

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MALATHİON'UN ÇÖPÇÜ BALIĞINDAKİ (*Orthrias angorae*,
Steindachner 1897) MİKRONÜKLEUS ORANINA ETKİSİ**

Bahadır GÜRDEGİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd.Doç.Dr. Süleyman GÜL

2006

KARS

Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi Bahadır GÜRDEĞİN 'nin Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı “MALATHİON’UN ÇÖPÇÜ BALIĞINDAKİ (*Orthrias angorae*, Steindachner 1897) MİKRONÜKLEUS ORANINA ETKİSİ” adlı bu çalışması, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy.....ile kabul edilmiştir.

...../...../2006

	Adı Soyadı	İmza
Başkan	:Doç.Dr.Kadir ÖZCAN
Üye	:Yrd.Doç.Dr.Hüseyin GEY
Üye	:Yrd.Doç.Dr.Süleyman GÜL

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun/...../2006 tarih ve/..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç.Dr.Yunus GİCİK
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET.....	II
ABSTRACT.....	III
TEŞEKKÜR.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
TABLolar DİZİNİ.....	VI
1-GİRİŞ	1
2-GENEL BİLGİLER	4
2.1. Pestisitler ve Malathion	4
2.2. Su Ortamlarının Kirlilik Göstergesi Olarak Balıklarda Sitogenetik Analizler	6
2.2.1. Analiz Yöntemleri	11
2.2.1.1. Kromozom Tipi Hataların Belirlenmesi	11
2.2.1.2. Kromatid Tipi Hataların Belirlenmesi	21
2.2.1.3. Anafaz Hatası Çalışmaları	23
2.2.1. 4. Mikronükleus Çalışmaları	24
2.3. Araştırma Örneklerinin Alındığı Alanın Özellikleri	28
2.4. Balık hakkında genel bilgiler	31
2.4.1. Familya: <i>Balitoridae</i>	31
2.4.2. Cins: <i>Orthrias</i>	31
2.4.3. <i>Orthrias angorae</i> (STEINDACHNER, 1897)	31
3- MATERYAL VE METOD	33
4- BULGULAR	34
4.1. İstatiksel Bulgular	34
5- TARTIŞMA VE SONUÇ	44
6- KAYNAKLAR	47
7-ÖZGEÇMİŞ	63

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MALATHİON'UN ÇÖPÇÜ BALIĞINDAKİ (*Orthrias angorae*, Steindachner 1897) MİKRONÜKLEUS ORANINA ETKİSİ

Bahadır GÜRDEGİN

Kafkas Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman

Yrd.Doç.Dr. Süleyman GÜL

ÖZET: Kromozomal bozulmanın bir göstergesi olarak, balık eritrositlerindeki mikronükleus oluşumu, çevresel kirleticilerin genotoksik potansiyellerinin izlenmesinde sıkça kullanılmaktadır. Malathion, tarımsal ürünlerin depolanmasında, böceklerin yok edilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. *Orthrias angorae* malathion'un 1,2,3,5 ve 7 mg/ litre'lik dozlarına akvaryumda 4 gün maruz bırakılmıştır. Her konsantrasyon düzeyi için, 10 balık kullanılmıştır ve her bir doz için mikronükleus oluşumu frekansı belirlenmiştir. Kan örnekleri 36. saatte alınmıştır. Negatif kontrol (çeşme suyu) ve pozitif kontrol (10 mg/lt Benzen) ile karşılaştırıldığında mikronükleus oluşumunun arttığı saptanmıştır. Kontrol balıklarının ölüm oranı sıfırdı. Sonuçlar malathion'un *Orthrias angorae'* da yüksek oranda zehirli olduğunu gösterdi.

Anahtar kelimeler: Malathion, micro nükleus, *Orthrias angorae*, eritrositler

**DETECTION OF MICRONUCLEI IN PERIPHERAL ERYTHROCYTES OF
Orthrias angorae (Steindachner, 1897) EXPOSED TO MALATHION**

Bahadır GÜRDEĞİN

Kafkas University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor

Ass. Prof. Dr. Süleyman GÜL

SUMMARY: Micronucleus formation in fish erythrocytes, as an indicator of chromosomal damage, is increasingly used to detect the genotoxic potential of environmental contaminants. Malathion is an organophosphorus insecticide widely used to control insects in stored grain. *Orthrias angorae*, exposed to malathion at concentrations of 1, 2, 3, 5 and 7 mg/L per liter of water, were kept in an aquarium for 4 days. Ten fish were used in the experiments at each concentration level. The frequency of micronucleus formation was studied at each level of exposure. Blood sampling was carried out after 36 hours. It was found that the frequency of micronucleus formation increased in comparison with that of the negative (tap water) and positive (10 mg/L Benzene) control groups. The rate of control mortality was zero. The results indicated that malathion is highly toxic to *Orthrias angorae*.

Key words: Malathion, micronuclei, *Orthrias angorae*, peripheral erythrocyte

TEŞEKKÜR

Tez konumu bana vererek çalışmamın her aşamasında değerli bilgi ve yardımlarını esirgemeyen hocam, Sayın Yrd. Doç. Dr. Süleyman GL 'e, Biyoloji Bölümü laboratuvar olanaklarından yararlanmamı sağlayan, Fen Edebiyat Fakültesi Dekanı ve Biyoloji Bölümü Başkanı hocam, Sayın Prof. Dr. Arif BAYSAL 'a, çalışmamda elde ettiğim sonuçların istatikselsel olarak yorumlanmasında yardımcı olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Turgut KIRMIZIBAYRAK' a, balıkların yakalanmasında yardımcı olan ve çalışmalarım sırasında emeği geçen Arş. Gör. Gökhan NUR ve Yüksek Lisans ğrencisi Taylan zgr KAYA 'ya teőekkürü bir borç bilirim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Kirli sularda yaşayan “White croaker” türünde tespit edilmiş Mikronükleus	4
Şekil 2. Malathion’un formülasyonu	7
Şekil 3. SCE frekansı tespiti	32
Şekil 4. Mikronükleuslu eritrosit oluşumu örnekleri	37
Şekil 5. Kars Çayı haritası	42
Şekil 6. <i>Orthrias angorae</i> .	45
Şekil 7. <i>Orthrias angorae</i> ’de mikronükleuslu eritrosit oluşumları.	52
Şekil 8. Artan malathion dozunun <i>O. angorae</i> ’nin eritrosit çekirdek morfolojisinde meydana getirdiği değişimler.	53

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Laboratuar ve/veya şartlarında balık hücrelerinde kromozom hataları, Kardeş kromatid değiştirme (SCE) veya mikronüklei'ye sebep olduğu ispatlanmış bazı kirleticilerin (genotoksikantların) etkileri.	12
Tablo 2. Pozitif Kontrol madde örnekleri.	17
Tablo 3. Pozitif kontrol maddeleri örnekleri için kimyasallar.	26
Tablo 4. Balık Kromozomları Üzerinde Genotoksik Etkiler.	29
Tablo 5. Balık kromozomlarında SCE'ye sebep olan genotoksik etkiler.	29
Tablo 6. Kars Çayı Su Kalite Değerleri.	42
Tablo 7. Akvaryumlarda kullanılan suyun fizikokimyasal özellikleri.	46
Tablo..8 Deney aşamasında verilen doz miktarı ve SCE değişimi tablosu	49

I. GİRİŞ

Endüstriyel gelişmenin bir sonucu olarak, son yıllarda 50.000 kadar kimyasal madde ortaya çıkmıştır. Hızla gelişmekte olan endüstri ise önemli çevre kirliliği oluşturmaktadır. Ayrıca yeryüzündeki canlı organizmaların hemen hepsi değişik seviyelerde radyasyon kaynaklarına (ör; UV ve iyonize radyasyona) maruz kalmaktadır. Çernobil kazası esnasında radyasyona maruz kalan hemen hemen her yaş gurubundaki insanlarda kanser vakalarındaki artışa sebep olmuştur. Özellikle disentrik kromozom sayılarında artışlar gözlenmiştir. Örneğin; Celep (1994)şöyle demektedir(14): Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yaşayan insanlarda yaptığı bir araştırmada çay ve fındık tüketimi suretiyle yüksek miktarda radyasyon alındığı tespit etmiştir.

Ayrıca, ağır metaller (ör; Fe, Mn, Cu, Zn, Ni, Cd, Pb, Cr vb.) ve aromatik hidrokarbonların (ör; naftalin, antracene, phenanthrene, fluoranthene, pyrene, triphenylene, chrizene, perlene, 3-4 benzo(a)pyrene) molluskalarda kromozom hatalarının artmasına sebep olduğu da tespit edilmiştir.

Su ortamı ve bu ortamda yaşayan canlılar çevresel kirlilikten çok fazla etkilenmekle beraber çevresel kirliliğin tespitinde birer indikatör görevi görmektedirler. Zira, hava ve toprağı kirleten kirleticiler eninde sonunda su ortamına ulaşmakta ve orada birirmektedir. Su ortamına bırakılan kirleticilerin, sediment ile balıklarında dahil olduğu bentik ve pelajik besin zincirinde bu kirleticilerin akümülyasyonuna (vücutta birikimine) sebep olduğu çok iyi bilinmektedir. Bunlara ilaveten, çok sayıda balık ve kabuklu hayvan türü (ör; hamsi, alabalık, mezigit, sazan, kefal, karides, midye vb. gibi) insan diyetinde ve insan tüketimi için yetiştirilen bazı hayvanlarda protein ve diğer besin elementlerinin önemli bir kaynağını oluşturmaktadır. Dolayısıyla, insanlar su ve sucul yiyeceklerdeki toksik maddelere daima maruz kalmaktadır. Bu nedenle, su kaynaklı kirleticilerin su ortamındaki canlıların (özellikle balıkların) genetik materyalinde ne gibi bir etkiye sahip olduğunun bilinmesi gerekmektedir.

1986 Nisan ayı itibariyle, 20.000'den ziyade kimyasal maddenin genotoksik değeri hesaplanmış ve bunlardan 10.000'den fazlası tek bir deneyde ve sadece bir kez belirlenmiştir(32).

Öncelikle, kirleticilerin etkileri biyokimyasal ve moleküler seviyelerde görülür. Daha sonra ise, balıklar ve molluskalar gibi iyi birer akümülatör olan organizmaların

dokularında sitolojik olarak gözlenebilen genetik değişikliklere sebep olurlar. Mutasyonlar, kromozom sayı ve yapısındaki değişiklikleri (yani kromozom değişiklikleri veya anormalliklerini) kapsayan kromozom mutasyonları ve kromozom seviyesinde gözlenemeyen, fakat bireysel organizmalardaki fenotipik değişikliklerden anlaşılabilen gen mutasyonları olarak gruplandırılır.

Canlı vücudunun başlıca yapı taşı hücredir. Bir balığın vücudunda milyonlarca (70 kg'lık bir insan vücudunda ise 70 trilyondan fazla) hücre bulunmaktadır. Bu hücrelerin her birinin çekirdeğinin içinde bulunan DNA molekülü, kendi eksenini etrafında kıvrılarak yükselen bir çift spiral yapıdadır. Mesela, bir insan vücudundaki bütün DNA moleküllerini çözerek arka arkaya dizersek, dünya ile güneş arasında 400 defadan fazla gidip gelinebilmektedir. Bir organizmaya ait bütün bilgiler DNA moleküllerinde 4 özel nükleotidin (A,T,G ve C) diziliş sırasına göre kodlanmıştır. Bir insana ait DNA molekülünde yaklaşık 3.5 milyar nükleotid yani 3.5 milyar harf bulunmaktadır. Diğer bir deyişle 46 kromozomlu bir insan hücresindeki DNA molekülleri "her cildi 20000 sayfalık 46 cilt dev bir ansiklopediye" benzemektedir. DNA üzerindeki bu bilgiler gen adı verilen özel bölümlerde yer alır. Bir organizmanın vücudunda ise on binlerce gen bulunur ve her bir organ farklı sayıda gen tarafından kontrol edilir. Mesela, yine insan vücudunda 50000 den fazla gen bulunur ve bunlardan 29930 tanesi beyinde görev yapar.

Gen denilen parçacıklardan oluşan ve kuşaktan kuşağa aktarılan madde "genetik madde" adını almaktadır. Genetik maddenin iki esas görevi;

1. Kendisine tıpa tıp benzeyen ya da kopyası olan maddeleri oluşturmak için replikasyon olayını gerçekleştirmek,
2. Enzimler ve hücre metabolizması için gerekli olan diğer moleküllerin sentezi ile bilgi aktarım görevini yerine getirmektir. Ancak, bir sonraki nesile "yaşam sırasında kazanılmış olan özellikler değil, yalnızca genlerdeki bilgiler " aktarılmaktadır.

Genetik (kalıtım bilimi), canlılarda bir önceki bireyden bir sonraki bireye neyin nasıl geçtiğini araştıran bir bilim dalıdır. Sitogenetik ise, kromozomları, bunların ayrışım ilkelerini incelemenin yanında fenotiple olan ilişkilerini de araştıran genetik dalıdır.

Geçmiş yıllardaki en önde gelen hastalık ve ölüm nedenleri enfeksiyonlar ve yetersiz beslenme olduğu için genetik etkenlere yeterince dikkat edilmemişti. Fakat özellikle gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde sosyo-ekonomik konulardaki ilerleme ve tıp

bilimindeki çok hızlı gelişmeler enfeksiyonları kontrol altına alırken, genetik hastalıkların üzerine daha fazla ve dikkatli eğilinmesine neden olmuştur.

Bugün için kromozomlar doğru olarak numaralandırılıp (karyotiplenip) yapısal ve sayısal değişiklikleri kolaylıkla saptanabilmektedir. kromozom elde etme ve kromozomları birbirinden ayırma tekniklerinin gelişmesi, özellikle bantlama tekniklerinin ortaya çıkışı sitogenetikte büyük atılımlara neden olmuştur. Sitogenetiğe olan ilginin artmasının bir başka nedeni ise, bilhassa insanlarda kongenital (nedeni çevresel ya da kalıtsal da olsa doğuştan var olan) hastalıkların doğumdan önce tanınmasıdır. Yine sonraki kuşakta daha az zarar vermesini sağlamak bakımından yapılan çalışmalar, yani "genetik danışmanlık" artık ayrı bir ilgi ve uygulama alanı olmuştur.

Balıklardaki kromozom çalışmaları da son yıllarda aktif bir araştırma sahası olmuştur. Bu konu birçok bilim adamının (taksonomici, balık bilimci ve toksikolog gibi) ilgisini çekmiştir.

Yetiştiricilikte hızlı büyüme yeteneğine sahip, hastalıklara karşı dayanıklı ve ortam şartlarına iyi uyum sağlayabilen balıklar tercih edilmektedir. Bu amaçla yapılan ıslah çalışmaları ise dünyada hızla devam etmekte ve önemli gelişmeler kaydedilmektedir. Avrupa ve bilimsel açıdan ileri diğer ülkelerde uygulanan üst düzey genetik çalışmalara (örneğin; kromozom seti manipülasyonu ve gen transferi gibi) nazaran, ülkemizde kamu sektörü bu konuya teknik, eleman ve maddi yetersizliklerden dolayı yeterince eğilememiş, özel sektör ise bu konuda eğitilememiştir. Özellikle balıkçılık alanında çiftlik stoklarının zaten bilinmeyen genetik yapıları da, çiftlikler arası nakiller yoluyla iyice içinden çıkılmaz bir hal almıştır. Bunun sebebi, herhangi bir çiftlik diğer bir çiftlikten genetik özellikleri bilinmeyen yumurta, yavru ya da damızlık balık almakta ve daha sonra bunları kendi çiftliğindekiler ile bilinçsizce çiftleştirmekte ve en önemlisi gerçekleştirdiği bu işlemleri kaydetmemektedir.

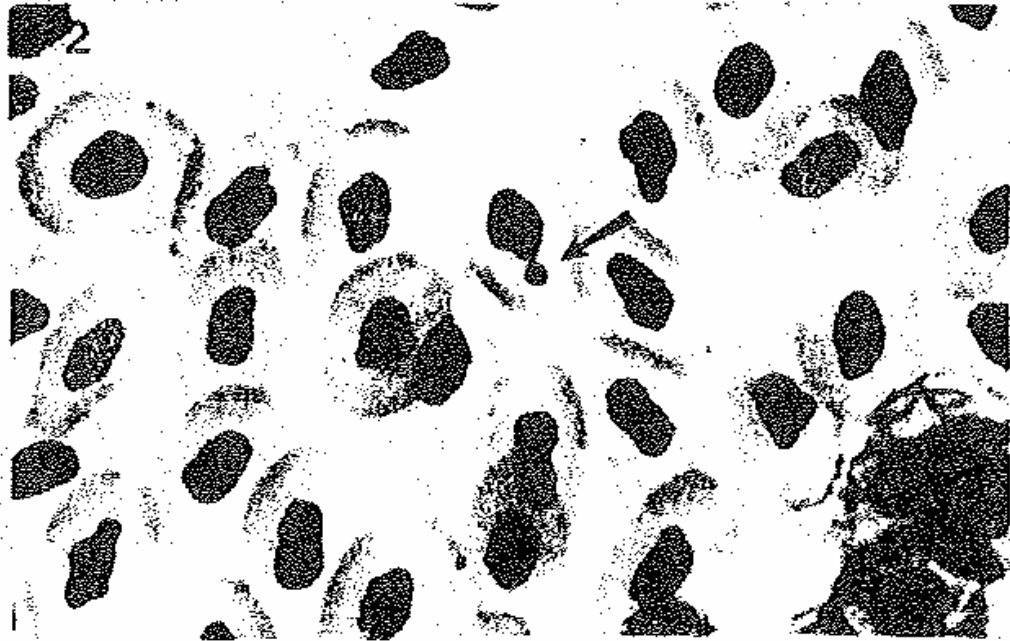
Halbuki, doğadaki ve çiftlik stoklarındaki genetik yapının bilinmesi; stok yönetimi çalışmalarında yeni stratejilerin geliştirilmesinde (gelecekte daha iyi stoklar elde edilebilmesi ve mevcut genetik kaynakların korunması çalışmalarında) çok yararlı olacaktır.

Kromozom analizleri yardımıyla balık popülasyonlarının genetik yapılarının belirlenmesi, popülasyonlar arası ve popülasyon içi (hatta bireysel) kromozom

polimorfizminin tespiti hususunda yurt dışında yapılmış çok sayıda çalışma mevcuttur. Ne var ki, ülkemizde bu konuda yapılmış çalışma yok denebilecek kadar azdır. Oysa kromozom analizi;

-Balıkçılık yönetimi ve yetiştiricilikte (kromozom manipulasyonu teknikleri, poliploidliği teşvik etmek suretiyle veya Ginogenezis yardımıyla-kısırlaştırma, yüksek popülasyonu önleme ve cinsi olgunluk yaşından sonra balıklarda büyüme ve hayatta kalma süresini artırmada).

- Su kirliliği göstergesi olarak (balıklar su yoluyla taşınan kirleticileri metabolize edebilen, toplayabilen ve depolayabilen organizmalar olması nedeniyle ve endüstriyel atıklar(kanserojen ve mutajen kimyasallar) ve radyasyonun balık kromozomlarında hatalara sebep olmasından dolayı su kirliliğinin tespiti için balık analizleri kullanılabilir).



Şekil 1. Kirli sularda yaşayan “White croaker” türünde tespit edilmiş mikronükleus okla gösterilmiştir. (12).

- Kromozomal hastalıkların tesbitinde (örneğin insanlarda; Mongolizm (Down sendromu, Trizomi D13 sendromu, G21 trizomi sendromu), 13q eksiklik sendromu, Turner sendromu, Klinefelter veya XXY sendromlarının belirlenebilmesinden)

- **Filogenetik ilişki** (evrimsel ilişkileri ortaya koyabilmesinden dolayı) kullanılabilir. Ancak balıklarda kromozomal incelemeler (özellikle kromozom bantlama çalışmaları) insanlardaki kadar ileri düzeye ulaşmadığından evrim konusundaki bilgiler tartışmalıdır.

Bu çalışmada, Malathion'un Çöpçü Balığındaki (*Orthrias angorae*, Steindachner 1897) mikronükleus oranına etkisi incelenerek malathion'un hücre çekirdeğinde meydana getirdiği genotoksik etkisi araştırılmıştır.

II. GENEL BİLGİLER

2.1. PESTİSİTLER VE MALATHION

Pestisit kelimesi Latince kökenli olup dar manada ‘‘haşare öldürücü’’ demektir. Pestisit pestlere karşı kullanılan kimyasal bileşiklerin hepsine birden verilen genel bir terimdir

Dünyada hızla artan nüfusun besin gereksinimi karşılayabilmek için; kültür bitkilerinde ürün kayıplarına neden olan yüzlerce hastalık ve zararlılar ile sürekli mücadele kaçınılmaz bir zorunluluk halinde devam etmektedir. Doğal koşullar altında veya seralarda yetiştirilen kültür bitkilerinin hemen hepsi gelişme döneminde; çeşitli hastalık, zararlı böcek, kırmızı örümcek veya yabancı otların etkisinde kalanlarda bazen %50'nin üzerinde zarar görmektedir. Zamanında veya uygun şekilde savaşımı yapılmayan etkili alanlarda verim düşmekte ve ürün kalitesiz hale gelerek pazar değerini kaybetmektedir. Bu nedenle tarımsal mücadele, birim alandan daha fazla ürün elde edebilmek için kaliteli tohumluk kullanmak, uygun toprak işleme yapmak, gübrelerin bilinçli uygulamasını sağlamak ve yeterli sulama suyu bulabilmek kadar önemini muhafaza etmektedir (21)

Günümüzde tarımsal etkinliklerin başlıca hedefi; en azından nüfus artışıyla dengeli olarak besin üretimini attırmaktır. Bu amacı gerçekleştirmek için en önemli araç; tarım zararlılarına karşı pestisit denen kimyasal maddelerin kullanılmasıdır. Pestisitlerde aranan en önemli özellik zararlı hayvanlara ve böceklere karşı çok toksik, buna karşılık zararsız böceklere, memeli hayvanlara ve insanlara karşı zararsız olmalarıdır.

Pestisitler kara ortamında, pestisit kalıntısı içeren bitkilere doğrudan ya da yemler içinde hayvanların vücuduna girerek dolaylı yollardan yine insan vücuduna kadar ulaşırlar. İnsanın hem hayvansal hem de bitkisel besinlerle beslenen bir canlı olması ve beslenme zincirinin son halkasını oluşturması bu tür bileşiklerin insana büyük ölçülerde yansımaya neden olmaktadır

Bilerek ya da bilmeyerek, kazara meydana gelen temaslar hariç, pestisit ile insanların teması, imalat ve nakliye, depolama, kullanma ve pestisit artığı içeren ürünlerin tüketimi esnasında olmaktadır. Bu temas sırasında pestisit insan vücuduna; ağız, deri, solunum yolları ile girmektedir. Pestisitlerin imalı sırasında daha konsantre maddelerle

Malathionun insan ve çevresel sağlığını olumsuz etkilemesinin yanısıra ve malathionun aktif metabolizmada **malaoxon**'a dönüşmesi önemli bir endişe kaynağıdır.

Malathion, genellikle tarla ürünlerine yada geniş bir yerleşim alanına spreylenerek kullanıldığında çevreye kolaylıkla bulaşır. Havadaki malathion damlaları toprağa, suya, bitkilere ve insan yapımı yüzeylere iner. Malathionun çoğu uygulandığı yüzeyde kalsa bile, bir kısmı da yağmur, rüzgar ve sis gibi taşıyıcı faktörler yardımıyla ilk serptildiği alandan daha uzak yerlere taşınabilmektedir. Malathion çevrede birkaç ay kalabilme süresine sahip olsada genelde birkaç hafta içinde yok olur. Malathion, güneş ışığı yanında toprakta ve suda bulunan bakteriler tarafından başka kimyasal bileşiklere dönüşebilmektedir. Malathion, toprağa yapışmayıp, bakteriler tarafından hızlıca parçalanabildiğinden ciddi miktarlarda yer altı sularına ulaşma olasılığı düşüktür. Suda ise, su içindeki bakteriler ve su hareketleriyle kısa bir zamanda parçalanmaya(yada inaktive olmaya) başlar. Havada ise, güneş ışığının oluşturduğu diğer kimyasal oluşumlarla reaksiyona girerek bozulur veya daha tehlikeli bir oluşum olan **malaoxon**'a dönüşür. Kuru toprak yada insan yapımı yüzeylerin üzerindeyse (kaldırım, park araç-gereçleri gibi) genellikle nemli topraktaki malathiona oranla daha geç çözülür.

Malathion'un spreylendiği bölgeye yakın oturmadıkları sürece, çoğu insan malathiona direkt olarak maruz kalmazlar. Asıl tehlike altında olanlar bu maddeyle çalışanlardır. Bunlar çiftçiler, kimyasal spreyleyiciler, malathionu ve diğer kimyasalları üreten fabrika çalışanlarıdır. Daha düşük oranda tehlike altında olanlar ise evleri civarında malathion kullanılanlar ile sivrisineklere karşı malathion spreylenen yerlere yakın oturanlardır. Aşırı derecede malathion dozuna maruz kalanlar zehirlenebilmekte, hatta bazı durumlarda bu zehirlenmeler ölümle sonuçlanabilmektedir. Malathion'dan etkilenmemek için özel giysiler ve soluk almak için cihaz kullanılmalı ve genellikle 6 güne kadar spreylenmiş alana girilmemelidir.

1971-1991 yılları arasında EPA(Uluslararası Çevre Ajansı) tarafından yapılan bir araştırmaya göre bir eyalette sadece 3 kuyuda malathion bulunmuş olup bulunan en yüksek değer 6.17 ppm'dir. Buda çoğunlukla tarımsal ve ormanlık bir bölge olan Virginia eyaletidir. Malathion'un spreylendiği yerlerin yakınlarından alınan su örnekleri incelemeleri sonucu genelde su içerisinde malathion'a rastlanmamıştır.

Malathion'un tarımsal bölgelerde, sivrisineklerin bir sorun teşkil ettiği şehir ve yerleşim alanlarında, evlerde, bahçelerde ve tarla ürünleri üzerinde kullanılmasına izin

verilmiştir. Yiyecek olarak kullanılan ürünlerde FDA(The Food and Drug Administration) ve EPA tarafından izin verilen malathion miktarı 8 ppm'dir. Genel olarak, FDA gözlemlene araştırmalarına göre ABD gıda malzemelerinin endişe vermeyecek kadar az miktarda böcek ilacı içerdiği saptanmıştır.(EPA,1999)

Genel nüfus açısından malathion'un vücuda girmesi, ilaçlanmış bitki, toprak, park alanı araç gereçleri ve bunun gibi pek çok nesneyle temasla geçilmesi ya da yiyecek ve içeceklerden gerçekleşmektedir. Ayrıca malathion spreylendikten sonra solunum yoluyla da vücuda girebilir. Malathion'a nasıl maruz kalınırsa kalınsın, vücuda hızlı bir şekilde girerek kana karışır ve kan yoluyla birçok organa ve dokuya ulaşır. Malathion'un büyük bir kısmı karaciğerde diğer metabolitlerine parçalanır. Bu metabolitlerden malaoxon, malathion'dan daha tehlikelidir. Malathion ve metabolitleri vücutta toplanıp, birikir ve birkaç günde idrarla birlikte büyük bir kısmı vücut dışına atılır.

2.2. SU ORTAMLARININ KİRLİLİK GÖSTERGESİ OLARAK BALIKLARDA SİTOGENETİK ANALİZLER

Balıkların içinde bulunduğu doğadaki bazı hayvanlardaki kromozom anormallikleri (hataları), petrokimyasal ürünler ile kirlenmiş olduğu bilinen bölgedeki klastojenik (balık kromozomlarında yapısal değişikliklere sebep olan) kimyasalların varlığının ve faaliyetlerinin iyi bir göstergesi olarak kullanılabilir. Polinükleer aromatik hidrokarbonlar (PAH), çok kanserojenik olan türevlerine metabolize edilebilirler. İyi bilinen bir örnek olarak, molekül üzerindeki özel mevkilerde oksijenin metabolik ilavesiyle bir kanserojene aktive edilebilen bir prokanserojen olan benzo(a)pyrene verilebilir. PAH, genellikle pişirme fırınlarına sahip çelik imalathanelerinde ve petrokimyasal endüstriler ve doğal orman yangınlarından dolayı doğaya girerler. PAH kirliliği, su biotasındaki tümörlerin artışıyla anlaşılabilir. Ayrıca, kanserojenik kimyasalların çoğu, metabolik olarak aktive edilmiş olmalıdır. Bu nedenle, her hangi bir balığın bir kimyasalın aktif formda bir prokanserojen ve/veya promotajen dönüştürme yeteneği bilinmelidir.

DNA hasarının birçok tipi, kromozomlarda değişikliklere sebep olan sudaki mutajenler tarafından da etkilenmiş olabilir. Kimyasalların mutajenik etkileri, DNA sentezi için habercileri tedarik ederek nükleotid birleştirmedeki bir dengesizliğin

başlaması sayesinde meydana gelebilir. Daha sonra genetik değişiklikler oluşabilir. Kromozom hatalarının belirlenmesi, sudaki mutajenik maddelerin görüntülenebilmesi için kabul edilebilir bir parametredir.

Ayrıca, balıkların genetik materyali, farklı yollarla iyonize radyasyon tarafından da etkilenmiş olabilir. Yüksek dozlardaki iyonize radyasyonun kromozom hasarına sebep olduğu bilinmektedir. Atom enerjisindeki artış, iyonize radyasyonların kanserojenik ve mutajenik etkilerinin artmasına neden olduğu görülmüştür. Çernobil benzeri radyasyon kazalarının sonuçlarının incelenmesi sadece fiziksel ölçümlerle sınırlandırılmamalıdır, zira biyolojik metotlarda kullanışlı olabilir.

Işınlama (İrridation, röntgen ışınlarına tabi tutma), eskiden beri jinogenesis ve androgenesis üretmek için balık embriyoları ve gametlerinde kullanılmaktadır (53-54,46). Işınlamanın canlılar üzerine etkisini gözlemlemek için deneylerde balık kromozomlarının kullanılabilceğini önerilmektedir. Bu deney, uygun bir kromozom setine sahip bir balık türünde “Kromozom Hataları (AB Anafaz hataları), Kardeş Kromotit Değişirme (SCE) ve Mikronükleus (M)” oluşuna bakılarak yapılabilir.

Memeli ve özellikle insan sitogenetiğindeki başarılı çalışmalar, benzer çalışmaların sitogenetik teknikler kullanılarak değişik genotoksik faktörlerin balıklar üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde de kullanılmasını düşündürmüştür.

Çevre ile ilgili olarak mutajenlik ve kanserojenlik konusunda çok az eserin neşredilmesi ve hükümetin yeterince ilgilenmemesinden dolayı, doğadaki ve çiftliklerdeki balıklar, daha şimdiden insan sağlığını etkileyebilen endüstriyel atık ürünler gibi kontrol edilmemiş yüksek seviyede kanserojenik ve mutajenik kimyasallara maruz kalmaktadırlar.

İn vivo ve in vitro mutajenite testlerinin amacı, hücrelerde yapısal kromozom hatalarına sebep olan amillerin belirlenmesidir. Kromozom mutasyonları ve ilişkili olaylar, insanlarda birçok genetik hastalığın sebebidir. Ayrıca, onkogenlerde ve vücut hücrelerinde tümör supressör genlerinde değişmeler sonucu oluşan kromozom mutasyonlarının ve ilişkili olayların insanlar ve deney hayvanlarında kanser oluşumuna sebep olduğu hakkında birçok delil vardır. Şayet, genotoksik kimyasallara maruz kalınması sonucu oluşan kalıtsal hastalıklar ve kanser vakaları balık tüketimi sonucu oluşmuş ise, yenen balıkların genotoksinlere maruz bırakılmış olduğu düşünülebilir.

DNA molekülünün her canlıda benzer şekilde olması sebebiyle, canlı organizmaların bir grubu için genotoksik olan bir amil, diğer gruplar içinde genotoksiktir (40).

Balıklardan; besin zincirinin en üst seviyede olmaları, solunum için büyük miktarlarda suya ihtiyaç duymaları, su ile taşınan kirleticileri metabolize edebilen ve depolayabilen sucul omurgalı organizmalar olmalarından dolayı sulardaki mutajenik ve/veya kanserojenik potansiyelin tespiti için çok önemli indikatör organizmalar ve mükemmel bir materyal olarak faydalanılabilir. Hemen belirtmek gerekir ki, in vitro mutajenlerin hepsinin kanserojenik olmadığı kaydedilmeli, bir balık mutagenesis testinde, in vitro ve in vivo olarak incelenmiş etkiler arasında farklılıklar göz önüne alınmalıdır.

Balık hücreleri üzerinde bazı mutajenik ve/veya kanserojenik kimyasalların genotoksik etkilerinin belirlenmesi çalışmalarında; a) Çalışmalar doz-cevap tarzında yapılmalıdır. b) Aynı kimyasalın aynı dozuna aynı familyanın (*Cyprinidae*) farklı türleri arasında her zaman farklı tepkilerin olduğu dikkate alınmalıdır (5). c) Önceden çalışılmış kimyasalların genotoksikliği hakkında güvenilir sonuçlar elde etmek istendiğinde, negatif ve pozitif kontroller de yapılmalıdır. d) Bazı kirleticilerin genotoksikliği hakkında çok daha güvenilir sonuçlar için, en az 3-5 farklı balık türü üzerinde deneyler tekrarlanmalıdır. e) Söz konusu kirleticiler hakkında daha iyi bir bilgi sağlamak için, diğer hayvan, bitki ve insan hücrelerinden elde edilmiş sonuçlar ile karşılaştırılmalıdır (1,7,11,36,38,40,52,55).

Balıklar, sadece sitotoksikolojik ve farklı genetik çalışmalar için değil, biyokimyasal ve fizyolojik araştırmalar için de deneysel laboratuvar çalışmalarında önemli bir deney hayvanı olarak kullanılabilir. Ne var ki, genotoksik etkilerin çalışılması için balık hücrelerinin kullanılması ancak son yıllarda keşfedilmiştir. Bununla beraber, genotoksik araştırmalarda balık kromozomlarının kullanımı, balıkların omurgalıların en geniş birbirinden çok farklı bireylerden meydana gelmiş grubu oluşturmasına rağmen çok az çalışılmıştır.

Maalesef, oldukça küçük ve çok sayıda kromozomlara sahip olmaları, memelilere göre mitotik indeksin düşük olmasından dolayı az sayıda balık türü üzerinde sitogenetik çalışma yapılmıştır. Erken müdahale sistemi ile, incelenen suyun genotoksik aktivitesi hakkında bize bilgi temin etmesi amacıyla; kromozomal hata çalışmaları için az sayıda büyük kromozomlara sahip ve karyotipleri belli balık türlerinin seçilmesi uygundur.

Kligermann (1982),(36)'ye göre, clastogenic çalışmalar için uygun karyotipli balık türleri şunlardır; *Ameca splendens* (2n=26), *Aphyosemion celia* (2n=20), *Aphyosemion christyi* (2n=18), *Aphyosemion franzwernerii* (2n=22), *Nothobranchius rachowi* (2n=16), *Spharichthys osphromoides* (2n= 16), *Umbra limi* (2n=22) ve *Umbra pygmaea* (2n=22).

Ayrıca, ucuz olmaları, elde edilmeleri ve bakılmalarının kolay olmaları, küçük bir alan ve az sayıda ekipmana ihtiyaç duymaları ve güvenilirlik açısından çok sayıda balığın kullanılabilmesi gibi avantajlarından dolayı bazı balık türleri bu tip genotoksik çalışmalar için kullanılabilirler (36).

Çevre kirliliğın çevreyi paylaşan canlılar üzerindeki olumsuz etkileri, bizleri su ortamı üzerinde endüstriyel ve diğer atıkların dolaylı veya dolaysız etkilerini araştırmaya zorlamaktadır. Biz bu bölümde, söz konusu alanda şimdiye kadar yapılmış çalışmaları değerlendirdik ve laboratuvar ve saha şartlarında su örneklerinin mutajenik ve/veya kanserojenik potansiyelinin çalışması için mükemmel bir materyal olarak balıkları önerdik. Aşağıdaki tabloda (Tablo 1), şimdiye kadar laboratuvar ve/veya saha şartlarında balık hücrelerinde kromozom hataları, kardeş kromatid değiştirme (SCE) veya mikronüklei'ye sebep olduğu ispatlanmış bazı kirleticilerin (genotoksikantların) etkileri hakkında bilgi verilmektedir.

Tablo 1. Laboratuvar ve/veya şartlarında balık hücrelerinde kromozom hataları, kardeş kromatid değiştirme (SCE) veya mikronüklei'ye sebep olduğu ispatlanmış bazı kirleticilerin (genotoksikantların) etkileri (3).

Balık adı	Kirleticiler	Miktar	Uygulama	Hücr.Tipi	Genot.Etk	Kaynak
<i>Cyprinus Carpio</i>	Alfatoxin B1	80 mg /kg	i.p.	Eritrosit	M	Al-Sabti,1986
		300mg/kg	"	Eritrosit	M	" ,1986
		"	"	Böbrek	CA	" ,1985
	Benzidine	80 mg/kg	"	Eritrosit	M	" ,1986
		"	"	Böbrek	CA	" ,1985
	Benzo(a)pyrne	"	"	Eritrosit	M	" ,1986
	20Methylcholanthr	"	"	Eritrosit	M	" ,1986

	ene					
<i>C. idella</i>	Alfatoxin B1	80 mg/kg	i.p.	Eritrosit	M	" ,1986
		"	"	Böbrek	CA	" ,1986
	Aroclour(1254)	300 mg/k	"	Eritrosit	M	" ,1985
		"	"	Böbrek	CA	" ,1986
	Benzidine	80 mg/kg	"	Eritrosit	M	" ,1986
	Benzo(a)pyrne	"	"	Eritrosit	M	" ,1986
		"	"	Böbrek	CA	" ,1985
	20Methylcholanthrene	80 mg/kg	"	Eritrosit	M	" ,1986
		"	"	Böbrek	CA	" ,1986
<i>Tinca tinca</i>	Alfatoxin B1	80 mg /kg	i.p.	Eritrosit	M	" ,1986
		"	"	Böbrek	CA	" ,1985
	Aroclour(1254)	300mg/kg	"	Eritrosit	M	" ,1986
		"	"	Böbrek	CA	" ,1985
	Benzidine	80 mg /kg	i.p.	Eritrosit	M	" ,1986
		"	"	Böbrek	CA	" ,1985
	Benzo(a)pyrne	"	"	Eritrosit	M	" ,1986
		"	"	Böbrek	CA	" ,1986
	20-Methylcholanthrene	80 mg/kg	"	Eritrosit	M	" ,1986
		"	"	Böbrek	CA	" ,1985
<i>O. mykiss</i>	9-Aminoacripe	1µg/ml	Maruz b.	Gonad	CA	Kocan c ark.1982
	Benzene	500mg/kg	İ.p.	Böbrek solung.	CA	AlSabti at all1984

<i>Umbra limi</i>	Benzo(a)pyrne	50µg/g	İ.p.	Eritrosit	M	Metcalf,1988
	Ethyl methane sulphonate	100µg/g	"	Eritrosit	M	" ,1988
	Benzo(a)pyrne	0,1µg/l	"	"	"	Hoftman at all,1981
	Ethyl methane sulphonate	200mg/l	"	Eritrosit	M	Hoftman at all,1982
	Rhine ırnak suyu	3-11 gün	"	Solungaç lar	CA	Priene ark,1987
		"	"	Solung ve tes.	SCE	Alink at all1980
<i>Amea splendens</i>	5-Bromodeoxyuridie	4.6g/ml	"	Embriyo	SCE	Barker ve Rackham
	MNNG	"	"	"	"	"
	Methyl methane sulphonate	0.26µg/ml	"	"	"	"
	Mitomycin-C	0.18µg/ml	"	"	"	"
<i>Esox lucius</i>	Caesium-137	Göller	"	Eritrosit	M	Al-Sabti,1991
<i>I. nebulosus</i>	Benzo(a)pyrne	50µg/g	İ.p.	"	"	Metcalf,1988
	Ethyl methane sulphonate	100µg/g	"	"	"	"
<i>Parophrys vetulus</i>	Benzo(a)pyrne	5µg/g	"	Yüzgeç,dalak,böbr .lökost.	SCE	Stromberg ark.1981
<i>G. lincatus</i>	US coast	Saha	"	Eritrosit	M	Hose at all,1987, Carrasco at all,1990

2.2.1. ANALİZ YÖNTEMLERİ

2.2.1.1. Kromozom Tipi Hataların Belirlenmesi

Yapısal kromozom hatalarının iki tipini (kromozom tipi ve kromotit tipi) kapsamaktadır. Poliploidlikteki bir artış, kimyasal maddenin sayısal hatalarda oluşturma potansiyeline sahip olacağını gösterir. Kimyasal mutajenlerin çoğu, kromotit tip hatalar oluşturur. Ancak kromozom tipi hatalar meydana gelebilir.

Kromozom mutasyonları ve ilişkili olaylar birçok genetik hastalığın sebebini oluşturur. Ayrıca “onkogen” lerde ve tümör engelleyici genlerde değişikliklere yol açan kromozom mutasyonları ve ilgili olayların insanlarda deneysel hayvanlarda kanser oluşmasına sebep olduğu hususunda çok önemli deliller bulunmaktadır. Kromozom hatası testleri in vivo ve in vitro olarak iki tarzda gerçekleştirilebilir(63).

İn-vivo Kromozom Hatası Testi

İn-vivo kromozom hatası testi, türler arasında ve dokular arasında değişiklik göstermekle birlikte, özellikle in vivo metabolizma, farmakinetik ve DNA eşleme işlemi ile ilgili faktörlerin önem kazandığı mutajenik riski tayin etmek için uygulanır. Ayrıca, bir in vitro test yardımıyla belirlenmiş mutajenik bir etkinin daha fazla araştırılması içinde kullanışlıdır. Ancak, ulaşamayacağı test maddesinin veya bir reaktif bir metabolitenin hedef (kullanılacak) dokuya uzanamayacağı hususunda delil varsa, bu testi kullanmak doğru değildir. Böyle bir teste kullanılacak doku, kolaylıkla izole edilebilen ve işleme tabi tutulabilen ve hızlı hücre döngüsüne sahip hücrelerden oluşması gerekir.

Bu metod hayvanların uygun bir yol ve süre ile test maddesine maruz bırakılmasına ve bu sürenin sonunda öldürülerek hücrelerinin kromozomal hasar yönünden incelenmesi prensibine dayanır. Ancak, öldürmeden önce hayvanlar metafazda durdurma amili (örneğin; kolşisin ve kolsemid) ile muamele edilirler. Daha sonra kromozom preparasyonları yapılır, boyanır ve kromozom hatası olup olmadığını belirlemek amacıyla metafaz hücreleri analiz edilir(63).

Metot:

Preparasyon

Hayvan Seçimi;

Genellikle genç ve sağlıklı hayvanlar kullanılır. Çalışmanın başlangıcında, deney hayvanlarının ağırlık değişimi minimal olmalıdır ve her bir cinsiyet için kendi ağırlığının \pm %20'sini geçmemelidir.

Muhafaza ve Beslenme Şartları:

Deney hayvanlarının tutulduğu ortamın sıcaklığı balık türüne göre uygun olan değeri ± 2 'yi aşmamalıdır. Yapay aydınlatma yapılmalı ve 12 saat aydınlatılıp 12 saat karartılmalıdır. Beslenme amacıyla uygun yemler kullanılabilir. İn vivo kromozom hatası testi yapılacağı zaman besleme, test maddesinden uygun miktarda yeme karıştırılarak yapılmalıdır. Hayvanlar teker teker yada aynı cinsiyete bağlı küçük gruplar halinde muhafaza edilmelidir. Genç ve sağlıklı bireyler, kontrol ve muamele gruplarına ayrılmalı, balıklar markalanmalı ve en az 5 gün laboratuvar şartlarına adaptasyonu sağlanmaktadır.

Doz Ayarlaması :

Katı test maddesi (şayet gerekli ise) eritilmeli veya uygun çözücülerde veya aletler içerisinde süspanse edilir ve sulandırılır. Sıvı test maddeleri balığa direkt olarak veya sulandırılarak uygulanabilir. Yeni hazırlanmış test maddeleri depolama süresini aşmadıkça kullanılabilir.

Test Şartları:

Çözücü/Alet:

Çözücü/alet, kullanılmış doz seviyelerinde toksik etkiler üretmemeli ve test maddeleri ile kimyasal reaksiyona girme şüphesi taşımamalıdır. Şayet çok iyi tanınan çözücü /aletlerden başka biri kullanılacaksa, bunların uygunluğunu gösteren veriler varsa dikkate alınmalıdır. Kullanımın uygun olup olmadığına karar verildikten sonra, öncelikle sulu bir çözücü/aletin kullanımına karar verilir.

Kontroller:

Uygun pozitif ve negatif (çözücü/alet) kontrolleri, her bir testteki her bir cinsiyeti kapsamalıdır. Test maddeleri ile muamele için olanlar hariç, kontrol gruplarındaki balıklar, muamele edilmiş gruplardaki hayvanlara özdeş bir usulde ele alınmalıdır.

Pozitif kontroller, mevcut şartlar üzerinde belirlenebilir bir artış vermesi beklenen maruz bırakılma seviyelerinde in vivo yapısal kromozom hataları üretmelidir. Pozitif kontroller, etkileri belirginleştirmek (açığa çıkarmak) için tercih edilmelidir, yoksa

okuyucuya kodlanmış lamaların tayinini derhal göstermek için değil. Pozitif kontrolün test maddesinden farklı bir yolla tatbik edildiği ve sadece bir kez örneklendiği kabul edilebilir. Kullanışlı olduğu takdirde, pozitif kontrol kimyasallarıyla ilgisi olan kimyasal sınıfın kullanımını düşünülebilir. Pozitif kontrol madde örnekleri aşağıdaki tablodakileri (Tablo .2) içerir.

Tablo 2. Pozitif kontrol madde örnekleri (47)

Kimyasal ve CAS No:
Triethylenemelamine [CAS No:51-18-3]
Ethyl methanesulphonate [CAS No:62-50-0]
Ethyl nitrosourea [CAS No:759-73-9]
Mitomycin [CAs No:50-07-7]
Cyclophosphamide (monohydrate) [CAS No:51-18-0;CAS No:6055-19-2]

Negatif kontroller, yalnız çözücü veya alet ile muamele edilmiş ve muamele grupları gibi aynı yolda başka türlü muamele edilmiş, her örnekleme zamanını kapsamalıdır, hayvanlar arası değişebilirlik kabul edilebilir olmadıkça kromozom hatalı hücrelerin frekansları tarihsel(önemli) kontrol verisinden elde edilebilir. Şayet negatif kontroller için tek bir örnekleme yapılacak ise, en uygun zaman ilk örnekleme zamanıdır. Ayrıca, muamele edilmemiş kontroller, seçilen çözücü/alet tarafından oluşturulmuş zararlı veya mutajenik etkiler olmaksızın (onu) göstererek tarihsel veya basılı kontrol verisi olmadıkça kullanılabilir.

Prosedür:

Hayvan sayısı ve cinsiyeti:

Her bir muamele ve kontrol grubu aynı cinsiyette en az 5 hayvan içermelidir. Şayet çalışma zamanı, aynı türlerde çalışmalardan elde edilebilir veri varsa onu gösteren aynı maruz bırakma usulü kullanılmışsa, cinsiyetler arası toksisitede önemli farklılıklar yoktur, daha sonra tek bir cinsiyette test etme yeterli olacaktır.

Muamele Programı:

Test maddeleri, tercihen tek bir muamele olarak tatbik edilir. Ayrıca, test maddeleri ikiye bölük doz olarak (örneğin, büyük hacimli bir materyale uygulamayı kolaylaştırmak için, birkaç saatten çok olmamak suretiyle ayrılmış aynı günde iki muamele şeklinde) ta uygulanabilir. Diğer doz sistemleri bilimsel olarak ayarlanmalıdır.

Örnekler, bir günde muameleyi takip eden iki ayrı zamanda alınabilir. Örneğin, ilk örnekleme aralığı, muameleyi takiben 1,5 normal hücre döngüsü uzunluğu (en az 12-14 saat) şeklinde belirlenebilir. Zira, hücre döngüsü kinetikleri üzerinde etkisi gibi test maddelerinin kavrama ve metabolizması için ihtiyaç duyulan zaman, kromozom hatasını belirlemek için ihtiyaç duyulan optimum zamanı etkileyebilir. Daha sonraki örnek toplama ilk örnekleme zamanından 24 saat sonra yapılabilir. Şayet bir günden daha çok doz rejimleri kullanılacak ise, son muameleden sonraki 1,5 normal hücre döngüsü uzunluklarında bir örnekleme zamanı kullanılabilir(63).

Öldürmeden önce, balıklara, i.p. olarak metafaz durdurma amili (örn; kolsemid veya kolşisin) enjekte edilir. Daha sonra balıklar uygun bir aralıkta (yaklaşık 3-5 saat) örneklenir. Hücreler dokudan hasat edilir ve kromozom hatalarını belirlemek için analiz edilir.

Doz Seviyeleri:

Şayet, seri bulgu çalışması yapılıyorsa (çünkü elverişli veri mevcut değildir), aynı laboratuarda, aynı tür, hat, cinsiyet ve temel çalışmada kullanmak için muamele rejimi kullanılarak yapılmalıdır. Şayet toksiklik var ise, aynı örnekleme zamanı için üç doz seviyesi kullanılır. Bu doz seviyeleri maksimumdan aza doğru (toksiklik yok) bir seri içermelidir. Sadece daha sonraki örnekleme zamanında en yüksek doz kullanılır. En yüksek doz, daha yüksek doz seviyelerinin (aynı dozlama rejimine dayanarak) öldürücülüğünü üretmek için beklenmiş (ummak) olacağı böyle toksikliğin doz üretme işaretleri olarak beklenilir. Düşük, toksik olmayan dozlarda özel (belirli) biyolojik aktiviteli maddeler (örneğin, hormonlar ve mitojenler) doz yerleştirme kriterine istisnalar olabilir ve sebep-sonuç temeline dayandırılarak değerlendirilmelidir. Ayrıca, en yüksek doz, bazı toksiklik belirtisi üreten (Ör, mitotik indekste %50 azalmadan daha büyük) bir doz olarak belirlenebilir.

Limit Testi:

Eğer günde tek bir veya 2 kadar muamele kullanılarak en az 2000 mg/kgv.a. doz seviyesinde bir test gözlemleyen toksik etkiler üretiyorsa ve şayet genotoksiklik yapısal olarak ilgili unsurlardan sağlanan veriye dayanarak beklenilecekse, daha sonra üç doz seviyesi kullanılarak tam bir çalışma gerekliliği göz önüne alınmayabilir. Daha uzun süreli çalışmalar için, limit doz 14 güne kadar muamele için 2000mg/kg/v.a./gün'dür ve 14 günden daha uzun muamele için 1000 mg/kg/v.a./gün'dür.

Dozların Uygulanması:

Test maddesi genellikle bir mide tüpü veya uygun bir “intubation cannula” kullanılarak gauage yoluyla veya i.p. enjeksiyon yoluyla tatbik edilir. Test maddesine diğer maruz bırakma yolları türleri göre ayarlanabilir. Bir defeda enjeksiyon yoluyla tatbik edilebilen maksimum sıvı hacmi test hayvanının büyüklüğüne bağlıdır. Hacim 2 ml 100g v.a.’nı aşmamalıdır. Bunlardan daha yüksek hacimlerin kullanımı, daha yüksek konsantrasyonlar ile normal olarak kötüleşme gösterecek olan tahrik edici veya aşındırıcı maddeler için hariç, test hacimdeki değişebilirlik bütün doz seviyelerinde sabit bir hacim sağlamak için konsantrasyonu ayarlamak suretiyle minimum hale getirilir.

Kromozom Preparasyonu:

Balık öldürüldükten hemen sonra, doku elde edilir, hipotonik solüsyona maruz tutulur ve fiske edilir. Hücreler daha sonra lam üzerine yayılır ve boyanır.

Analiz:

Muamele edilen (pozitif kontroller de dahil) bütün balıklar ve muamele görmemiş negatif (kontrol grubu balıklardan) her bir birey için en az 1000 hücrede sitotoksikliğin bir ölçme olarak mitotik indeks belirlenmelidir. Her bir balık için en az 100 hücre analiz edilmelidir. Bu sayı yüksek sayıda hatalar gözlenildiğinde azaltılabilir. Bütün lamlar (Pozitif ve negatif kontrollere ait lamlarda dahil olmak üzere) mikroskopik analizden önce bağımsız olarak kodlanmalıdır. Zira, lam preparasyonu prosedürleri, genellikle kromozom kayıplı metafazlar oranında uygunsuzluk gösterir, bundan dolayı sayılan hücreler $2n \pm 2$ sayısına eşit sentromer sayısı içerecektir.

Veri ve Kayıt:**Sonuçların Sunulması:**

Hayvanlara ait bireysel veriler, çizelge halinde sunulur. Deney birimi hayvandır. Her bir hayvan için hücre sayısı belirlenir, her bir hücredeki hata sayısı ve yapısal kromozom hatalı hücrelerin yüzdesi değerlendirilir. Muamele edilmiş ve kontrol gruplarına göre farklı kromozom hatası tipleri listelenmelidir. Açıklıklar (gap) müstakil olarak kaydedilir ve rapor edilir, fakat genellikle toplam hata frekansı kapsamına alınmaz. Şayet cinsiyetler arasında toksit meddeye karşı gösterilen tepkilerde farklılık yoksa, elde edilen veri istatistik analiz için birleştirilir.

Sonuçların Değerlendirilmesi ve Yorumlanması:

Pozitif sonuç belirtmek için birkaç kriter vardır. Örneğin, kromozom hatalı hücrelerin nispi sayısındaki bir doz-ilişki artışı veya tek bir örnekleme zamanında tek bir doz grubundaki hatalı hücre sayısındaki belirgin bir artış dikkate alınabilir. Sonuçların biyolojik uygunluğu dikkate alınacak ilk unsurdur. İstatistik metotlar, test sonuçlarını değerlendirmede yardımcı olarak kullanılabilir. İstatistik önemi pozitif bir cevap için sadece faktör belirleme olmamalıdır. Eşdeğerlik sonuçları, deneysel şartların bir modifikasyonunu kullanarak, daha ileri test etmek suretiyle aydınlatılır.

Poliploidlikteki bir artış, daha öncede belirtildiği gibi, test maddesinin sayısal kromozom hataları oluşturma potansiyeline sahip olduğunu gösterebilir. Endoreduplikasyondaki bir artış test maddesinin hücre döngüsü ilerlemesini durdurma potansiyeline sahip olduğunu gösterebilir.

Sonuçları yukarıdaki kritere yaklaştırmak için test maddesinin bu testte mutajenik olmadığı düşünülür. Her ne kadar, deneylerin çoğu pozitif veya negatif sonuçları açık olarak verecek olsa da, nadir olaylarda veri seti test maddesinin aktivitesi hakkında kesin bir yargıya varmaya engel olacaktır. Sonuçlar, yapılan deney sayısının yetersiz veya kuşku dolu olduğunu gösterecektir.

İn vivo kromozom hatası testinden elde edilen pozitif sonuçlar, bir maddenin test edilen türün dokusunda kromozom hataları oluşturduğunu gösterir. Negatif sonuçlar ise, test şartları altında, test maddesinin test edilen türün dokusunda kromozom hatası oluşturmadığını gösterir(63).

Test maddesi veya metabolitelerinin genel (kan) dolaşım sirkülasyonuna veya özel olarak hedef dokuya (örneğin sistemik toksiklik) eriştiği (tesir ettiği) ihtimali tartışılmalıdır.

Test Raporu:

Test raporu aşağıdaki bilgileri içermelidir

Test Maddesi:

- Marka özellikleri ve CAS No. (Şayet biliniyorsa),
- Fiziksel yapısı ve saflığı,
- Çalışmanın yürütülmesi ve ilgili fizikokimyasal özellikleri,
- Test maddesinin sağlamlığı (biliniyorsa),

Çözücü / Alet:

- Alet seçimi sebebi,
- Çözücü / alet içinde test maddesinin çözülebilirliği veya stabilliği,

Test Hayvanları:

- Kullanılan tür / hat
- Hayvan sayısı, yaşı, cinsiyeti,
- Kaynağı, muhafaza şartları, diyet vs.
- Hayvanların testin başlangıcındaki bireysel ağırlığı (vücut ağırlığı serisini kapsayacak şekilde), her bir grubun ortalaması ve standart sapması,

Test Şartları:

- Pozitif ve negatif (alet / çözücü) kontrolleri,
- Seri (range)-bulgu çalışmasında elde edilen veri (şayet rehberlik edecek ise),
- Doz seviyesi seçimi için gerekçe,
- Test maddesi preparasyonunun detaylandırılması,
- Test maddesinin tatbikinin detayları,
- Tatbik yolu için gerekçe,
- Test maddesinin genel sirkilasyonu veya hedef dokuya eriştiğini doğrulama, tetkik metotları,
- Hazırdaki doza diyet / içme suyu test maddesi konsantrasyonundan (ppm) değişim, şayet uygulanabilirse,
- Besin ve su kalitesi değeri,
- Muamele ve örnekleme programı,
- Toksikite ölçüm metotları,
- Metefazda durdurma maddesinin tarifi, konsantrasyonu ve muamele süresi,
- Lam hazırlama metotları,
- Hataları sayma kriteri,
- Her bir balık için analizi yapılan hücre sayısı,
- Pozitif, negatif veya iki taraflı olarak düşünülen çalışmalar için kriter,

Sonuçlar:

- Toksiklik belirtileri,

- Mitotik indeks,
- Her bir balık için ayrı ayrı olacak şekilde hata tipi ve sayısı,
- Her bir grup için toplam hata sayısı, ortalama ve standart sapmalar,
- Ortalama ve standart sapmaları verilerek her bir grup için hatalı hücrelerin sayısı,
- Ploidydeki değişmeler (şayet görünüyorsa),
- Doz-cevap ilişkisi(mümkün olduğu kadar),
- İstatistik analizler,
- Negatif kontrol verisi uyumu,
- Serili, ortalamalı ve standart sapmalı tarihsel negatif kontrol verisi,
- Pozitif kontrol verisi uyumu,

Sonuçların tartışılması:

Sonuç

Literatür

Ek

Tanımlar:

Kromatid tipi hata: Tek kromatidlerin kırılması veya kromatidler arası yeniden birleşme olarak ifade edilen yapısal kromozom hasarı.

Kromozom tipi hata: Aynı mevkideki her iki kromatidin kırılması veya kırılma ve yeniden birleşmesi olarak ifade edilen yapısal kromozom hasarı.

Endoreduplikasyon: DNA replikasyonunun S periyodundan sonraki bir işlem, nukleus mitozu gitmez, fakat bir diğer S periyodu başlar. Sonuç 4,8,16,... kromatidli kromozomlar.

Gap(açıklık): Bir kromatidin genişliğinden daha küçük ve kromatidlerin minimum yanlış dizilmeli bir akromatik lezyon,

Sayısal hata: Kullanılan balığın normal sayısal özelliğinden farklı olarak, kromozom sayısındaki değişim.

Poliploiplik: Diploid sayıdan haploid kromozom sayısı kadar bir katlanma (Örn; 3n, 4n...).

Yapısal hata: Hücre bölünmesinin metafaz safhasının mikroskopla incelenmesi suretiyle belirlenebilen kromozom yapısındaki bir değişme (kaybolma, parçalar, kromozomlar arası değişmeler, kromozom içi değişmeler olarak gözlemlenir).

İn-vitro Kromozom Hatası Testi

İn-vivo'da olduğu gibi, in vitro kromozom hatası testinde, kültürü yapılan hücrelerde yapısal kromozom hatalarına sebep olan amili tesbit etmek amacıyla yapılır. Bu testin prensibi, hücre kültürlerinin metabolik aktivasyonlu ya da aktivasyonsuz test maddesine maruz bırakılmasına, önceden belirlenen aralıklarda metafazda durdurulmasıdır.

İn-vitro kromozom hatası testinde, oluşturulmuş hücre hatları, hücre soyları veya primer hücre kültürlerinin kültürlerini kullanılabilir. Kullanılacak hücreler; kültürde büyütülebilirliği, karyotip kararlılığı, kromozom sayısı, kromozom farklılığı ve kromozom hatalarının kendiliğinden olan frekansı gibi özellikler dikkate alınarak seçilir(63).

İn-vitro yürütülen testler, genellikle egzogenus bir metabolik aktivasyon kaynağının kullanımına ihtiyaç duyar. Bu metabolik aktivasyon sistemi tamamen in vivo şartları taklit etmez. Hakiki mutajenliği yansıtmayan ve pH, osmolalitedeki değişikliklerden veya yüksek sitotoksikliklerden ortaya çıkabilen pozitif sonuçlara sebep olan şartlardan kaçınmak için dikkatli olunmalıdır.

Bu test, mutajen ve kanserojenleri görüntülemek için kullanılır. Bu testte pozitif olan birçok bileşim memelilerde kanserojendir; bununla beraber bu test ve kanserojenlik arasında tam bir korelasyon yoktur. Korelasyon kimyasal sınıfa bağlıdır. Ve bu test yardımıyla belirlenemeyen kanserojenlerin olduğu hususunda giderek artan deliller vardır, çünkü (onlar) direkt DNA hasarından başka mekanizmalar yüzünden harekete geçerler. Bu test metodunda hücre kültürleri metabolik aktivasyonlu olsun yada olmasın her iki test maddesine de maruz bırakılabilirler.

Preparasyonlar

Hücre:

Balıklara ait fibroblast ve periferel kan limfositlerinden hazırlanan hücre hatları, soyları veya primer hücre kültürleri kullanılabilir.

Ortam (besiyeri) ve Kültür Şartları :

Hücre kültürü yapımında besiyeri ve kültür şartlarının (kültür kaplarının, karbondioksit konsantrasyonunun, sıcaklığın ve nemliliğin) uygun olmasına dikkat

edilmelidir. Hücre hatları ve soyları, modal (temel) kromozom sayısı ve mikoplazma kontaminasyonu hususunda rutin olarak kontrol edilmelidir. Şayet kontaminasyon varsa kullanılmalıdır (kontaminasyon varlığı besiyerinin bulanık olmasıyla anlaşılabilir). Hücrelerin normal hücre döngüsü zamanı ve kültür şartları iyi bilinmelidir(63).

Kültürlerin Hazırlanması :

- Hücre hatları ve soyları: Hücreler stok kültürlerden yayılmalı, hasat zamanından önce kültürlerin bir araya karışmış olarak uzanmayacak bir yoğunluktaki kültür ortamında ekilmeli ve uygun sıcaklıkta inkübe edilmelidir.
- Limfositler: Tam kan, bir anti-koagulant (pıhtılaşmayı önleyici, ör; heparin) ile muamele edilmeli veya sağlıklı bireylerden elde edilen ve saflaştırılmış limfositler bir mitojen (ör; PHA) içeren kültür ortamına ekilir ve uygun sıcaklıkta inkübe edilir.

Metabolik Aktivasyon :

Hücreler uygun bir metabolik aktivasyon sisteminin varlığında ve yokluğunda test maddesine maruz bırakılmalıdır. En yaygın kullanılan sistem, Aroclor 1254 veya Phenobarbitone ve β -Naphthoflavone karışımı gibi enzim oluşturan amiller ile muamele edilmiş kemirgen hayvanların karaciğerinden hazırlanan ko-faktör ilaveli post-mitokondrial fraction (S9)'dur. Post-mitokondrial fraction, genellikle son test ortamında %1-10 v/v'lik bir seri konsantrasyonda kullanılır. Metabolik aktivasyon sisteminin durumu, testi yapılan kimyasalın sınıfına bağlı olabilir. Bazı durumlarda, post-mitokondrial fraction'un bir konsantrasyonunda daha çok kullanmak uygun olabilir. Hücre hatlarının seçimi, bilimsel olarak doğrulanmalıdır (Ör; test maddesinin metabolizması için Cytochrome P450 izo enziminden faydalanılır).

Test Şartları :

Çözücü/alet test maddesi ile kimyasal reaksiyona girme şüphesi taşımamalı ve hücrelerin yaşabilirliği ve S9 aktivitesi ile uyumlu olmalıdır. Suyla kimyasal yapısı değişebilen maddeler test edileceği zaman, kullanılan organik çözücülerin suyu alınmalıdır. Su moleküler bir elek eklemek suretiyle uzaklaştırılabilir.

Maruz Bırakma Konsantrasyonları :

En yüksek konsantrasyon belirleneceği zaman, dikkate alınması gereken kriterlerden birisi, bu test sistemindeki sitotoksiklik, çözülebilirlik ve pH veya ozmoloritedeki değişikliklerdir.

Sitotoksiklik, hücre bütünlüğünün ve büyümesinin uygun bir göstergesini (yani bir araya karışma derecesi, yaşabilir hücre sayıları veya mitotik indeks) kullanarak asıl deneydeki metabolik aktivasyonlu ve aktivasyonsuz belirlenmelidir. Ön bir deney yapılarak sitotoksiklik ve çözülebilirlik belirlemek uygun olabilir.

En az üç analiz yapılabilir konsantrasyonda kullanılmalıdır. Sitotoksiklik meydana geldiği yerde, konsantrasyonlar maksimumdan aza (veya hiç toksik olmayan konsantrasyona) kadar bir seri şeklinde hazırlanmalıdır; böylece genellikle konsantrasyonların 2 ve 10 arasında bir faktörden daha fazla olmayacak şekilde ayrılmalıdır. Hasat zamanında en yüksek konsantrasyon karışma derecesi, hücre sayma veya mitotik indeksdeki (hepsi %50'den daha büyük) önemli bir azalmayı göstermelidir. Mitotik indeks, sadece sitotoksik / sitostatik etkilerin direkt ölçümüdür ve muameleden sonraki süreye bağlıdır. Bununla beraber, mitotik indeks diğer toksit ölçümlerinin külfetli ve pratik olmayabilen süspansiyon kültürleri için kabul edilebilir. Hücre döngüsü kinetikleri hakkında bilgiyi (ör; ortalama generasyon zamanı =Average generation time (AGT)), destekleyici bir bilgi olarak kullanılabilir. Bununla birlikte, AGT her zaman gecikmiş alt populasyonların varlığını ortaya koymayan kapsamlı bir ortalamadır. Hatta, AGT'deki hafif artışlar bile hataların optimal ürün zamanındaki çok önemli gecikme ile ilişki kurabilir. Nispeten sitotoksik bileşikler için maksimum konsantrasyon, en düşük hangisi olursa olsun, 5 µg/ml, 5mg/ml ve 0.1 M olmalıdır.

Çözünemeyen konsantrasyondan daha düşük konsantrasyonlarda toksik olmayan nispeten çözünemeyen maddeler için en yüksek doz, muamele periyodu sonunda son kültür ortamındaki çözünebilirlik sınırının üzerinde bir konsantrasyon olmalıdır. Bazı durumlarda (ör; toksiklik sadece en düşük çözülme konsantrasyonundan daha yüksekte meydana geldiği zaman), görünebilir çökeltmeli bir konsantrasyondan daha çoğunda test etmek tavsiye edilir. Çözünebilirlik, hücreler, S9, serum vs. mevcudiyetinden dolayı test sistemindeki maruz bırakma süresi esnasında değişebileceği gibi, muamele başlangıcı ve sonunda çözülebilirliği tayin etmek için kullanışlı olabilir. Çözülme ise, çıplak gözle belirlenebilir. Çökeltme, sayma ile karıştırılmamalı.

Kontroller :

Metabolik aktivasyonlu ve aktivasyonsuz uygun pozitif ve negatif (çözücü veya alet) kontroller her bir deneyde de yapılmalıdır. metabolik aktivasyon kullanıldığı zaman pozitif kontrol kimyasalı mutajenik bir cevap vermek için aktivasyona ihtiyaç duyan birisi olmalıdır.

Pozitif kontrol konsantrasyonları, etkilerin belirginleşmesi için seçilmeli, fakat okuyucuya kodlanmış lamların tayinini derhal ortaya koymamalıdır. Pozitif kontrol maddeleri örnekleri aşağıdaki kimyasalları içerir:

Tablo 3. Pozitif kontrol maddeleri örnekleri için kimyasallar (47).

Metabolik aktivasyon durumu	Kimyasal ve CAS No.
Exogenous metabolik faaliyetli	Methyl methanesulphonate [CAS No.66-27-3]
	Ethyl methanesulphonate [CAS No.62-50-0]
	Ethyl nitrosourea [CAS No.759-73-9]
	Mitomycin C [CAS No.50-07-7]
Exogenous metabolik faaliyetli	Benzo(a) pyrene [CAS No.50-32-8]
	Cyclophosphamide(monohydrate) [CAS No.51-18-0]

Farklı uygun olan pozitif kontrol maddeleri de kullanılabilir. Kullanışlı olduğu takdirde, pozitif kontrol kimyasallarının bağlı bulunduğu kimyasal sınıfın kullanımı düşünülebilir.

Muamele ortamında (besiyerinde) yalnız çözücü veya aletten oluşan ve muamele kültürleri gibi aynı yolla muamele edilmiş negatif kontroller her hasat zamanı için hesaba katılmalıdır. Ayrıca, muamele edilmemiş kontroller, seçilen çözücü tarafından oluşturulmuş zararlı veya mutajenik olmaksızın (onu) göstererek tarihsel kontrol verisi olmadıkça kullanılmamalıdır.

Prosedür

Test Maddesi ile Muamele ;,

Bölünen(proliferating) hücreler, metabolik aktivasyon sistemi bulunması ve yokluğunda test maddesi ile muamele edilirler. Limfositlerin muamelesi, mutajenik uyardıktan sonra yaklaşık 48 saat (insanlar için) sonra başlamalıdır.

Duplike (ikincil) kültürler, normal olarak her bir konsantrasyonda kullanılmalı ve negatif çözücü kontrol kültürleri için kuvvetle tavsiye edilirler. İkincil kültürler arasında

tarihsel veriden minimal değişim gösterebildiği yerde her bir konsantrasyonda kullanılmak amacıyla tekli kùltürler için kabul edilebilir. Gazlı ve buharlaşabilen maddeler, uygun metotlar yardımıyla (Ör; kapalı kùltür kapları içinde) test edilmelidir.

Kùltür Hasat Zamanı :

İlk deneyde hücreler 3-6 saat süreyle metabolik faaliyetli ve aktivasyonsuz test maddelerine maruz tutulurlar ve muamelenin başlamasından sonra yaklaşık 1,5 normal hücre döngüsü uzunluğuna eşit bir zamanda örneklenir. Şayet bu protokol, aktivasyonlu ve aktivasyonsuz olarak her ikisiyle de negatif sonuçlar veriyorsa, yaklaşık 1.5 normal hücre döngüsü uzunluklarına eşit bir zamanda örneklmeye kadar, devamlı muamele ile aktivasyonsuz ilave bir deney yapılmalı. Bazı kimyasallar 1.5 döngü uzunluğundan daha uzun muamele / örnekleme suretiyle çok kolay olarak belirlenebilir. Metabolik faaliyetli negatif sonuçlar, sebep –sonuca bakılarak desteklenmeye ihtiyaç duyarlar. Negatif sonuçların desteklenmesinin gerekliliği düşünülmediği durumlarda, “justification” kullanılabilir.

Kromozom Preparasyonu :

Hücre kùltürleri genellikle hasattan 1-3 saat önce kolsemid veya kolşisin ile muamele edilir. Her bir hücre kùltür hasat edildikten sonra kromozom preparasyonu için ayrı ayrı işleme tabi tutulur. Kromozom preparasyonu, hücrelerin hipotonik muamelesi, fiksasyonu ve boyanmasını ihtiva eder.

Analiz :

Pozitif ve negatif kontrollere ait bütün lamalar, mikroskopik analizden önce teker teker kodlanmalıdır. Zira, fiksasyon prosedürleri genellikle belli bir oranda kromozom kayıplı metafaz hücreleri oluştururlar. Bundan dolayı hücreler bütün hücre tipleri için modal sayı ± 2 'ye eşit sentromer sayısı içerirler. Her konsantrasyon için en az 200 iyi yayılmış metafaz sayılmalı ve kontrol eşleşmeler arasında eşit olarak bölünmelidir(şayet uygun ise). Bu miktar, yüksek hata sayıları gözlenildiğinde azaltılabilir.

Al-Sabti (1991), tarafından su ile taşınan veya oluşturulan genotoksik amillerin risklerinin bir göstergesi olarak balıklardaki kromozom hataları kullanıldığı zaman herhangi bir laboratuvar çalışması için ihtiyaç duyabilecek bir tablo şu şekilde önerilmektedir. (63).

Araştırmacının Adı: Kromozomları inceleyen kişinin adı.

Tür: Deney yapılan canlının yaygın ve bilimsel adı.

Deney Tarihi :

Yer: Deneyimizin saha veya laboratuvar şartlarında olup olmadığı.

Örnek Numarası : Deneyde kullanılan bütün örneklerin Latin sayıları

Lam Numarası : Lamaların rakamsal kodlanması.

Lam üzerinde metafazın pozisyonu: Mikroskop yardımıyla lam üzerinde tespit edilen metafazın yerini şüpheli durumlarda tekrar bulabilmek, diğer araştırmacılar tarafından da kullanılmasını sağlamak ve fotoğrafını çekebilmek için koordinatlarının yazılması.

Muamele: Numunenin içinde kirletici olduğundan şüphelenilen su kütlelerindeki doğal ortamlarından yakalanarak mı elde edildiği veya laboratuvar şartlarında genotoksik amillere mi maruz bırakıldığı veyahut da etkisi araştırılacak amilin numuneye i.p veya i.m enjeksiyonuyla mı muamele edildiği.

Doz: İn vitro deneylerin çoğu doz-cevap çalışmaları şeklinde planlanmıştır. Bu nedenle kullanılan dozlar tabloda yer almalıdır.

Normal metafaz: Sayılmış bütün normal metafazların frekansı.

Hatalı metafaz: Numunedeki sayılan hatalı metafazların sayısı.

Kromozomal anormalliklerin tipi: Farklı tipteki kromozom hatalarının frekansı.

Karyotip: Söz konusu balığın normal karyotipi de diploid sayı(2n) ve m,sm,st,t veya a ile kol sayısı (NF) verilerek ifade edilmelidir.

Toplam: Tablonun sonunda, ifade edilen bütün veriler için toplamlar belirtilmelidir.

Her bir SCE ve mikronukleus testi için istenilen tablo kullanılabilir veya şayet gerekli ise standart tabloda birleştirilebilirler: Mesela, mikronuklei / 1000 hücre frekansı SCE / hücre frekansı, tabloda hatalı metafazların yerine kullanılabilirler. Aşağıda örnek olması amacıyla, metafaz analizi için bir tablo düzenlenmiştir.

Tablo 4. Balık Kromozomları Üzerinde Genotoksik Etkiler (63).

Araştırmacının Adı: Mehmet Ulupınar

Tür: Gökkuşluğu alabalığı (*O.mykiss*)

Tarih:15.09.1997

Yer: K.T.Ü, Sürmene Den. Bil. Fak. Laboratuvarı

Tablo 4. Balık Kromozomları Üzerinde Genotoksik Etkiler (63).

Num No:	Lam No:	Metafaz Pozis.	Muamel Tarzı	Doz mg/kg	Nor. Metefaz Sayısı	Hatalı metefaz sayısı	Hata Tipleri	Karyotip (2n=60) m+sm+s t+a veya t
1	12a	23-130	Benzidin (i.p.)	10	203	35	r,dic.,br ,gap	44m,sm +16st+a
2	23c	31-125	"	40	154	47	r,dic.,ga p	
3	7a	27-111	"	80	136	83	b,r.,gap. ,frag.	
TOP								

Tablo 5. Balık kromozomlarında SCE'ye sebep olan genotoksik etkiler (3)

Numune no	Lam no	Metafaz pozis.	Muamele tarzı	Doz mg /kg	Metafaz sayımı	SCE frekansı/1 hücre	SCE frekansı/100 Hücre
1	76d	13-11	Benzidine (i.p.)	10	123	18±0.78	23±0.43

Tablo 5'in Devamı

Numune no	Lam no	Mikronukleus Pozisyonu.	Muamele tarzı	Doz mg /kg	Sayılan Eritrosit Sayısı	Nükleotidli Eritrosit Sayısı 1Mn 2Mn	3Mn	Toplam Mn Sayısı
1	98c	22-145	Benzidine (i.p.)	10	1000	19 3	0	22
TOP.								

2.2.1.2. Kromatid Tipi Hataların Belirlenmesi

Balıklarda yapılmış Çalışmalar

Diğer türlerin (özellikle memelilerin) hücreleriyle çalışılmış olan birçok araştırmacı, balık kromozomlarıyla çalışmaya başlamışlardır. Ancak balıklar için kullanılan teknikler, aynı amaçla diğer organizmalar için kullanılanlardan birçok bakımdan farklılık arz etmektedir.

Kromozom çalışmaları, çevre koruma ile ilgili birçok programdaki önemine ilaveten çiftlikte yetiştirilmiş balıkların genetik ıslahı için de giderek artan bir öneme sahiptir.

Bu çalışmada, günümüz saha ve laboratuvar şartları altında genotoksik amillerin bir göstergesi olarak kromozom hatası tayininin kullanılmasının uygunluğu ileri sürülmektedir. Ayrıca, farklı genotoksik amillerin balık kromozomları üzerindeki etkilerinin nasıl olacağı kısaca tartışılmıştır. Burada, kromozom hatalarının değişik tipleri sunulmuş ve bunlara sebep olan mekanizmalar ortaya konulmuştur.

Genotoksik etkiyi belirlemede en geçerli metotlardan birisi olarak "Sister Chromatid Exchanges (SCE) (=Kardeş kromozomlarda Kromatid değişimi(KKD))" dir. Sitogenetik zararı belirleme konusundaki diğer iki metot ise "Micronuclei (M)" ve "Anaphase Aberrations (AA) (=Anafaz Hataları(AH))"metotları olup bu metotlar SCE tekniğine göre çok hızlı ve daha ucuz testlerdir. Ancak, balık kromozomlarının boylarının küçük

ve sayılarının fazla olması nedeniyle hata analizlerinin yapılması zordur. Bununla beraber, mikronuklei ve anafaz hataları testi sistemleri, teknik olarak daha basit ve uygulamak için daha kolaydır. Böylece, özellikle balıkların buldukları suyun kalitesi hakkında hızlı sonuçlara ihtiyaç duyan balık üreticileri ve biyologlar için daha kullanışlıdır.

Kardeş Kromatid Değişirme (SCE) Analizi Çalışmaları

Kardeş kromatid değişirme: SCE olarak bilinen bu teknik son birkaç yıl içinde geliştirilmiştir ve standart kromozomal tekniklerin kullanımıyla keşfedilen kromozomlar üzerindeki genotoksik etkileri meydana çıkarmak için Kligerman ve Bloom(1976),(37)' tarafından balıklarda uygulanmıştır.

Canlının mutajenik-kanseronejik amillere maruz kaldığını belirleyebilen metotlardan biri olan SCE metodu kromozom kırılması analizinden daha hassas bir metottur(Şekil 3). Birçok mutajenik ve kanseronejik kirlenici SCE frekanslarında önemli artışlara sebep olabilmektedir. Az ya da büyük olmayan kromozom hasarı meydana getiren seviyelerdeki bazı kimyasallar (mitomisin C, EMS, MMS, HN2 vb.) ile kültür edilmiş hücrelerde önemli SCE artışları gözlenmiştir.

SCE, tek bir kromozomun iki kromatidi üzerinde görünüşte benzer mevkilerde DNA kırılması ve yeniden birleşmesinin sitolojik görünmesidir.

Bir kardeş kromatid değişirme noktasında kromozomlar, bir açık, bir koyu kromatide sahiptir; değiştirilmiş meteryalli olanlar açık ve koyu bölge kromatidlere sahiptir. SCE analizleri, orada görünmeleri sebebiyle SCE frekansı ve kromozom hasarı vasıtalarına (ör; radyasyon ve kimyasallar) maruz olma arasında iyi bir korelasyon olması sebebiyle iyi bir göstergedir. Bu yüzden, bu tip analizler mutagenesis ve balıklarda çevresel zehirleyiciler çalışma hususunda değerli bir yoldur. Çalışmalar, in vivo dokularda, deneysel balıklardan kültürlenmiş limfositlerde ve in vitro vasıtalarla maruz bırakılmış hücrelerde yapılabilir (35,51).

SCE, ihtiva eden hücre kültürlerini belirlemek için birçok sistem kullanılmaktadır. İn vitro sistemler, önemli deneysel özelliklere sahiptir, fakat kimyasal maddeler canlı bir hayvana girdiği zaman ne olacağını sadece kabaca bilgi verir. Bununla beraber bromodeoxyuridine (BrdU) probu ile SCE'nin varlığının ortaya konulduğu iki in vivo sistem vardır. Vicia faba kök uçları, tavuk ve fare embriyoları bu teknikler ile, aynı

kromozomun iki kardeş kromatidi arasındaki genetik materyalin değişiminin gözlenmesi kolaydır. Bu işlem, DNA replikasyonunun en az iki çevirimde timidinin analogo olan 5-bromodeoxyuridine (BrdU)'e bölünmekte olan hücreleri maruz bırakmak suretiyle gerçekleştirilebilir.



(Şekil 3) Örn:SCE www.fgf.de/english/fup/fgfpub

Fakat, genel olarak kullanılabilirliği tespit edilmiş bir BrdU konsantrasyonu yoktur. Balığın sıcak veya soğuk su, deniz veya tatlı su, karnivor veya omnivor vb. olması gibi farklı faktörlere bağlı olarak, optimum değer balık türlerine göre değişebilir. BrdU konsantrasyonunun en uygun seviyesini belirlemek için, araştırmacı, hücre kültürü ortamında veya i.p. (intraperitoneal=karın boşluğu) veya i.m. (intramuscular=kas içi) enjeksiyonuyla deneme yapmalıdır.

Kromozom hatası testi, yüksek dozlarda bulduklarında farklı kromozomal hatalara sebep olabilen kanserojenik-mutajenik kimyasallar ve iyonizeradyasyon'un etkilerini belirlemek için uygundur. SCE metodu yardımıyla ise, sözkonusu amillerin düşük dozlarındaki etkileride çok kolay belirlenebilir. Bu ise kimyasal veya amilin aksiyon mekanizmasına (yani onun S-fazına bağımlı olup olmamasına) bağlıdır.

Bu durum, Kligerman ve Bloom (1976),(38)'un Mudminnow (*Umbra limi*) üzerindeki çalışmalarında SCE sistemini geliştirmelerine yardımcı olmuştur. Bu teknik çevre kirliliği problemleri ile ilgili laboratuvar çalışmalarında çok popüler olmuştur. Bu test için çeşitli balık hücreleri kullanılmıştır (ör; Barker ve Rackham (1979) tarafından(11) *Amea splendens*, Stromberk vd.(1981) tarafından (59) English sole

(*Paophrys vetulus*), Park ve Grimm (1981) tarafından(51):Avrupa yılanbalığı (*Anguilla anguilla*), Landolt ve Kocan (1983) tarafından (40):Pasifik sanddab (*Citharichtys sordidus*) ve Van de Kerhhoff ve Van der Gaag (1985) tarafından (64) *Nothobranchius rachowi*'da kullanılmıştır.

Kligerman vd. (1981) tarafından(36) tarif edilen SCE metodu şöyledir;

1. Balıklara 500µg BrdU/g vücut ağırlığı hesabıyla i.p.enjeksiyonu yapılır.
2. 24 saat sonra, balıklara test amili (etkisi araştırılan kirletici madde) i.p. yoluyla enjekte edilir veya bu madde balığı içinde bulunduğu akvaryuma belli bir oranda konularak balığın bu maddeden etkilenmesi sağlanır.
3. 4 gün sonra ve öldürülmeden yaklaşık 7 saat önce her bir balığa metafazda bölünen hücreleri bloklamak için 25µg kolsemid/g v.a. veya kolşisin verilir.
4. Balıklardan solungaçlar böbrek ve bağırsak alınır ve 30dk.%0.4'lük KCl (hipotonik solüsyon) ile muamele edilir.
5. Dokular, methanol: asetik asit içinde 1 gece fiske edilir ve dilute hücre süspansiyonu elde etmek amacıyla iyi bir çökme lamında %50'lik asetik asit te yumuşatılır.
6. Hücre süspansiyonu, hücrelerin tek tabaka halinde bir halka oluşturması için 50°C'ye kadar ısıtılmış bir lam üzerine konulur.
7. Boyama için, lamlar, 30-45 dak. Şiddetli floresan ışığına ıslak konmuş lamaların maruz bırakılmasını takiben Hoechst 33.258 (200µg/ml) ile 10 dak. muamele edilir.
8. lamlar hava ile kurutulur, xylol ile temizlenir ve üzerine konur.

2.2.1.3. Anafaz Hatası Çalışmaları :

Anafaz Hataları (AA): Anafaz hatası tekniği, bazı kirleticilerin genotoksik etkilerini daha iyi ortaya koyması ve su ortamındaki mutajenlerin bir göstergesi olarak cazibeli olmasından dolayı çok önemlidir (44). Bu test sistemi, metafazdaki kromozom hatalarının belirlenmesinden çok daha basittir. Bu teknik, in vitro hücre kültürlerinde (39), ve hem in vitro hem de in vivo'nun her ikisinde Liguori ve Landolt (1985)(41): genoto-oksidentlerin yüksek seviyelerine maruz kalan canlılarda, anafaz esnasında mitoz hücrelerindeki kromozomal makro lezyonları belirlemeyi sağlar.

Anafaz hataları anafaz esnasındaki metafaz plağından bir veya daha fazla kromozomun hareketindeki bir gecikme(anafaz gecikmesi) gibi veya ayrılması

suretiyle meydana gelebilir, fakat sentromer her iki karşı kutbun iğilerine bağlı olan hariç hala bölünmemiştir. İz (Trailing=kuyruk) ve bitişik kırılmış parçalar anafaz hatalarında en sık görünen tipler olup anafaz esnasında ayrılmış kromozomlar arasında derin bir boyanmış yapı olarak görünebilirler. Gökkuşığı alabalığı hücrelerinde anafaz hataları testi Liguori ve Landolt (1985) tarafından(41) aşağıdaki şekilde önerilmiştir.

1. Formalinde fiske edilmiş embriyolar yumurta sarısından ayrılır.
2. 2-2-3 saat %50-70'lik asetik asit içinde bekletilir.
3. 1 kısım aside 19 kısım boya oranında propionik asit içeren %2'lik acetorcean boyasına 2-3 saatliğine bırakılır.
4. Boyanmış embriyo bir lam üzerindeki bir damla asetik asit içine konulur.
5. Lam ve lamel arasında yavaşça ezilir.
6. Ezme preparasyonlar temiz tırnak cilası ile kapatılır.
7. Hatalı anafazların sayısı, ilk yüz anafaz hücresinin sayılması veya bir ışık mikroskobu (X1000) kullanma lamalar üzerinde mevcut anafaz hücrelerinin tamamının sayılması suretiyle belirlenir.

2.2.1.4. MİKRONÜKLEUS (M) ÇALIŞMALARI

Mikronükleus testi, kromozomal kırığın kalitatif tayininin hızla yapılmasını sağlamaktadır ve kimyasalların mutajenliğini aksettiren bir metod olup kolay başarılmış ve sitoplazmada daimidir. Mikronükleinin tanınması teknik olarak çok kolaydır ve bu teknik metafazdaki kromozomların direk gösterilmesinden 15 defa daha hızlıdır.

Mikronüklei, anafaz esnasında kromozom veya aksentrik kromozom fragmentlerinden şekillenen kromatin içerikli sitoplazmik cisimcikler olup hücre siklusunda kardeş çekirdeklerin birbirleriyle birleşmeleri sırasında meydana gelir. Kromozom kırılmaları, yapısal anormal kromozomlar ve iğ anormalliklerinin sonucu olan genetik hasarlar mikronüklei oluşumuna yol açtığından dolayı, mikronüklei indeksi bu tip genetik hasarların bir göstergesidir. Esansiyel olarak klastojen etki gösteren tüm ajanların mikronükleiye neden olduğu saptanmıştır. Mikronüklei sayımı kromozomal aberrasyon tespitine göre daha az teknik malzeme gerektirdiğinden ve daha hızlı olduğundan dolayı bu teste nazaran daha fazla tercih edilmektedir. Bunun yanı sıra klastojenezis ve iğ bozuklukları gibi önemli iki genetik hasardan meydana geldiği için,

bu tip hasarlara neden olan kimyasalların taranmasında yaygın olarak kullanılan bir testtir.

Mikronükleus testi, hayvanlardan alınan periferik kan hücrelerinin(eritrositlerinin) analizi yoluyla eritroblastlarının mitoz cihazlarında veya kromozomlarda test maddesi tarafından oluşturulmuş hasarın belirlenmesi için kullanılır. Mikronuklei (M), asentrik kromozom parçalarının yoğunlaştırılması suretiyle veya anafazi takip ederek asıl nükleide dahil olmayan bütün kromozomlar tarafından oluşturulmuştur. Bir mikronükleus, bir hücrenin stoplazmasında ışık mikroskobu yardımıyla görülebilen bir fazlalık (supernumerary) nukleustur.

Mikronuklei testleri içerisinde ise en yaygın kullanım alanı bulan İn vivo memeli eritrosit mikronuklei testidir. Bu İn vivo mikronukleus testi, eritroblastların mitotik aparatları veya kromozomlarında test substansları tarafından meydana getirilen hasarın tespitini sağlar. Bu test genellikle rodentlerin kemik iliği ve / veya periferik kan numunelerindeki eritrositlerin analizi yoluyla yapılır. Rodent kemik iliği, polikromatik eritrositler bu dokuda üretildiği için bu testte rutin olarak kullanılırlar. Polikromatik (immature) mikronukleili eritrositleri dalak tarafından dolaşım kanından uzaklaştırılmadığı bilinen türlerde periferik kan da kemik iliğine eşit şekilde mikronuklei ölçümünde kabul edilebilir bir dokudur (58).

İn vivo memeli mikronukleus testinin amacı mikronuklei şekillenmesiyle sonuçlanan sitogenetik hasara neden olan substansların ayırımını yapmaktır. Kemik iliğinin normal fizyolojisinde, bir eritroblast bir polikromatik eritrosite dönüşürken, ana nukleus çıkarılır. Ancak patolojik olarak bir mikronukleus formu gelişmişse mikronuklei çekirdeksiz sitoplazma içerisinde kalır. Mikronukleilerin mikroskop altında görülmesini spesifik boyama teknikleri ve hücrede bir çekirdeğin olmayışı kolaylaştırmaktadır. Uygulama yapılan hayvanların mikronukleili polikromatik eritrositlerinin frekansında bir artış, kromozomal hasarın ve o kimyasalın potansiyel karsinojenik / mutajenik olduğunun göstergesidir (49).

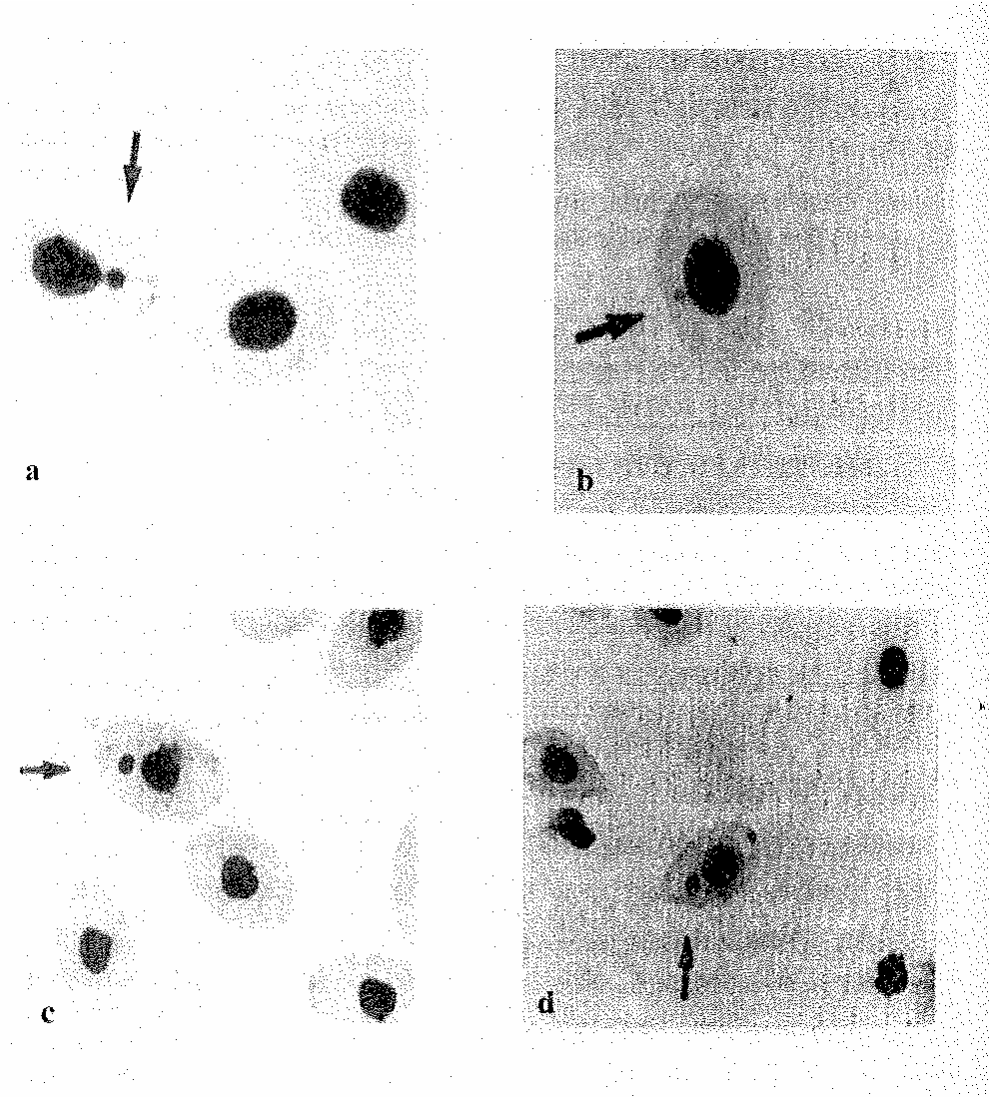
İn vivo memeli mikronukleus testi, İn vivo metabolizma, farmakokinetik unsurlar, DNA onarım prosesleri, türlere özel farklılıklar ve dokular arası etkileşim gibi faktörlerin değerlendirilmesini de mümkün kıldığından gerçek bir mutajenik değerlendirme sağlar. Bu yüzden mutajenik defektlerin tespitlerin İn vitro sistemlere göre daha kullanışlı bulunmaktadır (15,17,19,22,:23,24,34,43,49,58).

Heddle(1973) ve Schmid(1975), mikronükleinin sitoplazma da aşğıdaki gibi şekillendiğini ifade etmişlerdir(36,57): Anafazda, sentrik elementler iğ kutuplara doğru hareket ettikleri zaman sentrik bir kromotid ve kromozom parçaları geri kalırlar. Telofazdan sonra zarar görmemiş kromozomlar sentrik parçalar gibi düzenli “daughter (evlat)” nükle’ye sebep olurlar geciken elementlerin çoğu evlat hücreler içerisinde dahildirler, fakat önemli bir oran, asıl nükleustan çok daha küçük (1/5-1/20) olan bir veya birkaç ikincil nüklei olarak şekillenirler ve bu yüzden “mikronülei” olarak adlandırılırlar.

Al-Sabiti ve Hardig (1990)(4), balıklardaki mikronükleinin, büyüklük olarak Heddle (1973) ve Schmid (1975) tarafından belirtilenden(36,57) daha küçük olabileceğini ifade etmiştir. Çünkü, onların açıklamaları büyük kromozomlara sahip olan memeli hücrelerine dayandırılmaktaydı. Diğer taraftan, balık kromozomları çok daha küçüktürler, mikronüklei asıl nükleustan yaklaşık 1/10-1/30 daha küçük olabilir demıştır. Mikronüklei gözlemleri çok hızlı yapılabilir. Balık türlerinin çoğunda eritrositler oldukça iridirler ve büyük bir nükleusa sahiptirler (5).

Son birkaç yıl içinde düşük dozda iyonize radyasyon ile problemler arasındaki ilişki artmıştır. Balıkların genetik materyali farklı yollarla iyonize radyasyon tarafından etkilenebilirler. İyonize radyasyonun, en azından yüksek dozlardan sonra kromozom hatasına sebep olduğu bilinmektedir. Çernobil’e benzer radyasyon kazalarının sonuçlarının araştırılmasında sadece fiziksel ölçümlerle yetinilmemelidir, ayrıca biyolojik metotlar da kullanılmalıdır. Balıklarda, radyokontaminantlar ve genetik etkiler arasındaki ilişki iyi bilinmemektedir. Genotoksik ortama maruz kalınmanın basit bir testi, balık eritrositlerinde mikronüklei frekansını çalışmaktır.

Radionükleid’lerden kaynaklanan radyasyon, ya doğrudan yada aktive edilmiş metabolitler yardımıyla DNA’ya saldırır ve mutasyonlara sebep olur, ve daha sonra genotoksik olarak düşünülür. Göllerdeki ve diğer sulardaki balıkların bütün vücudu ışınlamaya (irradiation) maruz kalabilir. Balık hücreleri radyasyona maruz kaldıkları zaman her bir kromotidte mevcut olan tek bir DNA çiftinin kırılması derhal gerçekleşir. Bu kırıkların çoğu, diğer hücreler anormal olarak yenilenirken farklı periyotlarda yenilenecektir.



Şekil 4. Mikronükleuslu eritrosit oluşumu (okla gösterilmiş): a) Doğa sazanı (*Cyprinus carpio*), b) Tatlısu kefali (*Leuciscus cephalus*), c) Kadife balığı (*Tinca tinca*), d) Ot sazanı (*Cytinopharyngodon idella*), (5).

Balıklarda mikronüklei testi, kromozom hasarı frekansını sağlar ve dolaylı olarak çevresel rado-kontaminantlar ve su ekosistemimizde insanlar tarafından oluşturulmuş ve doğal diğer birçok kirleticilerden insan sağlığı için riskin olup olmadığının anlaşılmasını sağlar. Bu test genotoksik maddeler veya amillerin birinci derecede görüntülenebildiği bir test olarak hizmet edebilir.

Her hangi bir hücre tipi için mikronükleus analizi, muamele edilmiş populasyonun önemli bir kısmının mitoz geçirmesine, böylece birinci hücre döngüsü esnasındaki muamele yoluyla sebep olunmuş sentrik parçaların ikinci veya daha sonraki hücre döngülerinin her hangi bir safhasında sitoplazmadaki mikronüklei gibi kendilerini açıkça göstermelerini gerektirir (60).

Bu metotta, hayvanlar uygun bir usulle test maddesine maruz bırakılır, uygun bir zaman sonra periferal kan alınır, yayma preparasyonları yapılır ve boyanır. Periferal kanla çalışmalar için, son maruz bırakma işlemi ile hücre hasatı arasında mümkün oldukça az zaman harcanmalıdır. Preparasyonlar mikronüklei mevcudiyetini tespit için preparasyonlar analiz edilir. Analiz için, en az toplam 1000 eritrosit sayarak her bir hayvan için toplam(olgun+olgun olmayan) eritrositler içinde olgun olmayanların oranı tespit edilir. Pozitif ve negatif kontrolleri içeren bütün lamalar, mikroskopik analizden önce birbirinden bağımsız olarak kodlanır. Her hayvanda en az 2000 olgun eritrosit, mikronükleuslu olgun olmayan eritrositlerin oluş derecesini tespit için sayılır. İlave işlem olarak, mikronüklei için olgun eritrositler sayılabilir. Lamalar analiz edilirken, toplam eritrosit içinde olgun olmayan eritrositlerin oranı kontrol değerinin %20'den daha az olmamalıdır. Ayrıca hayvanlar 4 hafta veya daha fazla bir süre devamlı olarak muamele edileceği zaman, her bir hayvanda en az 2000 olgun eritrosite mikronüklei oluşum derecesi için sayılmalıdır. Otomatik analiz sistemleri (imaj analizi ve hücre süspansiyonları flow sitometrisi) doğrulama için alternatif olarak kabul edilir.

İlk olarak fareler de kullanılmak amacıyla geliştirilmiş olmakla beraber, bu teknik, daha sonra laboratuarda balıklara uygulanmak amacıyla Hooftman ve Raat (1982), tarafından geliştirilmiştir(28). Bu modifikasyon, "piscine micronucleus test" olarak bilinir ve kimyasal kontaminasyonlu balık ve omurgasızların hızlı ve ucuz bir in situ biyolojik indikatörü olarak önerilmektedir. Bu metot AA ve SCE testlerinde mevcut problemlerden kaçınmak maksadıyla balık sitogenetikçileri tarafından daha fazla tercih edilmektedir.

Mikronüklei testi, mutasyonel hasarın frekanslarını tayin etmeyi ve çevresel kirleticilerin insan sağlığına direkt ve indirekt tesirini tespit etmeyi sağlar. Herhangi bir hücre tipi için mikronükleus tayini, ilk hücre döngüsü esnasında muamele sonucu oluşturulmuş sentrik parçaların ikinci veya daha sonraki hücre döngülerinin herhangi bir

safhasında stoplazmadaki mikronüklei gibi kendilerini gösterebilir diye, muamele edilmiş popülasyonun gerçek bir parçasının mitozda çekilmesine ihtiyaç duyar.

Balıklarda mikronüklei ölçümleri, laboratuvar ve çevre şartları altında, çevre ile ilgili çalışmalarda kromozom hatalarından daha iyi bir parametre olarak gösterilmektedir.(4,12,16,18,30-32,40,44).

Her ne kadar çok hızlı yapılabilmesine ve ucuz olmasına rağmen, balıklarda mikronüklei oluşumu, toksikologlar tarafından nadiren kullanılmıştır. Carrasso (1990). aşağıdaki faktörlerin balıklar, kurbağagiller ve omurgasızlarda mikronükleus testinin, biyolojik bir gösterge olarak kimyasal kontaminasyonun kesin teşhisini engellediğini tespit etmişlerdir(12).

1. Zaten varolan çekirdek morfolojisindeki düzensizliklerin mikronükleinin genotoksik analoglarının sanılması.
2. Çekirdek lezyonlarının gerçekten genotoksiteden mi kaynaklandığı ya da herhangi bir exogeneous amile maruz kalmadan mı kaynaklandığı hususunda laboratuvar verilerinin yetersizliği.
3. Genotoksit lezyonlarının özelliklerini veya birkaç fotoğrafını içerecek şekilde verinin olmaması.
4. Laboratuvar çalışmalarında kimyasal maddeye maruz bırakma metodlarında uyumsuzluğun bulunması.
5. Biyolojik örneklerin toplandığı sahalarda kimyasal kontaminantların varlığını teyit etmek için kimyasal analizlerin yapılmamış olması.
6. Biyolojik bir göstergenin önemli olduğu yerlerde, ara kirlilik şiddetine sahip bölgelerden yeterince örneğin toplanması.

Hooftman ve Vink (1981) ve Hooftman ve Raat (1982) laboratuvar şartlarında etil metanesülfonat ile mudminnow (*Umbra pygmaena*)'da mikronüklei oluşturmuşlardır(28,30). Ayrıca, yine laboratuvar şartlarında, sazangillerden üç tür (doğa sazani, *Cyprinus carpio*; ot sazani, *Ctenopharyngodon idella*; kadife balığı, *Tinca tinca*)'de mikronüklei oluşturmak amacıyla 5 çeşit kanserojenik-mutajenik kimyasal (alfatoxin B1, aroclor 1254, benzidine, benzo(a)pyrene ve 20-methyl-cholanthrene) test edilmiştir (5).

Birleşmiş Milletler'de, Hose (1987) ve Carrasso (1990), Güney Kaliforniya açıklarındaki kontamine olmuş bölgelerden elde ettiği iki deniz balığı (White croaker,

Genyonemus lineatus ve Klep bass, Paralabrax calthratuse)'nda eritrosit mikronükleisi dolaşım frekansının, daha düşük kontamine olmuş mevkilerden elde edilen balıklara nispetle yüksek olduğunu bulmuşlardır(31,12). Bu tahlil sistemi, İsveç'te endüstriler tarafından kirletilen Baltık Denizi'nin çeşitli bölgelerinden (4) ve radiosezyum ile kirletilmiş İsveç göllerinden elde edilen balıkların hücrelerinde saha şartları altında başarılı olunacağını göstermiştir (2).

2.3. ARAŞTIRMA ÖRNEKLERİNİN ALINDIĞI ALANIN ÖZELLİKLERİ

O.angorae örnekleri Kars çayı (Kars)'ndan avlanmıştır. Kars çayı farklı isimlerle anılan yan kollardan birleşmesinden oluşur. Bunlar Sarıkamış Çayı, Kekeç Çayı, Katranlı Çayı, Bayburt Suyu, Susuz Çayı, Çıldır Göluyağı, Karahan Çayı ve Tazekent Suyudur.

Uzunluğu 93 kilometre olan Kars çayı'nın en uzun kolu Sarıkamış Çayıdır. Soğanlı Dağlarının Aşit Tepe (2350 m) eteklerinden doğan Sarıkamış Çayı, Sarıkamış ilçesini geçtikten sonra Kars çayı adını alır. Kars çayının su potansiyeli açısından en önemli kolu Kekeç Çayıdır. Katranlı Çayı ve Bayburt Suyu ile birleştikten sonra Selim İlçesi Killik düzü mevkiinde Kars çayı'na karışır.

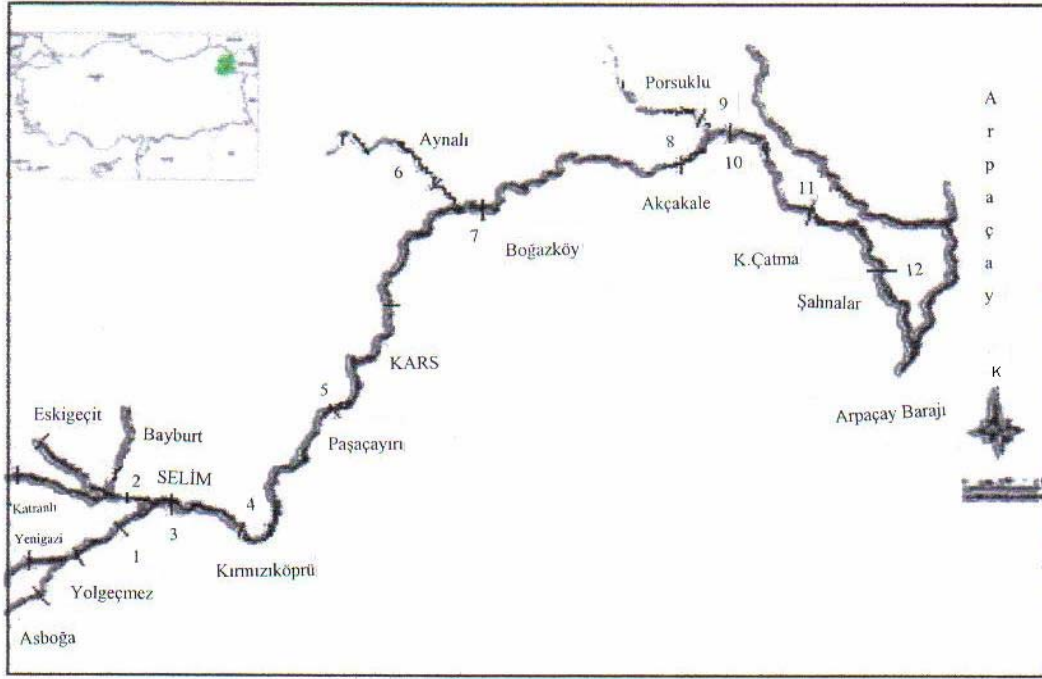
Kars Çayı 6990 km²'lik drenaj alanına sahiptir. Kars Çayını, Sarıkamış ve çevresindeki yükseltilerin doğu yamaçlarından inen sular oluşturmaktadır. Bu sular doğuya selim ovasına doğru akışa geçerek Sarıkamış çayı adını alır. Yolgeçmez köyü yakınlarında güney deresini de içine alarak Selim ovasına girer. Selim ilçesi yakınlarında kuzeyden gelen Güllü, Kekeç ve Bayburt Dereleri ile birleşerek doğuya doğru Selim ovasını kat eder. Ova çıkışında güneyden gelen Yunus deresini alır. Kırmızı köprü mevkiinde Selim ovasını terk ederek güneybatı-kuzeybatı yönünde akışını sürdürür. Dikme Köyünü geçtikten batıdan gelen Sarıçayır Deresi ve Değirmen Deresini alarak Kars'a doğru akışına devam eder.

Kars Çayı, Kars'ı geçtikten sonra Boğazköy dolaylarında batıdan gelen Çarbaş deresini içine alır. Çamçavuş Köyü'nde doğuya dönerek akışını sürdürür. Akçalar köyü civarında Susuz ve Porsuk Ovaları çevresinin sularını boşaltan Çayır deresini alır. Karaorgan Köyü yakınlarında Arpaçay Ovasının sularını drene eden Cerede deresini alır. Kars çayı Geçit Köyünden sonra güneye doğru akışını sürdürür. Aslanhane Köyü

güneyinde devam ederek batıdan Başgedikler ovasından gelen çevre sularını boşaltan Başgedikler Çayını alır ve bu kesimde Arpaçay olur.

Kars Çayı yaklaşık 3000 m kotlarındaki Allahuekber Dağlarından doğar. Allahuekber Dağlarının en yüksek tepesi 3120 m ile Allahuekber Tepesidir. Kars Çayı doğduğu yerde farklı isimlerle anılan kollardan meydana gelir. Bunlar, Sarıkamış Çayı, Katranlı Çayı, Kekeç Çayı, Bayburt Çayıdır. Bu akarsular Kars'ın Selim ilçesi yakınlarında birleşir ve Kars Çayını teşkil ederler. Kars Çayı Selim ilçesinden sonra akışını doğu yönünde sürdürerek Kars ili içinden geçer. Carcı Köyü yakınlarından kuzeyden Çıldır Gölü ayağını alır. Daha sonra Arpaçay barajına dökülür.

İnceleme materyalimiz olan *O.angorae* (Steindachner 1897) yukarıda da değindiğimiz gibi sadece Kura-Aras Havzasında yaygın bulunan bir türdür. Kura nehri Türkiye'den kaynaklanarak, Transkafkasya olarak adlandırılan Gürcistan ve Azerbaycan içinden geçen, yaklaşık 1500 km uzunluğunda bir nehirdir. Hazar denizine dökülmeden önceki 480 km uzunluğundaki kısmı deniz taşıtlarının seyri için uygun bir özellik arzeder. Nehrin kaynağı, Türkiye'nin kuzeydoğusundaki bir dağdan kaynaklanan Kuru çayıdır. Kuzeydoğu yönünde akıp Gürcistan topraklarına girer ve Gori şehrinin yakınından geçtikten sonra güneydoğu yönünde akmaya devam eder. Sabirabat'ta, Arasın başlıca kolları Kura nehrine katılır. Kura nehri, Bakü şehrinin güneyinde Hazar denizine dökülür. Aras veya diğer bir deyişle Araks nehri, Asya'nın güneybatısında Erzurum şehri sınırları içerisinde kaynaklanır. Türkiye'den kaynaklanan nehir genelde doğu yönünde akarak Ermenistan, daha sonra da Azerbaycan topraklarına girer ve başlıca kolları Kura nehrine katılarak Hazar denizine dökülür. Aras nehri; Ermenistan-Türkiye, Ermenistan-İran ve Azerbaycan-İran arasındaki sınırın şekillenmesinde önemli rol oynar. Aras nehrine katılan en önemli kollar 914 km uzunluğundaki Hrazdan ve Qareh nehirleridir (46).



Şekil 5. Kars Çayı haritası (8).

Yağış Alanı = 4793 km²

Yıllık Ortalama Su= 604 hm³

Kars Çayı Boyu = 120 km

Kars Çayı suyunun özelliklerini belirlemek amacıyla değişik zamanlarda DSİ Genel müdürlüğü tarafından analizleri yapılmıştır. Bu analizlerin sonucu Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Kars Çayı Su Kalite Değerleri (8).

Özellikleri	01.07.2000	03.10.1994	19.10.1994	19.08.1964
Ph	8.59	8.06	8.34	8.20
ECx E ^o 25 °C	431	420	387	388
Toplam Katyon (me/lt)	4.66	4.58	4.25	3.88
Na ⁺	1.26	1.05	1.05	1.38
K ⁺	0.11	0.13	0.10	0.00

Ca ⁺⁺ Mg ⁺⁺	3.29	3.40	3.10	2.50
Toplam Anyon (me/lt)	4.66	4.58	4.25	3.88
CO ₃ ⁻²	0.84	0.16	0.62	1.60
HCO ₃	2.81	3.76	2.85	1.44
Cl ⁻	0.62	0.42	0.42	0.48
SO ₄ ⁻²	0.39	0.24	0.36	0.36
% Na	27.04	22.92	24.70	36.00
SAR	0.98	0.80	0.84	0.52
Sulama Suyu Sınıfı	C ₂ S ₁	C ₂ S ₁	C ₂ S ₁	C ₂ S ₁

2.4. BALIK HAKKINDA GENEL BİLGİLER

2.4.1. Familya: *Balitoridae*

Genellikle hızlı akan sularda yaşayan küçük vücutlu balıklardır. Kayalara tutunmak için ventral yüzgeçleri modifiye olmuştur. Büyük emici ağızlara sahiptirler. Ağızlarının etrafında en az 3 çift bıyık bulunur ve özelliği ile cobitidae familyasına benzerler. Bu familyanın 52 genusu ve 500'den fazla türü vardır (10).

2.4.2. Cins: *Orthrias*

Vücut iğ şeklinde, rengi koyu kahverengi veya kahverengi – sarı zemin üzerinde benekler bulunur. Ağız kenarlarında bir çift, üst dudakta ise iki çift olmak üzere bıyıkları mevcuttur. Gözlerin alt tarafında diken bulunmaz. Dorsal yüzgeçleri 6 – 18 dallanmış ışın ihtiva etmektedir. Kaudal yüzgeç dış bükey, düz ve derin çatallı olabilmektedir. Bazen sırtta dorsal yüzgecin gerisinde bir karina bulunur. Yüzme keseleri kemik bir kapsülle tamamen örtülüdür (10).

2.4.3. *Orthrias angorae* (STEINDACHNER, 1897)

Vücut silindirik şekilli olup, çok küçük pullarla örtülmüştür. Gözler küçük ve başın üst tarafına doğru yerleşmiştir. Pektoral yüzgeçler çok uzundur ve ventrallerin iyice yakınına kadar uzanabilir. Burun üzerinden çıkan bıyıkların boyları aşağı yukarı birbirlerine eşittir ve göz çapından 1-1.5 misli daha uzundur. Dorsal yüzgeç, burun ucuna ve kuyruk yüzgeci başlangıcına eşit mesafede bulunur. Kuyruk yüzgecinin

serbest kenarı büyük bir varyasyon göstermekte olup, bazı bireylerde düz, bazılarında ise derinliği az çok değişen bir girinti meydana getirir.

Renk çok değişken olmakla beraber, genellikle gri-sarı görünüştedir. Vücudun sırt bölgesinde ve yan taraflarında, çeşitli büyüklükte ve gelişigüzel dağılmış olan kahverengi-esmer benekler bulunur. Dorsal ve kaudal yüzgeçler, çoğu kez düzenli seriler halinde yerleşmiş ve küçük kahverengi noktalardan meydana gelmiş enine bantlarla süslenmiştir. Diğer yüzgeçler ise, genellikle renksizdir. Maksimal vücut uzunluğu 8-9 cm. kadardır.

Bu tür, genellikle temiz ve serin olan nehir ve çayların bilhassa yavaş akan çakıllı-kumlu zeminlerinde yaşarsa da, bazen göllerin fazla derin olmayan kıyı zonlarında da bulunur. Gececi özellikte olup gündüzleri daima taşlar altında gizlenen ve sedenter olarak yaşayan bir zemin balığıdır. Temiz suları tercih etmekle beraber, pollüsyona karşı da çok dayanıklı olduğundan, oksijenin eser halde bulunduğu ortamlarda bile uzun süre yaşayabilir. Yumurtlama periyodu Mayıs-Temmuz ayları arasına rastlar. Genellikle 5 cm. boyda iken cinsel olgunluğa erişirler. Yumurtalar çakıllar, taşlar ve bitki gövdeleri üzerine yapıştırılır. Başlıca gıdasını bentik omurgasızlardan kurtlar ve böcek larvaları oluşturur.

Doğu ve Güneydoğu Anadolu'nun küçük bir kısmı hariç, bütün Anadolu'ya yayılmış olan bu türün, dorsal yüzgeçteki dallanmış ışın sayısının farklı olmasına göre Türkiye'de iki alttürünün bulunduğu (*O.angora angora* STEINDACHNER 1897 ve *O.angora bureschi* DRENSKY 1928) rapor edilmiştir. Bu rapora göre: *O.angora angora*'nin yumuşak ışın sayısının genellikle 7 olup Orta ve Kuzeydoğu Anadolu kesimlerinde yayıldığı; *O.angora bureschi*'nin ise yumuşak ışın sayısının genellikle 8 olup Doğu, Güney ve Güneybatı Anadolu bölgelerinde yayıldığı belirlenmiştir. Fakat her iki formun yayılma alanları, özellikle Batı ve Kuzeybatı Anadolu'da birbirine çok karıştığından, alttür yönünden kesin bir sonuç ortaya konulamamıştır (20)



Şekil 6: *Orthrias angorae* (www.fishbase.com, 2005).

III- MATERYAL VE METOD

Deneylerde kullanılan balıklar Selim ilçesi yakınlarından geçen Kars Çayı'ndan elektrikli şokerler kullanılarak yakalandı Kura-Aras nehir yatağı [(lat 42° 15'E, long 41° 10'N), (lat 42° 30'E, long 40° 40'N), (lat 43° 10'E, long 41° 15'N), (lat 43° 15'E, long 41° 10'N)]. Yakalanan balıklar plastik bidonlara konuldu. Sağ olarak yakalanan balıkların KAÜ.Fen-Edb. Fak.Laboratuvarına sağ olarak getirilebilmesi için, motorlarla balıklara O₂ verilmesine dikkat edildi. Laboratuarda her akvaryuma 10 balık gelecek şekilde yerleştirme yapıldı. Balıklar iki gün arayla balık yemiyle beslenildi. Akvaryumlarda balık ölümleri çok nadirdi. Deneylere başlamadan önce, balıkların yeni ortamlarına alışmaları için bir hafta müddetince ortalama 18-20 °C'lik kloruz suda bekletildiler (Tablo 7). Mikronükleus testi için, akvaryumlar hazırlanarak içerisi hiçbir maddenin kalmaması açısından iyice temizlenip yıkanarak, içerisine malathion'un ppm olarak hesaplanmış değerleri (1 ppm/L, 2 ppm/L, 3 ppm/L, 5 ppm/L, 7 ppm/L) en küçüğünden başlanılarak konuldu her akvaryuma 10 balık yerleştirildi. Balığın her bir gramı için 1 L su konulduğundan ortalama her akvaryuma 30 L su konulmuştur. Ayrıca kontrol grubu da oluşturulmuştur. Mikronükleus değerinin maksimum değere ulaştığı 24-48 saat zaman dilimi çerisinde (ortalama 36 saat) balıkların kuyruk toplar damarından kan örnekleri alınarak 20 dakika etanolde fiske edilir. Hazırlanan preparatlar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldıktan sonra, Sorenson tamponundaki %10'luk Giemsa ile 20 dakika boyanır. Preparatlar kodlanarak oda ısısında kurumaya bırakıldıktan sonra, her preparattan 1000 eritrosit hücresi sayılarak toplam sayılan hücrelerin ortalaması alınarak her 1000 eritrosit hücresindeki mikronükleus oluşum frekansı belirlenmiştir.

Tablo 7. Akvaryumlarda kullanılan suyun fizikokimyasal özellikleri.

Parametreler	Değerler
Sıcaklık (°C)	19±1
pH	7.2-7.3
Çözünmüş Oksijen (mg/L)	8-9
Toplam Sertlik (CaCO ₃) (mg/L)	150-170

IV- BULGULAR

Gelişen sanayi ve teknolojiye paralel olarak sayıları hızla artan kimyasal maddeler insan yaşamını kolaylaştırmaları, istenmeyen bazı olguların ortaya çıkmasını engellemeleri gibi pek çok faydalı yararlar göstermeleri yanında özellikle bunların kullanıldıktan sonra gereken şekilde yok edilmemeleri, saklanma ve kullanma talimatlarına tam olarak uyulmaması nedeniyle canlılar üzerinde pek çok olumsuz durumu da paralelinde getirmektedir. Bu yüzden son yıllarda, besin zinciri halkaları düşünülerek bu kimyasal maddelerin canlılar üzerindeki genotoksik etkisi pek çok araştırmacı tarafından incelenmektedir. Bu nedenle tarımsal ürünlerin stoklanmasında yaygın şekilde kullanılan bir insektisit olan malathion'un genotoksik etkisinin görülebilmesi için, bu maddenin kullanım esnasında ve sonrasında toprağa ve oradan da sucul alana geçebilme durumu düşünülerek sucul alandaki pelajik bölgede bulunan balıklar araştırma materyali olarak kullanılmıştır.

Mikronükleus testi ile malathion'un genç eritrositler üzerine yaptığı etki gösterilmiştir. Mikronükleus testi için akvaryumlara sırasıyla 1 ppm/L, 2 ppm/L, 3 ppm/L, 5 ppm/L ve 7 ppm/L konulmuş, mikronükleus değerinin maksimum değere ulaştığı 24-48 saat zaman dilimi içerisinde (ortalama 36 saat) balıklardan kan örnekleri alınarak eritrosit hücreleri incelenerek sırasıyla kontrol grubunda ortalama her 1000 eritrosit hücresinde 3.86, malathion konulan akvaryumlardan alınan balıklarda doz sırası ile 4,75, 5,15, 6,59, 7,72, 9,13 mikronükleus ve pozitif kontrol için 10 ppm (mg/L) benzen konulan akvaryumdaki balık eritrositlerinde ise 9,87 mikronükleus tespit edilmiştir (Tablo 8).

Ayrıca çalışmada kullanılan suyun fizikokimyasal özellikleri incelenerek bunların benzer diğer çalışmalarda kullanılan su özelliklerine sahip olması amaçlanmıştır (Tablo 7). Su sıcaklığının çalışmada kullanılan malathion'un çözülebilmesi üzerinde etkili olduğu saptanmış ve maddenin deney öncesi su içerisinde tam olarak çözünmesi sağlanmıştır. Deneyler sonucunda malathion'un mikronükleus oluşumuna etki ettiği ve artan doz miktarıyla orantılı olarak mikronükleus oluşumunda da artış olduğu, kullanılan malathion doz miktarının artışıyla çekirdeğin morfolojisinde de belirgin değişimlerin olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 7 a, b ve Şekil 8).

4.1. İSTATİSTİKSEL BULGULAR

Tablo.8. Deney aşamasında verilen doz miktarı ve SCE değişimi tablosu

Muamele Şekli	Konsantrasyon (mg/L)	MN sıklığı (ortalama ± S.E)
Negatif kontrol	Çeşme suyu	3.86 ± 0.423
Positif kontrol	10 mg/L.Benzen	9.87 ± 0.858**
Malathion	1 mg/L	4.75 ± 0.524 ^{ns}
	2 mg/L	5.15 ± 0.597 ^{ns}
	3 mg/L	6.59 ± 0.527*
	5 mg/L	7.72 ± 0.535*
	7 mg/L	9.13 ± 0.121***

^{ns} : non significant (P> 0.05) * P< 0.05 ** P< 0.01 *** P< 0.001

Veriler: mikronükleus için

NC	PC	1ppm	2 ppm	3 ppm	5 ppm	7 ppm
4,20	11,05	5,25	5,00	7,50	8,25	9,36
3,02	8,20	3,50	6,25	5,25	6,65	8,95
4,36	10,36	6,50	4.20	6,25	8,26	9,08

Two Sample T- Test and Confidence Interval

Two sample T for NC vs 1 ppm

	N	Mean	StDev	SE mean
NC	3	3,860	0,732	0,42

1ppm 5 4,75 1,17 0,52

95 % CI for mu NC - mu 1ppm : (-2,76 ; 0,98)

T-test mu NC = mu 1 ppm (vs not =) : T = -1,16 **P = 0,29** DF = 6

Both use Pooled StDev = 1,05

Two Sample T- Test and Confidence Interval

Two sample T for NC vs 2 ppm

	N	Mean	StDev	SE mean
NC	3	3,860	0,732	0,42
2ppm	3	5,15	1,03	0,60

95 % CI for mu NC - mu 2ppm : (-3,32 ; 0,74)

T-test mu NC = mu 2 ppm (vs not =) : T = -1,76 **P = 0,15** DF = 4

Both use Pooled StDev = 0,895

Two Sample T- Test and Confidence Interval

Two sample T for NC vs 3 ppm

	N	Mean	StDev	SE mean
NC	3	3,860	0,732	0,42
2ppm	4	6,59	1,05	0,53

95 % CI for mu NC - mu 3ppm : (-4,57 ; -0,89)

T-test mu NC = mu 3 ppm (vs not =) : T = -3,81 **P = 0,013*** DF = 5

Both use Pooled StDev = 0,938

Two Sample T- Test and Confidence Interval

Two sample T for NC vs 5 ppm

	N	Mean	StDev	SE mean
NC	3	3,860	0,732	0,42
2ppm	3	7,720	0,927	0,54

95 % CI for mu NC - mu 5ppm : (-5,75 ; -1,97)

T-test mu NC = mu 5 ppm (vs not =) : T = -5,66 P = **0,0048**^{*} DF = 4

Both use Pooled StDev = 0,835

Two Sample T- Test and Confidence Interval

Two sample T for NC vs 7 ppm

	N	Mean	StDev	SE mean
NC	3	3,860	0,732	0,42
2ppm	3	9,130	0,210	0,12

95 % CI for mu NC - mu 7 ppm : (-6,49 ; -4,05)

T-test mu NC = mu 7 ppm (vs not =) : T = -11,99 P = **0,0003**^{***} DF = 4

Both use Pooled StDev = 0,538

Two Sample T- Test and Confidence Interval

Two sample T for NC vs PC

	N	Mean	StDev	SE mean
NC	3	3,860	0,732	0,42
2ppm	3	9,87	1,49	0,86

95 % CI for mu NC - mu 7 ppm : (-8,67 ; -3,35)

T-test mu NC = mu PC (vs not =) : T = -6,28 P = **0,0033**^{**} DF = 4

Both use Pooled StDev = 1,17

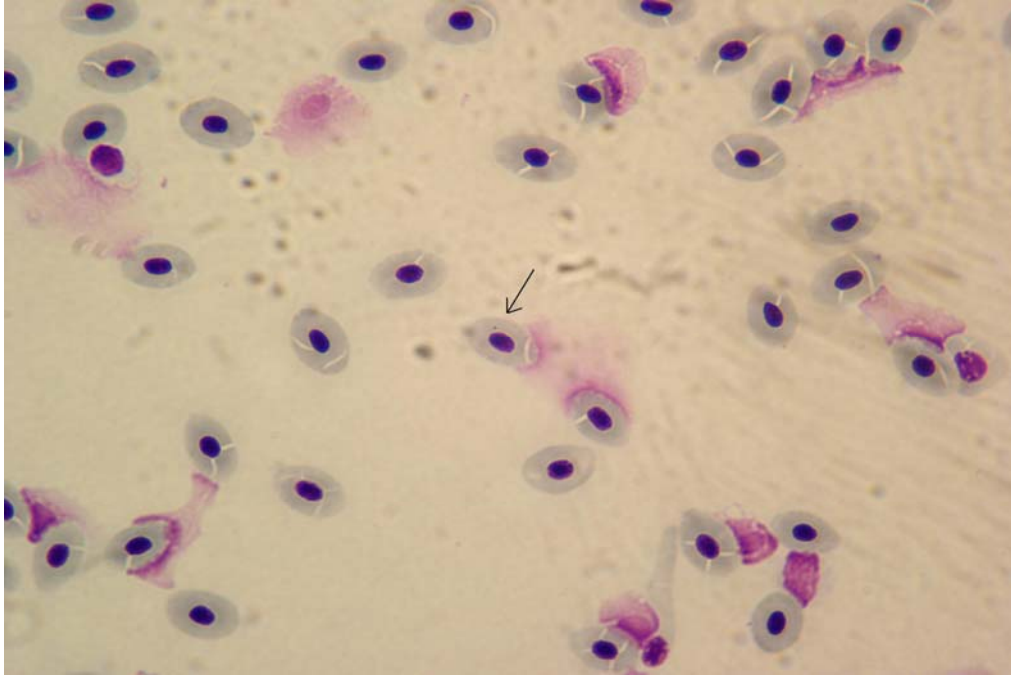
Descriptive Statistics

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>Mean</u>	<u>Median</u>	<u>Trmean</u>	<u>Stdev</u>	<u>SE</u>
<u>Mean</u>						
NC	3	3,860	4,200	3,860	0,732	0,423
PC	3	9,870	10,360	9,870	1,487	0,858
1 ppm	5	4,750	4,500	4,750	1,173	0,524
2 ppm	3	5,150	5,000	5,150	1,033	0,597
3 ppm	4	6,590	6,805	6,590	1,054	0,527
5 ppm	3	7,72	8,250	7,720	0,927	0,535
7 ppm	3	9,130	9,080	9,130	0,210	0,121

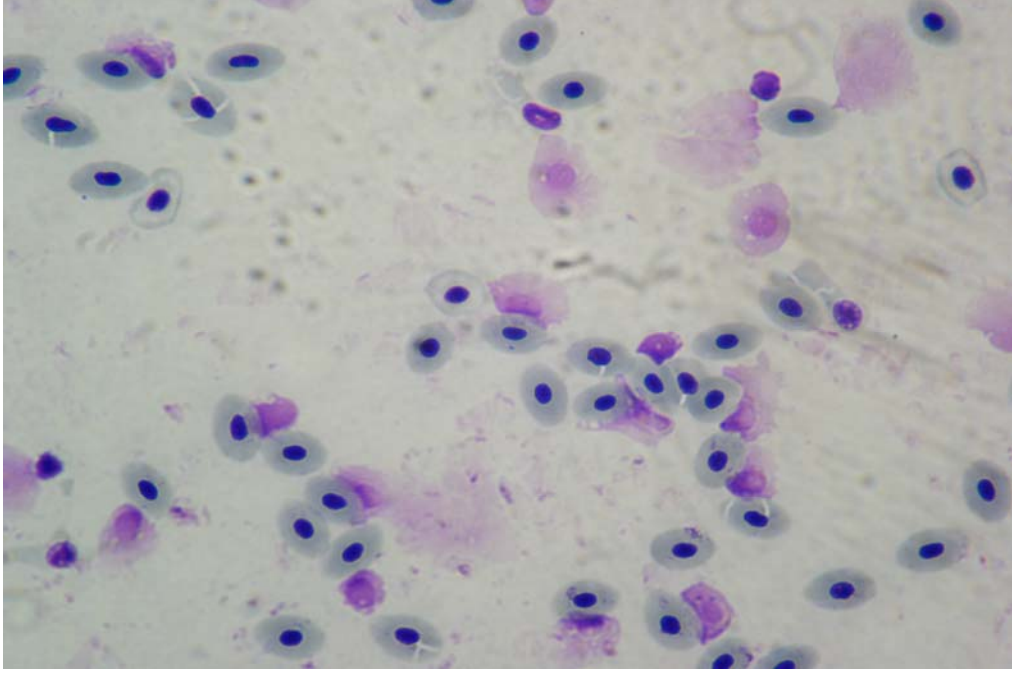
<u>Variable</u>	<u>Minimum</u>	<u>Maximum</u>	<u>Q1</u>	<u>Q3</u>
NC	3,020	4,360	3,020	4,360
PC	8,200	11,050	8,200	11,050
1 ppm	3,500	6,500	3,750	5,875
2 ppm	4,200	6,250	4,200	6,250
3 ppm	5,250	7,500	5,500	7,465
5 ppm	6,650	8,260	6,650	8,26
7 ppm	8,950	9,360	8,950	9,360



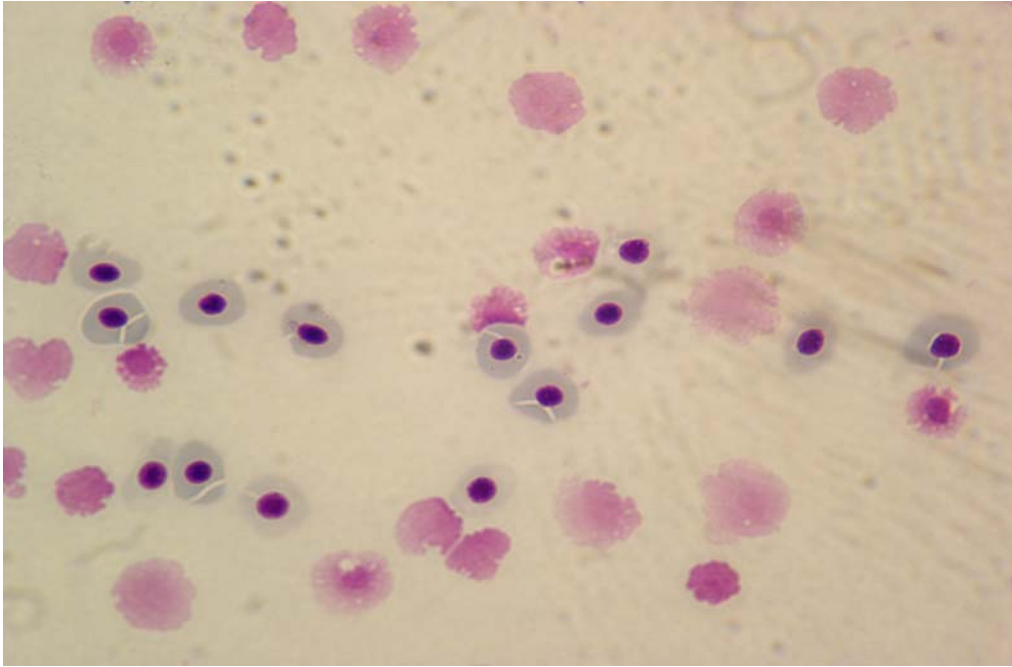
(Şekil 7 a), *O. angorae*'nin eritrositleri. Ok, mikronükleus oluşmuş eritrositleri göstermektedir. ($\times 1000X$).



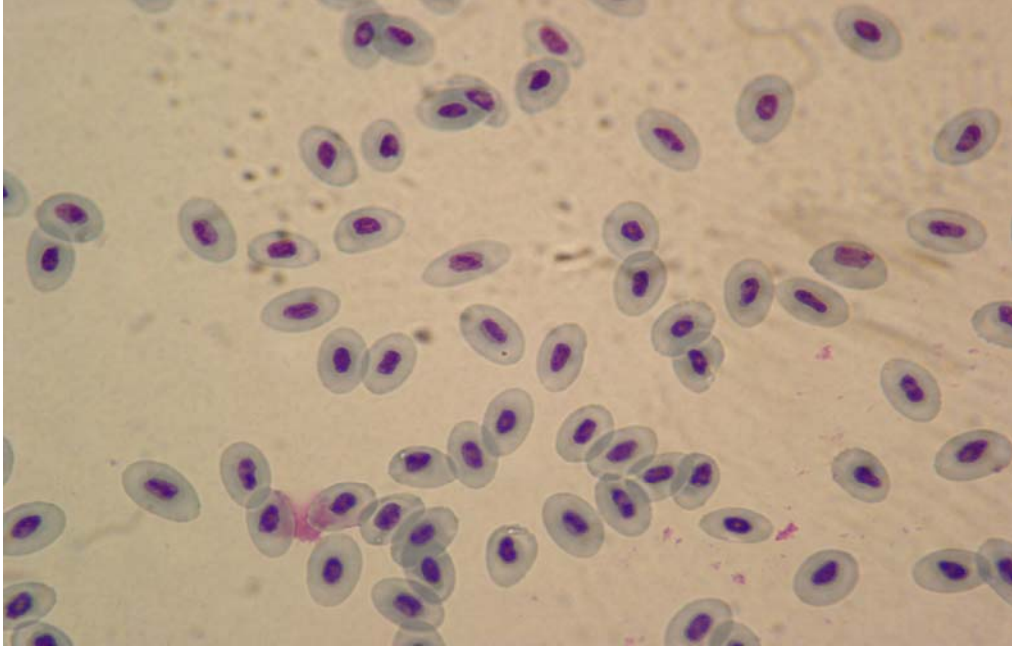
(Şekil 7 b), *O. angorae*'nin eritrositleri. Ok, mikronükleus oluşmuş eritrositleri göstermektedir. ($\times 1000X$).



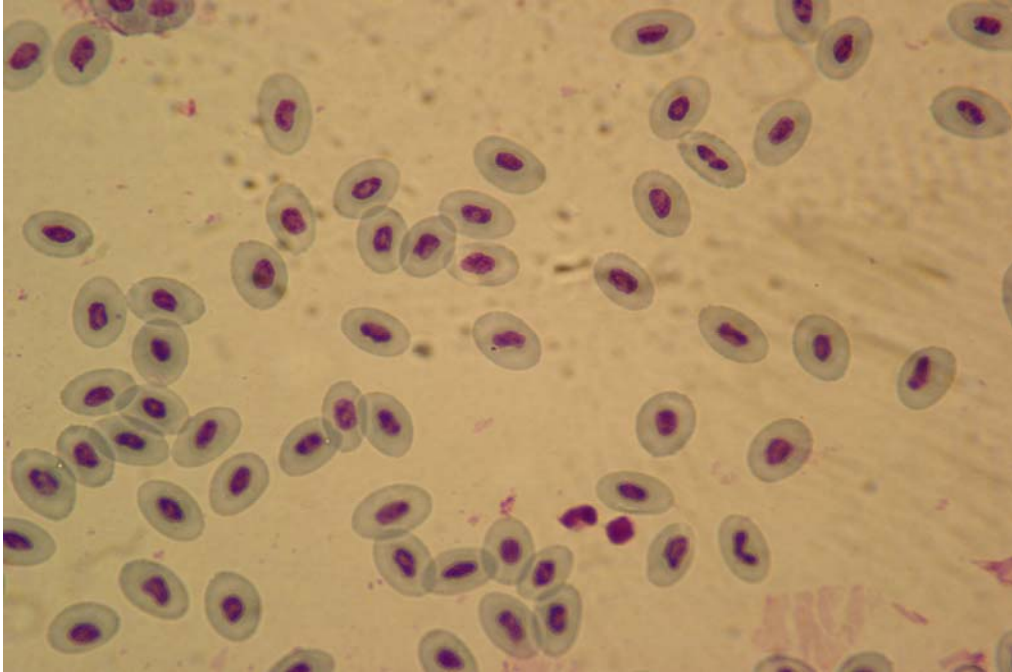
(Şekil 8 a) 1 ppm/L doz malathion uygulanan *O. angorae* eritrositleri. Artan malathion dozunun *O. angorae*'nin eritrosit çekirdek morfolojisinde meydana getirdiği değişimler. ($\times 1000X$).



(Şekil 8 b) 2 ppm/L doz malathion uygulanan *O. angorae* eritrositleri



(Şekil 8 c). 5 ppm/L doz malathion uygulanan *O. angorae* eritrositleri.



(Şekil 8 d). 7 ppm/L doz malathion uygulanan *O. angorae* eritrositleri.
Şekil 8 a, b, c, d. Artan malathion dozunun *O. angorae*'nin eritrosit çekirdek morfolojisinde meydana getirdiği değişimler. ($\times 1000X$).

V- SONUÇ VE TARTIŞMA

Yüzey suları, tabiatta meydana getirilen kirliliğin tespiti açısından oldukça önemli yer tutar. Nehirler, göller, denizler gibi sucul sistemler endüstriyel, tarımsal ve evsel atıklarla kirlenmektedir. Sonuçta pek çok etkisi bilinmeyen bileşik, içme suyuna kadar bulaşmaktadır. Şuana kadar araştırma yapılan ABD kaynaklarına göre 100 bin ton kimyasal, yüzey sularına ve 762 ton kimyasal da atmosfere yalnızca Amerika'dan atılmıştır. Bu miktarın içerisinde kanserojen maddelerde vardır. Bunlar metal ve polisiklik aromatik bileşikler gibi kalıcı olan ve buharlaşma özelliği olan bileşiklerdir. Mutajenik ve genotoksik bileşikler kanserojenleri de içine alır. İnsan sağlığı üzerine etkileri olduğu gibi tüm atmosfere de etkileri vardır. Ülkemizde ne kadar kimyasalın doğaya salındığı ve ne tip kimyasallar olduğu üzerine kapsamlı bir araştırma yoktur.

Malathion organofosfor sınıfına dahil olan bir insektisittir. Böceklere karşı kullanımının sonucu memelilerin yaşamsal alanlarına da bulaşma riski taşıyıp memeliler üzerinde istenmeyen olguların meydana gelmesine yol açabilir. Paration, paraokson, timet ve tetram insan zehirleri kategorisinde “süpertoksik” düzeyinde kabul edilmektedir. İnsan için öldürücü dozu 5mg/kg'dan daha düşük olduğu için arsenike benzer bir özellik taşımaktadır. 2mg paration'un bir çocuğu öldürmeye yeteceği bilinmektedir. Organofosfatlı bileşiklerce zehirlenmenin belirtileri; kusma, ishal, kramp, ağız köpürmesi, görme bozukluğu ve titremedir. Çoğu zehirlenme öldürücüdür ve bunu solunumu durdurarak yapar. Omurgalı ve omurgasızlarda bu grup insektisitler asetilkolinesterazı inhibe ederler. Bu enzim nörotransmitter olan asetilkolin'in parçalanmasından sorumludur. Bu yolla böceklerde sinir uçlarına asetilkolinesteraz birikir ve bozukluğa sebep olur. Omurgalılarda benzer enzim ve benzer mekanizmalar olduğu saptanmıştır(27).

Çalışmamızda da çevreyi değişik yollarla kirleten ve oldukça sık kullanılan malathionun sulak alanlarda balıklar üzerine etkileri araştırılmıştır. Pandey at all, 2005, malathionun “*channa punctatus*” isimli balık üzerinde oldukça toksik etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Bu çalışmaya göre malathionun LC₅₀ değerinin 6,65mg/lit olduğu ve mikronukleus oranını oldukça arttırdığı saptanmıştır. Tsuda ve arkadaşları (1988). LC₅₀ değerini 1,8mg/lit olarak rapor etmişlerdir(61). Khangarot ve arkadaşları(1997), LC₅₀ değerini 1,73 - 2,35mg/lit bulmuşlardır(33). Bu çalışmaların hepsinde maddeye

maruz bırakılma süresi 48-96 saat arasındadır. Balıklarda bu değerlerin farklı olmasının suyun Ph, toplam sertliği ve çözülmüş oksijen miktarına bağlayabiliriz. Test edilen türünde önemi oldukça büyüktür. Çünkü bazı canlılar sedimentle beslendiği halde diğerleri farklı şekilde beslenebilmektedir. Örneğin; Changarod at alladaşları civaklorür'ün balıklardaki toksisite oranını ısı ile orantılı olduğunu saptamıştır. Ağır metallere duyarlılığın ısı ile artıp, azalması metabolik aktiviteyi, solunumu ve kalp atım hızını etkilemesine bağlanabilir. Bizim çalışmamızda LC₅₀ değerini belirleyemedik. Bu konunun ayrıca çalışılmasına gerek vardır. Hayvanların malathiona duyarlılıkları 96 saatlik LC₅₀ değerleri 0,25-15mg/l arasında değişmektedir. Alt ve üst değerlerdeki bu değişimin canlılardaki karaciğer aktivitesine ve detoksifiye edici enzimlerin sülfürlenme reaksiyonları ile bağlantılı olduğu saptanmıştır.

Geçtiğimiz 15 yıldan beri mikro çekirdek testi büyük bir hızla geliştirilerek yaygınlaşmaktadır. Sitogenetikci olmayanların bile sonuçlarını değerlendirebilmesi, ucuz ve fazla masraf gerektirmemesi, testi cazip kılan noktalardır. Hatta son yıllarda araştırmacılar, klasik kromozomal aberasyonların analizine, alternatif olduğunu bildirmişlerdir.

Birleşik Devletler, Ulusal Toksikoloji Programı (U.S. N.T.P.). Mikroçekirdek denemelerini başka bir in vitro kısa süreli test olan Salmonella Testi (Ames Testi) ile birlikte yapılmasını ya da değerlendirilmesini önermektedir. 29 Kanserojen ve 17 kanserojen olmayan madde Salmonella denemelerinde ve fare kemik iliğinde mikroçekirdeğe yol açıp açmadığını tespit etmek için test edilmiştir. Her iki denemede pozitif tepki veren 13 kimyasal maddenin kanserojen olduğu saptanmıştır. Salmonella denemelerinde negatif sonuç veren, fakat fare kemik iliğinde test sonucu pozitif olan 8 kimyasal madde arasından 6 sının kanserojen olduğu belirlenmiştir. Bu noktada "in vivo" testinin Salmonella denemesinde gözden kaçan 6 kanserojeni tanıdığı sadece 21 taneden 2 tanesinde yanlış pozitif tepki verdiği bildirilmektedir. Her iki testte de negatif sonuç veren 10 kimyasal madde arasında 4 kanserojenin olduğu tespit edilmiştir. Ancak bunlarında gerçek genetik olmayan kanserojen olduğu görüşü yaygındır. Uluslar arası kanser araştırmaları ajansının (I.A.R.C.) değerlendirmesinde insan için kanserojenik olmayan bir madde olarak varsayıp sınıflandırılmıştır. Bu konuda Birleşik Devletler Ulusal Toksikoloji Programı ve Uluslararası Çevre Örgütü (U.S. N.T.P. ve E.P.A) önemli sonuçlara ulaşmıştır. Bunlardan birincisi, Salmonella

Testinin tek başına genotoksinleri fark edemeyeceği yönündedir. İkincisi ise, “in vivo” bulgusundaki negatif yeterlilik ve uygunluk, pozitif “ in vitro” sonuçlarına baskın değildir. Bu düşüncelerden anlaşılacağı üzere in vivo testler ve buna bağlı mikroçekirdek testi, kanserojenlerin belirlenmesinde daha çok güvenilir görünmekle birlikte, diğer kısa süreli testlerle beraber alınan sonuçlarında dikkate alınması yerinde olacaktır. Aslında mikroçekirdek testini bu derece ve bu açıdan önemli kılan: in vivo çalışmalar için doğrudan ya da metabolize edildikten sonra etki gösteren mutajenlerin, memelilerde oluşturduğu genetik zararları belirlemede çok uygun olmasındandır. Bu test mutajenlerin hücre döngüsünün özgül zamanları üzerindeki etkilerini ve kemik iliği hücrelerinin çoğalma durumları hakkında bilgi verir.

Bilindiği gibi balıkların eritrositleri çekirdeklidir. Bu yüzden mikronukleus izlenmesi daha kolaydır. Mikronukleus testi çevresel kirleticilerin sulara meydana getirdiği kirliliğin izlenebilmesi açısından oldukça kullanışlıdır. Balıklarla mikronukleus testi ile ilgili pek çok çalışma vardır.(13), Mikronukleus kromozom ya da kromozomal fragmentlerin mitoz esnasında sentromerlerini kaybetmeleri sonucu nukleusa katılmayarak ayrı bir çekirdek grubu oluşturmasıdır. Al-Sapti (1991). tekstil sanayinde kullanılan boyaların balıklar üzerinde mikronukleus etkisini incelemiştir. 3,6 ve 9 gün boyunca maddeye maruz bırakılan canlıların hücrelerinde mikronükleus oranında büyük artışlar olduğu saptamışlardır(3). Bu çalışmada yine pozitif kontrol olarak benzen ve negatif kontrol olarak çeşme suyu kullanılmıştır. Bizde çalışmamızda benzeni kullandık. Bilindiği gibi benzen suları kirleten önemli bir hidrokarbondur.

Cavaş (2003), kadmiumklorit ve bakır sülfatın mikronukleus oranı üzerindeki etkilerini izlemişler ve önemli oranda artışlar olduğunu saptamışlardır(13). Bu çalışmada solungaç epitelleri kullanılmış ve solungaç epitellerinin ağır metallere eritrositlerden daha duyarlı olduğu da tespit edilmiştir. Bu olay kirletici ile hücrenin direk karşılaşmasından kaynaklanabilir. Çalışmada pozitif kontrol olarak krom kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ta çeşme suyu kullanılmıştır.

Arhipcuk (2005), yine balıkların yüzgeç epitel hücrelerinde mikronukleus oranına bakmışlar. Ağır metallere yapılan bu çalışmada mikronukleus oranı incelenmiştir(9). Grisolia,(2001), mytomycin ve çeşitli pestisitlerin fare ve balıklarda mikronukleus üzerine etkisini araştırmıştır(25)Farelerde negatif kontrol olarak distile su balıkta ise çeşme suyu kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak farelerde mytomycin-C,

balıklarda ise siklofosfamid kullanılmıştır. Kullanılan bileşiklerin tümünde mikronukleus oranını arttırdığını saptamıştır. Cavas ve arkadaşları(2003), florasen bir boya olan akridin oranj kullanarak metronidazol'un genotoksik etkisini araştırmışlardır(13). Yine siklofosfamid pozitif kontrol olarak çeşme suyu da negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Mikronukleus oranındaki artışın doza ve zamana bağlı olarak arttığını saptamıştır. Metronidazolun hem sitotoksik hem de genotoksik etkisinin olduğu saptanmıştır. Sanches-Galen (2001). yılan balığında kadmium ve civanın etkisini araştırmışlar ve mikronukleus oranında oldukça belirgin artışlar gözlemlemişlerdir(56). Yalnız bu çalışmada balığın bulunduğu ortama kirletici vermek yerine direk balığın karın bölgesinden enjeksiyonlama yöntemini kullanmışlardır. Mikronukleus oranında önemli artışlar gözlemlemişlerdir.

Bu tip çalışmalarda genellikle T testi kullanılmaktadır(3). Bizde çalışmamızda bu testi referans aldık. Mikronukleus oluşumu 7mg/lt, 5 mg/lt ve 3mg/lt'de negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında arttığı tespit edildi. Mironukleus oluşumu için genellikle 48-96 saatlik çalışmalarda pik yaptığı gözlenmiştir(39).Bu çalışmada 36 saatlik süre baz alındı (25,13). 7mg/lt' lik dozun pozitif kontrol grubu olan benzene yakın mn. frekansı ortaya çıkardığı gözlenmiştir. Çalışmamızda malathion'un genotoksik etkileri belirgin şekilde saptandı. İlerde yapılacak çalışmaları, özellikle doğadaki kirleticilerin miktarının belirlenmesi çalışmalarına katkısının olabileceğini umuyoruz. Bu çalışmada çevre kirliliğinin besin zinciri yoluyla direk insanı etkileyebileceği ve hücrelerde ne gibi etkilere yol açabileceğini gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Alink, G.M., Frederix-Wolters, E.M.H., Van der Gaag, M.A., Van Kerkhoff, J.F.J., Poels, C.L.M.: Induction of Sister-Chromatid Exchanges in Fish Exposed to Rhine Water. *Mutat.Res*, 78:369-374 (1980).
2. Al-Sabti, K.: Monitoring the Genotoxicity of radiocontaminants in Swedish Lakes by fismicronuclei. *Cytobios*, 70, 101- 106 (1992).
3. Al-Sabti, K.: Handbook of genotoxic effects and fish chromosomes. J. Stefan Institute, 221pp, Printed by Kristoft, Ljubljana, Yugoslavia (1991) .
4. Al-Sabti, K., Hardig, J., Micronucleus test in fish for monitoring the genotoxic effects of industrial waste products in the Baltic Sea, Sweden. *Comp. Biochem. Physiol*, 97C, 1, 179- 182 (1990).
5. Al-Sabti, K.: Clastogenic effects of five carcinogenic-mutagenic chemicals on the cells of the common carp, *Cyprinus carpio* L. *Comp. Biochem. Physiol*, 85C, 1, 5- 9 (1986).
6. Al-Sabti, K.: Chromosomal Studies by Blood Leucocyte Culture Technique on Three Salmonids from Yugoslavia Water. *J.Fish Biol*, 6,5- 12 (1985).
7. Al-Sabti, K., Fijan, N., Kurelec, B.: Frequency of Chromosomal Aberrations in the Rainbow Trout, (*Salmo gairdneri* Rich.) Exposed to Detergent and Benzene. *Vet Arh*, 54:83- 89 (1984).
8. Aras ve Aras, 2001., DSİ, ÇED Raporu (2003).
9. Arkhipchuk, V.V. and Garanko, N.N:Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells. *Ecotoxicol. Environ. Saf*. 62, 42-52 (2005).
10. Ayaz, M., , Kars Çayı Balıklarının Sistemik Yönden İncelenmesi, Kafkas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (2004).
11. Barker, C.J., Rackham, B.D.: The Induction of Sister-Chromatid Exchanges in Cultured Fish Cells (*Ameva splendens*) by Carcinogenic-Mutagens. *Mutat.Res*, 68,381-387 (1979).
12. Carrasco, K.R., Tilbury, K.L., Myers, M.S.: Assesment of the piscine micronucleus test as in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Canad. J. Fish. Aquat. Sci*. 47(11), 2123- 2136 (1990).
13. Cavas, T. and Ergene-Gozukara, S.: Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells. *Mutat. Res*. 534 (1-2): 93-99 (2003).
14. Celep, F.: Çernobil Reaktör Kazası Sonrası Doğu Karadeniz Bölgesindeki Radyoaktif Kirlenmenin Muhtemel Sonuçlarının Sitogenetik Seviyede İncelenmesi.Yüksek Lisans Tezi, K. T. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.(1994).
15. Chauhan L.K.S., Agarwal D.K. and Sundararaman V.: In vivo induction of sister chromatid exchange in mouse bone marrow following oral exposure to commercial formulations of alpha-cyano pyrethroids. *Tox. Let.*; 93:153-157 (1997).
16. Cross, J.N., Hose, J.E.: The reproductive cycle of demersal fishes in an area receiving Urban wates. Abstract in: Sixth International Ocean Disposal Symposium, April 21- 25, Pacific Grove, California, 116- 117 (1988).

17. Das, R.K., Nanda, N.K.: Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of fish, *Heteropneustes fossilis* by mitomycin C and paper mill effluent. *Mutat. Res*, 175, 67- 71 (1986).
18. Dass S.B., Ali S.F., Heflich R.H., Casciano D.A.: Frequency of spontaneous and induced micronuclei in the peripheral blood of aging mice. *Mutat. Res.*; 381:105-110 (1997).
19. EPA,: Summary of OPP redect risk pesticides initiative.US.EPA,2.pp
20. Fahmy M.A. and Aiy F.A.E.: In vivo and in vitro studies on the genotoxicity of cadmium chloride in mice. *J. Of App. Tox*; 20: 231- 238 (2000).
21. Geldiay, R., Balık, S., 2002, Türkiye Tatlı Su Balıkları, Ege Üniv. Fen Fak. Kitaplar Serisi, No: 46, İzmir, s.387 (1999).
22. Gullino, M.L. and Kuışpers, L.A.M.:Social and political implication of managing plant diseases with restricted fungicides in Europa. *Anno Rev.Phytopath.* 32: 559- 579 (1994).
23. Grisolia, C.K. and Starling, F.L.R.M.: Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoa, under influence of sewage treatment plant discharges. *Mutat. Res.* 491 (1-2), 39-44 (2001).
24. Hayashi M., Tice R.R., MacGregor J.T., anderson D., Btakey D.H., Volders M.K., Oleson Jr F.B., Pacchierotti F.H., Romagna F., Shimada H, Sutou S. and Vannier B.: In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat. Res.*; 312: 293-304 (1994).
25. Hayashi M., MacGregor J.T., Gatehouse DC., Adler i.D., Biakey D.H., Dertinger S.D., Krishna G., Morita T., Russo A., Sutou S.: In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. ii. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Env. Mol. Mut.*35: 234- 252 (2000).
26. Heddle, J.A.: A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutat. Res*, 18, 307- 317 (1973).
27. Ho-Yu. M.: Environmental Toxicology, Lewis Publisher, New York, 192-194 (2001).
28. Hooftman, R.N., Raat, W.K.: Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of Eastern Mudminnow (*Umbra pygmaena*) by ethyl methanesulphonate. *Mutat. Res*, 104, 147- 152 (1982).
29. Hooftman, R.N.: The induction of chromosome aberrations in *Nothobranchius rachowi* (Pisces, Cyprinodontidae) after treatment with ethyl methanesulphonate or benzo(a)pyrene. *Mutat. Res*, 91, 347- 352 (1981).
30. Hooftman, R.N., Vink, G.J.: Cytogenic Effects on the Eastern Mudminnow (*Umbra pygmaea*) Exposed to Ethyl Methanesulphonate, Benzo(a)pyrene and River Water, *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 5, 261- 269(1981).
31. Hose, J.E., Cross, J.M., Smith, S.G., Dario, D.: Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites off Southern California. *Mar. Environ. Res*, 22, 167- 176 (1987).
32. ICPEMC.. Testing For Mutagens and Carcinogens; The Role Of Short-term Genotoxicity Assays. *Mutat. Res*, 205:3- 12 (1988).
33. Khangarot, B.S. and Ray, P.K.:Studies on the toxicity of malathion to freshwater teleosts, *Channa punctatus* (Bloch) and *Puntius sophore* (Hamilton). *Arch. Hydrobiol.* 113, 465-46 (1988).

34. Krishna G. and Hayashi M.. In vivo rodent micronucleus assay : protocol, conduct and data interpretation. *Mutat. Res* ; 455:155 – 166 (2000).
35. Kligerman, A.D.: Fishes as Biological Detectors of The Effect of Genotoxic Agents, In: utagenicity, new Horizons in Genetic Toxicology. *J. Heddle (Ed)*, 335-356 (1982).
36. Kligerman, A.D.: The Use of Cytogenetics to Study Genotoxic Agents in Fishes, In: “Cytogenetic Assay of Environmental Mutagens”, (Hsu T.C. and Totowa, N.J., eds.). Allanheld Omsun, pp:161-181 (1981).
37. Kligerman, A.D., Bloom, S.E.: Sister-Chromatid Differentiation and Exchanges in Adult Mudminnow (*Umbra limi*). *Cytogenet. Cell Genet*, 18,182-196 (1976).
38. Kligerman, A.D., Bloom, S.E., Howell, W.M.: *Umbra limi*: a Model for the study of chromosome Aberration in Fishes. *Mutat. Res*, 31, 225-233 (1975).
39. Kocan, R.M., Landolt, M.L., Sabo, K.M.: Anaphase aberrations: a measure of genotoxicity, in mutagen-treated fish cells. *Environ. Mutagen*, 4,181-189 (1982).
40. Landolt, M.L., Kocan, R.M.: Fish cell cytogenetics: A measure of the genotoxic effects of environmental pollutants. *Aquatic Toxicology*, 335-353 (1983).
41. Liguori, V.M., Landolt, M.L.. Aberrations: an In Vivo Measure of Genotoxicity. Short-Term Bioassay in the Analysis of Complex Environmental Mixture IV (Water, M.D., Sandhu, S.S., Lewtas, J., Glaxton, L., Strauss, G., Nesnow, S., eds). *Plenum Publishing Co*, pp:87-98 (1985).
42. Loobee, J.W., Delen, N., Tosun, N.: Chemical control up. pp. 199-203, 2001.
43. MacGregor J.T., Wehr M., Henika P.R. and Shelby M.D.. The in vivo erythrocyte micronucleus test : Measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies. *Fun. and App. Tox.* ; 14:513-522 (1990).
44. Metcalfe, C.D.: Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocyte of Mudminnows (*Umbra limi*) and Brown Bullheads (*Ictalurus nebulosus*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, 40C, 489-495 (1988).
45. Microsoft Encarta Encyclopedia (2004).
46. Nagy, A., Rajki, K., Horvath, L., Csanyi, V.: Investigation on Carp (*Cyprinus carpio*) Gynogenesis. *J. Fish Biol*, 13:215-224 (1988).
47. OECD: Guideline for the testing Of Chemical Proposal for Updating Guideline 473, In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test. OECD, 12pp (1997).
48. Ohe. Y., Watanabe. T., Wakabayashi. K.: Mutagen in surface waters: a review, *Mutat Res*. 567:109-149 (2004).
49. Ortiz G.G., Reiter R.J., Zuniga O., Meichiorri D., Sewerynek E., Pablos MI., Oh C.S., Garcia J.J., Bitzer-Quintero OK.: Genotoxicity of paraquat : induced micronuclei induced in bone marrow and peripheral blood are inhibited by melatonin. *Mutat. Res.*; 464:239-245 (2000).
50. Pandey, S., Kumar, R., Sharma, S., Nagpure, N. S., Srivastava, S.K. and Verma, M. S.: Acute toxicity bioassays of mercuric chloride and malathion on air-breathing fish *Channa punctatus* (Bloch). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 114-120 (2005).

51. Park, E.H., Grimm, H.: Distribution of C-Band Hetrochromatin in the ZW Sex Chromosomes of European and American Eels (Anguillidae, Teleostomi). *Cytogen. Cell Genet*, 31(3):167-174 (1981).
52. Prein, A.E., Thie, G.M., Alink, G.M., Koeman, J.H.: Cytogenetic Changes in Fish Exposed to Water of The River Rhine. *Sci Total Envir*, 9:287-291 (1978)
53. Purdom, C.E., Lincoln, R.F.: Chromosome Manipulation in Fish. In: Genetics and Mutagenesis of Fish (Schroders, J.H. ed.). *Springer-Verlag*, Berlin 5:83-89 (1973).
54. Purdom, C.E.: Radiation Induced Gynogenesis and Androgenesis in Fish. *Heredity*, 24:431-444(1969).
55. Refstie, T.: Tetraploid Rainbow Trout Produced by Cytochalasin B. *Aquaculture*, 25:51-58(1981).
56. Sanchez-Galan. S., Linde, A.R., Ayllon. F. and Garcia-Vazquez, E. :Induction of micronuclei in eel (*Anguilla anguilla* L.) by heavy metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49 (2), 139-143 (2001).
57. Schmid, W.. The micronucleus test. *Mutat. Res*, 31, 9-15 (1973).
58. Suralles J., Xamena N., Creus A., Cataian J., Norppa H. and Marcos R.,: induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.*; 341:169-184 (1995)
59. Stromberg, P.T., Landolt, M.L., Kocan, R.M.: Alteration in the frequency of Sister-Chromatid Exchanges in Faltfish From Puget Sound, Washington, Following Experimental and Natural Exposure to Mutagenic Chemicals. NOAA Technical Memorandum OMPA, 10:48pp.(1981).
60. Tate, A.D., Neuteboom, I., Hofker, M., Den Engelse, L.. A micronucleus technique for detecting clastogenic effects of mutagens/carcinogens (DEN, DMN) in hepatocytes of rat liver in vivo. *Mutat Res.* 74: 11-20(1980).
61. Tsuda, T., Kojima, M., Harada, H., Nakajima, A., Akoi, S. : Acute toxicity, accumulation and excretion of organophosphorus insecticides and there oxidation products in killifish. *Chemosphere.* 35, 939-949(1997).
62. Ueda, T., Kobayshi, M., Sato, R.: Triploid Rainbow Trout Induced by Polyethylene Glycol. *Proc. Jap. Acad*, 62:161-164(1986).
63. Ulupınar, M., Okumuş, İ.: Gökkuşığı Alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) kromozom analizi için ıslah edilmiş bir metod. IX. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, Süleyman Demirel Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Eğridir, Isparta(1997).
64. Van de Kerkhoff, J.F.J., Van der Gaag, M.A.: Some Factors Affecting Optimal Differential Stainning of Sister-chromatids In Vivo in the Fish *Nothobranchius rachowi*. *Mutat. Res.*, 143,39-43(1985)
65. www.fgf.de/english/fup/fgfpub
66. www.fishbase.com(2005).

ÖZGEÇMİŞ

Bahadır GÜRDEĞİN; 1973 Yılında Kars'ta doğdu.1994 yılında kazandığı Kafkas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 1998 yılında mezun oldu.2000 yılında vatani görevini tamamlayarak iş hayatına atıldı.2000-2002 yılları arasında özel bir İlaç firmasında çalıştı.2003 yılında Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisansa başladı.2004 -2006 yılları arasında Botaş BTC Hampetrol Boru Hattı Projesinde Çevre Atık Yönetimi Uzmanı olarak çalıştı.