T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇANAKKALE CİVARINDAN TOPLANAN *LISSOTRITON VULGARIS* (LINNAEUS, 1758) (AMPHIBIA: URODELA) ÖRNEKLERİNDE MİKRONUKLEUS ANALİZİ VE NUKLEAR ANOMALİLER

Bircan TAŞCI

Biyoloji Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: **29/01/2018**

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Cemal Varol TOK

ÇANAKKALE

Bircan TAŞCI tarafından Prof. Dr. Cemal Varol TOK yönetiminde hazırlanan ve **29/01/2018** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan "**Çanakkale Civarından Toplanan *Lissotriton vulgaris* (Linnaeus, 1758) (Amphibia: Urodela) Örneklerinde Mikronukleus Analizi ve Nuklear Anomaliler**" başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Prof. Dr. Cemal Varol TOK ……

Başkan

Prof. Dr. Sibel HAYRETDAĞ ……

Üye

Doç. Dr. Kerim ÇİÇEK ……

Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ
Müdür
Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:……

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir. Proje Numarası: FYL-2016-763.

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Bircan TAŞCI

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesinde her türlü bilgi, deneyim ve desteğini esirgemeyen saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Cemal Varol TOK'a teşekkürlerimi sunarım. Yine çalışmamda bilimsel katkılarını esirgemeyen ve bana sürekli yardımda bulunarak yol gösteren sayın hocam Prof. Dr. Sibel HAYRETDAĞ'a teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmalarım sırasında bilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın Arş. Gör. Dr. Mert GÜRKAN'a ve doktora öğrencisi sevgili Batuhan Yaman YAKIN'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasına desteklerinden ötürü Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne, FYL-2016-763 no'lu proje ile çalışmaya maddi destek sağladıkları için Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın başından sonuna kadar tüm zorluklara karşı benimle birlikte mücadele eden ve hayatımın her aşamasında olduğu gibi eğitimimde de bana en büyük fedakarlığı gösteren değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmam boyunca desteklerini ve tecrübelerini esirgemeyen eniştem Dr. Serdar ÖZYALIN ve yol göstericim olan canım ablam Öğr. Gör. Selcan ÖZYALIN'a teşekkür ederim.

Bircan TAŞCI

Çanakkale, Ocak 2018

SİMGELER VE KISALTMALAR

♀♀	Dişi bireyler
♂♂	Erkek bireyler
f	Frekans
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
ml	Mililitre
mg	Miligram
p	Önemlilik Değeri
U	Mann-Whitney U Test Değeri
%	Yüzde Oranı
ark.	Arkadaşları
$CuSO_4$	Bakır Sülfat
Cyt-B	Cytochalasin-B
FISH	Floresan In Situ Hibridizasyon
KA	Kromozom Anormallikleri
KKD	Kardeş Kromatit Değişimi
L	Litre
LC_{50}	%50 Öldürücü Konsantrasyon
MN	Mikronukleus
NA	Nuklear Anomaliler
SD	Standart Sapma
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences

ÖZET

ÇANAKKALE CİVARINDAN TOPLANAN *LISSOTRITON VULGARIS* (LINNAEUS, 1758) (AMPHIBIA: URODELA) ÖRNEKLERİNDE MİKRONUKLEUS ANALİZİ VE NUKLEAR ANOMALİLER

Bircan TAŞCI
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi
Danışman : Prof. Dr. Cemal Varol TOK
29/01/2018, 32

Bu çalışmada, Çanakkale'nin iki farklı lokalitesinden toplanan (Kalabakbaşı köyü 12 (5♂♂, 7♀♀), Kirazlı köyü 9 (4♂♂, 5♀♀)) *Lissotriton vulgaris* örnekleri değerlendirilmiştir. *L. vulgaris* örneklerinden hazırlanan kan preparatlarında genetik materyaldeki hasarın göstergelerinden biri olan mikronukleus (MN) ve nuklear anomaliler (NA) belirlenmiştir. Çalışmada mikronukleusun yanısıra binukleat, tomurcuklu nukleus, loplu nukleus ve çentikli nukleus olmak üzere 4 tip nuklear anomaliye ilaveten sitoplazmik vakuol ve mikrosit saptanmıştır. Kalabakbaşı köyü örneklerinde ortalama MN sayısı 9,25±2,02, MN frekansı % 0,3, NA frekansı % 2,37; Kirazlı köyü örneklerinde MN sayısı 15,22±2,98, MN frekansı % 0,5, NA frekansı 4,54'dur. Mann-Whitney U testi kullanılarak gerçekleştirilen istatistiksel analizler neticesinde iki lokalite arasında sırasıyla çentikli (p=0,001), tomurcuklu (p=0,006) ve loblu (p=0,008) nuklear anomaliler bakımından yüksek düzeyde anlamlı fark bulunmuştur. Kalabakbaşı lokalitesindeki dişi bireylerde ortalama toplam NA sayısı 69,29±26,16, NA frekansı % 2,30; Kirazlı lokalitesindeki dişi bireylerde toplam NA sayısı 143,20±35,37, NA frekansı % 4,77 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, NA sayıları bakımından Kalabakbaşı ve Kirazlı lokalitelerindeki *L. vulgaris* dişi (p=0,007) ve erkek (p=0,050) populasyonları kendi aralarında karşılaştırıldığında, önemli derecede fark bulunmuştur. Ayrıca cinsiyet karşılaştırılması yapıldığında iki lokalitede de toplam MN ve NA sayısı bakımından önemli fark bulunmadığı gözlemlenmiştir.

Anahtar sözcükler: *Lissotriton vulgaris*, Çanakkale, Amfibi, Urodela, Mikronukleus Testi, Nuklear Anomali.

ABSTRACT

MICRONUCLEUS ANALYSIS AND NUCLEAR ABNORMALITIES IN THE *LISSOTRITON VULGARIS* (LINNAEUS, 1758) (AMPHIBIA: URODELA) SPECIMENS COLLECTED IN THE VICINITY OF ÇANAKKALE

Bircan TAŞCI

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master of Science Thesis in Biological Science

Advisor : Prof. Dr. Cemal Varol TOK

29/01/2018, 32

In this study, *Lissotriton vulgaris* samples collected from different locations of Çanakkale (Kalabakbaşı; 12 (5♂♂, 7♀♀), Kirazlı; 9 (4♂♂, 5♀♀)) were evaluated. In blood preparations prepared from specimens, micronucleus (MN) and nuclear abnormalities (NA), one of indicators of damage in genetic material, were determined. Cytoplasmic vacuole and microcytes were detected in addition to micronucleus and four types of nucleolar anomalies, binucleate, blebbed nucleus, lobed nucleus and notched nucleus in the study. In Kalabakbaşı locality samples, the mean number of MN was calculated 9,25±2,02, MN frequency as 0,3%, NA frequency as 2,37%; in Kirazlı locality samples MN number was calculated 15,22±2,98, MN frequency as 0,5% and NA frequency as 4,54. Statistical analyzes using Mann-Whitney U test revealed a significant difference between the two localities in terms of notched (p=0.001), blebbed (p=0.006) and lobulated (p=0.008) nuclear abnormalities, respectively. The mean total number of NA was calculated as 69.29±26.16, the frequency of NA as 2.30% in the female individuals collected from Kalabakbaşı locality; the total number of NA was calculated as 143.20±35.37 and NA frequency as 4.77% in the female individuals collected from Kirazlı locality. According to the results obtained, when comparing in each other *L. vulgaris* female (p=0,007) and male (p=0,050) populations in Kalabakbaşı and Kirazlı localities were found the significance differences in NA numbers. In addition, when gender was compared, it was observed that there was no significant difference in the total number of MN and NA at two localities.

Keywords: *Lissotriton vulgaris*, Çanakkale, Amphibia, Urodela, Micronucleus Test, Nuclear Abnormality.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI iii
TEŞEKKÜR iv
SİMGELER VE KISALTMALAR v
ÖZET vi
ABSTRACT viii
ŞEKİLLER DİZİNİ xi
ÇİZELGELER DİZİNİ xii
BÖLÜM 1
GİRİŞ 1
BÖLÜM 2
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 4
BÖLÜM 3
MATERYAL VE YÖNTEM 9
3.1. Örneklerin Hazırlanması 9
3.2. Mikronukleus Analizi 9
3.3. Yayma Kan Preparatlarının İncelenmesi 10
3.4. İstatistiksel Değerlendirmeler 10
BÖLÜM 4
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 11
4.1. Mikronukleus ve Diğer Nuklear Anomaliler 11
4.2. Lokalite ve Cinsiyete Bağlı Olarak Yapılan Ölçümler 15
4.3. Tartışma 21
BÖLÜM 5
SONUÇ VE ÖNERİLER 24
KAYNAKLAR 26
ÖZGEÇMİŞ I

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 4.1.1. *Lissotriton vulgaris* örneğine ait normal eritrositler (özgün) 11
Şekil 4.1.2. *Lissotriton vulgaris* örneğine ait mikronukleus (özgün) 12
Şekil 4.1.3. *Lissotriton vulgaris* örneğine ait çentikli nukleus (özgün) 12
Şekil 4.1.4 *Lissotriton vulgaris* örneğine ait loblu nukleus (özgün) 13
Şekil 4.1.5 *Lissotriton vulgaris* örneğine ait tomurcuklu nukleus (özgün) 13
Şekil 4.1.6 *Lissotriton vulgaris* örneğine ait binukleat hücre (özgün) 14
Şekil 4.1.7 *Lissotriton vulgaris* örneğine ait sitoplazmik vakuol bulunduran hücre (özgün) 14
Şekil 4.1.8 *Lissotriton vulgaris* örneğine ait mikrosit (özgün) 15
Şekil 4.2.1. Kalabakbaşı ve Kirazlı'dan toplanan *L. vulgaris* örneklerindeki ortalama mikronukleus ve nuklear anomali sayıları 16
Şekil 4.2.2. Kalabakbaşı ve Kirazlı'dan toplanan *L. vulgaris* dişi bireylerin ortalama mikronukleus ve nuklear anomali sayıları 17
Şekil 4.2.3. Kalabakbaşı ve Kirazlı'dan toplanan *L. vulgaris* erkek bireylerin ortalama mikronukleus ve nuklear anomali sayıları 18
Şekil 4.2.4. Kalabakbaşı'ndan toplanan *L. vulgaris* dişi ve erkek bireylerin ortalama mikronukleus ve nuklear anomali sayıları 19
Şekil 4.2.5. Kirazlı'dan toplanan *L. vulgaris* dişi ve erkek bireylerin ortalama mikronukleus ve nuklear anomali sayıları 20

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 4.2.1. Kalabakbaşı ve Kirazlı bölgelerindeki *Lissotriton vulgaris* örneklerine ait MN ve toplam NA istatistikleri 16
Çizelge 4.2.2. Kalabakbaşı ve Kirazlı bölgelerindeki *L. vulgaris* dişi bireylere ait toplam NA istatistikleri 17
Çizelge 4.2.3. Kalabakbaşı ve Kirazlı bölgelerindeki *L. vulgaris* erkek bireylere ait toplam NA istatistikleri 18
Çizelge 4.2.4. Kalabakbaşı bölgesindeki *L. vulgaris* erkek ve dişi bireylere ait MN ve toplam NA istatistikleri 19
Çizelge 4.2.5. Kirazlı bölgesindeki *L. vulgaris* erkek ve dişi bireylere ait MN ve toplam NA istatistikleri 20

BÖLÜM 1
GİRİŞ

Amfibiler, sucul ve agro ekosistemlerde önemli organizmalar olup, tarım zararlılarının en önemli doğal düşmanlarıdır (Feng ve ark., 2004). Çevresel koşullardaki değişimlere karşı oldukça hassas olmaları, yaşamlarının belirli periyotlarını tamamen suda geçirmeleri ve derilerinin oldukça hassas olması sebebiyle amfibiler biyoindikatör canlılardır (Lambert, 1996; Schuytema ve Nebeker, 1999).

Sucul kirleticiler, suda yaşayan canlıların populasyon, komünite ve ekosistem düzeylerini, populasyon yoğunluklarını, organlarının fonksiyonlarını, üreme durumlarını, hayatta kalmalarını yani sonuç olarak biyoçeşitliliğini etkiler (Bolognesi ve Hayashi, 2011). Tarımsal, endüstriyel ve madene yönelik çalışmalarda olduğu gibi birçok sebepten dolayı meydana gelen pestisit kontaminasyonunun, hedef organizmalarla birlikte hedef olmayan organizmalara da etkisi vardır (Pimentel ve ark., 1998). Pestisit kontaminasyonu, bu çalışma alanları civarında bulunan amfibi populasyonlarındaki azalmaların en önemli sebeplerinden birisidir (Sparling ve ark., 2001).

Lissotriton vulgaris omurgalı hayvanların Amphibia (Çift Yaşamlılar) sınıfına ait Urodela (Kuyruklu Kurbağalar) takımının Salamandridae familyası üyesidir. *L. vulgaris* örnekleri, Türkiye'nin özellikle kuzey batısında yaygın dağılış gösteren bir amfibi türüdür (Özeti ve Yılmaz, 1994). Amfibilerin çoğu, özellikle üreme zamanı olmak üzere yaşamları boyunca suya bağımlı olmaları sebebiyle oluşacak her türlü kimyasal değişimlerden etkilenmektedirler (Gürkan ve ark., 2012).

Genetik materyaldeki hasarları belirlemek amacıyla in vivo ve in vitro pek çok test kullanılmaktadır. Bu testler; "*Salmonella*/Mikrozom mutajenite (Ames) testi", "Tek hücre jel elektroforez (Comet) testi", "Kromozom anormallikleri (KA) testi", "Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi" ve günümüzde yaygın olarak kullanılan "Mikronuklues testi"dir (Şekeroğlu-Atlı ve Şekeroğlu, 2011a).

Kimyasal maddelerin mutajenik etkilerinin araştırılmasında kullanılan Ames testi, yaygın kullanılan bakteriyel bir testtir. Bu testte gerekli aminoasit olan histidini sentezleyemeyen ve önceden var olan mutasyonlara sahip *Salmonella typhimurium* bakterisinin suşu kullanılmaktadır. Önceden var olan bu mutasyonların bulunduğu genlerin yakınında bulunan yeni mutasyonlar, genin fonksiyonunu eski haline getirmekte ve hücrelerin histidin sentezleyebilmesine olanak sağlamaktadır. Bu yeni mutasyona uğramış hücreler, histidin yokluğunda büyüyebilmekte ve koloniler oluşturabilmektedir. Bu

nedenle, test genellikle "geri dönüşüm testi" olarak adlandırılmaktadır. (Ames ve ark., 1975; Mortelmans ve Zeiger, 2000).

Singh ve ark., (1988) tarafından geliştirilen Comet testi (tek hücre jel elektroforez), hassas, hızlı ve uygulanabilirliği kolay olan bir testtir. Bu test, fiziksel ve kimyasal ajanların yol açtığı DNA kırıklarının tayininde, DNA hasarı ve onarım bozukluğunun tespitinde kullanılan bir yöntemdir (Burlibasa ve Gavrila, 2011).

Kromozom anormallikleri (KA) testi, genetik materyaldeki onarılmamış çift zincir kırıkları ve bu zincir kırıklarının yanlış onarılmasından kaynaklı oluşan yapısal ve sayısal kromozomal anormallikleri saptamada kullanılan bir testtir. Bu testin hassasiyeti yüksek olmasına rağmen, kromozomal anormalliklerin tespiti oldukça yavaş ve zor bir süreçtir (Yüzbaşıoğlu ve ark., 2014).

Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi, genetik materyaldeki kardeş kromatidler arasında oluşan değişimleri tespit etmektedir. DNA eklentileri oluşturan ya da DNA replikasyonu ile etkileşimde bulunan ajanların mutajenik ve karsinojenik etkilerini belirleyerek, kromozomlardaki yapısal hasarları saptamada kullanılan bir testtir (Latt ve Schreck, 1980; Kontaş ve ark., 2011).

Mikronukleus testi (MN), 1950'li yılllarda bitki hücrelerinde kromozomal anormalliklerin belirlenmesinde, 1970'li yıllarda kimyasal karsinojenleri belirlemek üzere hayvan hücrelerinde ve daha sonra insan periferik kan lenfosit kültürlerinde kullanılan bir testtir. Birçok araştırmada MN testi için lenfosit hücre kültürleri ve kemik iliği hücreleri veya periferal kan hücrelerinin analizi gibi teknikler kullanılmıştır (Şekeroğlu ve Şekeroğlu-Atlı, 2011b). Deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda, sitogenetik harabiyetin göstergesi olarak kullanılan MN çalışmalarının sayısının 1980'den sonra arttığı belirlenmiştir (Demirel ve Zamani, 2002). MN testi; kromozom hasarlarına sebep olabilecek fiziksel etkenlerin ve kimyasal maddelerin karsinojenik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesinde, ilaçların toksik etkilerinin ve güvenilirliğinin araştırılmasında, kanserden korunmada ve kanserin takip edilmesinde oldukça yaygın kullanılan bir biyoizlem testi olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte, elektromanyetik radyasyona dahil olan iyonlaştırıcı radyasyon ve mikro dalga ışınlarının klastojenik etkilerinin; sigara, pestisit, nanomateryaller, gıda katkı maddeleri ve parazitik hastalıklara yol açan bulaşıcılar gibi çevresel ve mesleki etkilerin ortaya çıkarılmasında önemlidir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu-Atlı, 2011b).

Mikronukleuslar (MN), mitoz bölünme sonucunda sitoplazma içerisinde yer alan, ana nukleusdan bağımsız, tam kromozom veya sentromersiz kromozom parçalarından

meydana gelen oluşumlardır (Savran, 2010). MN'ler hücre döngüsünün kontrol mekanizmasında bulunan genlerdeki eksikliklerden, iğ iplikçiklerindeki hatalardan, kinetokor veya mitotik aygıtın diğer parçalarından ve kromozomal hasara sebep olan hatalardan dolayı meydana gelmektedir. Anöploidiyi uyaran ajanlar, sentromerlerin hatasız bir şekilde bölünmesini ve iğ iplikçiklerinin işlevini yerine getirmesini engelleyerek; klastojenler ise kromozom kırıkları oluşturarak MN oluşumuna sebep olmaktadırlar (Zuno ve ark., 1994).

Amfibi eritrositlerinin nukleus içermesi sebebiyle mikronukleus oluşumlarını MN testi ile belirlemek oldukça pratiktir (Şekeroğlu-Atlı ve Şekeroğlu, 2011a).

Genotoksik hasarın belirlenmesi amacıyla bir çok canlı türü üzerine mikronukleus analiz çalışmaları dünya çapında hızla artmış olmasına rağmen (Feng ve ark., 2004; Saleh ve Sarhan, 2007; Strunjak-Perovic ve ark., 2010; Özparlak ve ark., 2011; Arıkan ve ark., 2012; Çavaş ve ark., 2012; Frossard ve ark., 2013; Davis ve Floyd, 2014) *L. vulgaris* türü üzerine herhangi bir mikronukleus analiz çalışmasına rastlanmamıştır.

Son zamanlarda Kazdağları'nda maden çalışmalarının yoğun bir şekilde yürütüldüğü bilinmektedir (Yavuz ve Bakar, 2013). Çalışmada, Çanakkale'de bulunan Kalabakbaşı köyü ve Kirazlı köyü araştırma alanı olarak seçilmiştir. Bu lokalitelerden Kirazlı köyü, Çanakkale'nin Çan ilçesine bağlı olmakla beraber Çanakkale merkeze yakın olması dolayısıyla, merkezle etkileşimi daha fazla olan bir köydür (Bıçkı, 2011). Ayrıca Ilgar (2008), Kirazlı köyünde altın rezervi bulunduğunu ve altın arama çalışmalarının başlamış olduğunu belirtmiştir. Kalabakbaşı köyü ise Çanakkale'nin Yenice ilçesine bağlı olup (Yaşar ve Örge-Yaşar, 2010), merkezi yerleşim alanlarına uzak olması ve maden faaliyetlerinin nispeten az olması sebebiyle temiz olduğu düşünülen bölge olarak seçilmiştir.

Daha önce yapılmış olan çalışmalarda, çeşitli sebeplerle meydana gelen kirliliğin canlılar üzerindeki etkisi, hücrelerdeki mikronukleus oluşumu ve nuklear anomalilerle görülmektedir (Ulupınar ve Okumuş, 2002; Çavaş ve Ergene-Gözükara, 2003; Gauthier ve ark., 2004; Kıran ve Şahin, 2005; Huang ve ark., 2007). Bu sebeple, bu çalışmada Çanakkale civarında iki lokaliteden toplanan *L. vulgaris* örnekleri üzerinde, kirlilik belirteci olan mikronukleus ve nuklear anomalilerin mikronukleus testiyle belirlenmesi, bulundukları ortamdaki kirlilikten etkilenip etkilenmedikleri ve dolayısıyla test edilen çevresel kontaminasyonun genetik bir hasar oluşturup oluşturmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Mikronukleus analizi ile ilgili çalışmalar 1950 yıllarında bitki hücrelerinin kromozom hasarının ölçülmesiyle başlamıştır. Kimyasal karsinojenleri belirlemek üzere 1970'li yıllarda hayvan hücrelerinde ve daha sonra insan lenfositleri kültürlerinde kullanılmıştır. MN büyüklük farkından yararlanarak modifiye metodlar geliştiren bazı araştırmacılar, klastojenler tarafından uyarılan MN'lerin; sentromersiz kromozom parçaları sonucu küçük, anojenler tarafından uyarılan MN'lerin ise tam bir kromozom kaybı sonucu büyük boyutta olduğu ayrımını yapmışlardır. Deney hayvanları kullanılarak 1980'den sonra yapılan çalışmalarda, sitogenetik harabiyetin göstergesi olarak kullanılan MN çalışmalarının sayısının arttığı belirlenmiştir. Bu çalışmalar 2000'li yıllarda daha fazla yoğunluk kazanmıştır (Demirel ve Zamani, 2002).

Lenfosit kültürlerindeki çalışmalardan sonra MN tekniği, ilk kez Stich ve ark., (1982) tarafından ağız, bronş, burun ve mesanenin iç kısmını kaplayan ürotelyal hücrelere uygulanmıştır. Bu teknik ile eksfolyatif hücrelerdeki kimyasal maddelerin ve enfeksiyonların etkileri değerlendirilmiştir.

Fenech ve Morley (1986)'in geliştirmiş olduğu Sitokinezi-Bloklama (Cytokinesis-Blocked) Metodu ile küf mantarlarının metabolizmaları sonucu bir ürün olarak ortaya çıkan Cytochalasin-B (Cyt-B) ile mitoz bölünme esnasında hücrelerdeki sitoplazmik ayrılmayı durdurmuşlardır. Bu sayede uygun konsantrasyonda Cyt-B, lenfosit hücre kültürlerine ilave edilmesiyle, çekirdek bölünmesini tamamlamış ancak sitokinezi tamamlayamamış iki nukleuslu hücreler kolay şekilde tanınabilmiş, sayılabilmiş ve MN içeren hücrelerin oranı saptanabilmiştir.

Eastmond ve Tucker (1989), MN'lerin boyutunu belirleme amacıyla, antikinetokor antikorları kullanarak kinetokor bulunduran MN'lerin tam bir kromozom, kinetokor bulundurmayan MN'lerin ise asentrik kromozom parçalarını içerdiğini ve bu yöntemin klastojenleri anöploidi uyaran ajanlardan ayırmak için daha mutlak bir yol olduğunu vurgulamışlardır.

MN araştırmalarında Norppa ve ark., (1993) tarafından ilk defa kromozomların sentromerlerini tanımlamak için in situ hibridizasyon (ISH) tekniği uygulanmıştır. İlerleyen yıllarda, floresan in situ hibridizasyon (FISH) tekniği ile MN oluşumuna sebep olan kromozomların her birini tanımlayabilecek nitelikteki teknolojik ilerlemeler ortaya koyulmuştur (Richard ve ark., 1994).

Canlılar üzerinde etkileri olan kimyasalların belirlenebilmesi amacıyla, yapılan tüm MN test sonuçları toplanarak, ABD Çevre Koruma Grubunun Gen-toks Programı ile değerlendirilmiştir. In vivo olarak çalışılmış memeli kan ve kemik iliğindeki 414 bileşiğin, yalnızca 220'sinin kriterlere uygun olarak analizinin yapıldığı belirlenmiştir. Analizi yapılan bu bileşikler içerisinde ise karsinojenler % 91 oranında saptanmıştır; ancak negatif testlerin ciddi oranda az olması eksiklik olarak görülmüştür (Mavournin ve ark., 1990).

Fiziksel ve kimyasal ajanlara maruz kalan canlılar üzerine uygulanan MN analizi ve maruziyet sonucu oluşan nuklear anomaliler hakkında birçok çalışma bulunmaktadır.

Villarini ve ark. (1998) yaptıkları çalışmada; deltamethrin insektisitinin in vitro genotoksisitesini, insan periferal kan lökositlerinde DNA'ya hasar vermesi yada mikronukleus ve kardeş kromatid değişimini (SCE) indüklemesi için, tek hücreli mikro jel elektroforezi yada comet analizi kullanarak değerlendirmişlerdir. Sonuçlar, deltamethrin'in metabolik aktivasyondaki (_S9mix) varlığı artan dozlara bağlı olarak (0, 5, 7.5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 300, 400 μg/ml) dizilerin anlık değerlerinin artışına ve DNA hasarına neden olduğunu ortaya koymuştur. Deltamethrin'e maruz kalmış hücrelerde SCE ve MN'nin frekansı hem S9mix olan hem de olmayan kontrollerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir artış göstermemiştir. Bununla birlikte, sitotoksisitesi nedeniyle düşük deltamethrin dozları comet analizi ile karşılaştırılarak test edilmiştir.

Çavaş ve Gözükara (2005) yaptıkları çalışmada; mikronukleus testini kullanarak *Oreochromis niloticus* (Nil Tilapyası) türünde petrol rafinerisi ve krom işleme tesisindeki atıkların genotoksik etkilerini araştırmışlardır. Bu balık türü 3, 6, ve 9 gün boyunca atıkların farklı konsantrasyonlarına (5, 10 ve 20%) maruz bırakılmıştır. Mikronukleus analizleri solungaç epitel hücreleri ve periferal kan üzerinde gerçekleştirilmiştir. Genetik hasar göstergesi olarak kabul edilen mikronukleuslar dışındaki nuklear anomaliler eritrositlerde ayrıca değerlendirilmiştir. Siklofosfamid tek bir dozda (4 mg/L) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Bu çalışmanın sonucu, her iki atığın da genotoksik potansiyelinin olduğunu göstermiştir. Bunun yanı sıra, petrol rafineri atığının neden olduğu DNA hasar seviyesi, krom işleme tesisindeki atığın neden olduğu DNA hasar seviyesine göre oldukça yüksek çıkmıştır. Nuklear anomali olarak görülen tomurcuklu ve loblu nukleuslar genotoksik hasar göstergesi olarak düşünülmüştür.

Saleh ve Sarhan (2007) yaptıkları çalışmada; Asser bölgesinde bulunan yem fabrikasının ürettiği yemlerle beslenen tavukların eritrositlerindeki periferal kanın mikronukleus testi kullanılarak klastojenik etkilerini araştırmışlardır. Pozitif kontrol olarak kırsal bölgeden toplanan tavuklar kulanılmıştır. Yayma preparat olarak hazırlanan kanların

incelenmesi sonucunda aynı tür tavuklarda diğer toplanan tavuklara göre 7-8 kat daha fazla mikronukleus oluşumu gözlenmiştir. Mikronukleus oluşumundaki bu artış, tavukların beslenme metodunun ve besin içeriklerinin periferal kanlarında klastojenik etki göstermesine sebep olmuştur ve tavuk tüketen insan nüfusunda da benzer etkiler oluşturabileceği düşünülmüştür.

Hayretdağ ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada; Vize (Kırklareli), Kızılcahamam (Ankara) and Digor (Kars)'dan toplanmış *Coronella austriaca* (Avusturya Yılanı), *Dolicophis schmidti* (Kırmızı Yılan) ve iki *Natrix tessellata* (Su Yılanı) türlerinin eritrositlerinde ortalama mikronukleuslu eritrosit frekansları ve nuklear anomalileri araştırmışlardır. Her yılan örneğinde farklı mikronukleus sayısı tespit etmişlerdir. Tomurcuklu nukleus, çentikli nukleus ve loblu nukleus olmak üzere 3 tip nuklear anomali görülmüştür. Mikronukleus frekansı (%) en yüksek olan tür *N. tessellata* (0.30±0.08), en düşük olan tür ise *D. schmidti* (0.13±0.07) olarak tespit edilmiştir. Bu lokalitelerdeki türlerin her birinde farklı sayıda nuklear anomali bulunmuştur. Bu türlerin eritrositlerindeki genotoksik etkilerinin bulundukları bölgelerdeki çevresel kirletici etkilerine göre farklılık gösterdiği düşünülmüştür.

Tarımsal, endüstriyel ve madene yönelik çalışmalarda olduğu gibi birçok sebepten dolayı meydana gelen çevresel kontaminasyonun, hedef organizmalarla birlikte hedef olmayan organizmalara da etkisi vardır (Pimentel ve ark., 1998). Pestisit kontaminasyonu, bu çalışma alanları civarında bulunan amfibi populasyonlarındaki azalmaların en önemli sebeplerinden birisidir (Sparling ve ark., 2001).

Birçok canlı türü üzerinde olduğu gibi amfibilerde de genetik hasarların belirlenmesi amacıyla, in vitro ve in vivo ortamlarda yapılmış oldukça fazla sayıda MN testi ve nuklear anomali çalışması bulunmaktadır.

Kryukov (2000), *Bufo viridis* (Gece Kurbağası) larvalarında mikronukleusa neden olan farklı konsantrasyonlardaki kurşunun etkilerini farklı zaman aralıklarında incelemiştir. Çalışma sonunda kurşun konsantrasyonunun artan dozuna bağlı olarak hücrelerdeki mikronukleus frekansının arttığı gözlenmiştir. Altı saatlik maruziyet sonrasında, 1.0 mg/L aşan kurşun konsantrasyonunun etkisi altında, mikronukleus frekansında istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu görülmüştür. Daha uzun maruziyetler sonrasında ise (12, 18 ve 24 saat) bu artış, 0.2 mg/L gibi daha düşük bir konsantrasyonda görülmüştür. Kurşunun 1 mg/ml olan konsantrasyonunda ve uzun süreli maruziyetlerde (18 ve 24 saat), klastojenik etkinin kısmen azaldığı kanıtlanmıştır. Bu, kurşunun toksik etkisinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir.

Kütahya ve Eskişehir'den akan Porsuk Çayı'nda yapılan bir diğer çalışmada endüstri ve tarım sebebiyle ortaya çıkan kirleticilerinin klastojenik etkisini *Rana ridibunda* (Ova Kurbağası) periferal eritrositlerinde araştırmışlardır. Yayma preparatların incelenmesi sonucu, nehirlerin en az kirlenmiş alanlarından çok azot, tekstil ve şeker fabrikası gibi sanayi alanlarındaki kurbağaların mikronukleus oluşumunun 5-6 kat daha fazla olduğu görülmüştür. Mikronukleus oluşumundaki bu artış, endüstriyel ve tarımsal kirliliğin organizmalardaki giderek artan etkisini göstermiştir ve bu bölgede yaşayan insanlarda da benzer etkilerin görülebileceği düşünülmüştür (Saleh ve Zeytinoğlu, 2001).

Campana ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada; pyrethroid lambda-cyhalothrin'in genotoksisitesini *Rana catesbeiana* türünün iribaşları üzerinde mikronukleus testi uygulayarak araştırmışlardır. *R. catesbeiana* iribaşları 24, 48, 72 ve 96 saat ve 8, 15, 20 ve 30 gün boyunca bu bileşiğin 4 konsantrasyonuna (0.02, 0.1, 0.2 and 0.4 μg/L) maruz kalmıştır. *R. catesbeiana* iribaşarından elde edilen yayma preparatlarda, mikronukleus frekansı belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak iribaşlar Cyclophosphamide'e (5 mg/L) maruz bırakılmıştır. Pyrethroid lambda-cyhalothrin'in artan konsantrasyonlarına maruz kalan *R. catesbeiana* iribaşlarının periferal kanındaki mikronukleus frekansında artış görülmüştür. Cyclophosphamide'e maruz kalan iribaşların mikronukleuslu hücrelerinde 15 gün sonra önemli bir artış görülmüştür.

Lajmanovich ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada; Endosulfan'ın genotoksisitesini *Hyla pulchella* iribaşları üzerinde mikronukleus testi uygulayarak araştırmışlardır. In vivo şartlarda bileşiğin 3 farklı konsantrasyonuna (2.5, 5, and 10 g/L) maruz kalan iribaşların mikronukleus frekansını belirlemek için 48. ve 96. örnekleme zamanlarında yayma preparatlar hazırlanmış ve incelenmiştir. Pozitif kontrol olarak iribaşlar 40 mg/L Cyclophosphamide'e maruz bırakılmıştır. Bu madde, çalışma süresince mikronukleuslu eritrositlerin frekansında artışa sebep olmuştur. Analiz sonuçlarına göre, Endosulfan'ın ticari formülasyonunun genotoksik etkisinin olduğu görülmüştür.

Ahmad ve Saleh (2010) yaptıkları çalışmada; Suudi Arabistan'ın güneybatı kesiminde Alahad belediyesinde bulunan Tandaha barajı civarında evsel atıkların ve tarımsal kirleticilerin klastojenik etkisini *Rana ridibunda* türünün periferal eritrositlerinde mikronukleus testi uygulayarak araştırmışlardır. İncelenen yayma preparatlarda, mikronukleus oluşumunda bir yıl boyunca önemli derecede artış görülmüş ($f=9.89$, $df=3$), ($p<0.05$); kontrol gruplarına göre ise daha fazla artış gösterdiği belirlenmiştir. Mikronukleus oluşumundaki bu artış, tarımsal kirliliğin *R. ridibunda*'nın periferal kanındaki klastojenik etkiyi arttırma riskinin göstergesi olarak görülmüştür. Baraj

civarında yaşayan insanlarda da benzer etkilerin görülebileceği düşünülmüştür.

Alıko ve ark., (2014), bakır sülfatın ($CuSO_4$) *Bufo viridis* larvalarının hematoloji ve morfolojisi üzerine etkilerini araştırmışlardır. *Bufo viridis* larvaları 120 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (0.01, 0.05 ve 0.1 mg/L) $CuSO_4$'a maruz bırakılmıştır. $CuSO_4$'ın LC_{50} değeri 0.058 mg/L olarak ölçülmüştür. En yüksek iki $CuSO_4$ konsantrasyonu larvaların yetersiz büyüme ve gelişmesine sebep olmuşken, ≥0.01 mg/L $CuSO_4$ konsantrasyonları deforme olmuş çekirdek ve hücreler, vakuolize olmuş hücreler gibi eritrosit anomalilerine, omurilik ve kuyruk deformasyonlarına sebep olmuştur. Sonuç olarak $CuSO_4$'ın , hematolojik ve morfolojik olarak *Bufo viridis* larvalarının büyümesi ve gelişimi üzerine olumsuz etkilere sahip olduğu belirtilmiştir.

Ranidlerle yapılan bir başka çalışmada Hindistan'ın 3 farklı habitatından toplanan (kirlenmiş pirinç tarlaları, kirlenmemiş bataklıklar ve sığ su havuzu) *Euphlyctis cyanophlyctis* eritrositlerinde nuklear anomaliler değerlendirilmiş olup mikronukleus analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre mikronukleus, çentikli, tomurcuklu, loblu ve binukleat hücreler tespit edilmiştir. Kontamine tarımsal alanlarda yaşayan kurbağaların %80'inden fazlasında bu nuklear anomaliler görülmüştür. Nuklear anomalilerin ortaya çıkışı kurbağaların zirai kimyasallardan etkilendiğini göstermiştir (Raghunath ve ark., 2017).

BÖLÜM 3
MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada, 2007 yılında Çanakkale civarından yakalanmış toplam 21 adet *Lissotriton vulgaris* örnekleri kullanılmıştır. Kalabakbaşı köyü civarından 12 (5♂♂, 7♀♀), Kirazlı köyü civarından ise 9 (4♂♂, 5♀♀) adet *Lissotriton vulgaris* örneği yakalanmıştır. Örneklerden kan alınarak yayma kan preparatları hazırlanmıştır. Bu örneklerde mikronukleus (MN) oluşumları ve diğer nuklear anomaliler (NA) incelenmiştir. Örneklerdeki mikronukleus ve diğer nuklear anomaliler istatistiksel olarak değerlendirilmiş olup, MN ve diğer NA'lerin lokaliteler ve cinsiyetler bakımından karşılaştırılması yapılmıştır.

3.1. Örneklerin Hazırlanması

Eter ile bayıltılmış hayvanların kalbinden kan örnekleri alınmış ve heparinli kılcal tüplere konulmuştur. Kan örnekleri temiz lamlar üzerine birer damla damlatılarak ince bir tabaka halinde yayılmıştır. Hazırlanan yayma preparatlar, oda sıcaklığında kurutulmuştur. Bu preparatlar fikse edilmiş ve May-Grunwald-Giemsa metoduyla boyanmıştır (Lewis ve ark., 2006). Güvenilir sonuçlar elde edebilmek için her bir *L. vulgaris* örneği için 3'er adet preparat hazırlanmıştır.

3.2. Mikronukleus Analizi

Bu çalışmada Çanakkale civarından toplanan örnekler üzerinde in vivo mikronukleus analizi yapılmıştır.

İn vivo MN analizi sıklıkla kullanılan ve eritrositlerdeki MN sıklığını belirlemek için başvurulan bir araştırma yöntemidir. Bu analiz genellikle kemik iliği veya periferal kan hücrelerinde eritrositler değerlendirilerek, test edilen maddenin kromozom hatalarına sebep olup olmadığının tespitinde uygulanır. Genellikle in vivo MN araştırmalarında periferal kan daha az değişkenlik göstermesinden dolayı daha doğru sonuç vermektedir. Ancak çalışma kapsamındaki *L. vulgaris* örneklerinin küçük boyutta olması sebebiyle periferal kanları alınamamış, örneklerin kalplerinden alınan kanları incelenmiştir.

Heddle ve Countryman (1976)'e göre, MN'lerin sayılması; MN'nin yuvarlak ve oval olması, MN çapının, ana çekirdeğin 1/3'ü büyüklüğünde veya daha küçük olması, MN'nin ana çekirdekten belirgin bir şekilde ayrı bulunması, boya alma yoğunluğunun ana çekirdek ile aynı olması kriterlerine göre gerçekleştirilmiştir (Demirel ve Zamani, 2002).

3.3. Yayma Kan Preparatlarının İncelenmesi

Mikronukleus ve nuklear anomali frekanslarının belirlenmesi amacıyla her bir preparattan 1000 eritrosit incelenmiş ve immersiyon yağı kullanılarak 1000X büyütmedeki görüntüleri, Leica DM-500 marka kameralı binoküler ışık mikroskobu kullanılarak kaydedilmiştir. Bu eritrositlerin içerisindeki MN ve NA taşıyanların sayıları tespit edilerek yüzdeleri çıkarılmıştır.

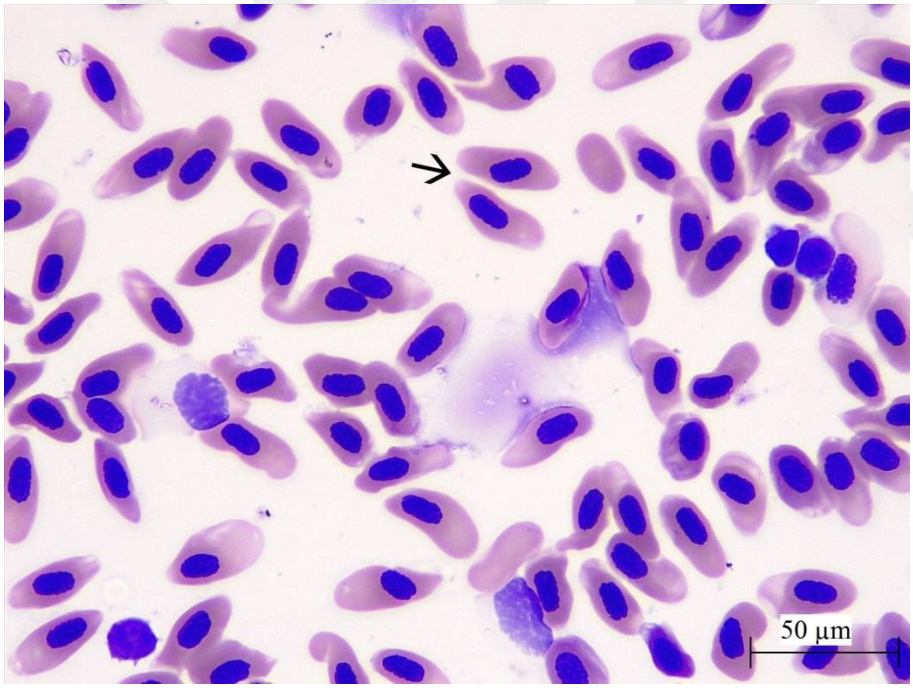
3.4. İstatistiksel Değerlendirmeler

Mikronukleus analizi sonucu elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmelerinin yapılması için IBM SPSS Statistics 22 programı kullanılmıştır. *L. vulgaris* örneklerindeki mikronukleus ve nuklear anomali sayıları arasındaki farkı ortaya koymak ve ayrıca lokalite ve cinsiyete bağlı olarak aralarındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla parametrik olmayan Mann-Whitney U testi kullanılmıştır (Sokal and Rohlf, 1997). Analizler %95 güven aralığında yapılmış ve değerledirilmiştir.

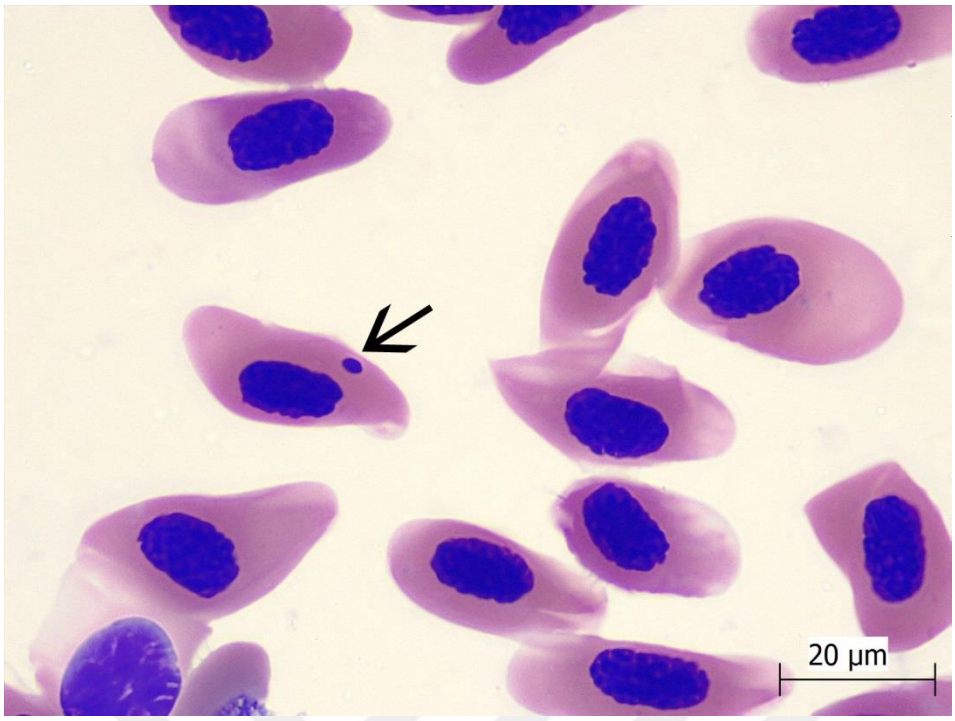
BÖLÜM 4
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Mikronukleus ve Diğer Nuklear Anomaliler

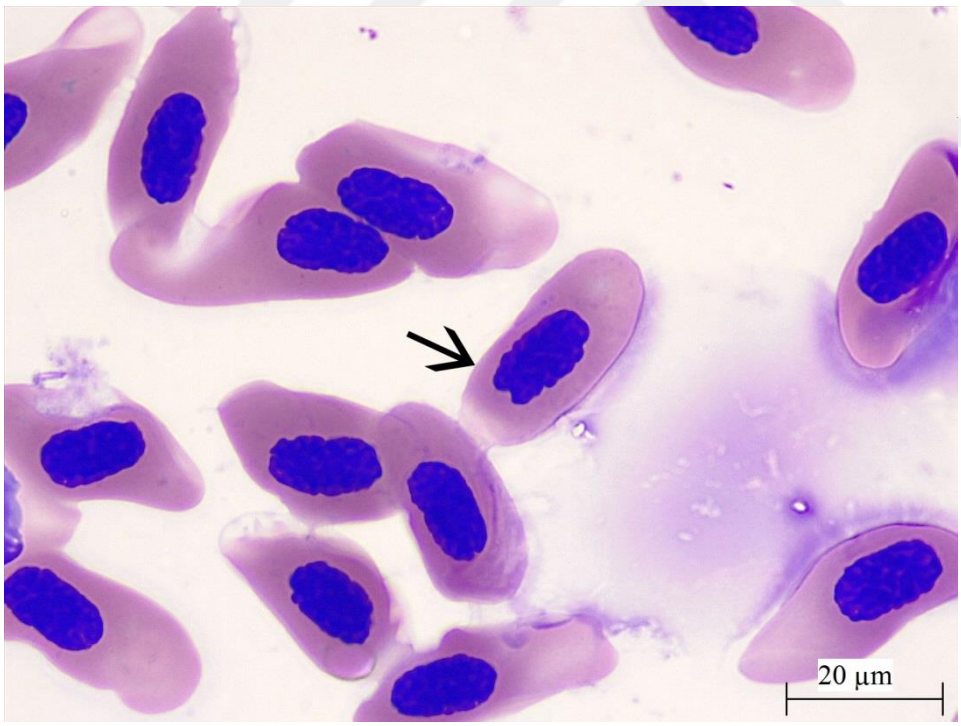
Bu çalışmada mikronukleus analizi ile mikronukleus ve diğer nuklear anomalilerin belirlenebilmesi için *Lissotriton vulgaris* örneklerinin eritrositleri incelenmiştir. Örneklerden elde edilen yayma preparatlar incelendiğinde mikronukleus ile birlikte çentikli nukleus, loblu nukleus, tomurcuklu nukleus ve binukleat hücreler tespit edilmiştir (Şekil 4.1.1, Şekil 4.1.2, Şekil 4.1.3, Şekil 4.1.4, Şekil 4.1.5, Şekil 4.1.6). Nuklear anomaliler Carrasco ve ark. (1990)'na göre sınıflandırılmıştır (Çavaş ve Ergene-Gözükara, 2005). Ayrıca sitoplazmik vakuol ve mikrositlere de rastlanmış fakat istatistiksel değerlendirmeye alınmamıştır (Şekil 4.1.7, Şekil 4.1.8).



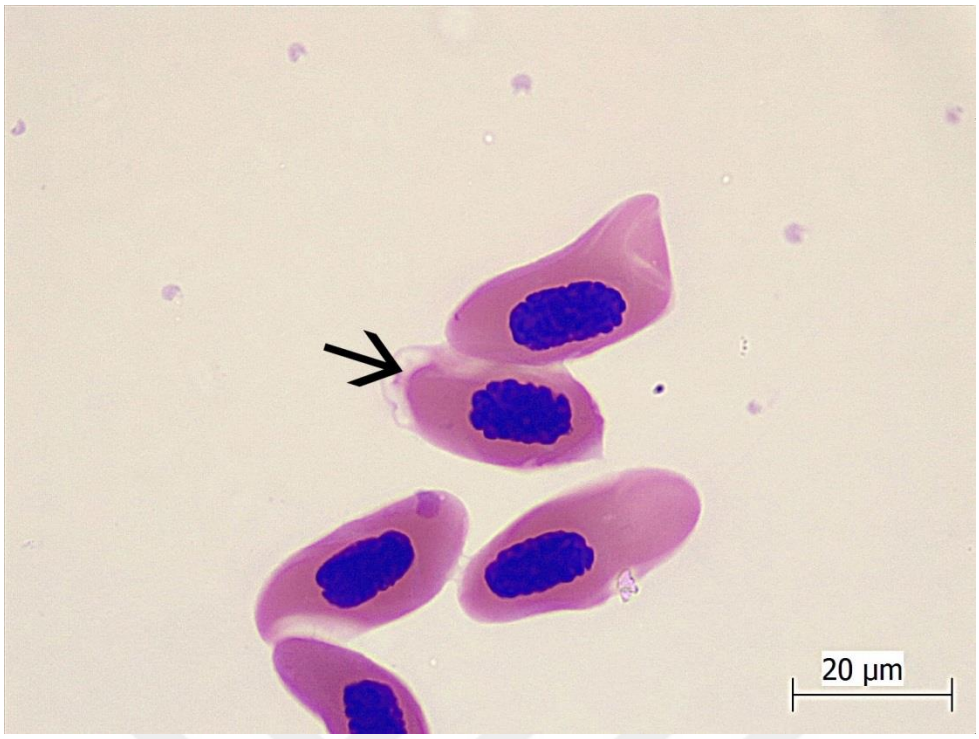
Şekil 4.1.1. *Lissotriton vulgaris* örneğine ait normal eritrositler (özgün)



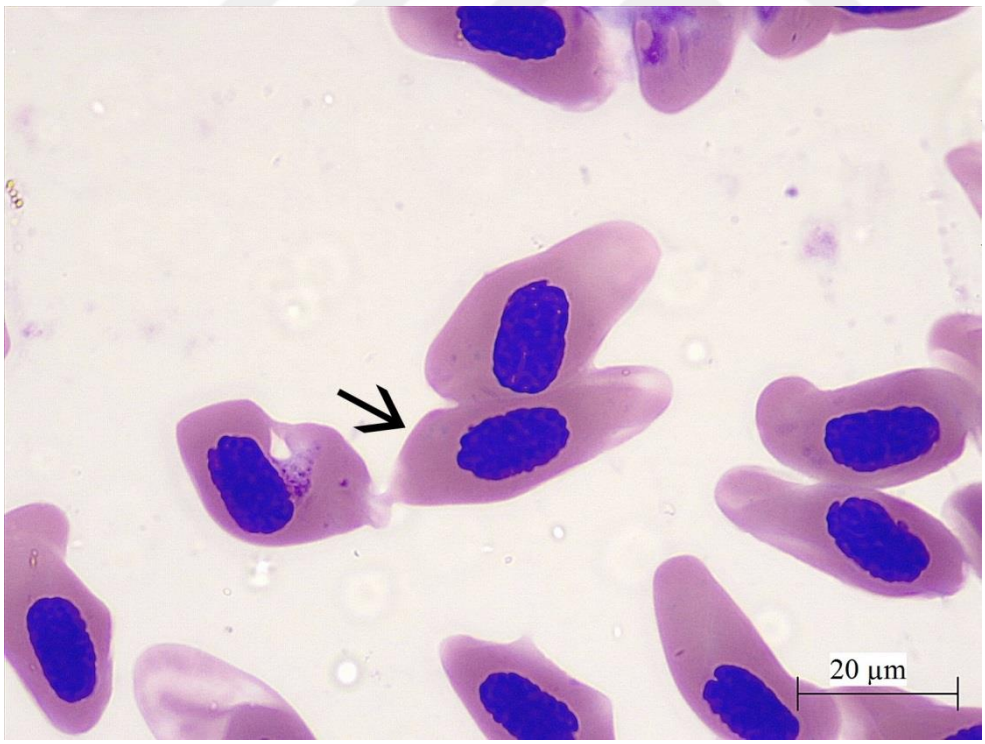
Şekil 4.1.2. *Lissotriton vulgaris* örneğine ait mikronukleus (özgün)



Şekil 4.1.3. *Lissotriton vulgaris* örneğine ait çentikli nukleus (özgün)



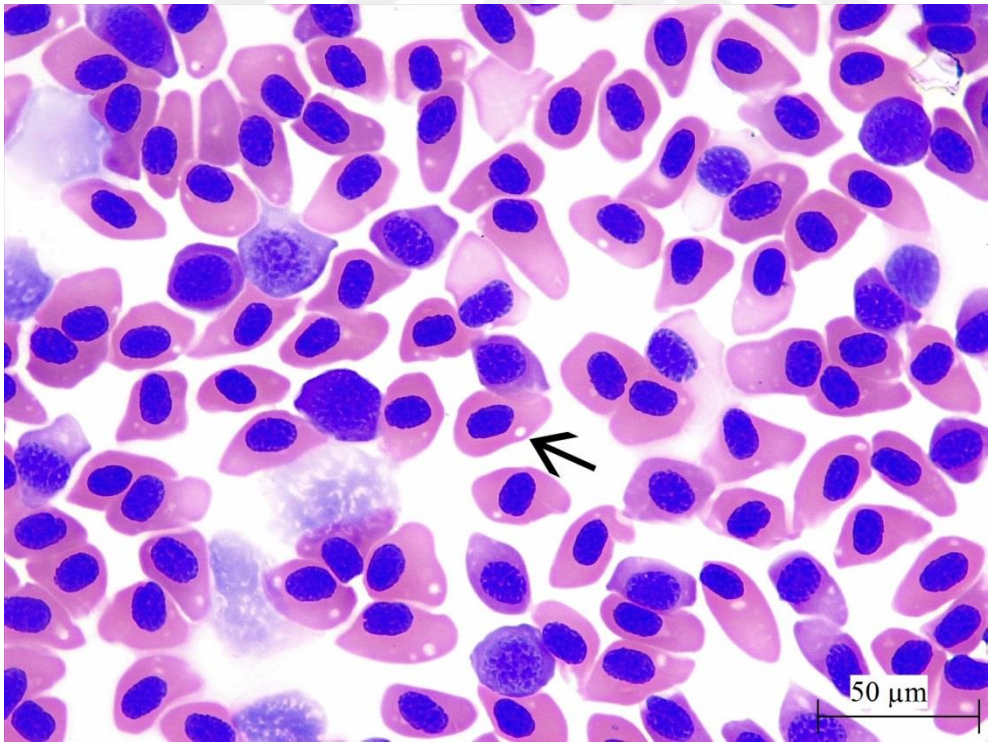
Şekil 4.1.4 *Lissotriton vulgaris* örneğine ait loblu nukleus (özgün)



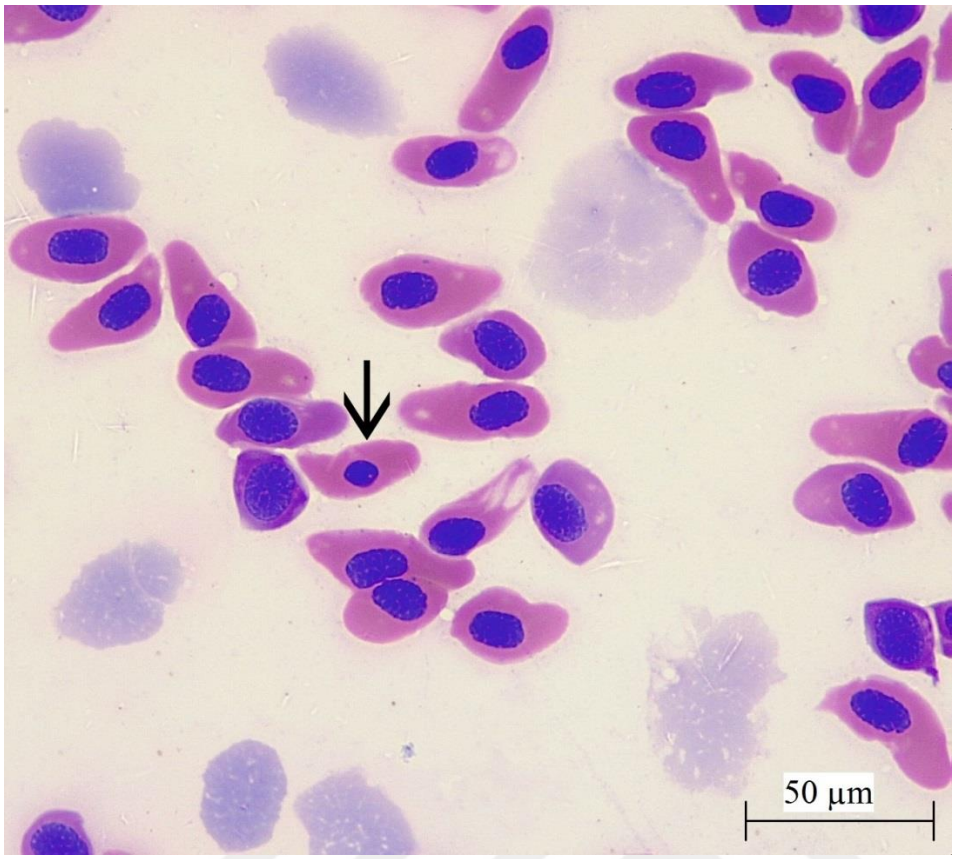
Şekil 4.1.5 *Lissotriton vulgaris* örneğine ait tomurcuklu nukleus (özgün)



Şekil 4.1.6 *Lissotriton vulgaris* örneğine ait binukleat hücre (özgün)



Şekil 4.1.7 *Lissotriton vulgaris* örneğine ait sitoplazmik vakuol bulunduran hücre (özgün)



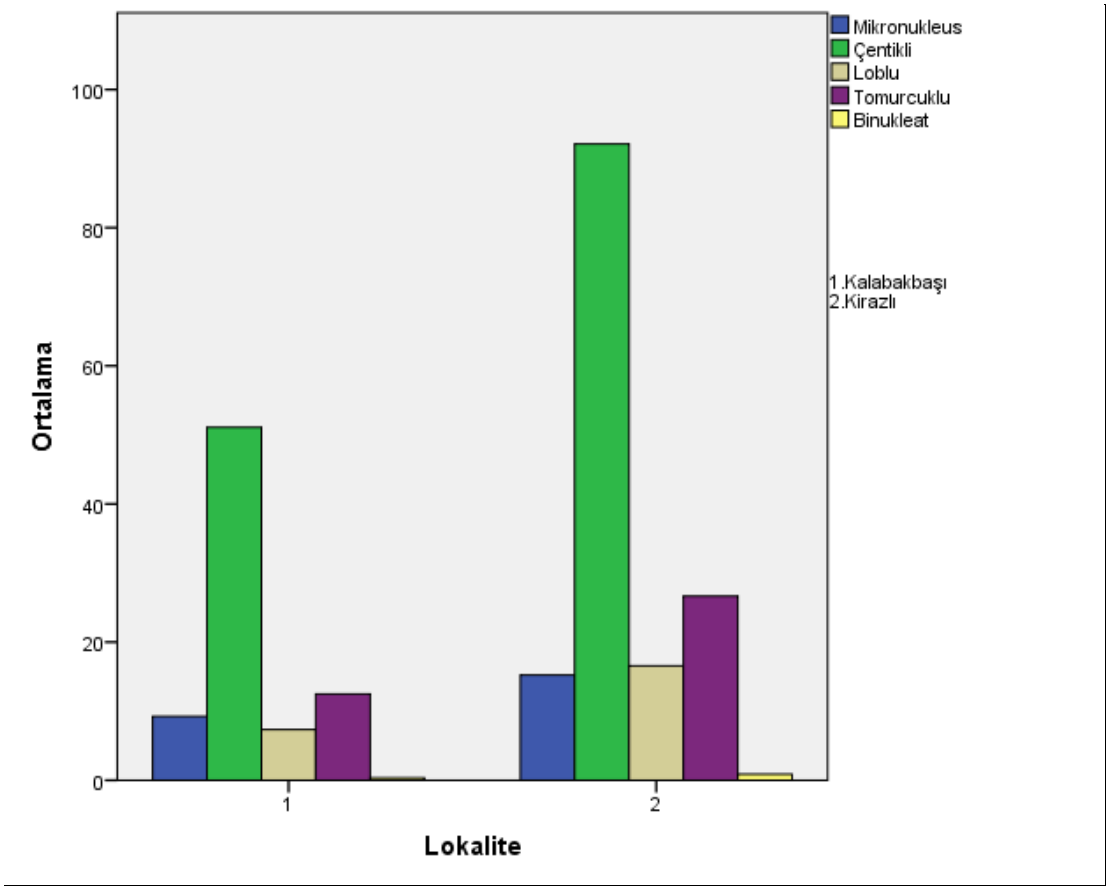
Şekil 4.1.8 *Lissotriton vulgaris* örneğine ait mikrosit (özgün)

4.2. Lokalite ve Cinsiyete Bağlı Olarak Yapılan Ölçümler

Çalışma kapsamında değerlendirilen Kalabakbaşı lokalitesi örneklerinde ortalama MN sayısı 9,25±7,02, MN frekansı % 0,3, toplam NA sayısı 71,25±23,81, NA frekansı % 2,37; Kirazlı lokalitesi örneklerinde ortalama MN sayısı 15,22±8,94, MN frekansı % 0,5, toplam NA sayısı 136,22±39,37, NA frekansı % 4,54 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.2.1). İstatistiksel analizler neticesinde mikronukleus ($p=0,101$; $U=31,000$), çentikli ($p=0,001$; $U=7,000$), loblu ($p=0,008$; $U=17,000$), tomurcuklu ($p=0,006$; $U=15,500$) ve binukleat hücre ($p=0,409$; $U=44,000$) olarak hesaplanmıştır. Mann-Whitney U testi sonucuna göre iki lokalite karşılatırıldığında toplam MN sayısı açısından anlamlı fark bulunmadığı belirlenmiştir. İki lokalite arasında sırasıyla çentikli, tomurcuklu ve loblu nukleus bakımından yüksek düzeyde anlamlı fark bulunmuştur ($p\leq0,05$). Cinsiyet farkı gözetilmeksizin MN ve NA'lar ayrı ayrı değerlendirilmiş olup iki lokalite arasındaki ilişkisi grafik ile gösterilmiştir (Şekil 4.2.1).

Çizelge 4.2.1. Kalabakbaşı ve Kirazlı bölgelerindeki *Lissotriton vulgaris* örneklerine ait MN ve toplam NA istatistikleri
(**SD:** Standart sapma, **MN:** Mikronukleus, **NA:** Nuklear anomali)

Örnek sayısı	Örneklerin toplandığı alan	Analiz edilen eritrosit sayısı	Ortalama±SD (MN)	% MN frekansı	Ortalama±SD (NA)	% NA frekansı
12	Kalabakbaşı	36000	9,25±7,02	0,3	71,25±23,81	2,37
9	Kirazlı	27000	15,22±8,94	0,5	136,22±39,37	4,54



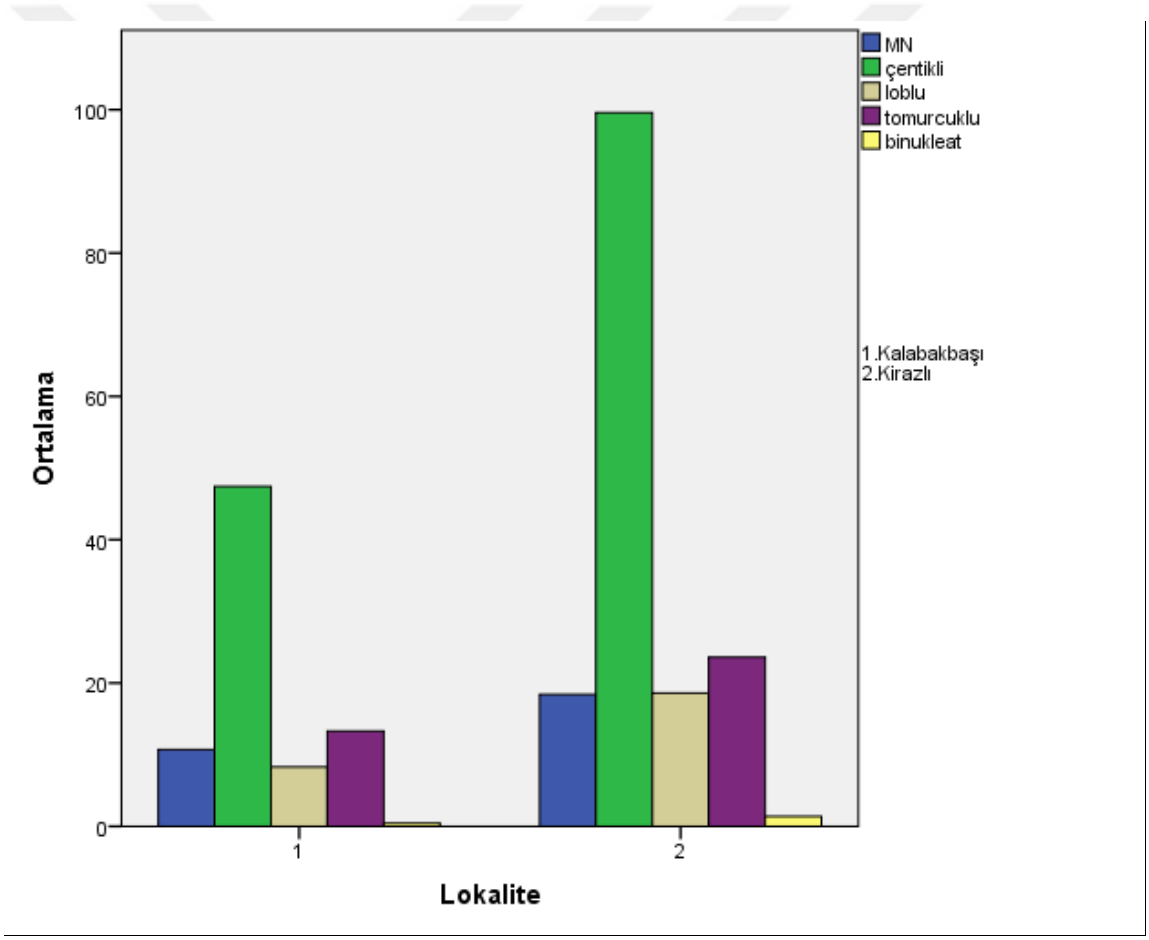
Şekil 4.2.1. Kalabakbaşı ve Kirazlı'dan toplanan *L. vulgaris* örneklerindeki ortalama mikronukleus ve nuklear anomali sayıları

Kalabakbaşı lokalitesindeki dişi bireylerde ortalama toplam NA sayısı 69,29±26,16, NA frekansı % 2,30; Kirazlı lokalitesindeki dişi bireylerde toplam NA sayısı 143,20±35,37, NA frekansı % 4,77 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.2.2). Mann-Whitney U testi sonucunda Kalabakbaşı ve Kirazlı örnekleri arasında NA sayıları bakımından fark önemli derecede anlamlı bulunmuştur (p=0,007 ; U= 1,000). Dişi bireylerdeki MN ve

NA'lar ayrı ayrı değerlendirilmiş olup iki lokalite arasındaki fark Şekil 4.2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2.2. Kalabakbaşı ve Kirazlı bölgelerindeki *L. vulgaris* dişi bireylere ait toplam NA istatistikleri

Cinsiyet	Örnek sayısı	Örneklerin toplandığı alan	Analiz edilen eritrosit sayısı	Ortalama±SD (NA)	% NA frekansı
♀♀	7	Kalabakbaşı	21000	69,29±26,16	2,30
	5	Kirazlı	15000	143,20±35,37	4,77

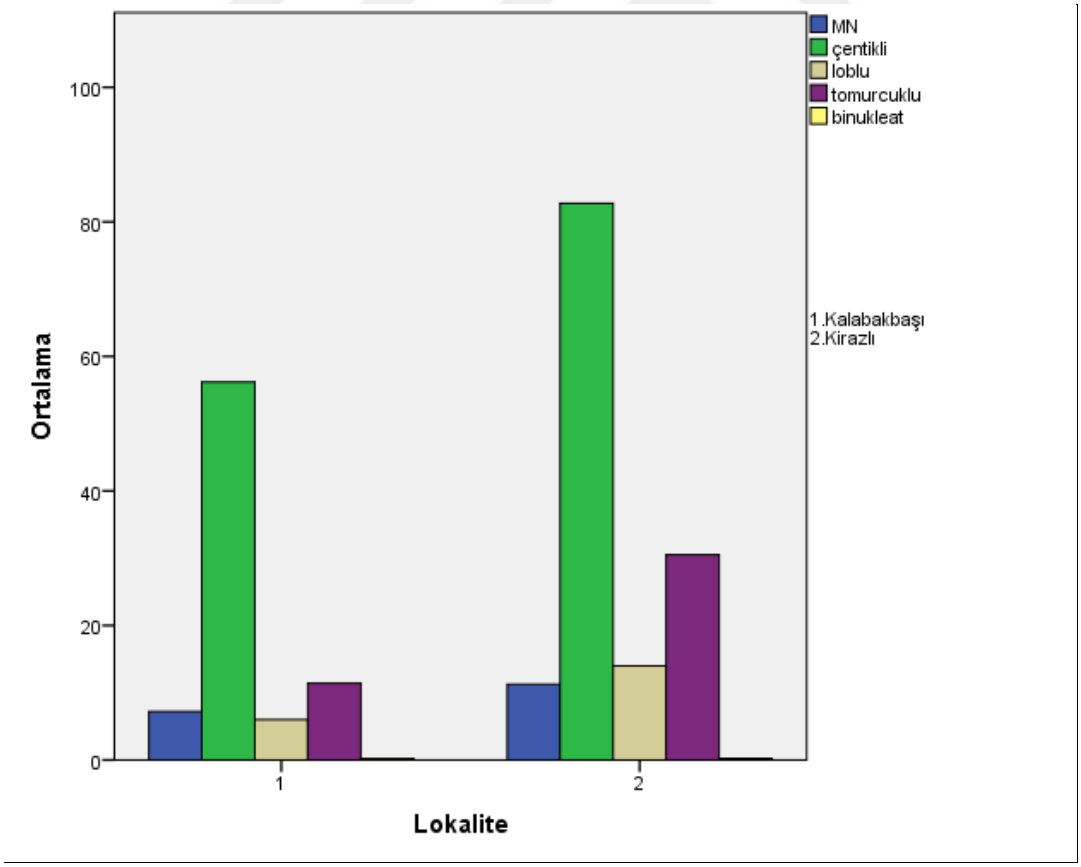


Şekil 4.2.2. Kalabakbaşı ve Kirazlı'dan toplanan *L. vulgaris* dişi bireylerin ortalama mikronukleus ve nuklear anomali sayıları

Kalabakbaşı lokalitesindeki erkek bireylerde ortalama toplam NA sayısı 73,80±22,81, NA frekansı % 2,46; Kirazlı lokalitesindeki erkek bireylerde toplam NA sayısı 127,50±47,78, NA frekansı % 4,25 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.2.3). Bu sonuca göre iki lokalite karşılaştırıldığında toplam NA sayısı açısından fark önemli derecede anlamlı bulunduğu belirlenmiştir (p=0,050 ; U=2,000). Erkek bireylerdeki MN ve NA'lar ayrı ayrı değerlendirilmiş olup iki lokalite arasındaki ilişki grafik ile gösterilmiştir (Şekil 4.2.3).

Çizelge 4.2.3. Kalabakbaşı ve Kirazlı bölgelerindeki *L. vulgaris* erkek bireylere ait toplam NA istatistikleri

Cinsiyet	Örnek sayısı	Örneklerin toplandığı alan	Analiz edilen eritrosit sayısı	Ortalama±SD (NA)	% NA frekansı
♂♂	5	Kalabakbaşı	15000	73,80±22,81	2,46
	4	Kirazlı	12000	127,50±47,78	4,25

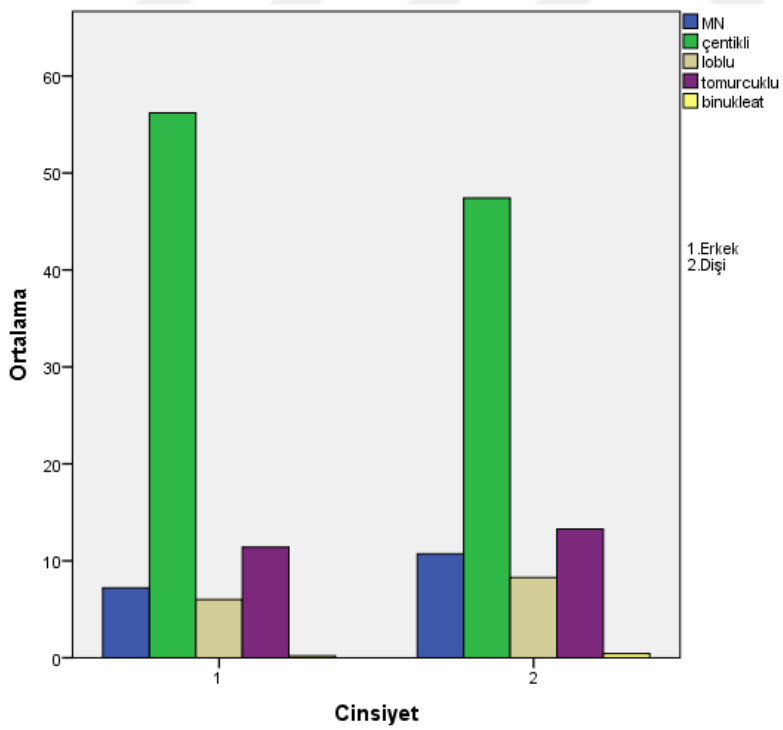


Şekil 4.2.3. Kalabakbaşı ve Kirazlı'dan toplanan *L. vulgaris* erkek bireylerin ortalama mikronukleus ve nuklear anomali sayıları

Kalabakbaşı lokalitesindeki erkek bireylerde ortalama MN sayısı 7,20±5,71, MN frekansı % 0,24, toplam NA sayısı 73,80±22,81, NA frekansı % 2,46; dişi bireylerde ortalama MN sayısı 10,71±7,91, MN frekansı % 0,35, toplam NA sayısı 69,29±26,16, NA frekansı % 2,30 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.2.4). Mann-Whitney U testi sonuçlarına göre cinsiyetler arasında toplam MN (p=0,514 ; U=13,500) ve NA (p=0,684 ; U=15,000) sayısı açısından anlamlı fark bulunmadığı tespit edilmiştir (p≤0,05). Kalabakbaşı lokalitesindeki *L. vulgaris* populasyonuna ait MN ve NA'lar ayrı ayrı değerlendirilmiş olup cinsiyetler arasındaki ilişki Şekil 4.2.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2.4. Kalabakbaşı bölgesindeki *L. vulgaris* erkek ve dişi bireylere ait MN ve toplam NA istatistikleri

Örnek sayısı	Örneklerin toplandığı alan	Analiz edilen eritrosit sayısı	Ortalama±SD (MN)	% MN Frekansı	Ortalama±SD (NA)	% NA Frekansı
5♂♂	Kalabakbaşı	15000	7,20±5,71	0,24	73,80±22,81	2,46
7♀♀		21000	10,71±7,91	0,35	69,29±26,16	2,30

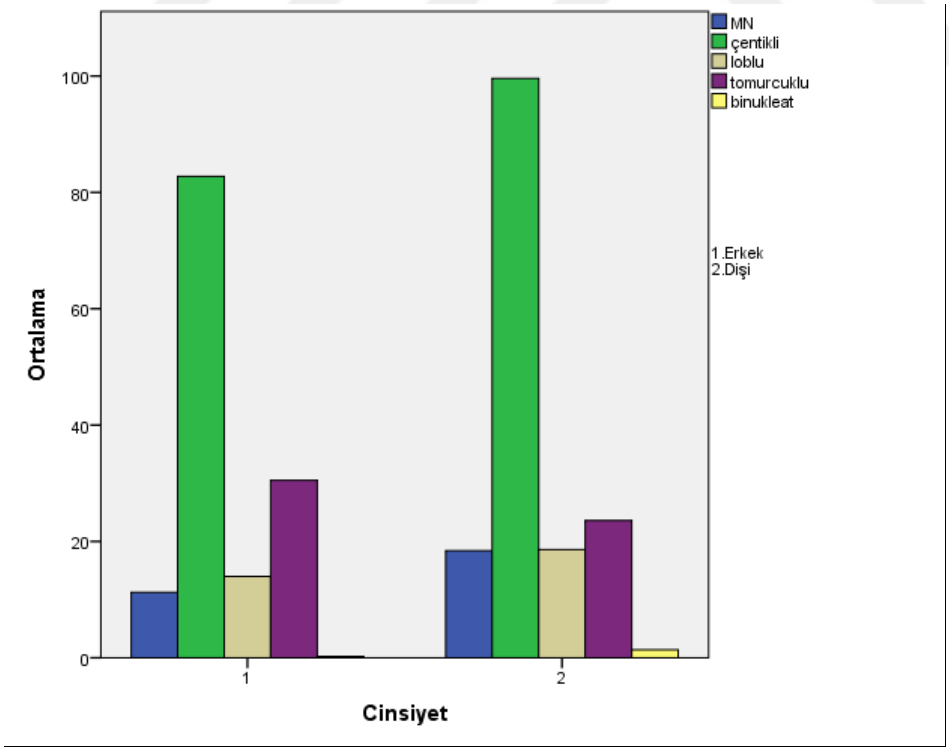


Şekil 4.2.4. Kalabakbaşı'ndan toplanan *L. vulgaris* dişi ve erkek bireylerin ortalama mikronukleus ve nuklear anomali sayıları

Kirazlı lokalitesindeki erkek bireylerde ortalama MN sayısı 11,25±8,65, MN frekansı % 0,37, toplam NA sayısı 127,50±47,78, NA frekansı % 4,25; dişi bireylerde ortalama MN sayısı 18,40±8,67, MN frekansı % 0,61, toplam NA sayısı 143,20±35,37, NA frekansı % 4,77 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.2.5). Mann-Whitney U testi sonuçlarına göre cinsiyetler arasında toplam MN (p=0,221 ; U=5,000) ve NA (p=0,624 ; U=8,000) sayısı açısından anlamlı fark bulunmadığı tespit edilmiştir (p≤0,05). Kirazlı lokalitesindeki *L. vulgaris* populasyonuna ait MN ve NA'lar ayrı ayrı değerlendirilmiş olup cinsiyetler arasındaki ilişki Şekil 4.2.5'te sunulmuştur.

Çizelge 4.2.5. Kirazlı bölgesindeki *L. vulgaris* erkek ve dişi bireylere ait MN ve toplam NA istatistikleri

Örnek sayısı	Örneklerin toplandığı alan	Analiz edilen eritrosit sayısı	Ortalama±SD (MN)	% MN Frekansı	Ortalama±SD (NA)	% NA Frekansı
4♂♂	Kirazlı	12000	11,25±8,65	0,37	127,50±47,78	4,25
5♀♀		15000	18,40±8,67	0,61	143,20±35,37	4,77



Şekil 4.2.5. Kirazlı'dan toplanan *L. vulgaris* dişi ve erkek bireylerin ortalama mikronukleus ve nuklear anomali sayıları

4.3. Tartışma

Mikronukleuslar, mitoz bölünme esnasında sitoplazma içerisinde yer alan, ana nukleusdan bağımsız, tam kromozom veya sentromersiz kromozom parçalarından meydana gelen oluşumlar olup, hücre döngüsünün kontrol mekanizmasında bulunan genlerdeki eksikliklerden, iğ iplikçiklerindeki hatalardan, kinetokor veya mitotik aygıtın diğer parçalarından ve kromozomal hasara sebep olan hatalardan dolayı meydana gelmektedir (Zuno ve ark., 1994).

Bu çalışmadaki Kalabakbaşı ve Kirazlı lokalitelerinde dağılış gösteren *Lissotriton vulgaris* örneklerinde, çevresel kirleticilere bağlı olduğu düşünülen mikronukleus ve diğer nuklear anomalilerin oluşumu ortaya konulmuştur. Örnekler, altın madeni çalışmalarının yürütüldüğü Kirazlı köyü civarıyla, maden faaliyetlerinin nispeten daha az yürütüldüğü Kalabakbaşı köyünden toplanmıştır. Maden faaliyetlerinin daha yoğun olduğu bölgeyle daha az yoğun olduğu bölgedeki örneklerde mikronukleus analizi bu sebeple yapılmıştır.

Çalışmamızda MN ve NA tanımlaması ve analizleri için elde edilen bulgular, doğadan toplanan amfibi türlerinin kullanıldığı MN analizi araştırmalarıyla benzerlik göstermektedir (Saleh ve Zeytinoğlu 2001; Aymak 2010; Gürkan ve ark., 2012; Pollo 2017).

Gürkan ve ark., (2012) yaptıkları çalışmada, pestisit kontaminasyonu bakımından kirli olduğu düşünülen Vize'den (Kırklareli) toplanan *Pelophylax ridibundus* (Ova Kurbağası) örneklerinde ortalama MN sayısını 6±4,17, frekansı % 0,3; Kazdağı'ndan (Yenice, Çanakkale) toplanan örneklerde ise MN sayısını 0,6±0,73, frekansı % 0,03 olarak hesaplamışlardır. Mann-Whitney U testi sonuçlarına göre; lokaliteler karşılaştırıldığında mikronukleus sayısı bakımından anlamlı düzeyde fark bulunduğunu belirtmişlerdir ($p \leq 0,05$). Bizim çalışmamızda ise MN sayısı Kirazlı'da Kalabakbaşı örneklerine göre daha fazla bulunmuş olup istatistiksel bir farklılık tespit edilememiştir. Gürkan ve ark., (2012)'ı çalışmaları sonucu binukleat, çentikli nukleus, tomurcuklu nukleus ve loblu nukleus olmak üzere 4 tip nuklear anomali tespit etmiş olup iki lokalite karşılatırıldığında toplam NA sayısı açısından önemli derecede anlamlı fark bulunmadığını bildirmişlerdir. Yapılmış olan çalışmadaki 4 tip nuklear anomaliye ilaveten bizim çalışmamızda sitoplazmik vakuol ve mikrositlere de rastlanmıştır. İki lokalite arasında sırasıyla çentikli, tomurcuklu ve loblu nukleus bakımından yüksek düzeyde anlamlı fark bulunmuştur.

Ratko (2014), iki ayrı *Pseudopus apodus* (Oluklu Kertenkele) populasyonundan numuneler alarak lokalite ve cinsiyete bağlı mikronukleus analizi yapmış ve nuklear anomalileri belirlemiştir. Sonuçlara göre antropojenik etkinin fazla olduğu lokalitede

yüksek oranda MN ve çift nukleuslu eritrositlerle birlikte nuklear ve sitoplazmik vakuolizasyonun yüksek olduğunu bildirmiştir. Çevresel strese karşı cinsiyetler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark oluşmadığını belirtmiştir. Bizim çalışmamızda bu çalışmaya benzer şekilde sitoplazmik vakuol gözlenmiş ancak çok az sayıda tespit edilebildiği için istatistik bir değerlendirme yapılamamıştır. Ayrıca cinsiyet karşılaştırılması yapıldığında toplam MN ve NA sayısı bakımından önemli fark bulunmadığı tespit edilmiştir.

Sitoplazmik vakuolizasyon, membran fonksiyonundaki bozuklukların bir sonucu olarak ortaya çıkan toksisite etkisini gösterebilmektedir ve bu, kimyasalların etkilerinden dolayı hücre içine büyük miktarda su akışına neden olmaktadır. Hücresel şişme, sitoplazmik dejenerasyona yol açan lizozomal hidrolitik enzimlerin sızıntısıyla gerçekleşmektedir (Abdelhalim, 2011). Çalışmada tespit edilen sitoplazmik vakuol, toksik etkinin varlığını ve bunun sonucunda oluşan genotoksik hasarın göstergesi olduğunu düşündürmektedir.

Karasu Nehri'nin (Erzurum) metallerle kirlenmiş ve kirlenmemiş bölgelerinde yaşayan *Pelophylax ridibundus* örneklerinin eritrositlerinde genotoksik etkilerin araştırılması sonucu mikronukleus ve diğer nuklear anomaliler tespit edilmiştir. Kirlenmiş bölgedeki kurbağalarda MN ve NA frekansının temiz bölgedeki kurbağalara göre önemli derecede artış gösterdiği belirlenmiştir. Kirliliğin tespiti için nehrin yüzey suyu örneklerinde ağır metallerin konsantrasyonlarının yüksek olduğu tespit edilmiştir (Cd, Al, As, Pb ve Mn). Nehrin kirlenmiş olması ile MN ve NA'lerin artışı arasında kuvvetli bir ilişki olduğu belirtilmiştir (Şişman ve ark., 2015). Yapılan bu çalışma ile yüksek ağır metal seviyelerinin toksisiteye yol açtığı düşünülebilir. Tespit edilen genotoksisite ise bizim çalışmamızda madene yönelik aktivilerle ilgili olabileceği gibi endüstriyel, tarımsal ve evsel aktivitelerle ilgili olabileceğini göstermektedir.

Benzer şekilde Aymak (2010) yaptığı çalışmada Mersin ilinin Alata ve Kazanlı bölgelerinde bulunan *Rana ridibunda* örneklerinin kas ve karaciğer dokularında kirliliğin etkilerini araştırmak amacıyla yaşadığı ortamın su ve sedimentteki ağır metal (krom, kurşun, mangan, bakır, arsenik, çinko, kadmiyum) birikimlerini lokalite ve mevsimlere bağlı olarak incelemiştir. Elde edilen sonuçlara göre ağır metal kirliliği Kazanlı bölgesinde daha yoğun olarak görülmüştür ve dolayısıyla bu bölgedeki kurbağaların toplam nuklear anomali sayısı istatistiksel olarak Alata bölgesine göre önemli derecede anlamlı bulunmuştur. Bu sonuçlar ağır metallerin sulak alanları kirlettiğini ve amfibiler dahil pek çok canlı türünü doğrudan ya da dolaylı olarak etkilediğini göstermektedir.

Pollo ve ark., (2017), Orta Arjantin'de bir florit madeni ile ilişkili doğal ve yapay çevrelerde yaşayan Güney Amerika kurbağası *Rhinella arenarum* MN, NA, mitoz ve olgunlaşmamış eritrosit frekanslarını hesaplamışlardır. Örnekler I: yüksek florit içeren granitik kayalarda çalışan akım, II: düşük florit içeren metamorfik kayalarda çalışan akım ve III: florit yüzdürme işlemi ile üretilen tortuları içeren suni çökeltme havuzlarından toplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre MN ve NA frekansları I. ve III. istasyonlarda yüksek bulunmuşken, II. istasyonda düşük bulunmuştur. Pollo ve ark., (2017)'nın florit madenine yönelik olarak yapmış olduğu çalışmada belli dönemlerini suda geçiren amfibiler üzerinde florit madenine yönelik çalışmaların olumsuz sonuçlara yol açabileceği ortaya konmuştur. Bizim çalışmamızda ise iki lokalite karşılaştırıldığında, altın rezervinin bulunduğu ve altın arama çalışmalarının devam ettiği Kirazlı yöresinde bulunan örneklerin ortalama MN sayılarında artış olduğu tespit edilmekle birlikte istatistiksel fark bulunmamıştır. Ortalama NA sayıları ve frekanslarında ise anlamlı bir fark bulunmuştur. Bu sonuçlara sebep olan en büyük faktörlerden birinin çevresel faktörler olduğu ve bu faktörlerin içerisinde de Kirazlı bölgesinde madene yönelik yapılan çalışmaların etkili olduğu düşünülmektedir.

Madencilik faaliyetleri sırasında sucul ekosistemlerin fizikokimysal yapısı değerlendirilmektedir. Birçok kirleticinin toksisite seviyeleri sıcaklık ile birlikte PH seviyelerine bağlı olduğu düşünülmektedir (Pollo ve ark., 2017). Madencilik faaliyetleri sucul canlıların kirliliğe maruz kalması ve bu kirliliğe tepki göstermesi konusunda yeterli bilgi sağlayamamasına rağmen tamamlayıcı bir araç olarak görülmektedir.

Çalışmadan elde edilen sonuçlar, Kirazlı bölgesinde madene yönelik yapılan çalışmalardan dolayı genotoksik maddelerin bulunabileceğini ve genotoksik hasarın göstergelerinden biri olan MN oluşumlarının burada bulunan kirleticilerden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Diğer NA oluşumlarının nedeni ve mekanizmaları hakkında net bir sonuç elde edilememesine rağmen NA artışının maden çalışmaları sırasında kurbağaların su ve topraktaki kimyasallara maruz kalması nedeniyle meydana gelen genotoksisiteye bağlı olabileceği düşüncesini akla getirmektedir.

BÖLÜM 5
SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, Çanakkale'nin iki farklı lokalitesinden toplanan (Kalabakbaşı köyü lokalitesi 12 (5♂♂, 7♀♀), Kirazlı köyü lokalitesi 9 (4♂♂, 5♀♀)) *Lissotriton vulgaris* örneklerinin eritrositlerinde mikronukleus analizi yapılarak mikronukleus ve diğer nuklear anomaliler tespit edilmiştir. *L. vulgaris* örneklerinde tespit edilen MN ve NA'lerin lokalite ve cinsiyetler bakımından karşılaştırılması yapılmıştır. Mikronukleus ve nuklear anomalilerin çevresel kirlilikle olan ilişkileri araştırılmış ve kirliliğin genotoksik hasara sebep olabileceği düşünülmüştür.

Çalışma kapsamında değerlendirilen örneklerden elde edilen yayma preparatlar incelendiğinde mikronukleus ile birlikte çentikli nukleus, loblu nukleus, tomurcuklu nukleus ve binukleat hücreler tespit edilmiştir. Ayrıca sitoplazmik vakuol ve mikrositlere de rastlanmış fakat çok az sayıda tespit edilebildiği için istatistik bir değerlendirme yapılamamıştır.

Parametrik olmayan Mann-Whitney U testi sonucuna göre, Kalabakbaşı lokalitesi örneklerinde ortalama MN sayısı 9,25±7,02, MN frekansı % 0,3, toplam NA sayısı 71,25±23,81, NA frekansı % 2,37; Kirazlı lokalitesi örneklerinde ortalama MN sayısı 15,22±8,94, MN frekansı % 0,5, toplam NA sayısı 136,22±39,37, NA frekansı % 4,54 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre; iki lokalite karşılaştırıldığında MN sayısı Kirazlı'da Kalabakbaşı örneklerine göre daha fazla bulunmuş olup istatistiksel bir farklılık tespit edilememiştir. İstatistiksel analizler neticesinde iki lokalite arasında p değerleri mikronukleus p=0,101, çentikli p=0,001, loblu p=0,008, tomurcuklu p=0,006 ve binukleat hücre p=0,409 olarak hesaplanmıştır. İki lokalite arasında sırasıyla çentikli, tomurcuklu ve loblu nukleus bakımından yüksek düzeyde anlamlı fark bulunmuştur.

Kalabakbaşı lokalitesindeki dişi bireylerde ortalama toplam NA sayısı 69,29±26,16, NA frekansı % 2,30; Kirazlı lokalitesindeki dişi bireylerde toplam NA sayısı 143,20±35,37, NA frekansı % 4,77 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, Kalabakbaşı ve Kirazlı lokalitelerindeki *L. vulgaris* dişi populasyonları karşılaştırıldığında NA sayıları bakımından fark önemli derecede anlamlı bulunmuştur (p=0,007).

Kalabakbaşı lokalitesindeki erkek bireylerde ortalama toplam NA sayısı 73,80±22,81, NA frekansı % 2,46; Kirazlı lokalitesindeki erkek bireylerde toplam NA sayısı 127,50±47,78, NA frekansı % 4,25 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, Kalabakbaşı ve Kirazlı lokalitelerindeki *L. vulgaris* erkek populasyonları

karşılaştırıldığında NA sayıları bakımından fark önemli derecede anlamlı bulunmuştur (p=0,050).

Ayrıca cinsiyet karşılaştırılması yapıldığında iki lokalitede de toplam MN ve NA sayısı bakımından önemli fark bulunmadığı gözlemlenmiştir.

İstatistiksel olarak anlamlı bir artış bulunmamasına rağmen Kirazlı lokalitesinde bulunan örneklerin ortalama MN sayılarında test sonucuna göre artış olduğu tespit edilmiştir. Kirazlı bölgesindeki örneklerin ortalama NA sayılarında ise önemli derecede artış gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, Kirazlı bölgesindeki çevresel kirliliğin *L. vulgaris* örneklerinde genetik hasara daha fazla yol açtığı olasılığını gösterebilir. Bu da bu bölgede yürütülen yoğun maden çalışmalarının olası olumsuz etkilerinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

NA oluşumları ve mekanizması hakkında kesin bir çözüm getirebilmek için türe ait eritrositlerin kromozomal anormalliklerinin belirlenmesi, değerlendirilmesi ve buna göre yorumlanmasının önemli olduğu kanısındayız.

Ayrıca *L. vulgaris* türü ile yapılacak olan MN çalışmalarında su ve sediment örneklerinde ortaya çıkabilecek ağır metallerin analizlerinin yapılması oluşabilecek genotoksik etkilerin daha net bir şekilde ortaya koyulmasına katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

Abdelhalim M. A. K., 2011. Gold Nanoparticles Administration Induced Disarray of Heart Muscle, Hemorrhagic, Chronic Inflammatory Cells Infiltrated by Small Lymphocytes, Cytoplasmic Vacuolization and Congested and Dilated Blood Vessels. Abdelhalim Lipids in Health and Disease. 10: 233-242.

Ahmad K., Saleh J., 2010. Clastogenic Studies on Tandaha Dam Water in Asser. Journal of Black Sea/Mediterranean Environment, 16 (1): 33-42.

Alıko V., Qırjo M., Nuna E., 2014. Haematological and Morphological Effects of Copper Sulfate on the Larval Development of Green Toad, *Bufo viridis*. 4th ICE Conference, Albania. 736-743.

Ames B. N., Mccann J., Yamasaki E., 1975. Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenity Test. Mutation Research 31: 347-364.

Arıkan Ş., Gülten T., Yakut T., 2012. Benzalkonyum Klorürün İnsan Lenfositleri Üzerindeki Genotoksik Etkisinin Araştırılması. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 38 (1): 13-18.

Aymak C., 2010. Mersin Bölgesinde Yaşayan *Rana ridibunda* Pallas, 1771 (Ranidae, Amphibia)'nın Mikronükleus Test Yöntemi ile Genotoksik Etkilerinin ve Ağır Metal Kirliliğinin Tespit Edilmesi (Doktora Tezi). Mersin Üniversitesi, Türkiye.

Bıçkı D., 2011. Geleceğin Kentte İnşası: Çanakkale Kırsalında Göç Eğilimleri. Süleyman Demirel Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi Dergisi 16 (3): 149-169.

Bolognesi C., Hayashi M., 2011. Micronucleus Assay in Aquatic Animals. Mutagenesis. 26 (1): 205-213.

Burlibasa L., Gavrila L., 2011. Amphibians as Model Organisms for Study Environmental Genotoxicity. Applied Ecology and Environmental Research. 9 (1): 1-15.

Campana M.A., Panzeri A.M., Moreno V.J., Dulout F.N., 2003. Micronuclei Induction in *Rana catesbeiana* Tadpoles by the Pyrethroid Insecticide Lambda-Cyhalothrin. Genetics and Molecular Biology, 26 (1): 99-103.

Carrasco K., Tilbury K. L., Myers M. S., 1990. Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an In Situ Biological Indicator of Chemical Contaminant Effects. Can. J. Fish Aquat. Sci., 47: 2123-2136.

Çavaş T., Ergene-Gözükara S., 2003. Micronuclei, Nuclear Lesions and Interphase Silver-Stained Nucleolar Organizer Regions (AgNORs) as Cyto-Genotoxicity Indicators in *Oreochromis niloticus* Exposed to Textile Mill Effluent. Mutauion Research, 538: 81-91.

Çavaş T., Ergene-Gözükara S., 2005. Induction of Micronuclei and Nuclear Abnormalities in *Oreochromis niloticus* Following Exposure to Petroleum Refinery and Chromium Processing Plant Effluents. Aquatic Toxicology, 74: 264-271.

Çavaş T., Çinkılıç N., Vatan Ö., Yılmaz D., Coşkun M., 2012. In Vitro Genotoxicity Evaluation of Acetamiprid in CaCo-2 Cells Using the Micronucleus, Comet and γH2AX Foci Assays. Pesticide Biochemistry and Physiology, 104: 212-217.

Davis A. K., Floyd T. M., 2014. Evaluating Levels of Genotoxic Stress in Eastern Hellbenders (*Cryptobranchus alleganiensis alleganiensis*) Using the Erythrocyte Micronucleus Assay. Comp. Clin. Pathol., 23: 1189-1193.

Demirel S., ve Zamani A. G., 2002. Mikronukleus Tekniği ve Kullanım Alanları. Genel Tıp Derg.,12(3): 123-127.

Eastmond D. A., Tucker J. D., 1989. Identification Aneuploidy Inducing Agents Using Cytokinesis-Blocked Human Lymphocytes and an Antikinetochore Antibody. Environ. Mol. Mutagen., 13: 34-43.

Fenech M., Morley A. A., 1986. Cytokinesis-Blocked Micronucleus Method in Human Lymphocytes: Effect of In Vivo Agening and Dose X-Irradiation. Mutat Res, 161: 193-198.

Feng S., Kong Z., Wang X., Zhao L., Peng P., 2004. Acute Toxicity and Genotoxicity of Two Novel Pesticides on Amphibian, Rana N. Hallowell. Chemosphere, 56: 457–463.

Frossard A., Ferreira P. D., Carneiro M. T. W. D., Heringer O. A., Endringer D. C., Gomes L. C., 2013. Effect of Dietary Cadmium on Fitness, Growth, Genotoxicity and Accumulation in the Yellow-Spotted River Turtle, *Podocnemis unifilis*. Aquatic Toxicology 140-141: 239-241.

Gauthier L., Tardy E., Mouchet F., Marty J., 2004. Biomonitoring of the Genotoxic Potential (Micronucleus Assay) and Detoxifying Activity (EROD Induction) in the River Dadou (France), Using the Amphibian *Xenopus laevis*. Science of the Total Environment, 323: 47-61.

Gürkan M., Hayretdağ S., Yakın B. Y., Tok C. V., 2012. A Preliminary Study on Micronucleus Analysis and Nuclear Anomalies in *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (Amphibia: Anura) Specimens Collected Around Vize (Kirklareli) and Ida Mountains (Çanakkale, Turkey). Ege J. Fish Aqua. Sci. 29(3): 133-136.

Hayretdağ S., Gürkan M., Yakın B. Y., Tok C. V., 2014. A Preliminary Study on Micronuclei and Nuclear Abnormalities in the Erythrocytes of Some Colubrid Snakes from Turkey. Biharean Biologist 8 (1): 53-55.

Heddle J. A., Countryman R. I., 1976. The Production of Micronuclei from Chromosome Aberration in Irradiated Cultures of Human Lymphocytes. Mutat. Res. 19: 109-17.

Huang D., Zhang Y., Wang Y., Ji W., 2007. Assessment of the Genotoxicity in Toad *Bufo raddei* Exposed to Petrochemical Contaminants in Lanzhou Region, China. Mutation Research 629: 81-88.

Ilgar R., 2008. Kaz Dağı'nın Üstü "Altın"dan Kıymetli mi?. Uluslararası Sosyal Araştırmalar Dergisi, 1 (2): 170-182.

Kıran Y., Şahin A., 2005. The Effects of the Lead on the Seed Germination, Root Growth and Root Tip Cell Mitotic Divisions of *Lens culinaris* Medik. G. Ü. Fen Bilimleri Dergisi, 18 (1): 17-25.

Kontaş S., Şekeroğlu-Atlı Z., Şekeroğlu V., 2011. Kardeş Kromatid Değişimi Testi ve Kullanım Alanları. TÜBAV Bilim Dergisi. 4 (4): 226-234.

Kryukov V. I., 2000. Effects of Lead on the Induction of Micronuclei in Anuran Larvae. Russian Journal of Ecology, 31 (6): 442- 443.

Lajmanovich R. C., Cabagna M., Peltzer P. M., Stringhini G. A., Attademo A. M. 2005. Micronucleus Induction in Erythrocytes of *Hyla pulchella* Tadpoles (Amphibia: Hylidae) Exposed to Insecticide Endosulfan. Mutation Research, 587: 67-72.

Lambert M. R. K., 1996. Environmental Effects of Heavy Spillage from a Destroyed Pesticide Store near Hargeisa (Somaliland) Assessed During the Dry Season, Using Reptiles and Amphibians as Bioindicators. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 32: 80–93.

Latt S. A., Schreck R. R., 1980. Sister Chromatid Exchange Analysis. American Journal of Human Genetics, 32: 297-313.

Lewis S. M., Bain B. J., Bates I., Dacie J. V., 2006. Dacie and Lewis Practical Haematology (10th ed.). Churchill Livingstone, Edinburgh. 653 p.

Mavournin K. H., Blakey D. H., Cimino M. C., Salamone M. F., Heddle J. A., 1990. The In Vivo Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrov and Peripheral Blood: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutat. Res., 239: 29-80.

Mortelmans K., Zeiger E., 2000. The Ames *Salmonella*/Microsome Mutagenity Assay. Mutation Research, 455: 29-60.

Norppa H., Renzi L., Lindholm C., 1993. Detection of Whole Chromosomes in Micronuclei of Cytokinesis-Blocked Human Lymphocytes by Antikinetochore Staining and In Situ Hybridization. Mutagenesis, 8: 519-525.

Özeti N., Yılmaz İ., 1994. Türkiye Amfibileri (2. Baskı). Bornova, İzmir. 221 s.

Özparlak H., Arslan A., Güler G. Ö., 2011. Organik İnsektisit Fipronil'in Genotoksik Etkilerinin Civciv Mikronukleus Test Sisteminde Belirlenmesi. S. Ü. Fen Fak. Fen. Derg., 37: 1-8.

Pimentel D., Greiner A., Bashore T., 1998. Economic and Environmental Costs of Pesticide Use. In: Rose, J. (Ed.), Environmental Toxicology: Current Developments. Gordon and Breach Science Publishers, UK, pp. 121–187.

Pollo F. E., Grenat P. R., Salinas Z. A., Otero M. A., Salas N. E., Martino A. L., 2017. Evalution In Situ of Genotoxicity and Stress in South American Common Toad *Rhinella arenarum* in Environments Related to Fluorite Mine. Environ. Sci. Pollut. Res., 24: 18179-18187.

Raghunath S., Veerabhadrappa C. M., Kulkarni K., Shivashankara S. K. H., Krishnamurthy S. V. B., 2017. Nuclear Abnormalities in Erythrocytes of Frogs from Wetlands and Croplands of Western Ghats Indicate Environmental Contaminations. The Journal of Tropical Life Science, 7 (3): 208-212.

Ratko M., 2014. Erythrocyte Morphology and Frequency of Nuclear Abnormalities in European Glass Lizard (*Pseudopus apodus* Pallas, 1775). Graduation Thesis. University of Zagreb, Croatia.

Richard F., Muleris M., Dutrillaux B., 1994. The Frequency of Micronuclei with X Chromosome Increases with Age in Human Females. Mutat. Res., 316: 1-7.

Saleh K., Sarhan M. A. A., 2007. Clastogenic Analysis of Chicken Farms Using Micronucleus Test in Peripheral Blood. Journal of Applied Sciences Research, 3: 1646-1649.

Saleh K., Zeytinoğlu H., 2001. Micronucleus Test in Peripheral Erythrocytes of *Rana ridibunda* as an Indicator of Environmental Pollution. Anadolu University Journal of Science and Technology, 2: 77- 82.

Savran L., 2010. Kanser Riskinin Belirlenmesi ve Oral Malignensilerin Tanısında Mikronükleus Testinin Değerlerndirilmesi. Bitirme Tezi. Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye.

Schuytema G.S., Nebeker A.V., 1999. Effects of Ammonium Nitrate, Sodium Nitrate and Urea on Red-Legged Frogs.- Pacific Treefrogs and African Clawed Frogs. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 63: 357-364.

Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R., Schneider E. L., 1988. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. Experimental Cell Research. 175 (1): 184-191.

Sokal R. R., Rohlf F. J., 1997. Biometry. The Principles and Practice of Statistics in Biological Research (3th ed.). New York: W.H. Freeman & Company. 427-431.

Sparling D. W., Fellers G. M., McConnell L. L., 2001. Pesticides and Amphibian Populations Declines in California, USA. Environmental Toxicology and Chemistry. 20: 1591-1595.

Stich H. F., Stich W., Parida B. B., 1982. Elevated Frequency Of Micronucleated Cells in the Buccal Mucosa of Individuals at High Risk for Oral Cancer: Betel Quid Chewers. Cancer Lett., 17: 125-134.

Strunjak-Perovic I., Lisicic D., Coz-Rakovac R., Popovic N. T., Jadan M., Benkovic V., Tadic Z., 2010. Evaluation of Micronucleus and Erythrocytic Nuclear Abnormalities in Balkan Whip Snake *Hierophis gemonensis*. Ecotoxicology, 19: 1460-1465.

Şekeroğlu-Atlı Z., Şekeroğlu V. 2011a. Genetik Toksisite Testleri. TÜBAV Bilim Dergisi. 4 (3): 221-229.

Şekeroğlu V., Şekeroğlu-Atlı Z., 2011b. Micronucleus Test for Determining Genotoxic Damage. Turk. Hij. Den. Biyol. Derg., 68 (4): 241-252.

Şişman T., Aşkın H., Türkez H., Özkan H., İncekara Ü., Çolak S., 2015. Determination of Nuclear Abnormalities in Peripheral Erythrocytes of the Frog *Pelophylax ridibundus* (Anura: Ranidae) Sampled from Karasu River Basin (Turkey) for Pollution Impacts. Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research 1(2): 75-81.

Ulupınar M., Okumuş İ., 2002. Detection of Mutagenic-Carcinogenic Pollutants in Aquatic Systems Using Cytogenetic Methods in Fish. Turk. J. Zool., 26: 141-148.

Villarini M., Moretti M., Pasquini R., Scassellati-Sforzolini G., Fatigoni C. Marcarelli M., Monarca S., Rodriguez A. V., 1998. In vitro Genotoxic Effects of the Insecticide Deltamethrin in Human Peripheral Blood Leukocytes: DNA Damage ('comet' assay) in Relation to the Induction of Sister-Chromatid Exchanges and Micronuclei. Toxicology, 130: 129-139.

Yaşar O., Örge-Yaşar F., 2010. Ayvacık, Bayramiç, Çan, Ezine ve Yenice (Çanakkale İli) İlçelerinde Köy Adlarının Kaynakları. Uluslararası Sosyal Araştırmalar Dergisi, 3 (11): 599-611.

Yavuz İ. C., Bakar C., 2013. Türk Tabipleri Birliği Kazdağları ve Çanakkale Yöresi Madencilik Girişimleri Raporu (1. Baskı). Ankara, 160 s.

Yüzbaşıoğlu D., Zengin N., Ünal F., 2014. Gıda Koruyucuları ve Genotoksisite Testleri. Gıda, 39 (3): 179-186.

Zuno A., Marcon F., Leopardi P., Salvatore G., Carere A., Crebelli R., 1994. An Assessment of the In Vivo Clastogenicity of Erythrosine. Fd. Chem. Toxic., 32: 159-163.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Bircan TAŞCI

Doğum Yeri : Fatih / İstanbul

Doğum Tarihi : 16.05.1989

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2009-2013)

Yüksek Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü (2014-)

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar -SCI -Diğer

b) Bildiriler -Uluslararası –Ulusal

Taşcı, B., Tok, C. V. Amfibilerde Mikronukleus ve Nuklear Anomaliler. XII. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi 14-17 Eylül 2015, Muğla. (Poster)

Yakın, B. Y., Başkurt, M., Şahin, U., Günay, U. K., Taşcı, B., Koca, U., Tok, C. V. Gökçeada'da Yeniden Bulunan Bazı Yılan Örnekleri Hakkında. XII. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi 14-17 Eylül 2015, Muğla. (Poster)

Taşcı, B., Tok, C. V. Çanakkale Civarından Toplanan *Lissotriton vulgaris* (Linnaeus, 1758) (Amphibia: Urodela) Örneklerinde Mikronukleus Analizi ve Nuklear Anomaliler. 6. Ulusal Biyoloji Toplulukları Kongresi 28-30 Nisan 2017, Bursa. (Poster)

c) Katıldığı Projeler

Çanakkale Civarından Toplanan *Lissotriton vulgaris* (Linnaeus, 1758) (Amphibia: Urodela) Örneklerinde Mikronukleus Analizi ve Nuklear Anomaliler. ÇOMÜ BAP.

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl :

İLETİŞİM

E-posta Adresi : bircantasci89@gmail.com