

Çanakkale Civarından Toplanan *Lissotriton vulgaris* (Linnaeus, 1758) (Amphibia: Urodela) Örneklerinde Mikronukleus Analizi ve Nükleer Anomaliler*

Bircan TAŞCI¹, Cemal Varol TOK^{2*}

¹⁻²Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

06.08.2018 Geliş/Received, 27.09.2018 Kabul/Accepted

Özet

Bu çalışmada, Çanakkale'nin iki farklı bölgesinden toplanan [Kalabakbaşı köyü 12 (5♂♂, 7♀♀), Kirazlı köyü 9 (4♂♂, 5♀♀)] *Lissotriton vulgaris* örneklerinden hazırlanan kan preparatlarında genetik materyaldeki hasarın göstergelerinden biri olan mikronukleus (MN) ve nükleer anomaliler (NA) belirlenmiştir. Çalışmada mikronukleusun yanısıra binukleat, tomurcuklu nükleus, loblu nükleus ve çentikli nükleus olmak üzere 4 tip nükleer anomaliye ilaveten sitoplazmik vakuol (SV) ve mikrosit saptanmıştır. İki lokalite arasında sırasıyla çentikli, tomurcuklu ve loblu nükleer anomaliler bakımından istatistiki olarak yüksek düzeyde anlamlı fark bulunmuştur. Nükleer anomali sayıları bakımından Kalabakbaşı ve Kirazlı lokalitelerindeki *L. vulgaris* dişi ve erkek popülasyonları kendi aralarında karşılaştırıldığında, önemli derecede istatistiki fark bulunmuştur. Ayrıca cinsiyet karşılaştırılması yapıldığında iki lokalitede de SV, MN ve NA sayısı bakımından önemli fark bulunmadığı gözlemlenmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar, Kirazlı bölgesindeki altın madeninde yapılan çalışmalardan dolayı genotoksik maddelerin bulunabileceğini ve genotoksik hasarın göstergelerinden biri olan MN oluşumlarının burada bulunan kirleticilerden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Lissotriton vulgaris*, Çanakkale, Urodela, mikronukleus testi, nükleer anomali

Micronuclei Analysis and Nuclear Abnormalities in *Lissotriton vulgaris* (Linnaeus, 1758) (Amphibia: Urodela) Specimens Collected in Çanakkale

Abstract

In this study, *Lissotriton vulgaris* specimens collected from different locations in Çanakkale (Kalabakbaşı; 12 (5♂♂, 7♀♀), Kirazlı; 9 (4♂♂, 5♀♀)) were analyzed. In the blood samples from the specimens, micronuclei (MN) and nuclear abnormalities (NA), an indicator of damage in a genetic material, were identified. Cytoplasmic vacuole (CV) and microcytes too were detected in addition to micronuclei and four types of nucleolar anomalies, i.e.

*Sorumlu Yazar (Corresponding Author): Cemal Varol Tok

(e-posta: cvtok@comu.edu.tr)

Bu çalışma ÇOMÜ BAP Koordinasyon Birimince desteklenmiştir. Proje numarası: FYL-2016-763

Bu makale Bircan Taşcı'nın tez konusu kapsamında yazılmıştır.

binucleated, blebbed, lobed, and notched nucleus. A statistically significant difference was found between the two localities in terms of notched, blebbed and lobulated nuclear abnormalities respectively. The between-group comparison of the female and male *L. vulgaris* populations in Kalabakbaşı and Kirazlı localities yielded highly significant differences in the NA number. In addition, the gender-based comparisons revealed no significant difference in the total number of CV, MN, and NA in the two localities. Relying on the obtained results, genotoxic substances may be suggested to occur due to the mining-oriented work in Kirazlı and MN formation, one of the indicators of genotoxic damage, to have resulted from the pollutants therein.

Keywords: *Lissotriton vulgaris*, Çanakkale, Urodela, micronucleus test, nuclear abnormalities

1. Giriş

Sucul kirleticiler, suda yaşayan canlıların popülasyon, komünite ve ekosistem düzeylerini, popülasyon 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 kontaminasyonun, hedef organizmalarla birlikte hedef olmayan organizmalara da etkisi vardır (Pimentel ve ark., 1998).

Lissotriton vulgaris, Türkiye'nin özellikle kuzey batısında yaygın dağılışı gösteren bir amfibi türüdür (Özeti ve Yılmaz, 1994). Bu tür, üreme dışında karasal olmakla birlikte üreme zamanında suya bağımlı olması sebebiyle oluşabilecek her türlü kimyasal değişimlerden etkilenmektedir (Gürkan ve ark., 2012).

Mikronukleuslar (MN), mitoz bölünme sırasında sitoplazma içerisinde yer alan, ana nukleusdan bağımsız, tam kromozom veya sentromersiz kromozom parçalarından meydana gelen oluşumlardır (Savran, 2010). Micronukleuslar 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 olmaktadır (Zuno ve ark., 1994).

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 testidir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu-Atlı, 2011b).

Genotoksik hasarın belirlenmesi amacıyla bir çok canlı türü üzerine mikronukleus analiz çalışmaları dünya çapında hızla artmaktadır (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).

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

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 Örgen-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

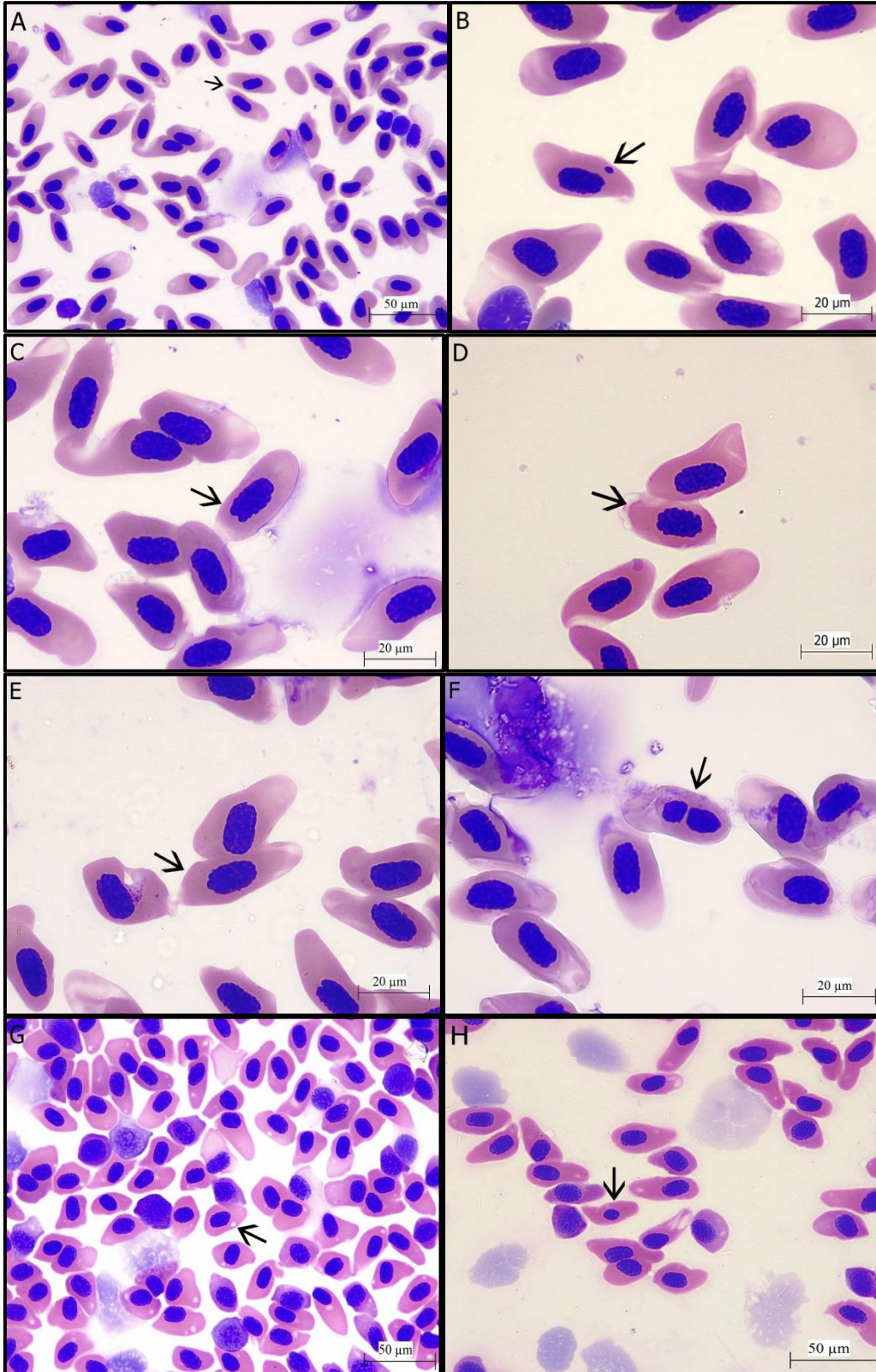
lokaliteden toplanan *L. vulgaris* örnekleri üzerinde, kirlilik belirteci olan mikronukleus ve nuklear anomalilerin mikronukleus testiyle belirlenmesi, buldukları ortamdaki kirlilikten etkilenip etkilenmedikleri ve dolayısıyla çevresel kontaminasyonun genetik bir hasar oluşturup oluşturmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

2. 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 *L. vulgaris* örneği yakalanmıştır. Çalışma, 30.07.2015 tarih, B.30.2.ÇAÜ.0.05.06-050.04-03 sayılı Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu iznine uygun olarak yapılmıştır. Eter ile bayıltılmış hayvanların kalbinden kan örnekleri alınmış ve heparinli kılcal tüplere konulmuştur. 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. Bu örneklerde MN oluşumları ve diğer nuklear anomaliler (NA) incelenmiştir. Countryman ve Heddle (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). Mikronukleus ve nuklear anomali frekanslarının belirlenmesi amacıyla her bir preparattan 1000 eritrosit incelenmiş ve görüntüleri, Leica DM-500 marka kameralı binoküler ışık mikroskobu kullanılarak kaydedilmiştir. Bu eritrositlerin içerisindeki MN ve NA taşıyanların sayıları tespit edilerek yüzdeleri çıkarılmıştır. 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 ve Rohlf, 1997). Analizler %95 güven aralığında yapılmış ve değerlendirilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

Bu çalışmada mikronukleus analizi ile mikronukleus ve diğer nuklear anomalilerin belirlenebilmesi için *Lissotriton vulgaris* örneklerinin eritrositleri incelenmiştir. Örneklerden elde edilen yayma preparatlar incelendiğinde mikronukleus, çentikli nukleus, loblu nukleus, tomurcuklu nukleus ve binukleat hücrelerin yanısıra sitoplazmik vakuol ve mikrositler de tespit edilmiştir (Şekil 3.1). Nuklear anomaliler Carrasco ve ark. 1990'na göre sınıflandırılmıştır (Çavaş ve Ergene-Gözükara, 2005).



Şekil 3.1. *L. vulgaris* örneklerinde gözlenen normal nukleus, mikronukleus, nuklear anomaliler, sitoplazmik vakuol ve mikrosit (A: normal eritrosit, B: mikronukleus, C: çentikli nukleus, D: loblu nukleus, E: tomurcuklu nukleus, F: binukleat hücre, G: sitoplazmik vakuol, H: mikrosit)

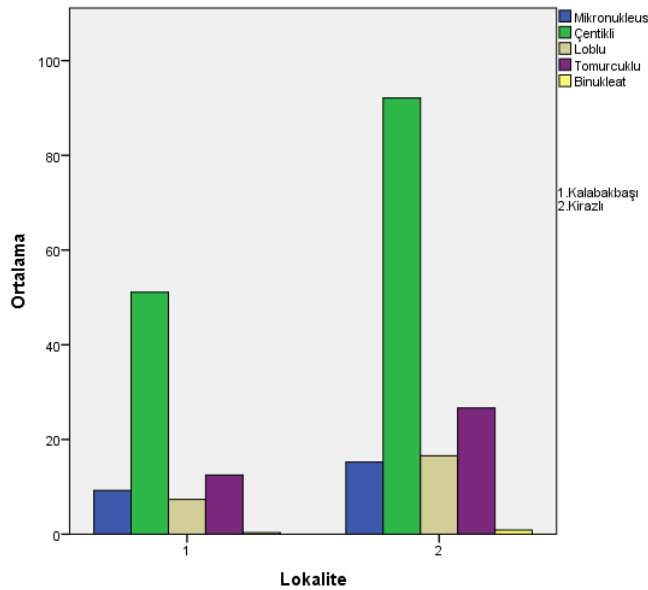
3.1. Lokalite ve Cinsiyete Bağlı Olarak Yapılan Ölçümler

Çalışma kapsamında değerlendirilen Çanakkale Kalabakbaşı lokalitesi *L. vulgaris* örneklerinde ortalama MN sayısı 9.25 ± 7.02 , MN frekansı % 0.3, toplam NA sayısı 71.25 ± 23.81 , NA frekansı % 2.37, SV sayısı 124.08 ± 106.43 , SV frekansı % 4.13; Çanakkale Kirazlı lokalitesi *L. vulgaris* örneklerinde ortalama MN sayısı 15.22 ± 8.94 , MN frekansı % 0.5, toplam NA sayısı 136.22 ± 39.37 , NA frekansı % 4.54, SV sayısı 558.67 ± 458.00 , SV frekansı % 18.622 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.1). İstatistiksel analizler neticesinde mikronukleus ($p=0.101$), çentikli ($p=0.001$), loblu ($p=0.008$), tomurcuklu ($p=0.006$), binukleat hücre ($p=0.409$) ve sitoplazmik vakuol ($p=0.002$) olarak hesaplanmıştır. Mann-Whitney U testi sonucuna göre iki lokalite karşılaştırıldığında toplam MN sayısı açısından anlamlı fark bulunmadığı belirlenmiştir. İki lokalite arasında sırasıyla çentikli nukleus, sitoplazmik vakuol, tomurcuklu nukleus ve loblu nukleus bakımından yüksek düzeyde anlamlı fark bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Cinsiyet farkı gözlemlenmemiş MN ve NA'lar ayrı ayrı değerlendirilmiş olup iki lokalite arasındaki ilişkisi grafik ile gösterilmiştir (Şekil 3.2).

Çizelge 3.1. Çanakkale Kalabakbaşı ve Kirazlı bölgelerindeki *L. vulgaris* örneklerine 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
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

(SD: standart sapma, MN: mikronukleus, NA: nuklear anomali)

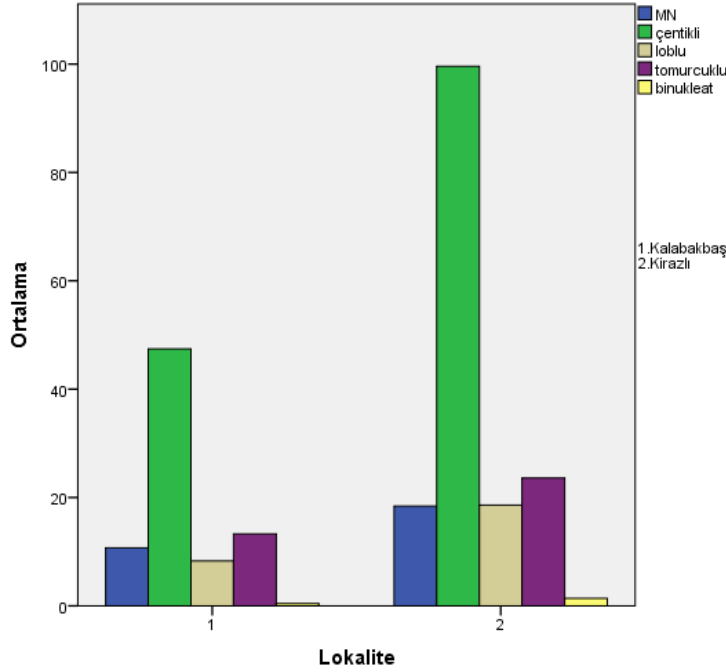


Şekil 3.2. Çanakkale Kalabakbaşı ve Kirazlı'dan toplanan *L. vulgaris* örneklerindeki ortalama mikronukleus ve nuklear anomali sayıları

Çanakkale Kalabakbaşı lokalitesindeki dişi *L. vulgaris* örneklerinde 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 3.2). Mann-Whitney U testi sonucunda Kalabakbaşı ve Kirazlı örnekleri arasında NA sayıları bakımından fark önemli derecede anlamlı bulunmuştur ($p=0.007$). Dişi bireylerdeki MN ve NA'lar ayrı ayrı değerlendirilmiş olup iki lokalite arasındaki fark Şekil 3.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Çanakkale Kalabakbaşı ve Kirazlı bölgelerindeki *L. vulgaris* dişi örneklere 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

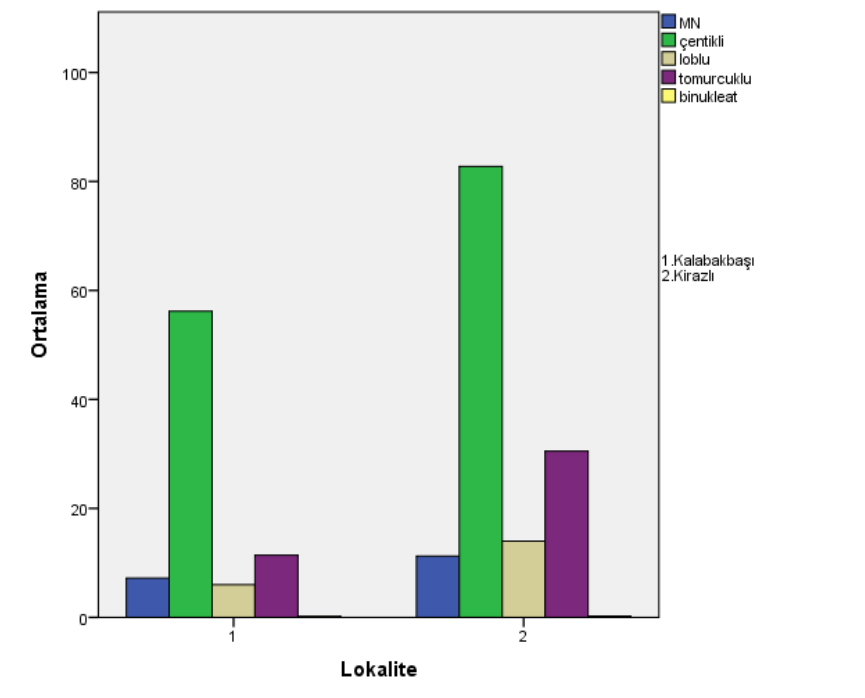


Şekil 3.3. Çanakkale Kalabakbaşı ve Kirazlı'dan toplanan *L. vulgaris* dişi örneklerin ortalama mikronukleus ve nuklear anomali sayıları

Kalabakbaşı lokalitesindeki *L. vulgaris*'e ait erkek örneklerde ortalama toplam NA sayısı 73.80 ± 22.81 , NA frekansı % 2.46; Kirazlı lokalitesindeki erkek *L. vulgaris* örneklerinde toplam NA sayısı 127.50 ± 47.78 , NA frekansı % 4.25 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.3). Bu sonuca göre iki lokalite karşılaştırıldığında toplam NA sayısı açısından fark önemli derecede anlamlı bulunduğu belirlenmiştir ($p=0.050$). Erkek *L. vulgaris* örneklerindeki MN ve NA'lar ayrı ayrı değerlendirilmiş olup, iki lokalite arasındaki ilişki grafik ile gösterilmiştir (Şekil 3.4).

Çizelge 3.3. Çanakkale Kalabakbaşı ve Kirazlı bölgelerindeki *L. vulgaris* erkek örneklere ait toplam NA istatistikleri

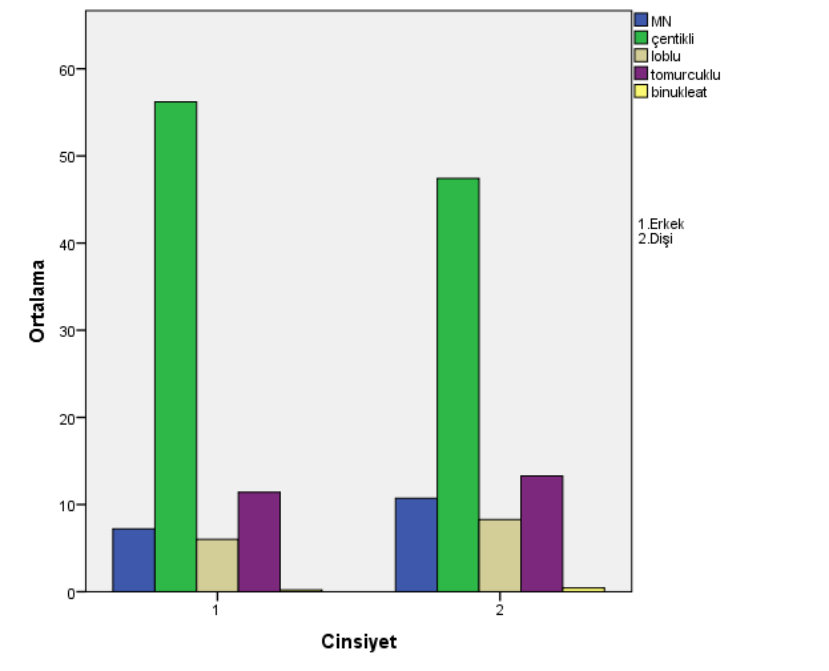
Cinsiyet	Örnek sayısı	Örneklerin toplandığı alan	Analiz edilen eritrosit sayısı	Ortalama±SD (NA)	%NA frekansı
♂♂	5	Kalabakbaşı	15000	73.80±22.81	2.46
	4	Kirazlı	12000	127.50±47.78	4.25

Şekil 3.4. Çanakkale Kalabakbaşı ve Kirazlı'dan toplanan *L. vulgaris* erkek örneklerin ortalama mikronukleus ve nuklear anomali sayıları

Kalabakbaşı lokalitesindeki erkek *L. vulgaris* örneklerinde ortalama MN sayısı 7.20 ± 5.71 , MN frekansı % 0.24, toplam NA sayısı 73.80 ± 22.81 , NA frekansı % 2.46; dişi *L. vulgaris* örneklerinde 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 3.4). 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 ($p \leq 0.05$). Kalabakbaşı lokalitesindeki *L. vulgaris* popülasyonuna ait MN ve NA'lar ayrı ayrı değerlendirilmiş olup cinsiyetler arasındaki ilişki Şekil 3.5'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Çanakkale Kalabakbaşı bölgesindeki *L. vulgaris* erkek ve dişi örneklerle 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

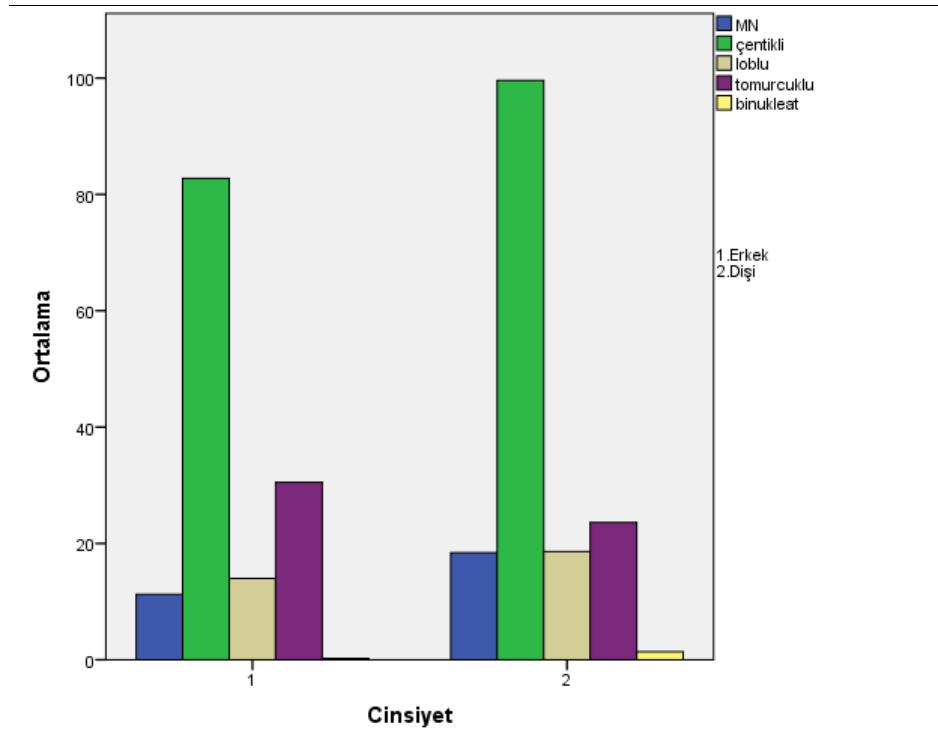


Şekil 3.5. Çanakkale Kalabakbaşı'ndan toplanan *L. vulgaris* dişi ve erkek örneklerin ortalama mikronukleus ve nuklear anomali sayıları

Kirazlı lokalitesindeki erkek *L. vulgaris* örneklerinde ortalama MN sayısı 11.25±8.65, MN frekansı % 0.37, toplam NA sayısı 127.50±47.78, NA frekansı % 4.25; dişi *L. vulgaris* örneklerinde 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 3.5). 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 ($p \leq 0.05$). Kirazlı lokalitesindeki *L. vulgaris* popülasyonuna ait MN ve NA'lar ayrı ayrı değerlendirilmiş olup cinsiyetler arasındaki ilişki Şekil 3.6'da sunulmuştur.

Çizelge 3.5. Çanakkale Kirazlı bölgesindeki erkek ve dişi *L. vulgaris* örneklerine 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 3.6. Çanakkale Kirazlı'dan toplanan *L. vulgaris* dişi ve erkek örneklerin ortalama mikronukleus ve nuklear anomali sayıları

Bu çalışmadaki Kalabakbaşı ve Kirazlı lokalitelerinde dağılışı gösteren *Lissotriton vulgaris* örneklerinde, çevresel kirleticilere bağlı olduğu düşünülen mikronukleus ve diğer nuklear anomalilerin oluşumu ortaya konulmuştur. *L. vulgaris* örneklerinde tespit edilen MN ve NA'ların lokalite ve cinsiyetler bakımından karşılaştırılması yapılmıştır. Mikronukleus ve nuklear anomalilerin çevresel kirlilikle olan ilişkileri araştırılmış ve kirliliğin genotoksik hasara sebep olabileceği düşünülmüştür. Örnekler, altın madeni çalışmalarının yürütüldüğü Çanakkale Kirazlı köyü civarıyla, maden faaliyetlerinin nispeten daha az yürütüldüğü Çanakkale Kalabakbaşı köyünden toplanmıştır. Maden faaliyetlerinin daha yoğun olduğu bölgeyle daha az yoğun olduğu bölgedeki örneklerde mikronukleus analizi bu sebeple yapılmıştır.

Gürkan ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada, pestisit kontaminasyonu bakımından kirli olduğu düşünülen Vize'den (Kırklareli) ve Kazdağı'ndan (Yenice, Çanakkale) toplanan *Pelophylax*

ridibundus (Ova Kurbağası) örneklerinde ortalama MN sayısı ve frekansını 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 karşılaştırıldığında 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), yaptığı çalışmada lokalite ve cinsiyete bağlı MN analizi yapmıştır. 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 sayısının yüksek düzeyde anlamlı olduğu görülmüştür. Ayrıca cinsiyet karşılaştırılması yapıldığında iki lokalitede de toplam SV, MN ve NA sayısı bakımından önemli fark bulunmadığı gözlemlenmiştir.

4. Sonuç

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 vakuolizasyon, seçici geçirgen membran yapısının bozulduğunun göstergesidir. Diğer bulgular ile birlikte değerlendirildiğinde bu durumun yüksek olasılıkla çevresel kirleticilerin toksik etkisinden kaynaklı olabileceği düşünülebilir.

Şişman ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada nehrin yüzey suyu örneklerinde ağır metallerin konsantrasyonlarının yüksek olduğunu tespit etmiştir (Cd, Al, As, Pb ve Mn). Nehrin kirlenmiş olması ile *Pelophylax ridibundus* örneklerinin eritrositlerindeki MN ve NA'lerin artışı arasında kuvvetli bir ilişki olduğunu belirtmiştir. Yapılan bu çalışma ile yüksek ağır metal seviyelerinin toksisiteye yol açtığı düşünülebilir. Tespit edilen genotoksisite ise bizim çalışmamızda madene yönelik aktivitelerle ilgili olabileceği gibi endüstriyel, tarımsal ve evsel aktivitelerle ilgili olabileceğini göstermektedir.

Benzer şekilde Aymak (2010) yaptığı çalışmada *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 sonuçlar ağır metallerin sulak alanları kirlittiğini 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. Pollo ve ark. (2017)'nin 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.

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 açtığını göstermektedir. Bu da bu bölgede yürütülen yoğun maden çalışmalarının olası olumsuz etkilerinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

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.

Nükleer anomali 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.

Teşekkür

Bu çalışma bir Yüksek Lisans Tezi olup, FYL-2016-763 nolu proje ile Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Kaynakça

- Abdelhalim MAK., 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. doi: <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-233>
- Arıkan Ş., Gülten T., Yakut T., 2012. Benzalkonyum klorürün insan lenfositleri üzerindeki genotoksik etkisinin araştırılması. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 38(1):13-18. [in Turkish]
- 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. 90 p. [in Turkish]
- Bıçkıcı D., 2011. Geleceğin kentte inşası: Çanakkale kırsalında göç eğilimleri. *Süleyman Demirel Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi Dergisi*. 16(3):149-169. [in Turkish]
- Bolognesi C., Hayashi M., 2011. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*. 26(1):205-213. doi: [10.1093/mutage/geq073](https://doi.org/10.1093/mutage/geq073)
- 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. doi: <http://dx.doi.org/10.1139/f90-237>
- Countryman P.I., Heddle J.A., 1976. The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res*. 19:109-117. doi: [10.1016/0027-5107\(76\)90105-6](https://doi.org/10.1016/0027-5107(76)90105-6).
- 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 γ H2AX foci assays. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 104:212-217. doi: [10.1016/S1383-5718\(03\)00091-3](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(03)00091-3)
- 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. *Mutation Research*. 538:81-91. doi: [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(03\)00091-3](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(03)00091-3)
- 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. doi: [10.1016/j.aquatox.2005.06.001](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.06.001)
- 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. doi: [10.1007/s00580-013-1761-1](https://doi.org/10.1007/s00580-013-1761-1).
- Demirel S., ve Zamani A.G., 2002. Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Derg*. 12(3):123-127. [in Turkish]

- 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. doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.02.010.
- 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. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.06.002>
- 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. doi: 10.1016/j.scitotenv.2003.10.014
- Gürkan M., Hayrettaş 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 (Kırklareli) and Ida Mountains (Çanakkale, Turkey). *Ege J Fish Aqua Sci*. 29(3):133-136. doi: <http://dx.doi.org/10.12714/egejfas.2012.29.3.05>
- 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. doi: 10.1016/j.mrgentox.2007.01.007
- İlgar R., 2008. Kaz Dağı'nın üstü "Altın"dan kıymetli mi?. *Uluslararası Sosyal Araştırmalar Dergisi*. 1(2):170-182. [in Turkish]
- 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 U J Sci*. 18(1):17-25.
- Lewis S.M., Bain B.J., Bates I., Dacie J.V., 2006. Dacie and Lewis practical haematology (10th ed.). Churchill Livingstone, Edinburgh. 653 p.
- Özeti N., Yılmaz İ., 1994. Türkiye amfibileri (2. Baskı). Bornova, İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi 221 p. [in Turkish]
- Özparlak H., Arslan A., Güler G.Ö., 2011. Organik insektisit Fipronil'in genotoksik etkilerinin civciv mikronukleus test sisteminde belirlenmesi. *S Ü Fen Fak Fen Derg*. 37:1-8. [in Turkish]
- 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. doi: <http://dx.doi.org/10.2307/1311994>
- Pollo F.E., Grenat P.R., Salinas Z.A., Otero M.A., Salas N.E., Martino A.L., 2017. Evaluation 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. doi: 10.1007/s11356-017-9479-2
- Ratko M., 2014. Morfologija eritrocita te učestalost pojave jezgrinih nepravilnosti u blavora (*Pseudopus apodus* Pallas, 1775). [Master's Thesis] / [PhD Thesis]. University of Zagreb, Croatia. 66 p. [in Croatian]

- Saleh K., Sarhan M.A.A., 2007. Clastogenic analysis of chicken farms using micronucleus test in peripheral blood. *Journal of Applied Sciences Research*. 3(12):1646-1649.
- Savran L., 2010. Kanser riskinin belirlenmesi ve oral malignensilerin tanısında mikronükleus testinin değerlendirilmesi. Bitirme Tezi. Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye. 44 p. [in Turkish]
- 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. p. 427-431.
- 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. doi: 10.1007/s10646-010-0531-y
- Şekeroğlu-Atlı Z., Şekeroğlu V., 2011a. Genetik toksisite testleri. *TÜBAV Bilim Dergisi*. 4(3):221-229. [in Turkish]
- Şekeroğlu V., Şekeroğlu-Atlı Z., 2011b. Micronucleus test for determining genotoxic damage. *Türk Hij Den Biyol Derg*. 68(4):241-252. doi: 10.5505/TurkHijyen.2011.06977
- 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. doi: 10.17216/LimnoFish-5000115825
- Ulupınar M., Okumuş İ., 2002. Detection of mutagenic-carcinogenic pollutants in aquatic systems using cytogenetic methods in fish. *Türk J Zool*. 26:141-148.
- Yaşar O., Öрге-Yaşar F., 2010. Ayvacık, Bayramiç, Çan, Ezine ve Yenice (Çanakkale ili) ilçelerinde köy adlarının kaynakları. *Uluslararası Sosyal Araştırmalar Dergisi*. 3(11):599-611. [in Turkish]
- Yavuz İ.C., Bakar C., 2013. Türk Tabipleri Birliği Kazdağları ve Çanakkale yöresi madencilik girişimleri raporu (1. Baskı). Ankara, 160 s. [in Turkish]
- 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(2):159-163. doi: <http://dx.doi.org/10.2307/1311994>.