

**CHLORPYRIFOS-ETHYL'İN SUBLETAL DOZUNUN SAZAN BALIKLARI
(*Cyprinus carpio* L., 1758) HİSTOLOJİSİ VE GENOTOKSİSİTESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

GÜL ÇELİK ÇAKIROĞULLARI

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE BİLİMLERİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HAZİRAN 2011
ANKARA**

Gül ÇELİK ÇAKIROĞULLARI tarafından hazırlanan “CHLORPYRIFOS-ETHYL’İN SUBLETAL DOZUNUN SAZAN BALIKLARI (*Cyprinus carpio* L., 1758) HİSTOLOJİSİ VE GENOTOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. A. Çağlan KARASU BENLİ

Tez Danışmanı, Çevre Bilimleri Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Çevre Bilimleri Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Beril SALMAN AKIN

Çevre Bilimleri Anabilim Dalı, G. Ü.

Doç. Dr. A. Çağlan KARASU BENLİ

Çevre Bilimleri Anabilim Dalı, G. Ü.

Doç. Dr. Rabia SARIKAYA

İlköğretim Eğitimi-Sınıf Öğretmenliği, G. Ü.

Tarih: 30/06/2011

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Bilal TOKLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Dr. Gül ÇELİK ÇAKIROĞULLARI

**CHLORPYRIFOS-ETHYL'İN SUBLETAL DOZUNUN SAZAN BALIKLARI
(*Cyprinus carpio* L., 1758) HİSTOLOJİSİ VE GENOTOKSİSİTESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ
(Yüksek Lisans Tezi)**

Gül ÇELİK ÇAKIROĞULLARI

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Haziran 2011**

ÖZET

Bu çalışmada sazan (*Cyprinus carpio* L.) fingerlingleri organofosforlu insektisitlerden chlorpyrifos-ethyl'in subletal konsantrasyonu 16 µg/L'ye (96 saatlik LC₅₀ değerinin 1/10'u) 24, 48, 96 saat ve 7 gün boyunca maruz bırakılmışlardır. Denemeler sonunda balıklardan elde edilen periferel eritrositlerde nükleus anomalileri ve mikronükleus farklı frekanslarda tespit edilmiştir. Nükleus anomalileri açısından chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan gruplar ile kontrol grupları arasındaki farklılıklar istatistiki yönden önemli bulunmazken (P>0,05), mikronükleus testi sonucunda chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan gruplar ile kontrol grubu arasındaki fark önemli bulunmuştur (P<0,05) ve pestisit genotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Hepatopankreas dokularında albumin dejenerasyonu, hidropik dejenerasyon, hiperemi, solungaç dokularında hiperemi, telangiektazi, hiperplazi, bronşitis, ödem, klorit hücre hiperplazisi ve füzyon ile böbrek dokularında kanama, hiperemi, melanizasyon, ödem, bowman kapsülünde genişleme, şişmiş glomerulus, tubullerde hidropik dejenerasyon ve tubulün etrafında melanizasyon, chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan sazan fingerlinglerinde en çok rastlanan histopatolojik bulgulardır. Kontrol gruplarında herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanılmamıştır. Chlorpyrifos-ethyl'e daha uzun süre maruz kalma, dokularda elde edilen bulguların şiddetlenmesine ve/veya görülen

histopatolojik bulguların daha yoğun ve daha fazla sayıda balıkta görülmesine sebebiyet vermemiştir.

Sonuç olarak subletal konsantrasyonda bile chlorpyrifos-ethyl'e maruziyetin sazan fingerlinglerinde genotoksik etki gösterdiği ve doku hasarına yol açtığı saptanmıştır.

Bilim Kodu :903.5.075
Anahtar Kelimeler :Chlorpyrifos-ethyl, sazan, genotoksisite, mikronükleus, histopatoloji
Sayfa Adedi : 86
Tez Yöneticisi : Doç. Dr. A. Çağlan KARASU BENLİ

**DETERMINATION OF HISTOLOGIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF
SUBLETHAL DOSE OF CHLORPYRIFOS-ETHYL ON CARP
FINGERLINGS (*Cyprinus carpio* L., 1758)
(M.Sc. Thesis)**

Gül ÇELİK ÇAKIROĞULLARI

**GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
June 2011**

ABSTRACT

In this study; the carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings were exposed to sublethal dose of 16 µg/L (1/10 of 96 h LC₅₀ value) of organophosphorus insecticide chlorpyrifos-ethyl for 24, 48, 96 hours and 7 days. At the end of the experiment different frequencies of nucleus abnormalities and micronuclei were determined in peripheral erythrocytes. Although the differences between control groups and the groups exposed to chlorpyrifos-ethyl were not found statistically significant ($P>0.05$) in terms of nuclear normalities, the differences between the control group and the groups exposed to chlorpyrifos-ethyl were found statistically significant in terms of micronucleus test ($P<0.05$); as a result the pesticide was determined as genotoxically effective. Cloudy swelling, hydropic degeneration, hyperemia in hepatopancreas tissues, and hyperemia, telangiectasis, hyperplasia, branchitis, oedema, chloride cell hyperplasia, fusion in gill tissues, and hemorrhage, hyperemia in kidney tissues, vacuolisation in bowman capsule, melanization in kidney tissues and tubules, swollen glomerulus, hydrophic degeneration in tubules are the major histopathologic findings determined in carp fingerlings exposed to chlorpyrifos-ethyl. No histopathological findings were found in control groups. Longer exposure to chlorpyrifos-ethyl did not reveal of more histopathological findings, in more fish, and the severity of the findings.

In conclusion it is determined that exposure to chlorpyrifos-ethyl even in sublethal concentration caused genotoxic effects and tissue damages in carp fingerlings.

Science Code	: 903.5.075
Key Words	:Chlorpyrifos-ethyl, carp, genotoxicity, micronuclei, histopathology
Page Number	: 86
Advisor	: Assoc. Dr. Aysel Çağlan KARASU BENLİ

TEŞEKKÜR

Çalışmamı yönlendiren ve araştırmanın her aşamasında bana yardımcı olan değerli danışman hocam, sayın Doç. Dr. A. Çağlan KARASU BENLİ'ye, çalışmalarım esnasında değerli katkılarda bulunan, yardımcı olan ve yönlendiren değerli hocalarım Prof. Dr. Figen ÜNLÜ ERKOÇ'a ve Prof. Dr. İ. Ayhan ÖZKUL'a, çalışmamı yürütürken yardımlarını gördüğüm değerli hocam sayın Doç. Dr. Mahmut SELVİ'ye ve Dr. Oner Koçak'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca tezimin her aşamasında desteklerini hissettiğim AİLEME en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması Gazi Üniversitesi BAP Biriminin 18-2010-06 no'lu ve "Chlorpyrifos-ethyl'in Subletal Dozunun Sazan Balıkları (*Cyprinus carpio* L., 1758) Histolojisi ve Genotoksitesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi" isimli projesi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xiii
SİMGELER.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	6
2.1. Chloryrifos-ethyl.....	6
2.2. Chlorpyrifos-ethyl ile Yapılan Çalışmalar.....	9
2.3. Genotoksisite.....	13
2.4. Mikronükleus Testi.....	14
2.5. Nükleus Anomalileri.....	17
2.6. Balıklarda Toksik Maddelerin Dokular Üzerine Etkisi.....	18
2.7. Kemikli Balıklarda Bazı Organların Histolojik Yapısı.....	19
2.7.1. Solungaçlar.....	19
2.7.2. Karaciğer.....	20
2.7.3. Deri.....	22
2.7.4. Böbrek.....	23
2.8. Kemikli Balıklarda Kanın Yapısı.....	25
3. MATERYAL VE METOD.....	28
3.1. Deney Materyali.....	28
3.2. Pestisit Materyali.....	28
3.3. Araştırmada Kullanılan Diğer Araç ve Gereçler.....	28
3.4. Metod.....	30
3.4.1. Deney ortamı ve adaptasyon süresi.....	30
3.4.2. Deneyin gerçekleştirilmesi.....	31

	Sayfa
3.4.3. Balıklardan kan alımı.....	33
3.4.4. Mikronükleus testi.....	34
3.4.5. Morfolojik nükleus düzensizlik analizi.....	36
3.4.6. Balıkların histopatolojik olarak incelenmesi.....	37
3.4.7. Suda chlorpyrifos-ethyl analizi.....	39
3.5. Akvaryumlar ve Su Kalitesi.....	41
3.6. İstatistiksel Analizler.....	42
4. BULGULAR.....	43
4.1. Nükleus Anomalileri ve Mikronükleus Sonuçları.....	43
4.2. Histopatoloji Sonuçları.....	48
4.2.1. Hepatopankreasta görülen histopatolojik bulgular.....	48
4.2.2. Solungaçta görülen histopatolojik bulgular.....	51
4.2.3. Böbrekte görülen histopatolojik bulgular.....	55
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	61
KAYNAKLAR.....	66
EKLER.....	77
EK-1.Histolojik İncelemelerde Kullanılan Çözeltiler.....	78
EK-2. Histolojide Kullanılan Bazı Terimler.....	80
ÖZGEÇMİŞ.....	82

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Chlorpyrifos-ethyl'in fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	9
Çizelge 3.1. GC operasyon koşulları.....	40
Çizelge 3.2. GC-MSD operasyon koşulları.....	40
Çizelge 3.3. Araştırmada kullanılan suyun kalite değerleri.....	42
Çizelge 4.1. Asetona, EMS'e (5 mg/L), subletal dozda (16 µg/L) chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan ve kontrol grubu sazan fingerlinglerinin eritrositlerinde görülen nükleus anomalileri ve mikronükleus sonuçları, ‰ ortalama ± standart hata (ortanca değer).....	47
Çizelge 4.2. Subletal dozda (16 µg/L) chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan sazan fingerlinglerinin hepatopankreas dokularında görülen histopatolojik bulgular, Adet-(%).....	49
Çizelge 4.3. Subletal dozda (16 µg/L) chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan sazan fingerlinglerinin solungaç dokularında görülen histopatolojik bulgular, Adet-(%).....	52
Çizelge 4.4. Subletal dozda (16 µg/L) chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan sazan fingerlinglerinin böbrek dokularında görülen histopatolojik bulgular, Adet-(%).....	60

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Chlorpyrifos-ethyl'in kimyasal yapısı.....	8

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Dozlamanın gerçekleştirilmesi.....	32
Resim 3.2. Deney ortamı ve stok akvaryumu.....	32
Resim 3.3. Balıklardan kalpten kan alımı.....	33
Resim 3.4. Periferel eritrositlerden sürme preparatların hazırlanması.....	35
Resim 3.5. Preparatların alkol ve Giemsa solusyonu ile muamelesi.....	35
Resim 3.6. Dokuların parafin blokların içerisine gömülmesi.....	38
Resim 4.1. Eritrositlerde görülen nükleus anomalisi, binükleus.....	46
Resim 4.2. Eritrositlerde gözlemlenen mikronükleus oluşumu.....	46
Resim 4.3. Kontrol grubuna ait sağlıklı hepatik doku (H&E,x100).....	50
Resim 4.4. Hepatik dokuda hiperemi (ok başı) ve hidropik dejenerasyon (ok) (H&E,x100).....	50
Resim 4.5. Pankreatik dokuda hiperemi (H&E,x100).....	51
Resim 4.6. Sazan balıklarında kontrol grubuna ait solungaç kesitleri (H&E, x100).....	53
Resim 4.7. Sazan balıklarında kontrol grubuna ait solungaç kesitleri (H&E, x250).....	53
Resim 4.8. Solungaç dokularında görülen telangiektazi (H&E,x40).....	54
Resim 4.9. Solungaç dokularında görülen hiperemi (kırmızı ok), klorit hücre hiperplazis(isiyah ok), füzyon (beyaz ok) (H&E,x100).....	54
Resim 4.10. Solungaç dokularında epitel ayrılması (H&E,x100).....	55
Resim 4.11. Böbrek dokusunda görülen kanama (beyaz ok) ve ödem(kırmızı ok) (H&E,x100).....	56
Resim 4.12. Glomerulus şişmiş (kırmızı ok) ve böbrek dokusunda hiperemi (beyaz ok) (H&E,x100).....	57
Resim 4.13. Cavum glomeruli'de genişleme (beyaz ok) (H&E,x100).....	57
Resim 4.14. Glomerulide yıkım (beyaz ok) (H&E,x100).....	58
Resim 4.15. Böbrek dokusunda kistik yapı (beyaz ok) (H&E,x100).....	58
Resim 4.16. Kontrol grubuna ait böbrek dokusu (H&E,x100).....	59

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada bazı simgeler ve kısaltmalar açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
‰	Binde
~	Yaklaşık
°C	Derece Santigrat
μ	Mikro
μg	Mikrogram
μm	Mikrometre
Ca	Kalsiyum
cm	Santimetre
cm³	Santimetreküp
dak	Dakika
g	Gram
Hg	Cıva
kg	Kilogram
L	Litre
LogK_{ow}	n/oktanol su partisyon katsayısı
m	Metre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mm³	Milimetreküp
mol	Mol
n	Sayı
ng	Nanogram
Ni	Nikel
nm	Nanometre
P	İstatistik önem seviyesi

Simgeler	Açıklama
ppb	Milyarda bir kısım
ppm	Milyonda bir kısım

Kısaltmalar	Açıklama
AChE	Asetilkolinesteraz
APHA	Amerika Halk Sağlığı Birliği
CA	Kromozomal aberasyonlar
CAS	Kimyasal özet
CE	Chlorpyrifos-ethyl
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ECD	Elektron yakalayıcı dedektör
ECVAM	Alternatif Metodların Validasyonu için Avrupa Merkezi
EMS	Etil metan sulfonat
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
ISO	Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu
IUPAC	Uluslararası Teorik ve Uygulamalı Kimyacılar Birliği
LC	Lethal konsantrasyon
LC₅₀	Organizmaların %50'sini öldüren konsantrasyon
MN	Mikronükleus
MSD	Kütle spektrometresi
OECD	Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü
SCE	Kardeş kromatid değişimi
TCP	Trichloropyridin
TSE	Türk Standartları Enstitüsü
USEPA	BirleşikDevletler Çevre Koruma Kurumu

1. GİRİŞ

Pestisitler bitki zararlıları olan organizmaları yok etmek için kullanılan sentetik ya da organik bileşiklerdir. Pestisitler, çeşitli yollarla su ortamlarına ulaştıklarında içerisindeki balık ve diğer canlılara zarar vermektedirler ve balıklar solungaçları veya tükettikleri besinler yoluyla bu toksik maddelere maruz kalmaktadırlar. Günümüzde artarak kullanılan pestisitler birinci derecede hedef olmayan canlılar üzerine genotoksik etkilere yol açmaktadır [Yılayaz, 2008a, b].

Organik fosforlu bileşikler dünyadaki tüm insektisit satışının % 34'ünü oluşturmaktadır, sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl 40 milyon kilogram organik fosforlu pestisit tarım arazilerine uygulanmaktadır. Organik fosforlu insektisitler organik klorlu olanlara kıyasla doğadaki kalıcılıklarının daha az olmasından ötürü kullanılmaya başlanmıştır ancak biyolojik birikim, akut ve kronik toksisitelerine ilişkin endişeler devam etmektedir [Simon et al., 1998]. Bu bileşiklerin memeli canlılar üzerine yüksek toksik etki yaptığı, insanlarda çeşitli kas ve sinirsel hastalıklara neden olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar pestisitlerin balıkların özellikle yağlı dokularında birikim yaptığını göstermiştir. Pestisitlere olan maruziyet dünyanın önemle üzerinde durduğu ve maruziyeti azaltmak adına gerekli önlemlerin alındığı bir konudur. Dünya çapında pestisit kaynaklı olarak yıllık 3 milyon akut zehirlenme ve 220 bin ölüm vakası olduğu rapor edilmiştir. [Marrs, 1993; USDA, 1994; Yasmashita et al., 1997; Ali et al., 2009].

Chlorpyrifos-ethyl ülkemizde çok yaygın şekilde kullanılan ve doğada kolay parçalanmayan bir pestisittir. Ülkemizde tarım ürünlerinde ruhsatlı bir şekilde kullanılmaktadır [Ali et al., 2009; Yurtkuran, 2010]. Turgut et al. [2010] tarafından yapılan bir çalışmada geleneksel yöntemlerle kurutulmuş üzüm üreten işletmelerden toplanan örneklerde maksimum kalıntı limitinin üzerinde chlorpyrifos-ethyl olduğu tespit edilmiştir. Tarımda çok kullanılmaktadır ve kullanıldığı bitkiler arasında meyveler, sebzeler, fındık, zeytin, pamuk, ayçiçeği ve hububatlar sayılabilir.

Avrupa’da yıllık 50 000 kg’ın üzerinde chlorpyrifos kullanıldığı belirtilirken, Amerika’da bu değer 5 milyon kg’ın üzerinde olarak rapor edilmiştir [Simon et al., 1998]. Chlorpyrifos-ethyl’in insan sağlığı üzerine olan olumsuz etkileri ise; hepatik bozukluklar, immunolojik anormallikler, embriyotoksisite, genotoksisite, teratojenite, nörokimyasal ve nörodavranışsal değişiklikler olup, üreme ve gelişim üzerine de olumsuz etkileri mevcuttur [Ali et al., 2009]. Akut toksisite açısından USEPA tarafından orta derecede toksik maddelerin yer aldığı Class II’de sınıflandırılmıştır.

Mevcut durumda 1000 taneden fazla kimyasal pestisit olarak sınıflandırılmış olup, farklı modeller kullanarak yapılan çalışmalar bunların bir kısmının genotoksik özellikleri olduğunu göstermiştir [Zljezic and Garaj-Vrhovac, 2002]. Bu nedenle son zamanlarda habitat tahribatı ve insan yapımı kimyasalların kullanımının artması ile yeni bir anlam kazanmıştır. DNA içerisinde kimyasal olarak kodlanan genetik bilgi, replike edildikten sonra mümkün olduğunca aslına uygun bir biçimde diğer nesillere aktarılacak zorundadır. Bu esnada gerek normal biyolojik süreçler sonucu gerekse DNA’nın doğrudan ya da dolaylı olarak fiziksel, kimyasal ve biyolojik etmenlerle etkileşimi sonucu çeşitli bozulmalar meydana gelebilmektedir. Kalıtım materyali olan DNA üzerinde bu şekilde hasarlara yol açan etmenleri tanımlamak için genotoksik terimi kullanılmaktadır. Genotoksik maddeler DNA hasarı oluşturduğunda bu durum üç şekilde sonuçlanabilir. Bunlar onarım, hücre ölümü ve mutasyon şeklinde olabilir. Mutasyon somatik hücrelerde gerçekleştiğinde canlı organizmada kanser görülebilecekken, mutasyon germinal hücrelerde oluşursa, durum kalıtsal bozukluk ve bunu takiben üretkenlik kaybı ile de sonuçlanabilir [Çavaş, 2010].

Günümüzde çevre sağlığının değerlendirilmesinde kirleticilerin toksik etkilerinin bir göstergesi olan biyoindikatörler ile yapılan çalışmalar büyük önem kazanmıştır. Özellikle biyokimyasal düzeyde meydana gelen değişimler, çevresel değişimlere karşı organizmanın “erken uyarı” yanıtını oluşturması bakımından önem taşımaktadır. Moleküler veya hücresel biyoindikatörlerin en önemli özelliklerinden birisi popülasyon ve ekosistem gibi biyolojik organizasyonun yüksek düzeylerinde

meydana gelebilecek değişiklikler hakkında muhtemel tahminler verebilmeleridir. Dolayısıyla biyoindikatörler, uzun dönemde oluşacak biyolojik etkilerin kısa sürede gözlenen göstergeleri olup, biyolojik sistem ile kimyasal, fiziksel veya biyolojik olabilecek potansiyel bir tehlike arasındaki interaksyonu yansıtan bir ölçümdür [Van der Oost et al., 2003; Okuşluk, 2008]. Balıklar ve sucul omurgasızlar, su kaynaklı kirleticileri metabolize etme, konsantre etme ve depolama özelliklerinden dolayı [Osman et al., 2007], kirleticilerin toksik, mutajenik ve karsinojenik potansiyelini değerlendirmede etkili model sistemleri olarak değerlendirilmektedir [Belpaeme et al., 1996; Spitsbergen and Kent, 2003; Braunbeck et al., 2005; Kumar et al., 2010]. DNA'yı etkileyerek genotoksik etki yaratan ksenobiyotiklere maruz kalınmasına bağlı olarak ortaya çıkabilecek etkilerin belirlenmesinde yararlanılan biyoindikatörlerde bulunmaktadır. Son yıllarda, genotoksisitenin duyarlı bir indikatörü olarak mikronükleus testine özel ilgi gösterilmektedir [Okuşluk, 2008]. Genotoksisite testlerinin ve histopatolojik bulguların balıkların dolayısıyla çevrenin maruz kaldığı potansiyel tehlikelerin belirlenmesinde iyi birer biyoindikatör olarak kullanılabileceği belirtilmiştir [Van der Oost et al., 2003].

Genotoksik maddeler doğrudan ya da dolaylı olarak DNA üzerinde hasarlar meydana getirebildikleri gibi hücre içerisinde süregelen onarım mekanizmalarında bozukluklara neden olarak, kendiliğinden olan DNA hasarlarının frekansını yükseltebilirler. Genetik toksikoloji testlerinde ana hedef DNA molekülü olduğundan dolayı, elde edilen sonuçlar aynı zamanda insan sağlığı ile ilgili olarak ortaya çıkabilecek problemlerin tahmininde de kullanılmaktadır. Bu nedenle bir türde DNA hasarı oluşturduğu bilinen bir kimyasal maddenin, diğer türlerde de benzer etkiler gösterebileceğini söylemek mümkündür [Çavaş, 2010].

Balıklar çevresel kontaminasyonun belirlenmesinde indikatör organizmalardır. Farklı toksik maddelerin balıklar üzerine olan genotoksik etkilerinin mikronükleus ve komet testleri ile araştırılmasına ilişkin çok sayıda çalışma mevcuttur [Bolognesi and Degan, 2001; Bombail et al., 2001; Çavaş and Ergene-Gözükara, 2003a, b; Çavaş and Ergene-Gözükara, 2005a; Çavaş and Ergene-Gözükara, 2005b; Ergene et al., 2007a, b; Çavaş, 2008; Çavaş and Könen, 2008; Okuşluk, 2008; Siu et al., 2008].

Sucul türlerde DNA hasarının ölçülmesinin birçok nedenleri vardır. En önemlisi çevrede genotoksik maddelerin etkisi ve maruziyet seviyesi hakkında bilgi verir. DNA'daki hasar direkt olarak karsinogenezis ile ilişkilendirilmektedir ki bu süreç sonuç olarak kontrolsüz hücre büyümesine sebebiyet veren çoklu genetik değişimleri içermektedir. Bu durum balık türlerinde, ksenobiyotik maddelerle tetiklenmiş tümörlerde *ras* geninde karakteristik mutasyonları bulma yoluyla belirtilir. Genotoksik kimyasallar, yüksek reaktivitelerine bağlı olarak germ line hücrelerinde mutasyonlara sebep olur ve teratojenik etkiler gösterir. Organizmalar için, üreme üzerine olan olumsuz etkileri populasyon seviyesinde karsinogenik etkilerden daha büyük etkiler yapmaktadır. DNA hasarının potansiyel önemi kanserden farklı olarak geri dönüşümsüz toksisiteye dahil olmasıdır [Mitchelmore and Chipman, 1998].

Chlorpyrifos-ethyl'in balıklar üzerine olan toksik etkilerine ilişkin yapılmış çalışmalar mevcuttur [Ali et al., 2008; Kavitha and Rao, 2008; Yılayaz, 2008a, b; Ali et al., 2009; Ghedira et al., 2009; Oruç, 2010]. Chlorpyrifos balıklar tarafından metabolize edilmektedir ve asetilkolinesterazın (AChE) inhibitörü olmayan başkalaşmış bir formda boşaltım sistemi yolu ile vücuttan uzaklaştırılmaktadır. Bitkiler yolu ile alım balıklardan daha hızlıdır [Simon et al., 1998]. Ancak yapılan literatür taraması sonucunda dünyada tatlı sularda en yaygın tür olan sazan balıklarında chlorpyrifos-ethyl'in genotoksik ve histopatolojik etkilerinin incelendiği bir çalışmaya rastlanılmamış olup gerçekleştirilen bu araştırma ilk çalışmadır.

Bu çalışmada, chlorpyrifos-ethyl'in belirlenmiş subletal dozda, sazan balıkları üzerine olan toksik etkileri genotoksik ve histopatolojik veriler kullanılarak değerlendirilmiştir. Genotoksik etkiler mikronükleus testiyle, histopatolojik etkiler ise toksik maddelerin hedef organları olan solungaç, böbrek ve hepatopankreas dokularında incelenmiştir. Çalışmada chlorpyrifos-ethyl için Spague [1971]'in bildirdiği üzere 96 saatlik LC₅₀ değerinin [Halappa and David, 2009] 1/10 değeri subletal doz olarak belirlenmiştir. Yarı statik yöntem kullanılmış ve deney ortamı 48 saatte bir yenilenmiştir. Bir hafta boyunca sürdürülen deneyde 24, 48, 96 ve 168. saatlerde mikronükleus için kan ve histopatoloji için doku örnekleri alınarak gerekli analizler yapılmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçlar ile dünyada tatlı su balıkları

arasında en yaygın olarak bulunan ve OECD tarafından toksisite çalışmalarında standart tür olarak belirlenen sazan balıklarında bu maddenin hücresel boyutta genotoksik ve histolojik etkisi belirlenerek, uluslararası literatüre katkı sağlanmış olup, bu konuda ileride yapılacak çalışmalara da ışık tutması beklenmektedir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 Chlorpyrifos-ethyl

Chlorpyrifos, phosphorothioate esteri olarak ilk defa Dow kimyasal şirketi tarafından tanıtılmış ve patent almıştır. 3,5,6-trichloropyridin-2-ol (TCP) ile o,o-diethyl phosphorochlorodithioate'ın reaksiyonu ile üretilmiştir [Simon et al., 1998]. Chlorpyrifos-ethyl'in kimyasal formülü $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ olup, kimyasal ismi o,o-diethyl,o-3,5,6-trichloro-2-pyridyl-phosphorothioate'dır [Anonymous 1]. Chlorpyrifos-ethyl'e ilişkin kimyasal yapı Şekil 2.1.'de, fiziksel ve kimyasal özellikleri ise Çizelge 2.1.'de verilmiştir.

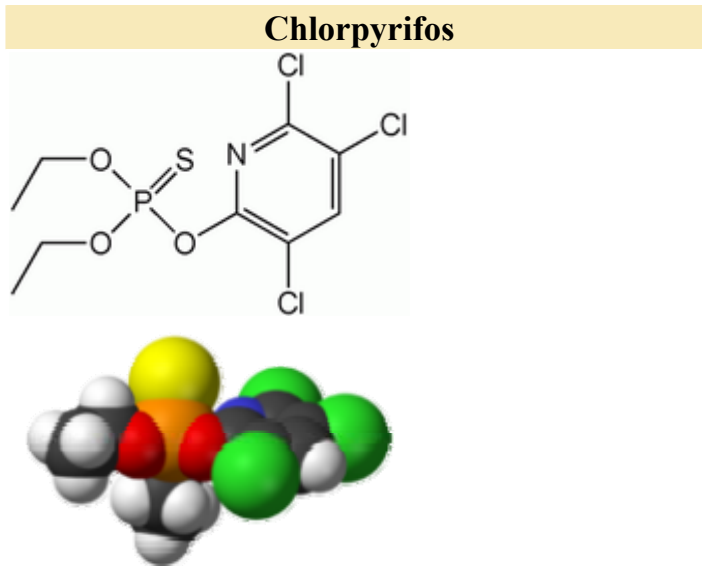
Hafif mercaptan kokulu, renksiz, kristal bir yapı gösterir. Piyasada % 2'lik ve % 25'lik formları bulunur. Korban 2 Dust, Pyrinex 2 Dust, Priban 2 Toz, Terpan 2 Toz, Korban 25 Dust vb. ticari isimlerle piyasada bulunmaktadır [Eaton et al., 2008]. USEPA [2001]'a göre chlorpyrifos'u aktif bileşen olarak ihtiva eden 400'ün üzerinde formülasyon mevcuttur. Sivrisineklerin kontrolü amaçlı 0,028-0,056 kg/yüzey alanı ha şeklinde önerilen oranlarda aplikasyonları sucul bütün canlılar üzerinde mortalite, biyoakümülyasyon ve sağlığa zararlı subletal etkiler meydana getirmiştir. Chlorpyrifos'un abiyotik ortamlarda parçalanma oranı değişmektedir. Deniz suyunda 1 hafta (% 50 parçalanma), toprakta 24 hafta (kuruluk, düşük sıcaklıklar, azaltılmış mikrobiyal aktivite, düşük organik içerik koşullarında), sedimentte 3,4 hafta, distile suda 7,6 hafta olarak tanımlanmıştır. Biyolojik örneklerde parçalanma zamanı daha kısadır ve genellikle balıklarda 9 saatten daha azdır [Odenkirchen et al., 1988].

Buhar basıncının yüksek olmasından ötürü ($25^{\circ}C$ 'de $1,9 \times 10^{-5}$ mm Hg) chlorpyrifos-ethyl atmosfere çok kolay buharlaşmaktadır. Suda çözünürlüğünün çok düşük olmasından ötürü topraktaki partiküllere, bitkilere çok hızlı bir şekilde tutunur ve belli bir kısmı da çevredeki su ortamına girer. Chlorpyrifos su ortamına girdiğinde suyun yüzeyinden buharlaşabildiği gibi, sudan hızlı bir şekilde ayrışır ve sediment partiküllerine tutunur. Kumlu toprak ve sediment partiküllerinden ziyade organik karakterli sediment yüzeylerine tutunur. Chlorpyrifos-ethyl'in hidrofobik

özelliğinden ötürü çevresel matrikslerdeki organik fraksiyonlara yüksek derecede ayrışma göstermesi chlorpyrifos'un biyokonsantrasyonunu sınırlamaktadır [Simon et al., 1998; Eaton et al., 2008; Becker et al., 2009]. Chlorpyrifos çevrede birçok yolla parçalanmaktadır. Chlorpyrifos ve metabolitleri ışığa karşı hassastır ve yarılanma ömrü yaklaşık 3 gündür ancak atmosferde hidroksil radikallerinin mevcudiyetinde yarılanma ömrü 6 saate kadar düşmektedir. Chlorpyrifos'un parçalanması su ortamına girdikten sonra, abiyotik hidroliz veya ışığa karşı daha duyarlı hale gelmiş oksidasyon ile ilişkilendirilmektedir. Toprakta ışık yolu ile parçalanma klorun uzaklaştırılmasında ve chlorpyrifos'un oksidasyonunda rol oynar, ancak güneş ışığının az olduğu, chlorpyrifos'un hızlı parçalanmasına etki eden su ve/veya toprak mikroorganizmalarının eksikliğinde chlorpyrifos aylarca kalıcılığını devam ettirir. Chlorpyrifos'un parçalanması ile oluşan metaboliti chlorpyrifos-oxon çok daha toksiktir [Eaton et al., 2008]. Chlorpyrifos-ethyl'in oksidasyonu CYP enzimine dayalı olup, sülfürün ve aril halkasının uzaklaştırılması ile gerçekleşmektedir [Hodgson, 2010].

Chlorpyrifos-ethyl'in tatlısu ve deniz balıkları için akut LC_{50} değerleri 2-250 $\mu\text{g/L}$ aralığında tanımlanmıştır, fakat genellikle 100 $\mu\text{g/L}$ olarak belirtilmiştir [NRA, 2000]. Chlorpyrifos geniş ölçüde aktif bir insektisittir, ağız yoluyla alım ve temasla etkili olup, deri, mide ve akciğer membranları ile absorbe edilir. Sistemik etkili değildir ve insektisidal konsantrasyonları fitotoksik değildir [Simon et al., 1998]. Mide ve solunum sistemine etkilidir [Anonim 1]. Chlorpyrifos-ethyl'e su ortamında kronik maruziyet beyindeki asetilkolinesteraz seviyesini inhibe etmektedir ve kronik maruziyet ile tetiklenen bu baskılama seviyesi de çevrenin tarımda kullanılan kimyasallarla kirlenmesinin tahmininde biyoindikatör olarak kullanılabilir [Dembele et al., 2000]. Chlorpyrifos-ethyl'in asıl hedefi asetilkolinesteraz enziminin inhibisyonudur [Rose et al., 1999; Rendon-von Osten et al., 2005; Halappa and David, 2009; Xing et al., 2010]. Bunun sonucu olarak merkezi sinir sistemi, kaslar ve bezler sürekli olarak uyarılırlar. Asetilkolinesteraz, sinaptik fissürdeki (aralıktaki) asetilkolini inaktive eden enzimdir. Bir alkaloid olan asetilkolin tanımlanan ilk nörotransmitterdir. Merkezi sinir sisteminde yer alan bir kimyasal transmitter (iletici) olmasının yanı sıra birçok organizmanın (insanlar dahil) parasempatik sinir

sisteminde yer alır. Formülü $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ olan asetilkolin, asetik asit ile kolin'in esteridir. Asetilkolin, bugün Alzheimer ve Parkinson hastalıklarının teşhis ve tedavisinde kullanılmaktadır. Asetilkolin çizgili kas (iskelet kası) liflerindeki asetilkolin reseptörlerine (alıcılarına) bağlanarak, lifin kasılmasına neden olur. Asetilkolinin öğrenme ve hafıza ile de derin bir ilişkisi bulunur [Ali et al., 2009; Anonymous 2]. Chlorpyrifos-ethyl'in nörotoksik etkileri vardır, endokrin sistem üzerine yıkıcı etkileri mevcuttur ve yapılan bazı çalışmalar astım hastalığını tetikleyici olduğunu göstermiştir. Ayrıca yakın zamanda yapılan çalışmalarda anne karnında chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan çocuklarda düşük doğum ağırlıkları, daha düşük kafa çapı görüldüğü ve 3 yaş dönemi çocuklarında ise, mental ve motor gelişimde gecikmeye ilişkin daha fazla risk olduğu belirtilmiştir [Anonymous 2]. Chlorpyrifos-ethyl ile gerçekleştirilen çalışmalarda farelerde fetus (1 mg/kg) ve ratlarda (15 mg/kg) ise üreme üzerine toksik etkiler yarattığı belirtilmiştir [Iyer, 2001]. Chlorpyrifos-ethyl'e ilişkin 96 saatlik LC_{50} değeri (0,160 mg/L) chlorpyrifos-methyl için belirlenmiş olan 96 saatlik LC_{50} değerinden (1,57 mg/L) 1/10 oranında daha düşüktür ki, bu durumda bu maddenin çok daha toksik olduğuna ilişkin bilgi vermektedir [Gül, 2005; Halappa and David, 2009].



Şekil 2.1. Chlorpyrifos-ethyl'in kimyasal yapısı ($\text{C}_9\text{H}_{11}\text{Cl}_3\text{NO}_3\text{PS}$) [Anonymous 2].

Çizelge 2.1. Chlorpyrifos-ethyl'in fiziksel ve kimyasal özellikleri [Anonymous 3; Eaton et al., 2008]

IUPAC ismi	o,o-diethyl o-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate
CAS no	2921-88-2
Molekül formülü	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
Molar kütle	350,59 g/mol
Görünüm	Renksiz kristal
Yoğunluk	1,398 g/cm ³ (43,5 °C)
Erime noktası	41-42°C
Kaynama noktası	~160°C'de dekompoze olur
Suda çözünürlük	2 mg/L (25 °C) 0,7 mg/L (20 °C)
Organik çözücude çözünürlüğü	% 79 isooktan % 43 metanol Diğerlerinde çok kolay çözünür
Partisyon katsayısı	Log Kow 4,96 (oktanol/su)
Buhar basıncı	1,87x10 ⁻⁵ mm Hg

2.2 Chlorpyrifos-ethyl ile Yapılan Çalışmalar

De Silva and Samayawardhena [2002]; 14 gün boyunca üç farklı konsantrasyonda chlorpyrifos-ethyl'e (0,5, 1 ve 2 µg/L) maruz kalan guppy balıklarında görülen davranış değişikliklerini ve histolojik etkileri incelemişlerdir. Çalışmanın sonunda chlorpyrifos-ethyl'in düşük konsantrasyonlarda dahi balıkların yüzme davranışlarında değişikliklere sebep olduğu, paraliz gerçekleştiği, bütün maruziyet gruplarında anomaliler gözlemlenirken özellikle en yüksek doza maruz kalan balıklarda daha fazla oranda gözlemlendiği belirtilmiştir. Eksternal anomaliler kaudal pedinkül ve operkulum alanında hemoraji, ventral bölgede şişme, yüzgeçlerde hasar ve hemoraji olarak belirtilmiştir. Solungaç dokularında birçok patolojik değişiklik tespit edilmiş olup, bunlar sekonder lamellaların yok olması, kısalması, mukoz salgısının artması, lamellalarda füzyon, solungaç lamellalarının düzensiz görünüşü, solungaç dokusunda artan vakuolizasyon olarak bulunmuştur. Barsak dokusunda tespit edilen bulgular ise doz artışına bağlı olarak epitelyum dokuda harabiyet, barsak villüslerinin zarar görmesi ve salgısının artması, intestinal lümenin kontrol grubu ile kıyaslandığında küçülmesi ve intestinal epitelde hemoraji gözlemlenmesi olarak belirtilmiştir.

Rao et al. [2003]; chlorpyrifos-ethyl'in tilapya balıklarına toksisitesini inceledikleri çalışmalarında 96 saatlik LC₅₀ değerini 26 µg/L olarak bulmuşlardır. Subletal konsantrasyon olarak 10,4 µg/L değeri seçilmiş ve davranışsal, morfolojiksel değişiklikler ile beyin ve solungaçlardaki asetilkolinesteraz aktiviteleri incelenmiştir. Asetilkolinesteraz aktivitesinin inhibisyonu beyinde daha fazla olarak bulunmuştur. Ayrıca solungaçlarda da sekonder lamellalarda büyük sub-epitelial boşlukların oluşumu, terminal uçlardaki lamellalarda şişlikler, lamellaların tabanında lezyonlar ve yıkımlanmalar, solungaç filamentlerinde kalın mukus tabakası ile kaplı sekonder lamellalarda yaygın füzyon gözlenmiştir. Solungaç dikenlerinin şekilleri ciddi bir şekilde etkilenmiş, daha incelmış ve uzamıştır. Solungaç dikenlerinin ve kemerinin temel yapısı da zarar görmüştür.

Okechukwu et al. [2007]; chlorpyrifos-ethyl'in 96 saat boyunca uygulanan akut nominal dozlarının (0,64, 0,80, 0,96, 1,12 ve 1,28 mg/L) Afrika yayın balıklarının (*Clarias gariepinus*) bazı hematolojik parametreleri üzerine olan etkilerini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda 96 saatlik maruziyetin balığın kanında hematokrit ve hemoglobin konsantrasyonlarını inhibe ettiği bulunmuştur. Kırmızı kan hücrelerinde en yüksek dozda ciddi bir azalma gözlemlenirken, beyaz kan hücrelerinin sayısında ise doza bağlı olarak bir artış gözlemlenmiştir. Ortalama korpüsküler hemoglobin'in inhibe olması, ortalama korpüsküler hemoglobin konsantrasyonunun artması istatistiki olarak önemli bulunmaz iken ($P>0,05$), ortalama korpüsküler hacim'in inhibe olması önemli bulunmuştur ($P<0,05$).

Ali et al. [2008]; akut doz ve subletal konsantrasyonlarda chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan *Channa punctatus* balıklarında mikronükleus testi kullanarak genotoksik değerlendirme yapmışlardır. 96 saatlik LC₅₀ değeri 811,98 µg/L olarak belirlenmiştir. Denemede uygulanan diğer dozlar ise 203, 406 ve 609 µg/L olarak tespit edilmiş ve balıklar subletal konsantrasyonlara 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca maruz bırakılmışlardır. Bütün muamele gruplarında tespit edilen mikronükleus frekansları kontrol gruplarından farklı bulunmuş olup, pestisitte doza bağlı bir etki gözlemlenmiştir. 24, 48 ve 72 saatlik (96 saat hariç) uygulamalarda en düşük doz ile en yüksek dozda elde edilen mikronükleus frekansı arasında 10 kat fark elde

edilmiştir. Benzer şekilde maruziyet süresi arttıkça gözlemlenen mikronükleus frekansının arttığı belirtilmiş olup, bu durumun 96 saatlik uygulama için geçerli olmadığı belirtilmiştir.

Kavitha and Rao [2008]; sivrisinek balığı (*Gambusia affinis*) ile yaptıkları çalışmada chlorpyrifos'un antioksidan enzimleri ve hedef enzim asetilkolinesteraz interaksyonu üzerine olan toksik etkilerini incelemişlerdir. 96 saatlik LC₅₀ değeri olan 297 µg/L'e maruziyetten sonra, antioksidan enzimleri olan süperoksidadizmutaz, katalaz, glutatyon redüktaz aktiviteleri ve beyinde asetilkolinesteraz inhibe olmuştur. Bununla beraber lipid peroksidasyonunun indüksiyonu gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar asetilkolinesterazın pestisitler ile kontamine olmuş sucul ortamlarda biyoindikatör olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Yılayaz [2008a]; chlorpyrifos-ethyl'in *Capoeta trutta* üzerindeki genotoksik etkisinin belirlenmesi için eritrosit mikronükleus testi kullanmışlardır. Çalışmada 96 saat süre ile 125, 150, 175, 200 ve 225 ppm'lik dozlarda chlorpyrifos-ethyl'e maruz bırakılan 24 adet bireyin eritrositlerinde mikronükleus oluşum frekansları hesaplanmıştır. Sonuç olarak en yüksek mikronükleus frekansı % 2,19 ile 225 ppm'lik doza maruz bırakılan bireylerde tespit edilmiş ve doz artışına bağlı olarak mikronükleuslu eritrosit sayısında artma olduğu gözlenmiştir.

Yılayaz [2008b]; chlorpyrifos-ethyl'in *Barbus rajanorum mystaseus* üzerindeki genotoksik etkisinin belirlenmesi için eritrosit mikronükleus testi kullanmışlardır. Çalışmada 96 saat süre ile 125, 150, 175, 200 ve 225 ppm'lik dozlarda chlorpyrifos-ethyl'e maruz bırakılan 24 adet bireyin eritrositlerinde mikronükleus oluşum frekansları hesaplanmıştır. Sonuç olarak en yüksek mikronükleus frekansı % 2,47 ile 225 ppm'lik doza maruz bırakılan bireylerde tespit edilmiş ve doz artışına bağlı olarak mikronükleuslu eritrosit sayısında artma olduğu gözlenmiştir.

Ali et al. [2009]; chlorpyrifos'un *Channa punctatus* balıkları üzerine genotoksik etkilerini mikronükleus testi ile incelemişlerdir. Mikronükleus indüksiyonu 14. günde ve 203,0 µg/L (subletal konsantrasyon) değerinde en yüksek olarak

bulunmuştur. Chlorpyrifos'un nonletal seviyede dahi (68,0 µg/L) balıklar üzerine mutajenik ve genotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir.

Ghedira et al. [2009]; chlorpyrifos-ethyl'in akut dozunun Akdeniz yengeci *Carcinus maenas*'ın karaciğer ve solungaçlarında asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. 2 günlük maruziyetten sonra asetilkolinesteraz aktivitesi her iki organda da 3,12 ve 7,82 µg/L konsantrasyonlarında inhibe olurken, bütirilkolinesteraz yalnızca 7,82 µg/L konsantrasyonunda inhibe olmuştur.

Halappa and David [2009]; tarafından gerçekleştirilen çalışmada, 0,0224 mg/L ve 0,0112 mg/L konsantrasyonda chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan sazan balıklarının türe özgü davranışlarında bozukluklar görülmüştür. Balıklarda huzursuzluk, akvaryum tabanında toplanma, yüzmede ve dengede bozukluklar, koordinasyon kaybı, kontrol grubunun kapladığı alanın iki katını kaplama, daha sonra akvaryumun köşelerine çekilme, suda asılı kalma gibi davranış değişiklikleri görülmüş olup, bu davranış değişiklikleri asetilkolinesteraz aktivitesinin inhibisyonuna bağlanmıştır.

Woke and Aleleye-Wokoma [2009]; tarafından gerçekleştirilen çalışmada *Clarias gariepinus* balıkları 0,5, 1,0, 2,0 ve 4,0 mg/L konsantrasyonlarında chlorpyrifos-ethyl'e maruz bırakılmışlardır. Balıklarda davranış bozuklukları, yüzme bozuklukları, yüzmede koordinasyon bozukluğu, denge kaybı, solunum stresine bağlı olarak hava yutma hareketinde artış, kaudal pedinkülde (kuyruk bölgesinde) pembe renkli renklenme, operkulumda hemoraji ve hasar tespit edilmiştir.

Xuereb et al. [2009]; yaptıkları çalışmada *Gammarus fossarum* (crustacea amfipod)'u 24, 48 ve 96 saat boyunca 0,125, 0,25, 0,5 ve 1 µg/L konsantrasyonlarında chlorpyrifos-ethyl'e maruz bırakmışlardır. Asetilkolinesteraz aktivitesinin en yüksek oranda inhibisyonu 96 saatlik maruziyette ve en yüksek dozda rapor edilmiştir. *G.fossarum*'un yaşama oranı üzerine yıkıcı etkiler asetilkolinesteraz inhibisyon seviyelerinin % 50'den yüksek olduğu durumda görülmüştür. Ancak görülen ölüm seviyelerinin her zaman için asetilkolinesteraz inhibisyonunun yüksekliği ile ilişkilendirilemeyeceği de Varo et al. [2002], Cooper

and Bidwell [2006] ve Gagnaire et al. [2008] tarafından yapılan çalışmalarda belirtilmiştir.

Oruç [2010]; *Oreochromis niloticus* balıklarını 15 ve 30 gün boyunca subletal konsantrasyonlarda (5, 10 ve 15 ppb) chlorpyrifos-ethyl'e maruz bırakmışlardır. Deneme sonunda oksidatif stres, steroid hormon konsantrasyonları ve asetilkolinesteraz aktivitesi incelenmiştir. Düşük konsantrasyonlarda dahi asetilkolinesteraz aktivitesinin inhibe olduğu ve oksidatif stresin tetiklendiği belirtilmiştir. Balıkların gonad dokularındaki lipid peroksidasyonuna karşın antioksidant enzimlerin koruyucu fonksiyonu tespit edilmiştir. Buna ilave olarak chlorpyrifos muamelelerinin maruz kalan balıklardaki lipid peroksidasyon prosesini stimüle etmediği bulunmuştur. Chlorpyrifos serum östrojen ve testosteron seviyelerini düşürmüş, steroid hormon sentezini bozmuştur ve bu bulguda chlorpyrifos'un endokrin bozucu olarak davrandığının bir göstergesi olarak tanımlanmıştır.

Xing et al. [2010]; tarafından yapılan çalışmada chlorpyrifos-ethyl'in üç farklı dozunun (1,16, 11,6 ve 116 µg/L) sazan balıklarının beyin ve kas dokularındaki asetilkolinesteraz seviyeleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. 40 gün süren deneme sonucunda artan pestisit konsantrasyonuna bağlı olarak her iki dokuda da asetilkolinesteraz aktivitesinin düştüğü, ve bütün maruziyet gruplarında her iki dokudaki enzimatik aktivitenin kontrol grubuna kıyasla istatistiki olarak önemli derecede düşük olduğu tespit edilmiştir. Beyindeki asetilkolinesteraz inhibisyonunun, kas dokusuna kıyasla daha yüksek olduğu dolayısıyla daha erken tespit edilebilen bir biyoindikatör olabileceği bulunmuştur.

2.3. Genotoksisite

Genotoksisite testleri farklı mekanizmalar yolu ile indirekt olarak veya direkt yolla genetik hasarı tetikleyen maddelerin tespiti için dizayn edilmiş in vivo ve in vitro testler olarak tanımlanır. Bu testler DNA'daki hasara ve onun fiksasyonuna bağlı olarak hasarın tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. Gen mutasyonları, büyük

ölçekli kromozomal hasarlar, rekombinasyon ve çok sayıdaki kromozom değişiklikleri şeklinde olup, hasarın DNA'ya fiksasyonu genel olarak kalıtsal etkiler ve genetik değişimlerin yalnızca bir kısım rol oynadığı, malign hücrelerin çok basamaklı oluşum süreci için gerekli olarak düşünülür. Bu tarz hasarları ortaya koyan testlere pozitif yanıt veren bileşikler insanlar üzerine karsinojen ve/veya mutajen etki yapma potansiyeline sahiptir ve kanser ve/veya kalıtsal hasarları tetikleyebilir. Çünkü belli bir kimyasala olan maruziyet ve karsinogenezis arasındaki ilişki ortaya konulabilmesine karşın kalıtsal hastalıklar için benzer bir ilişkiyi ispatlamak zordur, genotoksisite testleri asıl olarak karsinojenitenin tahmini için kullanılmaktadır [European Medicines Agency, 2006].

Bir genotoksisite test yönteminde olması istenen temel özellikler şunlardır:

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

Günümüzde bu özellikleri taşıyan, birçok doku ve organizma üzerinde in vivo ve in vitro olarak en yaygın olarak kullanılan test metodlarının başında mikronükleus testi gelmektedir [Çavaş, 2010]. Sucul organizmalardaki genotoksisite biyoindikatörleri karsinojenik deniz kirlleticilerinin indikatörleri olarak kullanılabilir [Bolognesi and Degan, 2001].

2.4. Mikronükleus Testi

Mikronükleuslar (MN) hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır. Anöploidiyi uyaran anojenler, sentromer bölünme hatalarına ve iğ iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarak; klastojenler ise kromozom kırıkları oluşturarak mikronükleus oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Mikronükleus sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Bu amaçla yürütülen analizler, Mikronükleus Testi olarak

adlandırılırlar. Mikronükleus testi OECD Kimyasal Test Rehberinde yer almaktadır [Çavaş, 2010]. Çeşitli yollarla ortaya çıkan genotoksik etkiler sonucunda hücre bölünmesinin metafaz evresinde gözlenebilen kromozomlardaki kırık parçalar ya da tam iğ ipliğine bağlanamayan tam kromozomlar, anafaz evresinde kutuplara çekilemezler. Bu nedenle ortada kalan tam kromozom ve kromozom parçaları hücre bölünmesinin son safhalarında yani telofaz evresinde ana nükleus içerisine dahil olamazlar. İşte bu yapılar hücre bölünmesi sonunda ana nükleusu oluşturacak diğer kromozomlar ile tekrar kromatin hale dönüştüklerinde, sitokinez yani sitoplazma bölünmesi ile birlikte oluşan kardeş hücrelerden birinde ana nükleus yanında ikinci bir küçük nükleus (mikronükleus) halinde kendilerini gösterirler [Çavaş, 2010].

Mikronükleus testinin birçok hücre tipine uygulanabilir olması, hızlı, ucuz ve basit bir test sistemi olması, otomasyon potansiyelinin olması, istatistik olarak güçlü sonuçlar vermesi, klastojen ve anojen maddelerin ayırımına olanak tanınması, apoptoz ve nekrozun da görülmesine olanak sağlaması, hücre proliferasyon oranının belirlenmesine olanak sağlaması (% binükleuslu hücre oranı) gibi birçok avantajının olmasına karşın, tüm yapısal kromozom aberasyonlarının belirlenememesi, mikronükleus ifadesi için hücrenin bir bölünme geçirmesi gerektiği, sitokalsin-B ile test edilen kimyasal arasındaki etkileşimler de bu test metodunun dezavantajları arasında sayılabilir [Çavaş, 2010]. Mikronükleusları tanımlamak için temel alınması gereken 5 tane kriter vardır. Bunlar:

- * Mikronükleus ana nükleus ile aynı mikroskopik refle'yi vermelidir.
- * Mikronükleus ana nükleusun 1/3'ünden daha küçük olmalıdır.
- * Mikronükleus ana nükleustan belirgin biçimde ayrılmış olmalıdır.
- * Mikronükleus ana nükleus ile aynı renk, doku ve fokus planına sahip olmalıdır.
- * Mikronükleus mutlaka sağlam, ve sitoplazması korunmuş olan hücrelerde analiz edilmelidir [Çavaş, 2010].

İnterfaz hücrelerinde mikronükleus sayımı teknik açıdan metafaz analizlerine oranla çok daha kolay ve hızlı bir yöntemdir. Kardeş kromatid değişimi (SCE) ve kromozomal aberasyonlar (CA) gibi metafaz tekniklerinin balıklarda uygulanması pratik açıdan çok kullanışlı değildir. Bunun sebebi balıkların memelilere göre çok

daha küçük ve fazla sayıda kromozoma sahip olmaları ve balık karyotipinin daha düzensiz bir yapı içermesidir [Çavaş, 2010]. Genotoksisite testi uygulanacak olan balığın yayılım alanının geniş olması gerekmektedir. Bu nedenle sitogenetik metodlar arasında kolay ve ucuz olmasının yanında, özellikle çevre kirliliğinde indikatör organizmalar olarak görev yapan balıklar üzerine kullanılabilirliğinin uygun olması nedeni ile mikronükleus testi son yıllarda giderek artan oranda kullanılan bir test metodu haline gelmiştir. Balık eritrositleri çekirdekli olduklarından dolayı, bu hücrelerin mikronükleus testinde kullanımı son derece kolaydır. Gerek in-situ gerekse laboratuvar koşullarında yapılan çalışmalarda genotoksik maddelere maruz kalan balıklarda mikronükleus frekanslarının anlamlı düzeyde arttığı gösterilmiştir [Çavaş and Könen, 2008]. Balıklarda genotoksisite testlerinde dolayısıyla mikronükleus testlerinde temel olarak 1 negatif kontrol, 1 pozitif kontrol (genotoksik bir madde) ve test edilmesi istenen maddenin 3 farklı uygulama dozu ve 3 farklı süreden oluşan bir deney seti kurulmalıdır. Genel olarak her doz/süre grubu için minimum olarak 5 balık kullanılmalıdır. Mikronükleus analizleri çoğunlukla periferik eritrositlerde gerçekleştirilir ve uygulama süresi sonunda kan örnekleri belirlenmiş olan yöntemler ile alınır. Her bir balıktan alınan kan örnekleri, her örnek için önceden hazırlanmış olan en az 2 temiz lama ince bir tabaka oluşturacak şekilde yayılırlar. Hazırlanan preparatlar havada kurutulduktan sonra % 95'lik etanolde 20 dakika süresince fiske edilirler. Fiske edilen preparatlar tekrar havada kurutulduktan sonra % 5'lik Giemsa solüsyonunda 20 dakika süresince boyanırlar. Boyama işleminden sonra preparatlar saf sudan geçirilerek fazla boyanın atılması sağlanır. Daha sonra preparatlar mikroskop altında değerlendirmeye alınırlar. Her preparattan minimum 1000 hücre sayılarak mikronükleus taşıyan hücrelerin frekansları belirlenir ve elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirmeye alınırlar. Ayrıca çok çekirdekli, apoptik ve nekrotik hücreler mikronükleus testinde sayılmamalıdır [Çavaş, 2010]. Mikronükleus testi balıklarda eritrositlere, lenfositlere, solungaç epiteline ve kuyruk yüzgeci epiteline uygulanabilir [Çavaş, 2010; Garcia-Medina et al., 2011].

Mikronükleus testi, sucul çevrelerde hücresel boyutta mikronükleus frekansını tetikleyici olarak tanımlanmış birçok farklı tipte kirleticiden kaynaklanan

genotoksisiteyi belirlemek üzere başarılı bir şekilde uygulanmaktadır [Carrasco et al., 1990; Lee and Steinert, 2003; De Andrade et al., 2004; Buschini et al., 2004; Ali et al., 2008; Ferreira et al., 2008; Frenzilli et al., 2009; Rybakovas et al., 2009; Nwani et al., 2010].

Farklı balık türleri farklı mikronükleus frekansları gösterebilir, ancak yüksek mikronükleus frekansları daha kirli bölgelerden [Al-Sabti and Metcalfe, 1995; Minissi et al., 1996; Bombail et al., 2001; Çavaş and Ergene-Gözükara, 2005b; Ergene et al., 2007a, b; Rybakovas et al., 2009; Ferreira et al., 2010] ve farklı tipte kirlleticilere maruziyetten sonra [Çavaş and Ergene-Gözükara, 2003a, b; Buschini et al., 2004; De Andrade et al., 2004; Çavaş and Ergene-Gözükara, 2005a, c; Bolognesi et al., 2006; Neuparth et al., 2006; Çavaş and Könen, 2007; Çavaş and Könen, 2008, Çavaş, 2008; Siu et al., 2008; Ramsdorf et al., 2009; Nwani et al., 2010] elde edilmiştir.

2.5. Nükleus Anomalileri

Balık periferik kan yaymalarından hazırlanan preparatlarda normal ve mikronükleuslu çekirdek yapısına sahip eritrositler yanında kendiliğinden bulunabilen ve genotoksik etki sonucunda frekansları arttığı gözlenen bazı nükleus anomalilerine de rastlanabilir. Bu anomaliler; binükleus, çentikli nükleus, tomurcuklu nükleus ve loblu nükleus olmak üzere başlıca dört grup altında toplanmışlardır. Bunlar sitokinez hatalarına bağlı olarak oluşan binükleus olarak isimlendirilen durumlar, kromozom kırılmalarına bağlı gen amplifikasyonu sonucu oluşabilen tomurcuklu nükleus, kesin olarak mekanizmanın bilinmediği loblu nükleus durumu ve çentikli nükleus durumu gibi oluşumlardır. Bir hücre içerisinde çift nükleus bulunma durumu olan binükleus terimi, hücre bölünmesi esnasında ve başlıca sitokinezde meydana gelen sitotoksik etkilerin göstergesi olarak kabul edilmektedir. Çentikli nükleus, içerisinde kromatin bulunmayacak şekilde çentik benzeri girintilere sahip nükleuslardır. Çentikli nükleus oluşum mekanizması ile ilgili olarak henüz ortaya atılmış bir görüş bulunmamaktadır. Bununla birlikte tomurcuklanma veya lob oluşumu ile ilgili bazı olası mekanizmalar öne sürülmüştür.

Amplifiye edilmiş DNA'nın hücre siklusunun S fazında nükleusun dış çevre kısımlarına doğru itilip, buradan nükleus tomurcuklanması ile bir nükleus oluşturmak üzere atıldığını göstermişlerdir. Nükleusun bir şekilde temel nükleus alanı ile uyuşmayacak şekilde fazlalık oluşturan DNA'yı tanıma yeteneğine sahip olabileceği ileri sürülmüştür. Bu fazlalık DNA tomurcuklanma yolu ile bir nükleus oluşturmak sureti ile nükleustan dışarı atılmaktadır. Sonraki aşamada ise bu mikronükleus bir mini-hücre oluşturmak üzere sitoplazmadan uzaklaştırılır. Nükleus tomurcuklanması mekanizması hücre siklusunun S fazında gerçekleşir ve oluşan tomurcuklar mikronükleus ile aynı morfolojik görünüme sahiptirler. Aradaki tek fark ise oluşan lob ve tomurcukların oluşum safhalarına bağlı olarak ana nükleusa kalınlığı ve büyüklüğü değişebilen bir nükleoplazmik sapla bağlı olmalarıdır. Nükleus tomurcuklanması ve oluşan mikronükleusun hücreden uzaklaştırılması işleminin ne kadar bir sürede gerçekleştiği henüz bilinmemektedir [Çavaş, 2010].

2.6. Balıklarda Toksik Maddelerin Dokular Üzerine Etkisi

Balığın yetiştiricilik ortamında optimal koşullarda büyümesi ve gelişmesini sağlamak için suda kirletici olarak bilinen ve çoğunlukla balıklar için toksik olan maddelerin maksimum kabul edilebilir düzeylerinin bilinmesi gerekir [Benli, 2006]. Bu ihtiyacın giderilmesinde en temel yöntem kuşkusuz kronik toksisite deneyleri yapılarak sonuçların deney maddesinin kalıntısı ve balık dokusundaki histopatolojik bulguların değerlendirilmesidir. Çünkü yabancı maddeye karşı organizmanın ilk yanıtı hedef organ ve dokularda moleküler ve hücresel düzeylerde meydana gelmektedir [Lloyd, 1992]. Bu yanıt toksik maddeye maruz kalmanın birinci saatinden itibaren saptanabilmektedir [Metcalf, 1998]. Temeli toksik maddeye duyarlılık, hedef organ ve etki mekanizmasının şekline dayanır. Balıklarda yapılan toksikolojik çalışmalarda ise özellikle maddenin subletal konsantrasyonlarını belirlemek açısından histopatoloji önem taşımaktadır [Benli, 2006]. Histopatolojik bulgular ani değişimler olmadığı için daha gerçek sonuçları yansıtmaktadır. Hiçbir teknik, histopatoloji kadar hızlı bir şekilde hasarın olduğu birçok bölgeden örnek almaya olanak tanımamaktadır. Kullanılan örneğin büyüklüğü (larva ya da anaç) ne olursa olsun maddenin etkilediği hedef organ ya da dokularda homojen değişiklikler

görülmektedir [Hinton and Lauren, 1990]. Örneklerin histopatolojik olarak hemen incelenmesi gerekmemektedir. Uygun saklama yöntemi [balıklarda Bouin fiksatif ve % 10'luk nötral formalin önerilmektedir] kullanılarak inceleme daha sonra gerçekleştirip tüm organ sistemleri değerlendirilebilmektedir [Teh et al., 1997].

Balıklarda kimyasal kontaminantlara maruz kalma sonucunda değişik organlarda lezyonlar oluşmaktadır. Nekropsi sonucunda çoğunlukla tüm organlar incelenmektedir. Ancak histopatolojik çalışmalarda su ortamıyla ilişkisi dolayısıyla solungaç, karaciğer ve böbrek kirliliğin etkisini saptamada kullanılan en uygun hedef organlardır. Bu organlar sucul kirlilik için primer indikatörlerdir. Özellikle solungaçlar su kalitesinin aynası olarak görülmektedir. Karaciğer metabolizmada kilit rol oynarken, böbrek ise balığın iç ortamı ile su-tuz dengesinin stabilizasyonu, atılımı ve ksenobiyotik metabolizma için önemlidir [Hibiya, 1982; Bernet et al., 1999; Benli, 2006].

2.7. Kemikli Balıklarda Bazı Organların Histolojik Yapısı

2.7.1. Solungaçlar

Balıklarda gaz değişiminin yapıldığı en önemli organlar solungaçlardır. Solungaçlar, yutak bölgesinde, her iki yanda içten dışa doğru uzanan bir seri cep ya da yarık içinde bulunurlar. Çene ve dil yayları arasında bulunan birinci solungaç yarığı kemikli balıklarda embriyonik gelişme sırasında tümüyle kapanmıştır. Gerçek işlevsel solungaçlar, spirakulumu izleyen solungaç yarıkları içinde ve septumların her iki yanında yer alırlar. Her septumda, solungaç yayından başka, solungaçlara kan getiren afferent ve solungaçlardan kan götüren efferent brankiyel arterler (solungaç atardamarları), sinirler ve kaslar bulunur. Her septumun bir yanında bulunan bir seri filamentten (primer lamella) oluşmuş solungaca, hemibrans; septumla birlikte iki hemibransa, holobrans denir. Kemikli balıklarda septumlar, ilkel formlardan gelişmişlere doğru gittikçe daha kısalma üzere, daima filamentlerden daha kısa olduklarından solungaçların tümü tek bir solungaç boşluğunda bulunur ve bu boşluk, her iki yanda birer kemik operkulumla örtülüdür. Bu balıkların çoğunda 4 çift

holobranş vardır. Her hemibranş bir seri filamentten oluşmuştur [Demir, 1992; Geldiay ve Balık, 1999]. Kemikli balıklarda her filament kemik bir destekle desteklenmiştir. Her filamentin alt ve üst her iki yüzünde, filament eksenine dikey olarak oluşmuş ve filamentin enine ikincil katları olan, çok sayıda solungaç lameli (sekonder lamella) bulunur. İki komşu filamentin birbirine bakan yüzündeki lameller, birbiri arasına girecek biçimde dizilmişlerdir. Solunum suyunun bu diziliş nedeni ile oluşan dar kanalcıklardan geçmeye zorlanması, lamellerdeki kanla solunum suyu arasında sıkı bir difüzyona olanak verir. Gaz değişimi sekonder lamellaların yüzeyinde olur. Biçimleri türlere göre çok değişiklik göstermekle birlikte az çok tepesi dışa dönük üçgen biçiminde olan lamellerin serbest kenarları, çok ince bir tabaka epitelle örtülüdür. Her lamel, ince bir bazal membranla sarılı olan ve pillar ya da pilaster hücreleri denilen destekleyici hücrelerce, kapillerlerden daha kısa ve geniş çapta olmaları nedeni ile birçok anatomistlerce kapiler yerine sinüzoit olarak adlandırılan, çok sayıda kanallara ayrılmıştır. Her lamelin kenarını çeviren bir marjinal kanal vardır. Sinüzoitlere kan, afferent brankiyal arterden her filamente giden afferent filament arteriyle gelir ve solunum suyunun akış yönünün ters yönünde akarak, efferent filament arterine geçer. Her filamentte bir de sentral sinüs vardır. Solungaçlarda gaz değişiminin yanı sıra, iyon ve su değişimi de yapılır. Sekonder lamellaların bizzat kendisi tipik bir histolojik yapı taşır. [Demir, 1992; Demirsoy, 1993]. Gerek mukus hücreleri, gerekse etkin iyon transportasyonu yapan klorür hücreleri, genellikle primer lamellanın tabanında yer alır. Klorür hücreleri detoksifikasyonda da görev almaktadır [Morrison, 2007]. Sekonder lamellalar parazit, fiziksel ya da kimyasal etkenler tarafından çabuk etkilenir ve patolojik bulgular çok kısa bir sürede oluşur [Hibiya, 1982].

2.7.2. Karaciğer

Kemikli balıklarda vücut boşluğunun ön kısmında yer alan karaciğer, karnivor balıklarda kırmızı kahverengi, herbivor balıklarda ise açık kahverengi olup genellikle iki lobludur [Geldiay ve Balık, 1999; Morrison, 2007]. Midenin üzerinde ve mideyi kısmen sararak uzanır. Safra kesesi karaciğerin içerisinde gömülü olarak bulunur. Karaciğerin her iki lobundan bir hepatik kanal (*ductus hepaticus*) çıkar ve safra

kesesinden çıkan sistik kanal (*ductus cyticus*) ile birleşerek ana safra kanalını oluşturur [Demir, 1992; Demirsoy, 1993]. Karaciğer dıştan seröz bir membran ile çevrilmiştir. Kemikli balıklarda yüksek omurgalılarından farklı olarak, merkezi vena ihtiva eden lobüler yapı görülmez. Hepatik arter ile portal vena karaciğerlere girerler ve portal vena birçok kollara ayrılarak daha sonra sinüzoitleri meydana getirir.

Sinüzoitlerin aralarında, parankimayı oluşturan karaciğer hücreleri (hepatik hücreler), hücre kordonları teşkil edecek şekilde yerleşmişlerdir. Parankim hücreleri poligonal hücreler olup yuvarlak çekirdekleri ve genellikle çekirdekçikleri vardır [Hibiya, 1982; Ferguson, 1989]. Karaciğer hücrelerinden salgılanan safra, hücrelerin aralarındaki ince kanalcıklarla toplanarak daha büyük kanallara taşınırlar ve bu kanallar safra kanallarına açılırlar. Safra kanalları ile safra ana kanalının bağlandığı bölgede hepatik arteriol de bulunur. Karaciğer sinüzoitleri endotelial hücreler ile kaplanmıştır. Makrofajlar sinüzoitlere bitişik veya hepatositlerin aralarında bulunur. Bazı kemikli balıklarda karaciğer basit ve kompakt bir organ olarak bulunurken sazan (*Cyprinus* sp.), *Sillago japonica*, *Chrysophrys major*, *Heliochoeres poecilopterus*, *Stephanolepis cirrhifer* ve *Platycephalus indicus* gibi balık türlerinde pankreatik doku portal vena kolları boyunca karaciğere sarılmış durumdadır. Hepatik ve pankreatik dokunun birleştiği bu yapı ‘hepatopankreas’ olarak adlandırılmaktadır [Hibiya, 1982; Ferguson, 1989; Roberts, 2001]. Balık karaciğerinde hepatik kan akışı, kardiyak kan akışına göre oransal olarak yavaş olduğundan toksik maddenin yarattığı hasarlara daha duyarlıdır [Metcalf, 1998]. Safra, yağları emülsiyon haline getiren safra tuzları ile kırmızı kan hücreleri ve hemoglobinin parçalanmasından oluşan bilirubin, biliverdin gibi safra pigmentlerini de içerir. Safra tuzları, yalnız yağların hidrolizine yardım etmeye değil, aynı zamanda barsaktaki sindirim özsularının, sindirim enzimlerinin iş görebilmesi için uygun alkaliniteye getirilmesine de yarar. Karaciğer safra algılama dışında, yağ, glikojen, A ve D vitaminlerini depo eder. Bu organın, kan hücrelerinin yıkımında ve kan kimyasında rolü olduğu gibi, üre ve diğer azotlu boşaltım maddelerinin oluşumu ile ilgili metabolik işlevleri vardır [Demir, 1992; Demirsoy, 1993; Geldiay ve Balık, 1999]. Balık karaciğeri ilaçları metabolize eden enzimleri içermektedir ve en çok zarar gören organlardan birisidir [Morrison, 2007].

2.7.3. Deri

Balıkların vücudu oldukça dayanıklı bir deri ile örtülüdür. Diğer omurgalılarda olduğu gibi, balıklarda da deri, birinci derecede vücudu dış etkenlere karşı koruyan bir örtü görevi görür. Ayrıca derinin solunum, boşaltım ve osmoregülasyon görevleri de vardır. Balıkların derisi, dışta epidermis (üst deri), içte dermis (alt deri) olmak üzere, iki tabakadan yapılmıştır [Morrison, 2007]. Hipodermis (derialtıdokusu), balıklarda yüksek omurgalılarınkinden farklı olarak dermisten güçlükle ayırt edilebilen ince bir tabaka halindedir. Epidermis ektodermal, dermis ve hipodermis mezodermal kökenlidir. Epidermis, tipik olarak çok incedir; kemikli balıklarda 10-30 hücre tabakasından oluşur ve ortalama kalınlığı 250 mikron dolaylarındadır. Epidermis altta stratum bazale ile onun üzerindeki stratum germinativum'dan yapılmıştır. Stratum germinativum'un hücreleri, çok yüzlü ve yüzeye doğru gittikçe yassılaştıran hücrelerdir; en yüzeydekiler zamanla ölür ve dökülürler. Stratum bazale'ye ait hücreler, genellikle silindirik, konik ya da topuz biçiminde hücrelerdir. Stratum bazale'de devamlı olarak hücre çoğalması olur. Ancak hücre çoğalması yalnızca bu tabakaya özgü olmayıp, tüm epidermiste olur. Balıklarda genellikle epidermisi tümüyle örten bir stratum korneum (keratin tabaka) bulunmaz, epidermisin yüzeyindeki hücreler canlı hücrelerdir [Demir, 1992]. Epidermiste çok sayıda bir hücreli mukus bezleri bulunur. Bu hücreler epidermisin orta tabakasından köken alırlar. Balon ya da tüp biçiminde olabilen bu bezlerin salgıladıkları mukus, başlıca çok miktarda su absorbe edebilen glikoproteinlerden ibarettir [Demirsoy, 1993; Morrison, 2007]. Epidermisle dermisi yalnızca elektron mikroskobu ile görülebilen bir bazal membran ayırır. Dermis genellikle üç tabakalıdır. En dıştaki tabaka, membrana terminans, çok incedir veya homojendir ya da ince tabakalıdır. Onun altında gevşek bir bağ dokusu tabakası olan ve çeşitli tipte hücrelerle bol miktarda kan damarları içeren stratum laksum bulunur. Dermisin en alt tabakası, kalın ve yoğun bağ dokusu lifleri içeren stratum kompaktum'dur. Bu tabakada bulunan hücre sayısı azdır [Demir, 1992]. Alt tabakayı teşkil eden dermis, daha karmaşık yapılı olup, bağ dokusu, kas fibrilleri, kan damarları ve sinirlerin yer aldığı kısımdır. Pullar ve pigment maddeleri de dermis tarafından oluşmaktadır [Geldiay ve Balık, 1999]. Gevşek bir bağ dokusundan yapılmış olan hipodermis, dermisi

altındaki kaslara bağlar. Dermiste bağdokusu hücrelerinden başka, düz kas hücreleri, pigment hücreleri, kan damarları ve sinirler bulunur. Belirtildiği gibi pulların ve deriye ait oluşumların kökeni başlıca dermistir [Demir, 1992].

2.7.4. Böbrek

Balıklarda böbrekler, vücut boşluğunun dorsalinde, periton epitelinin dışında, omurganın ve dorsal aortanın ventralinde yerleşmiş, ince-uzun, koyu kırmızı renkli bir çift organdır; genellikle birbirine yakın olup, çeşitli derecelerde kaynaşmış da olabilirler. Ergin balıklarda böbrek opistonefrozdur. Tüm balıkların embriyonik gelişmeleri sırasında işlevsel olan böbrekler pronefrozdur. Pronefroзда, segmental olarak sıralanmış tüpcükler, nefrostom (kirpikli huni)'la söloma açılırlar. Pronefroz kemikli balıkların büyük bir çoğunluğunda erginlerde de kalır. Buna baş böbrek adı verilir. Baş böbrek, her zaman mezonefroz ya da opistonefrozun önünde yer alır ve kemikli balıklarda genellikle opistonefroza bitişiktir. Baş böbrek hemopoietik, lenfoit, interrenal ve kromofin dokulardan oluşmuştur, yani her çeşit kan hücresi oluşturma ve endokrin işlevleri vardır. Gerek mezonefroz, gerekse opistonefrozun yapısal birimleri olan nefronlar, birbirine benzer olmakla birlikte, opistonefroзда, mezonefrozdakinin tersine, segmental olarak sıralanmamışlardır ve sayıları arkaya doğru gittikçe artar [Demir, 1992]. Her nefron, bir renal korpüskül (böbrek cisimciği) ile birkaç segmentten oluşan bir sarmal tüpcükten yapılmıştır. Renal korpüskül, sıkı sarılmış bir kapiler yumakçığı olan glomerulusla onu saran çift çeperli bir kapsülden, Bowman kapsülünden, oluşur [Morrison, 2007]. Kapsülün iç çeperi çok incedir, iç ve dış çeperleri arasında bir boşluk vardır. Bu boşluk, sarmal tüpcükle devam eder. Balıkların nefronlarında renal korpüskülün bulunup bulunmayışı, bulunuyorsa büyüklüğü ile sarmal tüpcüğü oluşturan segmentlerin sayı ve büyüklükleri, gruplara özellikle tatlı su ve deniz formu oluşlarına göre değişir. Kemikli balıkların tatlı suda yaşayanlarda her nefronda tipik olarak renal korpüskül ile onu izleyen sarmal tüpcükte sırasıyla dar bir boyun segmenti, iki kısımlı proksimal segment, bir ara segment, bir distal segment ve toplayıcı tüpcük bulunur. Toplayıcı tüpcükler, ayrı ayrı ya da birkaçı birleşerek, bir kanala açılırlar. Balıkların çoğunda bu kanal nefrik kanaldır. Her böbrekte glomeruluslara kan, renal arterden ayrılan afferent

arteriyollerle gelir ve efferent arteriyollerle gider. Efferent arteriyoller, renal portal venanın tüpcüklerin çevresinde oluşturduğu kapiler ağı ile birleşir. Böbreklerden çıkan kan, sonunda posteriyor kardinal venalarda toplanır. Kemikli balıkların tatlı su formlarının çoğunda da gerçek bir renal portal sistem yoktur. Bu balıklarda tüpcükleri saran kapiler ağını efferent arteriyoller oluşturur. Her nefronda, glomerulus ve bowman kapsülü, birlikte bir ultrafiltre rolü oynarlar [Demir, 1992]. Nefronların yapısı balıkların yaşadığı ortama göre oransal olarak büyük farklılıklar gösterir. Böbrek cisimcikleri (Malpigi cisimcikleri) tatlı suda yaşayanlarda orta büyüklükte, deniz balıklarında küçük ya da tamamen kaybolmuştur. Tatlı su balıklarında tubuli contorti kısa, deniz formlarında ilke olarak daha uzundur. Kemikli balıkların tümünde idrarın iletimi Wolff kanalı (birincil idrar kanalı) üzerinden olmasına karşın, idrar iletim sisteminin erkek gonad sistemi ile olan bağlantısı bakımından farklı eğilimler görülür [Demirsoy, 1993]. Afferent arteriöl duvarlarında PAS reaksiyonu ile pozitif boyanan sekresyon granüllerinin bulunduğu juktaglomerular hücreler tanımlanabilir. Renin hormonunun bu hücrelerden salındığı söylenmektedir [Hibiya, 1982]. Boyun segmenti ince ve kısadır. Proksimal toplayıcı tubul iki segmente ayrılır. Birinci segmentte fırça kenarlı kübik epitel hücreleri vardır. Yuvarlak veya oval şekilli büyük çekirdekleri olan bu hücrelerin sitoplazmalarında mitokondriler ve sekresyon granülleri bulunur. İkinci segment nefronun büyük bir bölümünü oluşturur. Kanal lümeni birinci segmentten biraz daha geniştir [Hibiya, 1982]. Ara segment, proksimal toplayıcı kanalın ikinci segmentinin özelliklerini gösterir. Distal toplayıcı segmente ait epitel hücrelerinde fırça kenar yoktur. Sitoplazmalarında kaba granüller bulunan bu hücreler eozin ile proksimal toplayıcı kanallara göre daha koyu boyanırlar [Hibiya, 1982; Morrison, 2007]. Glomeruler arteriyolde kan basıncının yüksek oluşu nedeni ile molekül ağırlığı yaklaşık olarak 70 000'e kadar olan moleküller, genellikle bir ayırım yapılmadan kandan ayrılırlar. Kan proteinleri kanda kalır. Bowman kapsülünden tüpcüklere geçen sıvı, orada yeniden değişikliğe uğrar ve glikoz, diğer besin materyali, çeşitli tuzlar, hormonlar, eser elementler ve diğer erimiş maddelerle kimi hallerde su, tüpcüklerin epitel hücrelerinin etkinliğiyle kapiler ağından yeniden kana emilirler. Filtrasyon ve geri emilim hormonlarla kontrol edilir [Demir, 1992]. Tatlısu balıklarında böbrekler tuzu muhafaza ederken, fazla suyu elimine eder, bunu da

yüksek glomerular filtrasyon oranı, proksimal (bazal) tubullerde tuzların yeniden absorbe edilmesi ve distal toplayıcı tubulde ürenin dilüsyonu ile yapar [Morrison, 2007]. Böbrekler balıkların kan yapıcı temel organıdır. Diğer omurgalılarda olmayan yalnızca kemikli balıkların renal hematopoietik dokusunda bulunan hücresel yapı melanomakrofaj merkezidir [Morrison, 2007].

2.8. Kemikli Balıklarda Kanın Yapısı

Balıklar gelişmiş organizasyonlulara göre çok az kan taşırlar. Alyuvarlar (eritrositler) kural olarak yuvarlak ya da ovaldir. Çekirdek taşırlar; yalnız birkaç Teleost balıkta çekirdek olmadığına ilişkin bilgi verilmektedir. Çapları ilke olarak kıkırdaklı balıklarının yarısı kadardır. Bu nedenle yoğunlukları (sayıları) onlarınkine göre 5-8 misli daha fazladır. Akyuvarları (lökositleri) yine ilke olarak gelişmiş organizasyonlu omurgalılardaki gibidir. Bununla beraber gelişmiş organizasyonlu omurgalılarda tipik şekilli akyuvarlar olmasına karşın, balıklarda çok defa ara formlar halinde görülürler [Demirsoy, 1993]. Balıklarda kanın hacmi, diğer omurgalılardakinden daha az olup, 2 ile 17 ml/100 g arasında değişir. Kemikli balıkların çoğunda 2-4 ml/100 g şeklindedir. Kemikli balıklar diğer balıklara kıyasla daha mükemmel bir damar sistemine sahip olmaları nedeni ile oksijen ve diğer maddelerin taşınması için daha az kana gereksinim duyarlar. Diğer omurgalılarda olduğu gibi balıklarda da kan, kan hücreleri ile plazmadan oluşur. Plazmada erimiş halde anorganik iyonlar, kan proteinleri (osmotik basıncı kontrol eden albumin, lipidleri taşıyan lipoproteinler, hemoglobin pigmentini bağlayan globulinler, bakırı bağlayan seruloplazmin, kanın pıhtılaşmasını sağlayan fibrinojen ve anorganik iyodu bağlayan iyoduroforin), glikoz, lipoitler, amino asitler, vitaminler, atılacak maddeler, erimiş gazlar, hormonlar ve enzimler bulunur. Kanın osmotik basıncı, diğer bir deyimle osmotik yoğunluğu, içerdiği anorganik iyonlar ve organik bileşiklerin miktarı ile orantılı olarak değişir. Balıkların kanında osmotik yoğunluk, başlıca sodyum ve klor miktarına, kısmen de potasyum, kalsiyum, magnezyum ve üre ile serbest aminoasitlerin miktarına göre değişir. Balıkların kan hücreleri, eritrositler, lökositler olmak üzere iki tiptir. Eritrositler genellikle nükleuslu ve yassılaşımış oval biçimde olup büyüklükleri türlere göre değişir. Kemikli balıkların çoğunda

eritrositlerin büyük çapları 12-24 mikron, küçük çapları 8,5-9,5 mikron arasında değişir. Genellikle eritrositlerin büyüklüğü ile sayısı arasında ters bir orantı vardır. Kemikli balıkların çoğunda $1-3 \times 10^6/\text{mm}^3$ eritrosit vardır ancak kimi etkin deniz balıklarında bu sayı $4-6 \times 10^6/\text{mm}^3$ eritrosite kadar çıkabilir. Eritrositlerin karakteristik kırmızı rengi, renksiz bir protein olan globin ve demir içeren sarı-kırmızı renkli bir pigment olan hemden oluşan hemoglobinden ileri gelir. Kemikli balıklarda hemoglobinin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 61 000-70 000 arasındadır ve bu balıklar için dört amino asit zincirinden oluşan tetramerik hemoglobinler karakteristiktir. Hemoglobin yoğunluğu balıklarda genellikle 100 ml'de 7-12 g'dır. Kanın oksijen taşıma kapasitesi, bir solunum pigmenti olan hemoglobinin miktarına o da eritrositlerin sayısına göre değişir. Çünkü kanın oksijen bağlama kapasitesini artıran başlıca hemoglobindir. Balıkların çoğunda kandaki oksijenin % 90'dan daha fazlası hemoglobin tarafından bağlanarak taşınır, ancak geri kalan az bir kısmı plazmada erimiş halde taşınır. Lökositlerin 1 mm^3 kandaki sayıları 20 000-150 000 arasında değişir, yani eritrositlerden daha azdır. Granülositler, lenfositler, monositler ve trombositler olmak üzere dört çeşit lökosit vardır. Tüm lökositlerin % 4-40'ını oluşturan granülositlerin çapları 10 mikron civarındadır. Granülositler, içerdikleri granüllerin boyanma yeteneğine göre nötrofil, asidofil (eozinofil) ve bazofil olmak üzere, başlıca üç tiptedir. Bunlardan bazofiller balıklarda ender olarak bulunurlar. Balıklarda sayıca en fazla bulunanlar nötrofillerdir. Granülositler genelde fagositik olup, hastalıklarla savaşta rol oynarlar ve balık bakterilerle enfekte olduğunda, sayılarında artma olabilir. Büyüklükleri 4,5-12 mikron arasında değişen lenfositlerin birincil işlevi, antikor oluşturarak hücrel bağışıklık sağlamaktır; fakat bu hücrelerin fagositik etkinlikleri de olduğuna ilişkin kanıtlar da vardır. Sayıca az olan monositler, makrofaj rolü oynarlar. Balıklarda lökositlerin yaklaşık yarısını oluşturan trombositler, az çok iğ biçiminde olup, kanın pıhtılaşmasında rol oynarlar. Balıkların lenf sistemi içinde eritrositler genellikle bulunmazlar, bununla birlikte daha yüksek omurgalılarınkine oranla daha sık olarak eritrositlere rastlanır. Çeneli balıklarda farklılaşmış ve mide yakınında yer alan bir dalak vardır. Bu, dışta kırmızı renkli korteks kısmıyla, içte beyaz renkli medulla kısmından oluşmuştur. Genellikle eritrositler ve trombositler dalağın kortikal kısmında, lenfositler ve kimi granülositler medullar kısmında oluşturulur. Fakat balıkların çoğunda eritrositler, en fazla

böbreklerde, özellikle baş böbreklerde oluşturulur. Lökositlerse kemikli balıkların çoğunda böbreklerde oluşturulur [Demir, 1992].

3. MATERİYAL VE METOD

3.1. Deney Materyali

Bu çalışmada, daha önce hiçbir enfeksiyon geçirmemiş ve herhangi bir toksik maddeye maruz kalmamış olan sağlıklı görünümlü, sazan balığı (*Cyprinus carpio* L. 1758) fingerlingleri ($50,90 \pm 11,01$ g ağırlığında ve $15,26 \pm 0,99$ cm boylarında) kullanılmıştır. Pestisit ve diğer çevresel kirleticiler hedef olmayan canlılara toksisite göstermekte; bunlardan da en fazla erken gelişme dönemleri (larva, juvenil, fingerling gibi) etkilenmektedir. Kullanılan sazanlar (*Cyprinus carpio* L. 1758) Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Akdeniz Su Ürünleri Araştırma Enstitüsünden temin edilmiştir. Birbirine yakın boy ve ağırlıkta olan balıklar tercih edilmiştir.

3.2. Pestisit Materyali

Denemede uygulanan toksik madde doğadaki kalıcılıkları yüksek olan, canlı organizmalarda özellikle yağlı dokularda birikim yapan, kanserojenik, mutajenik ve teratojenik etkileri bulunan chlorpyrifos-ethyl'dir. Teknik chlorpyrifos-ethyl (% 99,8) kullanılmıştır. Deneylerde formülasyon yerine teknik materyal tercih edilmesinin sebebi formülasyonlarda terkinin çoğunu aktif madde haricinde stabilizatörler, sinerjistler vb. maddelerin oluşturmastır. Chlorpyrifos-ethyl analitik saflıkta asetonda çözülerek uygulanmıştır. Deneyde kullanılan subletal konsantrasyon balık sayısını azaltmak ve akut toksisite deneylerini tekrarlamamak için Spague [1971]'in bildirdiği üzere 96 saatlik LC_{50} değerinin 1/10'u olarak tespit edilmiştir [Halappa and David, 2009].

3.3. Araştırmada Kullanılan Diğer Araç ve Gereçler

a. Teraziler

Kimyasal maddelerin tartılmasında 0.001 g'a, balıkların tartılmasında ise 0.01 g'a duyarlı teraziler kullanılmıştır.

b. Oksijenmetre

Deney süresince ortam suyunun çözülmüş oksijen, sıcaklık, iletkenlik ve pH değerlerini ölçmede taşınabilir oksijenmetre (YSI marka) kullanılmıştır.

c. Spektrofotometre

Deneylerde su analizlerinin kolorimetrik ölçümlerinde Shimadzu UV-1201V marka spektrofotometre kullanılmıştır.

d. Mikrotom

Parafin bloklardan doku kesitlerinin alınmasında Thermoshandon 325 mikrotom kullanılmıştır.

e. Mikroskop

-Dokuların histolojik kesitlerinin incelenmesi ve görüntülenmesinde Nikon ve Leica marka fotoğraf çekimi yapabilen mikroskoplar kullanılmıştır.

-Eritrosit hücrelerinde mikronükleusların sayımında ise Leica DM 3000 marka fotoğraf çekimi yapabilen ışık mikroskobu kullanılmıştır.

f. Termostatlı ısıtıcılar

Deneyler süresince deney suyu sıcaklığı 100 Wattlık sera marka termostatlı ısıtıcılar ile sabit tutulmuştur.

g. Gaz kromatografi cihazı

-Gaz Kromatografisi: Agilent 6890N serisi gaz kromatografisi

Dedektör: Elektron Yakalayıcı Dedektör (μ ECD), 63Ni

-Gaz Kromatografisi: Agilent 6890 serisi gaz kromatografisi

Dedektör: Kütle seçici dedektör (MSD), Agilent 5973

h. Diğer materyaller

- Balıkların uzunluk ölçümlerinin alınmasında ölçüm tahtası
- Nekropside balık dokularından örnek almak amacıyla steril 12 cm'lik cerrahi makaslar ve 10 cm'lik pensler
- Balıkların tespit edilmesi ve doku takibinde kullanılan etil alkolün derecelerinin ayarlanmasında alkolmetre kullanılmıştır.

3.4. Metod

3.4.1. Deney ortamı ve adaptasyon süresi

Balık örnekleri deneylere başlamadan bir ay önce alınarak stok akvaryumlarında adaptasyon süresine tabi tutulmuşlardır. Sazanlar içerisinde yeterince hava bulunan plastik torbalarda, deney ortamına getirilmişlerdir. Stok akvaryumu (100 L) olarak kullanılan akvaryuma torbası ile bırakılan balıklar, su sıcaklığı ve ortama alışmaları için 30-35 dakika naylon torba içinde akvaryum suyunda bırakılmış, sonra torbanın ağzı kesilerek açılmak suretiyle, balıkların akvaryum suyuna geçmeleri sağlanmıştır.

Deneylerde içerisinde yaklaşık 25 L hacimli akvaryumlar kullanılmıştır. Akvaryumlarda 48 saat önceden dinlendirilerek kloru giderilmiş çeşme suyu kullanılmıştır. Akvaryumlar sürekli hava motorları yardımıyla havalandırılmış ve termostatlı ısıtıcılar vasıtasıyla su sıcaklığı $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de sabit tutulmuştur. Balıkların deney ortamına adaptasyonunun sağlanması için deney başlamadan 15 gün önce stok akvaryumundan alınarak deney ortamlarına yerleştirilmişlerdir. Deneyin başlama tarihinden önceki dört gün içinde balıklarda görülen ölüm oranının % 5'den fazla olmamasına dikkat edilmiştir [APHA, 1975; Reish and Oshida, 1987]. Adaptasyon süresi esnasında balıklar günde vücut ağırlıklarının % 2'si oranında uygun yemle beslenmişlerdir. Balıkların boy ve ağırlıkları hassas terazi vasıtasıyla tartılarak, deney akvaryumlarına rastgele stoklanmıştır (5 balık/akvaryum). Dozlanmadan önce

akvaryumların su kalitesi parametreleri ölçülmüştür. Dozlamadan önce ve deney süresince davranış değişiklikleri takip edilmiştir. Fotoperiyot 12:12 h olarak ayarlanmıştır. Akvaryumlarda her gün su sıcaklığı, pH, çözünmüş oksijen ve elektrik iletkenliği ölçülmüştür. Balıklar yemlendikten iki saat sonra sifonlama yöntemi ile metabolizma artıkları ortamdaki uzaklaştırılmış ve taze su eklenmiştir. Dozlamadan önce 48 saat ve deney süresince balıklar aç bırakılmıştır. Ayrıca deneylerde kullanılan su örneklerinden toplam sertlik, kalsiyum, alkalinite, toplam amonyak azotu, nitrit azotu ve chlorpyrifos-ethyl analizleri de yapılmıştır.

3.4.2. Deneyin gerçekleştirilmesi

Tüm biyodeneyleler APHA, OECD, TSE, ISO ve FAO'nun yöntemlerine göre yapılmıştır [APHA, 1971, 2005; OECD, 1981; TSE, 1988; FAO, 1977; 1982; 1987; ISO, 1996]. Deneyin yapıldığı şekil ve şartlarla birlikte yürütülen üç farklı kontrol grubu kullanılmıştır. Birinci kontrol grubuna kullanılan maksimum aseton miktarı olan 80 µL eklenmiş, ikinci kontrol grubuna ise hiçbir kimyasal madde katılmamıştır [TSE, 1988]. Üçüncü kontrol grubu olarak pozitif kontrol grubundaki balıklar ise 5 mg/L etil metan sulfonat (EMS)'e maruz bırakılmıştır [Çavaş and Könen, 2008]. Chlorpyrifos-ethyl, aseton ve EMS akvaryumlara otomatik pipetler yardımıyla verilmiş ve cam bagetlerle karıştırılarak suda dağılması sağlanmıştır. Chlorpyrifos-ethyl'in 96 saatlik LC₅₀ değeri 0,160 mg/L dir [Halappa and David, 2009]. Subletal konsantrasyon olarak akut değerin 1/10'u olan 16 µg/L seçilmiştir [Spague, 1971]. Denemede toplam 13 akvaryum kullanılmıştır. Gruplar kontrol, 24, 48, 96 saat ve 7 gün boyunca asetona maruz bırakılan gruplar, 24, 48, 96 saat ve 7 gün boyunca EMS'e maruz bırakılan gruplar ve 24, 48, 96 saat ve 7 gün boyunca chlorpyrifos-ethyl'e maruz bırakılan gruplar olarak belirlenmiştir. Deney dozlamadan itibaren 24, 48, 96 ve 168 saat (7 gün) devam etmiştir. Bu deneylerde yarı statik yöntem kullanılarak deney ortamı 48 saatte bir yenilenmiştir. Deney ortamına ilişkin resimler Resim 3.1. ve 3.2.'de verilmiştir.



Resim 3.1. Dozlamanın gerçekleştirilmesi



Resim 3.2. Deney ortamı ve stok akvaryumu

3.4.3. Balıklardan kan alımı

Sazan eritrositlerinde, subletal chlorpyrifos-ethyl'in genotoksik etkilerini incelemek amacıyla 24, 48, 96 ve 168 saatlik (7 gün) maruziyet sonunda kan örnekleri alınmıştır. Sazan balıklarından kan örnekleri, (ortalama 0,5 ml) kalpten punksiyonla alınmıştır. Kan alımı öncesi buz anestezisi uygulanmıştır. Bu amaçla sol taraf üzerine yatırılan balığın solungaç kapağı kaldırıldıktan sonra kleithrum kemiğinin oluşturduğu pektoral kemerin hemen önünden alt üçte bir mesafeden önceden heparinize edilen 5 ml'lik enjektör yardımıyla 40-45 derecelik bir açı yapacak şekilde kalbe girilerek kan çekilmiştir [Siwicki and Anderson, 1993; Yıldız, 1997]. Kanın pıhtılaşmasını önlemek için antikoagülant olarak ticari adı Nevparin olan heparin kullanılmıştır. Kan çekilecek enjektörün duvarları ticari heparin solüsyonu ile sıvanarak heparinize edilmiştir [Amlacher, 1981; Yıldız, 1997]. Kan örnekleri deneme sonunda alınmıştır ve kan alımında, her akvaryum için 5 balık örneği kullanılmıştır. Alınan kan örnekleri mikronükleus testi için kullanılmıştır. Balıklardan kan alımına ilişkin resim Resim 3.3.'de verilmiştir.



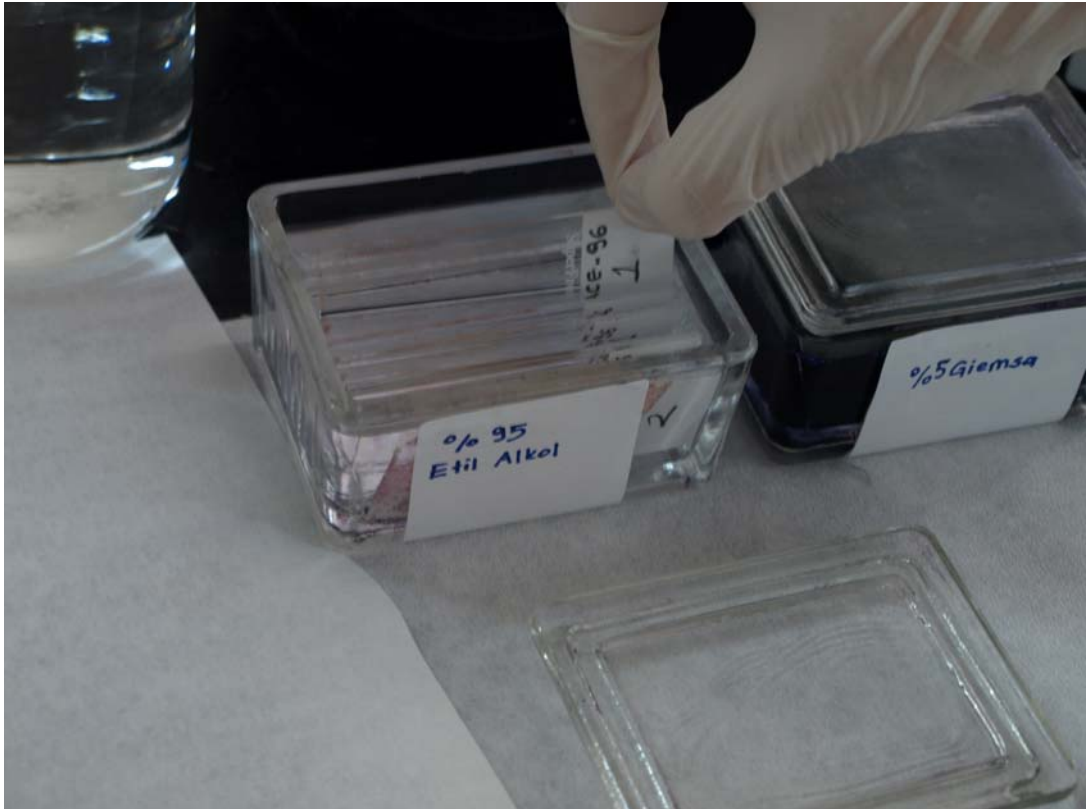
Resim 3.3. Balıklardan kalpten kan alımı

3.4.4. Mikronükleus testi

Mikronükleus analizleri periferel eritrositlerde gerçekleştirilmiştir. Periferel kan örnekleri önceden temizlenmiş lamaların üzerine yayılarak açık havada kurutulmuştur. % 95'lik etanolde 20 dakika boyunca fiksasyondan sonra, kan örnekleri tekrar açık havada kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra örnekler % 5'lik Giemsa solüsyonu (pH 6.8 olan Sorrensen tamponunda hazırlanır) ile 20 dakika boyunca boyanmıştır. Boyama işleminden sonra preparatlar saf sudan geçirilerek fazla boyanın atılması sağlanmıştır. Her bir balık için kan örneklerinden üç adet lam hazırlanmış ve 100X büyütmede her bir örnekten 1000 hücre sayılmıştır. Her akvaryumdan 5 adet balık alınmış ve her balıktan da üç adet paralelli çalışılmıştır. Eritrositlerde mikronükleusların sayımında Leica DM 3000 marka ışık mikroskobu kullanılmıştır. Asıl nükleus ile aynı sabitleme ve fokus yapısına sahip küçük, refraktif olmayan, sirküler veya ovoid kromatin yapılar, mikronüklei olarak değerlendirilmiştir [Al-Sabti and Metcalfe, 1995]. Mikronükleus frekansı 1000 hücre başına ifade edilmiştir (‰). Hazırlanan preparatlarda zaman zaman boya partikülleri ve/veya diğer bazı kirlenmeler nedeni ile mikronükleus ile karıştırılabilen yapılarla karşılaşılabilir. Bu tip hataların elimine edilmesi için mikronükleus sayımlarında genel olarak standardize edilmiş olan kriterler göz önüne alınmıştır. Preparatların hazırlanması ile alkol ve Giemsa solusyonu ile muameleye ilişkin resimler Resim 3.4. ve 3.5.'de verilmiştir.



Resim 3.4. Periferel eritrositlerden sürme preparatların hazırlanması



Resim 3.5. Preparatların alkol ve Giemsa solusyonu ile muamelesi

3.4.5. Morfolojik nükleus düzensizlik analizi

Morfolojik nükleus düzensizlikleri periferik kan eritrositlerinde değerlendirilmiştir. Kalpten punksiyonla elde edilen kan, temiz preparatlara yayıldıktan sonra havada kurutulmuş ve bunu müteakiben % 95'lik etanolde 20 dakika fiske edilmiştir. Hazırlanan yayma preparatlar daha sonra % 5'lik Giemsa çözeltisinde 20 dakika boyanmışlardır.

Morfolojik nükleus düzensizlikleri [Çavaş and Ergene-Gözükara, 2003a; Çavaş and Ergene-Gözükara, 2005b; Çavaş and Ergene-Gözükara, 2005c; Ergene et al., 2007a] çentikli nükleus, tomurcuklu nükleus, loblu nükleus ve binükleus olmak üzere başlıca dört grup altında toplanarak değerlendirilmiştir. Değerlendirmeler için her preparattan 1000 hücre sayılmıştır. Morfolojik düzensizliklere ilişkin tanımlar şu şekilde belirtilmiştir:

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

Bu tanımlar dikkate alınarak eritrosit hücrelerindeki morfolojik düzensizlikler tanımlanmıştır. Bu anomaliler balık periferik kan yaymalarından hazırlanan preparatlarda normal ve mikronükleuslu çekirdek yapısına sahip eritrositler yanında kendiliğinden bulunabilen ve genotoksik etki sonucunda frekansları arttığı gözlenen nükleus anomalileridir.

Mikronükleus testi OECD kimyasal test rehberinde yer almaktadır ve testin geçerliliği ECVAM tarafından da kabul edilmiştir [Anonymous 4, 5].

3.4.6. Balıkların histopatolojik olarak incelenmesi

Sazan dokuları üzerine chlorpyrifos-ethyl'in etkilerinin incelenmesi amacıyla kan alımı sonrasında balıklara dekapitasyon yöntemi ile ötenazi yapılmıştır. Öldürülen balıklar disekte edilerek toksik maddelerin en çok etkilediği hedef organlar olan solungaç, hepatopankreas ve böbrek dokuları histolojik inceleme için tespit edilmiştir. Tespitte Bouin's tespit (pikrik asit, formalin, glacial asetik asit) solüsyonu kullanılmıştır (EK-1). 24 saat sonra dokular % 70'lik etil alkole aktarılmıştır [Elçin vd. 2010a, b; Roberts, 2001].

a. Doku takibi ve sabit preparat haline getirilmesi

Tespit edilen dokular, 2-3 mm kalınlığında kesilerek doku takip kasetlerine yerleştirilmiştir. Daha sonra ikişer saat kaldıkları % 70, 80, 90, 96 ve absölüt etil alkol ve ksilol serilerinden geçirilmiştir. 56-58°C'de ksilollü parafin ve parafinde ikişer saat bekletilme sonunda gömülmüşlerdir. Dehidratasyon işlemlerinin tüm aşamaları Leica marka doku takip cihazında yapılmıştır. Gömmek üzere özel kalıplar içerisine eritilen parafin doldurularak doku parçaları yerleştirilmiş ve dokular parafin bloklara alınmıştır. Parafin içine gömülmüş bloklar kullanılıncaya kadar buzdolabında bekletilmiştir. Daha sonra parafin içine gömülü dokular rotary mikrotom (Thermo Shandon, Finnesse 325, ABD) yardımıyla 5-6 mikron kalınlığında kesilerek, su banyosunda lam üzerine yerleştirilmiş ve yaklaşık 56°C'lik etüvde kurumaya bırakılmıştır. Lam üzerindeki doku kesitleri Harris'in Hematoksilen-Eosin (EK-1) boyama yöntemine göre sırasıyla ksilol-1, ksilol-2, absölüt alkol-1, absölüt alkol-2'de 5'er dakika bekleyerek, sonra yine sırası ile % 96 alkol, % 80 alkol, % 70 alkol, distile su-1, distile su-2'de 2'er dakika bekleyerek ve daha sonra hematoksilende 4 dakika boyanarak, distile su, çeşme suyu ve tekrar distile su işlemlerinden sonra eosinde 2 dakika bekletilip, daha sonra distile su, çeşme suyundan geçirilmiş ve tekrar absölüt alkollerde 5'er dakika, ksilollerde 5'er dakika bekletilmiş ve Canada balsamı ile yapıştırılarak [Luna, 1968; Mumford, 2004], sabit preparat haline getirilmiştir [Elçin vd. 2010a, b]. Dokuların parafin blokların içerisine gömülmesine ilişkin resim Resim 3.6.'da verilmiştir.

b. Preparatların incelenmesi

Daha sonra sabit preparat haline getirilmiş ve boyanmış dokular ışık mikroskop altında incelenmiştir. Mikroskopik incelemede fotoğraf kamerası adapte edilmiş Leica marka mikroskop kullanılmıştır. Balık örneklerinde doku takiplerinin gerçekleştirilmesinde, preparatların incelenmesi ve değerlendirilmesinde Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nın olanaklarından yararlanılmıştır.



Resim 3.6. Dokuların parafin blokların içersine gömülmesi

3.4.7. Suda chlorpyrifos-ethyl analizi

a. Ekstraksiyon

Alınan su örnekleri EPA [1999]'a göre aşağıdaki şekilde analiz edilmiştir:

Ekstraksiyon: Bu basamakta ayırma hunisinde sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır. İlk olarak 1 L örnek 2 L'lik ayırma hunisine boşaltılmıştır. Örneğin bulunduğu şişe 2 defa 5'er ml'lik saf su ile yıkandıktan sonra yıkama suları ayırma hunisine boşaltılmış ve boş örnek sisesine 60 ml diklorometan ilave edilerek, şişe 60 saniye çalkalanmıştır. Daha sonra çözücü ayırma hunisine boşaltılmış ve ayırma hunisi 2 dakika çalkalanarak örneğin ekstrakte edilmesi sağlanmıştır ve 10 dakika beklenerek organik tabakanın sulu tabakadan ayrılması sağlanmıştır. Emülsiyon oluşmaması gerekmektedir. Emülsiyon oluştuğu durumda ise ve oluşan emülsiyon çözücü tabakasının hacminin 1/3'lük kısmından daha fazla bir hacme sahip olduğunda faz ayrımının gerçekleştirilebilmesi için mekanik teknikler uygulanmıştır. Daha sonra diklorometan ekstraktı; çözücü ile yıkanmış ve temiz külsüz filtre kağıdı üzerine yerleştirilmiş granüler susuz sodyum sülfat içeren huniden drene edilerek yine çözücü ile yıkanmış 500 ml'lik konsantrasyon balonuna alınmıştır. Su örneği iki defa daha 60'ar ml diklorometan ile ekstrakte edilerek ve her bir kısım sodyum sülfattan geçirilerek konsantrasyon balonuna alınmıştır. Üçüncü ekstraksiyondan sonra; ayırma hunisi 20 ml diklorometan ile yıkanmış ve sodyum sülfattan drene edilerek yine konsantrasyon balonuna alınmış ve bu işlem iki defa daha tekrar edilmiştir. Elde edilen ekstraktlar, şeffaf bir renge sahip olduğundan makro-ekstraksiyon yöntemlerinden biri olan döner-buharlaştırıcı kullanılarak konsantrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Deriştirme aşamasında ise döner buharlaştırıcının su banyosunun sıcaklığı 45°C olacak şekilde ayarlanmıştır. Konsantrasyon işlemi 15-20 dakikada tamamlanmış ve ekstraktın kaynamasına ve tamamen kurumasına izin verilmemiştir.

Örnekler en son olarak asetonitrilde çözdürülerek cihaza verildiğinden solvent değişimi yapılmış dolayısıyla ekstraktın bulunduğu 500 ml'lik balona iki defa 15 er ml asetonitril ilave edilerek döner buharlaştırıcıda konsantre edilmiş daha sonra 15

ml asetonitril ilave edilerek yine döner buharlaştırıcıda tamamen kurumasına izin verilmeden deriştirme işlemi yapılmıştır en son olarak ekstrakt 1 ml asetonitrilde çözdürülmüştür.

b. Gaz kromatografide ölçüm

Elde edilen ekstrakt gaz kromatografisi elektron yakalayıcı (GC-ECD) ve kütle spektrometresi (GC/MSD) cihazlarına enjekte edilmiştir. GC-MSD doğrulama için kullanılmıştır. Cihazlara ilişkin koşullar Çizelge 3.1. ve 3.2.'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. GC operasyon koşulları

Kolon	HP-5MS (30mx0,25mmx0,25µm)ECD
Fırın programı	ECD 60 ° C 0 dak 15 ° C/dak 100 ° C 5 ° C/dak 200 ° C 3 ° C/dak 270 ° C 10 dak
Enjeksiyon	Splitless (ECD) 250 ° C 1 µL Purge flow: 50 ml/dak Purge time: 1 ml/dak Total flow: 54,1 ml/dak
Dedektör Sıcaklığı	ECD-300 ° C

Çizelge 3.2. GC-MSD operasyon koşulları

Kolon	HP-5MS (30mx0,25mmx0,25µm)
Fırın programı	70 ° C 2 dak ° C 25 ° C/dak 150 ° C 3° C/dak 200 ° C 8° C/dak 280 ° C 10 dak
Dedektör sıcaklığı	280 ° C
Enjeksiyon	Splitless 250 ° C 1µL

c. Hesaplama

Chlorpyrifos-ethyl'in kalıntı miktarı suda ng/ml olarak ifade edilmiştir.

Hesaplamalarda aşağıdaki eşitliklerden yararlanılmıştır:

a. Test çözeltisindeki kalıntı konsantrasyonunun hesaplanması

$$C_t = \frac{C_s \cdot A_t}{A_s} \quad \text{veya} \quad C_t = \frac{A_t - b}{a}$$

Burada;

C_t : Test çözeltisindeki kalıntının konsantrasyonu, ng/ml

C_s : Standart çözeltinin konsantrasyonu, ng/ml

A_t : Test çözeltisi içindeki kalıntının pik alanı,

A_s : Standart çözeltinin pik alanı,

a : Standart eğrinin eğimi,

b : Kalibrasyon eğrisinin y-eksenini kestiği nokta

b. Sudaki kalıntı miktarının hesaplanması

$$\text{Kalıntı (ppb)} = \frac{C_t}{v}$$

Burada;

C_t : Test çözeltisindeki kalıntının konsantrasyonu, ng/ml

v : Test çözeltisinin temsil ettiği örnek miktarı, ml

3.5. Akvaryumlar ve Su Kalitesi

Deneyde en az 48 saat dinlendirilmiş ve daha sonra havalandırılarak kloru giderilmiş şehir suyu kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan suyun parametreleri günlük olarak YSI marka portatif, arazi tipi multimetre kullanılarak ölçülmüştür. Amonyak konsantrasyonları Nessler reaktifi kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Toplam amonyak azotu miktarlarının ölçümü, Nesslerizasyon metodu kullanılarak [APHA, 1975] spektrofotometrede (Shimadzu UV-1201V) 410 nm dalga boyunda yapılmıştır. Deneyde kullanılan akvaryum suyunun su kalitesi değerleri Çizelge 3.3.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. Araştırmada kullanılan suyun kalite değerleri

Parametre	Ort.±St.hata
Sıcaklık (°C)	23.33±0.10
Oksijen (mg/L)	4.25±0.07
İletkenlik (µg/siemens)	209.12±0.72
pH	7.07±0.05
Toplam sertlik (CaCO ₃ , mg/L)	73,38±0,84
Kalsiyum (mg/L)	51,69±0,73
Alkalinite (CaCO ₃ , mg/L)	73,92±0,62
Toplam amonyak azotu (TA-N, mg/L)	0,10±0,00
Nitrit azotu (NO ₂ -N, mg/L)	0,01±0,00

3.6. İstatistiksel Analizler

Mikronükleus testi sonucunda bazı balıklardan sağlıklı sonuç elde edilememesi nedeni ile örnek sayısının azalmasından dolayı veriler; SPSS 11,5 paket programında Kruskall Wallis ve Mann-Whitney U non-parametrik testleri kullanılarak, 0,05 önem seviyesinde analiz edilmiştir [Bolognesi and Degan, 2001; Kumar et al., 2010].

4. BULGULAR

Bu araştırmada sucul ekosistemin indikatör organizması olan balıklara yüksek toksisite gösterdiği bilinen chlorpyrifos-ethyl kullanılmıştır. Araştırmanın hipotezi akut LC₅₀ değerin 1/10'u olan subletal doz seviyesinde (16 µg/L) teknik chlorpyrifos-ethyl'e, çevresel kirleticilere ergin balıklardan daha hassas olduğu bilinen sazan fingerlingleri, maruz bırakıldıklarında son-nokta olarak mortalite (ölüm) görülmeden ve davranış değışiklikleri olmadan genotoksik ve histopatolojik etkiler görülebilir mi? olarak kurulmuştur. Bu amaçla laboratuvar şartlarında sazan fingerlingleri 15 gün adaptasyon süresinin sonunda 16 µg/L konsantrasyonda teknik chlorpyrifos-ethyl'e 24, 48, 96 saat ve 7 gün boyunca maruz bırakılarak bu günlerin sonunda nekropsileri yapılmış; kan ve doku örnekleri alınarak analiz edilip değerlendirilmiştir.

Chlorpyrifos-ethyl'e 24, 48, 96 saat ve 7 gün süresince maruz kalan balıklarda morfolojik olarak ve davranışlar açısından kontrol grubuna kıyasla, herhangi bir farklılık gözlenmemiştir.

Suda chlorpyrifos-ethyl analizinin sonucu 14,4 µg/L olarak bulunmuş olup, elde edilen bu değ er sudan chlorpyrifos-ethyl'in ekstraksiyonu ve gaz kromatografi cihazında enjeksiyon esnasındaki kayıplarda göz önünde bulundurulduğ unda çalışmada uygulanan subletal doz olan 16 µg/L değ eri ile uyumlu bulunmuştur.

4.1. Nükleus Anomalileri ve Mikronükleus Sonuçları

Chlorpyrifos-ethyl'e ilişkin subletal doz olarak belirlenmiş olan 16 µg/L konsantrasyona 24 saat, 48 saat, 96 saat ve 7 gün boyunca maruz bırakılan sazan fingerlinglerinden elde edilen periferik kan örneklerinin eritrositlerinde tespit edilen nükleus anomalilerine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Çizelge 4.1.'de benzer şekilde kontrol (hiç bir muameleye maruz bırakılmamış), aseton kontrolleri (24 saat, 48 saat, 96 saat ve 7 gün boyunca, chlorpyrifos-ethyl maddesinin çözücüsü olan asetona, uygulama grupları ile aynı konsantrasyonda maruz bırakılan gruplar) ve

pozitif yani EMS kontrollere (24 saat, 48 saat, 96 saat ve 7 gün boyunca genotoksik etki yaptığı bilinen EMS (5 mg/L) maddesine maruz bırakılan gruplar) ilişkin sonuçlar da mevcuttur. Resim 4.1. ve 4.2.'de nükleus anomalilerinden binükleus ve mikronükleus'a ilişkin örnekler verilmiştir.

Çentikli nükleus, tomurcuklu nükleus, loblu nükleus, binükleus ve mikronükleus açısından gruplar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde varyansların homojenliği sağlanamadığı için non-parametrik testler uygulanmıştır. Dolayısıyla istatistiksel karşılaştırmalarda parantez içerisinde belirtilen ortanca değerler dikkate alınmıştır. 48 saat boyunca asetona maruz bırakılan gruptaki balıklardan elde edilen kanlardan sağlıklı sonuç elde edilemediği için değerlendirmeye alınmamıştır. Her akvaryumdan 5 adet balık alınmış ve her balıktan da üç adet paralelli çalışılarak (üç adet lam hazırlanmıştır), 100X büyütmede her bir örnekten 1000 hücre sayılmıştır. Ancak uygulama sonucunda sağlıklı veri elde edilemeyen örnek ve preparatlar kullanılamadığı için bazı gruplarda örnek sayıları daha az olmuştur. Kontrol grubunda diğer gruplara kıyasla daha fazla sayıda balık (n=14) ile çalışılmıştır. 96 saat boyunca chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan grupta 10 adet balık kullanılmasının nedeni mevcut çalışmaya ilaveten, bu gruptan elde edilen kan örneklerinde ilave bir çalışma olarak hematolojik ve biyokimyasal analizlerinde gerçekleştirilmiş olmasıdır.

Gruplar çentikli nükleus açısından değerlendirildiğinde kontrol grubundan elde edilen frekans 48 saat, 96 saat ve 7 gün boyunca chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan gruplardan elde edilen frekanslardan farklı bulunurken ($P<0,05$), diğer gruplarla benzer bulunmuştur ($P>0,05$). En yüksek frekans 0,66 değeri ile 7 gün boyunca chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan gruptan elde edilse de bu sonuç asetona maruz kalan gruplarla karşılaştırıldığında istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur ($P>0,05$). Chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalma süresi arttıkça çentikli nükleus görülme sıklığı artmıştır ancak istatistiksel olarak gruplar arasında farklılık görülmemiştir ($P>0,05$).

Gruplar tomurcuklu nükleus açısından değerlendirildiğinde kontrol grubundan elde edilen frekans 24 saat, 48 saat, 96 saat ve 7 gün boyunca chlorpyrifos-ethyl'e maruz

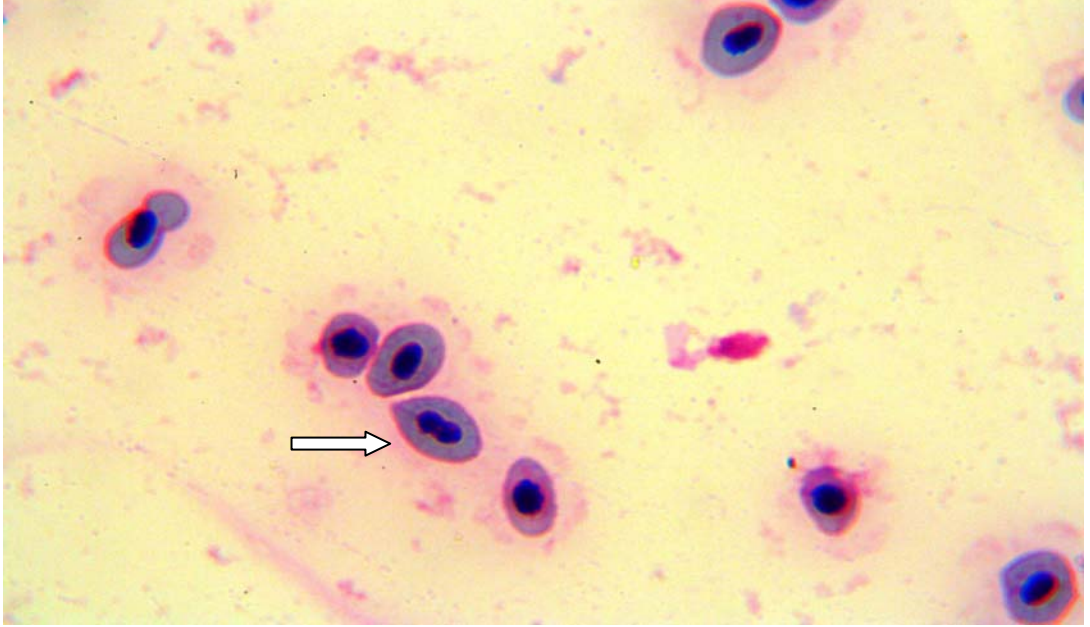
kalan gruplardan elde edilen frekanslardan farklı olarak bulunurken ($P<0,05$), diğer gruplarla benzer bulunmuştur ($P>0,05$). En yüksek frekans 96 saat ve 7 gün boyunca chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan gruplardan elde edilirken, bu gruplardan elde edilen değerler, chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan diğer gruplar ve 7 gün boyunca asetona maruz kalan grup ile 24 saat boyunca EMS'e maruz kalan grupla benzer bulunmuştur ($P>0,05$). Genel olarak chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalma süresi arttıkça tomurcuklu nükleus görülme sıklığı artmıştır ancak istatistiksel olarak gruplar arasında farklılık görülmemiştir ($P>0,05$).

Gruplar loblu nükleus açısından değerlendirildiğinde ise bütün gruplardan elde edilen frekans değerleri kendi aralarında benzer bulunmuş ($P>0,05$), olup elde edilen değerler arasındaki farklılıkların bireyler arasındaki farklılıklardan kaynaklanabileceği yorumuna varılmıştır.

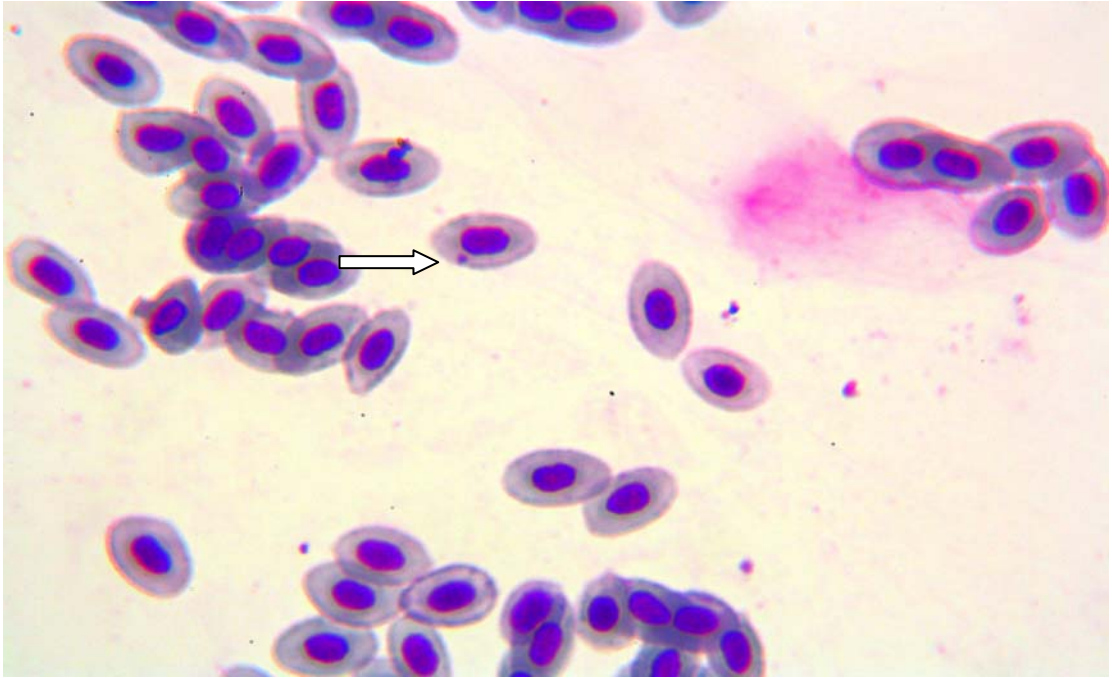
Gruplar binükleus açısından değerlendirildiğinde kontrol grubundan elde edilen frekans 96 saat ve 7 gün boyunca chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan gruplardan elde edilen frekanslardan farklı olarak bulunurken ($P<0,05$), diğer gruplarla benzer bulunmuştur ($P>0,05$). Chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan gruplardan elde edilen değerler kendi aralarında da benzerlik göstermektedir ($P>0,05$).

Gruplar mikronükleus açısından değerlendirildiğinde ise kontrol grubundan elde edilen frekans 24 saat ve 7 gün boyunca EMS'e maruz kalan gruplardan ve 24 saat, 48 saat, 96 saat ve 7 gün boyunca chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan gruplardan elde edilen frekanslardan farklı olarak bulunurken ($P<0,05$), diğer gruplarla benzer bulunmuştur ($P>0,05$). En düşük frekans değeri kontrol grubundan elde edilirken, en yüksek frekans ise 2,66 değeri ile 7 gün boyunca chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan gruptan elde edilmiş olup, bu gruptan elde edilen frekans değeri diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatistiki yönden farklı olarak bulunmuştur ($P<0,05$). Chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalma süresi uzadıkça mikronükleus görülme sıklığı da artmıştır. 24 saat, 48 saat ve 96 saat boyunca chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan gruplardan elde edilen değerler kendi aralarında benzerlik gösterirken ($P>0,05$), elde edilen değerler benzer şekilde 24 saat, 48 saat, 96 saat ve 7 gün boyunca EMS'e

maruz kalan gruplardan elde edilen değerler ile de benzerlik göstermektedir ($P>0,05$).



Resim 4.1. Eritrositlerde görülen nükleus anomalisi, binükleus



Resim 4.2. Eritrositlerde gözlemlenen mikronükleus oluşumu

Çizelge 4.1. Asetona, EMS'e (5 mg/L), subletal dozda (16 µg/L) CE'e maruz kalan ve kontrol grubu sazan fingerlinglerinin eritrositlerinde nükleus anomalileri ve mikronükleus sonuçları, ‰ ortalama ± st. hata (ortanca değer)

Deneme grupları	Çentikli nükleus	Tomurcuklu nükleus	Loblu nükleus	Binükleus	Mikronükleus
Kontrol n=14	0,10±0,05 a (0,00)	0,07±0,07 a (0,00)	0,14±0,05 a (0,00)	0,14±0,08 a (0,00)	0,41±0,11 a (0,42)
ASEK24saat n=5	0,20±0,20 abc (0,00)	0,20±0,20 ab (0,00)	0,40±0,24 a (0,00)	0,80±0,37 ab (1,00)	0,60±0,24 ab (1,00)
ASEK48saat n=0	*	*	*	*	*
ASEK96saat n=3	0,33±0,19 abc (0,33)	0,00±0,00 a (0,00)	0,00±0,00 a (0,00)	0,11±0,11 a (0,00)	0,72±0,15 ab (0,66)
ASEK7gün n=3	1,07±0,97 abc (0,20)	0,22±0,22 abc (0,00)	0,11±0,11 a (0,00)	0,35±0,19 ab (0,40)	1,09±0,54 ac (1,60)
EMSK24saat n=4	0,00±0,00 a (0,00)	0,31±0,12 bc (0,38)	0,04±0,04 a (0,00)	0,50±0,20 ab (0,50)	1,69±0,28 c (1,75)
EMSK48saat n=3	0,00±0,00 a (0,00)	0,17±0,17 ab (0,00)	0,00±0,00 a (0,00)	0,00±0,00 a (0,00)	0,83±0,44 ac (1,00)
EMSK96saat n=3	0,22±0,22 abc (0,00)	0,00±0,00 a (0,00)	0,00±0,00 a (0,00)	0,11±0,11 a (0,00)	1,11±0,67 ac (1,00)
EMSK7gün n=5	0,13±0,08 ab (0,00)	0,00±0,00 a (0,00)	0,00±0,00 a (0,00)	0,05±0,05 a (0,00)	1,73±0,39 c (1,75)
CE24saat n=5	0,30±0,20 abc (0,00)	0,38±0,20 bc (0,25)	0,20±0,20 a (0,00)	0,47±0,23 ab (0,33)	1,13±0,16 bc (1,00)
CE48saat n=5	0,40±0,16 bc (0,33)	0,50±0,17 bc (0,50)	0,00±0,00 a (0,00)	0,40±0,24 ab (0,00)	1,43±0,36 bc (1,66)
CE96saat n=10	0,62±0,24 bc (0,33)	1,18±0,31 c (0,83)	0,20±0,09 a (0,00)	0,77±0,16 b (0,66)	1,64±0,34 c (1,42)
CE7gün n=5	0,70±0,13 c (0,66)	1,21±0,44 c (0,66)	0,38±0,13 a (0,33)	0,72±0,24 b (1,00)	2,90±0,45 d (2,66)

* Sağlıklı sonuç elde edilemedi

4.2. Histopatoloji Sonuçları

EMS yalnızca genotoksisite testinin pozitif kontrolü olarak kullanıldığı için bu gruptaki balıklarda histopatolojik muayene yapılmamıştır. Kontrol ve aseton kontrol gruplarından alınan balıklardan hazırlanan preparatlarda ise herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanılmamıştır. Her akvaryumdan 5'er adet balık alınmıştır ancak 96 saat boyunca chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan gruptan alınan balıklardan birinden hazırlanan preparata ilişkin sağlıklı değerlendirme yapılamadığından, bu grupta değerlendirmeler 4 balık üzerinden yapılmış olup, diğer gruplarda histopatolojik incelemeler ve değerlendirmeler 5'er balık üzerinde gerçekleştirilmiştir. Sazan fingerlinglerinin nekropsilerinde iç organlarda makroskopik bulguya rastlanmamıştır. Kontrol grubu ve chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan gruplardan elde edilen deri (kas) örneklerinde herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanılmamıştır. Histolojide kullanılan bazı terimler EK-2'de verilmiştir.

4.2.1. Hepatopankreas dokularında görülen histopatolojik bulgular

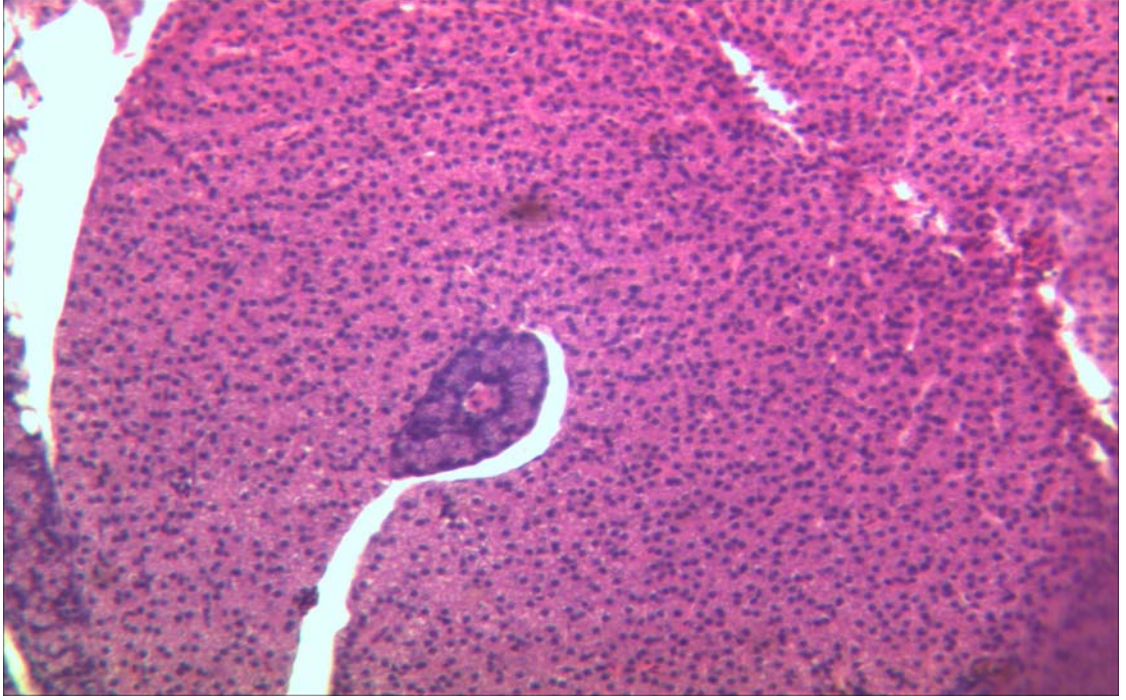
Chlorpyrifos-ethyl'e ilişkin subletal doz olarak belirlenmiş olan 16 µg/L konsantrasyona 24 saat, 48 saat, 96 saat ve 7 gün boyunca maruz bırakılan sazan fingerlinglerinden elde edilen hepatopankreas dokularına ilişkin histopatolojik bulgular Çizelge 4.2. de verilmiştir.

Hepatik dokularda albumin dejenerasyonu, hidropik dejenerasyon, pasif hiperemi ve hiperemi ile pankreatik dokularda hiperemi bulguları balıkların büyük bir çoğunluğunda görülen en önemli bulgular olarak tespit edilmiştir. Bu bulgulara ilaveten pankreatik dokularda pasif hiperemi, yağlanma, pankreatitis, pankreasın ductusunda ve damarlarda hiperemi, damarlarda dolgunluk, perihepatitis, hepatik dokularda çok şiddetli kanama, ödem, yangı, trombus, fokal hepatit, nekroz, safra kanalının etrafında nekroz, fokal kanama gözlemlenen diğer bulgular arasındadır. 48 saat, 96 saat ve 7 gün boyunca chlorpyrifos-ethyl'e maruz bırakılan bazı balıklardan hazırlanan bazı preparatlarda sağlıklıya yakın hepatik doku bulgusu da tespit edilmiştir. Chlorpyrifos-ethyl'e daha uzun süre maruz kalma hepatopankreas

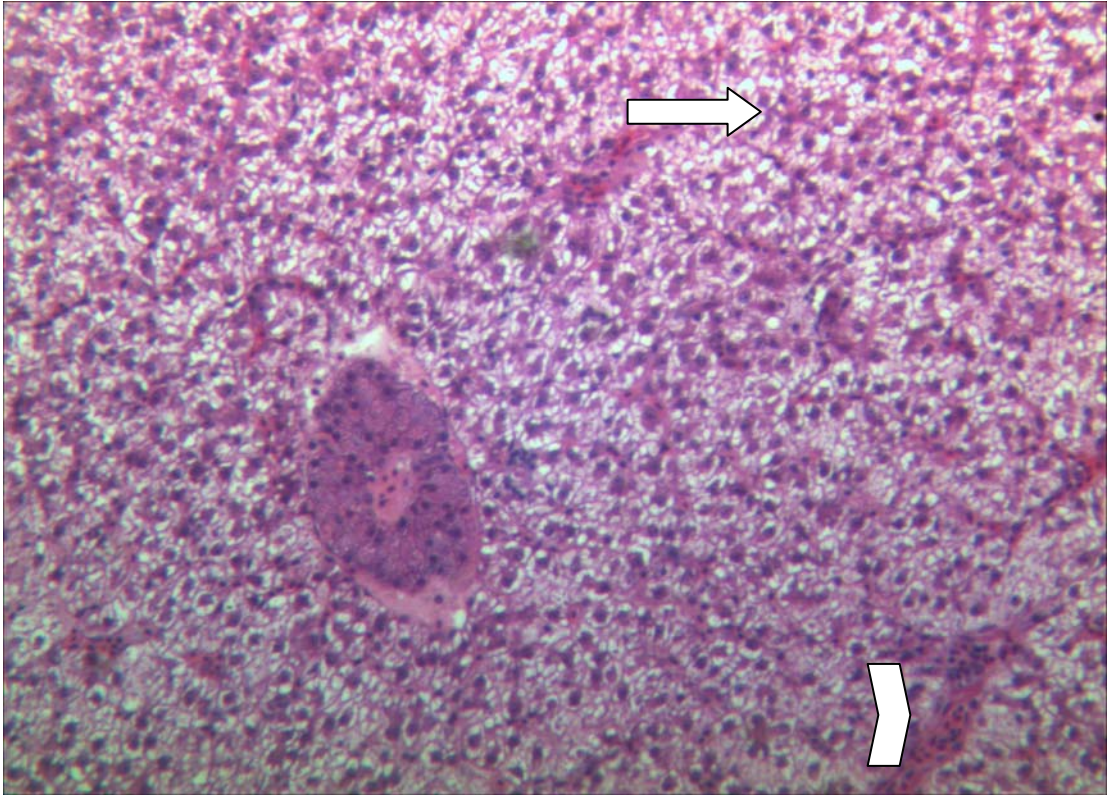
dokularında elde edilen bulguların şiddetlenmesine ve/veya görülen histopatolojik bulguların daha yoğun olmasına ve daha fazla balıkta görülmesine sebebiyet vermemiştir. Sazan balıklarından elde edilen hepatopankreas dokularına ilişkin histopatolojik bulguların resimleri Resim 4.3.- 4.5.'te verilmiştir.

Çizelge 4.2. Subletal dozda (16 µg/L) chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan sazan fingerlinglerinin hepatopankreas dokularında görülen histopatolojik bulgular, Adet-(%)

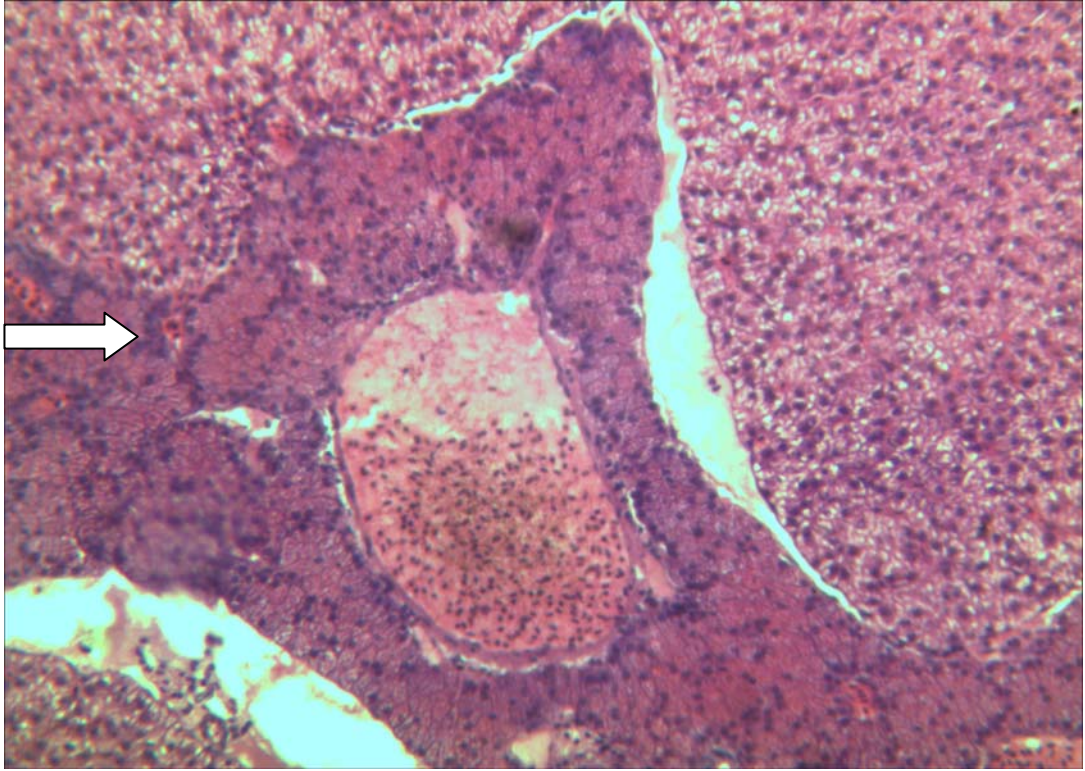
Hepatopankreas Dokularında Histopatolojik Bulgular	CE24saat Adet-(%) n=5	CE48saat Adet-(%) n=5	CE96saat Adet-(%) n=4	CE7gün Adet-(%) n=5
Hepatik dokuda albumin dejenerasyonu	5-(100)	5-(100)	2-(50)	3-(60)
Pankreatik dokuda damarlarda dolgunluk	1-(20)	- (0)	- (0)	- (0)
Hepatik dokuda hidropik dejenerasyon	2-(40)	- (0)	2-(50)	2-(40)
Hepatik dokuda pasif hiperemi	4-(80)	5-(100)	2-(50)	3-(60)
Hepatik dokuda hiperemi	5-(100)	3-(60)	2-(50)	4-(80)
Hepatik dokuda çok şiddetli kanama	1-(20)	- (0)	- (0)	- (0)
Pankreatik dokuda hiperemi	3-(60)	3-(60)	- (0)	2-(40)
Pankreatik dokuda pasif hiperemi	1-(20)	1-(20)	- (0)	- (0)
Hepatik doku sağlıklıya yakın	- (0)	1-(20)	2-(50)	1-(20)
Pankreatik dokuda yağlanma	- (0)	1-(20)	- (0)	- (0)
Hepatik dokuda yangı	- (0)	1-(20)	- (0)	- (0)
Pankreatitis	- (0)	1-(20)	- (0)	1-(20)
Perihepatitis	- (0)	1-(20)	- (0)	- (0)
Hepatik dokuda ödem	- (0)	- (0)	1-(25)	- (0)
Pankreatik doku ductusunda hiperemi	- (0)	- (0)	1-(25)	- (0)
Hepatik dokuda trombus	- (0)	- (0)	1-(25)	- (0)
Hepatik dokuda fokal hepatit	- (0)	- (0)	1-(25)	- (0)
Hepatik dokuda nekroz	- (0)	- (0)	1-(25)	- (0)
Safra kanalının etrafında nekroz	- (0)	- (0)	1-(25)	- (0)
Pankreatik dokuda damarlarda hiperemi	1-(20)	- (0)	- (0)	- (0)
Hepatik dokuda fokal kanama	1-(20)	- (0)	- (0)	- (0)



Resim 4.3. Kontrol grubuna ait sağlıklı hepatik doku (H&E,x100)



Resim 4.4. Hepatik dokuda hiperemi (ok başı) ve hidropik dejenerasyon (ok) (H&E,x100)



Resim 4.5. Pankreatik dokuda hiperemi (H&E,x100)

4.2.2. Solungaç dokularında görülen histopatolojik bulgular

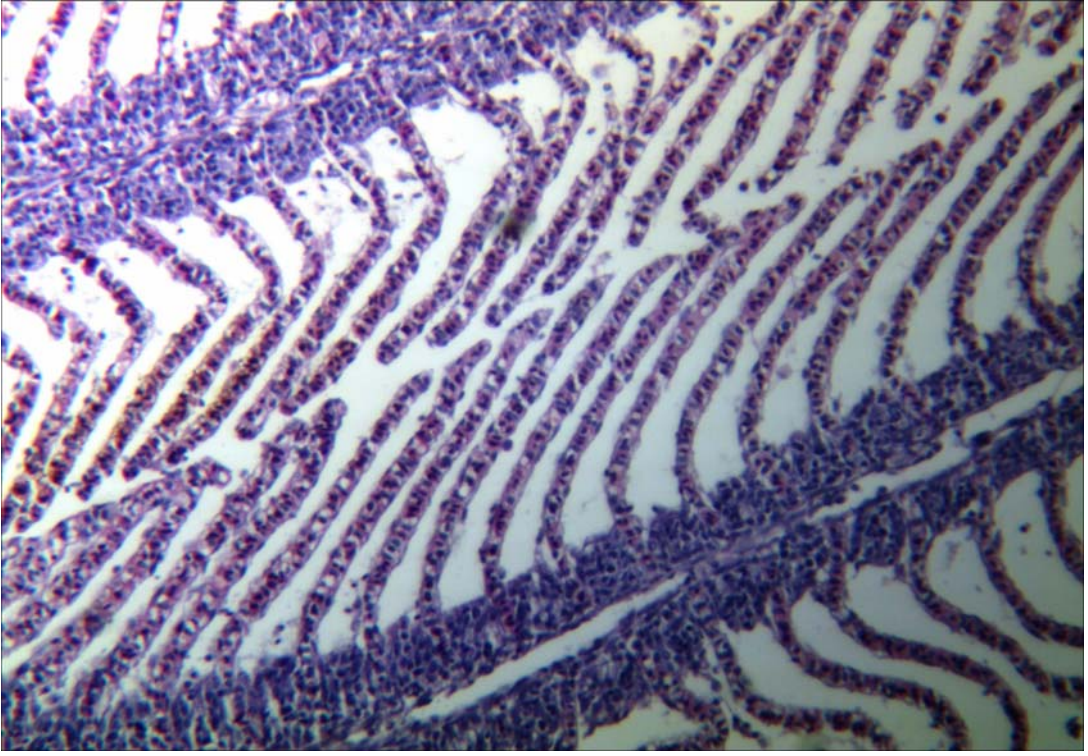
Chlorpyrifos-ethyl'e ilişkin subletal doz olarak belirlenmiş olan 16 $\mu\text{g/L}$ konsantrasyona 24 saat, 48 saat, 96 saat ve 7 gün boyunca maruz bırakılan sazan fingerlinglerinden elde edilen solungaç dokularına ilişkin histopatolojik bulgular Çizelge 4.3. de verilmiştir.

Solungaç dokularında hiperemi, telangiektazi, hiperplazi, bronşitis, ödem, klorit hücre hiperplazisi ve füzyon sazan fingerlinglerinde en çok tespit edilen histopatolojik bulgular olarak belirlenmiştir. Solungaç dokularında kanama, epitel ayrılması, yangı, hafif bronşitis, nekroz, klorit hücre hiperplazisine bağlı füzyon tespit edilen diğer bulgular arasındadır. Sıklıkla görülen histopatolojik bulgular için 24 saat boyunca chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalma dahi yeterli olmuştur. Toksik maddeye daha uzun süre maruz kalma solungaç dokularında elde edilen bulguların şiddetlenmesine ve/veya görülen histopatolojik bulguların daha yoğun olmasına ve

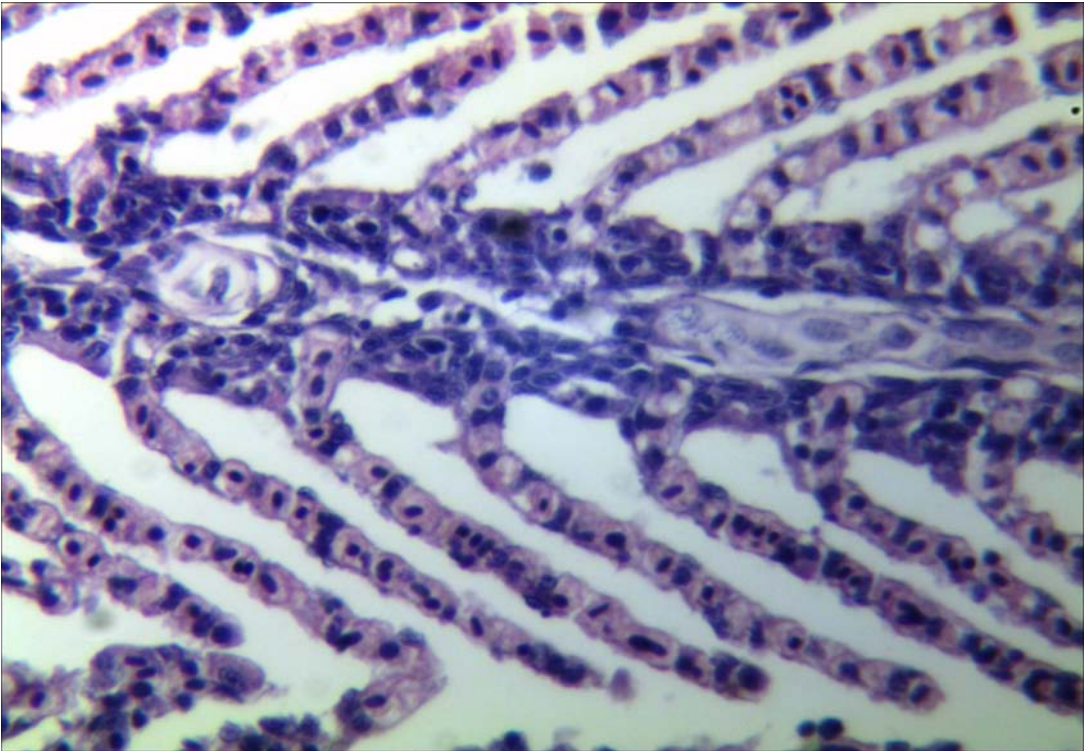
daha fazla balıkta görülmesine sebebiyet vermemiştir. Bununla birlikte chlorpyrifos-ethyl'e maruz bırakılan sazan fingerlinglerinin hiçbirisinde sağlıklı solungaç dokusuna rastlanılmamıştır. Sazan balıklarından elde edilen solungaç dokularına ilişkin histopatolojik bulguların resimleri Resim 4.6.- 4.10.'da verilmiştir.

Çizelge 4.3. Subletal dozda (16 µg/L) chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan sazan fingerlinglerinin solungaç dokularında görülen histopatolojik bulgular, Adet-(%)

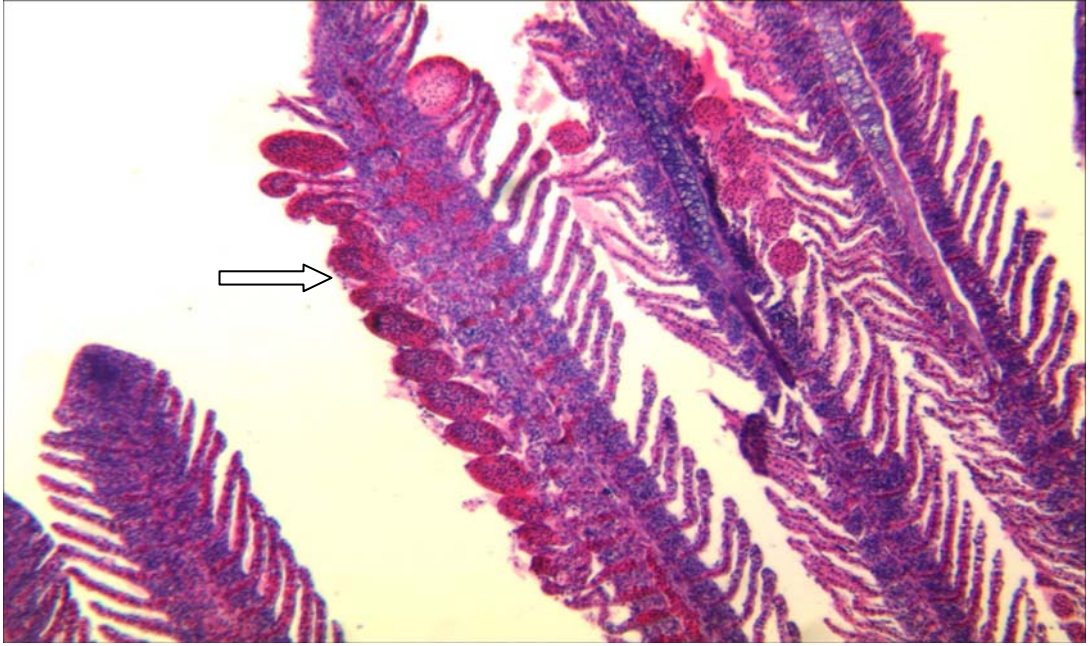
Solungaç Dokularında Histopatolojik Bulgular	CE24saat Adet-(%) n=5	CE48saat Adet-(%) n=5	CE96saat Adet-(%) n=4	CE7gün Adet-(%) n=5
Hiperemi	1-(20)	5-(100)	3-(75)	2-(40)
Telangiyektazi	2-(40)	3-(60)	1-(25)	-(0)
Hiperplazi	1-(20)	4-(80)	1-(25)	1-(20)
Yangı	1-(20)	1-(20)	-(0)	-(0)
Bronşitis	4-(80)	5-(100)	3-(75)	1-(20)
Ödem	1-(20)	-(0)	1-(25)	-(0)
Klorit hücre hiperplazisi	1-(20)	-(0)	1-(25)	-(0)
Kanama	1-(20)	-(0)	-(0)	-(0)
Epitel ayrılması	-(0)	1-(20)	-(0)	-(0)
Füzyon	-(0)	2-(40)	-(0)	2-(40)
Hafif bronşitis	-(0)	1-(20)	-(0)	-(0)
Nekroz	-(0)	1-(20)	-(0)	-(0)
Klorit hücre hiperplazisine bağlı füzyon	-(0)	-(0)	1-(25)	-(0)



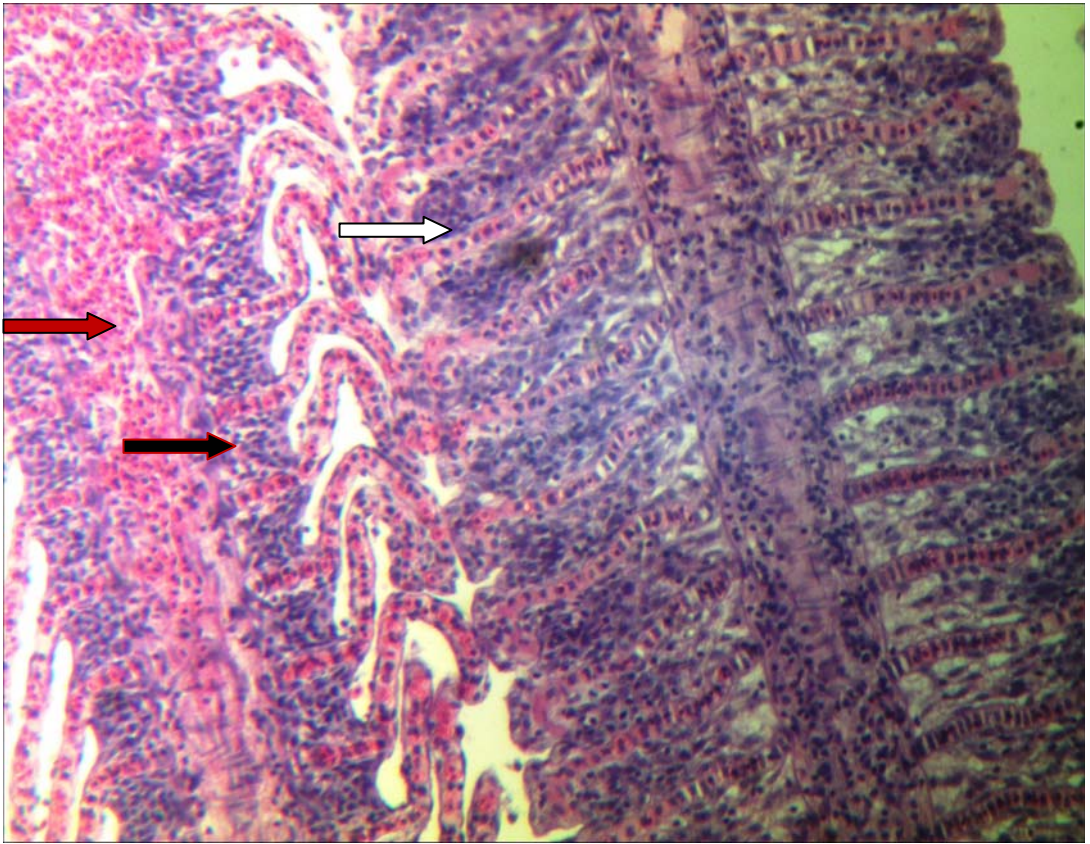
Resim 4.6. Sazan balıklarında kontrol grubuna ait solungaç kesitleri (H&E, x100)



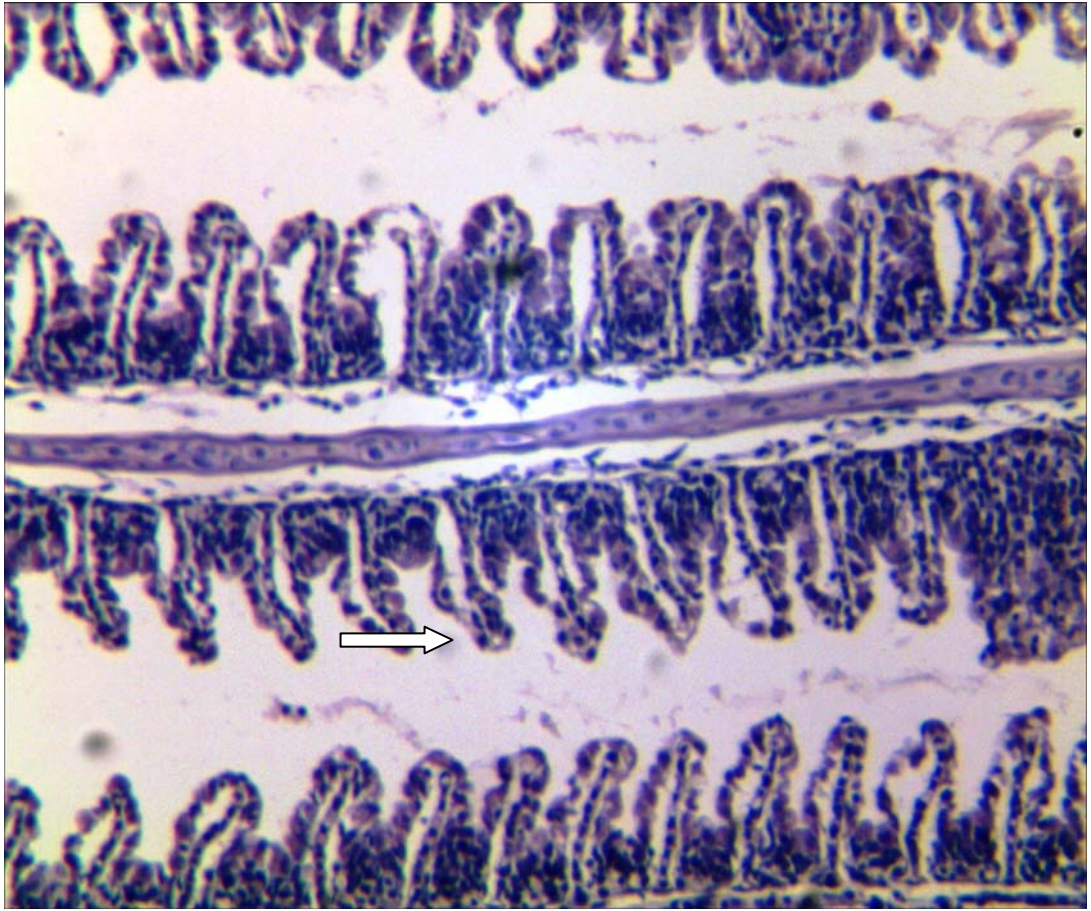
Resim 4.7. Sazan balıklarında kontrol grubuna ait solungaç kesitleri (H&E, x250)



Resim 4.8.Solungaç dokularında görülen telangiektazi (H&E,x40)



Resim 4.9. Solungaç dokularında görülen hiperemi (kırmızı ok), klorit hücre hiperplazisi (siyah ok), füzyon (beyaz ok) (H&E,x100)



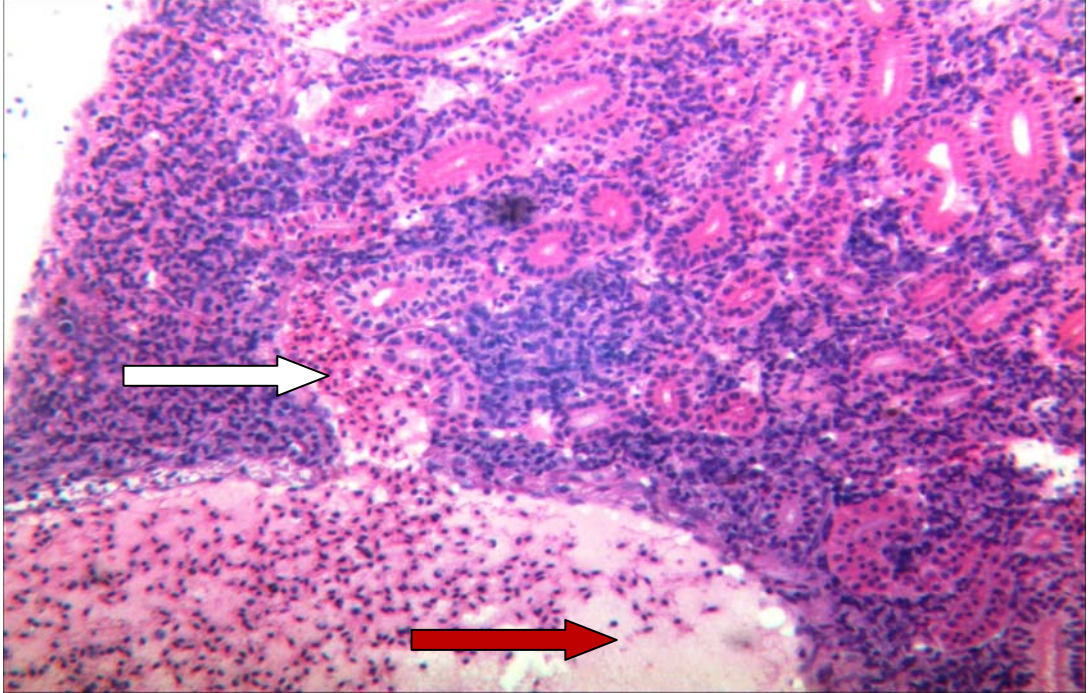
Resim 4.10. Solungaç dokularında epitel ayrılması (H&E,x100)

4.2.3. Böbrek dokularında görülen histopatolojik bulgular

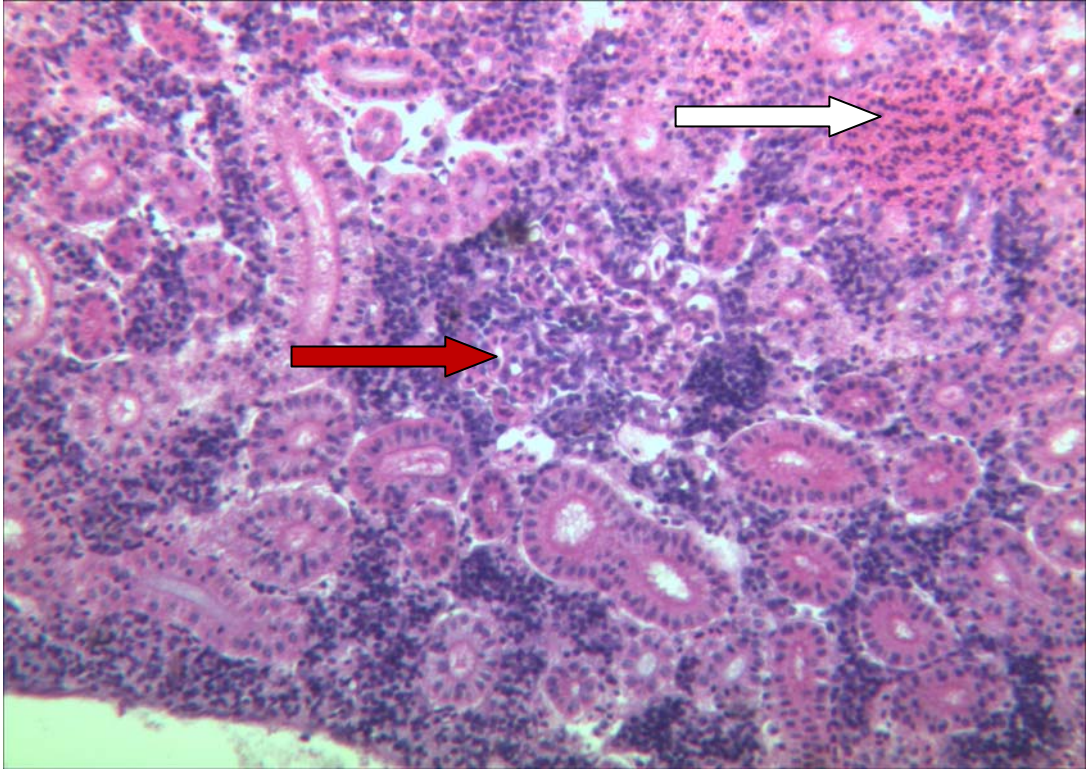
Chlorpyrifos-ethyl'e ilişkin subletal doz olarak belirlenmiş olan 16 $\mu\text{g/L}$ konsantrasyona 24 saat, 48 saat, 96 saat ve 7 gün boyunca maruz bırakılan sazan fingerlinglerinden elde edilen böbrek dokularına ilişkin histopatolojik bulgular Çizelge 4.4. de verilmiştir.

Böbrek dokularında kanama, şiddetli kanama, hiperemi, bowman kapsülünde genişleme, böbrek dokularında melanizasyon, tubulun etrafında melanizasyon, tubulun bazal membranını ayırmış (tubulde melanizasyon), şişmiş glomerulus, tubullerde hidropik dejenerasyon, böbrek dokularında ödem chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan sazan fingerlinglerinde en çok rastlanan histopatolojik bulgulardır. Bu bulgulara ilaveten böbrek dokularında kanamaya bağlı ödem, bowman kapsülünü

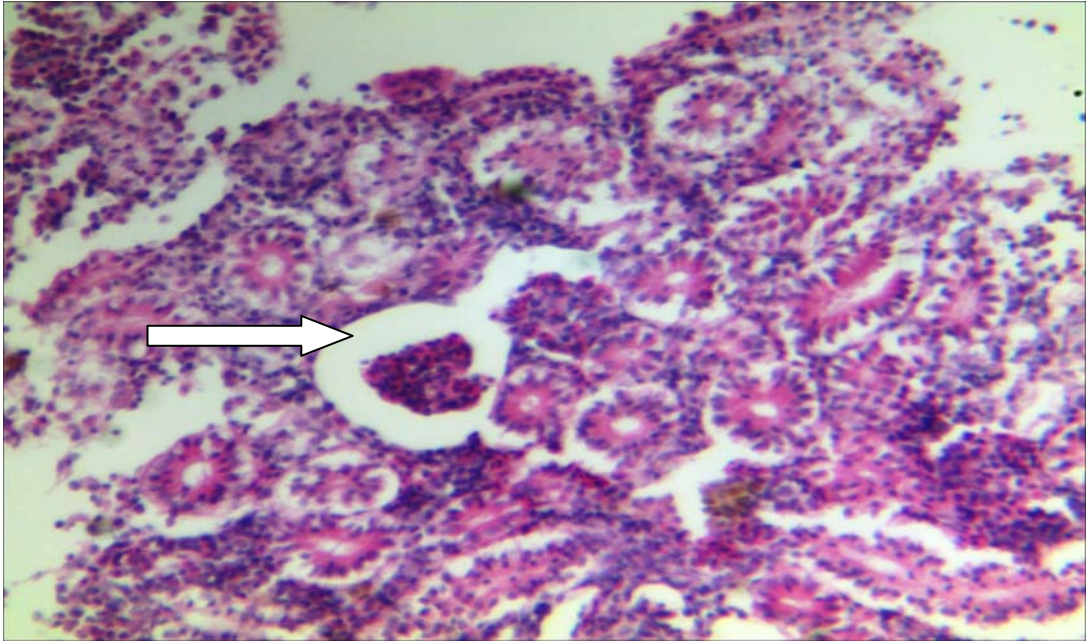
doldurmuş, yok olmuş cavum glomerili, genişlemiş cavum glomerili, cavum glomerulusta atrofi, cavum glomerili çevresinde melanizasyon, içi boşalmış ve yıkımlanmış bowman kapsülü, böbrek dokularında nekroz, şiddetli hiperemi, kompresyon atrofi, damarda ve damar çevresinde melanizasyon, dokuda kistik yapı, tubulleri gölgede bırakacak şekilde böbrek dokusunda çok şiddetli kanama, böbrek kapsulasında ödem, kapsulada ve kapsulanın dışında da kanama, damarda genişleme, dolgunluk gibi histopatolojik bulgulara da rastlanılmıştır. Elde edilen histopatolojik bulgular 48 saat boyunca chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalma sonucunda görülmeye başlanmıştır. Bununla birlikte chlorpyrifos-ethyl'e maruz bırakılan sazan fingerlinglerinin 24 saatlik doz grubu hariç hiçbirisinde sağlıklı böbrek dokusuna rastlanılmamış olup, 48 saat boyunca chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan yalnızca 1 balıkta, normal cavum glomerili bulgusu tespit edilmiştir. Chlorpyrifos-ethyl'e daha uzun süre maruz kalma, böbrek dokularında elde edilen bulguların şiddetlenmesine ve/veya görülen histopatolojik bulguların daha yoğun olmasına, ve daha fazla sayıda balıkta görülmesine sebebiyet vermemiştir. Böbrek dokularına ilişkin elde edilen histopatolojik bulgular Resim 4.11-4.16.'da verilmiştir.



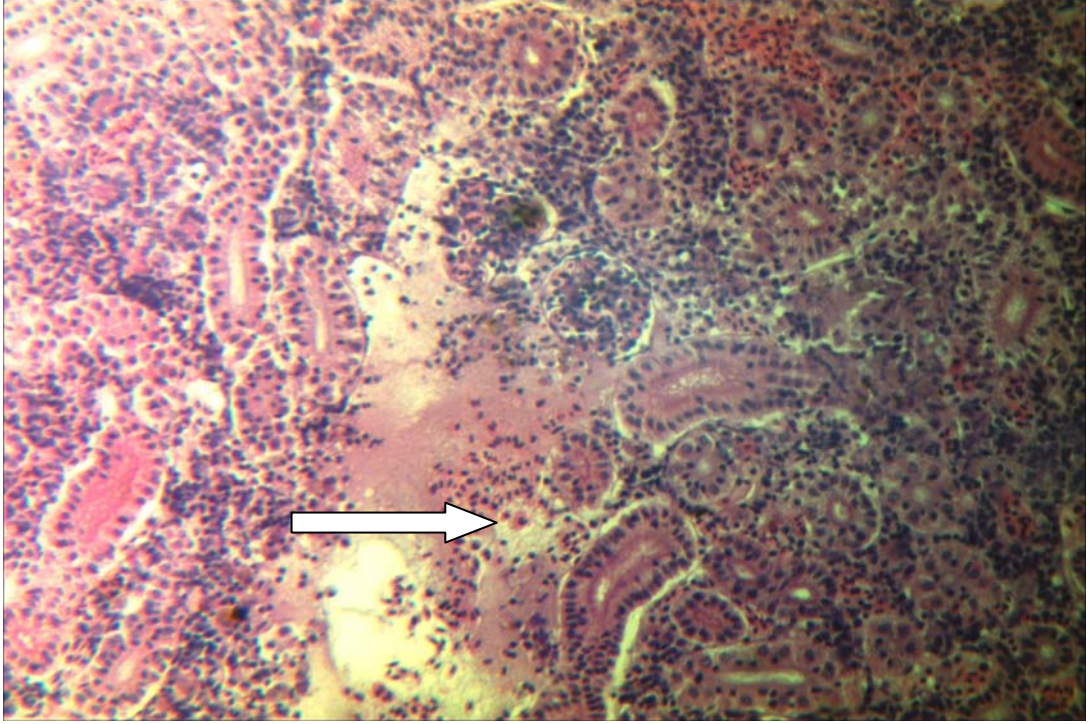
Resim 4.11. Böbrek dokusunda görülen kanama (beyaz ok) ve ödem(kırmızı ok) (H&E,x100)



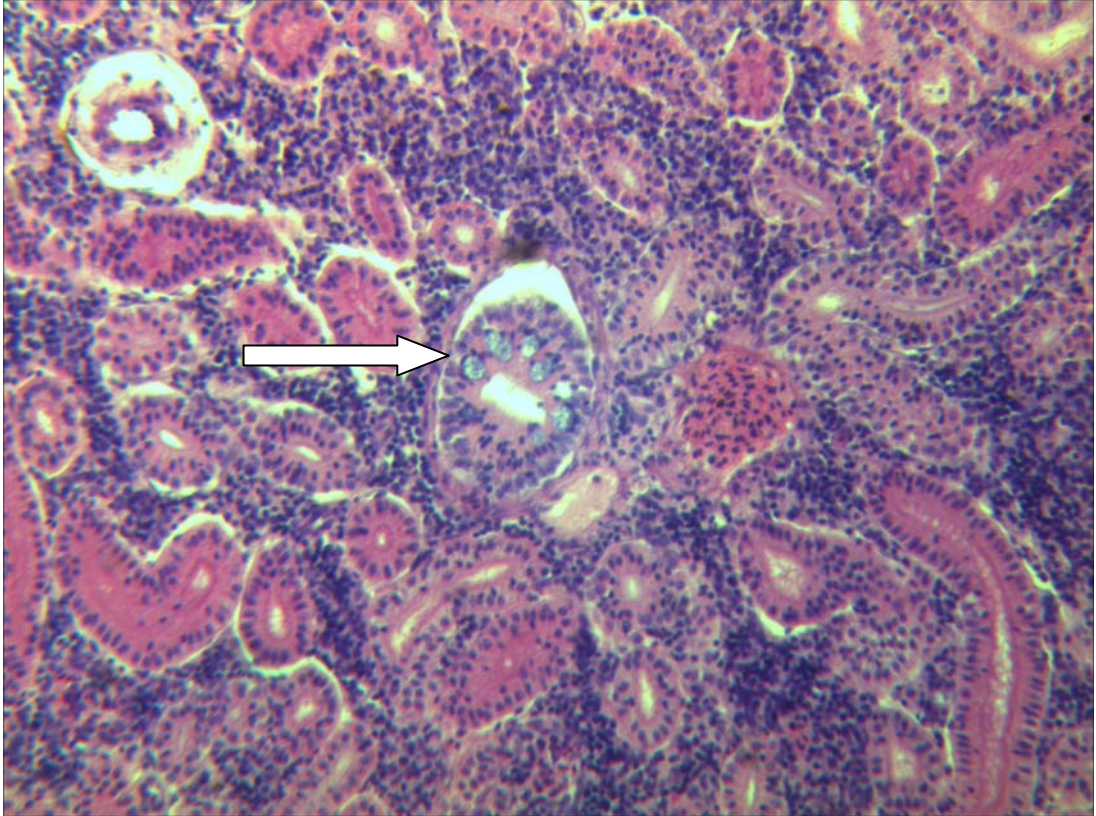
Resim 4.12. Glomerulus şişmiş (kırmızı ok) ve böbrek dokusunda hiperemi (beyaz ok) (H&E,x100)



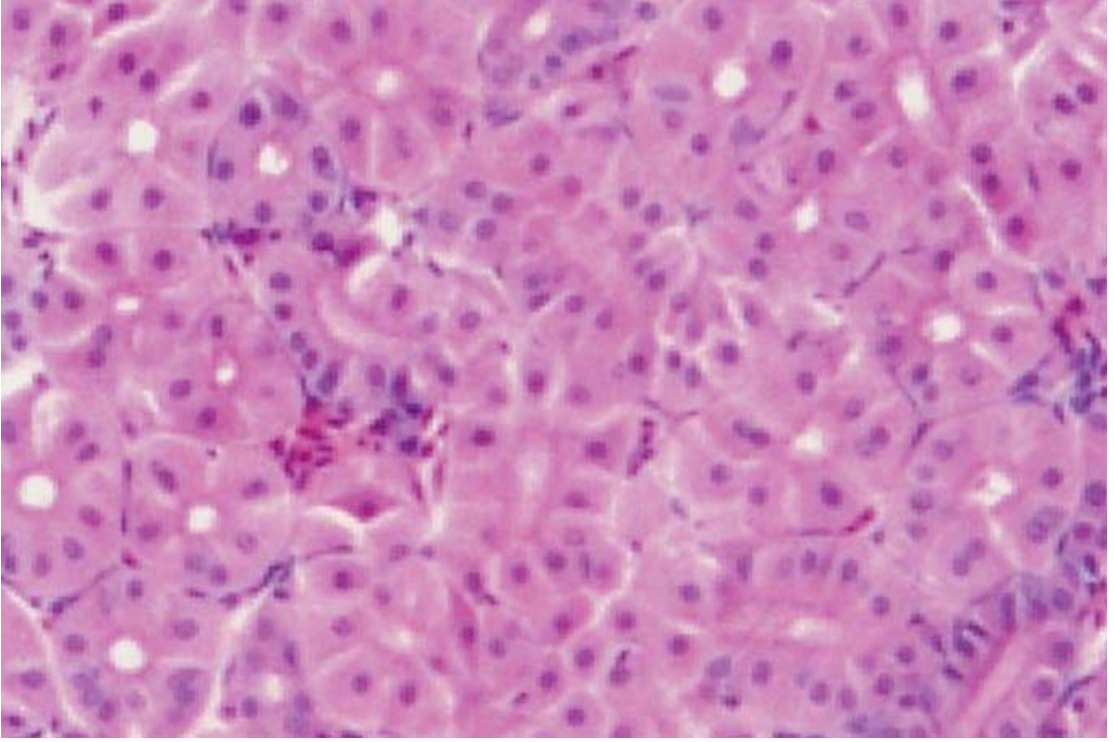
Resim 4.13. Cavum glomeruli'de genişleme (beyaz ok) (H&E,x100)



Resim 4.14. Glomerulide yıkım (beyaz ok) (H&E,x100)



Resim 4.15. Böbrek dokusunda kistik yapı (beyaz ok) (H&E,x100)



Resim 4.16. Kontrol grubuna ait böbrek dokusu (H&E,x100)

Çizelge 4.4. Subletal dozda (16 µg/L) chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan sazan fingerlinglerinin böbrek dokularında görülen histopatolojik bulgular, Adet-(%)

Böbrek Dokusunda Histopatolojik Bulgular	CE24saat Adet-(%) n=5	CE48saat Adet-(%) n=5	CE96saat Adet-(%) n=4	CE7gün Adet-(%) n=5
Kanama	-(0)	5-(100)	4-(100)	3-(60)
Şiddetli kanama	-(0)	1-(20)	-(0)	1-(20)
Kanamaya bağlı ödem	-(0)	1-(20)	-(0)	-(0)
Cavum glomerili normal	-(0)	1-(20)	-(0)	-(0)
Hiperemi	-(0)	3-(60)	3-(75)	3-(60)
Bowman kapsülünde genişleme	-(0)	1-(20)	1-(25)	-(0)
Melanizasyon	-(0)	3-(60)	2-(50)	2-(40)
Tubulun etrafında melanizasyon, tubulun bazal membranını ayırmış (tubulde melanizasyon)	-(0)	1-(20)	2-(50)	-(0)
Glomerulus şişmiş	-(0)	1-(20)	1-(25)	-(0)
Cavum glomerili yok olmuş, bowman kapsülünü doldurmuş	-(0)	-(0)	1-(25)	-(0)
Tubullerde hidropik dejenerasyon	-(0)	1-(20)	1-(25)	-(0)
Ödem	-(0)	1-(20)	3-(75)	1-(20)
Bowman kapsülünün içi boşalmış	-(0)	1-(20)	-(0)	-(0)
Nekroz	-(0)	1-(20)	-(0)	-(0)
Şiddetli hiperemi	-(0)	-(0)	1-(25)	-(0)
Bowman kapsülü yıkılmış	-(0)	-(0)	1-(25)	1-(20)
Kompresyon atrofi	-(0)	-(0)	1-(25)	-(0)
Damarda ve damar çevresinde melanizasyon	-(0)	-(0)	1-(25)	-(0)
Kistik yapı	-(0)	-(0)	1-(25)	1-(20)
Cavum glomerili genişlemiş	-(0)	-(0)	-(0)	2-(40)
Çok şiddetli kanama, tubulleri gölgede bırakmış	-(0)	-(0)	-(0)	1-(20)
Cavum glomerulusta atrofi	-(0)	-(0)	-(0)	1-(20)
Cavum glomerili çevresinde melanizasyon	-(0)	-(0)	-(0)	1-(20)
Böbrek dokusunun kapsulasında ödem	-(0)	-(0)	-(0)	1-(20)
Kapsulada kanama, kapsulanın dışında da kanama var	-(0)	-(0)	-(0)	1-(20)
Damarda genişleme, dolgunluk	-(0)	-(0)	-(0)	1-(20)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada sazan fingerlingleri chlorpyrifos-ethyl için subletal doz olarak belirlenmiş olan 16 µg/L konsantrasyona, 24, 48, 96 saat ve 7 gün boyunca maruz bırakılmışlardır.

Denemeler sonunda balıklardan elde edilen periferik eritrositlerde nükleus anomalileri ve mikronükleus farklı frekanslarda tespit edilmiştir. Nükleus anomalileri açısından chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan gruplar ile kontrol grupları arasındaki farklılıklar istatistiki yönden önemli bulunmazken ($P>0,05$), mikronükleus testi sonucunda chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan gruplar ile kontrol grubu arasındaki fark önemli bulunmuştur ($P<0,05$) ve maddenin genotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Uygulama süresi arttıkça nükleus anomalileri ve mikronükleus frekansında artış gözlemlenmiştir.

Hepatopankreas dokularında albumin dejenerasyonu, hidropik dejenerasyon, hiperemi ile solungaç dokularında hiperemi, telangiektazi, hiperplazi, bronşitis, ödem, klorit hücre hiperplazisi, epitel ayrılması ve füzyon ile böbrek dokularında kanama, hiperemi, melanizasyon, ödem, bowman kapsülünde genişleme, tubulün etrafında melanizasyon, şişmiş glomerulus, tubüllerde hidropik dejenerasyon, chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan sazan fingerlinglerinde en çok rastlanan histopatolojik bulgulardır. Kontrol gruplarında herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanılmamıştır. Chlorpyrifos-ethyl'e daha uzun süre maruz kalma, dokularda elde edilen bulguların şiddetlenmesine ve/veya görülen histopatolojik bulguların daha çok olmasına, ve daha fazla sayıda balıkta görülmesine sebebiyet vermemiştir.

Sazan balıklarında chlorpyrifos-ethyl'den farklı toksik maddelerin genotoksik etkilerini belirlemek üzere mikronükleus testinin [Grisolia and Starling, 2001; Buschini et al., 2004; Çavaş and Könen, 2007; Çavaş, 2008; Garcia-Medina et al., 2011] ve histopatolojik verilerin kullanıldığı çalışmalar [Cengiz, 2006; Ayas et al., 2007; Sepici-Dinçel et al., 2009; Velisek et al., 2010; Ba-Omar et al., 2011] mevcuttur. Bununla birlikte chlorpyrifos-ethyl'in sazandan farklı balık ve kabuklu su

ürünlerinde meydana getirdiği davranış değişiklikleri, histopatolojik, genotoksik, hematolojik ve morfolojik etkiler, asetilkolinesteraz, oksidatif stres ve antioksidan enzimleri ile steroid hormon seviyeleri üzerine olan etkilerinin incelendiği çalışmalar da mevcuttur [De Silva and Samayawardhera, 2002; Rao et al., 2003; Okechukwu et al., 2007; Ali et al., 2008; Kavitha and Rao, 2008; Yılayaz, 2008a, b; Ali et al., 2009; Ghedira et al., 2009; Woke and Aleleye-Wokoma, 2009; Xuereb et al., 2009; Oruç, 2010]. Ancak chlorpyrifos-ethyl'in sazan balıkları üzerinde davranış değişiklikleri ve asetilkolinesteraz enziminin seviyeleri üzerine etkilerinin incelendiği çalışmalar mevcut olsa da [Halappa and David, 2009; Xing et al., 2010], genotoksik ve histopatolojik etkilerinin incelendiği bir çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır.

Balık periferel kan yaymalarından hazırlanan preparatlarda normal ve mikronükleuslu çekirdek yapısına sahip eritrositler yanında kendiliğinden bulunabilen ve genotoksik etki sonucunda frekansları arttığı gözlenen bazı nükleus anomalilerine de rastlanmıştır. Gruplar çentikli ve tomurcuklu nükleus açısından değerlendirildiğinde chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalma süresi arttıkça çentikli ve tomurcuklu nükleus görülme sıklığı artmıştır ancak istatistiksel olarak uygulama dozları arasında farklılık görülmemiştir ($P>0,05$). Loblu nükleus açısından gruplar değerlendirildiğinde ise kontrol grubu dahil bütün gruplardan elde edilen frekans değerleri kendi aralarında benzer bulunmuş ($P>0,05$), olup elde edilen değerler arasındaki farklılıkların bireyler arasındaki farklılıklardan kaynaklanabileceği yorumuna varılmıştır. Binükleus açısından değerlendirildiğinde, chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan gruplardan elde edilen değerler kendi aralarında benzerlik göstermektedir ($P>0,05$). Nükleus anomalilerine ilişkin elde edilen bu bulgular hem değerler itibari ile hem de toksik maddeye maruziyete ilişkin olarak bu anomalilerin frekansının artmasına bağlı olarak Çavaş and Ergene-Gözükara, [2005b]; Ergene et al. [2007a] ile benzerlik göstermiştir.

Gruplar mikronükleus açısından değerlendirildiğinde ise en düşük frekans değeri kontrol grubundan elde edilirken, en yüksek frekans ise 2,66 değeri ile 7 gün boyunca chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan gruptan elde edilmiş olup, bu gruptan elde edilen frekans değeri diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatistiki yönden farklı

olarak bulunmuştur ($P < 0,05$). Chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalma süresi uzadıkça mikronükleus görülme sıklığı da artmıştır. 24 saat, 48 saat ve 96 saat boyunca chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan gruplardan elde edilen değerler kendi aralarında benzerlik göstermiştir ($P > 0,05$). Bu çalışmada sazan balıklarından uygulama süresine bağlı olarak artarak elde edilen mikronükleus frekansı bulgusu chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan *C. punctatus*'tan elde edilen bulgularla benzerdir [Ali et al., 2008; Ali et al., 2009]. Ancak bu iki çalışmadan elde edilen mikronükleus frekansları, bu çalışmada chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalan sazan balıklarından elde edilen değerlerden düşük bulunmuştur. Elde edilen sonuçlardaki farklılıklar farklı balık türleri ve dozlarla çalışılmış olmasından kaynaklanmış olabilir. Ali et al. [2008] ve Ali et al. [2009] tarafından yapılan çalışmalarda chlorpyrifos-ethyl *C. punctatus* balıklarında çok farklı dozlar şeklinde denenmiş ve mikronükleus frekansının doz artışına bağlı olarak arttığı bulunmuştur. Yine benzer şekilde Yılayaz [2008a, b]'ın çalışmalarında farklı balık türlerinde chlorpyrifos-ethyl'in genotoksik etkisi mikronükleus testi ile araştırılmış ve balıklar farklı dozlara maruz bırakılmıştır. Her ne kadar farklı dozlar, farklı balık türleri üzerinde denenmiş olsa da elde edilen sonuçlar bu çalışmadan sazan balıkları ile elde sonuçlarla, bu maddenin genotoksik etkiler yaratabileceği hususunda benzerlik göstermektedir. Uygulanılan ve/veya maruz kalınan toksik madde chlorpyrifos-ethyl olmasa da sazan balıkları ile yapılan iki çalışmada mikronükleus testi ile genotoksik etki araştırılmıştır [Grisolia and Starling, 2001; Garcia-Medina et al., 2011]. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda her iki çalışmada da toksik maddeye maruziyet sonrasında balıkların eritrositlerinde mikronükleus frekansının arttığı görülmüştür.

Daha öncede belirtildiği üzere; chlorpyrifos-ethyl'in sazan balıkları üzerinde yaratmış olduğu histopatolojik etkilerin incelendiği bir çalışmaya rastlanılmadığı için bu çalışmadan elde edilen bulgular chlorpyrifos'un histopatolojik etkilerinin farklı balıklar üzerinde solungaçlar yönünden incelendiği iki çalışma [De Silva and Samayawardhena, 2002; Rao et al., 2003] ve farklı toksik maddelerin sazan balıkları üzerinde yaratmış olduğu histopatolojik etkilerin incelendiği çalışmalar [Cengiz, 2006; Ayas et al., 2007; Sepici-Dinçel et al., 2009; Velisek et al., 2010; Ba-Omar et al., 2011] ile karşılaştırılmıştır.

Solungaç dokularında birçok patolojik değişiklik tespit edilmiş olup, histopatolojik bulgular için 24 saat boyunca chlorpyrifos-ethyl'e maruz kalma dahi yeterli olmuştur. Toksik maddeye daha uzun süre maruz kalma solungaç dokularında elde edilen bulguların şiddetlenmesine ve/veya görülen histopatolojik bulguların daha yoğun olmasına ve daha fazla balıkta görülmesine sebebiyet vermemiştir. Bununla birlikte chlorpyrifos-ethyl'e maruz bırakılan sazan fingerlinglerinin hiçbirisinde sağlıklı solungaç dokusuna rastlanılmamıştır. Solungaç dokularında tespit edilen bulgular De Silva and Samayawardhena [2002], Rao et al. [2003] ve Ba-Omar et al. [2011] ile benzerlik göstermektedir. Hepatopankreas ve böbrek dokularından elde edilen bulgular kısmen Velisek et al. [2010] ile benzerlik gösterirken, sentetik bir piretroid olan ve farklı bir etki mekanizmasına sahip olan cyfluthrin'e maruz kalan sazan balıklarının solungaç ve hepatopankreas dokularından elde edilen bulgular da [Sepici-Dinçel et al., 2009], bu çalışmada sazan balıklarından elde edilen bulgular ile benzerlik göstermektedir. Ayas et al. [2007] tarafından Sarıyar barajından yakalanan sazan balıklarının böbreklerinin tubullerinde elde edilen dejenerasyon bulgusu bu çalışmadan elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

Chlorpyrifos-ethyl'in bu çalışmada sazan balıkları üzerinde yapmış olduğu genotoksik ve histopatolojik etkiler göz önünde bulundurulduğunda, bu pestisitinin dünyadaki kullanımının yaygınlığına, kullanım alanının çeşitliğine ve çok kullanılıyor olmasına da bağlı olarak sucul organizmalara ilişkin olarak yaratacak olduğu potansiyel tehlikeye ilişkin daha fazla önem verilmeli ve daha detaylı çalışmalarla sucul organizmalarda özellikle de balıklardaki mekanizma ve DNA metabolizması ile olan interaksiyon açığa çıkarılarak, pestisitinin mutajenik ve genotoksik durumu daha detaylı olarak ortaya çıkarılmalıdır.

Sonuç olarak chlorpyrifos-ethyl'in sazan balıkları üzerindeki genotoksik etkilerini belirlemek üzere daha farklı dozları da kapsayan denemeler gerçekleştirilmelidir ve bu denemelerde DNA'daki kırılmalar hakkında daha fazla bilgi edinmemizi saylayan alkali tek hücre jel elektroforezi yani Komet testi kullanılmalıdır. Bununla birlikte farklı dozlarda gerçekleştirilecek olan bu çalışmalarda histopatolojik verilerde biyoidikatr olarak değerlendirilmelidir. Benzer şekilde sazan balıklarında

chlorpyrifos uygulamasından sonra asetilkolinesteraz enziminin aktivitesi incelenmeli, hematolojik ve biyokimyasal parametrelerle birlikte değerlendirilmelidir.

KAYNAKLAR

Ali, D., Nagpure, N.S., Kumar, S., Kumar, R., Kushwaha, B., “Genotoxicity assessment of acute exposure of chlorpyrifos to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis”, *Chemosphere*, 71: 1823-1831 (2008).

Ali, D., Nagpure, N.S., Kumar, S., Kumar, R., Kushwaha, B., Lakra, W.S., “Assessment of genotoxic and mutagenic effects of chlorpyrifos in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis”, *Food and Chemical Toxicology*, 47: 650-656 (2009).

Al-Sabti, K., Metcalfe, C.D., “Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water”, *Mutat. Res.*, 343: 121-135 (1995).

Amlacher, E. “Taschenbuch der Fischkrankheiten”, *Gustav Fischer Verlag*, Stuttgart. 474 (1981).

Anonim 1, “Chlorpyrifos”, <http://www.bitkisagligi.net> (2010).

Anonymous 1, “Chlorpyrifos ethyl”, Jiangsu Fengshan Group, <http://www.jsfchem.com> (2010).

Anonymous 2, “Chlorpyrifos”, <http://www.en.wikipedia.org> (2010).

Anonymous 3, “Chlorpyrifos ethyl”, PAN Pesticide Database, <http://www.pesticideinfo.org> (2010).

Anonymous 4, “Micronucleus test”, Organisation for Economic Co-operation and Development, <http://www.oecd.org/dataoecd/60/28/32106288.pdf> (2010).

Anonymous 5, “Micronucleus test”, European Centre for the Validation of the Alternative Methods, http://ecvam.irc.it/publication/ESAC25_statement_MNT_20061128_C.pdf (2010).

APHA, AWWA, WPCF, “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater”, *APHA, Washington, D.C.* 495 (1971).

APHA, AWWA, WPCF, “Standard methods for the examination of water and wastewater” 14th edition *Washington. APHA*, USA. 1134 (1975).

APHA, AWWA, WPCF, “Standard methods for the examination of water and wastewater”, 21st edn. *American Publication of Health Association, Washington, DC.* 510 (2005).

Ayas, Z., Ekmekci, G., Ozmen, M., Yerli, S.V., “Histopathological changes in the livers and kidneys of fish in Sariyar Reservoir, Turkey”, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23: 242-249 (2007).

Ba-Omar, T.A., Al-Jardani, S., Victor, R., “Effects of pesticide temephos on the gills of *Aphanius dispar* (Pisces: Cyprinodontidae)”, *Tissue and Cell*, 43: 29-38 (2011).

Becker, A.G., Moraes, B.S., Menezes, C.C., Loro, V.L., Santos, D.R., Reichert, J.M., Baldisserotto, B., “Pesticide contamination of water alters the metabolism of juvenile silver catfish, *Rhamdia quelen*”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 1734-1739 (2009).

Belpaeme, K., Delbeke, K., Zhu, L., Kirsch-Volders, M., “Cytogenetic studies of PCB77 on Brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay”, *Mutagenesis*, 11 (5): 485-492 (1996).

Benli, A.C.K., “Subletal amonyak konsantrasyonlarının tilapia (*Oreochromis niloticus*) ve sazan (*Cyprinus carpio*) balıklarında büyüme ve kan parametreleri ile dokulara etkisi”, *Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Su Ürünleri Anabilim Dalı. Doktora tezi, Basılmamış. 216 (2006).

Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P. and Wahli, T., “Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution”, *J. Fish Dis.*, 22: 25-33 (1999).

Bolognesi, C., Degan, P., Chapter 3. “Genotoxicity biomarkers in aquatic organisms as indicators of carcinogenic marine pollutants. Biomarkers in marine organisms: A practical approach”, Ph. Garrigues, H. Barth, C.H. Walker and J.F. Narbonne, eds. *Elsevier*. 45-64 (2001).

Bolognesi, C., Perrone, E., Roggieri, P., Pampanin, D.M., Sciutto, A., “Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions”, *Aquat. Toxicol.*, 78S: S93-S98. (2006).

Bombail, V., Aw, D., Gordon, E., Batty, J., “Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland”, *Chemosphere*, 44: 383-392 (2001).

Braunbeck, T., Boettcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M., Seitz, N., “Towards an alternative for the acute fish LC(50) test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species- an update”, *ALTEX*, 22(2): 87-102 (2005).

Bruno, D.W., Poppe, T.T., “A colour atlas of salmonid diseases” *Academic Press*, London. 194 (1996).

Buschini, A., Martino, A., Gustavino, B., Monfrinotti, M., Poli, P., Rossi, C., Santoro, M., Dörr, A.J.M., Rizzoni, M., “Commet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization”, *Mutation Research*, 557: 119-129 (2004).

Carrasco, K.R., Tilbury, K.L., Myers, M.S., “Assessment of the piscine micronuclei test as an *in situ*”, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 47: 2123-2136 (1990).

Cengiz, İ.E., “Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin”, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 22: 200-204 (2006).

Cooper, N.L., Bidwell, J.R., “Cholinesterase inhibition and impacts on behaviour of the Asian clam, *Corbicula fluminea*, after exposure to an organophosphate insecticide”, *Aquatic Toxicology*, 76: 258-267 (2006).

Çavaş, T., Ergene-Gözükara, S., “Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cytogenotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent”, *Mutat. Res.*, 538: 81-91 (2003a).

Çavaş, T., Ergene-Gözükara, S., “Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells”, *Mutation Research*, 534: 93-99 (2003b).

Çavaş, T., Ergene-Gözükara, S., “Genotoxicity evaluation of metronidazole using the piscine micronucleus test by acridine orange fluorescent staining”, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19: 107-111. (2005a).

Çavaş, T., Ergene-Gözükara, S., “Micronucleus test in fish cells: A bioassay for *In situ* monitoring of genotoxic pollution in the marine environment”, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 46: 64-70 (2005b).

Çavaş, T., Ergene-Gözükara, S., “Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents”, *Aquatic Toxicology*, 74: 264-271 (2005c).

Çavaş, T., Könen, S., “Detection of cytogenetic and DNA damage in perihel erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay”, *Mutagenesis*, 22: 263-268 (2007).

Çavaş, T., “In vivo genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: Micronucleus test on acridine orange stained fish cells”, *Food and Chemical Toxicology*, 46: 352-358 (2008).

Çavaş, T., Könen, S., “In vivo genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay”, *Aquatic Toxicology*, 90: 154-159 (2008).

Çavaş, T., “Genotoksik etkilerin araştırılmasında hızlı bir yöntem olarak mikronükleus testi ve Comet testi uygulamaları” 89-105. *Çevre Toksikolojisinde Hızlı Tarama Testleri Kursu*. 03-06 Şubat (2010).

De Andrade, V.M., Da Silva, J., Da Silva, F.R., Heuser, V.D., Dias, J.F., Yoneama, M.L., De Freitas, T.R.O., “Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the comet assay and micronucleus test”, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44: 459-468 (2004).

De Silva, P.M.C.S. and Samayawardhena, L.A., “Low concentrations of Lorsban in water result in far reaching behavioral and histological effects in early life stages in guppy”, *Ecotoxicology and Environmental Safety, Environmental Research, Section B*, 53: 248-254 (2002).

Dembele, K., Haubruge, E., Gaspar, C., “Concentration effects of selected insecticides on brain acetylcholinesterase in the common carp (*Cyprinus carpio* L.)”, *Ecotoxicology and Environmental Safety, Environmental Research, Section B*, 45: 49-54 (2000).

Demir, N., “İhtiyoloji”, *İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Basımevi*, İstanbul. 391 (1992).

Demirsoy, A., “Yaşamın Temel Kuralları. Omurgalılar, Cilt III / Kısım I”, *Meteksan A. Ş.* Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Beytepe, Ankara. 684 (1988).

Demirsoy, A., “Yaşamın Temel Kuralları. Omurgalılar, Cilt III / Kısım I”, *Meteksan A. Ş.* Düzeltmiş İkinci Baskı. Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Beytepe, Ankara. 684 (1993).

Eaton, D.L., Daroff, R.B., Autrup, H., Bridges, J., Buffler, P., Costa, L.G., Coyle, J., Mc-Khann, G., Mobley, W.C., Nadel, L., Neubert, D., Schulte-Hermann, R., Spencer, P.S., “Review of the Toxicology of Chlorpyrifos With an Emphasis on Human Exposure and Neurodevelopment”, *Critical Reviews in Toxicology*, S2:1–125 (2008).

Elçin, A.E., Erkoç, F., Atik, A.D., Selvi, M., Sarıkaya, R., Öztekin, M., “Biyoloji Laboratuvarının Temelleri”, Editörler A. E. Elçin ve F. Erkoç. *Palme Yayıncılık*, Ankara. 326 (2010a).

Elçin, A.E., Erkoç, F., Sarıkaya, R., Selvi, M., Atik, A.D., Öztekin, M., “Molekülden Hücreye, Dokudan Fizyolojiye Biyoloji Deneyleri”, Editörler A. E. Elçin ve F. Erkoç. *Palme Yayıncılık*, Ankara. 400 (2010b).

EPA., “Method 1668, Revision A: Chlorinated Biphenyl Congeners in water, soil, sediment and tissue by HRGC/HRMS”, *United States Environmental Protection Agency. Office of water (4303)*. EPA No. EPA-821-R-00-002. United States of America. 127 (1999).

Erer, H., Kıran, M.M., Çiftçi, M.K., “Veteriner Genel Patoloji” *Bahçıvanlar Basım Sanayi A.Ş.*, Konya. 280 (2000)

Ergene, S., Cavas, T., Celik, A., Köleli, N., Aymak, C., “Evaluation of river water genotoxicity using the piscine micronucleus test”, *Environ. Mol. Mutagen.*, 46: 421-429 (2007a).

Ergene, S., Çavaş, T., Çelik, A., Koleli, N., Kaya, F., Karahan, A., “Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution”, *Ecotoxicology*, 16: 385-391 (2007b).

European Medicines Agency, ICH Topic S 2 B. “Genotoxicity: A Standard battery for genotoxicity testing of pharmaceuticals. Step 5.”, *CPMP/ICH/174/95*. March, 1998. London, UK. 9 (2006).

FAO, “Manual of methods in aquatic environment research. Part 4- bases for selecting biological tests to evaluate marine pollution”, *FAO Fisheries Tech. Paper, No. 164*, Roma 16-20 (1977).

FAO, Ward, G.S. and Parrish, P.R., “Manual of methods in aquatic environment research”, *FAO Fisheries Tech. Paper, No. 185*, Roma. 17-30 (1982).

FAO, Reish, D.L., Oshida, P.S., “Manual of Methods in Aquatic Environment Research. Part 10. Short -Term Static Bioassays”, *FAO Fish Tech. Pap. 247*, Roma. 17-33 (1987).

Ferguson, H.W., “Systemic pathology of fish. A text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts”, *Iowa State University Press Iowa*, USA. 263 (1989).

Ferreira, M., Antunes, P., Costa, J., Amado, J., Gil, O., Pousao-Ferreira, P., Vale, C., Reis-Henriques, M.A., “Organochlorine bioaccumulation and biomarkers levels in culture and wild white seabream (*Diplodus sargus*)”, *Chemosphere*, 73: 1669-1674 (2008).

Ferreira, M., Caetano, M., Antunes, P., Costa, J., Gil, O., Bandarra, N., Ferreira-Pousao, P., Vale, C., Reis-Henriques, M.A., “Assessment of contaminants and biomarkers of exposure in wild and farmed seabass”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73 (4): 579-588 (2010).

Frenzilli, G., Nigro, M., Lyons, B.P., “The comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments”, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 681: 80-92 (2009).

Gagnaire, B., Geffard, O., Xuereb, B., Margoum, C., Garric, J., “Cholinesterase activities as potential biomarkers: characterization in two freshwater snails, *Potamopyrgus antipodarum* (Mollusca, Hydrobiidae, Smith 1889) and *Valvata piscinalis* (Mollusca, Valvatidae, Muller 1774)”, *Chemosphere*, 71: 553-560 (2008).

Garcia-Medina, S., Razo-Estrada, C., Galar-Martinez, M., Cortez-Barberena, E., Gomez-Olivan, L.M., Alvarez-Gonzalez, I., Madrigal-Bujaidar, E., “Genotoxic and cytotoxic effects induced by aluminum in the lymphocytes of the common carp (*Cyprinus carpio*)”, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 153: 113-118 (2011).

Geldiay, R., Balık, S., “Türkiye Tatlı Su Balıkları (Ders Kitabı) III. Baskı”, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Su Ürünleri Temel Bilimler Bölümü. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları No: 46. Ders Kitabı Dizini No:16. *Ege Üniversitesi Basımevi*, Bornova-İzmir, 532 (1999).

Ghedira, j., Jebali, J., Bouraoui, Z., Banni, M., Chouba, I., Boussetta, H., “Acute effects of chlorpyrifos-ethyl and secondary treated effluents on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in *Carcinus maenas*”, *Journal of Environmental Sciences*, 21: 1467-1472 (2009).

Grisolia, C.K. and Starling, F.L.R.M., “Micronuclei monitoring of fishes from Lake Parana, under influence of sewage treatment plant discharges”, *Mutation Research*, 491: 39-44 (2001).

Gül, A., “Investigation of acute toxicity of chlorpyrifos-methyl on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) larvae”, *Chemosphere*, 59: 163-166 (2005).

Halappa, R., David, M., “Behavioural responses of the freshwater fish, *Cyprinus carpio* (Linnaeus) following sublethal exposure to chlorpyrifos”, *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 9: 233-238 (2009).

Hinton, D.E. and Lauren D.J., “Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes”, *American Fisheries Society Symposium*, 8: 51-65 (1990).

Hibiya, T., “An Atlas of Fish Histology. Normal and Pathological Features”, *Kodansha, Tokyo*, Japan. 147 (1982).

Hodgson, E., “Metabolism of Pesticides, Chapter 38”, *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*. 893-921 (2010).

ISO., “Water quality, Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish. Static method”, **ISO 7346-2**. 1-11 (1996).

Iyer, P., “Chapter 14. Developmental and Reproductive Toxicology of Pesticides”, **Handbook of Pesticide Toxicology, Volume 1. Principles**. 375-423 (2001).

Kavitha, P., Rao, J.V., “Toxic effects of chlorpyrifos on antioxidant enzymes and target enzyme acetylcholinesterase interaction in mosquito fish, *Gambusia affinis*”, **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 26: 192-198 (2008).

Kumar, R., Nagpure, N.S., Kushwaha, B., Srivastava, K.S., Lakra, W.S., “Investigation of the genotoxicity of malathion to freshwater teleost fish *Channa punctatus* (Bloch) using the micronucleus test and comet assay”, **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, 58: 123-130 (2010).

Lee, R.F., Steinert, S., “Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals”, **Mutation Research**, 544: 43-64 (2003).

Lloyd, R., “Pollution and Freshwater Fish”, **Oxford**, U.K. 176 (1992).

Luna, L.G., “Manual of histological staining methods of the armed forces”, Institute of Pathology. Third Edition. **McGraw-Hill Book Company**. USA. 258 (1968).

Mars, T.C., “Organophosphate poisoning”, **Pharmacol. Ther.**, 58: 51-66 (1993).

Metcalf, C.D., “Toxicopathic responses to organic compounds. In Fish diseases and disorders Vol 2, Non-infectious disorders”, Leatherland, J. F. and Woo, P. T. K. (Eds.) **CABI publishing. Wallingford**. UK. 386 (1998).

Minissi, S., Ciccotti, E., Rizzoni, M., “Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater”, **Mutat. Res.**, 367: 245-251 (1996).

Mitchelmore, C.L., Chipman, J.K., “DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring”, **Mutation Research**, 399: 135-147 (1998).

Morrison, J., “Fish histology and histopathology. Chapter 2. Normal Histology”, **United States Fish and Wildlife Service's National Conservation Training Center (USFWS-NCTC)**. <http://www.nctc.fws.gov>. 357, 12-69 (2007).

Mumford, S.L., “Chapter 13. Histology for finfish. National Wild Fish Health Survey (NWFHS) Laboratory Procedures Manual. Second Edition”, **United States Fish and Wildlife Service (USFWS), Olympia Fish Health Center. Olympia, Washington**. <http://www.fws.gov>. 12 (2004).

Neuparth, T., Bickham, J.W., Theodorakis, C.W., Costa, F.O., Costa, M.H., “Endosulfan induced genotoxicity detected in the gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., by means of flow cytometry and micronuclei assays”, *Environ. Contam. Toxicol.*, 76: 242-248 (2006).

NRA., “Review of chlorpyrifos”, *National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals Canberra, Australia*, 263 (2000).

Nwani, C.D., Lakra, W.S., Nagpure, N.S., Kumar, R., Kushwaha, B., Srivastava, S.K., “Mutagenic and genotoxic effects of carbo-sulfan in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis”, *Food and Chemical Toxicology*, 48: 202-208 (2010).

Odenkirchen, E.W., Eisler, R., “Chlorpyrifos hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review”, *U.S. Fish Wildl. Serv. Biol. Rep.* 85 (1.13): 34 (1988).

OECD, “Fish acute toxicity test. OECD Guidelines for Testing of Chemicals”, *OECD*, Paris (1981).

Okechukwu, E.O., Auta, J., Balogun, K.K., “Effects of acute nominal doses of chlorpyrifos-ethyl on some haematological indices of African Catfish *Clarias gariepinus*-Teugels”, *Journal of Fisheries International*, 2 (2): 190-194. (2007).

Okuşluk, Ö., “Mogan gölü’ndeki olası kirlenmenin sazan balıklarında (*Cyprinus carpio* L.) comet testi kullanılarak araştırılması”, *Gazi Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü*; Yüksek Lisans Tezi, 86 (2008).

Oruç, Ö.E., “Oxidative stres, steroid hormone concentrations and acetylcholinesterase activity in *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos”, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 96: 160-166 (2010).

Osman, A.G.M., Wuertz, S., Mekkawy, I.A., Exner, H.J., Kirschbaum, F., “Lead induced malformations in embryos of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822)”, *Environ. Toxicol.*, 22(4): 375-389 (2007).

Ramsdorf, W.A., Ferraro, M.V.M., Oliveira-Ribeiro, C.A., Costa, J.R.M., Cestari, M.M., “Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*”, *Environ. Monit. Assess.*, 158: 77-85 (2009).

Rao, J.V., Rani, C.H.S., Kavitha, P., Rao, R.N., Madhavendra, S.S., “Toxicity of chlorpyrifos to the fish *Oreochromis mossambicus*”, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70: 985-992 (2003).

Reisch, D.L. and Oshida, P.S., “Manual of methods in aquatic environment Research. Part 10. Short -Term Static Bioassays”, *FAO Fish Tech. Pap.* 247, 17- 33 (1987).

Rendon-von Osten, J., Ortiz-Arana, A., Guilhermino, L., Soares, A.M.V.M., “In vivo evaluation of three biomarkers in the mosquito fish (*Gambusia yucatana*) exposed to pesticides”, *Chemosphere*, 58: 627-636 (2005).

Roberts, R.J., “Fish Pathology”, 3rd edition. *Churchill Livingstone*, London 467 (2001).

Rose, R.L., Hodgson, E., Roe, R.M., “Chapter 28. Pesticides”, *Toxicology*, 663-697 (1999).

Rybakovas, A., Barsiene, J., Lang, T., “Environmental genotoxicity and cytotoxicity in the offshore zones of the Baltic and the North Seas”, *Marine Environmental Research*, 68: 246- 256 (2009).

Sepici-Dinçel, A., Benli, A.C.K., Selvi, M., Sarıkaya, R., Şahin, D., Özkul, I.A., Erkoç, F., “Sublethal cyfluthrin toxicity to carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings: Biochemical, hematological, histopathological alterations”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 1433-1439 (2009).

Simon, D., Helliwell, S., Robards, K., “Analytical chemistry of chlorpyrifos and diuron in aquatic ecosystems”, *Analytica Chimica Acta*, 360: 1-16 (1998).

Siu, S.Y.M., Lam, P.K.S., Martin, M., Caldwell, C.W., Richardson, B.J., “The use of selected genotoxicity assays in green-lipped mussels (*Perna viridis*): A validation study in Hong Kong coastal waters”, *Marine Pollution Bulletin*, 57: 479-492 (2008).

Siwicki, A.K. and Anderson, D.P., “Immunostimulation in fish: measuring the effects of stimulants by serological and immunological methods”, *Nordic Symp. Fish Immunol. May 19-22*. Lysekil, Sweden. (1993).

Spague, J.B., “Measurement of pollutant toxicity to fish: III. Sublethal effects and “safe” concentrations”, *Water Res.*, 5: 245–266 (1971).

Spitsbergen, J.M., Kent, M.L., “The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research-advantages and current limitations”, *Toxicol Pathol.*, 31: 62-87 (2003).

T.S.E., “Su kirliliği kontrolü, metod ve kuralları, zehirlilik denemeleri”, 5676, Ankara (1988).

Teh, S.J., Adams, S.M. and Hinton, D.E., “Histopathological biomarkers in freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress”, *Aquatic Toxicology*, 37: 51-70 (1997).

Turgut, C., Ornek, H., Cutright, T.J., “Pesticide residues in dried table grapes from the Aegean region of Turkey”, *Environ. Monit. Assess.*, 167: 143-149 (2010).

USDA, "Agriculture Chemical Usage Field Crop Study", *US Department of Agriculture*, Washington, DC, 396-432 (1994).

USEPA., "Interim Reregistration Eligibility Decision for Chlorpyrifos", September 2001; <http://www.epa.gov/pesticides/op>. (2001).

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., "Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review", *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57-149 (2003).

Varo, I., Navarro, J.C., Amat, F., Guilhermino, L., "Characterisation of cholinesterases and evaluation of the inhibitory potential of chlorpyrifos and dichlorvos to *Artemia salina* and *Artemia parthenogenetica*", *Chemosphere*, 48: 563-569 (2002).

Velisek, J., Sudova, E., Machova, J., Svobodova, Z., "Effects of sub-chronic exposure to terbutryn in common carp (*Cyprinus carpio* L.)", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73: 384-390 (2010).

Woke, G.N., Aleleye-Wokoma, I.P., "Effects of pesticide (chlorpyrifos-ethyl) on the fingerlings of catfish (*Clarias gariepinus*)", *Global Journal of Pure and Applied Sciences*, 15 (3&4): 265-266 (2009).

Xing, H., Wang, J., Li, J., Fan, Z., Wang, M., Xu, S., "Effects of atrazine and chlorpyrifos on acetylcholinesterase and carboxylesterase in brain and muscle of common carp", *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 30 (1): 26-30 (2010).

Xuereb, B., Lefevre, E., Garric, J., Geffard, O., "Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Linking AChE inhibition and behavioural alteration", *Aquatic Toxicology*, 94: 114-122 (2009).

Yasmashita, M., Tanaka, J., Ando, Y., "Human mortality in organophosphate poisonings", *Vet. Hum. Toxicol.*, 39: 84-85 (1997).

Yılayaz, Ö., "Chlorpyrifos-ethyl (insektisit)'in *Capoeta trutta* (Heckel, 1843) üzerindeki genotoksik etkisinin eritrosit mikronükleus testi ile belirlenmesi", *Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları*, 70-74 (2008a).

Yılayaz, Ö., "Chlorpyrifos-ethyl (pestisit; insektisit)'in *Barbus rajanorum mystaseus* (Heckel, 1843) üzerindeki genotoksik etkilerinin eritrosit mikronükleus testi ile belirlenmesi", *Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları*, 113-117 (2008b).

Yıldız, H. Y., Pulatsu, S. and Kurtoglu, F., "Baseline haematological and serological parameters of healthy Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)", *Animal Science Papers and Reports*, 15 (4): 213-217 (1997).

Yurtkuran, Z., <http://www.topraksukongre.org/sistem76.html> (2010).

Zeljezic, D., Garaj-Vrhovac, V., “Sister chromatid exchange and proliferative rate index in the longitudinal risk assessment of occupational exposed to pesticide”, *Chemosphere*, 46: 295-303 (2002).

EKLER

EK-1. Histolojik İncelemelerde Kullanılan Çözeltiler

BOUÏN SOLÜSYONU (Roberts, 2001)

Doymuş pikrik asit solüsyonu	75 mL
Formalin (% 37-40 formaldehit)	25 mL
Asetik asit (glacial)	5 mL

HARRIS ALUM HEMATOKSİLEN (Luna, 1968)

Hematoxylin crystal	5 g
Alkol, absolute	50 mL
Amonyum ve Potasyum Alum	100 g
Saf su	1000 mL
Mercuric oxide (kırmızı)	2.5 g
Glacial asetik asit	2-4 mL

HAZIRLANIŞI

- Hematoksilen alkol içinde, alum da suda ısıtılarak çözülür.
- Alum çözeltisi ateş üstünden alınıp iki çözelti karıştırılır.
- Çözelti karışımı mümkün olduğu kadar çabuk kaynatılır ve ateşten alınıp üzerine yavaşça merkürük oksit eklenir.
- Solüsyon koyu mor renk alıncaya kadar tekrar kaynatılır. Sonra kap hemen soğuk su içine oturtularak soğuyuncaya kadar tutulur. Her 100 mL boya için 2-4 mL glacial asetik asit eklenir. Boya kullanmadan önce süzülür (Benli, 2006)

EOSIN-PHLOXINE SOLÜSYONU (Luna, 1968)

Stok Eosin Solüsyonu

Eosin Y, suda çözülen	1 g
Distile su	100 mL
Phloxine B	1 g
Distile su	100 mL

EK-1. (Devam) Histolojik İncelemelerde Kullanılan Çözeltiler

Çalışma Solüsyonu

Stok Eosin solusyonu	25 mL
Stok Phloxine Solusyonu	2.5 mL
Alkol, % 95	195 mL
Glacial asetik asit	1 mL

Tüm çözeltiler alkol ve glacial asetik asit ile karıştırılır (Luna, 1968).

EK-2. Histolojide Kullanılan Bazı Terimler (Bruno and Poppe, 1996; Erer vd., 2000)

Yangı: Endojen ve eksojen çeşitli zararlı etkenlere karşı organizmanın gösterdiği vasküler, hümeral, sinirsel ve hücrel reaksiyonların tümüne verilen isimdir.

Albumin dejenerasyonu: (Bulanık şişkinlik): Daha hafif bir şişkinliği tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Sitoplazma şişkin, açık renkli ve granüller halinde koagüle proteinler içerdiğinden bulanıktır. Bu granüller protein yapısında oldukları için albumin dejenerasyonu adını almıştır.

Hidropik dejenerasyonu: Daha şiddetli akut hücre şişkinliği şekillerindendir. Hidropik dejenerasyonda hücre sitoplazmasında aşırı miktarda ve sitoplazmanın her tarafına yayılmış bir sıvı artışı vardır. Şiddetli olgularda su alan hücreler balon gibi şişmişlerdir.

Hiperemi: Arteriyel damarların dilatasyonu sonucu bir bölgeye arteriyel kanın fazlaca gelmesi olayıdır.

Pasif hiperemi: (Konjesyon): Venöz kanın dönüşünün engellenmesi veya dokuların bir bölgesinde veya tamamında birikmesi olayıdır.

Telangiektazi: Kılcal damarların dilatasyonudur.

Glomerulonefritis: Glomerulusta yangıdır.

Bransitis: Solungaçlarda yangı

Apoptozis: Programlanmış hücre ölümü. Çok hücreli organizmaların genetik şifrelerinde bulunan “hücre intiharı” programlarının gelişimsel veya çevresel uyarımlarla etkinleşmesi sonucu ortaya çıkan, gelişim ve farklılaşma sırasında organ yapısı ve işlevlerinin aktif değişimini sağlayan fizyolojik hücre ölümü.

Hipertrofi: Bir organın ya da dokunun büyüklüğündeki artmadır; o doku ya da organa özgü hücrelerin hacimce artışına bağlıdır.

Hiperplazi: Bir organın ya da dokunun büyüklüğündeki artmadır; o doku ya da organa özgü hücrelerin sayıca artışına bağlıdır.

Epiteliyal lifting: Epitel ayrılması

Nekroz: Bir veya daha fazla sayıda hücrenin, dokunun, ya da organın geri dönüşmez şekilde hasar görmesi sonucu görülen patolojik ölüm

Trombus: Canlı organizmalarda kan öğelerinin kalp ve damar iç yüzüne kitle halinde yapışması olayına tromboz, oluşan kitleye trombüs denir. Başlıca nedenler,

EK-2. (Devam) Histolojide Kullanılan Bazı Terimler (Bruno and Poppe, 1996; Erer vd., 2000)

kalp ve damar iç zarında bozukluk, kan akışının bozulması ve kanın pıhtılaşma eğiliminin artmasıdır.

Peritonitis: Karın organlarını örten zarın bir bölgede veya yaygın biçimde iltihaplanmasıdır.

Füzyon: Birleşme

Atrofi: Bir organ veya oluşumun, -herhangi bir nedenle- işlevi de ileri derecede azalmak veya ortadan kalkmak üzere küçülmesi, körelme.

Kompresyon atrofi: Hehangi bir vücut kısmının baskı altında kalışı nedeni ile gelişen atrofi

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı :ÇELİK ÇAKIROĞULLARI, Gül
 Uyuğu :T.C.
 Doğum tarihi ve yeri :13. 10. 1976 Ankara
 Medeni hali :Evli
 Telefon :0 (312) 327 41 81/1162/1165
 Faks :0 (312) 327 41 56
 e-mail :gcakirogullari@yahoo.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Ankara Üniversitesi/Su Ürünleri A.B.D.	2006
Yüksek lisans	Ankara Üniversitesi/Su Ürünleri A.B.D.	2001
Lisans	Ankara Üniversitesi/Ziraat Fakültesi/Su Ürünleri	1998
Lise	Özel Antalya Fen Lisesi	1994

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2010-Devam ediyor	Ulusal Gıda Referans Laboratuar Müd./Dioksin	Mühendis
2007-2010	Ankara İl Kontrol Lab. Müd./Dioksin	Mühendis
2002-2007	Ankara İl Kontrol Lab. Müd./Kalıntı	Mühendis
1998-2002	Ankara Ün./Ziraat Fak./Su Ürünleri A.B.D.	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce, Almanca

Yayınlar

1.	Bekcan, S., Dogankaya, L., Çelik Çakiroğulları, G. 2006. Growth and body composition of European catfish (<i>Silurus glanis</i> L. 1758) fed diets containing different percentages of protein. The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh. 58 (2); 137-142 p. SCI-EXPANDED
2.	Bozkurt, Y., Bekcan, S., Çakiroğulları, G.Ç. 2006. Seasonal changes of body composition of <i>Alburnus orontis</i> , S. 1882. Ankara University Faculty of Agriculture Journal of Agricultural Sciences. 12 (1); 70-73 p. (In Turkish)
3.	Bozkurt, Y., Çelik Çakiroğulları, G. , Seçer, S. 2006. Growth of tilapia fry (<i>Oreochromis niloticus</i>) fed diets containing different percentages of protein. Journal of Agriculture Engineering. January-June number:346. 44-47 s. (In Turkish)
4.	Uçar, Y., Kılıç, D., Oymael, B., Çelik Çakiroğulları, G. , Bozkurt, E. N. 2008. PCDD/F, dl-PCB and indicator PCBs in whiting, horse-mackerel and anchovy in Black Sea in Turkey. BIES 08 Blacksea International Environmental Symposium Proceedings. 25-29 August 2008. Oral presentation.
5.	Traag, WA., Immerzeel, J., Kraats, C., Lee, MK., Hoogenboom, LAP., Oymael, B., Ucar, Y., Kılıç, D., Çakiroğulları, GC. 2008. Levels of PCDD/Fs, dioxin-like PCBs in butter from Turkey. Organohalogen compounds. Vol 70; 2404-2407 p. (As a poster in Dioxin congress in Birmingham United Kingdom August 2008).
6.	Traag, W., Vanderweg, G., Vandekraats, C., Uçar, Y., Kılıç, D., Çelik Çakiroğulları, G. , Oymael, B. 2009. Determination of PBDEs in Turkish butterfats. 7. International Attended Turkish Toxicology Institution Congress "Rational use of toxicology in human health and environmental protection". S19 page 59. (In Turkish) Oral presentation. 30 Mayıs-1 Haziran 2009.
7.	Gül Çelik Çakiroğulları, Selçuk Seçer. 2009. Determination of Polychlorinated biphenyls and DDTs in Whiting (<i>Gadus merlangus</i> L.1758) and Horse mackerel (<i>Trachurus mediterraneus</i> S.1868) from the İzmit Bay, Türkiye. 15th National Aquaculture and Fisheries Symposium. Oral presentation. 01-04 July 2009. (In Turkish)
8.	Ucar, Y., Çakiroğulları, GC. , Kılıç, D., 2009. Kocaeli ilinde gıda örneklerinde poliklorlu dibenzo-para-dioksin, poliklorlu dibenzofuran ve dioksin benzeri poliklorlu bifenillerin miktarları. 1. Gıda Güvenliği Kongresi. 4 Aralık 2009. Harbiye Askeri Müze ve Kültür Sitesi. İstanbul www.gidaguvenligikongresi.org. Gıda Güvenliği Derneği. (Oral presentation) (In Turkish)
9.	Ucar, Y., Çakiroğulları, GC. , Kılıç, D., 2010. Dioxin regulations in food and feedingstuffs and analytical basis in Turkey. Ulusal Gıda Referans Laboratuvar Müdürlüğü. 30 Mart 2010. Dioksin analizleri ve CALUX teknolojisi Workshop. (In Turkish)
10.	Çelik Çakiroğulları, G. , Seçer, S. 2009. Effects of organochlorine insecticide DDT on aquatic systems and studies in Turkey. Organik klorlu insektisit DDT'nin sucul sistemlere etkisi ve Türkiye'de yapılan çalışmalar. Journal of Agriculture Engineering. Ziraat Mühendisliği Dergisi. Temmuz-Aralık sayı:353. 34-39 s. (In Turkish)
11.	Çelik Çakiroğulları, G. , Uçar, Y., Kılıç, D. 2009. Effects of dioxin and dioxin-like PCBs on nature and environment. Dioksin ve dioksin benzeri poliklorlubifenillerin doğaya ve çevreye etkisi. Journal of Agriculture Engineering. Ziraat Mühendisliği Dergisi. Temmuz-Aralık sayı:353.40-43 s. (In Turkish)

12.	Çelik Çakıroğulları, G. , Kılıç, D., Uçar, Y. 2010. Levels of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzo-p-furans and polychlorinated biphenyls in farmed Sea Bass (<i>Dicentrarchus labrax</i>) and Sea Bream (<i>Sparus aurata</i>) from Turkey. Food Control Vol 21, 1245-1249. doi:10.1016/j.foodcont.2010.02.010. SCI
13.	Gül Çelik Çakıroğulları , Yunus Uçar, Berrin Oymael, Edibe Nurzen Bozkurt, Devrim Kılıç. 2010. PCDD/F, dl-PCB and indicator PCBs in whiting, horse-mackerel and anchovy in Black Sea in Turkey.Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. Vol 10 Number 3. SCI-EXPANDED
14.	Çelik Çakıroğulları, G. , Uçar, Y., Kılıç, D. 2011. PCDD/F and PCB contamination in <i>Atherina boyeri</i> (Risso, 1810) from Turkey. Food Control. 22(1):67-71.SCI
15.	Çelik Çakıroğulları, G. , Uçar, Y., Kılıç, D. 2010. DETERMINATION OF DIOXIN, FURAN AND POLYCHLORINATED BIPHENYLS IN SEA BASS FILLETS (<i>Dicentrarchus labrax</i>). 1. Ulusal Palandöken Toksikoloji Sempozyumu. 28-30 Mayıs 2010. Erzurum. Poster (In Turkish)
16.	Çelik Çakıroğulları G. , Ateş, M., Kayım, M., Kocabaş, M., Can, E., Kızak, V. 2010. Seasonal changes of body composition and fatty acid composition of <i>Salmo trutta</i> population caught from Munzur Creek. 2. Ulusal Alabalık Sempozyumu. National Trout Symposium. 6-8 Temmuz 2010 Karaman. Oral presentation. (In Turkish).
17.	Ateş, M., Çelik Çakıroğulları G. , Kayım, M., Kocabaş, M., Can, E., Kızak, V. 2010. Seasonal changes of body composition and fatty acid composition of <i>Salmo trutta</i> population caught from the streams flowing through Uzungöl. 2. Ulusal Alabalık Sempozyumu. National Trout Symposium. 6-8 Temmuz 2010 Karaman . Poster. (In Turkish).
18.	Kılıç, D., Çelik Çakıroğulları, G. , Uçar, Y. 2010. Türkiye’de Gıdalarda Dioksin Analizi ve Risk Değerlendirme. Dioxin analysis and risk assessment in food in Turkey. POP İzleme: POPs Monitoring Workshop. Çevre ve Sağlık Çalıştayı. 3-5 Kasım 2010. Antalya.(Oral presentation). (In Turkish). Invited speaker.
19.	Çakıroğulları, G.C. , Traag, W.A., Vanderweg, G., Immerzeel, J., Kraats, C., Lee, M.K., Hoogenboom, L.A.P., Uçar, Y., Kılıç, D., 2010. Levels of PCDD/Fs, PCBs, PAHs, OCL pesticides, PBDD/Fs, PBDEs and heavy metals in four fish species from Turkey. Dioxin congress in Texas USA September 2010.(poster)
20.	Çakıroğulları, G.C. , Benli Karasu, C.A., 2010. Toxicity of PCBs on Aquatic Systems.Journal of National Food Reference Laboratory. 1 (1). 77-82 (In Turkish).
21.	Çelik Çakıroğulları, G. , Seçer, S. 2010. Levels of DDTs and indicator polychlorinated biphenyls in Whiting (<i>Merlangius merlangus</i> L.1758) and Horse mackerel (<i>Trachurus mediterraneus</i> S.1868) from the İzmit Bay, Turkey. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. Vol:10, Number:3. SCI-EXPANDED
22.	Çelik, G. , Ölmez, M. 2001. Farklı oranlarda virginiamycin ilaveli beslemenin Aynalı Sazan (<i>C. carpio</i> L. 1758) yavrularının bazı somatik indeksleri ile besin madde içerigine etkileri. The effects of virginiamycin as a growth promoter on somatic indices and body composition of mirror carp fry (<i>C. carpio</i> L. 1758). Oral presentation. XI. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu Bildirileri. 04-06 Eylül 2001. Cilt 2. Mustafa Kemal Üniversitesi Yayınları No:8. Hatay.
23.	Çelik, G. , Ölmez, M. 2003. Virginiamycin ilaveli beslemenin Aynalı Sazan (<i>C. carpio</i> L. 1758) yavrularının büyüme ve yem değerlendirmesine etkisi. The effects of virginiamycin as a growth promoter on growth performance and feed conversion ratio of mirror carp fry (<i>C. carpio</i> L. 1758). Süleyman Demirel Üniversitesi Egirdir Su Ürünleri Fakültesi (Journal of Faculty of Fisheries and Aquaculture) Dergisi. 2 (10); 72-78 s.

24.	Çelik, G., Ölmez, M. 2004. The effects of virginiamycin as a growth promoter on somatic indices and body composition of mirror carp fry (<i>C. carpio</i> L. 1758). Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi (Journal of Natural and Applied Sciences). 8 (1); 7-10 p.
25.	Gül Çelik Çakıroğulları, Yunus Uçar ve Devrim Kılıç. 2010. DİOKSİN ve DİOKSİN BENZERİ POLİKLORLU BİFENİLLERİN RISK YÖNETİMİ VE TÜRKİYE’DE SU ÜRÜNLERİ VE ÇEVRE ÖRNEKLERİNDE YAPILAN ÇALIŞMALAR. Risk management of dioxins and dioxin-like PCBs and studies on aquatic and environmental systems in Turkey. Aquaculture Engineers Association Journal.
26.	Gül Çelik Çakıroğulları. 2010. ACCUMULATION OF POLYCHLORINATED BIPHENYLS IN AQUATIC ORGANISMS AND ENVIRONMENT. E-Journal of New World Sciences Academy. Ecological Life Sciences. 5 (3). 274-296.
27.	Gül Çelik Çakıroğulları, Selçuk Seçer. 2010. Poliklorlu Bifeniller ve Sucul Yaşam. Polychlorinated Biphenyls and Aquatic Life. Ankara University of Journal of Environmental Sciences (Accepted).
28.	Devrim Kılıç, Gül Çelik Çakıroğulları, Yunus Uçar. Dioxins and Risk in Foodstuffs. Journal of National Food Reference Laboratory. 1 (1). 51-53. (In Turkish).
29.	Zayde Alçiçek, Özge Zencir, Gül Çelik Çakıroğulları, Hasan H. Atar. 2010. The Effect of Liquid Smoking of Anchovy (<i>Engraulis encrasicolus</i> , L. 1758) Fillets on Sensory, Meat Yield, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Content and Chemical Changes. Journal of Aquatic Food Product Technology, 19: 264-273. SCI-EXPANDED
30.	Ahmet Şeref Korkmaz, Gül Çelik Çakıroğulları. 2010. Effects of partial replacement of fish meal by dried baker’s yeast (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) on growth performance, feed utilization and digestibility in koi carp (<i>Cyprinus carpio</i> L., 1758) fingerlings. Journal Of Animal and Veterinary Advances. 10(3), 346-351. SCI-EXPANDED
31.	Mehmet Ateş, Gül Çelik Çakıroğulları. 2011. Akuakültürde Vitamin C (Askorbik Asit) kullanımı ve Önemi. Usage and importance of Vitamin C in Aquaculture. Journal of Agriculture Engineering. Ziraat Mühendisliği Dergisi. Accepted.
32.	Gül Çelik Çakıroğulları, Devrim Kılıç. ANALYTICAL TECHNIQUES OF NON DIOXIN-LIKE POLYCHLORINATED BIPHENYLS. Journal of National Food Reference Laboratory. (In Turkish). Kabul edildi.
33.	Devrim Kılıç, Gül Çelik Çakıroğulları, Yunus Uçar, Rob Theelen, Wim Traag, 2011. Comparison of PCDD/F and dl-PCB levels of Turkish foodstuffs in an industrial and a rural area, local and market products, and assessment of dietary intake. Food Additives and Contaminants Part A. Accepted. SCI. DOI: 10.1080/19440049.2011.565482
34.	Gül Çelik Çakıroğulları, Yunus Uçar, Devrim Kılıç, 2011. DETERMINATION OF DIOXIN, FURAN AND POLYCHLORINATED BIPHENYLS IN SEA BASS FILLETS (<i>Dicentrarchus labrax</i>). Ege University Faculty of Fisheries, Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. Accepted.
35.	Gül Çelik Çakıroğulları, Selçuk Secer. 2011. Spatial and Seasonal Distribution of Organochlorine Contaminants in Surface Water and Sediment from the İzmit Bay, Turkey. Süleyman Demirel University, Journal of Natural and Applied Sciences. Accepted.
36.	Gül Çelik Çakıroğulları, Selçuk Secer. 2011. Seasonal variation of organochlorine contaminants in Bonito (<i>Sarda sarda</i> L.1758) and Anchovy (<i>Engraulis encrasicolus</i> L.1758) in Black Sea region, Turkey. Chemosphere. SCI. (submitted)

37.	Yunus Uçar, Wim Traag, Jaap Immerzeel, Cornelis Kraats, Martijn van der Lee, Ron Hoogenboom, Guido van der Weg, Gül Çelik Çakıroğulları , Berrin Oymael, Devrim Kilic 2011. Levels of PCDD/Fs, PCBs and PBDEs in butter from Turkey and estimation of dietary intake. Food Additives and Contaminants PartA. Accepted. SCI. DOI: 10.1080/19440049.2011.576435
38.	Gül Çelik Çakıroğulları , Aysel Çağlan Karasu Benli, Aylin Sepici-Dinçel, Mahmut Selvi, Rabia Sarıkaya, Figen Erkoç. 2011. Chlorpyrifos-ethyl'in subletal dozunun sazan balıklarının (<i>C. carpio</i> L.1758) hematolojik ve biyokimyasal parametreleri üzerine etkilerinin belirlenmesi. 16. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, 25-27 Ekim Antalya (Poster)
39.	Ali Gül, A. Çağlan Karasu Benli, Ayşen Ayhan, Burcu Koçak Memmi, Mahmut Selvi, Aylin Sepici-Dinçel, Gül Çelik Çakıroğulları , Figen Erkoç. 2011. Sazan balığı (<i>C. carpio</i> L. 1758) fingerlinglerinde propoxur'un genotoksik etkisinin eritrosit mikronükleus testi ile belirlenmesi. 16. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, 25-27 Ekim Antalya (Poster)
40.	Gül Çelik Çakıroğulları , A. Çağlan Karasu Benli. 2011. Histologic and genotoxic effects of chlorpyrifos-ethyl on carp fingerlings (<i>C. carpio</i> L., 1758). 7th MGPR International Symposium, "Paolo Cabras". Greece. 09-11 November 2011 (Poster).