

**EGE ÜİVERSİTESİ FEN FABIİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**ANATOXIN-A' NİN ERKEK ALBİNO FARELER
ÜZERİNDEKİ SUBAKUT ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Muhammet Ali KARAASLAN

049113637

Biyoloji Anabilim Dalı

401.01.00.

Sunuş Tarihi : 28.08.2006

Tez Danışmanı : Prof. Dr. M. Günnehir Oğuz

Bornova – İzmir

ÖZET
ANATOXIN-A' NIN ERKEK ALBİNO FARELER
ÜZERİNDEKİ SUBAKUT ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ

KARAAASLAN, Muhammet Ali

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü

Tez Yöneticisi : Prof. Dr. M. Günnehir Oğuz

Ağustos 2006, 66 sayfa

Bu çalışmada, Anatoxin-a' nın, erkek fareler üzerindeki subakut etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır. Ayrıca çalışmamızda, toksinin in vitro bakteri testleriyle mutajenitesi *Serratia marcescens* mutasyon testi ile ortaya konmuştur. Anatoxin-a, *Anabaena*, *Aphonizomenon* ve *Oscillatoria* cinslerine ait türler tarafından üretilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından Anatoxin-a' nın genotoksik etkisine ilişkin yeterli derecede çalışmalar bulunmadığı bildirilmiştir.

Toksinin 3 farklı konsantrasyonu (50 µg/ kg, 100 µg/ kg ve 150 µg/ kg) ve kontrol grubu (0.1 ml serum fizyolojik / fare) ile birlikte toplam 4 grup oluşturulmuştur. Her gün aynı saatte, farelere intraperitoneal olarak toksin enjekte edilmiştir. Deneme süresi sonunda, farelerden kan, beyin, böbrek ve testis örnekleri alınmıştır. Yapılan biyokimyasal, histolojik ve mikroskopik incelemeler sonucunda; uygulanan toksinin kan biyokimyasal parametrelerinde belirgin bir değişim gözlenmemekle birlikte, 150 µg/ kg uygulanan grupta glikoz değerinde anlamlı bir değişim olduğu görülmüştür. Testislerde yapılan histopatolojik incelemelerde ise; tubuli seminiferi contorti' lerde doz artışına bağlı olarak şekil bozukluğu, intersitisyumda yer yer bağ dokusu kalınlaşmaları, defektif tubul, spermatojenik hücre serilerinde dejenerasyon ve buna bağlı hücre kayıpları, bazal lamina ve intercellular ayrışma, piknotik nükleus, germ hücre kaybına rastlanmıştır. Ayrıca; cauda epididimis ağırlıklarında doza bağlı olarak azalma ile birlikte sperm sayısında belirgin azalmalar kaydedilmiştir. Bakteri mutajenite testinde ise; Anatoxin-a' nın konsantrasyona bağlı olarak *Serratia marcescens'* in üremesi üzerine

bakterisidal bir etki oluşturduğu ve 100 µg/ L ve üzeri konsantrasyonlarda ise mutajenik olduğu saptanmıştır.

Uygulanan anatoxin-a adlı maddenin üreme sistemi üzerine toksik etkisi, ayrıca genotoksik ve mutajenik etkisi ortaya konmuştur. Sonuçta bu çalışma ile anatoxin-a' nın toksisitesine ait değerli bilgiler bulunmuştur. Bu ve buna benzer çalışmalar neticesinde anatoksin-a maddesi hem tıpta hem de eczacılıkta daha fazla kullanım alanı bulacağına inanıyoruz.

Anahtar Kelimeler: Mavi –Yeşil Algler (Bakteriler), Anatoxin-a, Toksin, Gentoksisite, Mutajenite, Histopatoloji, Testis.

ABSTRACT
DETERMINATION OF SUBACUTE EFFECTS OF
ANATOXIN-A ON MALE ALBINO MICE

KARAASLAN, Muhammet Ali

Msc in Biology

Supervisor: Prof. Dr. M. Günnehir Oğuz

August 2006, 66 pages

In this study, we aimed to find out subacute effects of anatoxin-a on the male mice. Also in our study we try to find the mutagenity of toxin by one of the in vitro bacteria tests that called “Serratia marcescens Mutation Test”. Anatoxin-a is produced by *Anabaena*, *Aphonizomenon* and *Oscillatoria* species. World Health Organisation (WHO) declared that there is not sufficient informations about genotoxicity of anatoxin-a. .

Three different concentration of the toxin (50 µg/ kg, 100 µg/ kg and 150 µg/ kg) and one control group (0.1 ml physiological water / mouse) is designed for the experiment. Everyday periodically intraperitoneal injection is administrated to the mice. At the end of experiment, blood, brain, kidneys and testes samples are taken. In biochemical, histological and microscobic examinations we find out that, there is no significant changes in blood parameters except glyucose level. It was different in 150 µg/ kg dose group according to control group. The histopathological findings in testes are, in tubuli seminifer contorties according to increasing doses there were degenerations in shape, thickness in connective tissue in some area of intersitium, defective tubul, degenerations in spermatogenetic cell lines and because of this cell losts, basal lamina and intercellular disassociation, picnotic nucleus, germ cell losts. Also, in cauda epididymes as increasing doses there is significant decreases in weights and sperms count. In bacteria mutagenity test, depend on concentrations, anatoxin-a has a affects on growth of *Serratia marcescens* like bacterisidal chemicals and mutagenic effects at the 100 µg/ L and above dose levels.

VIII

We can conclude that, anatoxin-a has a toxic effects on reproductive system also has a genotoxic and mutagenic characters.

Keywords: Blue – Green Algae (Bacteria), Toxin, Anatoxin-a, Genotoxicity, Mutagenesis, Histopathology, Testes.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans sürecinde danışmanlığımı yapan, yol gösteren yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. M. Günnehir Oğuz'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bana ve bu Tez konusuna güvenip hiçbir yardımcı esirgemeyen gerek deney sürecinde gerekse yazım aşamasında bizzat çalışan, kendisinden gerek biyolojik bilgiler gerekse çalışma disiplini konusunda çok şey öğrendiğim, gerçekten büyük saygı ve sevgi beslediğim sayın Araş. Gör. Dr. N. Ülku Karabay' a özellikle teşekkür ederim. Böyle bir proje kendisinin varlığı olmadan gerçekleşemezdi. Deney Aşamasında büyük yardımlarını gördüğüm sayın Araş. Gör. Ferah Sayım' a da teşekkürü bir borç bilirim. Histolojik çalışmalarda her türlü teknik ve teorik konuda destek aldığım Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı çalışanlarına ve öğretim üyelerine özellikle benden hiçbir yardımcı esirgemeyen kendisinden bilimsel anlamda gerçekten çok şey öğrendiğim değerli ağabeyim sayın Yard. Doç Dr. Altuğ Yavaşoğlu' na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	V
ABSTRACT	VII
TEŞEKKÜR	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XV
1. GİRİŞ	1
1.1. Toksin Nedir?	1
1.2. Siyanobakteriler (Mavi -Yeşil Algler) ve Toksin Üretimi	4
1.3. Anatoxin-a	7
1.3.1. Anatoxin-a' nın Etki Mekanizması	8
1.3.2. Anatoxin-a' nın Toksisitesi	10
1.3.3 .Anatoxin-a Üreten Mavi – Yeşil Algler	11
1.4. Kimyasal Maddelerin Toksik Etkilerinin BelirleNmesi	13
1.5. Çalışmanın Amacı	16
2. MATERYAL METOD	17
2.1. Materyal	17
2.1.1. Deney Hayvanları	17
2.1.2. Toksin	19
2.2. Metod	19
2.2.1. Deney Dizaynı	19
2.2.1.1. In vivo Test	19
2.2.1.2. In vitro Test	19

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.2.2. Deneysel Prosedür	20
2.2.2.1. Sperm Sayımı	20
2.2.2.2. Histopatolojik Yöntem	21
2.2.2.3. Kemik İliği Direkt Metodu	23
2.2.2.4. Serratia marcescens Mutasyon Testi	25
2.2.3. İstatistiksel Değerlendirme	28
3. BULGULAR	29
3.1. Total Vücut Ağırlıkları	29
3.2. Kan Biyokimyasal Parametreleri ile İlgili Bulgular	31
3.3. Reprodüktif Sistem ile İlgili Bulgular	32
3.4. Testis' in Histopatolojik Bulguları	35
3.5. Kromozom İncelemeleri ile İlgili Bulgular	40
3.6. Serratia marcescens Mutasyon Testi Bulguları	44
4. SONUÇ VE TARTIŞMA	53
4.1. Total Vücut ve Organ Ağırlıkları	53
4.2. Kan Dokusu	53
4.3. Testis Dokusu	55
4.4. Kromozomlar ve Mutajenik Etki	57
5. YARARLANILAN KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Toksinlerin insan vücuduna giriş yolları.....	2
1.2 Anatoxin-a' nın kimyasal yapısı	8
1.3 Toksinin sinirin akson ve terminal kısmı üzerinde etkilediği potansiyel bölgeler	9
1.4 <i>Anabaena spp.</i> nin mikroskopik görünümü	11
1.5 <i>Aphnizomenon flos – aquae</i> ' nin mikroskopik görünümü	12
1.6 <i>Oscillatoria sp</i> ' nin mikroskopik görünümü	12
2.1 Çalışmada kullanılan Bulb-c albino erkek deney fareleri	17
2.2 Deney hayvanlarının tutulduğu kafesler	18
2.3 (±)-Anatoxin A fumarate' ın kimyasal yapısı	19
2.4 Kemik iliği aspirasyonu	23
3.1 Testis ağırlıklarının (g) grafiksel gösterimi	33
3.2 Cauda epididimisi ağırlıklarının (g) grafiksel gösterimi	34
3.3 Cauda epididimisten yapılan sperm sayım sonuçları (grafiksel)	34
3.4 Kontrol grubundan elde edilen Testis dokusu ışık mikroskopik görüntüleri	36
3.5 50 µg/kg anatoxin-a uygulanan gruptan elde edilen testis dokusu ışık mikroskopik görüntüleri.....	37
3.6 100 µg/kg anatoxin-a uygulanan gruptan elde edilen testis dokusu ışık mikroskopik görüntüleri	38
3.7 150 µg/kg anatoxin-a uygulanan gruptan elde edilen testis dokusu ışık mikroskopik görüntüleri	39

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.8 Kontrol grubu fare kromozomlarının görünümü.....	40
3.9 50 µg/kg Anatoxin-a uygulanmış fare kromozomlarının görünümü	41
3.10 100 µg/kg Anatoxin-a uygulanmış fare kromozomlarının görünümü	42
3.11 150 µg/kg Anatoxin-a uygulanmış fare kromozomlarının görünümü	43
3.12 <i>Serratia marcescens</i> mutasyon testi sonuçları grafiksel gösterimi	45
3.13 (-) Kontrol grubu <i>S. marcescens</i> mutasyon testi sonuçları	46
3.14 25 µg/ L anatoxin-a grubu <i>S. marcescens</i> mutasyon testi sonuçları	47
3.15 50 µg/ L anatoxin-a grubu <i>S. marcescens</i> mutasyon testi sonuçları	48
3.16 100 µg/ L anatoxin-a grubu <i>S. marcescens</i> mutasyon testi sonuçları ..	49
3.17 150 µg/ L anatoxin-a grubu <i>S. marcescens</i> mutasyon testi sonuçları ..	50
3.18 200 µg/ L anatoxin-a grubu <i>S. marcescens</i> mutasyon testi sonuçları ..	51
3.19 (+) Kontrol - UV grubu <i>S. marcescens</i> mutasyon testi sonuçları	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Canlı grupları ve ürettikleri bazı toksinler	3
1.2 Coğrafik olarak rapor edilen toksik siyanobakteri ani çoğalması	5
1.3 Bazı mavi - yeşil algler ve ürettikleri toksinler	6
1.4 Genetik Toksikolojide Temel Testler.....	14
1.5 Temel gereksinim için dikkat edilen toksisite verileri	15
2.1 <i>S. marcescens</i> mutasyon testinin şematik olarak gösterimi	27
3.1 Çalışma sonunda deney gruplarına göre farelerin dağılımı	29
3.2 Farelerin total vücut ağırlığı ortalamaları ve standart sapmaları.....	30
3.3 Farelerin organ ağırlığı ortalamaları (g) ve standart sapmaları.....	30
3.4 Karaciğer/ total vücut ağırlıkları oranları	30
3.5 Kontrol ve anatoxin-a uygulanmış farelerin biyokimyasal analiz sonuçları	31
3.6 Farelerin testis, cauda epididimis ağırlıkları (g) ve sperm sayıları	32
3.7 Testis/ total vücut ağırlıkları orası	33
3.8 <i>Serratia marcescens</i> mutasyon testi sonuçları	45

1. GİRİŞ

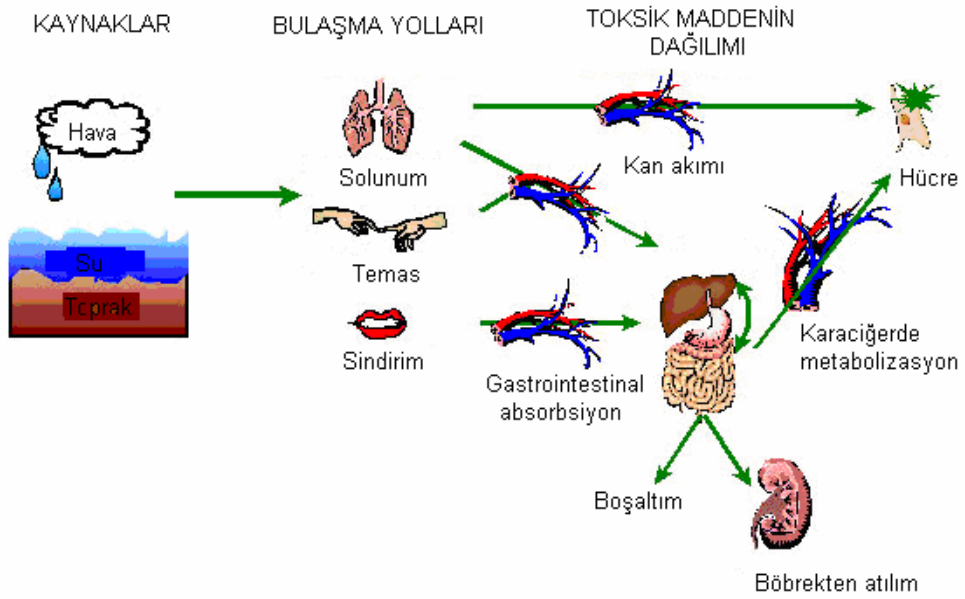
1.1. Toksin Nedir?

Belirli bir derişimin üstünde, girdiği organizmanın yaşamsal fonksiyonlarını sekteye uğratan veya tamamıyla durduran, organik veya inorganik maddelere “*zehir*” denir. Zehir, hücrelere ve yaşayan dokulara kimyasal ya da biyokimyasal nitelikte zararlar veren her türlü maddedir. Zehrin en tipik özelliği bu zararlı etkisini en küçük dozlarda bile göstermesidir. Toksin ise, canlı sistemlerce üretilen doğal zehirlerdir. Toksinler, kimyasal yapılarına, etki mekanizmalarına ve yerlerine göre, ayrıca toksini üreten canlı grubuna veya toksinin zarar verdiği hücre veya sistemlere göre çeşitli sınıflara ayrılabilir (Whitton ve Potts, 2000; Chorus ve Bartram, 1999).

Doğada çok sayıda organik ve inorganik madde bulunmaktadır ve bu maddelerden herhangi birisinin zehir olarak kabul edilmesi için bazı temel etmenler vardır. Toksik bir maddenin etkisini gösterebilmesi için öncelikle canlı sisteme girmesi gerekir. Memeliler açısından; deri ile temas, havadan solunum yolu ve gıda maddeleri başlıca toksin giriş yollarıdır (Kamrin, 1988) (Şekil 1.1). Canlı sisteme giren miktar çok önemlidir yani; “maddenin zehirliliğini dozu belirler”. Bazı zehirler, düşük dozda kullanıldığında tedavi edici maddeler olsalar bile, yüksek dozda kullanıldıkları zaman öldürücü etki yaparlar. Paraselsus (1493 – 1541) "*Tüm maddeler zehirdir, ilacı zehirden ayıran dozudur*" diyerek zehire doz kavramını getirmiştir. Diğer etken ise organizmanın toksine maruz kalma süresidir.

Canlılar, metabolik faaliyetler sonucu primer ve sekonder maddeler üretebilirler. Primer metabolitler canlı için mutlaka var olması gereken bileşiklerdir. Sekonder metabolitler ise, canlılığın sürdürülmesi için yardımcı bileşiklerdir. Canlıların, üretip depoladığı bazı sekonder metabolitler diğer canlı sistemler açısından zehirli etki gösterebilir. Böylelikle canlının sekonder metaboliti bir diğeri için toksin olabilmektedir (Çizelge 1.1). Bu

özelliklerinden ötürü eski çağlarda Romalılar ve Yunanlılar lekeli baldıran (*Conium maculatum*), Su baldıranı, Kurtboğan, Güzelavratotu, Şeytan elması (Tatula) gibi bitkileri, mantarları, bunların dışında akrep, yılan ve karakurbağası zehirlerini genelde avcılıkta, savaşta ve idam cezalarının infazında kullanılıyordu.



Şekil 1.1. Toksinlerin insan vücuduna giriş yolları (McLaughlin Centre, Institute of Population Health, University of Ottawa, 2006).

Çizelge 1.1. Canlı Grupları ve ürettikleri bazı toksinler (Whitton ve Potts, 2000; White ve ark 2005; Çevre ve Orman Bakanlığı Orman Genel Müdürlüğü Yayınları, 2006 kaynaklarından derlenmiştir).

	Canlı Grubu	Ürettiği Toksin	Etkisi
Bakteriler	<i>Cyanobacteria</i>	Anatoxin, Paralytic Selfish Poison (PSP) , Microcystin	Nörotoksik, Hepatotoksik, Sitotoksik
	<i>Actinobacteria</i>	Difteria Toxin	Nörotoksik
	<i>Clostridia</i>	Botulinum	Nörotoksik
Mantarlar	<i>Tricholomataceae</i>	Coprine	Disulfiram benzeri reaksiyonlar
	<i>Lepiotaceae</i>	İbotenik asit	Nörotoksik
	<i>Amanitaceae</i>	Amanitin	Hepatotoksik
Bitkiler	<i>Ranunculaceae</i>	Aconitine	Nörotoksin
	<i>Leguminosae</i>	Abrin	Sitotoksik
	<i>Euphorbiaceae</i>	Monguine	Sitotoksik
	<i>Amaranthaceae</i>	Okzalit ve Nitrat Bileşikleri	Sistemik Etki
	<i>Asteraceae</i>	Belirlenememiş	Sistemik Etkili
Hayvanlar	<i>Colubridae</i>	Three finger Toxin	Nörotoksik
	<i>Viperidae</i>	GBL toxins	Galaktoza bağlanan Lektin
	<i>Amphibia</i>	Tetratoxin	Nörotoksik
	<i>Loxosceles</i>	Loxnecrogin	Dermonecrotic
	<i>Scorpionida</i>	α- toxin	Nörotoksik

1.2. Siyanobakteriler (Mavi -Yeşil Algler) ve Toksin Üretimi

Dünyada, fotosentez sonucu O₂ çıkarma yeteneğini ilk kazanan canlılar olarak bilinen siyanobakteriler (mavi - yeşil algler), yaklaşık 3.5 milyar yıldır yani Pre-Kambriyen döneminden beri yaşamaktadır (Humm ve Wick, 1980; Bryant, 1994). Mavi-yeşil algler, hücrenel farklılaşma göstermeyen, zarla çevrili nukleus ve organelleri olmayan prokaryotlardır (Fogg ve ark., 1973).

Primer üretici olmaları nedeniyle oldukça büyük öneme sahip olan mavi-yeşil algler, ortam şartlarının uygun olması durumunda aniden büyük bir hızla çoğalarak buldukları habitatı kaplayabilme yeteneğine sahiptirler (Chorus ve Bartram, 1999). Ani alg çoğalması denen bu olayda, N ve özellikle P gibi besleyicilerin derişimlerinin artmasıyla algler popülasyonlarını son derece seri biçimde sayıca arttırmaları. Bu durum özellikle sucul ortamlarda ekolojik açıdan büyük sorunlara neden olur. Ani alg çoğalmasının meydana geldiği sucul ortamlarda ışık girişimi azalır, ortamdaki inorganik madde derişimi düşer ve en önemlisi aerobik hayatın olmazsa olmaz koşulu olan O₂ büyük bir hızla azalır. Bu da ortamdaki tüm aerobik canlılar gibi balıkların da ölümüne yol açar. Özellikle durgun sularda anaerobik süreçler hız kazanır ve ötrafikasyonla beraber su kalitesi büyük oranda düşer ve kullanılamaz hale gelir.

Mavi - yeşil alglerin bir diğer ekotoksikolojik etkisi ise; toksin üretmeleridir (Whitton ve Potts, 2000). Bu gruba dahil canlılardan bazıları nörotoksik ve hepatotoksik maddeler üretmektedir. Özellikle ani alg çoğalması ile birlikte gelen bu toksin üretimi, o habitatta yaşayan tüm canlıları etkilemektedir (Codd ve ark., 2005). Mavi - yeşil alglerin kapladığı sular, görüntü ve koku açısından son derece kötüdür. Anatoxin-a açısından baktığımızda asıl sorun bu ani çoğalma değildir. Tatlı su kaynakları veya barajlarda meydana gelen mavi - yeşil alg hücreleri; ani çoğalma meydana getirdikten sonra, ya kendiliğinden bozunma süreçlerine girerler veya bakır

sülfat gibi çeşitli kimyasal uygulamalar ile yapay olarak parçalanırlar (Chorus ve Bartram, 1999). Hücrelerin parçalanmasıyla hücrelerin içindeki toksin serbest hale geçer ve suya karışır. Böylelikle su, renk ve koku açısından düzelirken toksin derişimi açısından tehlikeli hale gelir. Toksik siyanobakteri popülasyonları tüm dünyada yaygın olarak görülmektedir (Çizelge 1.2)

Çizelge 1.2. Coğrafi olarak toksik siyanobakterinin ani çoğalması (Codd ve ark. 2005).

Avrupa	Belçika, Çek Cumhuriyeti, Danimarka, Estonya, Finlandiya, Almanya, Hollanda, İrlanda, Yunanistan, Portekiz, Ukrayna, İngiltere, Rusya ve Türkiye
Amerika	Arjantin, Bermuda, Brezilya, Kanada ve Şili
Orta Doğu ve Asya	Hindistan, İsrail, Güney Kore ve Suudi Arabistan
Afrika	Mısır, Etiyopya, Kenya ve Güney Afrika
Antarktika Denizi	Atlantik okyanusu, Baltık Denizi ve Hint Okyanusu

Mavi - yeşil alglerce yani Siyanobakterilerce üretilen toksinlere siyanotoksin denir (Çizelge 1.3). Siyanotoksinler etki mekanizmalarına göre; hepatotoksinler, nörotoksinler ve sitotoksinler (Whitton ve Potts, 2000), kimyasal yapılarına göre ise; siklik peptidler, alkaloidler ve lipopolisakkaritler olmak üzere sınıflandırılırlar (Chorus ve Bartram, 1999). Ek olarak; bazı siyanobakteriler daha az toksik olan lipopolisakkarit ve diğer potansiyel farmakolojik kullanımlı sekonder metabolit üretirler. Siyanobakterilerle kontamine olmuş suyun öldürücü dozu, hücresel konsantrasyonuna ve toksin tipine ayrıca toksine maruz kalma yoluna ve zehirlenen canlının yaş, cinsiyet ağırlık gibi özelliklerine bağlıdır (Carmichael, 1994). Toksikite ile en çok anılan türler; *M. aeruginosa*, *Oscillatoria*, *Aphanizomenon flos aquae*,

Anabaena flos aquae, *Planktothrix agardhii* ve *Lyngbia*' dır (Crayton, 1993).

Çizelge 1.3. Bazı mavi - yeşil alger ve ürettikleri toksinler(Ross, 1994)

Cins	Ürettiği Toksin
<i>Anabaena</i>	Anatoxin-a, Microcystin, Saxitoxin, LPS
<i>Anabaenopsis</i>	Microcystin, LPS
<i>Anacystis</i>	LPS
<i>Aphanizomenon</i>	Saxitoxin, Cylindrospermopsin, LPS
<i>Cylindrospermopsis</i>	Cylindrospermopsin, Saxitoxin, LPS
<i>Hapalosiphon</i>	Microcystin, LPS
<i>Lyngbia</i>	Aplysiatoxin, Lyngbiatoxin-a, LPS
<i>Microcystis</i>	Microcystin, LPS
<i>Nodularia</i>	Nodularin, LPS
<i>Nostoc</i>	Microcystins, LPS
<i>Phormidium (Oscillatoria)</i>	Anatoxin, LPS
<i>Planktothrix (Oscillatoria)</i>	Anatoxin, Aplysiatoxin, Microcystin, Saxitoxin, LPS
<i>Schizothrix</i>	Aplysiatoxin, LPS
<i>Trichodesmium</i>	Tam olarak bilinmemekte
<i>Umezakia</i>	Cylindrospermopsin, LPS

LPS: Lipopolisakkarit

Siyanobakterilerin hangi çevresel koşullar altında toksin ürettiği tam olarak bilinmese de bu toksinlerin sentez yolları daha açık hale gelmiştir.

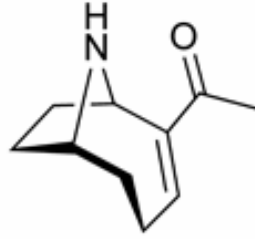
Küçük siklik yapıları ve aminoasit yapısındaki anormallikler bu peptitlerin ribozom dışında (non-ribozomal peptid) sentezlendiğini göstermiştir. Ribozom dışında sentezlenen peptitleri içeren enzim Peptit Sentetaz, modüler yapıya sahiptir. Her bir modül tek bir peptid sentaz biriminin bilgisini içerir. Siyanobakteriyel strainlerin toksin üretebilme yetenekleri peptit sentazı kodlayan genlere ve bu genlerin belirli çevresel koşullar altında ekspresyonuna bağlıdır (Chorus ve Bartram, 1999).

1.3. Anatoxin- a

Anatoxin-a, *Anabaena* ve diğer bazı mavi - yeşil alg türleri tarafından üretilen, çok güçlü alkaloid yapı gösteren bir toksindir. Anatoxin-a tropan bağlı bir alkaloid toksindir. 165 dalton moleküler ağırlığında, bisiklik sekonder amin, 2-asetil-9 azabisiklo [4.2.1] non-2 en kimyasal yapısına sahiptir. Anatoxin-a, hücre içerisinde, ornitin dekarboksilaz enzimi aracılığıyla putreskin üzerinden ornitinle sentezlenir. Küçük bir molekül olduğundan, ağız yoluyla alındığında çok kısa bir sürede absorbe olur (Duy ve ark., 2000). Anatoxin-a kolinesteraz enzimi tarafından hidrolize edilemez. Çünkü bu toksin ester bağı oluşturmamaktadır (Kofuji ve ark., 1990). Yazılı kayıtlara göre; doğada bu tür mavi - yeşil alg türlerine ait ölümle sonuçlanan ilk olay 1878 yılında gerçekleşmiştir (Whitton ve Potts, 2000). Mikro algal toksinlerin hem denizlerde hem de nehirlerdeki etkenleri; son yıllarda belirgin bir şekilde artmış ve zehirlenme olayları tüm dünyada daha yaygın hale gelmiştir (Codd ve Beattie, 1991; Keevil, 1991).

Mavi - yeşil alglerin alkaloid toksinleri arasında Anatoxin, zehirlilik açısından ilk sıralarda yer alır. Bu toksin alınan miktara bağlı olarak, 4 dakika gibi kısa sürede ölümlere yol açtığından “Çok Hızlı Ölüm Etkeni” olarak adlandırılmıştır (Edwards, 1999). Toksik etkiye sahip olmasına rağmen, anatoxin ve analogları tıp ve farmakolojik alanlarda oldukça geniş kullanım alanına sahiptir. Asetilkolin reseptörlerine geri dönüşümsüz bir biçimde bağlandığından reseptör çalışmalarında ve nöromuskular olayların

anlaşılmasında gerçekten anatoksin eşsiz olanaklar sunmaktadır (Edwards, 1999). Bu tür çalışmalar özellikle, Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde yeni ilaçların bulunmasında önemlidir. Kimyasal yapısına bakıldığında değişik bir bisiklik alkaloid yapıda olduğu görülmüştür (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Anatoxin-a' nın kimyasal yapısı.

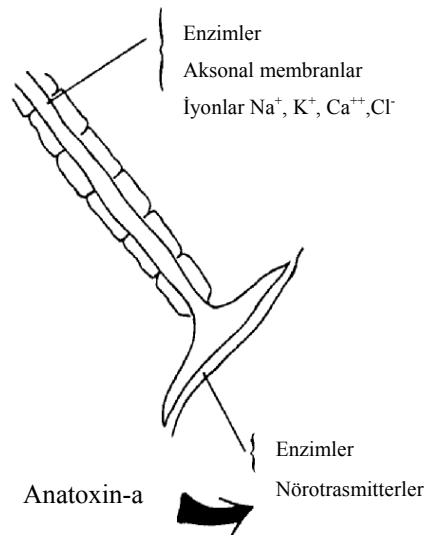
1.3.1. Anatoxin-a' nın Etki Mekanizması

Anatoxin-a, sinir sistemini bozan, genellikle solunum kaslarında uyuşmalar sonucu ölüme neden olan kuvvetli bir nörotoksindir. Nörotransmitter (sinir iletilci kimyasallar) asetilkolin gibi davranarak geri dönüşümsüz biçimde nikotinic asetilkolin reseptörlerine bağlanarak etki gösterdiği bilinmektedir. Sinir hücrelerinden asetilkolin salgılanır. Salgılanan asetilkolin ilgili reseptöre bağlanır. Bu bağlanma ilgili sodyum kanallarının açılmasına neden olur. Sodyum iyonlarının hareketi, kasların kasılmasını sağlayacak enerjiyi oluşturur. Bundan sonra asetilkolin esterase denilen bir enzim nörotransmitteri (sinirsel sinyal iletilci kimyasal) parçalayarak sodyum iyonlarının eski durumuna dönüşünü sağlar. Böylelikle, kaslar tekrar normal duruma geçerler (Edwards, 1999).

Anatoxin-a nöronal asetilkolin reseptörlerine bağlanan nikotinic (kolinerjik) ve muskarinik bir agonisttir (Duy ve ark., 2000). Anatoxin-a tarafından aktive edilen presinaptik nikotinic asetilkolin reseptörleri, Na⁺ iyonunun salınmasına ve elektriksel gerilimlere duyarlı Ca⁺⁺ ve Na⁺

kanallarını açmaya yetecek şekilde lokal depolarizasyonlara neden olur. Bu bağlanma sonucu kaslar kasılır. Buradaki önemli husus ise; bu toksinin enzim tarafından yok edilememesidir. Bu yüzden; sodyum kanalları açık kalır ve kaslar aşırı uyarılarak sürekli kasılı halde kalır (Şekil 1.3). Sonuçta; kaslar önce direncini kaybeder ardından felç oluşur. Solunum kasları zarar görürse, beyine yeterince oksijen sağlanmadığından kasılmalar meydana gelir.

Toksinin vücuda alınmasından sonra birkaç dakika içinde gelişen son olay; boğularak ölümdür (Edwards, 1999). Anatoxin-a, sıçanların hipokampal nöronlarında tip 1A ve tip 2 yanıtlarını arttırma yönünden nikotin veya asetilkolinden daha kuvvetlidir (Alkondon ve Albuquerque, 1995). Sıçanlarda yapılan in vivo çalışmalar, toksinin simpatetik sistemi, katekolaminlerin salgılanması yoluyla harekete geçirdiğini göstermiştir (Dube ve ark., 1996).



Şekil 1.3. Toksinin sinirin akson ve terminal kısmı üzerinde etkilediği potansiyel bölgeler (Ecobichon, 1996).

1.3.2. Anatoxin-a' nın Toksisitesi

Akut toksisite:

Farelerde, i.p. yolla LD_{low} (ölüme yol açan en düşük doz) değeri 250 µg/kg ve i.p. LD₅₀ 375 µg/kg olarak tespit edilmiştir(Fawell ve ark., 1999). Anatoxin-a' nın oral LD₅₀ değeri 5000 µg/kg' dan fazladır ve solunum yoluyla elde edilen LD₅₀ değeri ise 2000 µg/kg olarak tespit edilmiştir (Chorus ve Bartram, 1999).

Elde çok fazla veri bulunmamakla birlikte yapılan iki çalışmada NOAEL değeri 100 µg/kg olarak kabul edilmiştir (Chorus ve Bartram, 1999 ve Codd ve ark., 2005).

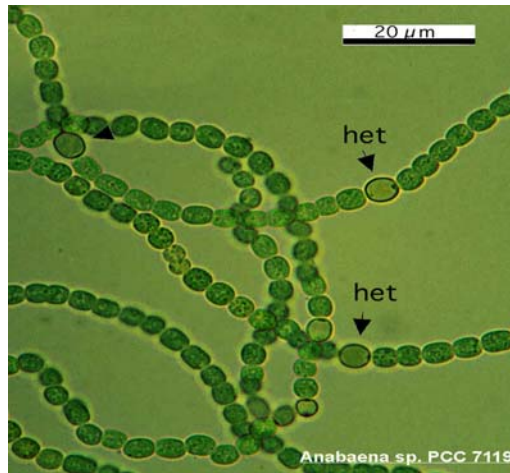
Subakut Toksisite:

Yapılan iki çalışmada, anatoxin-a sıçanlara içme sularında ağız yoluyla 54 gün boyunca 0.51 ve 5.1 ppm (51 ve 510 µg/kg' a denk) oranında ve 21 gün boyunca i.p yolla 16 µg her bir sıçana günlük olarak enjekte edilmiş ve sonuçta hiçbir zehirlenme belirtisi gözlemlenmemiştir (Chorus ve Bartram, 1999).

1.3.3. Anatoxin-a Üreten Mavi – Yeşil Algler

Anabaena spp. : *Nostocales* ordosuna dahildir. Bu ordoda trikomu oluşturan hücreler tek sıralı dizilmiştir. İplikler tek tek ya da bir çoğu bir arada, uç kısımları tüylü ya da tüysüz, veya nadir durumlarda yalancı dallanma görülebilir (Güner ve Aysel, 1999) (Şekil 1.4).

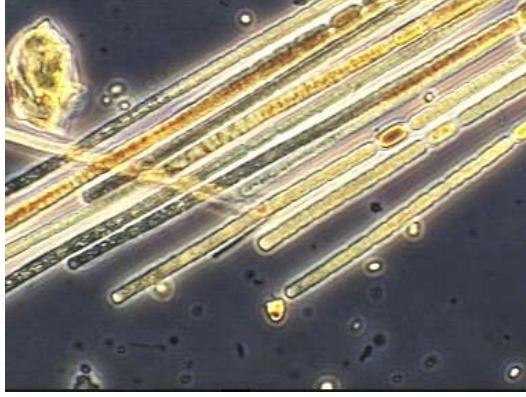
Anabaena cinsinde; dışta çok akıcı bir kına sahip olan trikom her tarafta aynı kalınlıktadır. Bazı türlerde suda yüzmeyi sağlayan yalancı vakuol (pseudo vacuol) bulunur. *Nostoc* cinsinden ayrımı oldukça güçtür. Bazı araştırmacılar; *Nostoc* kolonilerinin makroskopik olarak görülebilmesine karşın *Anabena* cinsinde görülememesinin bu iki cinsin ayrılmasında kullanılabileceğini savunmuşlardır (Bold ve Wynne, 1995).



Şekil 1.4. *Anabaena spp.* nin mikroskopik görünümü (Ross, 1994).

Aphnizomenon flos – aquae: Hücreler; düz, her iki başa doğru az dağınık filament şeklini oluşturacak şekilde birleşmiştir. Filamentler, kümelenerek, serbest yüzen, paralel filament yığınları oluştururlar (saman yığınları gibi). Bu yığınlar; su örneklerinde asılı, mercek şekilli mavi – yeşil tek bir göz gibi

görünür. Hücreler geniş yapılıdır (5 – 6 μm yarıçaplı, 8 – 12 μm) (Şekil 1.5) (Crayton, 1993).



Şekil 1.5. *Aphnizomenon flos - aquae*' nin mikroskopik görünümü

Oscillatoria sp.: Tek tek ve ince kılıfı olan ve uzun ekseni boyunca rotasyon yönünde kıvrımlı hareket edebilen trikom' a sahip bir cinstir. Trikomları silindirik ve dallanmamış yapıdadır. Üremeleri, hormogonia oluşumuyla tamamlanmaktadır. Çok sayıda türü vardır. Heterosist oluşumu gözlenmez (Şekil 1.6) (Crayton, 1993) .



Şekil 1.6. *Oscillatoria sp*' nin mikroskopik görünümü (Ross, 1994)

1.4. Kimyasal Maddelerin Toksik Etkilerinin Belirlenmesi

Çevremizde bulunan ve biyolojik etkileri henüz tamamen bilinmeyen bir çok sentetik ve doğal maddenin toksisite açısından test edilmesi, sağlık açısından gerekmele birlikte, laboratuvar hayvanlarıyla yapılan deneylerin çok zaman alması ve çok pahalı olmaları nedeniyle zordur. Bu yüzden kimyasal maddelerin kanserojenik potansiyellerini ölçebilmek için bazı in vitro test sistemleri geliştirilmiştir. Toksik etkiler için kısa zamanlı testler diye bilinen bu testlerle kimyasal maddelerin belirli genetik sistemlerde belirli sonuçlar verip vermedikleri ölçülmekte ve elde edilen sonuçlarla maddelerin mutajenik/kanserojenik potansiyelleri arasında ilişki kurulmaktadır (Karabay, 2000). En sık kullanılan testlerin bazıları Çizelge 1.4' de verilmiştir (Bishop, 1978; Shapiro, 1983; Cooper ve Lane, 1984).

Bir maddenin mutajenik/kanserojenik potansiyeli, deney hayvanlarıyla yapılan uzun-zamanlı testler veya epidemiyolojik çalışmalarla ölçülmektedir. Genotoksik potansiyel ise kısa – zamanlı testlerle mutasyon, kardeş kromatid değişimleri, kromozom anomalileri frekansları gibi değerlerle ölçülmektedir. Kanserojenik potansiyel ile genotoksik potansiyel arasında kantitatif bir ilişki her kanserojen için gösterilememektedir. Fakat az bir ilişki bile olsa bunu göstermek mümkün olduğunda bir maddenin mutajenik potansiyeline bakarak o maddenin kanserojenik değerlendirmesi yapılabilmektedir (Bishop, 1978; Shapiro, 1983; Cooper ve Lane, 1984).

Bir canlının toksik doza maruz kalma sayısına göre akut veya kronik etkiden söz edilir. Akut toksisite, toksik maddeye kısa süreli yüksek dozda maruz kalmayla meydana gelen zehirliliktir. Kronik toksisite ise; toksik maddeye uzun süreli düşük dozlarda maruz kalma ile oluşan zehirliliktir. Toksinler, organizmaya girip hedef hücre veya sisteme ulaştıktan sonra çeşitli mekanizmalarla etkisini gösterirler. Bu etkilerden bazıları enzimatik reaksiyonlar aracılığıyla bazıları ise enzimatik olmayan yollardan meydana gelmektedir. Bir kimyasalın toksisitesinin tipik spektrumu Çizelge 1.5' de

görülmektedir. Bununla birlikte, kuşlar, memeliler, sucul organizmalar, bitkiler, toprak, çevresel sürekliliği ve biyoakümülyasyon üzerine çevresel etkinin yoğun çalışmalarna ihtiyaç vardır.

Çizelge 1.4. Genetik Toksikolojide Temel Testler (Ecobichon, 1996).

I. Temel testler

A. Gen mutasyonları için test

Salmonella/memeli mikrozom testi (Ames testi)

B. İn vivo kromozom hasarı için memeli testi

Rodent kemik iliğinde metafaz analizi ya da mikronukleus testi

II. Yoğun veri tabanı ya da tek son nokta üzerine dayanan diğer testler

A. Gen mutasyonları için testler

E.coli WP2 triptofan reversiyon testi

Kültürdeki memeli hücrelerinde TK ve HPRT ileri mutasyonları testi

Drosophila eşeye bağıl resesif letal test

B. Kültürdeki Çin Hamster ya da insan hücrelerinde sitogenetik analiz

Kromozom aberasyonları ve mikronukleus için testler

Aneuploidi için testler

C. Genetik hasarın diğer indikatörleri

Mayada ya da Drosophila' da mitotik rekombinasyon için testler

Kültüre edilmiş hepatositler ve rodentlerde programsız DNA sentezi

D. Memeli eşey hücre testleri

Fare görülebilir veya elektroforetik spesifik-lokus testleri

İskeletal ya da katarakt mutasyonları için testler

Sitogenetik analizler ve kalımsal translokasyon testleri

Rodent eşey hücrelerinde DNA hasarı ve onarımı

Dominant letal test

Çizelge 1.5. Temel gereksinim için dikkat edilen toksisite verileri (Ecobichon, 1996).

Akut

Oral (sıçan)
 Dermal (tavşan)
 İnhalasyon (genellikle sıçan)
 İrritasyon çalışmaları
 Göz (tavşan)
 Deri (tavşan, kobay)
 Dermal duyarlılık (kobay)
 Gecikmiş nörotoksisite (tavuk)

Subkronik

90 gün beslene çalışmaları
 Rodent (sıçan, fare)
 Rodent olmayan (köpek)
 Dermal kullanılan örneğe bağlıdır
 İnhalasyon ve mesleğe bağlı maruzat
 Nörotoksisite için potansiyeldir.

Kronik

Bir ya da iki yıl besleme çalışmaları
 Rodent (genellikle sıçan)
 Rodent olmayan (köpek)
 Onkojenisite çalışmaları (sıçan ya da fare)

Reproduktif

In vitro mutajenisite (mikroorganizma)
 Fertilite/reproduksiyon (sıçan, fare, tavşan)
 Teratojenisite (sıçan, fare, tavşan)

1.5. Çalışmanın Amacı

Mavi – yeşil algler tüm dünyada geniş yayılış alanına sahip tek hücreli canlılardır. Atmosfere oksijen salan fotosentez sürecini ilk gerçekleştiren canlı grubudur. Mavi – yeşil algler, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de çok geniş yayılış gösteren canlılardır. Primer üretici olmaları nedeniyle ekosistemler açısından büyük öneme sahiptirler. Havanın serbest azotunu, bitkiler ve diğer canlılar için kullanılabilir forma dönüştürebilirler. Uygun ortam ve besleyici koşullarında (sıcaklık, pH, azot ve fosfor miktarı gibi) aniden çok hızlı büyüme özelliğine sahiptirler. Hızla çoğalarak buldukları habitatı kapladıkları zaman; ışık girişiminin zayıflaması ve inorganik madde miktarında azalması gibi büyük sorunlara yol açabilirler. Ayrıca, toksik olan sekonder metabolitleri de üretme yeteneğine sahiptirler. Mavi yeşil bakteriler; hepatotoksik ve nörotoksik etkiye sahip çok sayıda toksin üretebilirler. Bu canlıların ürettiği toksinlerin çevre ve insan sağlığı üzerine potansiyel riskleri büyüktür.

Araştırma konusu olan Anatoxin-a, *Anabaena* cinsi tarafından üretilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından Anatoxin-a' nın genotoksik etkisine ilişkin yeterli derecede çalışmalar bulunmadığı bildirilmiştir. Çalışmamızda bu toksinin, erkek fareler üzerindeki subakut etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır. Ayrıca çalışmamızda, toksinin in vitro bakteri testleriyle mutajenitesi *Serratia marcescens* mutasyon testi ile ortaya konmuştur.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışma, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Hayvan Etik Kurulu' nun onayı (18.10.2005 tarih- 35 no) ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Deney Hayvanları Yetiştirme Merkezi' nden temin edilen, seksüel olgunluğa erişmiş 8-10 haftalık, ağırlıkları 20-25 g. arasında değişen Bulb-c albino erkek ($n=40$) deney fareleri (*Mus musculus*) kullanıldı (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan Bulb-c albino erkek deney fareleri

Hayvanlar çalışmaya başlamadan 15 gün önce deney ortamına alınarak deneye hazırlandı. Fareler kontrol ve deney grupları için tesadüfi olarak seçildi ve 5 erli gruplar şeklinde kafeslere yerleştirildi. Çalışma

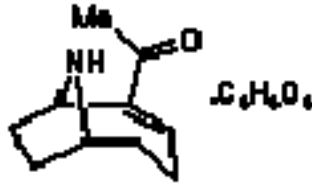
süresince hayvanlar, kenarları sert plastik ve üstünde çelik ızgara bulunan, deney grubuna göre işaretlenmiş kafeslerde (425 x 266 x 185 mm – taban alanı: 800 cm²) tutuldu (Şekil 2.2). Laboratuvar sıcaklığı 21 ± 1 °C ve nem % 45-75 olarak düzenlendi. 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık periyodu uygulandı. Deney hayvanlarının beslenmeleri için hayvan başına günlük 10 g standart laboratuvar yemi (pellet) ve yeteri kadar su kullanıldı. Yem ve su günlük olarak değiştirildi.



Şekil 2.2. Deney hayvanlarının tutulduğu kafesler

2.1.2. Toksin

Çalışmada, kuvvetli bir nikotinik agonisti olan ($\alpha 4\beta 2$ ve $\alpha 7$ nikotinik reseptörleri için sırasıyla K_i değerleri :1.25 ve 1840 nM) ve Tocris Bioscience Şirketinden elde edilen (\pm) – Anatoxin A fumarate kullanıldı (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. (\pm)-Anatoxin A fumarate' in kimyasal yapısı.

2.2. Metod

2.2.1. Deney Dizaynı

2.2.1.1. In vivo Test

Kontrol ve her bir toksin konsantrasyonu için her gruba 10 erkek fare çalışmaya alındı. Toksinin 3 farklı konsantrasyonu (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ve 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ve kontrol grubu (0.1 ml serum fizyolojik / fare) ile birlikte toplam 4 grup oluşturuldu. Konsantrasyonlar hesaplanırken LD_{50} değeri dikkate alındı.

2.2.1.2. In vitro Test

In vitro mutajenite testleri *Serratia marcescens* mutasyon testi ile gerçekleştirildi. *Serratia marcescens* mutasyon testinde 5 farklı toksin konsantrasyonu (25 $\mu\text{g}/\text{L}$, 50 $\mu\text{g}/\text{L}$, 100 $\mu\text{g}/\text{L}$, 150 $\mu\text{g}/\text{L}$ ve 200 $\mu\text{g}/\text{L}$) ve kontrol grubu (distile su) olmak üzere toplam 6 grup oluşturuldu. Ayrıca pozitif kontrol için UV kullanıldı.

2.2.2. Deneysel Prosedür

Bu çalışmada deneysel dizayn olarak Standart dominant assayin bir modifikasyonu kullanıldı (Knudsen ve ark., 1977; Francis ve ark., 1990). Hesaplanan konsantrasyonlarda hazırlanan toksin solusyonu, 7 gün boyunca her gün aynı saatte farelere intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı (her fare için 0.1 ml distile su içerisinde çözülerek uygulandı). Kontrol gruba ise, 7 gün boyunca serum fizyolojik i.p. uygulaması yapıldı (0.1 ml serum fizyolojik/fare). Hayvanlara standart laboratuvar pellet yemi ile birlikte yeteri kadar su verildi.

Toksin uygulaması tamamlandıktan sonra fareler tartıldı ve ketamin + xylazin ile (0.10 mg/kg Ketalar® + 0.02 mg/kg Rompun®, i.p.) anestezi altına alındı. Yaklaşık her fareden 0.7 – 1.0 ml kan alındı. Kanlar 2500 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi. Serum kısımları ayrılarak kandaki bazı biyokimyasal parametreler, Architect® robotik sistemi ile belirlendi. Kan alınımı sonrasında iç organları çıkarıldı, yıkandı ve tartıldı. Organların ortalamaları ve standart sapmaları SPSS 11.0 programında hesaplandı ve sonuçlar *t*-testi ile kontrole göre karşılaştırıldı (Snedecor, 1968).

Farelerin her iki cauda epididimisi çıkartılarak tartıldı ve sperm sayımı için kullanıldı (Oishi, 2002; Yang ve ark., 2005). Testisler % 4 paraformaldehit içerisinde tespit edilerek histolojik inceleme için preparatlar hazırlandı (Hunt ve ark, 1966).

Kromozom preparatları kemik iliği direkt yöntemi ile hazırlandı (Adler, 1984).

2.2.2.1. Sperm Sayımı

Anestezi altında farelerin cauda epididimisi diseke edildi. Serum fizyolojik ile yıkanan doku tartılarak HTF-Hepes (Life global GMHH-100) tamponu içine alınıp 37 °C de CO₂’li Heracell inkübatörde 1 gece

inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün 1 ml HTF-Hepes tamponu içeren petri kabında iki insülin enjektörü vasıtasıyla cauda epididimis içindeki spermelerin tampona geçişi sağlandı. 100 mikrolitre pipetle tampon alınıp yine aynı miktardaki Tripan blue boyası ile karıştırdı. Buradan alınan damla Neubauer lamı üzerinde sayılarak kontrol grubu ve uygulama grupları arasındaki sperm sayıları karşılaştırıldı.

2.2.2.2. Histopatolojik Yöntem

Boyama Öncesi İşlemler:

1. Alınan örnekler % 4'lük Paraformaldehit içerisinde 1 gece bekletildi. Daha sonra aşağıdaki uygulamalar sırasıyla gerçekleştirildi:

- Akarsuda 1 gece bekletme
- % 80'lik Alkolde 2 saat bekletme
- % 95'lik Alkolde 2 saat bekletme
- % 95'lik Alkolde 4 saat bekletme
- % 95'lik Alkol çözeltisinde 1 gece bekletme
- % 100'lük Alkol içerisinde 2 saat bekletme
- % 100'lük Alkol içerisinde 2 saat bekletme
- % 100'lük Alkol içerisinde 2 saat bekletme

Alkolden çıkartılan örnekler havada kurutmaya bırakıldı.

2. Kuruyan örnekler, şeffaflaşana kadar 30 dk'lık 3 defa Xylol'den geçirildi

Parafine koyulan örnekler, 58 C⁰'lik etüvde 1 gece bekletildi

Parafin yenilendi ve 2 saat beklendi

Tekrar parafin yenilendi ve 2 saat beklendi

Son işlem olarak örnekler parafine gömüldü.

3. Buzdolabında donmaya bırakılan örnekler kesim için çıkarıldı ve aşağıdaki işlemler uygulandı:

Bloklar traşlandı (trimleme).

Bloklar sırasıyla mikrotoma yerleştirildi.

Kesit alındıktan sonra lamlara alınan örnekler havada kurutuldu

Boyama öncesi 58 C°'lik etüvde 1.5 saat tutuldu.

Hemotoksilen – Eozin Boyama:

Etüvden çıkarılan örnekler Xylol içerisine konu
58 C°'lik etüvde 20 dakika beklendi
Xylol'den çıkarılıp havada kurutulmaya bırakıldı
% 100'lük Alkol içerisinde 2 dakika
% 100'lük Alkol içerisinde 2 dakika
% 95'lik Alkol içerisinde 2 dakika
% 80'lik Alkol içerisinde 2 dakika
Distile suda 5 dakika
Hemotoksilen boyasında 2.5 dakika
Akar sudan geçirme 5 dakika
Asit Alkol içerisinde pembe renk oluşana kadar bekletildi
Akar sudan geçirildi
Amonyaklı suda mor renk olana kadar bekletildi
Akar sudan geçirildi
Distile suda 5 dakika bekletildi
Kurutmaya bırakıldı
Eozin boyasında 2.5 – 3 dakika bekletildi
% 95'lik Alkol içerisinde 2 dakika bekletildi
% 100'lük Alkol içerisinde 2 dakika bekletildi
% 100'lük Alkol içerisinde 2 dakika bekletildi
Kurutmaya bırakıldı
Xylol içerisinde 3 kez 10'ar dakika bekletildi
Havada kurutmaya bırakıldı
Entellan ile lamel kapatılıp 10 gün beklendi.

2.2.2.3. Kemik İliği Direkt Metodu

1. Fareler tartılıp, 2.5 mg /kg (distile suda çözülmüş) Colchicine (Sigma no: C-9754), intraperitoneal olarak enjekte edildi.
2. Enjeksiyondan 2 saat sonra sakrifiye edilen farelerin iki femuru da çıkarılıp yumuşak dokudan temizlendi. Sonra makasla femurun her iki ucu kesilip distal ucuna yumuşak ve kemik çapından daha dar polietilen boru takıldı. Borunun diğer ucuna ise Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, pH 7.2) içeren enjektör takıldı. Bu enjektörün pistonu yardımı ile basınç yapılarak kemik iliği hipotonik şok solusyonu ile birlikte bir santrifüj tüpüne (15 mL.lik) alındı. Materyal bir pastör pipeti yardımı ile iyice homojenize edildi.



Şekil 2.4. Kemik iliği aspirasyonu

3. Tüpler 10 dakika 1000 rpm' de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
4. Elde edilen hücre pelletine % 0.56 KCl eklendi ve homojenize edildi ve 37 ± 1 °C de 25 dk. su banyosunda tutuldu.
5. Hücreler tekrar santrifüjlendi. Süpernatant atıldı.

6. Etüvde 37 °C' de 20 dak. inkübe edildikten sonra 600 rpm.' de 6 dak. santrifüj edildi.
7. Dipte çöken hücre pelletine yeni hazırlanmış Carnoy (3:1 Metanol/Asetik Asit) fiksatifinden 7 mL ilave edildi ve hücrelerin birbirlerine yapışmaması için pipetaj yapıldı. Ağızları kapatılan tüpler bir gece buzdolabında (+4 °C) bir gece bekletildi.
8. Ertesi gün çıkarılan tüpler 1200 rpm' de 5 dak. santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Pellet üzerine 5 mL taze hazırlanmış fiksatif ilave edildi ve 5 dak. 1200 rpm' de santrifüj edildi. Bu işlem 2 kez daha tekrarlandı. Üst sıvı atıldıktan sonra tüpün dibinde kalan pellete 2-3 damla fiksatif ilave edilerek hücre süspansiyonu hazırlandı.
9. Cam kalemi ile numaralandırılan lamalar metanolle iyice temizlendikten sonra içinde distile su bulunan cam jar içinde +4 °C' de bekletildi. Hazırlanan fiksatif-hücre süspansiyonundan, soğuk ve ıslak lamalar üzerine (suyun fazlası filtre kağıdına alındı) 1-2 damla, yaklaşık 20 cm. yükseklikten hızlı bir şekilde damlatıldı. Lamalar oda ısısında kurutuldu. Her hayvan için 5 preparat hazırlandı.
10. Lamalar hidrolize edildikten sonra Giemsa boyasında 7 dak. boyandı.

Giemsa boyası: 90 mL distile su
1,5 mL NH₄OH
100 mL' ye süzölmüş Giemsa boyası ile tamamlanır.

2.2.2.4. *Serratia marcescens* Mutasyon Testi

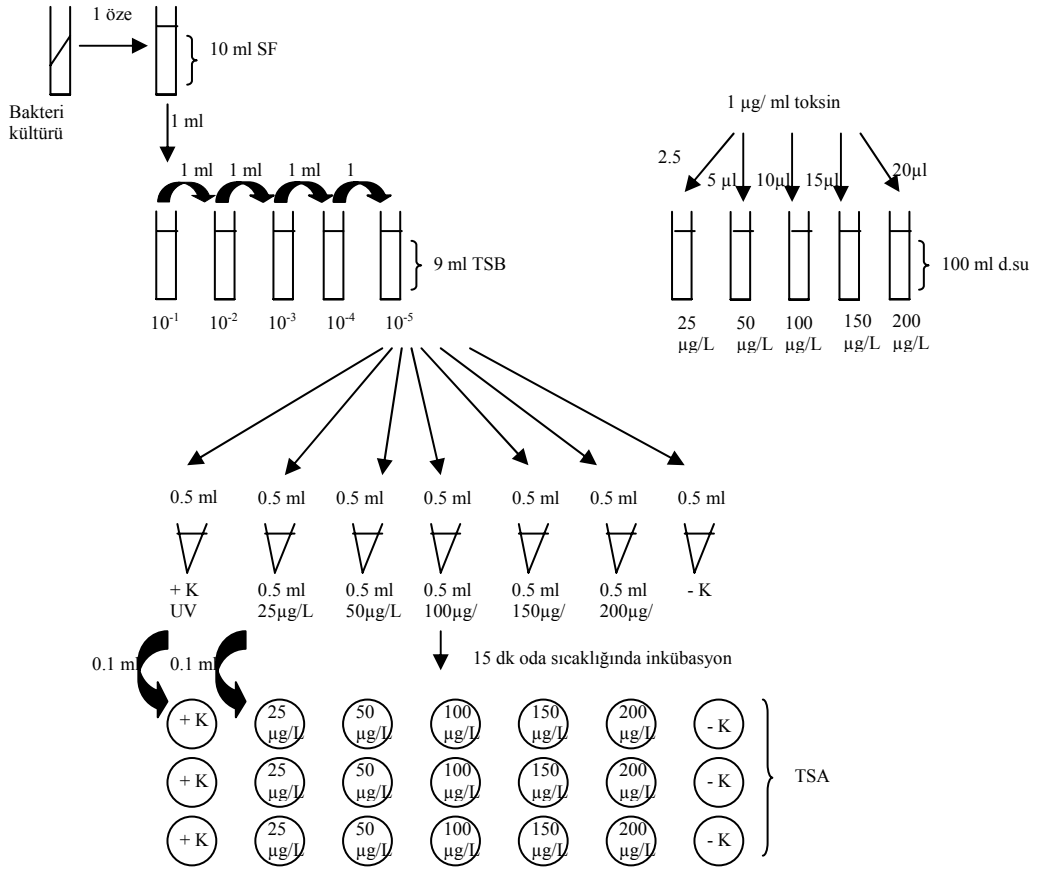
Serratia marcescens, çubuk şekilli gram negatif bir bakteridir ve oda sıcaklığında (28 °C) üretildiği zaman kırmızı pigment oluşturmaktadır. Sıcaklık bu derecenin üzerine çıktığı zaman (37 °C) organizma, bu kırmızı pigmentleri üretememektedir (Brock, 1988). *S. marcescens* doğal olarak toprakta, suda ve hayvanların bağırsaklarında bulunmaktadır (Schenectady County Community College, no date). 1951' den önce, *S. marcescens*' in insanlar için patojen olmadığı düşünülmekteydi, fakat son yıllarda bu bakterinin üriner sistem enfeksiyonlarında, endokarditlerde, yara enfeksiyonlarında, solunum sistemi ve göz enfeksiyonlarında ve ayrıca menenjitte fırsatçı patojen olarak, etkili olduğu bilinmektedir (Schenectady, no date).

S. marcescens kültürü son derece kolay olan, standart ortamlarda ve oda sıcaklığında büyüeyebilen bir canlıdır. *S. marcescens*' de, UV ışığa maruzat bakteride gen mutasyonu ile sonuçlanır. Bakteri 28°C de kırmızı pigment üretmek yerine beyaz koloni üretmeye başlar. UV ye maruzat aynı zamanda bakteri hücrelerinin sayısında da azalmaya sebep olur. UV şiddeti arttıkça oluşan kolonilerde beyazların sayısı artar ve kırmızılıkların sayısı azalır. *S. marcescens* de koloni renginde gözlenen kırmızı-beyaz değişikliği mutasyonları gözleme özelliği taşımaktadır ve UV dışında da olası tüm mutajenik maddeler bu şekilde test edilebilirler. Sonuçlar, oluşan kolonilerin sayısı ve kırmızı-beyaz oranı ile ifade edilebilir.

Yöntem :

1. Mc Farland sayım yöntemine göre *S. marcescens* kültüründen alınarak serum fizyoloji içerisinde seyreltme yapıldı.
2. Serum fizyolojik (SF) içerisinde hazırlanan seyretmeden triptik soy broth (TSB) içeren tüplere bir seri seyreltme yapılarak 10^{-5} konsantrasyona kadar bakteriler seyreltildi.
3. Hazırlanan 10^{-5} konsantrasyondaki bakteri süspansiyonundan steril ependorf tüplerine 0.5 ml aktarıldı.
4. Aynı ependorf tüplerine 0.5 ml 5 farklı konsantrasyondaki (25 $\mu\text{g/L}$, 50 $\mu\text{g/L}$, 100 $\mu\text{g/L}$, 150 $\mu\text{g/L}$ ve 200 $\mu\text{g/L}$) toksin solusyonundan eklendi. Toksin steril distile su içerisinde çözülerek hazırlandı.
5. Toksin solusyonu eklenmiş bakteriler 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
6. Süre sonunda triptik soy agar (TSA) içeren petrilere, ependorf içerisinde 0.1 ml alınarak yayma ekim yapıldı.
7. Negatif kontrol için bakteriler hiçbir maddeye maruz bırakılmadan TSA içeren petrilere ekim yapıldı. Pozitif kontrol için petrilere ekim yapılan bakteriler 2 dk UV' ye maruz bırakıldı.
8. Tüm petrilere 28 °C' deki inkübatörde 24 – 48 saat inkübe edildi.
9. Süre sonunda oluşan kırmızı (normal), pembe (hibrit) ve beyaz (mutant) koloniler sayılarak konsantrasyonlar arasında karşılaştırma yapıldı.

S. marcescens mutasyon testinin şematik olarak gösterimi Çizelge 2.1' de anlatılmıştır.



Çizelge 2.1 *S. marcescens* mutasyon testinin şematik olarak gösterimi.

2.2.3. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmadaki istatistiksel değerlendirmeler SPSS for Windows 11.0 istatistiksel analiz programı kullanılarak yapılmıştır. Deney sonunda bütün gruplardaki farelere ait total ağırlık, organ ağırlıklarının ortalamaları ve organ ağırlığı/total vücut ağırlığı oranları hesaplanarak, sonuçlar varyans analizi (One-Way ANOVA) ile kontrole göre karşılaştırılmıştır. Biyokimyasal parametrelerin ve mutasyon testlerinin değerlendirilmesinde de, farklı konsantrasyon grupları kontrol grubu ile karşılaştırılmak üzere yapılan varyans analizi ile gruplar arasında farklılık olup olmadığı saptanmıştır. İstatistiksel açıdan önem kontrolü $p < 0.01$ ve $p < 0.05$ seviyelerinde, kontrol grubu ile uygulama grupları arasında yapılmıştır.

3. BULGULAR

Çalışmaya her grupta 8 sıçan olmak üzere 56 sıçanla başlanmış, çalışma sonunda ise 9 fare çeşitli sebeplerle ölmüş ve çalışma 43 sıçanla tamamlanmıştır. Deney gruplarına göre sıçanların dağılımı ve ölüm %' si Çizelge 3.1' de görülmektedir.

Çizelge 3.1. Çalışma sonunda deney gruplarına göre farelerin dağılımı

Grup no	Uygulanan anatoxin-a Konsantrasyonu	Başlangıç Sayısı	Bitiş Sayısı	Ölüm %' si
1	Kontrol (serum fizyolojik)	13	13	0.0
2	50 µg/ kg anatoxin-a	13	9	23.0
3	100 µg/ kg anatoxin-a	13	11	25.4
4	150 µg/ kg anatoxin-a	13	10	23.0
TOPLAM		52	43	8.3

3.1. Total Vücut ve Organ Ağırlıkları ile İlgili Bulgular

Çalışma sonunda fareler tartılmış, anestezi altına alınmış ve disekte edilen farelerden çıkarılan iç organlar yıkanmış ve tartılmıştır. Farelerin total ağırlıkları ve organların ortalama ağırlıkları ve standart sapmaları Çizelge 3.2 ve 3.3' de görülmektedir.

Deneme sonunda, Anatoxin-a' nın farklı dozları uygulanan farelerin final total vücut ağırlıkları, kontrole oranla ve başlangıç ağırlıklarına oranla herhangi değişiklik göstermemiştir. Yine tüm uygulama gruplarında bulunan fareler, iç organ ağırlıkları bakımından ve karaciğer/ total vücut ağırlığı bakımından da kontrole göre ve kendi aralarında herhangi bir önemli farklılık göstermemektedir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.2. Farelerin total vücut ağırlığı ortalamaları ve standart sapmaları

Grup no	Uygulanan anatoxin-a Konsantrasyonu	Başlangıç Ağırlık (g)	Final Ağırlık (g)
1	Kontrol (serum fizyolojik)	26.3 ± 1.18	25.7 ± 1.05
2	50 µg/ kg anatoxin-a	26.5 ± 1.03	24.8 ± 1.24
3	100 µg/ kg anatoxin-a	26.2 ± 1.58	27.3 ± 1.53
4	150 µg/ kg anatoxin-a	26.0 ± 1.43	25.1 ± 0.84

* p< 0.05 seviyesinde istatistiksel olarak önemli (LSD testi)

Çizelge 3.3. Farelerin organ ağırlığı ortalamaları (g) ve standart sapmaları

Grup	Karaciğer (ort ± SS)	Beyin (ort ± SS)	Böbrek (ort ± SS)
Kontrol	1.36 ± 0.18	0.38 ± 0.01	0.33 ± 0.04
50 µg/ kg	1.27 ± 0.09	0.38 ± 0.01	0.32 ± 0.02
100 µg/ kg	1.36 ± 0.07	0.39 ± 0.01	0.35 ± 0.02
150 µg/ kg	1.40 ± 0.05	0.38 ± 0.01	0.35 ± 0.03

Böbrek ağırlıkları her 2 organın toplam ağırlığı olarak verilmiştir.

* p< 0.05 seviyesinde istatistiksel olarak önemli (LSD testi)

Çizelge 3.4. Karaciğer/ total vücut ağırlıkları oranları

Grup	Karaciğer (g) (ort ± SEM)	Final ağırlık (g) (ort ± SEM)	Rölatif Karaciğer ağırlığı (g) (ort ± SEM)
Kontrol	1.36 ± 0.18	25.7 ± 1.05	0.052 ± 0.006
50 µg/ kg	1.27 ± 0.09	24.8 ± 1.24	0.051 ± 0.003
100 µg/ kg	1.36 ± 0.07	27.3 ± 1.53	0.050 ± 0.002
150 µg/ kg	1.40 ± 0.05	25.1 ± 0.84	0.056 ± 0.002

* p< 0.05 seviyesinde istatistiksel olarak önemli (LSD testi)

3.2. Kan Biyokimyasal Parametreleri ile İlgili Bulgular

Kontrol ve uygulama grubu farelerden alınan kanlarda yapılan biyokimyasal inceleme sonuçları Çizelge 3.5' de sunulmuştur.

Çizelge 3.5. Kontrol ve anatoxin-a uygulanmış farelerin biyokimyasal analiz sonuçları. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. ALT (Alanin-Aminotransferase), AST (Aspartat-Aminotransferase), AlkP (Alkaleen fosfataz), TP (Total protein), LDL (Low density lipid), HDL (High density lipid).

Parametreler - Ref. değerleri*	Kontrol	50 $\mu\text{g/ kg}$	100 $\mu\text{g/ kg}$	150 $\mu\text{g/ kg}$
ALT 23-48 IU/l	311.8 \pm 113	229.5 \pm 111	418.4 \pm 129	269.9 \pm 81
AST 2-24 IU/l	496.0 \pm 107	515.2 \pm 119	541.1 \pm 118	627.9 \pm 109
AlkP 10-28 IU/l	122.9 \pm 41.1	74.2 \pm 13.1	116.8 \pm 38.6	107.8 \pm 24.7
TP 4.0-8.6 g/dl	5.25 \pm 0.19	5.14 \pm 0.18	5.37 \pm 0.14	5.02 \pm 0.15
Albumin 2.5-4.8 g/dl	2.57 \pm 0.10	2.46 \pm 0.08	2.62 \pm 0.10	2.38 \pm 0.09
Glikoz 63-176 mg/dl	204.8 \pm 27.6	154.3 \pm 22.5	151.9 \pm 15.2	138.4 \pm 19.4**
Kolesterol 26-82 mg/dl	73.3 \pm 3.90	87.00 \pm 8.17	78.9 \pm 5.02	73.3 \pm 6.39
Üre 14-28 mg/dl	46.6 \pm 3.90	51.2 \pm 4.93	46.7 \pm 3.62	53.1 \pm 5.19
Fosfor 2.3-9.2 mg/dl	8.22 \pm 0.57	8.11 \pm 0.42	8.98 \pm 0.66	8.87 \pm 0.42
Kalsiyum 3.2-8.5 mg/dl	7.93 \pm 0.98	8.45 \pm 0.23	8.62 \pm 0.19	8.85 \pm 0.95

* Referans değerleri cinsiyete ve yaşa göre önemli değişiklikler gösterebilmektedir (Altuğ ve ark., 2004; XIII. Deney Hayvanları Kursu Notları, 2006).

** $p < 0.05$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli (LSD testi)

3.3. Reprodüktif Sistem ile İlgili Bulgular

Erkek farelerin testis, cauda epididimis ağırlık ölçümleri ve sperm sayımları Çizelge 3.6 da ve Şekil 3.1, 3.2 ve 3.3 de sunulmuştur. Kontrol ile karşılaştırıldığında fare testis ağırlıklarında ve rölatif testis ağırlıklarında önemli bir değişme bulunmamıştır (Çizelge 3.7). Bununla birlikte 50 µg/ kg, 100 µg/ kg ve 150 µg/ kg anatoxin-a uygulanmış farelerin cauda epididimislerinde kontrole oranla bir azalma olduğu ancak yalnızca 100 µg/ kg ve 150 µg/ kg anatoxin-a uygulanan farelerin ağırlıklarında kontrole göre $p<0.01$ seviyesinde önemli bir azalma bulunduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde farelerin cauda epididimislerinden yapılan sperm sayımı sonuçlarına bakıldığında her 3 uygulama grubunda da kontrole göre $p<0.01$ seviyesinde önemli azalmanın olduğu görülmektedir. Bu 2 sonucun birbiri ile uyumlu olması anatoxin-a'nın cauda epididimis ağırlığına etki ettiği ve cauda epididimis ağırlığı azaldıkça içerisinde bulunan sperm sayısının da azaldığını ortaya koymaktadır.

Çizelge 3.6. Farelerin testis, cauda epididimis ağırlıkları (g) ve sperm sayıları ($\times 10^7$)

Grup	Testis (g) (ort \pm SEM)	Cauda epididimis (g) (ort \pm SEM)	Sperm Sayısı($\times 10^7$) (ort \pm SEM)
Kontrol	0.18 \pm 0.01	0.0596 \pm 0.0024	54.67 \pm 1.76
50 µg/ kg	0.20 \pm 0.02	0.0497 \pm 0.0013	27.33 \pm 1.20 **
100 µg/ kg	0.18 \pm 0.01	0.0395 \pm 0.0035**	22.00 \pm 1.15 **
150 µg/ kg	0.18 \pm 0.01	0.0358 \pm 0.0048**	15.67 \pm 0.88 **

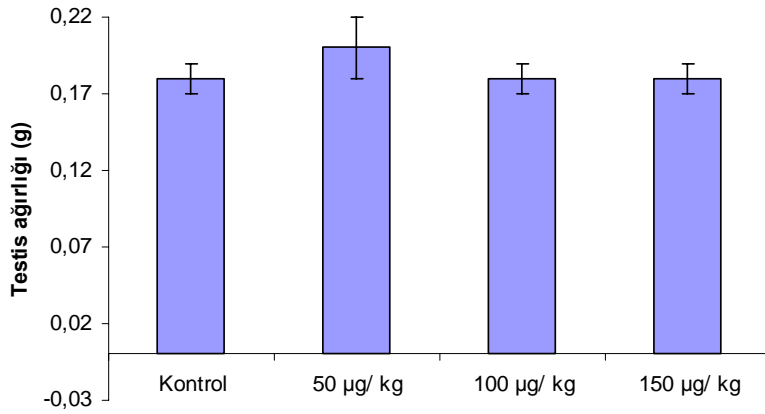
Testis ve cauda epididimis ağırlıkları her 2 organın toplam ağırlığı olarak verilmiştir.

** $p<0.01$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli (LSD testi)

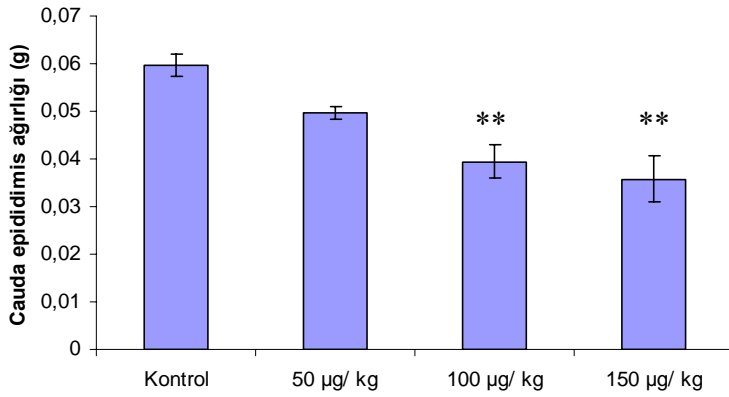
Çizelge 3.7. Testis/ total vücut ağırlıkları oranları

Grup	Testis (g) (ort ± SEM)	Final Ağırlık (g) (ort ± SEM)	Rölatif Testis Ağırlığı (g) (ort ± SEM)
Kontrol	0.18 ± 0.01	25.7 ± 1.05	0.007 ± 0.001
50 µg/ kg	0.20 ± 0.02	24.8 ± 1.24	0.008 ± 0.001
100 µg/ kg	0.18 ± 0.01	27.3 ± 1.53	0.007 ± 0.001
150 µg/ kg	0.18 ± 0.01	25.1 ± 0.84	0.007 ± 0.001

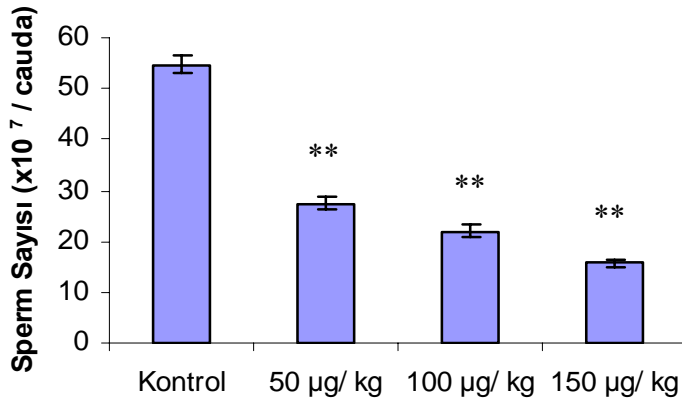
* p< 0.05 seviyesinde istatistiksel olarak önemli (LSD testi)



Şekil 3.1. Testis ağırlıklarının (g) grafiksel gösterimi



Şekil 3.2. Cauda epididymis ağırlıklarının (g) grafiksel gösterimi. ** $p < 0.01$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli (LSD testi)



Şekil 3.3. Cauda epididymisten yapılan sperm sayımı sonuçlarının grafiksel gösterimi ** $p < 0.01$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli (LSD testi)

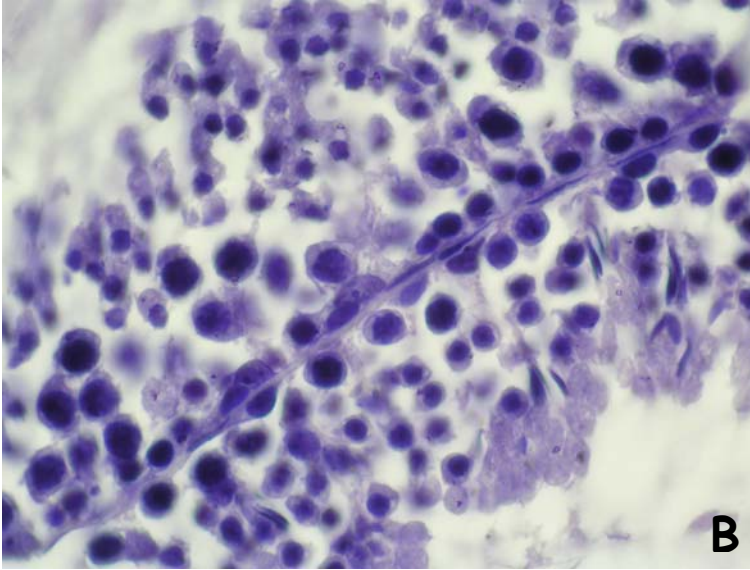
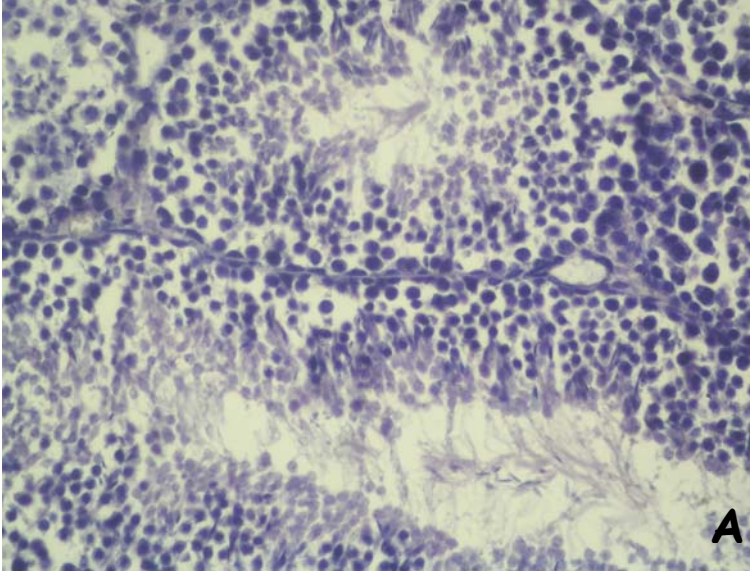
3.4. Testis' in Histopatolojik Bulguları

Kontrol grubundan elde edilen testis dokusu ışık mikroskopik görüntüleri Şekil 3.4' de görülmektedir. Kontrol grubu farelerdeki Tubuli seminiferi contorti ve spermatojenik hücre serileri normal histolojik görünümde dir.

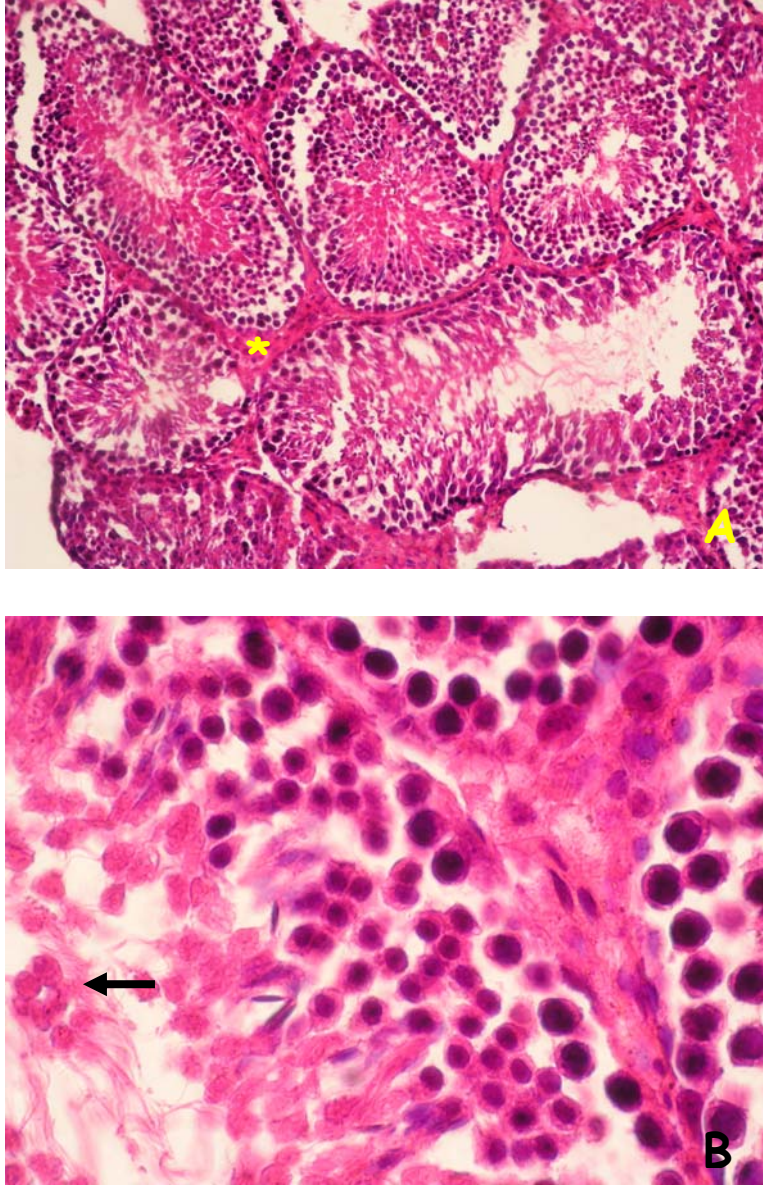
50 µg/kg anatoxin-a uygulanan gruptan elde edilen testis dokusu ışık mikroskopik görüntüleri Şekil 3.5' de görülmektedir. Bu grupta tubuli seminiferi contorti' ler normal görünümde olmasına rağmen intersitisyumda yer yer bağ dokusu kalınlaşmaları dikkat çekmektedir. Spermatojenik hücre serileri genellikle normal görünmesine rağmen yer yer lumen içinde bu hücrelere ait döküntülere rastlanmıştır.

100 µg/kg anatoxin-a uygulanan gruptan elde edilen testis dokusu ışık mikroskopik görüntüleri Şekil 3.6' da görülmektedir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, bu grupta spermatojenik hücre serilerinde dejenerasyon, intercellular ayrışma, piknotik nükleus, germ hücre kaybı ve bu hücrelere ait döküntüler görülmektedir.

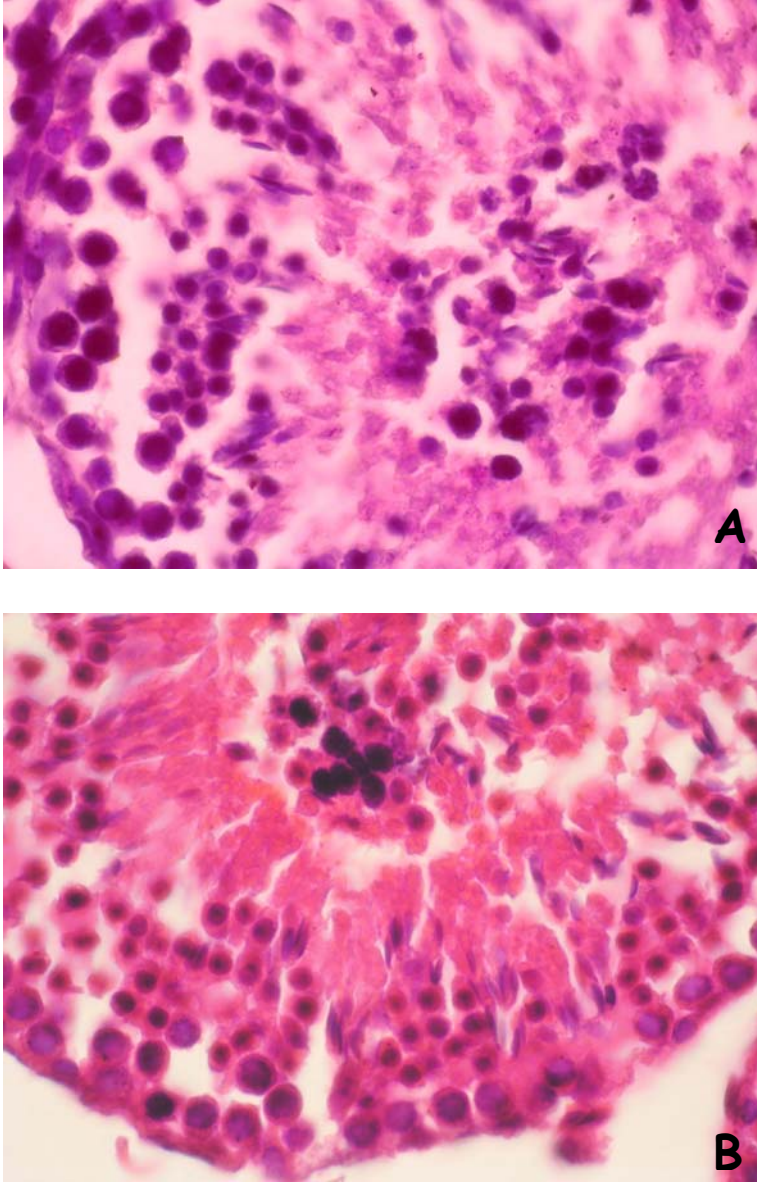
150 µg/kg anatoxin-a uygulanan gruptan elde edilen testis dokusu ışık mikroskopik görüntüleri Şekil 3.7' de görülmektedir. Kontrol ve diğer gruplarla karşılaştırıldığında tubuli seminiferi contorti' lerde şekil bozukluğu, defektif tubul, spermatojenik hücre serilerinde dejenerasyon ve buna bağlı hücre kayıpları, bazal lamina ve intercellular ayrışma, piknotik nükleus, germ hücre kaybına bu grupta oldukça şiddetli bir şekilde rastlanmıştır.



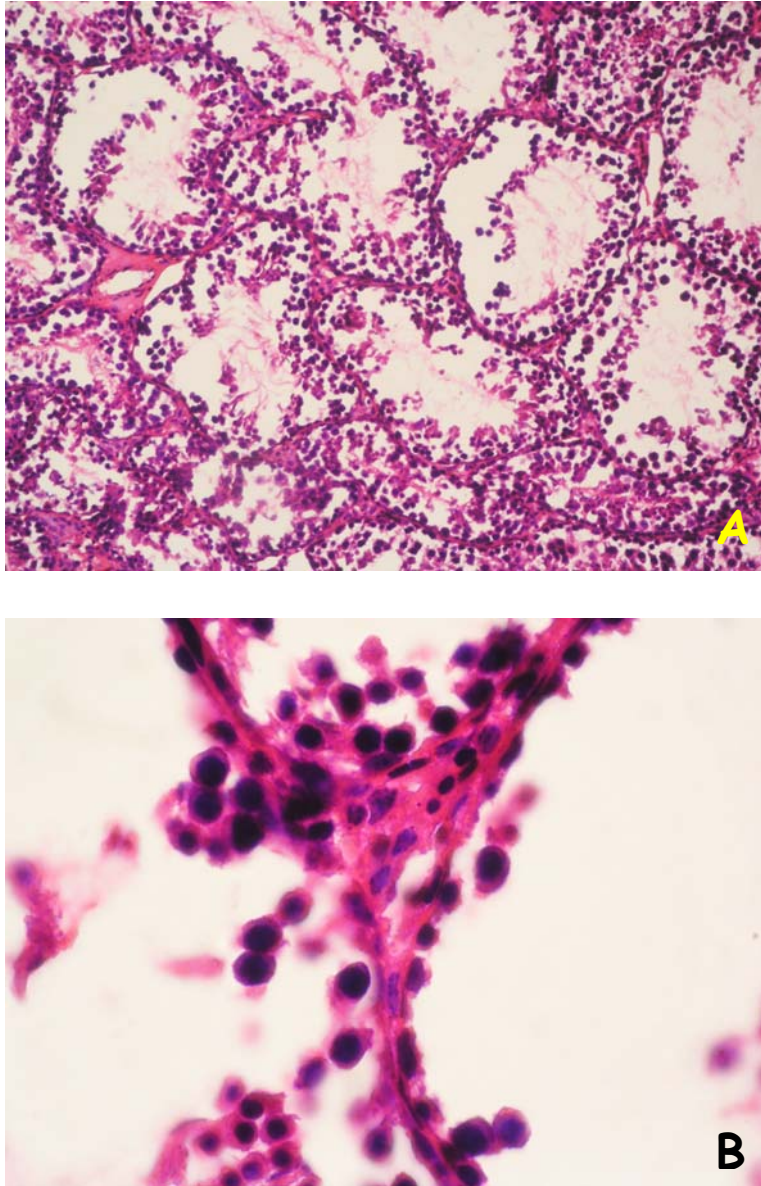
Şekil 3.4. Kontrol grubundan elde edilen Testis dokusu ışık mikroskopik görüntüleri. **A.** Tubuli seminiferi contorti ve **B.** Spermatojenik hücre serileri (B) normal histolojik görünümündedir. Hematoksilen- Eosin (A x40, B x100).



Şekil 3.5. 50 µg/kg anatoxin-a uygulanan gruptan elde edilen testis dokusu ışık mikroskopik görüntüleri. **A.** Tubuli seminiferi contorti'ler normal görünümde, intersitisyumda bağ dokusu kalınlaşmaları gözlendi (*). **B.** Spermatojenik hücre serileri genellikle normal görünümde, yer yer lumen içinde bu hücelere ait döküntüler. Hematoksilen- Eosin (A x20, B x100).



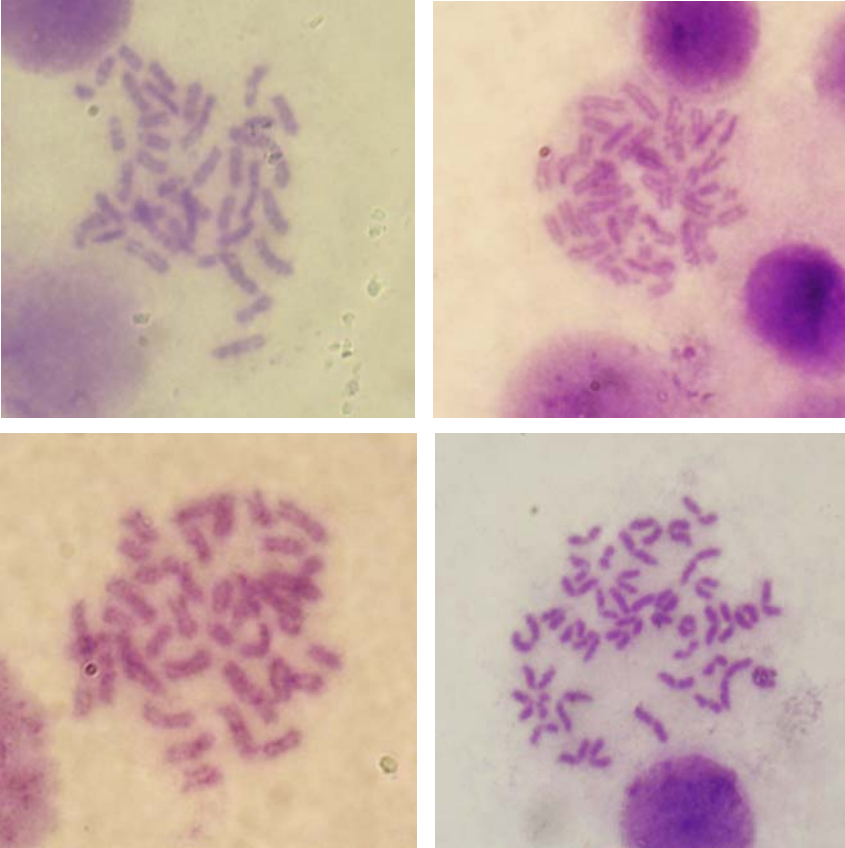
Şekil 3.6. 100 µg/kg anatoxin-a uygulanan gruptan elde edilen testis dokusu ışık mikroskopik görüntüleri. **A** ve **B**. Spermatojenik hücre serilerinde dejenerasyon, intercellular ayrışma, piknotik nükleus, germ hücre kaybı ve bu hücrelere ait döküntüler görülmekte. Hematoksilen- Eosin (A x100, B x100).



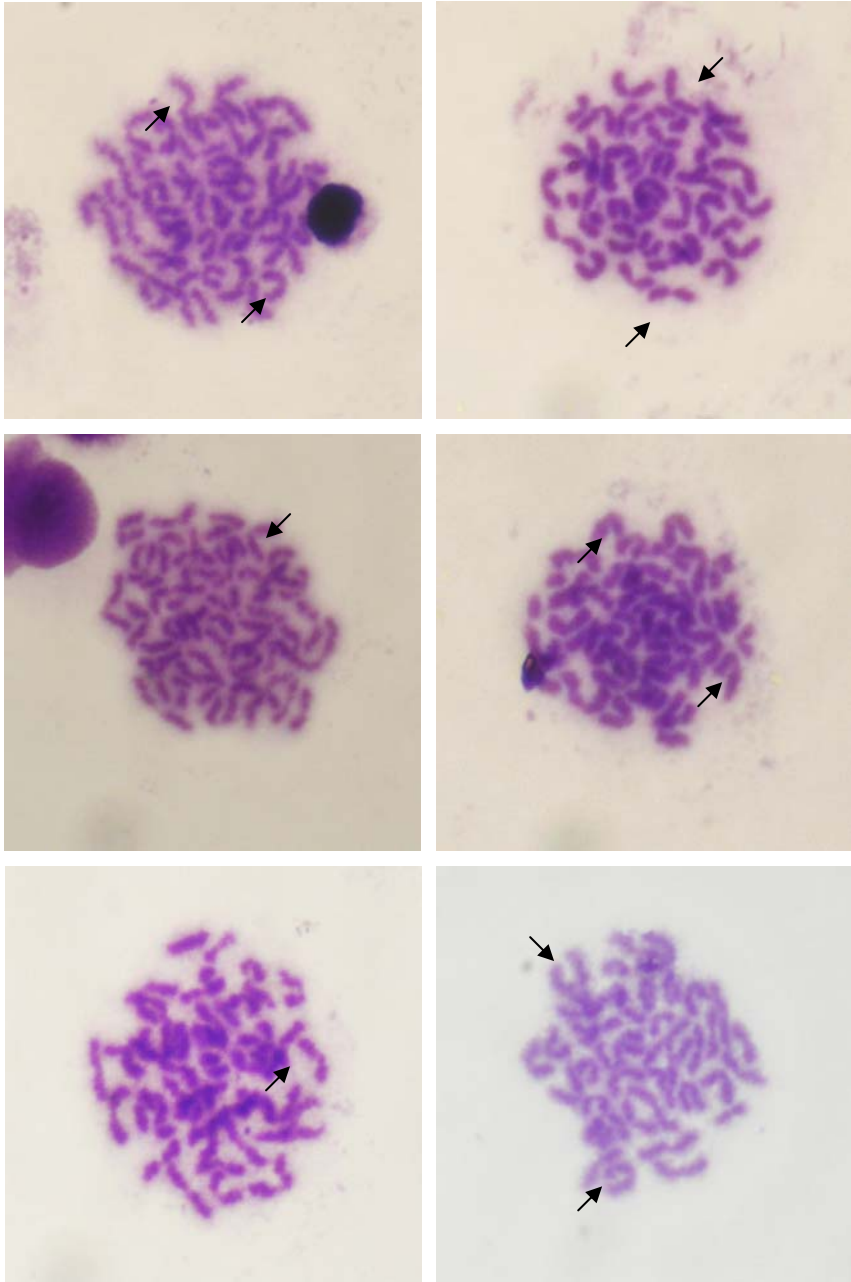
Şekil 3.7. 150 µg/kg anatoxin-a uygulanan gruptan elde edilen testis dokusu ışık mikroskopik görüntüleri. **A.** Tubuli seminiferi contorti' lerde şekil bozukluğu, **A** ve **B** Defektif tubul, spermatojenik hücre serilerinde dejenerasyon, bazal lamina ve intercellular ayrışma, piknotik nükleus, germ hücre kaybı. Hematoksilen- Eosin (A x20, B x100).

3.5. Kromozom incelemeleri ile ilgili bulgular

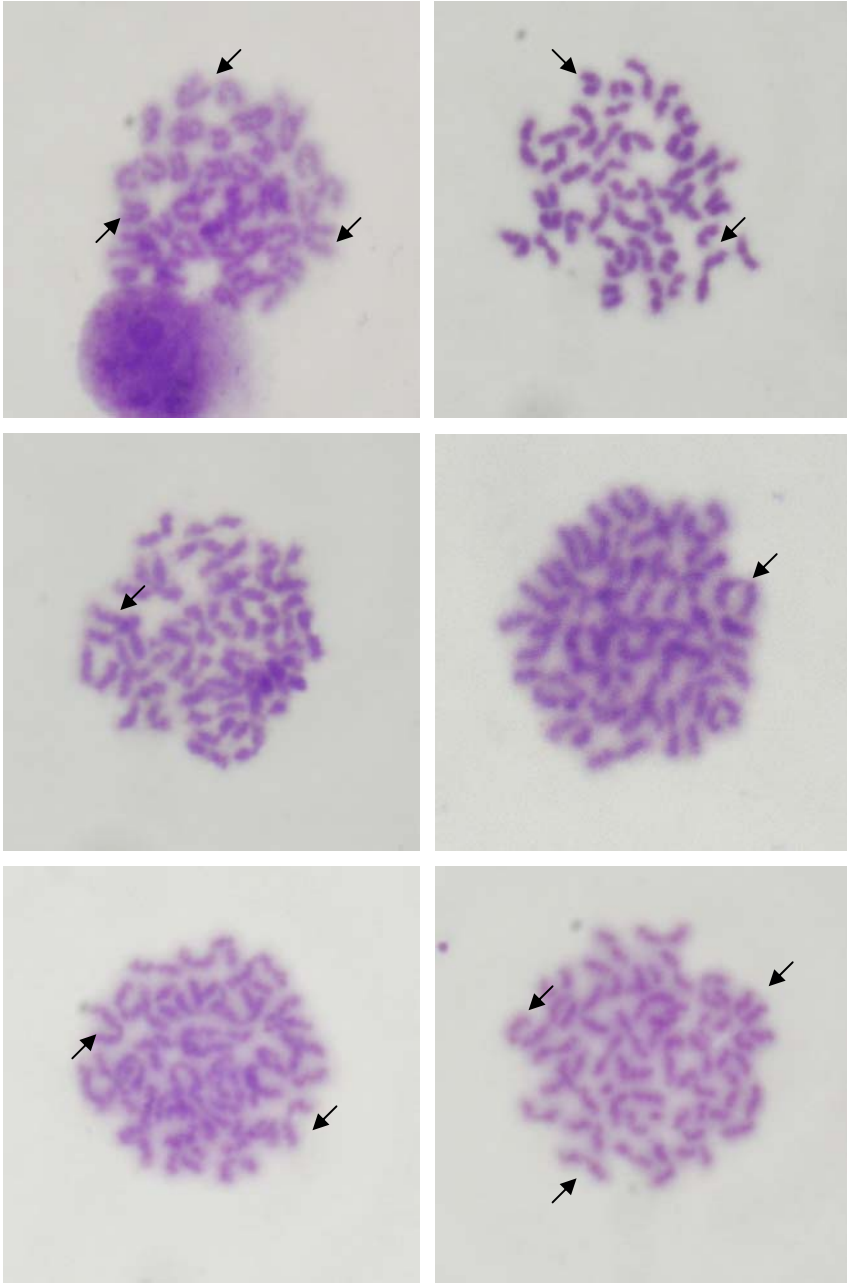
Her deneme grubundan 100 hücre incelenmiştir. Kontrol grubuna ait farelerin kromozom sayıları $2n=40$ olup, Şekil 3.8’ de görülmektedir. 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ve 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Anatoxin-a uygulanmış farelerde gözlenen tek bulgu kromatid ayrışmasıdır. Bu gruplara ait farelerin kromozomları Şekil 3.9 ve 3.10’ de görülmektedir. 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Anatoxin-a uygulanmış farelerde, kromatid ayrışması ve kromozomlarda yapışma kaydedilmiştir. Bu gruba ait farelerin kromozomları Şekil 3.11’ de görülmektedir.



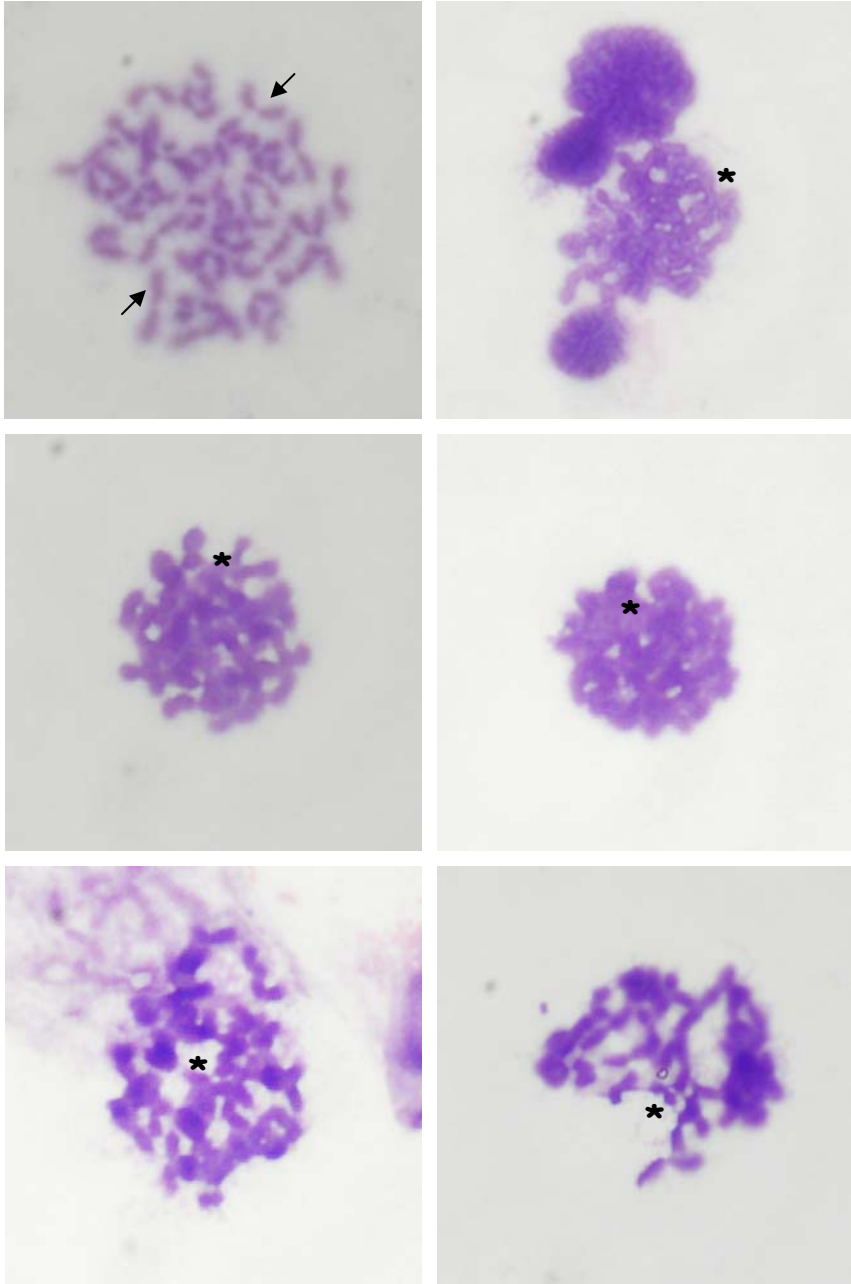
Şekil 3.8. Kontrol grubu fare kromozomlarının görünümü ($2n=40$).
(Giemsa x100)



Şekil 3.9. 50 µg/kg Anatoxin-a uygulanmış fare kromozomlarının görünümü (→ kromatid ayrışması). (Giemsa x100)



Şekil 3.10. 100 µg/kg Anatoxin-a uygulanmış fare kromozomlarının görünümü (→ kromatid ayrışması). (Giemsa x100)



Şekil 3.11. 150 µg/kg Anatoxin-a uygulanmış fare kromozomlarının görünümü (→ kromatid ayrışması, * kromozomlarda yapışma).
(Giemsa x100)

3.6. *Serratia marcescens* Mutasyon Testi Bulguları

Serratia marcescens mutasyon testi sonuçları Çizelge 3.8 ve Şekil 3.12' de verilmiştir. Uygulanan Anatoxin-a konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak toplam bakteri sayısında doza – bağlı azalma gözlenmiştir. (-) Kontrol ile karşılaştırıldığında yalnızca 25 µg/ L konsantrasyonda $p<0.05$ olmak üzere diğer tüm konsantrasyonlarda ve (+) Kontrol olarak UV uygulamasında $p<0.01$ seviyesinde önemli bir azalma belirlenmiştir.

Uygulanan konsantrasyondaki artışa bağlı olarak kırmızı kolonilerin sayısında azalma ve beyaz kolonilerin sayısında ise artma gözlenmiştir. Kırmızı kolonilerin sayısındaki azalma tüm konsantrasyonlarda (25 µg/ L, 50 µg/ L, 100 µg/ L, 150 µg/ L ve 200 µg/ L) $p<0.01$ seviyesinde önemlilik göstermektedir. Bu sonuçların aksine beyaz kolonilerde konsantrasyona bağlı bir artma ile birlikte yalnızca 100 µg/ L, 150 µg/ L ve 200 µg/ L konsantrasyonlarda $p<0.01$ seviyesinde önemli bir artış tespit edilmiştir (Şekil 3.13, 3.14, 3.15, 3.16, 3.17 ve 3.18).

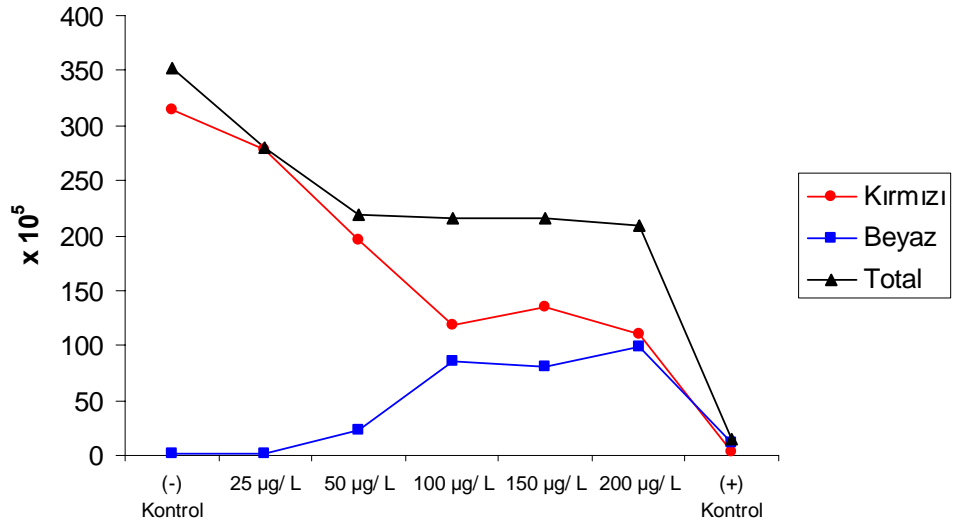
Bu sonuçlar doğrultusunda Anatoxin-a' nın konsantrasyona bağlı olarak *Serratia marcescens*' in üremesi üzerine bakterisidal bir etki oluşturduğu saptanmıştır. Ayrıca bu bakterinin oda sıcaklığında (28 °C) üretildiği zaman kırmızı pigment oluşturduğu bilinmektedir. Ancak herhangi bir mutajen bu bakterinin oda sıcaklığında kırmızı koloni üretmesini engellemekte ve beyaz koloni oluşturmasını sağlamaktadır. Anatoxin-a *S. marcescens*' de, konsantrasyondaki artışa bağlı olarak bir gen mutasyonu oluşturmuş olup, bakteri 28 °C de kırmızı pigment üretmek yerine beyaz koloni üretmeye başlamıştır. UV' ye maruzat da bakteri hücrelerinin sayısında da azalmaya ve kolonilerde beyazların sayısının artmasına sebep olmuştur (Şekil 3.19).

Çizelge 3.8. *Serratia marcescens* mutasyon testi sonuçları

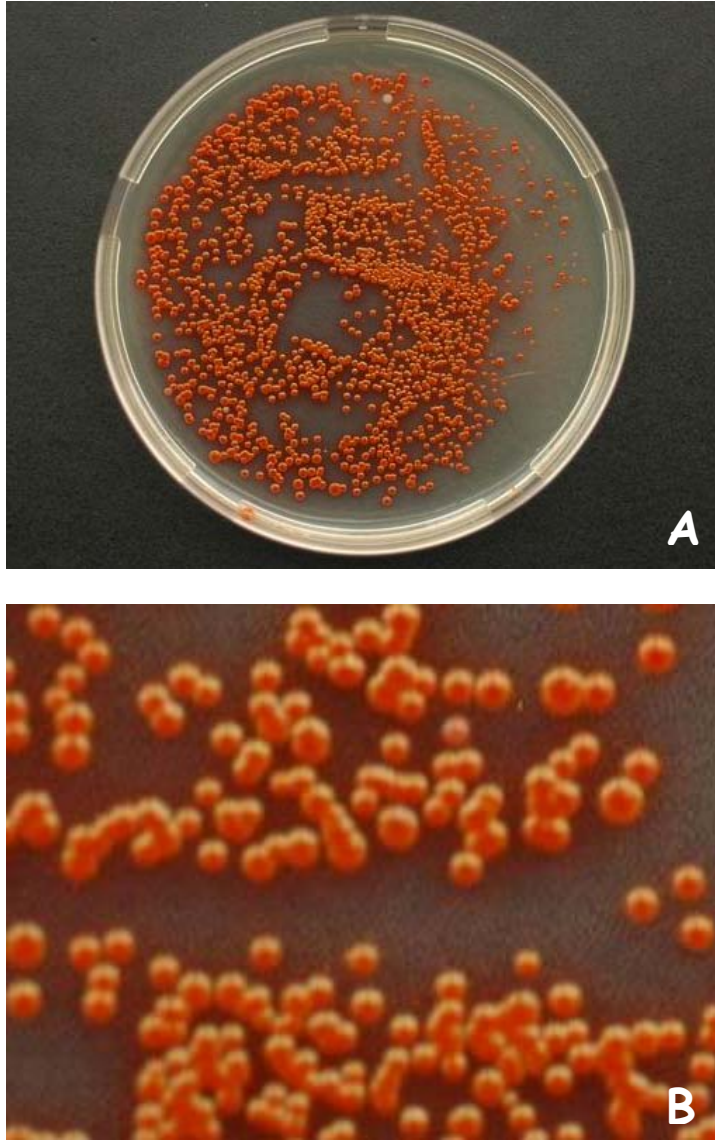
Grup	Koloni sayısı x 10 ⁵ (ort ± SEM)			
	Kırmızı	Beyaz	Total	K / B Oranı
(-) Kontrol	315 ± 38	1 ± 0.6	352 ± 38	315
25 µg/ L	278 ± 31	2 ± 1.3	280 ± 30 *	139
50 µg/ L	196 ± 25 **	23 ± 13	219 ± 17 **	8.5
100 µg/ L	135 ± 34 **	80 ± 22 **	215 ± 18 **	1.7
150 µg/ L	118 ± 27 **	86 ± 23 **	216 ± 6 **	1.4
200 µg/ L	111 ± 4 **	98 ± 6 **	209 ± 10 **	1.1
(+) Kontrol	4 ± 1 **	11 ± 1	15 ± 2 **	0.4

* p< 0.05 seviyesinde istatistiksel olarak önemli (LSD testi)

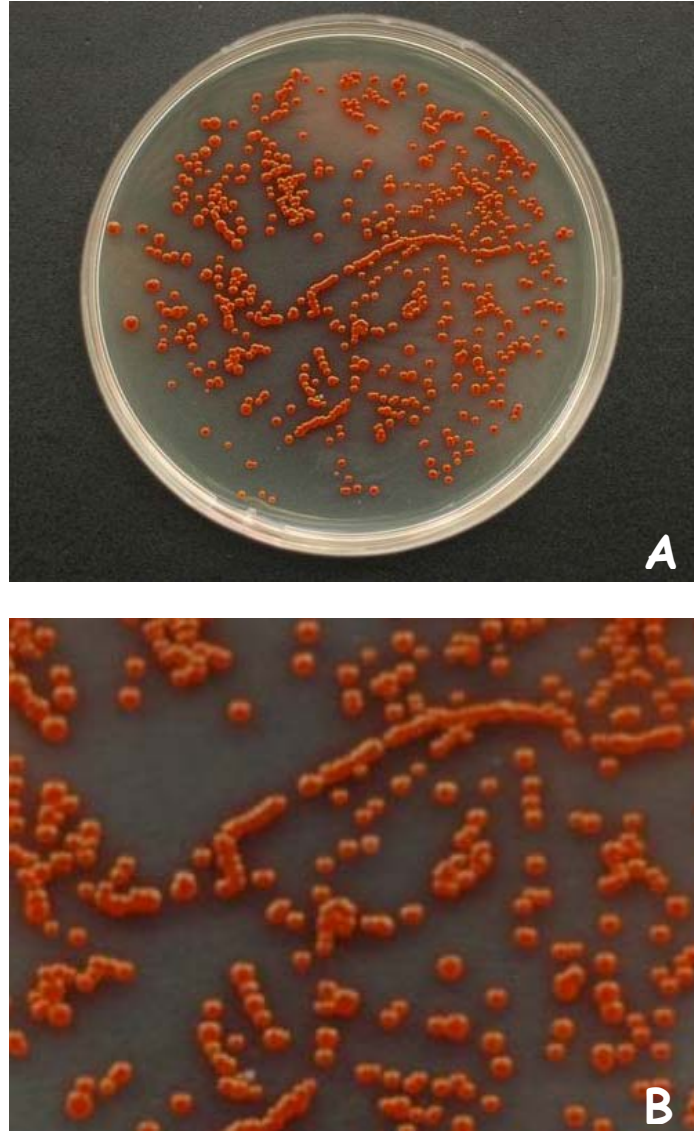
** p< 0.01 seviyesinde istatistiksel olarak önemli (LSD testi)



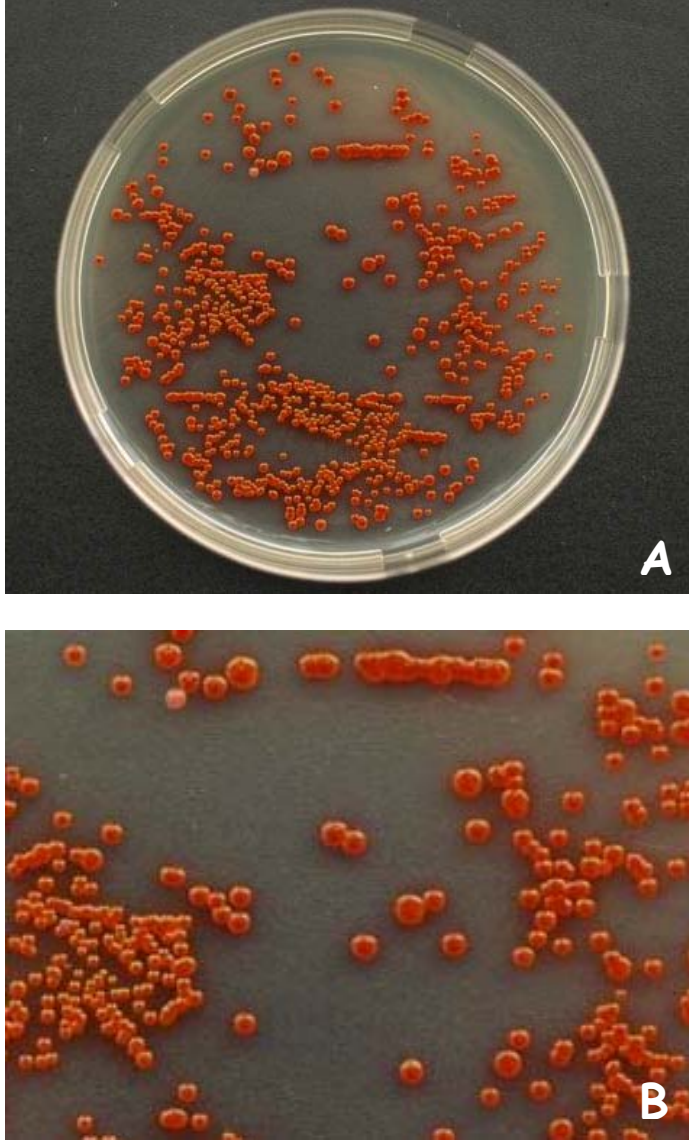
Şekil 3.12. *Serratia marcescens* mutasyon testi sonuçları grafiksel gösterimi



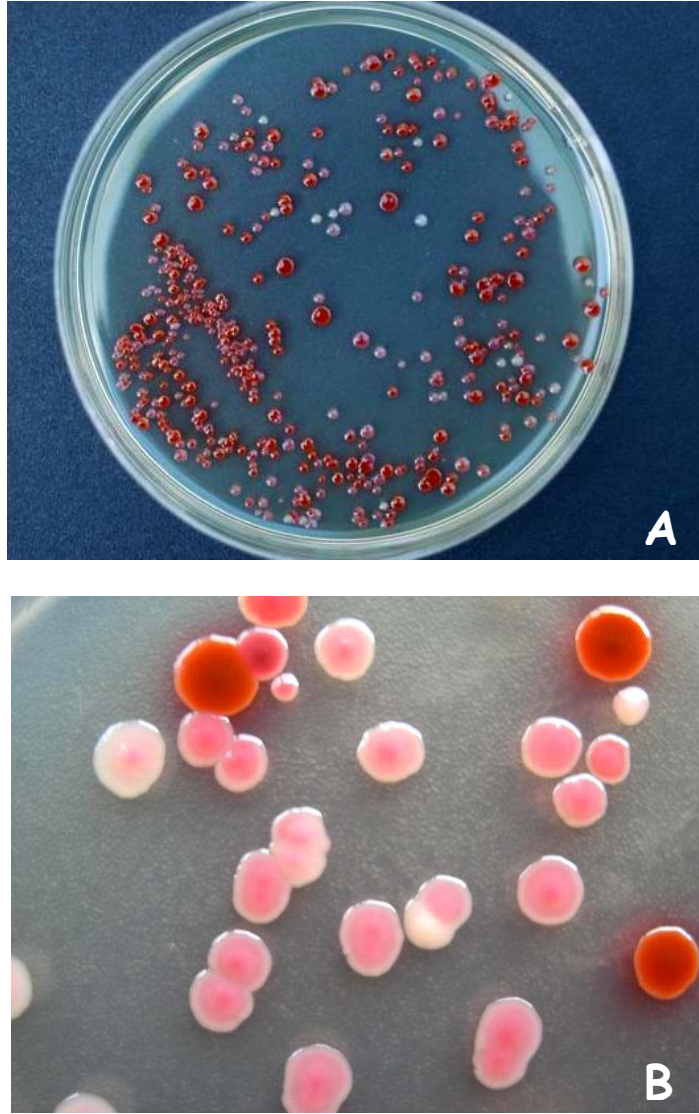
Şekil 3.13. (-) Kontrol grubu *S. marcescens* mutasyon testi sonuçları. **A.** Genel petri görünümü, **B.** Bakteri kolonilerinin yakından görünümü.



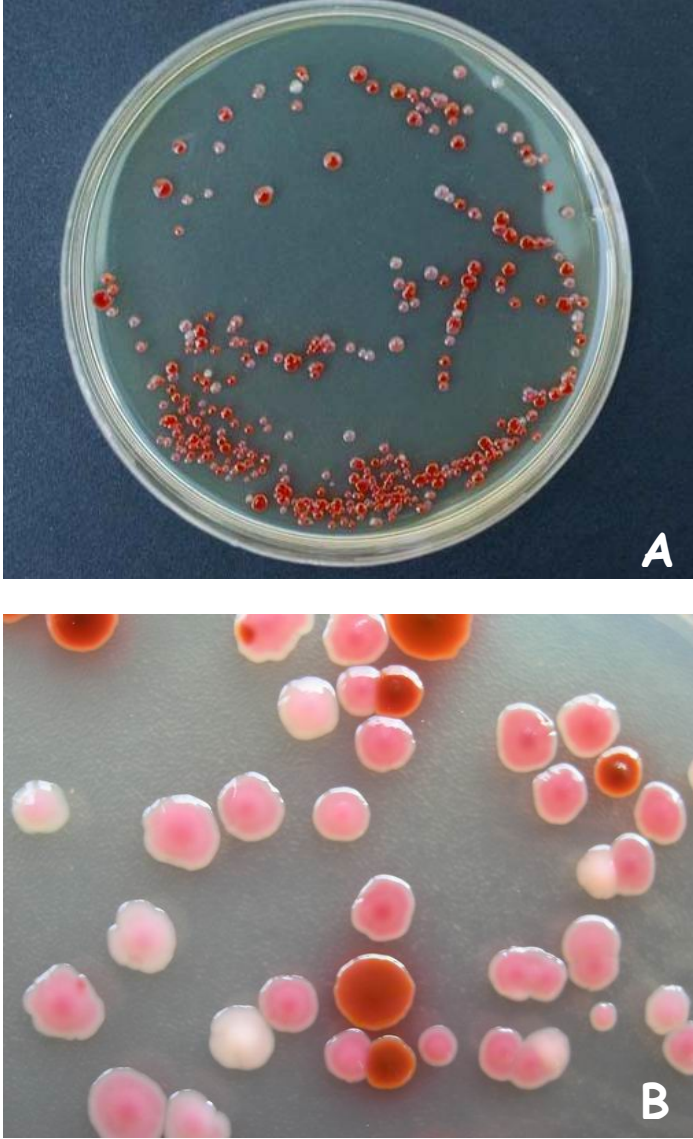
Şekil 3.14. 25 µg/ L anatoxin-a grubu *S. marcescens* mutasyon testi sonuçları. **A.** Genel petri görünümü, **B.** Bakteri kolonilerinin yakından görünümü.



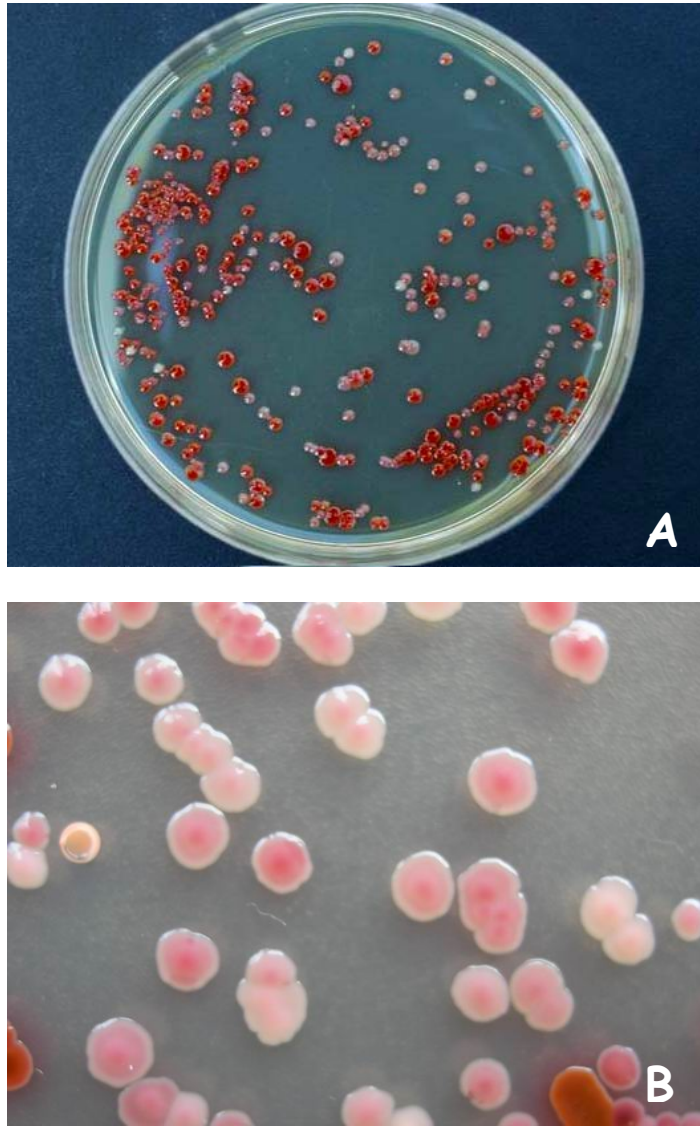
Şekil 3.15. 50 µg/ L anatoxin-a grubu *S. marcescens* mutasyon testi sonuçları. **A.** Genel petri görünümü, **B.** Bakteri kolonilerinin yakından görünümü.



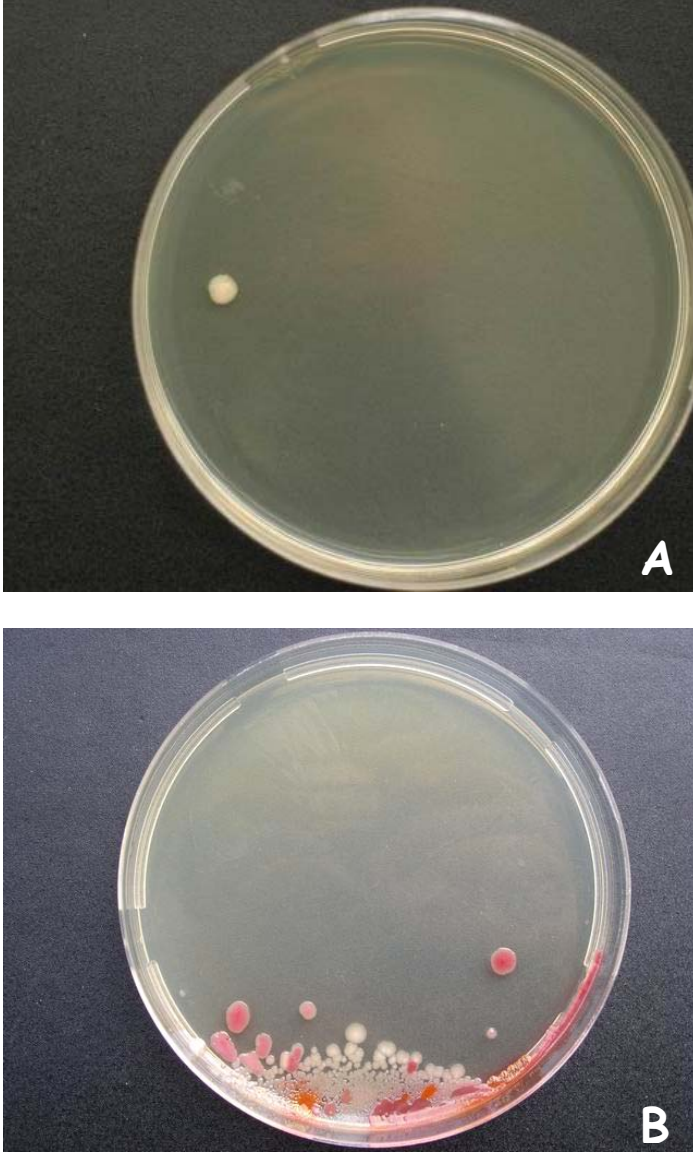
Şekil 3.16. 100 µg/ L anatoxin-a grubu *S. marcescens* mutasyon testi sonuçları. **A.** Genel petri görünümü, **B.** Bakteri kolonilerinin yakından görünümü.



Şekil 3.17. 150 µg/ L anatoxin-a grubu *S. marcescens* mutasyon testi sonuçları. **A.** Genel petri görünümü, **B.** Bakteri kolonilerinin yakından görünümü.



Şekil 3.18. 200 µg/ L anatoxin-a grubu *S. marcescens* mutasyon testi sonuçları. **A.** Genel petri görünümü, **B.** Bakteri kolonilerinin yakından görünümü.



Şekil 3.19. (+) Kontrol - UV grubu *S. marcescens* mutasyon testi sonuçları.
A. Genel petri görünümü, B. Genel petri görünümü.

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

4.1. Total Vücut ve Organ Ağırlıkları

Toksisite denemelerinde; organ ağırlıkları ve rölatif organ ağırlıkları, organ toksisitesini değerlendirmede kullanılan önemli kriterlerdendir (Timbrell, 2000; Crissman et al., 2004). Deneme sonunda, Anatoxin-a' nın farklı dozları uygulanan farelerin final total vücut ağırlıkları, kontrole oranla ve başlangıç ağırlıklarına oranla herhangi değişiklik göstermemiştir. Yine tüm uygulama gruplarında bulunan fareler, iç organ ağırlıkları bakımından ve rölatif karaciğer ağırlığı bakımından da kontrole göre ve kendi aralarında herhangi bir önemli farklılık göstermemektedir.

Testis ağırlıklarının toplam vücut ağırlığından bağımsız olduğunu söyleyen araştırmacılar bulunmakla birlikte (Reddy ve ark., 2006) çalışmamızda kontrol ile karşılaştırıldığında, fare testis ağırlıklarında ve rölatif testis ağırlıklarında önemli bir değişim kaydedilmemiştir. Bununla birlikte 50 µg/ kg, 100 µg/ kg ve 150 µg/ kg anatoxin-a uygulanmış farelerin cauda epididimislerinde kontrole oranla bir azalma olduğu ancak yalnızca 100 µg/ kg ve 150 µg/ kg anatoxin-a uygulanan farelerin ağırlıklarında kontrole göre $p < 0.01$ seviyesinde önemli bir azalma bulunduğu belirlenmiştir. Seminifer tübüllerinin uzunluğu sertoli hücre sayısı ile ilişkili olup (Toppari, 1996) yüksek dozlarda gerek sertoli hücrelerinde gerekse diğer spermatogenetik hücrelerde ve tübül yapısında meydana gelen aşırı harabiyet ağırlık kaybına neden olarak gösterilebilir.

4.2. Kan Dokusu

Yaptığımız çalışmada uygulanan anatoxin-a maddesinin, kontrol grubuna göre diğer gruplardaki erkek farelerin kan biyokimyasal değerlerinde belirgin bir değişiklik meydana getirmediği sadece 150 µg/ kg anatoxin-a dozu uygulanan grupta glikoz düzeyinin $p < 0.05$ seviyesinde anlamlı olarak

azaldığı bulunmuştur. Küçük memeli hayvanların kan değerlerinin çeşitli faktörlere (ortam sıcaklığı, mevsimsel değişimler ve metabolik hız) bağlı olarak değişebileceği bildirilmiştir (Sealander, 1962). Ayrıca içme suyundaki nitrat – nitrit miktarının da kandaki glikoz miktarı üstüne etkili olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (Tsuchiya, 2004).

Anatoxin-a uygulanan farelerin serum total protein miktarında, kontrol grubu değerlerine göre istatistiksel açıdan önemli bir artış gözlenmemiştir. Serum total protein miktarına ilişkin bulgularımız, Selmanoğlu ve Akay (2001)' in sonuçlarıyla da paralellik göstermektedir. Araştırmacılar dimethoate uygulanan erkek sıçanların serum total protein miktarında kontrole göre önemli bir fark tespit edilmediğini bildirmişlerdir. Protein değerlerindeki azalmanın; hiperhidrasyon, renal veya intestinal fonksiyonların bozulmasından kaynaklanan albumin ve/veya protein kaybı, protein sentezinin bozulması, katabolizmanın artması ve yetersiz beslenme (Örn., besin alımında ksenobiyotik uygulamasına bağlı azalma) gibi birçok faktöre bağlı olabileceği bildirilmiş (Kaneko, 1989; Nguyen, 1989) olup araştırmamızda Anatoxin-a' nın bu gibi hasarlara sebep olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca albümin düzeyi; neoplazm, enfeksiyon ve travmada olduğu gibi artan yıkım ve damar içi fazla miktarda sıvı yüklenmesi olup olmadığı hakkında fikir veren bir parametredir (Kaplan, 1996). En yüksek dozlarda bile Albümin düzeyi önemli bir fark göstermemiştir.

ALT, AST ve Alkalin Fosfataz ise karaciğer harabiyetini gösteren testlerdendir (Duman ve Erden, 2004). Çalışmamızda bu değerler referans değerlerden çok yüksek olarak bulunmakla birlikte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamı değişimler olmadığından uygulamamızın karaciğere belirgin zarar vermediğini söyleyebiliriz.

4.3. Testis Dokusu

Mevcut çalışmada; Anatoxin-a' nın erkek fareler üzerindeki etkisinin araştırılmasında, rölatif organ ağırlıkları saptanan testisler ışık mikroskobu seviyesinde histopatolojik yönden incelenmiştir. Ksenobiyotiklerin testis üzerindeki etkilerini saptamada; organ ağırlığı ve histopatolojik inceleme metodlarının, serum hormon seviyeleri veya sperm inceleme metodlarından daha kolay ve daha etkili olduğu bildirilmiştir (Okazaki et al., 2001; Crissman et al., 2004).

Bu çalışma sonunda testislerde; tubuli seminiferi contorti' lere doz artışına bağlı olarak şekil bozukluğu, intersitisyumda yer yer bağ dokusu kalınlaşmaları, defektif tubul, spermatojenik hücre serilerinde dejenerasyon ve buna bağlı hücre kayıpları, bazal lamina ve intercellular ayrışma, piknotik nükleus, germ hücre kaybına rastlanmıştır. Trifluralin ve PCNB karışımı uygulanan albino farelerin testislerinde seminifer tübüllerde, mevcut araştırmada gözlenene benzer tarzda tübüler bozulma görüldüğü ve orta doz grubunda hasarın olduğu tübüllerde az sayıda sperme rastlanırken, yüksek doz grubu fare testislerindeki hasarlı seminifer tübüllerde hiç sperma olmadığı bildirilmiştir (Akay ve ark., 1988). 65 gün boyunca oral olarak Dimethoate uygulanan sıçanlarda, histolojik incelemeler sonucunda da, spermatogonial hücrelerde orta dereceli ve ciddi dejeneratif değişiklikler (primer ve sekonder spermatositlerde vakuolizasyon, seminifer tübüllerin çoğunda spermatid ve spermatozoa sayısında azalmayla birlikte spermatogenik hücre sırasında düzensizlik), ve spermatogenezin kısmen engellenmesiyle karakterize testis lezyonlarına sebep olduğu bildirilmiştir. Ayrıca intersititial dokuda ödeme bağlı genişleme ve kanlanma gözlenmiştir (Afifi et al., 1991). Mevcut araştırmanın histopatolojik bulguları daha önce yapılmış olan bu çalışma sonuçlarını desteklemektedir. Fakat bizim çalışmamızda kanlanma bulgusuna rastlanmamıştır ve mevcut çalışmada gözlenen seminifer tübül hasarı, Afifi et al., (1991) tarafından bildirilene benzemekle birlikte, bazı tübüllerde spermatogenik hücrelerin tamamen yok

olmasıyla karakterize olup, çok daha ciddi boyutlardadır. Bu farkın, mevcut çalışmada kullanılan farelerin Afifi et al., (1991) tarafından kullanılanlardan daha genç olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Gelişmekte olan, genç hayvanların ksenobiyotiklerin toksik etkilerine karşı daha hassas oldukları (Sjoberg et al., 1985; Saxena et al., 1990) ve seksüel gelişimin ergenlik öncesi dönemindeki herhangi bir ksenobiyotik maruzatının gonadlarda kalıcı hasarlara yol açabileceği (Sinha et al., 1997) bildirilmiş olup, söz konusu çalışmalar bu düşüncemizi destekler niteliktedir.

Hess ve Nakai (2000), Foley (2001) ve Creasy (2001) tarafından da toksik madde etkisiyle, bu çalışmada da gözlemlendiği gibi, germ hücrelerinin tübüler lümenine döküldüğü bildirilmiştir. Bu dökülmenin, kimyasalın sertoli hücrelerinin mikrotübülleri veya intermediat filamentleri üzerindeki etkilerinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Hess and Nakai, 2000).

Memelilerde sperm oluşumu spermatojenik hücre serilerinin faaliyetleri sonucu meydana gelmektedir. Kimyasallar nedeniyle bu hücre dizileri, kısmen veya tamamen dejenerasyona uğrayabilmektedir. Üreme sistemine etkili birçok kimyasal bilinmektedir. Sperm üretim süreci birçok basamakta gerçekleşmektedir. Bu süreçlere katılan hücre dizilerinden herhangi birisinde meydana gelecek bozulmalar tüm süreci etkileyebilmektedir. Sperm üretme kapasitesi seminifer tübüllerdeki Sertoli hücre sayısına bağlıdır (Orth ve ark., 1988) ve her bir sertoli hücresi sınırlı sayıda germ hücrelerini destekleyebilmektedir (Ruseel ve Peterson, 1984). Bu hücrelerin dejenere olması sperm sayısına doğrudan etki etmektedir. Gill ve ark'(1978) nın yaptığı bir çalışmada Dietilstilbestrol' e maruz kalan insanların sperm sayısının kalmayanlara göre belirgin bir düzeyde düştüğü görülmüştür (Toppari ve ark., 1996). Çalışmamızda yükselen dozlarda spermatojenik hücrelerdeki deformasyonların artmasıyla sperm sayısındaki azalmanın da arttığı görülmüştür. Fetal ve postnatal dönemde östrojenik kimyasallara maruziyet nedeniyle sertoli hücre sayısında azalma meydana gelen sıçanların yetişkin dönemde kontrol grubuna göre sperm sayısı ve

kalitesinde belirgin farklar olması (Toppari ve ark., 1996), ayrıca östrojenik etkiye sahip izoflavonca zengin yoncalarla beslenen koçlarda da sperm sayısının düşmesi (Price ve Fenwick, 1985; Kaldas ve Hughes, 1989) bulduğumuz sonuçları destekler tarzdadır.

4.4. Kromozomlar ve Mutajenik Etki

Kromozom aberasyonları, kromozom yapısında meydana gelen değişiklikler olup, genellikle genetik materyaldeki deformasyonları kapsarlar. Sitolojik olarak belirlenen zarar, kromozom kırılmaları ve bunun sonucu olarak kromozomların yeniden düzenlenmelerini içermektedir. Çoğu kimyasal klastojen, hücre döngüsünün S periyodunda DNA şablonunun zarar görmesi üzerine, DNA sentezi sonucu oluşan aberasyonlardan ötürü kromatid aberasyonlarını indüklemektedir (Bender et.al., 1988; Sorsa et.al., 1992). Bazı aberasyonlar tekrarlanan hücre bölünmelerinden ötürü aktarılabilirler ve hücre populasyonlarında bu yüzden sabit kalırlar. Delesyonlar, duplikasyonlar, inversiyonlar ve dengeli translokasyonlar hücre ya da organizma populasyonlarında aktarılabilen kromozomal aberasyonlardır. Asentrik fragmentler oluşturan kromozom kırıkları, disentrik kromozomlar, halka kromozomlar ve diğer çeşitli kromozomal düzenlemeler, genetik materyal kaybı sonucu hücre ölümü nedeniyle sabit kalmaz.

Mutasyon ve kanser arasındaki ilişki, özellikle zorunlu metabolik aktivasyon yetenekleri olan biyolojik sistemlerde, kimyasalların mutajenite ve karsinojeniteleri arasındaki korelasyonda olduğu gibi indirekt kanıttır. Gen mutasyonları, kromozom aberasyonları ve aneuploidinin hepsi de kanser gelişiminde rol oynayan olaylardır. Mutajenler ve kanserojenler, başlatıcı olarak karsinojenezise katılabilirler. Bunların rolü yalnız başlatmakla sınırlı değildir ve mutajenler, klastojenler ve aneujenler multiple genetik alterasyonların ilerlemesine de katılırlar. Promotor olarak karsinojenezise katılan diğer ajanların mutajen olmaları gerekmez.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından Anatoxin-a' nın genotoksik etkisine ilişkin yeterli derecede çalışmalar bulunmadığı bildirilmiştir. Bununla birlikte microcystinler gibi cyanobacterial toksinlerin genotoksik etkileriyle ilgili yapılmış araştırmalar bulunmaktadır (Colins et.al., 1981; Ding et.al., 1999). Bu araştırma sonunda microcystinlerin Ames testi ile kuvvetli mutajenik olduğu, comet testi ile DNA hasarı oluşturduğu ve kromozom hasarına sebep olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda *Serratia marcescens* mutasyon testi ile, uygulanan konsantrasyondaki artışa bağlı olarak kırmızı kolonilerin sayısında azalma ve beyaz kolonilerin sayısında ise artma gözlenmiştir. Kırmızı kolonilerin sayısındaki azalma tüm konsantrasyonlarda (25 µg/ L, 50 µg/ L, 100 µg/ L, 150 µg/ L ve 200 µg/ L) $p<0.01$ seviyesinde önemlilik göstermektedir. Bu sonuçların aksine beyaz kolonilerde konsantrasyona bağlı bir artma ile birlikte yalnızca 100 µg/ L, 150 µg/ L ve 200 µg/ L konsantrasyonlarda $p<0.01$ seviyesinde önemli bir artış tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda Anatoxin-a' nın konsantrasyona bağlı olarak *Serratia marcescens*' in üremesi üzerine bakterisidal bir etki oluşturduğu ve 100 µg/ L ve üzeri konsantrasyonlarda ise mutajenik olduğu saptanmıştır. Ayrıca uygulanan Anatoxin-a gruplarının yüksek konsantrasyonlarında kromozom yapışmasının ve kromatid ayrışmasının daha fazla olduğu belirlenmiş olup doza bağlı olarak etkilerde artış olduğu tespit edilmiştir. Bu aberasyonların yüksek bir oranda gözlenmesi dışarıdan ksenobiotik muamelesi olduğunun indirekt kanıtıdır ve Anatoxin-a' nın konsantrasyona bağlı olarak mutajenik ve klastojenik etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.

5. REFERANSLAR

- Adler, I.D.** 1984, Cytogenetic tests in mammals, in: S.Venitt, J.M. Parry (Eds.), *Mutagenicity Testing—A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, Washington, DC, pp. 275–306.
- Afifi, N.A., Ramadan, A., Abd-El-Aziz, M.I. and Saki, E.E.,** 1991, Influence of dimethoate on testicular and epididymal organs, testosterone plasma level and their tissue residues in rats, *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 98:419-423.
- Akay, M.T., Özmen, G., ve Elcüman, E.A.,** 1999, Effects of combinations of endosülfan, dimethoate and carbaryl on immune and hematological parameters of rats, *Vet Hum Toxicol*, 41(5): 296-299.
- Alkondon, M. and Albuquerque, E.X.,** 1995, Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. III. Agonist actions of the novel alkaloid epibatidine and analysis of II current. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 274(2), 771 – 782.
- Altuğ H.,** 2004 XIII. Deney Hayvanları Kursu Notları.
- Bender, MA.; Awa AA.; Brooks, AL.,** 1988 Current status of cytogenetik procedures to detect and quantify previous exposures to radiation. *Mutat. Res.* 196: 103-159.
- Bishop, J.M.,** 1978, Retroviruses. *Annu. Rev. Biochem.* 43: 35-88.
- Bold, H.C. and Wynne, M.J.** 1995 Intoduction to the Algae. <http://www.cyanosite.bio.purdue.edu/index.html>.
- Brock D.** 1998, Now you see it, now you don't! Making regulation of gene expression come alive for all students. *The American Biology Teacher.* 60:288–290.

- Bryant, D.A.**, 1994, *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- Carmichael WW** 1994, Toxins of Cyanobacteria, *Sci. American* 270:64-70.
- Chorus I and Bartram J** 1999, *Toxic Cyanobacteria in Water*, Taylor and Franchis Group on Behalf of WHO.
- Codd GA and Beattie K.A.** 1991, Cyanobacteria (blue green alga) and their toxins: awareness and action in the United Kingdom. *PHLS PHLS Microbiology Digest Supplement* 8:82-86.
- Codd GA, Morrison LF., and Metcalf JS.** 2005, Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology and Applied Phar.* 203 264 – 272.
- Codd GA, S.M.F.O. Azevedo, S.N. Bagchi, M.D. Burch, W.W. Carmichael, W.R. Harding, K. Kaya and H.C. Utkilen,** 2005, *A Global Network for Cyanobacterial Bloom and Toxin Risk Management*, IHP-VI Technical Documents in Hydrology No. 76 UNESCO, Paris.
- Colins MD., Gowans CS., Garro F., Estervig D., Swanson T.,** 1981, Temporal association between an algal bloom and mutagenicity in a water reservoir, in WW.Carmichael (Ed) *The Water Environment: Algal Toxins and Health*, Plenum, New York. pp: 271-279.
- Cooper, G.M.and Lane, M.A.,** 1984, Cellular Transforming Genes and Oncogenes *BBA.* 738-920.
- Crayton, M. A.** 1993. *Toxic Cyanobacteria Blooms: A Field/Laboratory Guide*. Office of Toxic Substances, Washington Department of Health, Olympia, WA.
- Creasy, D.M.,** 2001, Pathogenesis of male reproductive toxicity, *Toxicologic Pathology*, 29(1): 64-76.

- Crissman, J.W., Goodman, D.G., Hildebrandt, P.K., Maronpot, R.R., Prater, D.A., Riley, J.H., Seaman, W.J. and Thake, D.C.,** 2004, Best practice guideline: toxicologic histopathology, *Toxicologic Pathology*, 32:126-131.
- Çevre ve Orman Bakanlığı Yayınları,** 2006, Web Birimi, .
- Ding WX, Shen HM, Zhu HG, Lee BL, Ong CN.,** 1999, Genotoxicity of microcystic cyanobacteria extract of a water source in China. *Mutat Res.* Jun 25;442(2):69-77.
- Dube, S.N., Mazumder, P.K., Kumar, D., Rao, P.V.L. and Bhaskar, A.S.B.** 1996, Cardiorespiratory and neuromuscular effects of freshwater cyanophyte *Anabaena flos – aquae* in rats, *Def. Sci. J.*, 46 (3), 135- 141.
- Duman C., Erden Faruk B.,** 2004, Birinci Basamak Sağlık Hizmetlerine Yönelik Biyokimyasal Laboratuar Verilerinin Kısa Yorumu, *STED* cilt 13, sayı 7, 256.
- Duy T, Lam P.K.S., Shaw G.R. and Connell D.W.** 2000, Toxicology and Risk assessment of freshwater Cyanobacterial Toxins in Water.
- Ecobichon, D.J.,** 1996, Toxic Effects of Pesticides. In Casarett and Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons. International Edition McGraw-Hill Health Professions Divisions. New York.
- Edwards N.** 1999, Anatoxin The Chemical Laboratories School of Chemistry, Physics & Environmental Science University of Sussex at Brighton.
- Fawell JK, Mitchell RE, Hill RE and Everett DJ.,** 1999, The Toxicity of Cyanobacterial toxins in the mouse : II Anatoxin-a Human & Experimentantal Toxicology 18, 168 – 173.
- Fogg, G.E., Stewart, W.D.P., Fay, P. And Walsby, A.E.** 1973, The Blue-Green Algae, Academic Pressi London.

- Foley, G.L.**, 2001, Overview of male reproductive pathology, *Toxicologic Pathology*, 29(1):49-63.
- Francis AJ, Anderson D, Evans JG, Jenkinson PC and Godbert P**, 1990, Tumours and malformations in the adult offspring of cyclophosphamide-treated and control male rats- Preliminary Communication. *Mutation Research*. 229: 239-246.
- Gill WB, Schumacher GFB, Bibbo M.**, 1978, Genital and semen abnormalities in adults males two and one-half decades after *in utero* exposure to diethylstilbestrol. In: *Intrauterine Exposure to Diethylstilbestrol in the Human* (Herbst AL, ed). Chicago: American College of Obstetricians and Gynecologists.
- Güner H. and Aysel V.** 1999, *Tohumuz Bitkiler Sistematiği Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Ders Kitabı*.
- Hess, R.A., and Nakai, M.**, 2000, Histopathology of the male reproductive system induced by the fungicide benomyl, *Histol Histopathol*, 15: 207-224.
- Humm, H.J and Wick, S.R** 1980, *Introduction and Guide to The Marine Bluegreen Algae*, John Wiley and Sons, Brisbane.
- Kaldas RS, Hughes GL.** 1989, Reproductive and general metabolic effects of phytoestrogens in mammals. *Reprod Toxicol Rev* 3:81-89.
- Kamrin M.A.** 1988, *Toxicology*, Lewis Publishers.
- Kaneko, J.J.**, 1989, Serum proteins and the dysproteinemias. J.J. Kaneko (Ed.), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, Academic Press, San Diego, CA, 142-165 pp.
- Kaplan L. A., Pesce A.J.**, 1996, *Clinical Chemistry Theory, Analysis and Correlation* Third ed.

- Karabay N.Ü.** 2000, Bazı Sinerjistik Etkili İnsektisitlerin Memeli Sistemleri Üzründe Toksik Etkilerinin Araştırılması, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enst. Doktora Tezi.
- Keevil CW** 1991, Toxicological and Detection of cyanobacterial (blue green algal) toxins: In: Codd GA and Roberts C (eds) Public Health Aspect of Cyanobacteria (blue green algae). PHLS Microbiology Digest Supplement 8:91-95.
- Knudsen, I.; Hansen, E.V.; Meyer, O.A. and Poulsen, E.,** 1977, A proposed method for the simultaneous detection of germ cell mutations leading to foetal death (codominant lethality) and of malformations (male teratojenicity). *Mutat. Res.* 48, 267-270.
- Kofuji P, AracavaY, Swanson KL, AronstamRS, RapoportH and Albuquerque EX** 1990, Activation and blockade of the acetylcholine receptor- ion channel by the agonist agonist (+)- anatoxin-a, the N-methyl derivative and errant enantiomer. *J. Pharmacol Exp Ther* 252: 517- 525.
- Nguyen, H.T.,** 1989, Transport Proteins, W.F. Loeb and F.W. Quimby (Eds.), *The Clinical Chemistry of Laboratory Animals, Pergamon Press, New York, NY*, pp.176-200.
- Oishi S.,** 2002, Effects of propyl paraben on the male reproductive system. *Food Chem Toxicol* 40, 1807-1813.
- Okazaki, K., Okazaki, S., Nishimura, S., Nakamura, H., Kitamura, Y., Hatayama, K., Nakamura, A., Tsuda, T., Katsumata, T., Nishikawa, A., and Hirose, M.,** 2001, A repeated 28-day oral dose toxicity study of methoxychlor in rats, based on the enhanced OECD test guideline 407 for screening endocrine-disrupting chemicals. *Arch Toxicol*, 75:513-521.
- Orth JM, Gunsalus GL, Lamperti AA.,** 1988, Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* 122:787-794.

- Price KR, Fenwick GR.**, 1985, Naturally occurring oestrogens in foods--a review. *Food Add Contam* 2:73-106.
- Reddy P.S., Pushpalatha T., Reddy P.S.**, 2006, Reduction of spermatogenesis and steoidogenesi in mice after fentin and fenbutatin adminstration, *Toxicology Letters* Article in Press.
- Hunt R.D.**, 1966, Selected Histochemical and Histopathological Methods, Charles C. Thomas Publisher
- Ross KE.** (1994) Cyanophyta, Plant Physiology Information Website.
- Russell LD, Peterson RN.**, 1984, Determination of the elongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. *J Reprod Fertil* 70:635-641.
- Saxena, D.K., Murthy, R.C., Lal, B., Srivastava, S., and Chandra, S.V.**, 1990, Effect of hexavalent chromium on testicular maturation in the rat, *Reprod Toxicol*, 4:223-228.
- Schenectady County Community College.** (no date) *Serratia marcescens*. Retrieved August 10, 2001, from the Schenectady County Community College Web site: www.sunysccc.edu/academic/mst/microbes/23smarc.htm.
- Selmanoğlu, G., and Akay M.T.**, 2001, Biochemical study of the combined effects of endosulfan, dimethoate and carbaryl on albino rats, *Pesticides*, 16:77-84.
- Sealander JA**, 1962, Seasonal Changes in Blood Values of Deer Mice and Other Small Mammals, *Ecology* JSTOR P:107 – 119 .
- Shapiro, J.A.**, 1983, Mobile Genetic Elements, Academic Press, London. Retroviruses: by H.E. Varmus. pp 411-503.
- Sinha, N., Narayan, R., and Saxena, D.K.**, 1997, Effect of endosulfan on the testis of growing rats, *Bull Environ Contam Toxicol*, 58:79-86.

- Sjoberg, P., Bondesson, U., Kjellen, L., Lindquist, N.G., Montin, G., and Ploen, L.**, 1985, Kinetics of di-(2- ethylhexyl) phthalate in immature and mature rats and its effect on testis, *Acta Pharmacol Toxicol*, 56:30-37.
- Snedecor GW, Cochran WG**, 1968, Statistical Methods, IOWA State University Press, IO, pp 104-105.
- Sorsa, M.; Wilbourn, J.; Vainio, H.**, 1992, Human cytogenetic damage as a predictor of cancer risk, in Vainio, H.; Magee, PN.; McGregor, DB.; McMichael, AJ (eds): Mechanisms of Carcinogenesis in Risk Identification. Lyons: International Agency for Research on Cancer, pp 543-554.
- Timbrell J.A.**, 2000, Biomarkers of organ toxicity, *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* 33 (51), 295-302.
- Toppari J., Larsen J. Chr., Christiansen P., Giwercman A., Grandjean P., Guillette Jr. L.J., Bernard J., Tina K. Je., Pierre J.**, 1996, Male Reproductive Health and Environmental Xenoestrogens, *Environ Health Perspect* 104(Suppl 4):741-803
- Tsuchiya Y., Watanabe A., Fujisuwa N., Kaneko T., Ishizi T., Fujimoto T., Nakamura K. and Yamamoto M.**, 2004, Effects of Desalted Deep Seawater on Hematologic and Blood Chemical Values in Mice, *Thoku J. Exp. Med.*, 203, 175 – 182.
- White J., Staples A., Blias P.**, 2005, Toxicology Dept. WCH, 2005 University of Illinois at Urbana-Champaign Library,
- Yang HJ, Lee SH, Jin Y, Choi JH, Han CH, Lee MH.**, 2005, Genotoxicity and toxicological effects of acrylamide on reproductive system in male rats. *J Vet Sci.*, 6(2):103-109.
- Whitton BA and Potts M**, 2000, The Ecology of Cyanobacteria, Kluwer Academic.

ÖZGEÇMİŞ

Muhammet Ali Karaaslan 02.07.1980 İstanbul Doğumludur. İlköğrenimini Ankara' da, orta öğrenimini İstanbul' da ve Lise ve Üniversite Eğitimini İzmir' de tamamlamıştır. Lisansüstü eğitimini Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yapmaktadır.