



Çevre Kirliliğinin Biyoizlenmesinde Balıklarda Genotoksisite Testleri

Gülşen GÖNEY
Toksikolog

*Sorumlu Yazar:
E-posta: gulsengoney@gmail.com

Geliş Tarihi: 25 Ocak 2016
Kabul Tarihi: 01 Mart 2016

Özet

Kimyasalların üretimi ve kullanımı son yıllarda artarak devam etmektedir. Kimyasalların kullanımı ve üretiminin artmasına paralel olarak kimyasallara maruziyetin artışı da kaçınılmaz hale gelmiştir. Özellikle sucul ekosistemlerde, besin zinciri göz önüne alındığında toksik kimyasal bileşiklere insanların maruziyeti çoğunlukla balık türleri ile birlikte olmaktadır. Bu nedenle çevre kirliliğinin biyoizlenmesinde balık türlerinde yapılan ekotoksikolojik çalışmalar giderek önem kazanmaktadır. Sunulan çalışmada balık türlerinde kullanılan genotoksisite testlerinin (Comet Yöntemi, Mikroçekirdek, FISH-MÇ, Kromozomal Aberasyon, Kardeş Komatid Değişimi) çevre kirliliği biyoizlenmesindeki önemine değinilmeye çalışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Genotoksisite, Biyoizleme, Çevre Kirliliği, Sucul toksisite, Ekotoksikoloji

Biomonitoring of Environmental Pollution: Fish Genotoxicity Tests

Abstract

In recent years production of chemicals increased steadily. As a result of the production and use of chemicals that make inevitable chemicals exposure. Humans are exposed throughout their lifetime to several xenobiotics present in both the water and aquatic food. More importantly, fish species are at the top position in the aquatic food chain and may directly affect the health of humans, which makes it much of significance for the biomonitoring using fish. In this study are given information about of Fish Genotoxicity Tests (Comet Assay, Micronucleus test, FISH-MN, Chromosomal Aberration, Sister Chromatid Exchange) for the biomonitoring of environmental pollution.

Keywords: Genotoxicity, Biomonitoring, Environmental pollution, Aquatic toxicity, Ecotoxicology

GİRİŞ

Endüstri ve sanayide meydana gelen gelişmeler ile birlikte kimyasalların yoğun bir şekilde üretimi ve kullanımı da doğru orantılı olarak artış göstermiştir. Zehirli kimyasal maddelerin biyolojikümüle olması ve bazı kirlenmelerin su ortamlarında daha uzun süre kalması çevresel kirliliğin artmasına neden olmaktadır. İnsan popülasyonundaki artış ile endüstrinin gelişmesi, endüstriyel kirliliklerin ve çeşitli kimyasalların denizlerde, okyanuslarda ve göllerde genotoksik ve karsinogenik bileşiklerin birikmesine neden olmaktadır [29], [37].

Toksik kimyasalların değerlendirilmesi ve sınıflandırılmasında; kirlilik kaynağının kontrolü, kirlilik durumu, kirliliğin izlenmesi ve "sucul ekosistem sağlığı"nın değerlendirilmesi için biyoizlemede hassas ve pratik tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle biyoizlemede nispeten kolay, ucuz, kısa sürede sonuçlandırılan ve değerlendirilen biyoizleme çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır [59].

Balık türleri vücut büyüklüğü, uzun yaşam süresi, kolaylıkla çoğalabilmeleri gibi özel biyolojik karakterleri nedeniyle su kirliliğinin biyoizlenmesinde oldukça fazla kullanılmaktadır. Daha da önemlisi balık türleri sucul besin zincirinin en üst kısmında bulunduğu için besin zinciri yoluyla insan sağlığını doğrudan etkilemesi özelliği nedeniyle de balıkların biyoizleme çalışmalarında kullanılması önem teşkil etmektedir [3]. 1990'ların başında balıklarda genotoksisite testleri çevre kirliliğinin değerlendirilmesi için önerilmiş ve başlıca biyoizleme yöntemi olarak kullanılmıştır. Comet yöntemi, mikroçekirdek, kromozomal

aberrasyon testleri su kirliliğinin değerlendirilmesinde en yaygın olarak kullanılan biyoizleme metodlarından [3], [22]. Balık türlerinde maruziyetin ve etkinin biyoizlenmesini amaçlayarak yapılan in vivo ve in vitro çalışmalara göre özellikle comet ve mikroçekirdek deneyleri sonuçları kirlilik ve genotoksik hasar arasında pozitif bir korelasyon olduğunu ortaya koymaktadır [13], [32], [47]. Balık genotoksisite testleri kirliliğin düzeyinin belirlenmesi ve su habitatının genotoksik hasar düzeyinin tespitinde önemli bir biyogöstergedir [3].

Ekotoksikoloji ve Genotoksisite Testleri

Biyogöstergeler maruziyetin, erken biyolojik etkinin ve duyarlılığın miktarını kantitatif olarak ölçmektedirler [41]. Kromozomal aberrasyon ve mikroçekirdek testleri erken dönem biyolojik etkinin belirlenmesinde kullanılabilmektedir. Biyogöstergeler özellikle a) erken dönem çevresel hasar b) çevresel stresin organizma, popülasyon, komünite, ekosistem sağlığına etkisi c) kirliliğe maruz kalan organizma bireysel cevabının ve kirliliğin popülasyon düzeyindeki etkisinin belirlenmesi d) doğal hayattaki türlerin kirliliğe cevabından yola çıkılarak insan sağlığına potansiyel zararlı etkilerin erken dönemde belirlenebilmesi f) sucul ekosistemlerin dekontaminasyon düzeylerinin etkinliği hakkında bilgi sahibi olunmasını sağlarlar [45]. Genetik ekotoksikolojide; comet yönetimi, mikroçekirdek ve kromozomal aberrasyon testleri (Çizelge 1) kısa ve uzun dönem etkinin doğal ve yabancıl türlerde, indüklenmiş genetik hasarın belirlenmesinde önemli role sahiptir [30].

Comet Yöntemi

Tek hücre jel elektroforezi olarak da adlandırılan comet yöntemi ekotoksikoloji ya da “eko-genotoksikoloji” alanında yapılan çalışmalara yeni bir ufuk açmıştır. Son yıllarda çevresel kirliliğin biyoizlenmesi amaçlı yapılan çalışmalarda kullanım sıklığı giderek artan ve yaygınlaşan bir genotoksik testtir [25], [26], [42], [51].

Comet yöntemi, biyolojik etkin doz hakkında bilgi sahibi olunmasını sağladığından maruziyetin biyogöstergesi olarak kabul görmektedir. Yapılan biyoizleme çalışmaları comet yönteminin maruziyetin biyogöstergesinde kullanılabilir olacak önemli bir test olduğunu da desteklemektedir [41]. Ayrıca indüklenmiş DNA hasarının tanımlanması için yapılan genetik ekotoksikoloji çalışmalarında önemli bir role sahiptir [30].

Balık türlerinde uygulanmakta olan tek hücre jel elektroforezi, DNA hasarının belirlenmesinde hızlı, hassas ve nispeten pahalı olmayan bir yöntem olup düşük hasar seviyesini ölçebilir ve az sayıda hücre örneği kullanılmaktadır. Bu nedenlerle de ekotoksikoloji ya da eko-genotoksikoloji çalışmalarında oldukça önemli bir yere sahiptir [30], [36], [51]. Comet yönteminin uygulanması ile kimyasalların ya da metabolitlerinin, proteinlerin ve DNA katım ürünlerinin DNA’da meydana getirebileceği olası hasarın düzeyi belirlenebilmektedir [41].

Comet yöntemi, birçok memeli hücresinde çeşitli ajanların indüklediği DNA hasarı ve onarım bozukluğunun tayinini amaçlayan çalışmalarda kullanılmaktadır. Genotoksinleri ilk etki bölgelerde değerlendirebilmekte ve hemen hemen tüm ökaryotik hücrelere uygulanabilmektedir. Comet yöntemi, farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı göç etmeleri esasına dayanmaktadır [33], [54]. Tek hücre jel elektroforezi alkali versiyonu; kimyasalların ve çevresel kontaminantların genotoksik etkisinin ve çevresel biyoizlenmenin değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntem ile DNA tek zincir kırıkları, alkali labil bölgeler, çapraz bağlantıların neden olduğu hasar düzeyi tespit edilebilmektedir. Alkali comet, genotoksik hasarın tespitinde kullanımının yaygınlaşması ile validasyonu sonrasında risk değerlendirilmesinde kullanılabilir yöntemlerden biri olacaktır. Comet yöntemi göç eden DNA düzeyinden yola çıkılarak, bakteriyel enzimlerle (glikozilaz, endonükleaz) inkübasyon sonrasında oksidatif DNA hasarının, alkilasyon düzeyinin de belirlenmesini sağlayabilmektedir. Duyarlı bölgelerde hasarın ölçülmesinde formamidopirimidin DNA glikozilaz (FPG) ve endonükleaz III (ENDO III) en yaygın olarak kullanılan enzimlerdir. Genel olarak nötral comet yönteminde çift sarmal kırıkları, alkali comet yönteminde (pH>13) ise; tek ve çift sarmal kırıkları, alkali labil bölgeler, enzimle kesim yapıldığında ise spesifik DNA lezyonlarının belirlenmesi sağlanmaktadır. Bu nedenlerle comet, balık türlerinde genotoksik hasarın tespitinde önemli bir yöntemdir [30], [54].

Tek hücre jel elektroforezinin nötral versiyonu tek zincir kırıklarının tespitinde, alkali versiyonu ise DNA tek ve çift zincir kırıkları, alkali labil bölgeler ve çapraz bağlantıların belirlenmesini sağlamaktadır. Comet yöntemi programında analiz sonucu DNA hasarı ve DNA göçünün tespit edilmesi amacıyla çeşitli ölçüm çıktıları örneğin kuyruk uzunluğu (μm), kuyruk yoğunluğu (% DNA) ve kuyruk momenti ortaya çıkartılmaktadır [33], [41], [54]. Balık türlerinde yapılan biyoizleme çalışmaları çevresel maruziyet nedeniyle DNA hasarının etkilendiğini göstermektedir [20], [42], [44], [58].

Microçekirdek Deneyi

Balık türlerinde yapılan mikroçekirdek deneyi DNA hasarının tespitinde oldukça hassas ve kabul görmüş bir deneydir. Balıklarda uygulanan mikroçekirdek deneyi, in vivo genotoksik testlerinden biri olmasının yanı sıra sudaki kirliliğin in situ izlenmesinde de önem taşıyan testlerden biridir [3], [6], [27]. Balık mikroçekirdek deneyinde eritrositler, solungaçlar, böbrek ve karaciğer hücreleri gibi farklı hücre tipleri mikroçekirdek sıklığının tespit edilmesinde kullanılmaktadır [3]. Balık eritrositlerinde uygulanan MÇ deneyi, laboratuvarlarda çok sayıda genotoksik ajana maruziyet sonrasında ve farklı türlerde yapılan çalışmalar sonrasında valide edilmiştir. Balık eritrositlerinde yapılan MÇ testi tatlı su ve deniz ekosistemlerinde doğal türlerde ya da kafes hayvanlarında in situ olarak genotoksikitenin değerlendirilmesinde en sık ve en yaygın olarak kullanılan deneylerden birisidir [14].

Mikroçekirdek, kromozomal fragmentler ya da asentrik kromozomlardan oluşabilir. Bölünme sırasında kromozomdan kopan parçalar oluşan yavru hücrelerde mikroçekirdek oluşumuna neden olmaktadır ve ana çekirdekten küçük olduklarından mikroçekirdek olarak isimlendirilmektedirler. Yaklaşık olarak büyüklükleri ana çekirdeğin 1/5’i ile 1/20’si arasındadır [3]. Balık türlerinde görülen mikroçekirdekler daha küçük boyuttadır. Bunun nedeni balık kromozomlarının memeli kromozomlarından daha küçük (yaklaşık olarak 1/10 ile 1/30) olmasıdır [14], [52].

MÇ’lerin tanımlanması ve sınıflandırılması farklı laboratuvarlarda farklı gözlemlerde değişiklik gösterebilmektedir. MÇ’lerin mikroskopik değerlendirilmesinde standardizasyon için laboratuvar içi değerlendirme sonuçlarında karşılaştırmalar yapılmalıdır. Lamlar kodlanmış olarak, deney grubu mu yoksa kontrol grubunun mu değerlendirildiği hakkında ön bir bilgi edinmeden yani “kör” olarak mikroskopta değerlendirilmelidir. Üst üste binen ve hasarlı hücreler sayım sırasında dikkate alınmamalıdır. Ayrıca boyamada hata ya da boya kalıntıları MÇ olarak değerlendirilip MÇ sayımında hatalara neden olabilmektedir. Kodlamada, iyi bir tesbit ve boyama yapılmış olan slaytlar $\times 1000$ büyütmede mikroskop altında değerlendirmeye alınmalıdır. Lamların değerlendirilmesi sırasında dikkat edilmesi gereken bu hususlar değerlendirmeler yapılırken laboratuvarlar arasında meydana gelen çeşitliliği ortadan kaldırmanın yanı sıra okuyucudan kaynaklanabilecek hataların azaltılmasına da yardımcı olacaktır [3]. Balık türlerinde sitolojik anomaliler iki grupta incelenmektedir; nükleer anomaliler (NA) ve sitoplazmik anomaliler (SA). Balık MÇ deneyinde hücre tipleri ve onların tanımlanma kriterleri Çizelge 2’de gösterilmektedir. Özellikle nükleer anomaliler maruziyetin biyogöstergesi olması bakımından da önem teşkil etmektedir [6]. Balıklarda MÇ deneyinde her bir örnek için en az 1000 eritrosit değerlendirilmeye alınmalıdır [3]. Fakat bazı çalışmalar genotoksik hasarın tespiti amacıyla MÇ değerlendirmeleri yapılırken her bir balık örneği için 1000 den fazla sayıda eritrositin değerlendirmeye alınmasını önermektedirler (örneğin her bir balık için 3000 ya da 4000 eritrositin değerlendirilmesi) [8], [39], [40], [46]. Sitokinezin durdurulduğu MÇ deneyinde ise binükleer hücreler değerlendirildiğinden her bir balık örneği için 500 hücrenin değerlendirilmesi uygun görülmektedir [1].

Eko-genotoksikolojik çalışmalar göstermektedir ki balık eritrositlerinde MÇ deneyi in situ sucul kirliliğin belirteçidir [5], [10], [19], [45], [46].

FISH-MÇ (Floresan In Situ Hibridizasyon)

Balık türlerinde Floresan In Situ Hibridizasyon, genotoksisite çalışmalarına katkıda bulunan önemli bir tekniktir. FISH tekniği; MÇ'nin tam bir kromozom kaybı (anojenik) ile mi yoksa kromozom parçası kaybı (klastojenik) ile mi oluştuğunun anlaşılabilmesi bakımından önem arz etmektedir [39]. Anöploidiler hücre bölünmesi sırasında anormal ayrılma nedeniyle kromozom sayısında meydana gelen sayısal genetik değişikliklerdir. Bu tip değişiklikler kendiliğinden ya da mutajenik bir ajana maruziyetle ortaya çıkabilmektedir. Başta kirleticiler olmak üzere çevresel ajanların insan sağlığına potansiyel zararlı etkisi yapılan çalışmalarla endişe yaratmaktadır [4], [39], [55]. Balık türlerinde FISH-MÇ deneyi ile yapılan sucül ekotoksikolojik çalışmalar oldukça az olup 2014 yılında Melo ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma bunlardan biridir [39].

Kromozomal Aberasyon Deneyi

Kromozomal aberasyon, karsinojenik ve teratojenik etkilerin belirlenmesinde önemli bir genotoksisite deneyidir. Comet yöntemi ile gösterilen DNA zincir kırıkları artışı ile kromozomal aberasyonlar arasında bir artış olabileceği de bilinmektedir. Subletal (DNA zincir kırıkları ya da kromozomal aberasyonlar gibi) biyolojik cevaplar ve doğal biyota içerisindeki malignitelerin insidansı ekotoksikolojik çalışmalarda önem kazanmaktadır [43]. Yapılan çeşitli sucül ekotoksikoloji çalışmaları ile balık türlerinde kromozomal aberasyon deneyi yapılmış ve indüklenmiş kromozomal aberasyonların çevre kirliliğine bağlı olabileceği belirtilmiştir [18], [24], [57].

Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) Testi

Balık hücrelerinde yapılan SCE testi genotoksik etkinin değerlendirilmesi amacıyla oldukça önemlidir [31], [49], [60]. Soğuk sulara yaşayan balık türlerinin kültürü yapılmış periferel kan lenfositlerinde yapılan kardeş kromatid değişimi, çevre kirliliğinin biyoizlenmesinde uzun yıllardır kullanılan bir genotoksisite testidir [60]. SCE testi, çevresel kirleticilerin neden olabileceği genotoksik hasarın balık türlerinde tespit edilebilmesine olanak veren uygun bir değerlendirme aracıdır [60].

SONUÇ

Mikroçekirdek testi, FISH-MÇ, Comet yöntemi, Kromozomal aberasyon ve Kardeş kromatid değişimi deneyleri balık türlerinde hücresel düzeyde genotoksik hasarın belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerdendir (Çizelge 3). Sudaki kirliliğin izlenmesinde ve genotoksikanların etkisinin belirlenmesinde balık genotoksisite testleri oldukça önem kazanmıştır. Sunulan çalışmada sucül ekosistemlerde, balık türlerinde kimyasal kontaminasyonun biyolojik indikatörü olarak genotoksisite testlerinin önemi değerlendirilmiştir. Sonuç olarak sucül kirliliğinin biyoizlenmesinde balık genotoksisite testlerinin kullanılması erken dönem biyolojik etkinin ve maruziyetin belirlenmesi açısından oldukça önem arz etmektedir.

Çizelge 1. Çevre kirliliğinin izlenmesinde genotoksisite testleri

Genotoksisite Testi	Hücre tipi	Kaynak
Kromozomal aberasyon	Periferel Kan	[24]
Comet yöntemi	Periferel Kan	[30], [34]
Mikroçekirdek deneyi	Eritrositler, periferel lenfositler, yüzgeç, böbrek, karaciğer ve solungaç hücreleri	[2], [14], [46], [53], [56]
FISH-MÇ	Periferel Kan	[39]
Kardeş kromatid değişimi	Periferel Kan	[60]

Çizelge 2. Balık mikroçekirdek deneyinde hücre tipleri ve hücrelerin tanımlanma kriterleri

Nükleer Anomaliler (NA)		Sitoplazmik Anomaliler (SA)	
Hücre tipi	Hücre karakterizasyonu	Hücre tipi	Hücre karakterizasyonu
Mikroçekirdek (MÇ)	Ana çekirdeğin 1/20 ve 1/5'i büyüklüğünde	Anizokromatik Eritrositler (AN)	Çevresinde pigmentler içeren eritrositler
Deforme Çekirdek (DÇ)	-	Vakuollü Sitoplazma (VS)	Vakuole sahip sitoplazma
Nükleer Tomurcuk (NT);	-	Ekinosit (EK)	Sitoplazmada meydana gelen anomaliler
Loblu Çekirdek (LÇ)	-	Enükleus (EN)	Sadece sitoplazmadan oluşan eritrosit
Nükleer Köprü (NK)	-	Mikrosit (MS)	Boyutları çok küçük olan eritrositler
Vakuole Sahip Çekirdek (VÇ)	-	-	-
Binükleer Hücreler (BNH)	-	-	-

Çizelge 3. Balık türlerinde genotoksisite çalışmaları

Tür	Çalışma bölgesi	Hücre tipi	Kontaminasyon nedeni	Genotoksisite Testi	Kaynaklar
<i>Salmo trutta fario</i> (Brown trout)	-	Eritrositler	PCB 77	MÇ, Alkali Comet Yöntemi	[13]
<i>Danio rerio</i> (Zebrafish)	Almanya, Rhine ve Elbe nehirleri	Hepatositler ve solungaçlar	-	Comet Yöntemi	[51]
<i>Salmo trutta</i> (Brown trout) <i>Anguilla anguilla</i> (European eel) <i>Phoxinus phoxinus</i> (European minnow)	İspanya	Böbrek, eritrositler	Siklofosfamid, kolşisin ve kadmiyum	MÇ	[48]
<i>Anguilla anguilla</i> L. caged eel	Portekiz, Aveiro Lagoon	Karaciğer ve böbrek hücreleri	-	Comet Yöntemi	[36]
<i>Hoplias malabaricus</i>	-	Periferel kan	Tribütiltin, inorganik kurşun (Pb II)	MÇ, Comet Yöntemi, Kromozomal Aberasyon Testi	[24]
<i>Cyprinus carpio</i>	İtalya, Perugia, Trasimeno Gölü	Periferel kan	Dezenfektanlar (sodyum hipoklorit, perasetik asit ve klorid dioksit)	MÇ, Comet Yöntemi	[17]
<i>Mugil sp.</i> (gray mullet) <i>Netuma sp.</i> (sea catfish)	Güney Brezilya	Eritrositler	Metil metan sülfonat (MMS)	Comet Yöntemi	[23]
<i>Mugil sp.</i> (mullet); <i>Netuma sp.</i> (sea catfish)	Güney Brezilya nehri	Periferel kan	Çevresel kontaminantlar, mevsimsel değişiklikler	MÇ, Comet Yöntemi	[23]
<i>Zoarces viviparus</i> (eelpout)	Göteborg limanı	Eritrositler	PAH metabolitleri	Comet Yöntemi	[25]
<i>Cyprinus carpio</i> L. (common carp), <i>Carassius auratus gibelio</i> Bloch. (crucian carp), <i>Tilapia</i> (<i>Saitherodon</i>) <i>mosambica</i> (Mozambique tilapia)	Ukrayna, Kiev	Solungaç hücreleri	Bakır ve kadmiyum iyonları, kloral hidrat	MÇ	[8]
<i>Oreochromis niloticus</i>	Brezilya, São Paulo	Eritrositler	Krom bileşikleri	MÇ, Comet Yöntemi	[38]
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (rainbow trout)	-	Eritrositler	B(a)P	Alkali Comet Yöntemi	[12]
<i>Carassius auratus</i> (goldfish)	Türkiye	Periferel kan eritrositler	Herbisit (Roundup), glifosfat formülasyonu	MÇ, Comet Yöntemi	[20]
<i>Prochilodus lineatus</i>	Brezilya nehirleri	Eritrositler	Dizel kirliliği	MÇ, Comet Yöntemi	[58]
<i>Carassius auratus gibelio</i> (Prussian carp)	-	Eritrositler	Aeromonas, Pseudomonas bakterileri	MÇ, Comet Yöntemi	[11]
<i>Carassius auratus auratus</i>	Türkiye	Periferel kan eritrositleri, solungaç ve yüzgeç epitel hücreleri	Civa clorid, kurşun asetat	MÇ	[21]
<i>Hyphessobrycon luetkenii</i>	Güney Brezilya, Sinos Nehri	Periferel kan	-	Comet Yöntemi	[50]
<i>Heteropneustes fossilis</i> (Fresh Water Catfish)	Hindistan	Böbrek ve periferel kan eritrositleri	Kına, (sentetik kına)	MÇ	[35]
<i>Oreochromis niloticus</i> (Cichlidae)	Brezilya, São Paulo	Eritrositler	-	MÇ ve NA (Nükleer Anomaliler)	[53]
<i>Apteronotus bonapartii</i> (Amazonian electric fish)	-	Eritrositler	Benzen	MÇ, Comet Yöntemi	[15]
<i>Therapon jarbua</i>	-	Solungaç, kan, böbrek hücreleri	Çinko klorid (HgCl ₂)	Comet Yöntemi	[42]
<i>Cnesterodon decemmaculatus</i> (Pisces, Poeciliidae)	-	Periferel kan eritrositleri	Herbisitler; 3,6-dikloro-2-metoksibenzoik asid (dicamba)	MÇ, Comet Yöntemi	[7]

<i>Synodontis clarias, Tilapia nilotica,</i>	Nijerya, Anambra Nehri	Solungaç ve böbrek eritrositleri	Ağır metaller ve PAH'lar	MÇ	[46]
<i>Oreochromis niloticus (Nile tilapia)</i>	-	Eritrositler	Rotenon (Pestisitler, piscisitler)	FISH MÇ	[39]
<i>Oncorhynchus mykiss (rainbow trout)</i>	-	Hepatositler	Heterosiklik PAH'lar	MÇ	[16]
<i>Labeo rohita (Indian major Carp)</i>	-	Eritrositler ve solungaç hücreleri	Heksavalan kromiyum (Potasyum dikromat)	MÇ, Comet Yöntemi	[44]

KAYNAKLAR

[1] Al-Sabti, K., 1994. Micronuclei induced by selenium, mercury, methylmercury and their mixtures in binucleated blocked fish erythrocyte cells, *Mutation Research*, 320, 157-163.

[2] Al-Sabti, K., Franko, M., Andrijani, B., Knez, S., Stegnar, P., 1994. Chromium induced micronuclei in fish, *Journal of Applied Toxicology*, 14, 333-336.

[3] Al-Sabti, K., Metcalfe, C.D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 343(2), 121-135.

[4] Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E., Tice, R., Waters, M.D., Aitio, A., 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *International Programme on Chemical Safety. Mutation Research*, 463:111-172.

[5] Ali, F., El-Shehawi, A.M., Seehy, M.A., 2008. Micronucleus test in fish genome: A sensitive monitor for aquatic pollution. *African journal of biotechnology*, 7(5), 606-612.

[6] Anbumani, S. and Mohankumar, M.N., 2011. Nuclear and cytoplasmic abnormalities in the fish *Catla catla* (Hamilton) exposed to chemicals and ionizing radiation. *Research Journal of Environmental Sciences*, 5(12), p.867.

[7] de Arcaute, C.R., Soloneski, S. and Larramendy, M.L., 2014. Evaluation of the genotoxicity of a herbicide formulation containing 3, 6-dichloro-2-metoxibenzoic acid (dicamba) in circulating blood cells of the tropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 773, 1-8.

[8] Arkhipchuk, V.V., Garanko, N.N., 2005. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62(1), 42-52.

[10] Ayllon, F., Garcia-Vazquez, E., 2001. Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49(3), 221-225.

[11] Bagdonas, E. and Lazutka, J.R., 2007. Evaluation of DNA damage by means of the comet assay and micronucleus test in erythrocytes of Prussian carp (*Carassius auratus gibelio*) infected with ulcerative disease. *Biologija*, 53(3), 1-5.

[12] Barga, I. D., Frenzilli, G., Scarcelli, V., Nigro, M., Malmvarn, A., Asplund, L., Forlin, L. and Struve, J., 2006. Effects of algal extracts (*Polysiphonia fucoides*) on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a biomarker approach. *Marine Environmental Research*, 62, 283-286.

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

[14] Bolognesi, C., Hayashi, M., 2011. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*, 26(1), 205-213.

[15] Buckner, A., Carvalho, M., Conceição, M. and Alves-Gomes, J., 2012. Micronucleus test and comet assay in erythrocytes of the Amazonian electric fish *Apteronotus bonapartii* exposed to benzene. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 7(1).

[16] Brinkmann, M., Blenkle, H., Salowsky, H., Bluhm, K., Schiwy, S., Tieh, A. and Hollert, H., 2014. Genotoxicity of heterocyclic PAHs in the micronucleus assay with the fish liver cell line RTL-W1. *PloS one*, 9(1), p.e85692.

[17] Buschini, A., Martino, A., Gustavino, B., Monfrinotti, M., Poli, P., Rossi, C., Santoro, M., Dörr, A.J.M. and Rizzoni, M., 2004. Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 557(2), 119-129.

[18] Cestari, M.M., Lemos, P.M.M., Ribeiro, C.A.D.O., Costa, J.R.M.A., Pelletier, E., Ferraro, M.V., Mantovani, M.S., Fenocchio, A.S., 2004. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. *Genetics and Molecular Biology*, 27(2), 270-274.

[19] Çavaş, T., Ergene, G., Gözükara, S., 2005. Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environmental and molecular mutagenesis*, 46(1), 64-70.

[20] Çavaş, T. and Könen, S., 2007. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis*, 22(4), 263-268.

[21] Çavaş, T., 2008. In vivo genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: micronucleus test on acridine orange stained fish cells. *Food and Chemical Toxicology*, 46(1), 352-358.

[22] De Flora, S., Vigano, L., D'agostini, F., Camoirano, A., Bagnasco, M., Bennicelli, C., Melodia, F. and Arillo, A., 1993. Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 319(3), 167-177.

[23] De Andrade, V.M., Da Silva, J., Da Silva, F.R., Heuser, V.D., Dias, J.F., Yoneama, M.L. and De Freitas, T.R., 2004. 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(5), 459-468.

[24] Ferraro, M.V.M., Fenocchio, A.S., Mantovani, M.S., Ribeiro, C.D.O., Cestari, M.M., 2004. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genetics and Molecular Biology*, 27(1), 103-107.

[25] Frenzilli, G., Scarcelli, V., Del Barga, I., Nigro, M.,

- Förlin, L., Bolognesi, C. and Sturve, J., 2004. DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Göteborg harbour. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 552(1), 187-195.
- [26] Frenzilli, G., Nigro, M., Lyons, B.P., 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 681(1), 80-92.
- [27] Hayashi, M., Ueda, T., Uyeno, K., Wada, K., Kinai, N., Saotome, K., Tanaka, N., Takai, A., Sasaki, Y.F., Asano, N., Sofuni, T., 1998. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 399(2), 125-133.
- [28] Heddle, J.A., 1973. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutation Research*, 18, 307-317.
- [29] Hutzinger, O., Tulp, M.T.M., Zitko, V., 2015. Chemicals with pollution potential. *Aquatic Pollutants: Transformation and Biological Effects*, 1, p.13.
- [30] Jha, A.N., 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis*, 23(3), 207-221.
- [31] Kligerman, A.D., Bishop, W.E., Valentine, L.C., 1984. Use of the mud minnow (*Umbra* sp.) in an in vitro sister chromatid test. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 65: 111-118.
- [32] Klobučar, G.I., Štambuk, A., Pavlica, M., Erben, R., 2006. Genotoxicity monitoring of freshwater environment: comet and micronucleus assays. In *Symposium Pollutant responses in marine organisms*, 62; 306-316.
- [33] Kumaravel, T. S., Jha, A. N., 2006. Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutation Research*, 605, 7-16.
- [34] Kumaravel, T. S., Vilhar, B., Faux, S. P., Jha, A. N., 2007. Comet assay measurements: a perspective. *Cell Biol. Toxicol.*, doi: 10.1007/s10565-007-9043-9.
- [35] Malla, T.M., Senthilkumar, C.S., Akhtar, S., Ganesh, N., 2011. Micronuclei as an evidence of DNA damage in freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch) exposed to synthetic indoor. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 6, 1990-6145.
- [36] Maria, V. L., Correia, A. C., Santos, M. A., 2003. Genotoxic and biochemical responses in caged eel (*Anguilla anguilla* L.) after short-term exposure to harbour waters. *Environment International*, 29, 923-929.
- [37] Martins, M., Ferreira, A.M., Costa, M.H., Costa, P.M., 2015. Comparing the genotoxicity of a potentially carcinogenic and a noncarcinogenic PAH, singly, and in binary combination, on peripheral blood cells of the European sea bass. *Environmental toxicology*.
- [38] Matsumoto, S.T., Mantovani, M.S., Malagutti, M.I.A., Dias, A.L., Fonseca, I.C. and Marin-Morales, M.A., 2006. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genetics and Molecular Biology*, 29(1), 148-158.
- [39] Melo, K.M., Grisolia, C.K., Pieczarka, J.C., de Souza, L.R., de Souza Filho, J., Nagamachi, C.Y., 2014. FISH in micronucleus test demonstrates aneugenic action of rotenone in a common freshwater fish species, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mutagenesis*, 29 (3) 215-219.
- [40] Metcalfe, C.D., 1988. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of mudminnows (*Umbra limi*) and brown bullheads (*Ictalurus nebulosus*), *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 40, 489-495.
- [41] Møller, P., 2006. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 98(4), 336-345.
- [42] Nagarani, N., Devi, V.J., Kumaraguru, A.K., 2012. Identification of DNA damage in marine fish *Therapon jarbua* by comet assay technique. *Journal of Environmental Biology*, 33(4), p.699.
- [43] Nagpure, N.S., Pandey, S., Sharma, S., 2005. Single cell gel electrophoresis (SCGE) or comet assay. In: Kapour, D and Nagpour, N.S (eds), *Training on genotoxic assays in fishes*. National Bureau of Genetic Resources. Dilkusha, Telibagh, India. 68 Pp.
- [44] Nagpure, N.S., Srivastava, R., Kumar, R., Kushwaha, B., Srivastava, S.K., Kumar, P., Dabas, A., 2015. Assessment of genotoxic and mutagenic potential of hexavalent chromium in the freshwater fish *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). *Drug and chemical toxicology*, 38(1), 9-15.
- [45] Obiakor, M., Okonkwo, J., Nnabude, P., Ezeonyejiaku, C., 2012. Eco-genotoxicology: micronucleus assay in fish erythrocytes as in situ aquatic pollution. *Journal of Animal Science Advances*, 2(1), pp.123-133.
- [46] Obiakor, M.O., Okonkwo, J.C., Ezeonyejiaku, C.D., 2014. Genotoxicity of freshwater ecosystem shows DNA damage in preponderant fish as validated by in vivo micronucleus induction in gill and kidney erythrocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 775, 20-30.
- [47] Raisuddin, S., Jha, A.N., 2004. Relative sensitivity of fish and mammalian cells to sodium arsenate and arsenite as determined by alkaline single cell gel electrophoresis and cytokinesis block micronucleus assay. *Environmental and molecular mutagenesis*, 44(1), 83-89.
- [48] Rodriguez-Cea, A., Ayllon, F., Garcia-Vazquez, E., 2003. Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56(3), 442-448.
- [49] Sahoo, P.K., Barat, A., Ponniah, A.G., 1998. In vitro sister chromatid differentiation and base line sister chromatid exchanges in *Channa punctatus*. *Indian J. Exp. Biol.* 36: 1041-1043.
- [50] Scalon, M.C.S., Rechenmacher, C., Siebel, A.M., Kayser, M.L., Rodrigues, M.T., Maluf, S.W., Rodrigues, M.A.S., Silva, L.B.D., 2010. Evaluation of Sinos River water genotoxicity using the comet assay in fish. *Brazilian Journal of Biology*, 70(4), 1217-1222.
- [51] Schnurstein, A., Braunbeck, T., 2001. Tail moment versus tail length—application of an in vitro version of the comet assay in biomonitoring for genotoxicity in native surface waters using primary hepatocytes and gill cells from zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49(2), 187-196.
- [52] Schmidt, W., 1975. The micronucleus test. *Mutation Research*, 31, 9-15.
- [53] Seriani, R., Abessa, D., Kirschbaum, A.A., Pereira, C.D.S., Ranzani-Paiva, M.J.T., Assunção, A., Silveira, F.L., Romano, P. and Mucci, J.L.N., 2012. Water toxicity and cyto-genotoxicity biomarkers in the fish *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 7(2).
- [54] 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 re-*

search, 175(1), 184-191.

[55] Sprague, J.B., 1970. Measurement of pollutant toxicity to fish. II. Utilizing and applying bioassay results. *Water Research*, 4(1), 3-32.

[56] Udroui, I., 2006. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology*, 79(2), 201-204.

[57] Ueda, T., Hayashi, M., Ohtsuka, Y., Nakamura, T., Kobayashi, J., Sofuni, T., 1992. A preliminary study of the micronucleus test by acridine orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic cells. *Water Science and Technology*, 25(11), 235-240.

[58] Vanzella, T.P., Martinez, C.B.R., Cólus, I.M.S., 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 631(1), 36-43.

[59] Wells, P.G., 1999. Biomonitoring the health of coastal marine ecosystems—the roles and challenges of microscale toxicity tests. *Marine Pollution Bulletin*, 39(1), 39-47.

[60] Zakour, H.R., Landolt, M.L., Kocan, R.M., 1984. Sister chromatid exchange analysis in cultured peripheral blood leucocytes of the cold water marine fish, Pacific staghorn (*Leptocottus armatus*): a feasible system for assessing genotoxic marine pollutants. *Basic Life Sciences* 29: 493-508.