoksik etkiler oluşturduğu gösterilmiştir. Krishnaja ve Rege [115], farklı dozlarda Cr(VI)'ya maruz bıraktıkları *Boelophthalmus dussimeri*'nin solungaç epitel hücrelerinde mitotik indeks oranlarında düşüş meydana gelirken kromozom aberasyonlarında artış meydana geldiğini bildirmişlerdir. Poongnathi ve ark. [35], 0,4 ppm dozda Cr(VI)'ya maruz bıraktıkları *Tilapia mossambicus* ve *Lepidocephalus thermanalis*'in periferel eritrositlerinde mikronükleus frekanslarında 7 ve 14. günlerde anlamlı artışlar olduğunu belirlemişlerdir. Benzer şekilde De Lemos ve ark. [116], farklı dozlarda Cr(VI)'ya maruz bıraktıkları *Pimephales promelas*'in eritrositlerinde mikronükleus frekanslarının 7. ve 14. günlerde arttığını saptamışlardır.

Bu çalışmada, mikronükleus frekansları açısından incelendiğinde 72 saatlik uygulamada ne solungaç epitel hücrelerinde ne de periferel eritrositlerde hiçbir doz'un mikronükleus oluşumuna yol açmadığı gözlenmiştir. Altı ve dokuz günlük uygulamalarda ise, sadece en yüksek konsantrasyon olan % 20'lik dozda her iki dokuda da mikronükleus frekanslarında anlamlı düzeyde bir artış olduğu gözlenmiştir. Krom sanayi atıklarının periferel eritrositlerde nükleus anomalileri oluşturma açısından etkileri incelendiğinde de 6 ve 9 günlük uygulamalarda, yalnızca binükleus frekanslarında anlamlı artışların olduğu, loblu çentikli ve tomurcuklu nükleus frekanslarında herhangi bir anlamlı değişimin olmadığı görülmüştür.

Metallerin nükleolus üzerindeki etkilerine yönelik olarak yürütülen çalışmaların sayısı son derece azdır ve genellikle bitkisel test sistemleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Alüminyum uygulaması sonucunda *Allium cepa* kök hücrelerinde nükleolus şeklinde deformasyonların olduğu bildirilmiştir [117]. Arkhipchuk ve Garanko [118], civa uyguladıkları *Allium cepa*, *Lactuca sativa* hücrelerinde nükleolus sayısında anlamlı oranda azalma olduğunu diğer taraftan *Hydra attenuata* hücrelerinde heteromorfik çift nükleolus yüzdesinde anlamlı bir azalma olduğunu bildirmişlerdir. Sresty ve Madhava Rao [119], nikel ve çinko'ya maruz bıraktıkları *Cajanus cajan* kök korteks hücrelerinde, nükleoluslarda değişimler olduğunu belirtmişlerdir. Yine Gabara ve ark. [120], *Pisum sativum*, köklerinde krom uygulanmasının sonucunda nükleolus sayısında azalma olduğunu

bildirmişlerdir. Paris-Palacios ve ark. [121], Cyprinidae familyasına dahil olan *Brachydanio rerio* örneklerine bakır uygulaması sonucunda hepatosit hücrelerinin nükleoluslarda morfolojik değişimlerin oluştuğunu rapor etmişlerdir.

Bu çalışmada ise, nükleolus parametreleri açısından incelendiğinde, krom sanayi atıklarının kuyruk epitel hücrelerinde yine yalnızca en yüksek doz olan % 20'lik konsantrasyonda değişimlere yol açtığı belirlenmiştir. Heteromorfik çift nükleolus yüzdesi ve ortalama tek nükleolus hacmi değerleri 180 dk'luk uygulamada anlamlı oranda bir düşüş gösterirken, nükleolus sayısı hem 90 hem de 180 dk'luk uygulamalarda kontrol grubuna göre anlamlı oranda azalma göstermiştir. Yüksek dozlarda krom atıklarına maruz kalma sonucunda nükleolus RNA sentez enzimlerinde meydana gelen inhibisyonlar, ya da rDNA'da meydana gelen hasarlar nedeniyle nükleolus aktivitesinde bir düşüşün meydana geldiği öne sürülebilir.

Cr(VI) ile karşılaştırıldığında, hücre içerisinde indirgenme reaksiyonları ile oluşan Cr(III) DNA'ya karşı yüksek bir afinite ve genotoksik etki göstermesine rağmen dışarıdan uygulanması durumunda hücreler üzerinde gösterdiği toksik etkileri ile ilgili olarak çelişkili sonuçlar bildirilmiştir ve Cr(III)'un genotoksik etkileri ile ilgili olarak yapılan karşılaştırmalı çalışmaların sayısı sınırlıdır. Nakamuro ve ark. [122], beş farklı Cr(III) ve Cr(VI) bileşiğinin insan lenfositlerinde genotoksik ve *E. coli*'deki mutajenik etkilerini çalışmışlar ve insan lenfositlerinde sadece Cr(VI)'nın klastojenik potansiyele sahip olduğunu, bunun yanında Cr(VI)'nın daha yüksek olmakla birlikte her iki bileşiğin de *E. coli*'de mutajenik etki gösterdiğini bildirmişlerdir. İnsan periferik lenfositlerinde hem Cr(III)'ün hem de Cr(VI)'nın DNA iplik kırılmalarına yol açtığını göstermişlerdir [123]. Al-Sabti ve ark. [124], Cr(IV) ve Cr(III)'e maruz bıraktıkları *Carassius auratus gibelio* eritrositlerinde kontrol grubuna oranla mikronükleus frekanslarında anlamlı oranda artış olduğunu belirtmişlerdir. Nijs ve Kirsch-Voders. [102] ise Cr(III)'ün iğ ipliklerinin inhibisyonu ile mitotik figürlerde anomalilere yol açtığını belirtmişlerdir.

Yapılan çalışmalarda Cr(VI)'nın Cr(III)'e göre daha yüksek bir toksisite gösterdiği bildirilmekle birlikte, Cr(III) konusunda derlenen veriler çoğunlukla bu krom formunun sitotoksik etkilerinin olmadığı yönündedir [125]. Bununla birlikte bazı çalışmalarda Cr(III)'ün hücre içerisine pasif difüzyon ile absorblanarak geçebileceğini göstermiştir [111, 112]. Bu sayede de Cr(III)'ün, özellikle yüksek konsantrasyonlarda, hücre içerisinde birikebileceğini ve toksik etki gösterebileceği belirtilmiştir [126]. Bu çalışmada genotoksik etkileri test edilen krom sanayi atık suyu örneği kompleks bir karışım halindedir ve bu atık numunesinin kimyasal analiz sonuçları incelendiğinde Cr(III) oranının daha fazla olduğu görülmektedir (Çizelge 4.1). Çalışmada anlamlı farklılıkların yalnızca yüksek konsantrasyon ve uygulama sürelerinde elde edilmiş olması, yukarıda belirtildiği üzere Cr(III)'ün hücre içerisine yüksek konsantrasyonlarda ve yavaş geçişi ile açıklanabilir. Dolayısıyla da krom atıklarının binükleus oluşumunu indüklemesi ve nükleolus parametrelerinde azalmalara yol açması özellikle yüksek konsantrasyonlarda ortaya çıkan sitotoksik etkinin bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. Bunun yanında krom sanayi atıklarında bulunan düşük miktardaki Cr(VI) krom da daha önce açıklanana mekanizmalar yolu ile yüksek atık konsantrasyonlarında genotoksik etkilere yol açabileceğini söylemek mümkündür.

#### 4.2.1.2. Petrol rafinerisi atıklarının genotoksik etkileri

Bu çalışmada, farklı doz ve sürelerde petrol rafinerisi atık suyuna maruz bırakılan *Oreochromis niloticus* örneklerinin solungaç epitel hücreleri ile periferik eritrositlerinde mikronükleus frekanslarında, periferik eritrositlerde nükleus anomalilerinde ve kuyruk epitel hücrelerinde interfaz AgNOR parametrelerinde meydana gelen değişimler incelenerek, bu atıkların genotoksik ve sitotoksik etkileri araştırılmıştır.

Petrol endüstrileri tarafından alınan saf petrolün işlenmesi için yüksek oranda suya gereksinim vardır ve bu rafineriler tarafından oluşturulan atık sular ise tipik olarak, tuz, metal, yağ, gres ve başta polisiklik aromatik hidrokarbonlar olmak üzere (PAH) diğer bazı organik kimyasalların karışımlarından oluşurlar [127]. Bu bileşenler arasından en önemlilerinden biri PAH'lardır ve deniz ortamlarına deşarj

edilen petrol atıkları, genotoksik/kanserojen ve sitotoksik etkileri oldukça iyi bilinen bu aromatik bileşikleri de beraberinde getirmektedir. Petrol rafinerisi atıklarının mutajenik ve genotoksik etkileri ile ilgili olarak yapılan çalışmaların sonuçları bu atıkların potansiyel olarak genotoksik etkiye sahip olduğunu göstermiştir [128].

Donnelly ve Brown [129], nokta mutasyonları belirlemek için *Salmonella* testini, DNA hasar/onarım oranını belirlemek için *Bacillus subtilis* testini ve kromozomal hasarlar ile mitotik rekombinasyonları belirlemek için de *Aspergillus nidulans*'ı kullanarak petrol rafinerisi atıklarının genotoksik etkilerini incelemiştir. Bu araştırmacılar petrol rafinerisi atıklarının her üç test yönteminde de pozitif sonuçlar verdiği ve genotoksik hasar oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Andon ve ark. [130], izole ettikleri petrol işleme sıvısının sitotoksik etkilerini çin hamster ovaryum hücrelerinde test etmişler ve hücrelerin canlılık oranında %50 den fazla azalma olduğunu bildirmişlerdir. Yine aynı izolatlar DeMarini ve ark. [131] tarafından fare lenfoma memeli hücre kültürlerinde genotoksik etkileri açısından test edilmiş ve sonuçta da kromozom aberasyonu ile kardeş kromatid değişimi (SCE) oranlarında artış gözlemlendiği bildirilmiştir. Petrol rafinerisi atıkları ile ilgili diğer iki çalışma Commomer ve ark. [132] tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmacılar petrol rafinerisi atıklarını *Salmonella* yöntemi ile test ettiklerinde açık bir şekilde mutajenik etki gösterdiklerini ve çerçeve kayması mutasyonlarına yol açtıklarını belirlemişlerdir.

Metcalf ve ark. [133], Kanada'da bulunan üç farklı petrol rafinerisinden aldıkları atık suların içerisinde bulunan partikül maddelerin genotoksik etkileri ile ilgili bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Bu katı partiküller atıktan santrifüjleme ve ekstraksiyon ile ayrılmış ve *Salmonella* üzerinde mutajenik etkileri ile çin hamsteri ovaryum hücrelerinde de kardeş kromatid değişimi (SCE) tekniği ile klastojenik etkileri açısından test edilmişlerdir. Sonuçta da bu üç atıktan ikisinin *Salmonella* testinde anlamlı oranda mutajenik etki gösterdiği, ayrıca atıklardan birinin de memeli testinde SCE frekanslarını arttırdığını rapor etmişlerdir. Krishnamurthi ve ark. [134], yine çin hamsteri ovaryum hücrelerinde, petrol rafinerisi atıklarının uygulanması

sonucu, kromozom aberasyonu ve DNA hasarlarının frekanslarını arttığını bildirmiştir ve bu etkileri atık bileşiminde bulunan aromatik hidrokarbonlara bağı olduğunu öne sürmüşlerdir.

PAH'lar balıklar üzerinde en yaygın olarak çalışılan genotoksik maddelerden biridir. Bu bileşikler birbiriyle birleşmiş olan aromatik halkalardan oluşurlar ve sitokrom P-450 gibi enzim sistemleri tarafından metabolik olarak aktive edilmeye gereksinim duyarlar. PAH'lar bu enzim sistemi tarafından oksidatif biyotransformasyona uğrayarak reaktif epoksi türevlerine çevrilirler. Bu epoksi formlar ise DNA'ya kovalent bağlanmak suretiyle PAH-DNA adduct'ları oluştururlar. Memelilere oranla daha yavaş olmakla birlikte, balıklar BP-7,8-diol-9,10-epoxide gibi PAH (Benzo[a]piren) metabolitlerini oluşturabilmektedirler [135, 136]. Epoksi ya da radikal formlara dönüşen PAH'lar, DNA adduct'ları yanında DNA polimeraz, RNA polimeraz ya da DNA replikasyonda rol oynayan ligaz ve topoizomeraz gibi enzimleri de inhibe ederek genotoksik etki gösterebileceği düşünülmektedir.

Petrol rafinerisi atıklarının omurgalı sucul organizmalar genotoksik etkileri çeşitli araştırmacılar tarafından mikronükleus testi kullanılarak incelenmiştir. Fernandez ve ark. [137], petrol atıklarının genotoksik etkilerini semender (*Pleurodeles waltl*) larva ve embriyoları üzerinde test etmişler ve eritrosit mikronükleus frekanslarında anlamlı artışlar olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde Djomo ve ark. [138], petrol rafinerisi atıklarına maruz kalma durumunda amfibi eritrositlerinde mikronükleus frekanslarının arttığını bildirmişlerdir. Bunun yanında, suda çözülebilir dizel petrol ve benzin fraksiyonlarına maruz bırakılan yılan balığı *Anguilla anguilla*'da 6 günlük uygulamada eritrositlerde mikronükleus frekanslarının arttığı bildirmiş ve bu artışın da gene test edilen karışımlarda bulunan PAH'lardan kaynaklanabileceği öne sürülmüştür [139].

Bu çalışmada da, petrol rafinerisi atıklarının, *O. niloticus* örneklerinde hem solungaç epitel hücrelerinde hem de periferik eritrositlerinde en yüksek iki doz olan % 10 ve % 20'lik konsantrasyonlarda ve tüm uygulama sürelerinde mikronükleus



oluşumunu arttırdığı belirlenmiştir. Periferal eritrositlerdeki nükleus anomalileri açısından değerlendirildiğinde ise, petrol atığı uygulamasının çentikli nükleus oluşumu hariç, her üç tipteki nükleus anomalilerinde de anlamlı oranda artışa yol açtığı belirlenmiştir. Bunlar arasında tomurcuklu nükleus frekansının ise diğerlerine göre daha yüksek oranda etkilendiği ve arttığı gözlenmiştir.

Tomurcuklu nükleus ile mikronükleus oluşumu arasındaki bağlantı göz önüne alındığında, petrol rafinerisi atıklarının DNA kırılmaları yolu ile bir genetik hasara yol açmış olabileceği söylenebilir. Rafineri atığının analiz sonuçlarına bakıldığında, daha önce de değinildiği üzere tipik olarak aromatik hidrokarbon ve bunun yanında da diğer önemli bir genotoksik madde olan Krom (VI)'nın bulunduğu görülmektedir (Çizelge 4.5). Gerek PAH'ların gerekse Cr(VI)'nın balıklar üzerinde genotoksik etkiye sahip olduğu ve mikronükleus oluşumunu indüklediği bildirilmiştir [140-142]. Dolayısıyla bu çalışmada da mikronükleus ve nükleus anomalilerine yol açan başlıca kaynağın bu iki tip kimyasal madde olabileceğini söylemek mümkündür. Balıklar su ve sudaki kimyasallara başlıca deri ve solungaçlar aracılığı ile maruz kaldıklarından dolayı, ortamdaki kimyasalların vücut içine geçişi daha kolaydır ve de gözlenen toksik etkiler daha yüksektir. Petrol rafinerisi atığındaki PAH ve krom gibi genotoksik maddeler de aynı yollarla canlı içine ve oradan da hücrelere ulaşarak genotoksik etkilerini göstermişlerdir.

Kuyruk epitel hücrelerinde ise başta tek nükleolus hacmi olmak üzere tüm interfaz AgNOR parametreleri de petrol rafinerisi atığı uygulanması sonucunda anlamlı oranda azalma olduğu göstermişlerdir. Yapılan literatür taramalarında aromatik hidrokarbonların nükleolus üzerindeki etkileri ile ilgili bir çalışmaya rastlanamamıştır. Bununla birlikte, PAH'ların sitotoksik etkileri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin, Motykiewicz ve ark. [143], aromatik hidrokarbonların çin hamsteri V79 hücrelerinde, mitotik bölünme üzerinde yüksek oranda bir inhibisyona yol açtığını bildirmişlerdir. Nükleolus parametreleri hücre çoğalma aktivitesi ile yakından ilişkili olduğu için ve aynı zamanda binükleus oluşumlarının da hücresel düzeyde toksisite göstergesi olarak kabul edildikleri için, petrol rafinerisi atıklarının gerek içerdiği aromatik hidrokarbonlar gerekse daha önce değinildiği üzere krom(VI)

sebebi ile sitotoksik etki göstererek nükleolus fonksiyonları üzerinde bir baskılanmaya yol açmış olabileceğini söylemek mümkündür.

#### 4.2.2. İn-Situ Çalışmalar

Bu çalışmada, Mersin ili sınırları dahilinde bulunan Karaduvar, Mersin ve Erdemli limanlarından farklı mevsimlerde yakalanan *Mugil cephalus* örneklerinin periferik eritrositlerinde ve solungaç epitel hücrelerinde mikronükleus testi, periferik eritrositlerde nükleus anomalileri testi ve kuyruk epitel hücrelerinde interfaz AgNOR analizi kullanılarak, kirlilik ve kaynakları açısından farklılık gösteren bölgelerde yaşayan organizmalarda olası genetik hasarların durumu incelenmiştir.

Doğal ortamlardaki su rezervlerinde genotoksik kirlilik uzun zaman boyunca bakteriyolojik test yöntemleri kullanılarak çalışılmış olmakla birlikte, özellikle son yıllarda in situ araştırmalarda kullanılacak araştırma teknikleri geliştirilmiştir. Bunlar arasında özellikle in situ çalışmalarda, aralarında başta balıklar olmak üzere, deniz kestanesi [144], midyeler [145, 146], amfibiler [147, 148] ve deniz kurdu [149], gibi diğer bazı sucul organizmalar üzerinde, mikronükleus test tekniği farklı şekillerde modifiye edilerek çalışılmıştır. Ancak bu test organizmaları arasında gerek bakımı gerekse uygulama ve preparasyonu açısından kullanımı son derece pratik olması yanında omurgalılar için iyi bir model oluşturan balıkların kullanımı diğerlerine göre çok daha yaygındır. Balıklarda mikronükleus testi, farklı kaynaklarla kirlenmiş göl, akarsu ve deniz gibi sucul ortamlardaki genotoksik etkilerin izlenmesi amacı ile çeşitli araştırmacılar tarafından in-situ olarak kullanılmıştır.

İn-situ çalışmalarda farklı yaklaşımlar izlenmekle birlikte, ana metodoloji başlıca iki yönetime dayanmaktadır. Bunlardan ilki daha önce bilinen bir genotoksik etkiye maruz kalmamış örneklerin kafesleme suretiyle belli süreler için kirli bölgeye bırakılarak oluşan genetik değişimlerin incelenmesi şeklindedir. Örneğin, De Flora ve ark. [28] kontrollü laboratuvar ortamında yetiştirilmiş olan sağlıklı alabalık örneklerini, evsel ve endüstriyel atıklarla kirlenmiş bir bölge olan Po nehrinde kafesler içerisinde yerleştirerek belirli sürelerde bu nehrin sularına maruz bırakmışlardır. Uygulama süresi sonunda eritrositlerdeki mikronükleus

frekanslarında anlamlı oranda artış meydana geldiğini ve bunun bu nehirde bulunan genotoksik kirleticilerden kaynaklandığını belirtmişlerdir. İn-situ çalışmalarda ikinci ve en yaygın kullanılan çalışma yöntemi ise direkt olarak o bölgede yaşayan organizmaların örneklenmesi ve incelenmesine dayanmaktadır [30, 32, 150].

Tatlı su ortamlarında özellikle akarsularda yapılan direkt kirlilik izleme çalışmalarında ise kontrol grubu oluşturabilmek amacı ile temiz ve kirli bölgelerin ayrımı zorunluluğu vardır. Bu sorun akarsu izleme çalışmalarında üst bölge, atık bölgesi ve alt bölge olmak üzere üç farklı örnekleme bölgesinin seçilmesi ile çözülebilmektedir. Nehrin üst bölgeleri daha temiz olacağı için referans bölge olarak, orta (deşarj noktası) ve alt bölgeleri ise kirli olduğundan esas analiz bölgeleri olarak kullanılmaktadır. Örneğin Ayyon ve ark. [31], İspanyada bir askeri tesis atıklarının deşarjına maruz kalan Trubia nehrinde deşarj noktasının alt ve üst bölgelerinden yakaladıkları alabalık örneklerinde mikronükleus frekanslarının aşağı bölgeden yakalananlarda daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Yine diğer bazı sanayi atıkları ile kirlenmiş olan nehirlerin farklı bölgelerinden yakalanan balıkların periferik eritrositlerinde mikronükleus frekanslarının örnekleme bölgesine oranla anlamlı oranda farklılık gösterdiği bildirilmiştir [36, 39, 40]. Deniz ve göl sistemlerinde çalışırken ise gene uzaklık kriteri temel alınmak üzere, ana kirlilik kaynaklarının ya daha az ya da hiç olmadığı referans bölgeler kontrol grubunu oluşturmak üzere kullanılmaktadır.

Çalışma kapsamında belirlenen istasyonlarından Karaduvar sahili, başta petrol rafinerisi ve metal sanayi olmak üzere soda fabrikası, gübre sanayi, ve serbest bölge gibi kuruluşların atık deşarjlarına maruz kalması nedeni ile kirliliğin yoğun olduğu bir bölgedir. Mersin limanı ise serbest bölge başta olmak üzere limana giriş çıkış yapan farklı özelliklerdeki gemilerden gelen yakıt vb. atıklar ile özellikle aromatik hidrokarbonlarla fazla oranda kirlenmiş bir alandır. Erdemli sahili ise bu açıdan adı geçen tipte kuruluşların bulunmaması nedeniyle diğer iki bölgeye oranla göreceli olarak çok daha temiz olması nedeni ile referans bölge olarak seçilmiştir. Yapılan analizler sonunda Karaduvar ve Mersin limanından yakalanan *M. cephalus* örneklerinde mikronükleus frekanslarının, Erdemli sahilinden yakalanan *M. cephalus*

örneklerindeki mikronükleus oranlarından anlamlı düzeyde yüksek olduğu görülmüştür (Çizelge 4.9). Sanayi atıkları ile kirlenmiş bölgelerden yakalanan balıklarda mikronükleus frekanslarında artış meydana geldiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.

Hughes ve Hebert [34], Amerika'da özellikle ağır metaller ve aromatik hidrokarbonlar ile kirlenmiş durumda olan Long Island kıyılarında belirlenen farklı istasyonlardan yakalanan *Pseudopleuronectes americanus* örneklerinin periferik eritrositlerinde, mikronükleus frekanslarını incelemiştir. Bu araştırmacılar yaptıkları çalışma sonucunda, yine kirliliğin yüksek olduğu bölgelerde eritrosit mikronükleus frekansının daha az kirli bölgelerden yakalanan örneklere oranla anlamlı oranda yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Pietripiana ve ark. [29], İtalya kıyılarında özellikle petrol atıkları ile kontamine olmuş olan Ligurian denizinde farklı istasyonlardan yakaladıkları demersal bir tür olan *Lepidorhamphus boscii*, *Merluccius merluccius* ve *Mullus barbatus* karaciğer hücrelerinde mikronükleus frekanslarının kirli bölgelerden yakalanan örneklerde anlamlı oranda yüksek olduğunu belirlemiştir.

Al-Sabti ve Hardig [151], İsveç de endüstriyel atıklarla kontamine olan Baltık denizi kıyılarında belirlenen istasyonlardan yakaladıkları *Perca fluviatilis*, örneklerinde eritrosit mikronükleus frekanslarının atık deşarj bölgesinde en yüksek düzeyde olduğunu ve bu bölgeden uzaklaştıkça yakalanan örneklerde mikronükleus frekanslarının düştüğünü belirlemiştir.

Bombail ve ark. [33], petro-kimya sanayi atıkları ile kontamine olmuş bölgelerden yakalanan *Pholis gunnellus* örneklerinde eritrosit mikronükleus frekanslarının temiz bölgelere oranla anlamlı düzeyde yüksek olduğunu belirlemiştir.

Bu çalışmada elde edilen bulgular, genotoksik kirlilik miktarı ve kaynağındaki artışa bağlı olarak, mikronükleus frekanslarının da arttığını bildiren

çalışmaların sonuçları ile uyum göstermektedir. Bu çalışmada mikronükleus frekansları dokulara bağlı olarak karşılaştırıldığında solungaç epitel hücrelerindeki mikronükleus frekanslarının periferal eritrositlere oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Benzer bulgular, Hayashi ve ark. [38] tarafından da rapor edilmiştir. Bu araştırmacılar doğal ortamlardan yakaladıkları beş farklı balık türünde solungaç ve eritrosit mikronükleus miktarlarını karşılaştırmışlar ve solungaç epitel hücrelerinde mikronükleus frekanslarının anlamlı oranda yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Bu durumun, solungaç epitel hücrelerinin dış ortamla direkt olarak temas halinde olması nedeni ile hem kimyasallara direkt olarak maruz kalması hem de epitel hücrelerinin yüksek oranda dejenerasyona maruz kalmaları nedeni ile rejenerasyonun yani mitotik indeksin yüksek olması ile açıklanabilir.

Balıklarda eritrositler dışında mikronükleus testi için alternatif olarak kullanılan diğer bir doku tipinin de hepatosit hücreleri olduğu görülmektedir. Vigano ve ark. [44], kirlenmiş bölgelerden alınan sediment örneklerine maruz bıraktıkları *Platichthys flesus* örneklerinde hepatositlerde mikronükleus frekansının arttığını bildirmişlerdir. Rao ve ark. [37], Kanada'da endüstriyel atıkların deşarj edildiği bir gölden yakaladıkları *Ameiurus nebulosus* türünde karaciğer hücrelerinde mikronükleus frekanslarında artış olduğunu belirlemişlerdir. Karaciğer bir çok kimyasalın birikim ve detoksifikasyon merkezi olduğu için bu dokunun mikronükleus analizi için uygun olduğu düşünülebilir. Ancak hepatosit hücrelerinde mikronükleus analizi hem karaciğer dokusunun yoğun yapısı nedeni ile preparasyonun zor olması, hem de bu doku hücrelerinde rejenerasyonun dolayısıyla mitotik indeksin son derece az olması nedeni ile oldukça zahmetlidir. Hepatosit çalışmaları öncesinde alil-format adlı kimyasalın uygulanması gerekmektedir. Bu madde karaciğer dokusunda dejenerasyona yol açar ve dolayısıyla mikronükleus oluşumunun gözlenebileceği mitotik rejenerasyon indüklenir. Bu tip bir uygulama özellikle in situ çalışmalarda kısıtlamalara yol açabilmektedir. Dolayısıyla eritrositlere alternatif olarak özellikle in-situ çalışmalarda solungaç epitel hücrelerinin kullanımının gerek pratik gerekse elde edilen sonuçların güvenilirliği açısından daha uygun olduğu görülmektedir.

Periferal eritrositlerde nükleus anomalisi analiz sonuçları incelendiğinde ise, Karaduvar ve Mersin limanlarından yakalanan örneklerdeki tüm nükleus anomalilerinin de referans bölge olan Erdemliden yakalanan örneklere oranla anlamlı oranda yüksek olduğu belirlenmiştir. Eritrosit nükleus anomalilerinin sınıflandırılması ve in situ olarak gösterilmesi ilk olarak Carrasco ve ark. [3], tarafından bildirilmiştir. Bu araştırmacılar çeşitli atık deşarjları ile kirlenmiş bir gölden yakaladıkları balık örneklerinin eritrositlerinde mikronükleus frekansına paralel oranda bazı morfolojik anomalilerin olduğu ve bu anomalilerin toplamda istatistiksel olarak kirli bölgelerde daha yüksek frekanslarda olduğunu belirlemiştir. Daha sonraları laboratuvar şartları altında yapılan çalışmalarda yine kağıt sanayi gibi endüstriyel atıkların ve cyclophosphamide gibi iyi bilinen genotoksik maddelerin de balık eritrositlerinde nükleus anomalilerinin frekanslarında artışa yol açtığı ve bu artışın mikronükleus ile paralel biçimde gerçekleştiği gösterilmiştir [46, 47, 48]. Bu çalışmada elde edilen nükleus anomali bulguları da yukarıda adı geçen çalışmaların sonuçlarını desteklemektedir.

Yapılan literatür taramalarında nükleolus analizlerinin çevresel toksikoloji çalışmalarında kullanımı konusunda yalnızca 2002 yılında yürütülmüş iki çalışmaya rastlanabilmiştir. Bu çalışmaların ilkinde kirli bölgelerden örneklenen *Chrinomus riparus* larvalarında morfolojik deformasyonların daha fazla olduğu ve bu örneklerin politen kromozomlarındaki nükleolus aktivitelerinin, dejenerasyon-rejenerasyon oranına bağlı olarak normal bireylerden daha yüksek olduğu bildirilmiştir [152]. Diğer bir çalışmada ise Butorina ve ark. [153], antropojenik kirliliğe maruz kalmış dört ve ekolojik olarak temiz olan bir bölgeden topladıkları huş ağacı fidelerinin kök uçlarında mitotik indeks ve nükleolus parametrelerini analiz etmişlerdir. Çalışma sonucunda kirli bölgelerden alınan örneklerde nükleolus hacminin, ortalama nükleolus sayısı ile aktif nükleolus sayısının ve anomalili mitoz oranının daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Bu tipteki bir artışın kirli bölgelere adaptasyon süreci ile bağlantılı olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Bu çalışmada da, her üç istasyondan yakalanan *Mugil cephalus* kuyruk epitel hücrelerindeki nükleolus'lar analiz edildiğinde interfaz AgNOR parametreleri

açısından örnekleme bölgeleri arasında anlamlı farklılıkların olduğu görülmüştür. Ortalama nükleus hacmi, heteromorfik çift nükleolus yüzdesi ve hücre başına düşen ortalama nükleolus sayısı değerlerinin, kirli bölgeler olarak belirlenen Karaduvar ve Mersin Limanından yakalanan örneklerde temiz bölge olarak belirlenen Erdemliden yakalanan örneklere oranla daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Laboratuvar çalışmalarında toksik etkileşimler genellikle kısa süreli testler ile denenmektedir ve kısa süreli toksisite çalışmalarında, toksik bir etmene maruz bırakılma durumunda başlıca sayı ve hacim gibi nükleolus parametrelerinde gerileme meydana geldiği bilinmektedir. Ancak in-situ çalışmalarda ise kirli bölgelerde yaşayan organizmalarda nükleolus fonksiyonları beklenenin aksine düşüş değil artış meydana geldiği görülmektedir. Bu durum yukarıda belirtildiği üzere kirleticilerin kronik etkilerini elemine etmek için metabolizma hızının daha yüksek olmasından dolayı ortaya çıkan bir adaptasyon olarak değerlendirilebilir. Bu noktada bu çalışmadan elde edilen in situ nükleolus analiz sonuçları önceki çalışmalar ile uyum göstermektedir.

Bu çalışmada yürütülen in situ analizlerin sonuçları mevsimsel olarak değerlendirildiğinde ise, mikronükleus ve nükleus anomali frekanslarının hem eritrositlerde hem de solungaç epitel hücrelerinde kış mevsiminde en düşük düzeyde iken bu yaz mevsiminde en yüksek değerlere ulaştığı ve aradaki farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. İlkbahar ve sonbahar analiz sonuçları ise çeşitli istisnalar ile birlikte yaz ve kış mevsimleri arasında kalan değerler vermiştir. Bu durumun her üç nükleolus parametresi için de benzer biçimde olduğu bulunmuştur.

Balık eritrositlerindeki mikronükleus frekanslarında mevsimsel olarak gözlenen in-situ değişimler çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Minissi ve ark. [150], *Barbus plebejus* eritrositlerinde genel olarak yaz sezonu frekanslarının sonbahar sezonu frekanslarından daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Hughes ve Hebert [34], *Pseudopleuronectes americanus* eritrositlerinde mikronükleus frekanslarının özellikle sonbahar mevsiminde kış ve ilkbahar mevsimlerine oranla anlamlı oranda

yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bunun yanında Longwell ve ark. [154], aynı türün eritrositlerindeki mikronükleus frekanslarının yaz sezonunda arttığını belirlemişlerdir. Hayashi ve ark. [38], farklı mevsimlerde Tamio nehrinden yakaladıkları *Carrassius auratus* ve *Zacco platypus* örneklerine ait genç polikromatik eritrositlerinde ve solungaç epitel hücrelerinde mikronükleus frekanslarının özellikle mayıs ve haziran dönemlerinde en yüksek düzeylerde olduğunu belirlemişlerdir. Bunun yanında yine aynı çalışmada farklı mevsimlerde yakalanan deniz balıklarında, yaz mevsimindeki mikronükleus frekanslarının ilkbahar mevsimine oranla daha yüksek olduğunu bildirilmiştir.

Bu çalışmanın ve yukarıdaki çalışmaların sonuçlarında da görüldüğü üzere genotoksisite düzeylerindeki dalgalanmalar genellikle ilkbahar ve yaz sezonlarında en yüksek değerlere ulaşmaktadır. Bu tip in-situ mevsimsel değişimler, sucul ortamlardaki zaman zaman değişen kirlilik düzeylerine, organizmaların üreme sezonu vb. etkenlere bağlı olarak gerçekleşen fizyolojik durum değişikliklerine ve diğer bilinmeyen bazı faktörlere bağlı olabilir. Bununla birlikte doğada mevsimlere bağlı olarak en kesin değişiklik gösteren parametrelerden biri sıcaklıktır. Balıklarda da vücut sıcaklığı ile metabolizma çevre sıcaklığına bağlı olduğundan dolayı ilkbahar ve özellikle yaz aylarında görülen yüksek sıcaklığa bağlı olarak artan metabolizma hızına paralel olarak nükleolus, mikronükleus ve nükleus anomalilerinin frekanslarını arttırabileceği düşünülmektedir.



## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın iki ana aşamasından ilkinin oluşturan laboratuvar çalışmalarında petrol ve krom sanayi kuruluşlarına ait olan sıvı atıkların genotoksik potansiyelleri mikronükleus, nükleus anomalileri ve interfaz AgNOR parametreleri kullanılarak *Oreochromis niloticus* üzerinde incelenmiştir. İkinci aşamayı oluşturan in-situ arazi çalışmalarında ise Mersin Akdeniz kıyı şeridinde seçilen ve atık deşarj kaynakları açısından farklılık gösteren üç bölgedeki kirliliğe bağlı genotoksik etkilerin düzeyi ve bu etkilerdeki mevsimsel değişimler, ekolojik valansı yüksek bir tür olan *Mugil cephalus* üzerinde yine aynı test teknikleri kullanılarak incelenmiştir.

Çalışmada elde edilen sonuçları şöyle sıralayabiliriz;

- *Mugil cephalus* ve *Oreochromis niloticus*'un genotoksisite çalışmalarında son derece uygun birer model organizma olarak kullanılacakları gösterilmiştir.
- Krom sanayi atıklarının *Oreochromis niloticus* eritrositlerinde ve solungaç epitel hücrelerinde sadece en yüksek uygulama doz ve sürelerinde mikronükleus frekanslarında, nükleus anomalilerinden ise sadece binükleus frekanslarında anlamlı oranda artışa yol açtığı belirlenmiştir. İnterfaz AgNOR parametrelerinde de benzer şekilde sadece en yüksek dozlarda anlamlı oranda bir azalmanın meydana geldiği belirlenmiştir.
- Petrol rafinerisi atıklarının *Oreochromis niloticus* periferik eritrositlerinde ve solungaç epitel hücrelerinde mikronükleus ve nükleus anomalisi frekanslarında anlamlı artışlara, interfaz AgNOR parametrelerinde ise anlamlı düşüslere yol açtığı belirlenmiştir.
- Petrol ve krom sanayi atıkları kimyasal kompozisyon olarak su kirliliği kontrol yönetmeliği değerlerinin altında olmalarına rağmen her iki atığın da genotoksik potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte petrol sanayi atıklarının genotoksik etkilerinin daha güçlü olduğu tespit edilmiştir.

- İn-situ çalışmalarda Karaduvar ve Mersin Limanından yakalanan *Mugil cephalus* örneklerinin periferal eritrositlerinde ve solungaç epitel hücrelerindeki mikronükleus ve nükleus anomalisi frekanslarının Erdemli'den yakalanan örneklerdekilere anlamlı oranda yüksek olduğu belirlenmiştir.
- Gerek laboratuvar gerekse in-situ çalışmalarda belirlenen mikronükleus frekanslarının nükleus anomalileri ile, özellikle de tomurcuklu ve loblu nükleus ve binükleus frekansları ile uyumlu olduğu gözlenmiştir.
- İn-situ çalışmalarda *Mugil cephalus* kuyruk epitel hücrelerinde interfaz AgNOR parametreleri karşılaştırıldığında ise, kirli bölgeler olan Karaduvar ve Mersin Limanından yakalanan örneklerdeki değerlerin referans bölge olan Erdemliden yakalanan örneklerdekilere göre anlamlı oranda yüksek olduğu belirlenmiştir.
- AgNOR analizleri, normal koşullar altındaki örneklerin toksik etkiye maruz bırakılmaları sonucunda nükleolus aktivitesinde ani bir düşüşün gerçekleştiğini göstermektedir. Bunun aksine in-situ analizlerde kronik olarak toksik etkiye maruz kalan örneklerde nükleolus aktivitelerinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. İnterfaz AgNOR parametrelerinin balıklarda in situ toksisite indikatörü olarak kullanılabileceği ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir.
- Gerek in-situ gerek laboratuvar çalışmalarında, mikronükleus frekansları açısından karşılaştırıldığında, solungaç epitel hücrelerindeki mikronükleus frekanslarının hem *M. cephalus* da hem de *O. niloticus* da, eritrositlerdekilere oranla daha yüksek olduğu gözlenmiştir.
- İn-situ analizlerde, her iki dokuda da hem mikronükleus frekanslarında, hem nükleus anomalilerinde hem de interfaz AgNOR parametrelerinde mevsimsel dalgalanmaların meydana geldiğini gözlenmiştir. Elde edilen veriler, tüm frekansların yaz aylarında en yüksek, kış aylarında ise en düşük değerlerde olduğunu göstermiştir.

Çalışma ışığında ortaya çıkan öneriler şunlardır:

- Genel olarak kirliliğe dirençli bir tür olarak bilinen *Mugil cephalus* özellikle deniz ortamlarındaki genotoksisite çalışmalarında model olarak kullanılacak iyi bir indikatör organizmadır.
- Balıklarda en çok kullanılan eritrositler yanında, gerek sahip olduğu yüksek mitotik aktivite indeksi gerekse dış ortamla bire bir etkileşim içinde olması nedeniyle, özellikle in-situ testler için, solungaç epitel hücrelerinin mikronükleus testinde kullanımın daha etkin olduğu düşünülmektedir.
- Yapısal genetik hasarların gösterilmesinde, özellikle tomurcuklu ve loblu nükleus gibi anomalilerin, mikronükleus testi ile kombine edilerek kullanılmaları sayesinde daha sağlıklı sonuçların alınacağı gösterilmiştir.
- Fonksiyonel genetik değişimlerin gösterilmesinde interfaz AgNOR parametrelerinin gerek in-situ, gerekse laboratuvar koşullarında iyi bir toksisite indikatörü olarak kullanılmasının uygun olduğu düşünülmektedir. Balıklarda kuyruk epitel dokusunun bu test tekniği için oldukça kullanışlı olduğu görülmektedir.
- İn-situ çalışmalarda mevsimsel örneklemlerin yapılması genotoksik etkilerin gözlemlenmesinde daha objektif ve yararlı bilgiler sağlayacaktır.
- Şu andaki mevcut su kirliliği kriterleri sadece akut lethal etkiler gibi testlere dayandırılarak düzenlenmektedir. Bununla birlikte çok daha önemli bir parametre olan genotoksik kirliliğin de şu anda mevcut olan su kirliliği kriterleri arasına dahil edilmesi gerekmektedir. Böylece söz konusu analizlerde daha etkili verilerin elde edilmesi mümkün olacaktır.

## KAYNAKLAR

- [1] De Flora, S., Bagnasco, M. ve Znacchi, P. "Genotoxic, carcinogenic and teratogenic hazards in the marine environment with special reference to the Mediterranean Sea" *Mutation Research*, **258**: 285-320, (1991).
- [2] Heddle, J.A., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournn, 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).
- [3] 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**: 2123-2136, (1990).
- [4] 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).
- [5] Muller, H.J. "Artificial transmutation of the gene" *Science*, **66**:84-87,(1927).
- [6] Brusick, D. "Principles of genetic toxicology". Plenum Press New york, USA, 284 p (1987).
- [7] Teaf, C.M. "Mutagenesis" Williams P.L. ve Burson J.L. (ed) Industrial Toxicology, Van Nostrand Reinhold, USA. 273- (1985) 273-300.
- [8] Ames, B.N., Magav, R. ve Gold, S. "Ranking possible carcinogenic hazards" *Science*, **236**: 271-279, (1987).
- [9] Leary, J.V., Kfir, R., Sims, J.J. ve Fulbright, D.W. "The mutagenicity of natural products from marine algae" *Mutation Research*, **68**: 301-306, (1979).
- [10] Mower, H.F. "Mutagenic compounds contained in seaweeds" Stich, H.F. (ed) Carcinogens and mutagens in the environment. CRC press, Boca Raton. FL. 81-85. (1983).
- [11] Kurulec, b.A., Garg, S., Krea, S., Chanko, M. ve Gupta, R.C. "Natural environment surpasses polluted environment inducing DNA damage in fish. *Carcinogenesis*, **10**: 1337-1339, (1989).

- [12] UNEP/IOC "Assessment of the state of pollution of the Mediterranean Sea by petroleum hydrocarbons" MAP Technical Reports Series No. 19, Athens. (1988)
- [13] 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).
- [14] Ames, B.N., Duston, W.E., Yamasaki, E. ve Lee, F.D. "Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenate for activation and bacteria for detection" *Proceedings of the National Academy of Sciences of The USA*, **70**: 2281-2285, (1973).
- [15] Phillips D.H. ve Venitt, S. "Environmental mutagenesis" Bios Scientific Publishers Ltd. Oxford. Uk. 401 p. (1995)
- [16] 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).
- [17] 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).
- [18] 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 Press, Germany, (1991).
- [19] Galetti, P.M., Aguilar, C.T. ve Molina, W.F. "An overview of marine fish cytogenetics" *Hydrobiologia*, **420**: 55-62, (2000).
- [20] Rishi, K.K. ve Grewal S. "Chromosome aberration test for the insecticide, dichlorvos, on fish chromosomes" *Mutation Research*, **344**: 1-4, (1995).
- [21] Ellingham T.J., Christensen, E.A., ve Maddock, M.B. "In-vitro induction of sister chromadic exchanges and chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of the oyster toadfish and american eel" *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **8**: 555-569, (1986).
- [22] Al-Sabti, K. ve Metcalfe, C.D. "Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water" *Mutation Research*, **343**: 121-135, (1995).

- [23] 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).
- [24] Mersch, J. ve Beuvais, M.N. "The micronucleus assay in zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, to in-situ monitor genotoxicity in freshwater environments" *Mutation Research*, **393**: 141-149, (1997).
- [25] Grant, W.F., Lee, H.G., Logan, D.M. ve Salamone, M.F. "The use of *Tredecantia* and *Vicia faba* bioassays for the in-situ detection of mutagens in the aquatic environment" *Mutation Research*, **270**: 53-64, (1992).
- [26] Ma, T.H. "Tredecantia micronucleus bioassay and polen tube chromatid aberration test for in situ monitoring and mutagen screening" *Environmental Health Perspective*, **37**: 85-90, (1981).
- [27] Williams, R.C. ve Metcalfe, C.D. "Development of an in vivo hepatic micronucleus assay with rainbow trout" *Aquatic Toxicology*, **23**: 193-202, (1992).
- [28] De Flora, S., Vigano, L., Agostini, F.D., Camoirano, A., Bagnasco, M., Benicelli, C., Melodia, F. ve Arillo, A. "Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in-situ to polluted river water" *Mutation Research*, **319**: 167-177, (1993)
- [29] Pietripiana, D., Modena, M., Guidetti, P., Falugi, C. ve Vacchi, M. "Evaluating the gentoxic damage and hepatic tissue alterations in demersal fish species: a case study in Ligurian Sea (NW: Mediterranean)" *Marine Pollution Bulletin*, **44**: 238-243, (2002).
- [30] Grisola, C.K. ve Starling, F.L.R.M. "Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoa, under influence of sewage treatment plant discharges" *Mutation Research*, **491**: 39-44, (2001).
- [31] Ayylon F., Suciu, R., Gephard, S., Juanes, F. ve Garcia-Vazquez, E. "Conventional armanent wastes induce micronuclei in wild brown trout *Salmo trutta*" *Mutation Research*, **470**: 169-176, (2000).
- [32] Al-Sabti, K. "Monitoring the genotoxicity of radiocontaminants in Sweedish lakes by fsh micronuclei" *Cytobios*, **70**: 101-106, (1992).

- [33] Bombail, V., Aw, D., Gordon, E. ve Batty, J. "Application of the comet and micronucleus assay to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland" *Chemosphere*, **44**: 383-392, (2001).
- [34] Hughes, J.B. ve Hebert, A.T. "Erythrocyte micronuclei in inder flounder (*Pseudopleuronectes americanus*): Results of field surveys during 1980-1988 from Virginia to Nova Scotia and in Long Island Sound" *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **20**: 474-479, (1991).
- [35] Poongnathi, K., Shayin, S. ve Usharani, V. "Induction of micronuclei in fish by polluted water and heavy metals" *Cytobios*, **86**: 17-22, (1996).
- [36] Pacheco, M. ve Santos, M.A. "Biochemical and genotoxic responses of adult eel (*Anguilla anguilla*) to resin acids and pulp mill effluent: Laboratory and field Experiments" *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **42**: 81-93, (1999).
- [37] Rao, S.S., Neheli, T., Carey, J.H. ve Cairns V.W. "Fish hepatic micronuclei as a indication of exposure to genotoxic environmental contaminants" *Environmental Toxicology and Water Quality*, **12**: 217-222, (1997).
- [38] Hayashi, M., Ueada, 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**: 125-133, (1998).
- [39] Russo, C., Rocco, L., Alessandra, M.A., ve Stingo, V. "Assessment of environmental stress by the micronucleus test and comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments" *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **57**(2):168-74, (2004).
- [40] Rodriguez-Cea, A., Ayylon, F., Garcia-Vazquez, E. "Micronucleus test in freshwater fish species : an evaluation of its sensitivity for application in fiels surveys" *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **56**(3):442-448, (2003).
- [41] 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).
- [42] 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).
- [43] 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).
- [44] Vigano, L., 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).
- [45] 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).
- [46] Shimura, M., Onozuka, Y., Yamaguchi, T., Hatake, K., Takaku, F. ve Ishizaka, Y. “Micronuclei formation withg chromosome breaks and gene amplification caused by Vpr, an accessory gene of human immunodeficiency virus” *Cancer Research*, **59**: 2259-2264, (1999).
- [47] M.A., C., Martin, S., Trask, B. ve Hamlin, J.L. “Sister chromatid fusion initiates amplification of the dihydrofolate reductase gene in Chinese hamster cells” *Genes and Development*, **7**: 605-620, (1993).
- [48] Ayylon, F. ve Garcia-Vazquez, E. “Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and molie *Poecilia latipinna* : an assessment of the fish micronucleus test” *Mutation Research*, **467**: 177-186, (2000).
- [49] Ayylon, F. ve Garcia-Vazquez, E. “Micronuclei and other nuclear lessions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncohynchus mykiss*” *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **49**: 221-225, (2001).
- [50] Fenech, M. ve Crott, J.W. “Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds inducd in folic acid deficient human lymphocytes – evdence for breakage – fusion- bridge cycles in the cytokinesis–block micronucleus assay” *Mutation Research*, **504**: 131-136, (2002).
- [51] Yokote, M. “Chapters 1–4” T. Hibiya (Ed.) *An Atlas of Fish Histology, Normal and Pathological Features*, Kodansha Ltd., Tokyo, (1982).



- [52] Montgomery, T.H. "Comperative cytological studies, with special regard to the morphology of the nucleolus" *Journal of Morphology*, **15**: 256-582, (1898).
- [53] Hadjilow, A.A. "The nucleolus and ribosome biogenesis" *Cell Biology Monographs Vol 12*. Springer Verlag Wien/NY, (1985).
- [54] Shaw, P.J. ve Jordan, E.G. "The nucleolus" *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **11**: 93-121, (1995).
- [55] Scheer, U. ve Hock, R. "Structure and function of of the nucleolus" *Current Opinion in Cell Biology*, **11**: 385-390, (1999).
- [56] Léger-Silvestre, I., Noaillac-Depeyre, J., Faublaider, M. ve Gas, N. "Structural and functional analysis of the nucleolus of the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*" *European Journal of Cell Biology*, **72**: 13-23, (1997).
- [57] Léger-Silvestre, I., Trumtel, S., Noaillac-Depeyre, J. ve Gas, N. "Functional compartmentalization of the nucleolus in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*" *Chromosoma*, **108**: 103-113, (1999).
- [58] Scheer, U. ve Weisenberger, D. "The nucleolus" *Current Opinion in Cell Biology*, **6**: 354-359, (1994).
- [59] Visintin, R., Craig, K., Hwang, E.S., Prinz, S. Tyers, M. ve Amon, A. "The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation" *Molecular Cell*, **2**: 709-718, (1998).
- [60] Jaspersen, S.L., Charlers J.F. ve Morgan, D.O. "Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase cdc28 and the phosphatase cdc14. *Current Biology*, **9**: 227-237, (1999).
- [61] Shou, W., Seol, J.H., Shevchenko, A., Baskerville, C., Moazed, D., Chen, Z.W., Janhg, J. Shevchenko, A, Charbonneau, H. ve Deshaies R.J. "Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release or the protein phosphatase cdc14 from nucleolar RENT complex" *Cell*, **97**: 233-244, (1999).
- [62] Straight, A.F., Shou, W., Doed, g.J., Truckj, C.W., Deshaies, R.J., Johnson, A.D. ve Moazed, D. " Net1, a sir2 associated nucleolar protein required for rDNA silencing and nucleolar integrity" *Cell*, **97**:245-256, (1999).

- [63] Visintin, R. Hwang, E.S. ve Amon, A. "cfl1 prevents premature exit from mitosis by anchoring cdc14 phosphatase in the nucleolus. *Nature*, **398**: 818-823, (1999).
- [64] Weber, D.J., Taylor, L.J., Roussel, M.F., Sherr, C.J. ve Bar-Sagi, D. "Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activate P53" *Nature Cell Biology*, **1**: 20-25, (1999).
- [65] Tao, W. ve Levine, A.J. "p19Arf stabilizes p52 by blocking nucleo cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The USA*, **96**: 6937-6941, (1999).
- [66] San-Segundo, P.A. ve Roeder, G.S. "Pch2 links chromatin silencing to meiotic checkpoint control" *Cell*, **97**: 313-324, (1999).
- [67] Heitz, E. "Die Ursache der gesetzmässigen Zahl, Form und Grösse pflanzlicher Nukleolen" *Planta*, **12**: 775-844, (1931).
- [68] McClintock, D.J.L. "The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*" *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, **21**: 294-328, (1934).
- [69] Derenzini, M., Pession, A. ve Trere, D. "The quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells. *Laboratory Investigation*, **63**: 137-140, (1990).
- [70] Hernandez-Verdun, D. "The nucleolar organiser regions" *Biology of the Cell*, **49**: 191-202, (1983).
- [71] Hernandez-Verdun, D. "Structural organisation of the nucleolus in mammalian cells" *Methods and Achievements in Experimental Pathology*, **12**: 26-62, (1986).
- [72] Derenzini, M. ve Platon, D. "Interphase nucleolar organiser regions" Crocker, J. (ed). Molecular biology in Histopathology. Wiley, New York, USA. 231-249, (1994).
- [73] Goodpasture, C. ve Bloom, S.E. "Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining" *Chromosoma*, **20**: 37-50, (1975).
- [74] Roussel, P. ve Hernandez-Verdun, D. "Identification of AgNOR proteins, markers of proliferation related to ribosomal gene activity" *Experimental Cell Research*, **214**: 465-472, (1994).

- [75] Ploton, D., Meneger, M., Jennesson, P., Himber, G., Pigeon, F. ve Adnet, J.J. "Improvement in the staining and visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer regions at the optical level" *Histochemical Journal*, **8**: 5-14, (1986)
- [76] Derenzini, M., Sirri, V., Treré, D. ve Ochs, R. "The quantity of nucleolar proteins nucleolin and porotein B23 is related to cell doubling tiem in human cancer cells. *Laboratory Investigation*, **73**: 497-502, (1995).
- [77] Treré, D., Pession, A.- Montanaro, L., Chicco, P. ve Derenzini, M. "AgNOR protein expression and tumor growth rate of human carcinoma xenografts growing subcutancously in nude mice. *European Journal of Histochemistry*, **41**: 153-154, (1997).
- [78] Treré, D. "AgNOR staining and quantification" *Micron*, **31**: 127-131, (2000).
- [79] Derenzini, M. "The AgNORs" *Micron*, **31**: 117-120 (2000).
- [80] Romanenko, V.D., Arkhipchuk, V.V., Solomatina, V.D., Malinovskaya, M.V. ve Makarova, T. A. "Using the morphological nucleolus characteristics for estimating metabolic processes in fish" *Doklady Rossiyskoyi Akademii Nauk*, **326**: 562-565, (1992).
- [81] Arkhipchuk, V.V. "Structural and functional changes of genomes in phylogeny and ontogeny" Dr. Biol. Thesis. Kiev. (1995).
- [82] Delany, M.E., Muscarella, D.E. ve Bloom, S.E. "Effects of rRNA gene copy number and nucleolar variation on early development: inhibiton of gastrulation in rRNA-deficient chick embryos" *Journal of Heredity*, **85**: 211-217, (1994).
- [83] Shukla, J.P ve Pandey, K. "Impaired ovarian functions in arsenic treated freshwater fish, *Colisa fasciatus* (bl. and sch.)", *Toxicology Letters*, **20**: 1-3, (1984).
- [84] McNulty, J.A. "The effects of constant light and constant darkness on daily changes in the morphology of the pineal organ in the goldfish, *Carassius auratus*" *Journal of Neural Transmission*, **53**: 277-292, (1982).
- [85] Schwint, A.E., Gomez, E., Itoiz, M.E. ve Cabrini, R.L. "Nucleolar organizer regions as marlers of incipient cellular alterations in squamous epithelium" *Journal of Dental Research*, **72**: 1233-1236, (1993).

- [86] Marshak, T.L., Dungenova, R.E., Sedkova, N.A. ve Brodski, V.I. "Ribosomal RNA synthesis and the count and type of nucleoli in rat hepatocytes" *Tsitologia*, **36**: 252-260, (1994).
- [87] Gabara, B., Krajewska, E. ve Stecka, E. "Calcium effect on number, dimension and activity of nucleoli in cortex cells of pea (*Pisum sativum* L.) roots after treatment with heavy metals" *Plant Science*, **111**: 153-161, (1995).
- [88] Jiang, W., Liu, D. ve Li, H. "Effects of Cu<sup>2+</sup> on root growth, cell division and nucleols of *Hellianthus annuus* L." *The Sciences of The Total Environment*, **256**: 59-65, (2000).
- [89] Dudnik, O.A., Zatsepina, O.V. ve Chentsov, L.S. "The effects of low ionic strength solutions on the structure and function of the nucleoli in living ESK cells" *Tsitologia*, **35**: 10-16, (1993).
- [90] Heinisch, G. Ve Wozel, G. "Determination of epidermal proliferative activity in experimental mouse tail test by AgNOR analysis" *Experimental and Toxicologic Pathology*, **47**: 19-23, (1995).
- [91] Kawamoto, K. ve Tamai K. "Effects of estrogen and dopamine agonists on the expression of argyrophilic nucleolar organizer regions in prolaction cells of rats" *Zoological Sciences*, **14**: 153-158, (1997).
- [92] Arkhipchuk, V.V. ve Malinovskaya M.V. "Quality of water types in Ukraine evaluated by WaterTox bioassays" *Environmental Toxicology*, **17**:250-257, (2002).
- [93] Arkhipchuk, V.V. ve Garanko, N.N. "A novel nucleolar biomarker in plant and animal cells for assessment of substance cytotoxicity" *Environmental Toxicology*, **17**: 187-94 (2002)
- [94] Hammer, D.S., Herberhold, C. ve Pfeifer, U. "Head and neck oncology: Argyrophilic nucleolar organizer region counts in squamous cell carcinomas of the head and neck after irradiation and chemotherapy" *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, **255**: 74-76, (1998).
- [95] Gyesko, A. ve Holczinger, L. "Changes in nucleolar number of ascites tumor cells treated with actinomycin D" *Neoplasma*, **22**: 395-402, (1975).

- [96] Howell, M.V. ve Black, D.A. "Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer : a 1-step method" *Experientia*, **36**:1014-1015, (1980).
- [97] Codd, R., Dillon, C.T., Levina, A. ve Lay, P.A. "Studies on the genotoxicity of chromium: from test tube to the cell" *Coordination Chemistry Reviews*, **216**: 537-582, (2001).
- [98] IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, pp 49-508 (1990).
- [99] Norseth, T. "The carcinogenicity of chromium" *Environmental Health Perspectives*, **40**: 121-131, (1981).
- [100] De Flora, S. "Threshold mechanisms and site specificity in chromium(VI) carcinogenesis" *Carcinogenesis*, **21**: 533-41, (2000).
- [101] Costa, M. "Toxicity and carcinogenicity of Cr(VI) in animal models and humans" *Critical Reviews in Toxicology*, **27**: 431-442 (1997).
- [102] Nijs, M. ve Kirsch-Volders, M. "Induction of spindle inhibition and abnormal mitotic figures by Cr(II), Cr(III) and Cr(VI) ions. *Mutagenesis*, **1**: 247-252 (1986).
- [103] Arslan, P., Beltrame, M. ve Tomasi, A. "Intracellular chromium reduction" *Biochimica Biophysica Acta*, **931**: 10-15, (1987).
- [104] De Flora, S. ve Wetterhahn, K.E. "Mechanisms of chromium metabolism and genotoxicity" *Life Chemistry Reports*, **7**: 169-244, (1989).
- [105] Tamino, G., Peretta, L. ve Levis, A.G. "Effects of the trivalent and hexavalent chromium on the physicochemical properties of mammalian cell nucleic acids and synthetic polynucleotides" *Chemico Biological Interactions*, **37**: 309-339 (1981).
- [106] Voitkun, V., Zhitkovich, A. Costa, M. "Complexing of amino acids to DNA by chromate in intact cells" *Environmental Health Perspectives*, **102**: 251-255, (1994).
- [107] Voitkun, V., Zhitkovich, A. Costa, M. "Cr(III)-mediated crosslinks of glutathione or amino acids to the DNA phosphate backbone are mutagenic in human cells" *Nucleic Acids Research*, **26**: 2024-2030, (1998).

- [108] Zhitkovich A., Voitkun, V. ve Costa, M. "Formation of the amino acid–DNA complexes by hexavalent and trivalent chromium in vitro: importance of trivalent chromium and the phosphate group" *Biochemistry*, **35**: 7275–7282, (1996).
- [109] Stearns, D.M., Kennedy, L.J., Courtney, K.D., Giangrande, P.H., Phieffer, L.S. ve Wetterhahn, K.E. "Reduction of chromium- (VI) by ascorbate leads to chromium–DNA binding and DNA strand breaks in vitro" *Biochemistry*, **34**: 910–919, (1995).
- [110] Sugiyama, M., Patierno, S.R, Cantoni, O. ve Costa, M. "Characterization of DNA lesions induced by CaCrO<sub>4</sub> in synchronous and asynchronous cultured mammalian cells" *Molecular Pharmacology*, **29**: 606–613, (1986)
- [111] Smith, B.W.S. "A comparison of <sup>125</sup>I and <sup>51</sup>Cr for measurement of total blood volume and residual blood content of tissues in the rat: evidence for accumulation <sup>51</sup>Cr by tissues" *Clinical Chemistry Acta*, **27**:105-108, (1970).
- [112] Ashby, C.A., Tinwell, H., Lefevre P.A. ve Browne, M.A. "The single cell gel electrophoresis assay for induced DNA damage (comet assay) measurement of tail length and moment" *Mutagenesis*, **10**: 85-90, (1995).
- [113] De la Sienna, E., Armienta, M.A., Gonsebatt, M.E. "Potassium dichromate increases the Micronucleus frequency in the crayfish *Procambarus clarkii*" *Environmental Pollution*, **126**: 367-70, (2003).
- [114] Godet, F., Babut, M., Burnel, D., Veber, A.M. ve Vasseur, P. "The genotoxicity of iron and chromium in electroplating effluents" *Mutation Research*, **370**: 19-28, (1996).
- [115] Krishnaja, A.P. ve Rege, M.S. "Induction of chromosomal aberrations in fish *Bolephthalmus dussimeri* after exposure in vivo to mitomycin C and heavy metals mercury, selenium and chromium" *Mutation Research*, **102**:71-82, (1982).
- [116] De Lemos, T.C., Rödel, P.M., Terra, N.R. ve Erdtmann, B. "Evaluation of basal micronucleus frequency and hexavalent chromium effects in fish erythrocytes" *Environmental toxicology and chemistry*, **20**(6): 1320-1324, (2001).

- [117] Fiskezjő, G. "Nucleolar dissolution induced by aluminium in root cells of *Allium cepa*" *Physiology of Plants*, **59**: 508-511, (1983).
- [118] Arkhipchuk V.V. ve Garanko, N.N. "A novel nucleolar biomarker in plant and animal cells for assessment of substance cytotoxicity" *Environmental Toxicology*, **17**(3): 187-194, (2002).
- [119] Sresty, T. V. S. ve Madhava Rao, K.V. "Ultrastructural alterations in response to zinc and nickel stress in the root cells of pigeonpea" *Environmental and Experimental Botany*, **41**: 3-13, (1999).
- [120] Gabara, B., Krajewska, M. ve Steckla, E. "Calcium effect on number, dimension and activity of nucleoli in cortex cells of pea (*Pisum sativum* L.) roots after treatment with heavy metals" *Plant Science*, **111**: 153-161, (1995).
- [121] Paris-Palacios, S., Biagianti-Risbourg, S. ve Vernet, G. "Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate" *Aquatic toxicology*, **50**(1-2): 109-124, (2000).
- [122] Nakamuro, K., Yoshikawa, K., Sayato, Y. ve Kurata, H. "Comparative studies of chromosomal aberration and mutagenicity of the trivalent and hexavalent chromium" *Mutation Research*, **58**(2-3): 175-181, (1978).
- [123] Blasiak, J. ve Kowalik, J. "A comparison of the in vitro genotoxicity of tri- and hexavalent chromium" *Mutation Research*, **469**:135-145, (2000).
- [124] Al-Sabti, K., ve Hardig, J. "Micronucleus test in fish for monitoring the genotoxic effects of the industrial waste products in Baltic Sea, Sweden" *Comparative Biochemistry and Physiology*, **97C**: 179-182, (1990).
- [125] Stohs, S.J., Downs, B.W., Bagchi, M. ve Preuss H.G. "Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium" *Toxicology*, **180**(1): 5-22, (2002).
- [126] Sterans, D.M., Belbruno, J.J. ve Wetterhahn, K.E. "A prediction of chromium (III) accumulation in humans from chromium dietary supplements" *FASEB Journal*, **9**:1650-1657, (1995).
- [127] Brown, K.W. ve Donnelly, K.C. "Mutagenic activity of runoff and leachate water from hazardous waste land treatment" *Environmental Pollution*, **35**:229-246 (1984).

- [128] Houk, V.S. "The genotoxicity of industrial wastes and effluents" *Mutation Research*, **227**:91-138, (1992).
- [129] Donnelly, K.C. ve Brown, K.W. "The development of laboratory and field studies to determine the fate of mutagenic compounds from land applied hazardous waste" Land Disposal of Hazardous Wastes, Proc. Ann. Res. Symp. 7<sup>th</sup> EPA 600/9-81-002b, Cincinnati, OH. Pp224-239, (1981).
- [130] Andon, B., Jackson, M., houk, V.S. ve Claxton, L. "Evaluation of chemical and biological methods for the identification of mutagenic and cytotoxic hazardous waste samples" Petros, J.K., Lacy, L.W., Conway, R.A. (Ed), Hazardous and Industrial Solid Waste Testing. 4<sup>th</sup> Symposium, ASTM STP 886, Philadelphia, P.A. pp 204-215, (1986).
- [131] De Marini, D.M., Brusick, D.J. ve Lewtas, L. "Use of limited protocols to evaluate the genotoxicity of hazardous waste in mammalian cell assays: Comparison to Salmonella" *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **22**:225-239, (1987).
- [132] Commomer, B., Vithayathil, A.J. ve Dolara, P. "Mutagenic analysis of complex samples of aqueous effluents, air particulates, and foods" Waters, MD (ed), Short-term Bioassays of Complex Environmental Mixtures, I. Plenum Press, New York, pp 49-71. (1978).
- [133] Metcalfe, C.D., Sonstegard, R.A. ve Quillam, M.A. "Genotoxic activity of particulate material in petroleum refinery effluents" *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **35**:240-248, (1985).
- [134] Krishnamurthi, K., Devi, F. ve Chakrabarti, T. "Genotoxic effects of PAH containing sludge extracts in Chinese hamster ovary cell cultures" *Biomedical and Environmental Sciences*, **16**(1):68-82, (2003).
- [135] Stegeman, J.J. "Cytochrome P450 forms in fish" Born, G.V.R., Cuatrecasas, P. Herkan, H. (Ed.) Handbook of Experimental Pharmacology. Vol 105, Springer, Heidelberg, pp 279-91, (1993).
- [136] Kleinjans, J.C.S. ve Van Schooten, F.J. "Ecogenotoxicology: the evolving field" *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **11**:173-179, (2002).



- [137] Fernandez, M. ve L'Haridon, J. "Effects of light on the cytotoxicity and genotoxicity of benzo(a)pyrene and an oil refinery effluent in the newt" *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **24**(4):124-136, (1994).
- [138] Djomo, J.E, Ferrier, V. ve Bekaert, C. "Amphibian micronucleus test in vivo (Jaylet test) to evaluate the genotoxicity of petrochemical waste waters" *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **65**(2):168-174, (2000).
- [139] Pacheco, M. ve Santos, M.A. "Biotransformation, Endocrine, and Genetic Responses of *Anguilla anguilla*L. to Petroleum Distillate Products and Environmentally Contaminated Waters" *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **49**:64-75 (2001).
- [140] Pacheco, M. ve Santos, M.A. "Induction of liver EROD and erythrocytic nuclear abnormalities by cyclophosphamide and PAHs in *Anguilla anguilla* L." *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **40**:71-76, (1998).
- [141] Pacheco, M. ve Santos, M.A. "Induction of EROD activity and genotoxic effects by poly aromatic hydrocarbons and resin acids on the juvenile eel (*Anguilla anguilla* L.)" *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **38**:252-259, (1997).
- [142] Gravato, C. ve Santos, M.A. "Juvenile sea bass liver P450, EROD induction and erythrocytic genotoxic responses to PAH and PAH-like compounds" *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **51**:115-127, (2002).
- [143] Motykiewicz, G., Hadnagy, W., Seemayer, N.H., Szeliga, J., Tkocz, A., ve Chorazy, M. "Influence of airborne suspended matter on mitotic cell division" *Mutation Research*, **260**:195-202, (1991).
- [144] Hose, J.E., Puffer, H.W., Oshida, P.S. ve Bay, S.M. "Developmental and cytogenetic abnormalities induced in the purple sea urchin by environmental levels of benzo[a]pyrene" *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **12**:319-325 (1983).
- [145] Burgeot, T., His, E. ve Galani, F. "The micronucleus assay in *Crassostera gigas* for the detection of seawater genotoxicity" *Mutation Research*, **342**:125-140, (1995).

- [146] Izquierdeo, J.I., Machado, G., Ayylonf, F., D'Amico, V.L., Bala, O.L., Vallarin, E., Elias, R. ve Garcia-Vazquez, E. "Assessing pollution in coastal ecosystem: a preliminary survey using the micronucleus test in the mussel *Mytilus edulis*" *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **55**:24-29, (2003).
- [147] Jaylet, A., Deparis, P., Ferrier, V., Grinfeld, S. ve Siboulet, R. "A new micronucleus test using the peripheral blood erythrocytes of the newt *Pleurodeles walil* to detect mutagens in freshwater pollution" *Mutation Research*, **164**:245-257, (1986).
- [148] Fernandez, M., L'Haridon, J., Gauthier, L. ve Zoll-Moreux, C. "Amphibian micronucleus test(s): a simple and reliable method for evaluating in vivo genotozic effects of freshwater pollutants and radiations. Initial assessment" *Mutation Research*, **292**:83-99, (1993).
- [149] Jha, A.N., Hutchinson, T.H., Mackay, J.M., Elliot, B.M., Pascoe, P.L. ve Dixon D.R. "The chromosomes of platynereis dumerilii (Polychaeta: Nereidae)" *Journal of Marine Biology Association of UK.*, **75**:551-562, (1990).
- [150] Minissi, S., Ciccotti, E. ve Rizzoni, M. "Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei: Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater" *Mutation Research*, **367**:245-251, (1996).
- [151] Al-Sabti, K. ve Hardig, J. "Micronucleus test in fish for monitoring the genotoxic effects of industrial waste products in the baltic sea, Sweden" *Comperative physiology and physiology*, **97**:179-182, (1990).
- [152] Meregelli, G., Bettinetti, R., Pluymers, L., Vermuelen, A.C., Rossaro, B. ve Ollevier, R. "Mouthpart deformities and nucleolus activity in field-collected *Chironomus riparius* larvae" *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **42**:405-409, (2002).
- [153] Butorina, A.K., Kalaev, V.N. ve Karpova, S.S. "Peculiarities of mitosis and nucleolar characteristics of the birch plantlest under antropogeneous pollution" *Tsitologija*, **44**(4):392-399, (2002).
- [154] Longwell, A.C., Perry, A.C., Hughes, J.B. ve Hebert, A. "Frequencies of micronuclei in mature and immature erythrocytes of fish as an estimate of

- chromosome mutation rates – results of field surveys on windowpane flounder and atlantic mackerel” ICES, C.M. (ed) Demersal and Pelagic Fish, 55, (1983).
- [155] Al-Sabti, K. “Comperative micronucleated erythrocyte cell induction in three cyprinids by five carcinogenic-mutagenic chemicals” *Cytobios*, 47: 147-154, (1986).
- [156] Metcalfe, C.D. “Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of mudminnow (*Umbra limi*) and brown bullheads (*Ictalurus nebulosus*)” *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 40: 489-495, (1988).
- [157] Al-Sabti, K. “Micronuclei induction in pike (*Esox lucius*) in Sweedish lakes contaminated with radiocaesium” *Cytobios*, 70: 27-32, (1992).
- [158] Manna, G.K. ve Sadhukhan, A. “Use of cells of gill and kidney of Tilapia fish micronucleus test (MNT)” *Current science*, 55: 498-501, (1986).
- [159] Hose, J.E., Cross, J.N., Smith, S.G. ve Diehl, D. “Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites of Southern California” *Marine Environmental Research*, 22: 167-176, (1987).
- [160] Das, R.K. ve Nanda, N.K. “Induction of micronuclei in peripheral erythrocyte of fish *Heteropneustes fossilis* by mitomycin-C and paper mill effluent” *Mutation Research*, 175: 67-71, (1986).
- [161] Hooftman, R.N., ve Raat, W.K. “Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in peripheral blood erythrocytes of Eastern mudminnow (*Umbra pygmea*) by ethyl-mathanosulphonate” *Mutation Research*, 104:147-152, (1982).
- [162] Al-Sabti, K. “Micronuclei induced by seleium, mercury, methylmercury and their mixtures in binucleated blocked fish erythrocyte cells” *Mutation Research*, 320: 157-163, (1994).
- [163] Ueada, T., Hayashi, M., Ohtsuka, Y., Nakjamura, T., Kobayashi, J. ve Sofuni, T. “A preliminary study of the micronnucleus test by acridine orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoetic and embryonic cells” *Water Science and Technology*, 21 :235-240, (1992).

- [164] Kurihara, Y., Rienjkarn, M. ve Etoh, H. "Cytogenetic adaptive response of cultured fish cells to low doss of X-rays" *Journal of Radiation Research*, **33**: 267-274, (1992).
- [165] Ergene, S., Çavaş, T., Karahan, A. ve Portakal, E. "*Methamidophos*'un *Clarias lazera* (Valeciennes, 1840) üzerindeki genotoksik etkilerinin eritrosit mikronükleus testi ile belirlenmesi" *Gazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi*, **19**:27-34, (1999).
- [166] Ergene-Gözükara S., Çavaş T. ve Aymak C. "Deltamethrin'in *Oreochromis niloticus* (L., 1758) Üzerindeki Akut Genotoksik Etkileri'nin Mikronükleus Testi ile Belirlenmesi" XI. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, 4-6 Eylül 2001, İskenderun, Hatay, 765-771, (2001).
- [167] Çavaş, T. ve Ergene-Gözükara, S. "Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells" *Mutation Research*, **534**: 93-99, (2003).

**EK.** Farklı balık türlerinde ve dokularında, in-situ ve laboratuvar şartları altında yapılan mikronükleus analizleri.

Kimyasal / Balık türü	Doz	Kontrol MN ‰	Deney MN ‰	Verilme Şekli	Alınan Hücre	Kaynak
<b>Aflotoxin B1</b>						
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	10 mg/kg	6.8	19.6	İ.P.	Eritrosit	[155]
	40 mg/kg		21.3			
	80 mg/kg		22.8			
<i>Cyprinus carpio</i>	10 mg/kg	6.2	18.5	İ.P.	Eritrosit	[155]
	40 mg/kg		19.6			
	80 mg/kg		19.1			
<i>Tinca Tinca</i>	10 mg/kg	6.5	20.0	İ.P.	Eritrosit	[155]
	40 mg/kg		20.5			
	80 mg/kg		23.7			
<b>Aroclor 1254 (PCBs)</b>						
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	50 mg/kg	6.8	23.3	İ.P.	Eritrosit	[155]
	150 mg/kg		76.3			
	300 mg/kg		79.0			
<i>Cyprinus carpio</i>	50 mg/kg	6.12	16.0	İ.P.	Eritrosit	[155]
	150 mg/kg		76.2			
<i>Tinca Tinca</i>	50 mg/kg	6.5	19.5	İ.P.	Eritrosit	[155]
	150 mg/kg		36.8			
	300 mg/kg		62.5			
<b>Benzidine</b>						
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	10 mg/kg	6.8	18.8	İ.P.	Eritrosit	[155]
	40 mg/kg		27.3			
	80 mg/kg		44.5			
<i>Cyprinus carpio</i>	10 mg/kg	6.2	23.4	İ.P.	Eritrosit	[155]
	40 mg/kg		25.8			
	80 mg/kg		62.0			
<i>Tinca Tinca</i>	10 mg/kg	6.5	25.0	İ.P.	Eritrosit	[155]
	40 mg/kg		33.3			
	80 mg/kg		73.5			
<b>Benzo[a]pyrene</b>						
<i>Ictalurus nebulosus</i>	5 µg/g	0.14	0.43	İ.P.	Eritrosit	[156]
	25 µg/g		10			
	50 µg/g		22			
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	10 mg/kg	6.8	22.2	İ.P.	Eritrosit	[155]
	40 mg/kg		36.5			
	80 mg/kg		66.8			
<i>Cyprinus carpio</i>	10 mg/kg	6.2	21	İ.P.	Eritrosit	[155]
	40 mg/kg		42			
<b>Radyasyon(caesium137)</b>						
<i>Esox Lucius</i>	Göl (in-situ)	5,3	10,1 41,8	Su ortamı	Eritrosit	[157]

**EK. Devam**

Kimyasal / Bahk Türü	Doz	Kontrol MN ‰	Deney MN ‰	Verilme Şekli	Hücre Tipi	Kaynak
<b>Cadmium Chloride</b>						
<i>Oreochromis mossambicus</i>	1m /100g	10	127	İ.P.	Solungaç	[158]
	1m/100 mg	8	91	İ.P.	Böbrek	[158]
<b>DDT, PCB mix.</b>						
<i>Genyonemus Lineatus</i>	İn situ	0.8	3.4	Maruz.	Eritrosit	[159]
<i>Paralabrax clathratus</i>	İn situ	-	6.8	Maruz.	Eritrosit	[159]
<i>Genyonemus lineatus</i>	İn situ		7.5	Maruz.	Eritrosit	[3]
<b>Chromium (VI)</b>						
<i>Carassius auratus gibelio</i>	25 ng/ml	10	14	Maruz.	Eritrosit	[124]
<b>Chromium (III)</b>						
<i>Carassius auratus gibelio</i>	50 ng/ml	10	19	Maruz	Eritrosit	[124]
	100 ng/ml		37			
<b>Diethylnitrosamine</b>						
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	100 mg/g	0	5	İ.P.	Karaciğer	[27]
<b>D-glocosamine hydrochl</b>						
<i>Oreochromis mossambicus</i>	% 1'lik	10	69	İ.P.	Solungaç	[158]
	% 1'lik	8	77	İ.P.	Böbrek	[158]
<b>Karışık PAH'lar</b>						
<i>Genyomenus lienatus</i>	İn situ	0.8	3.4	Maruz.	Eritrosit	[159]
<i>Paralabrax clathratus</i>	İn situ	0.8	6.8	Maruz.	Eritrosit	[159]
<i>Perca fluviatilis</i>	İn situ	-	18	Maruz	Eritrosit	[151]
<b>Kağıt fabrikası atığı</b>						
<i>Heteropneustes fossilis</i>	% 10	0.25	0.69	Maruz	Eritrosit	[160]
	% 20		1.25			
	% 40		0.5			
<i>Perca fluviatilis</i>	İn situ	-	18	Maruz	Eritrosit	[151]
<b>EMS</b>						
<i>Ictalurus nebulosus</i>	25 µg/g	0.14	1.71	İ.P.	Eritrosit	[156]
	50 µg/g		0.50			
	100 µg/g		0.43			
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	50 µg/g	0.1	3.6	İ.P.	Karaciğer	[27]
	100 µg/g		4.2			
<i>Umbra limi</i>	25 µg/g	0.14	3.7	İ.P.	Eritrosit	[156]
	50 µg/g		2			
	75 µg/g		0.86			
<i>Umbra pygmea</i>	200 mg/L	0	1.6	Maruz.	Eritrosit	[161]
<b>Methylcholantrene</b>						
<i>Cyprinus carpio</i>	10 mg/kg	6.8	18.8	İ.P.	Eritrosit	[155]
	40 mg/kg		42.8			
	80 mg/kg		97.6			
<i>Tinca tinca</i>	40 mg/kg	6.5	38.8	İ.P.	Eritrosit	[155]
<b>Selenium</b>						
<i>Carassius auratus gibelio</i>	250 ng/5ml	5,2	25.3	İn vitro	Eritrosit	[162]

EK. Devam

Kimyasal / Balık türü	Doz	Kontrol MN %	Deney MN %	Verilme Şekli	Alınan Hücre	Kaynak
<b>Civa (Hg<sup>+2</sup>)</b> <i>Carassius auratus gibelio</i>	10 ng/5mL 25 ng/5mL 50 ng/5mL	5.2	38 57.6 69.3	İn vitro	Eritrosit	[162]
<b>MetilCiva (MeHg)</b> <i>Carassius auratus gibelio</i>	10 ng/5mL 10 ng/5mL 25 ng/5mL 50 ng/5mL	5.2	52.6 80.7 113.1	İn vitro	Eritrosit	[162]
<b>Mitomisin-C</b> <i>Oncorhynchus mykiss</i>	0,5 µg/L 1 µg/L 2 µg/L 3 µg/L	>1.0	1-3	I.P.	Karaciğer	[27]
<i>Carassius auratus</i>	2 mg/kg 4 mg/kg 10 mg/kg 20 mg/kg	0,0	34.0 72.2 24,3 18,8	I.P.	Eritrosit	[163]
<i>Heteropneustes fossilis</i>	0.5 mg/kg 1 mg/kg 2 mg/kg	0,18	0,88 1,13 1,44	I.P.	Eritrosit	[160]
<b>Radyasyon X-Işını</b> <i>Oreochromis mossambicus</i>	200 r 800 r	10 8 10 8	64 38 375 49	Işınlama	Solungaç Böbrek Solungaç Böbrek	[158]
<i>Umbra limi</i>	2 Gy	15,8	33,60	Işınlama		[164]
<b>Methamidophos</b> <i>Clarias lazera</i>	100 ppm 125 ppm 150 ppm 175 ppm 200 ppm	1,8	19,2 22,4 24,9 31,9 32,6	Maruz	Eritrosit	[165]
<b>Cypermethrin</b> <i>Oreochromis niloticus</i>	0.0002ppm 0,005 ppm 0,001 ppm	3	36 62 82	Maruz	Solungaç	[166]
<b>Lambda-cyhalothrin</b> <i>Oreochromis niloticus</i>	0,05 µg/L 0,01 µg/L 0,05 µg/L	3	3,3 5,7 8,3	Maruz	Eritrosit	[167]
<b>Benzen</b> <i>Oreochromis niloticus</i>	10 ppm	3	9.7	Maruz	Eritrosit	[167]

## ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Ankara’da doğdum. 1990 yılında Kilis Lisesinden, 1995 yılında da Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünden mezun oldum. Aynı yıl Mersin Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitime ve Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladım. 1998 Yılında yüksek lisans eğitimimi tamamlayıp aynı yıl doktora programına başladım. 2001 yılında TÜBİTAK NATO-A2 yurtdışı araştırma bursu programı ile Ukrayna Ulusal Bilimler Akademisi, A.V. Dumansky Institute of Colloid Chemistry and Water Chemistry’de nükleolus parametrelerinin toksisite testlerinde biomarker olarak kullanımı konusunda çalışmalarda bulundum. Halen Mersin Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.