

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**BAZI BETA ADRENERJİK RESEPTÖR
ANTAGONİST ETKİLİ İLAÇLARIN DENİZ
KESTANESİ (*Paracentrotus lividus*) EMBRİYO
GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Muhammet Ali KARAASLAN

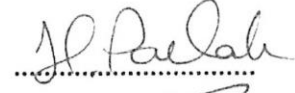
**Bornova-İZMİR
2013**

Muhammet Ali KARAASLAN tarafından Doktora tezi olarak sunulan "Bazı Beta adrenerjik reseptör antagonist etkili ilaçların Deniz Kestanesi (*Paracentrotus lividus*) embriyo gelişimi üzerine etkilerinin araştırılması" başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 8.07.2017 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

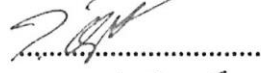
Jüri Başkanı: Prof. Dr. Hatice PARLAK



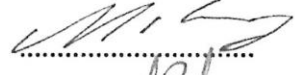
Raportör Üye : Doç. Dr. Selma KATALAY



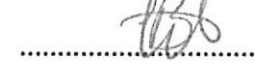
Üye: Prof. Dr. İsmet ÖZEL



Üye: Prof. Dr. Nispet KAYA



Üye: Prof. Dr. Belgin HOSSUCU



ÖZET**BAZI BETA ADRENERJİK RESEPTÖR ANTAGONİST ETKİLİ İLAÇLARIN DENİZ KESTANESİ (*Paracentrotus lividus*) EMBRİYO GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

KARAASLAN, Muhammet Ali

Doktora Tezi, Su Ürünleri Temel Bilimler Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Hatice Parlak

Temmuz 2013, 48 sayfa

Basit bir kimyasal formüle sahip olmakla birlikte su, ekosistemlerin vazgeçilmez ögesidir. Okyanuslar, denizler, akarsular ve diğer sucul sistemler tüm dünyaya yayılarak canlılar için yaşamı mümkün kılar. Uygarlıklar hep su kaynaklarına yakın yerlerde kurulmuş dolayısıyla kaynaklar sürekli olarak insan etkisine maruz bırakılmıştır. Su yenilenebilir bir kaynak olmakla birlikte yenilenme hızının çok üstünde kullanıma sahip olduğundan büyük tehlike altındadır. Çalışmamızda; sucul ekosistemin önemli bir ögesi olan ve erken gelişim evreleri çalışmalarında model organizma olarak kullanılan deniz kestanesi *Paracentrotus lividus* embriyo gelişimi üzerine atenolol, metaprolol, nadolol ve propranolol'ün etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla deniz kestanesi embriyolarına seçilen beta blokerler uygulanmış ve embriyotoksik, genotoksik ve sitotoksik etkiler incelenmiştir. Embriyotoksisite denemelerinden elde edilen EC₅₀ değerleri; Propranolol 0,232 mg/l; Metaprolol 9,32 mg/l, Atenolol 33,802 mg/l ve Nadolol 53,08 olarak bulunmuştur. Elde edilen tüm sonuçlara bakıldığında test edilen beta bloker etkili ilaçların deniz kestanesi embriyo gelişimi üzerine etkili olduğu ve bu etkinin, tüm embriyo, larva gelişimi ve hücrel toksisite düzeyinde kendini gösterdiği söylenebilir.

Anahtar Sözcükler: Beta bloker, farmasötikler, deniz Kestanesi, embriyotoksisite, genotoksisite

ABSTRACT**THE INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SOME BETA
ADRENERGIC RECEPTOR ANTAGONIST DRUGS ON
EMBRYONIC DEVELOPMENT OF SEA URCHIN
(*Paracentrotus lividus*)**

KARAASLAN, Muhammet Ali

PhD in Marine – Inland Water Sciences and Technology

Supervisor: Prof. Dr. Hatice Parlak

July 2013, 48 pages

Despite having a simple chemical formula water is indispensable element of ecosystems. Oceans, seas, rivers and the other aquatic systems are widely distributed on earth and makes the life possible for living organisms. As human civilization begins near the water resources anthropogenic effects have been creating stress on the aquatic systems continuously. Although water is renewable source reason by usage of above the renew rate it is under great danger. In our study the effects of Atenolol, propranolol, metoprolol and nadolol are being investigated by embryos of sea urchin *Paracentrotus lividus* which is one of the most important member of aquatic ecosystems. For this purpose we exposed sea urchin embryos to the selected beta blockers in order to find out embryotoxic, genotoxic and cytotoxic effects of them. According to our results the EC50 values are 0,232 mg/l for Propranolol; 9,32 mg/l for Metoprolol, 33,802 mg/l for Atenolol and 53,08mg/l for Nadolol. Considering all the results obtained from tested beta blockers we can concluded that beta blockers have effects on embryonal development of sea urchin and these effects can be seen on embryonal stages, larval development and cytotoxic level.

Key Words: Beta blockers, pharmaceuticals, sea urchin, embryotoxicity, genotoxicity

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimime başladığım ilk günden itibaren kendine yakışan güzellikte ve profesyonellikle bana danışmanlık yapan sayın Prof. Dr. Hatice Parlak hocama sonsuz sevgi ve saygılarımı sunuyorum. Teşekkür metinlerinde danışmana teşekkür etmek hiç şüphesiz bir gelenek halini almıştır. Bununla birlikte bu teşekkür metninin gelenekten veya zorunluluktan olmadığı iyi bilinmelidir. Bana sadece danışman değil ikinci bir anne olan güzel insan sevgili hocama gerçekten çok teşekkür ediyorum ve bu tezi okuyan herkes bilmelidir ki; akademik hayatımda elde ettiğim ve bundan sonra kazanacağım herşey kendisinin eseridir. Tüm duam ve arzum yaptığım işlerin hocamın yüzünü ağartacak ve onu mutlu edecek işler olmasıdır. Hakkını asla ödeyemeyeceğim hocama ömür boyu minnettar olacağım.

Çalışmalarım boyunca bana her türlü desteği veren, bizzat çalışan ve emek harcayan sevgili ablalarım Doç.Dr. Özlem Çakal Arslan' a ve Dr. Meltem Boyacıoğlu'na özel olarak teşekkür etmek isterim. Onların varlıkları bana her zaman güven vermiştir. Umarım benim varlığım da onlara hüznün değil mutluluk getirmiştir. Laboratuvar çalışmalarına katılan ve destek veren Yüksek Mühendis Gülçin Gündüz Ve Yüksek Biyolog Ahmet Dönmez'e teşekkürlerimi sunuyorum. Ayrıca doktora süresi boyunca beraber çalıştığım Sayın Doç.Dr. A. Kerem Bakır, Dr. Ertan Dağlı ve Dr. E. Çağrı Taş başta olmak üzere E.Ü Su Ürünleri Fakültesinin tüm idari ve akademik çalışanlarına ve Egeboyut Fotokopi sahibi sayın Celal Şenocak' a çok teşekkür ediyorum.

Tüm hayatım boyunca desteğini gördüğüm eğitim sevdalısı sevgili annem Beyaz Karaaslan ve gerçek bir lider ve aile babası olan sevgili babam Abdurrahman Karaaslan' a özel olarak teşekkür ediyorum. Ablalarım Mehtap Karaaslan, Hicran Kapucu ve Songül Aksu' ya hayatımda oldukları için çok teşekkür ediyor sevgilerimi sunuyorum. Ayrıca ailemizin genç üyeleri sevgili Ferhat Kapucu, Sonay Aksu, Emir Ali Aksu ve Asya Kapucu' ya hayatıma kattıkları renkten dolayı çok teşekkür ediyorum. Bu tatlı çocukların sevgili babaları Yasin Kapucu ve Aydın Aksu'ya da desteklerinden dolayı sevgilerimi sunuyorum. Canım kardeşim Veysel Karaaslan ve sevgili eşi kardeşim Didem Karaaslan'a da hayatıma kattıkları ve katacakları güzelliklerden dolayı çok teşekkür ediyor sevgilerimi sunuyorum.

Beni tanıyan herkesin çok iyi bildiği gibi sadece bu tez ve akademik yaşamımın değil tüm hayatımın anlamı olan, doğdukları ilk günden itibaren yaşama karşı verdikleri mücadeleyle bana çok şey katan, yaşama sevincim herşeyim sevgili ikizlerim Abdurrahman Can ve Beyza Karaaslan sizleri çok seviyorum inşallah babanızla hep gurur duyarsınız. Hayatımın son 10 yılına damgasını vurmuş desteğiyle umutsuz anlarımda ışık olan sevgili eşim Meryem Karaaslan teşekkürlerin en özeli senin için olsun.

Bu tez Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) Çevre, Atmosfer ve Yer ve Deniz Bilimleri Araştırma Destek Grubu 109Y176 kodlu projesi tarafından desteklenmiştir. Tez kapsamında gerçekleştirilen tüm denemeler Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Ekotoksikoloji Laboratuvarında yapılmıştır.

Projeye maddi olarak destek sağlayan ÇAYDAG (Çevre, Atmosfer ve Yer ve Deniz Bilimleri Araştırma Destek Grubuna teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER**Sayfa**

ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1.GİRİŞ	1
2.MATERYAL VE METOT	14
2.1.Deniz Kestanesi (<i>Paracentrotus lividus</i>)'nin Biyolojik Özellikleri	14
2.1.1.Döllenme.....	15
2.1.2.Segmentasyon	17
2.1.3.Gastrulasyon	18
2.1.4.Organogenez	18
2.2.Biyodeneylelerin Yapılışı	19
2.2.1.Hazırlık aşaması.....	19
2.2.2.Stokların ve test konsantrasyonlarının hazırlanması	20
2.3.Biyodeneylemeler	21
2.3.1.Embriyo denemeleri.....	22
2.3.2.Spermiyotoksisite	23
2.3.3.Fertilizasyon başarısı	24
2.3.4.Genotoksisite	24
3.BULGULAR	26
3.1.Embriyotoksisite Sonuçları.....	26
3.1.1.Atenolol uygulamaları bulguları.....	26

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.1.2.Propranolol uygulamaları bulguları	27
3.1.3.Metoprolol uygulamaları bulgular	27
3.1.4.Nodolol uygulamaları bulgular	28
3.2.Fertilizasyon Başarısı	29
3.3.Sitotoksiteden Elde Edilen Bulgular	30
4.SONUÇ VE TARTIŞMA	35
KAYNAKLAR DİZİNİ	39
ÖZGEÇMİŞ	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Atenolol ilacına ait örnek kodlama sistemi	7
2.1. Paracentratus lividus'da döllenme ve döllenme zarının oluşumu.	16
2.2. Döllenmiş P. lividus yumurtası	17
2.3. Segmentasyon evreleri.....	17
2.4. Gastrula safhası.....	18
2.5. Prizma safhası.....	18
2.6. Pluteus larvası.....	19
2.7. Paracentrotus lividus türüne ait dişi ve erkek gonadlar.	21
2.8. P. lividus sperm ve yumurta taşıyan gonadlar.	21
2.9. Döllenmiş ve döllenmemiş yumurtalar. Döllenen yumurtaların.	22
2.10. Normal Pluteus	23
2.11. Patolojik Pluteus	23
3.1. Atenolol için embriyotoksosite sonuçları.	26
3.2. Atenolol uygulanan deniz kestanesi embriyotoksosite denemesindeki normal birey sayısı.....	26
3.3. Propranolol için embriyotoksosite sonuçları.	27
3.4. Propranolol uygulanan deniz kestanesi embriyotoksosite denemesindeki normal birey sayısı.....	27
3.5. Metoprolol için embriyotoksosite sonuçları	28
3.6. Metoprolol uygulanan deniz kestanesi embriyotoksosite denemesindeki normal birey sayısı.....	28
3.7. Nadolol uygulanan deniz kestanelerinde embriyotoksosite sonuçları.....	29
3.8. Beta bloker etkili ilaç uygulanan deniz kestanesi embriyo hücrelerinde görülen sitogenetik bozukluklar.	30

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. ATC sınıflandırmasında ilaçların 14 ana grubu.....	7
2.1. Embriyotoksisite çalışmalarında uygulanan test konsantrasyonları.	20
2.2. Fertilizasyon başarısı ve Sitotoksisite çalışmalarında uygulanan test konsantrasyonları.	20
2.3. Genotoksik etkilerin değerlendirilmesinde kullanılan sayısal ve morfolojik ölçütler	25
3.1. Atenolol, için elde edilen genotoksisite sonuçları.	31
3.2. Propranolol, için elde edilen genotoksisite sonuçları.....	32
3.3. Metaprolol için elde edilen genotoksisite sonuçları.....	33
3.4. Nadolol için elde edilen genotoksisite sonuçları.....	34

1. GİRİŞ

Dünya; üzerinde yaşam olduğu kesin olarak bilinen, yaklaşık 510 milyon km²'lik yüzölçümü, çeşitli gazların karışımından oluşan atmosferi ve yaşamın temel kaynağı sucul ortamları olan bir gezegendir. Güneş sisteminde büyüklük bakımından 5. sırada bulunan Yerküre; atmosfer (hava küre), litosfer (yer kabuğu), pirosfer (ateş küre), barisfer (çekirdek) ve hidrosfer olmak üzere 5 tabakadan oluşmaktadır. Bu tabakalardan Hidrosfer yerkürenin büyük çoğunluğunu kaplayan (yaklaşık % 71' i) su tabakasıdır.

Basit bir kimyasal formüle sahip olmakla birlikte su, ekosistemlerin vazgeçilmez ögesidir. Yüksek ısı kapasitesi, deniz ve göllerde sıcaklık tabakalarının oluşumunu sağlayarak buralarda yaşayan canlılar için uygun ortamları yaratırken viskozitesinin yüksek olması 50 m' den uzun olan ağaçların bile uç kısımlarına kadar suyun bir sütun halinde durmasına olanak sağlamaktadır. Suyun bu eşsiz fizikokimyasal özelliklerinin yanı sıra canlı metabolizmasında üstlendiği çok önemli işlevler vardır. Enzimlerin çalışmasında, protein sentezinde hücre içi taşımada su doğrudan veya dolaylı olarak iş görmektedir. Okyanuslar, denizler, akarsular ve diğer sucul sistemler tüm dünyaya yayılmış ve canlılığın oluşmasında ve çeşitlenmesinde büyük rol üstlenmiştir. Uygarlıklar hep su kaynaklarına yakın yerlerde kurulmuş dolayısıyla kaynaklar sürekli olarak insan etkisine maruz bırakılmıştır. Yeryüzünde yaklaşık 1,35 milyon km³ su bulunmaktadır. Bu oldukça büyük miktarda suyun çoğunluğu okyanuslarda bulunur ve tuzluluğu fazladır. Tatlı su kaynakları ise toplam su kütesinin ancak %3' ü kadardır ve bu tatlı suyun da büyük kısmı buzullarda kullanılamaz durumdadır. Bir başka deyişle kullanabileceğimiz toplam tatlı su oldukça azdır. Sucul sistemler, hem gıda kaynağı olarak hem de atıkların giderilmesi için kullanılabilen çok büyük ve geniş sistemler olarak görülmüştür. Su yenilenebilir bir kaynak olmakla birlikte yenilenme hızının çok üstünde kullanıma sahip olduğundan büyük tehlike altındadır.

Suyun yenilenme hızından fazla tüketilmesi sadece nüfustaki aşırı artışla açıklanamaz. İnsan yaşam kalitesinin artırılması, gelişen teknoloji ve tüketim

eğilimlerimiz tüm ekosistemler üzerinde olduğu gibi sucul sistemler üzerinde de baskı oluşturmaktadır. Son yüzyılda ekosistemler daha önce hiç var olmayan tipte ve sayıda kirleticiye maruz kalmıştır. Yeni sentezlenen karmaşık yapılu birçok bileşik ortamda bulunan canlılar tarafından metabolize edilememiş bunlardan biyobirikim eğilimine sahip olanlar besin zinciri boyunca biriktirilerek iletilmiştir. Parçalanması uzun süren yeni maddelere plastik iyi bir örnektir. Plastik gibi birçok sentetik madde uzun yıllar boyunca doğada bozulmadan kalabilmektedir. Kullanımlarının artmasıyla bu tip maddelerin çevredeki miktarları da artmıştır. Bununla birlikte su kaynakları uzun yıllar boyunca işlevini yerine getirebilmiş ve sucul ortamların kirliliği bir sorun olarak görülmemiştir. Bunun temel nedeni 1850'li yıllara kadar endüstrinin gelişmemesi ve dünya nüfusunun 1 milyarın altında kalmasıdır (BM, 1999). Endüstri devrimi olarak bilinen başlıca kültürel değişiklik İngiltere'de 1700'lü yılların ortalarında başlamış ve Amerika'ya 1800'lerde yayılmıştır. Bu devrimden sonra dünya ile olan ilişkilerimiz tarım devriminden daha çok artmıştır (Miller, 1991). Enerji ve diğer kaynakların ortalama kullanımı oldukça artmış olduğundan endüstriyel toplumlar diğer toplumlara göre dünyanın görünüşünü daha fazla değiştirmişlerdir.

Endüstri devrimi İngiltere'de ormanların yakıt ve barınak yapımı için aşırı kullanımı sonucu görülen Kesin Kaynak azlığı (Absolute Source Scarcity)'na bir tepki olarak ortaya çıkmıştır (Miller, 1991). Farklı enerji kaynaklarının kullanımı yeni makinelerin keşfini beraberinde getirmiştir. Kömüre dayalı buharlı makineler, petrol ürünleri ile işleyen büyük aletler ve nükleer enerji kullanan makineler birbirini takip eden teknolojilerdir. Böylece endüstri devrimi insanların başlıca kaynak olarak yenilenebilen odun, akarsu gibi kaynakları kullanımından yenilenemeyen ve çevreye daha zararlı olan fosil yakıtlara (önce kömür daha sonra petrol ve doğal gaz) yönelişinin simgesi olmuştur (Miller, 1991). Artan tarımsal üretim ve fabrikaların şehirlerde kurulması çiftçilerin şehirlere taşınmasına olanak sağlamıştır. Daha iyi gelir ve daha güvenilir besin stoklarının artışı insan nüfusunun eksponansiyel büyümesine neden olmuştur. Dünya nüfusu özellikle 1900'lü yıllarda büyük artışlar göstermiş ortalama insan ömrü 46 iken günümüzde 67'lere kadar ulaşmıştır (Yaukey et al., 2001). Yapılan çalışmalara göre; önümüzdeki 40 yılda 9 milyarı aşkın insan dünyada yaşamaya devam edecektir. Ülkemiz açısından bakıldığında 74 milyon olan nüfusumuzun 2050

yılında 90 milyonu geçeceği tahmin edilmektedir (TUİK, 2012). Nüfus artışının yanı sıra yaşam kalitesinin yükseltilmesi çalışmaları, bilimsel ve teknolojik ilerlemeler sayesinde başarıya ulaşmıştır. Bu artışın başlıca sebeplerinden birisinin, insanların hastalıkları kontrol edebilme ve ilaç geliştirip yaygın olarak kullanma konusunda yaptığı çalışmalar olduğu söylenebilir.

İnsanların yaşam kalitesinin artmasında hiç şüphesiz son 50 yılda büyük ilerleme gösteren teknolojik gelişmeler büyük rol üstlenmiştir. Bununla birlikte nüfus ve ortalama insan ömrünün artmasının arkasında temel olarak sağlık ve gıda alanındaki gelişmelerin olduğu söylenebilir. İlk kez 1928 yılında Fleming tarafından penisilinin tedavi edici özelliği bulunana kadar insanlar basit enfeksiyonlar nedeniyle hayatlarını kaybetmekteydiler. Günümüzde ölümcül bir sorun olmaktan çıkan diyare 1900'lü yılların başında Amerika Birleşik Devletlerinde ölüm nedenlerinin başında gelmekteydi (Anonim, 2012a). Kalp damar sistemi hastalıkları günümüzde halen ölümcül nitelikte olmakla birlikte artık birçok hastalıkta olduğu gibi bu hastalıkların da belirtileri ilaçlarla hafifletilmekte veya tamamen ortadan kaldırılabilir.

Karasal ortamda yürütülen tarım ve hayvancılık faaliyetlerinin yanı sıra denizlerde de balıkçılık faaliyetleri sürdürülmektedir. Yapılan tahminlere göre gelecek 3 yıl içerisinde su ürünleri çiftlikleri toplam su ürünleri tüketiminin % 39'unu sağlayacaktır (Doughton and Brooks, 2011). Su ürünleri yetiştiriciliğinde, canlı sayısının fazla olması, canlıların müdahale maruz kalması ve diğer etkenler organizmaları hassas hale getirmekte ilaç kullanımını zorunlu kılmaktadır. Çiftliklerde sucul canlıların sağlıklı olabilmesi ve verim artışı için çok sayıda ve çeşitte ilaç uzun yıllar boyunca kullanılmıştır. Örneğin; Danimarka' da çiftliklerde yıllık 200 ton antibiyotik kullanılması dikkate alınması gereken önemli bir olaydır (Wollenberger et al., 2000). Sadece ABD'de su kültürü çiftliklerinde yılda yaklaşık olarak 92,500 – 196,400 kg antibakteriyel ilaç kullanıldığı tahmin edilmektedir (Boxall, 2004). İrlanda' da yapılan bir araştırmaya göre bu ülkede 2009 yılında 900 ton antibiyotik veterinerlik hizmetlerinde kullanılmıştır (Beechinor, 2011). Marmara denizinde yapılan bir araştırmaya göre sedimentte bulunan antibiyotik konsantrasyonları µg/l seviyelerine ulaşmıştır (Okay, 2012). Özellikle antibiyotiklerin doğrudan sucul ortama eklenmesi hedef olmayan

organizmalar üzerinde hem subletal hem de öldürücü etkiler oluşmasına yol açmaktadır.

İnsanlar da dahil olmak üzere yeryüzünde yaşayan canlıların büyük çoğunluğu çok sayıda ve çeşitte kimyasala her geçen gün artan miktarlarda maruz kalmaktadır. İlaç ve ilaç etken maddeleri ise bilinen diğer kimyasallardan farklı özelliktedir. Klasik çevresel risk değerlendirme bakış açısıyla kimyasalın çevresel konsantrasyonunun miktarı ve ilgili kimyasalın çevrede parçalanma gibi özellikleri önemlidir. Farmasötiklerin çevresel konsantrasyonları litrede mikrogram seviyesinde bulunurken çevre üzerinde yıkıcı etkileri bilinen kadmiyumun düzeyi litrede miligram olarak belirlenmiştir. Birçok ilaç ve ilaç etken maddesi su dışındaki abiyotik etmenler nedeniyle kısa yarılanma ömrünü sahiptirler (Andreozzi et al., 2003). Bu iki durum yani düşük konsantrasyon ve yarılanma ömrünün az olması çevre sağlığı açısından farmasötiklerin gözden kaçmalarına neden olmuştur. Ayrıca ilaçlar piyasaya sürülmeden önce laboratuvar çalışmaları ile memeli sistemler üzerindeki zehirlilik etkileri kanuni bir zorunluluk olarak belirlenmektedir. Bu durum ilaçların bir tehdit olarak algılanmasını uzun yıllar boyunca engellemiştir. Dolayısıyla kadmiyum ve cıva gibi ağır metaller ya da her gün bir yenisinin üretildiği sentetik maddeler çevre sağlığı yönünden detaylı olarak incelenirken ilaçlar bilim insanlarının gündemine gelmemiştir. Teknolojik ve bilimsel gelişmelerle birlikte çevrede var olan maddelerin oldukça düşük konsantrasyonları belirlenmeye başlanmış ve farmasötiklerin sucul kaynaklardaki varlıkları 1980’li yılların ilk yarısında ortaya konmuştur (Andreozzi et al., 2003). Farmasötik etkili maddelerin sucul ortamlardaki konsantrasyonları belirlenirken büyük çoğunlukla kromatografik yöntemlerden HPLC tekniği kullanılmakla birlikte örnek hazırlanması ve analitik süreçler farklılıklar içermektedir. Yapılan analitik çalışmalarda farmasötiklere veya parçalanma ürünlerine; musluk sularında, yeraltı sularında, yüzey sularında ve diğer sucul sistemlerde litrede mikrogram düzeyinde rastlanılmıştır (Ternes, 1998; Bound and Voulvoulis, 2004; Kot – Wasik et al., 2006; Bartelt-Hunt et al., 2009).

Farmasötikler hedef organizmada belirli fizyolojik değişiklikler oluşturmak üzere tasarlanmakla birlikte çevreye yayılmalarıyla birlikte hedef olmayan canlı veya sistemlerde de etkilere neden olabilmektedir (Doughton and Ternes, 1999; Jorgensen, 2000; Kümmerer, 2009). İlaç ve ilaç etken maddelerinin

hedef organizmadaki etkilerinin çok iyi araştırıldığı kabul edilse dahi doğada hedef olmayan canlılar üzerindeki olası yıkıcı etkileri hakkında bilgimiz yok denecek kadar azdır. Tüm dünyada oldukça sık görülen meme kanserinin tedavisinde kullanılan tamoksifen adlı ilacın balıklarda endokrin tahrip edici etkisi hedef olmayan organizmada ilaçların tasarlanma amacından farklı etkiler oluşturabileceğini göstermektedir (Sun et al., 2007).

Doğada kimyasal maddeler ile biyolojik sistemler sürekli bir ilişki içerisinde. Bu ilişkilerin önemli bir kısmı kimyasalın biyolojik sistemde ilgili reseptörlerle çeşitli bağlar kurmasıyla (kovalent bağlar, iyonik bağlar, vander walls bağları v.b) meydana gelmektedir. Bu bağları kuracak maddelerin belirli bir hastalıktan korunmaya veya hastalığı iyileştirilmek üzere tasarlanmasıyla ilaç dediğimiz bileşikler oluşur. İlaç terimi dilimizde birbirine yakın farklı anlamlarda kullanılmaktadır. Genel olarak; biyolojik sistemde etki oluşturan maddeler ilaç olarak tanımlanmaktadır (Bökesoy ve diğ., 2000). Doktorlar ve halk, hastalıkların tanısı veya iyileştirilmesi için kullanılan kimyasalı ilaç olarak tanımlarken bu amaçla hazırlanan ve bileşimlerinde belirli miktarda etken madde içeren şekiller de ilaç olarak isimlendirilmektedir. En geniş anlamıyla; tanı, uygulama (tedavi edici/Hastalığın etkilerini azaltıcı), düzenleyici veya hastalıklardan koruyucu veya yapı ve işlevin bozulmamasını sağlayan kimyasallara farmasötikler denir (Dougton ve Ternes, 1999). Farmasötik Etkili Madde terimi ise, hem tedavi edici özellikte olan hem de diğer amaçlar için (büyümeye yardımcı maddeler, önleyici olanlar) kullanılan tüm maddeleri kapsar (Jones et al., 2007).

İlaçların sentezi ve farmasötik etkili maddelerin etki mekanizmaları farmakoloji bilim dalının araştırma konusudur. Farmakoloji her ne kadar 19. yy' da ilk kez ortaya çıkmış olsa da insanların tedavi edici maddeleri kullanmaları çok daha eskilere dayanmaktadır. Sümerlerin günümüzden yaklaşık 4000 yıl önce güherçe (potasyum nitrat) ve tuz (sodyum klorür) minerallerini, çeşitli bitki tohumlarını ve süt gibi hayvansal sıvıları tedavi amacıyla kullandıkları görülmektedir (Kramer, 1957). Bulunan tabletler incelendiğinde bitkilerden öz eldesi için kaynatma, süzme gibi işlemlerin uygulandığı, çeşitli karışımlardan merhem yapılarak kullanıldığı anlaşılmaktadır.

Günümüzde ilaç endüstrisi, ileri teknoloji ve bilimsel bilgi birikimiyle çok çeşitli ilaçları 10 - 15 yıl gibi bir sürede piyasaya sunabilmektedir (IFPMA, 2011). Farmasötik teknoloji alanında büyük gelişmeler kaydedilmesiyle hedeflenen dokuya özgü etki gösteren veya mideye ulaştıktan sonra bozulmadan bağırsaklardan emilimi gerçekleşen ilaçlar üretilmiştir.

Canlılara biyolojik olarak aktif olan maddeler doğrudan uygulanmamaktadır. İlgili etken maddenin çeşitli yardımcı maddelerle karıştırılarak, organizmaya alınımı, metabolik süreçlerde etkinliğini yitirmemesi ve hedef organ veya dokuda istenilen etkiyi göstermesi sağlanmaktadır. Ayrıca bu tip yardımcı maddeler ilacın tadı ve kokusunu da iyileştirebilmektedir. Etken madde ve yardımcı maddelerin karıştırılmasıyla çeşitli şekillerdeki ilaçlar meydana gelmektedir. Farmasötik etkilerine göre ilaçları aşağıdaki şekilde sınıflandırmak mümkündür.

- Katı ilaç şekilleri
- Sıvı ilaç şekilleri
- İki fazlı sistemler
- Yarı katı ilaç şekilleri
- Aeroseller
- Parenteral preparatlar
- Radyofarmasötikler
- Kontrollü salınım sistemleri
- Diğer preparatlar (göz, kulak ve burun preparatları)
- Pansuman ve cerrahi malzemeler

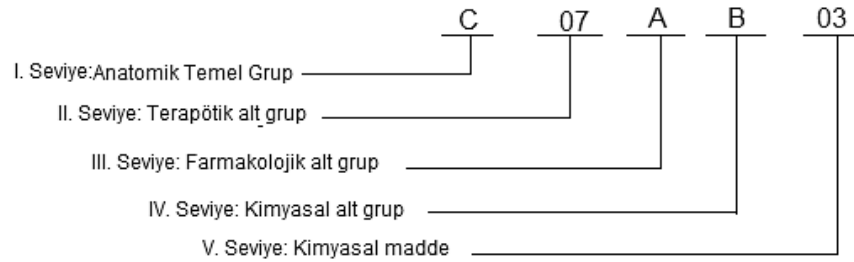
İlaçların isimlendirilmesinde farklı yollar vardır. Genel isimlendirme, ticari isimlendirme veya kimyasal isimlendirme yapılabilir. Farmasötik şekilleri dışında ilaçları, etki mekanizmalarına veya etki ettiği sisteme göre sınıflandırmak mümkündür. İlaç sınıflandırılmasında günümüzde uluslararası bir standart olan ATC (Anatomical Therapeutic Chemical) sınıflandırma sistemi DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından kullanılmaktadır. ATC sisteminde ilaçlar etki ettikleri organ veya sisteme göre farklı gruplara ayrılmaktadır. Bu ana grupların altında ise terapötik, farmakolojik ve kimyasal özelliklerine göre alt gruplara sınıflandırılmaktadır (World Health Organisation, 2009). Bu sınıflandırma

sistemi 5 farklı seviyede yapılmaktadır. İlk seviye kod 14 ana gruptan oluşmaktadır (Çizelge 1-1).

Çizelge 1.1. ATC sınıflandırmasında ilaçların 14 ana grubu

A	Sindirim sistemi ve metabolizma
B	Kan ve kan yapıcı organlar
C	Kardiyovasküler sistem
D	Dermatolojikler
G	Ürogenital sistem ve cinsiyet hormonları
H	Sistemik hormonal preparatlar, cinsiyet ve hormonları ve insülin hariç
J	Sistemik kullanımlar için antienfektifler
L	Antineoplastikler ve bağışıklık sistemi düzenleyicileri
M	Kas iskelet sistemi
N	Sinir sistemi
P	Parazit önleyiciler, insektisit ve haşere kovucular
R	Solunum sistemi
S	Duyu organları
V	Diğer organ veya sistemler

Daha sonra gelen 2, 3 ve 4. Seviyelerde ilacın farmakolojik, terapötik ve kimyasal özelliklerini ifade eden kodlamalar yapılırken 5. Seviye kod kimyasal maddenin kendisine karşılık gelmektedir (Şekil 1-1). Anatomik temel grupta isimlendirme ilgili sistemin veya organın İngilizce karşılığına gelen ilk harfe göre verilmektedir.



Şekil 1.1. Atenolol ilacına ait örnek kodlama sistemi

İlk keşfedilen beta bloker etkili hipertansiyon ilacı olan Atenolol'ün ATC sınıflandırması aşağıda belirtildiği gibidir.

I. Seviye: Kardiyovasküler sistem ilaçları (C; Cardiovascular system)

II. Seviye: Beta reseptörleri bloke edici etki (Terapötik etki)

III. Seviye: Beta bloke edici ilaçlar (Farmakolojik alt grup)

IV. Seviye: Seçici Beta bloker (kimyasal grup)

V. Seviye: Atenolol (kimyasalın adı)

İlaçlar organizma tarafından alındıktan sonra çeşitli şekillerde etkisini gösterebilir. Oluşan etkiler sistem, organ, doku düzeyinde incelenebileceği gibi hücre veya hücrealtı seviyelerde de incelenebilir. İlaçlar farklı etki mekanizmalarına sahip olmakla birlikte çoğunlukla reseptörlerle etkileşim kurarak fizyolojik yanıt oluştururlar.

Hücresinin çevresiyle uyum içinde olması dış ortamla ya da diğer hücrelerle haberleşmesine bağlıdır. Hücre haberleşmesi birbirine yakın hücreler arasında olabileceği gibi birbirinden uzak hücreler arasında da olabilir. Hücre haberleşmesi; sinyalin alınmasıyla başlayan sonra sinyalin hedefe ulaştırılması ve son olarak cevabın oluşturulmasıyla sonlanan karmaşık süreçleri kapsamaktadır. Tek hücreli canlılardan gelişmiş karmaşık organizmalara kadar tüm canlı hücreler farklı şekillerde bu süreçleri gerçekleştirmektedir. Yüksek yapıları organizmalarda bulunan milyonlarca hücre çevrelerinden sadece kendilerine gönderilen sinyalleri almakta ve bu işi hemen hemen sıfır hata ile başarmaktadırlar. Sinyalin sadece ilgili hücre tarafından tanınıp diğer hücrelerce algılanmamasının temelinde reseptörler iş görmektedir (Campbell and Reece, 2006). Birçok sinyal molekülünün ilgili reseptöre bağlanması, hücrelerin ve organizmanın hayatta kalması ve hayatını sürdürmesi için bir seri reaksiyonu başlatır (Cooper and Hausman, 2006). Reseptörler, hücre üzerinde veya içerisinde oluşturulmuş özel bölgelerdir. Bu özel bölgeye sadece kimyasal şekli uyan özel sinyal molekülü bağlanabilir. Reseptör kelimesinin anlamı araştırıldığında çeşitli bilim dallarında farklı anlamları olduğu görülmektedir. Biyolojik açıdan reseptör; hücre içinde ya da üzerinde hormon, ilaç, virüs veya benzerlerinin özel olarak bağlandığı ve bazı hallerde özel bir hücre cevabının verilmesine yol açan veya bunların hücreye

girmesini sağlayan, protein, glikoprotein ya da oligosakkaritlerden oluşan yer veya yapı olarak tanımlanabilir (TDK, 2008). Sinyal ile reseptör arasındaki uygunluk tıpkı enzimle substratı arasındaki anahtar – kilit uyumu gibidir. Burada reseptöre bağlanan kimyasala ligand adı verilmektedir. Ligand, reseptörlere bağlanan hücre dışı bileşiklerdir ve basit gazlardan karmaşık yapılı proteinlere kadar uzanan çeşitli yapılarda bulunabilirler (Campbell ve Reece, 2006). Ligand ile reseptör bağlanması kimyasal denge kanunlarına göre gerçekleşmektedir. Eđer ligandı bir anahtara benzetecek olursak reseptör anahtarın gireceği kilittir. Bir bileşik reseptörün doğal ligandıyla (hormon veya nörotransmitter gibi) aynı yapıya sahipse kilidin içine girecek ve tıpkı anahtar gibi iř gōrebilecektir. Bir başka ifadeyle bileşik doğal maddenin yerine alarak aynı fizyolojik cevabın oluşmasını sağlayacaktır. Bu tūrden reaksiyonlar agonist etki olarak tanımlanmaktadır. Bu etki mekanizmasına göre iř gōren ilaçlar (insūlin, dopamin, morfin v.b) agonist etkili ilaçlar olarak tanımlanırlar. Reseptörün doğal ligandına benzeyen ve reseptöre bağlanan ligand fizyolojik cevap oluşturmaz ise antagonist etkiye neden olur. Antagonist etkili bir molekūl reseptöre bağlandıktan sonra ilgili reseptörün diğer ligandları (agonist molekūl veya doğal ligand) bu bōlgeye bağlanamaz ve reseptör bloke olur (Jenkinson, 1991). Antagonist etkili ilaçların başında beta adrenerjik reseptör antagonisti propranolol, atenolol vb. hipertansiyon ilaçları gelmektedir.

Hücre zarında çeşitli reseptörler bulunmakla birlikte, G- Proteine bağlı reseptörler, tirozin kinaz reseptörleri ve iyon kanalı reseptörleri olmak üzere 3 temel zar reseptör grubu vardır. Transmembran özellikte olan G-proteine bağlı reseptörler (G- protein coupled) plazma zarı reseptörüdür ve hayvanlarda embriyonik gelişimden başlayarak duyu algılanmasına kadar farklı birçok sūrete önemli gōrevler üstlenirler (Campbell ve Reece, 2006). İnsanlarda gōrūlen çeşitli bakteriyel kaynaklı hastalıklarda bu reseptörlerin etkisizleşmesi hastalığın oluşmasına neden olmaktadır. G – protein bağlı reseptörler zarı 7 kez geçen α heliks yapıları ile tanımlanırlar (Cooper ve Hausman, 2006). G- proteini bağlı reseptör ailesine üye adrenerjik reseptör grupları adrenalin (epinefrin) ve noradrenalin (norepinefrin) gibi katekolaminlerin hedef reseptörleri olarak tanımlanırlar. Bu reseptörler, α (alfa) ve β (beta) olmak üzere iki temel alt gruptan oluşmaktadır. Beta adrenerjik reseptörlerin (G_s bağlı) β_1 , β_2 ve β_3 olmak üzere 3

alt tipi bulunmaktadır (Ma and Huang, 2002). Bu reseptörlerin aktivasyonu, hücrel proteinlerin fosforilasyonundan sorumlu protein kinaz A aktivitesinin artırılmasıyla simpatomimetik cevapların oluşmasına neden olmaktadır. Adrenalin ve noradrenalin, beta adreno reseptörlere bağlandığında kalp atış hızında ve sıklığında artış, tansiyonun yükselmesi ve özellikle iskelet kaslarına doğru kan akışının yönlendirilmesi gibi fizyolojik değişimlere neden olur (Parlak ve diğ., 2009). Böylelikle organizma bir tehlike durumunda kendini savunabilecek duruma gelir. Beta adrenerjik reseptörlerin aktivitesi böbrekten renin salınımını artırarak anjiotensin II üretiminde de artışa neden olur. Ayrıca açlık hormonu olarak bilinen Ghrelin salınımı da beta 1 reseptörleri aracılığıyla kontrol edilmektedir (Anonim, 2012b) Bununla birlikte örneğin beta adrenerjik reseptörlere yüksek bağlanma isteğine (affinite) sahip isoproterenolün bağlanması Src (tirozin kinaz ailesi) moleküllerinin kullanılmasıyla birlikte hücreyi apoptoz sürecine de itebilmektedir (Geng et al., 1999). Beta adrenerjik reseptörlerin alt tipleri farklı organlarda yerleşebilir. Kalp ve böbrek hücrelerinde çoğunlukla β_1 (Beta1) tip reseptörler vardır ve böbreklerde renin salınımını artırırken kalpte kronotropi (atım hızı) ve inotropi (kasılma gücü) oranlarını arttırmaktadır (Helfand et al., 2009). Uterus ve bronşlardaki düz kaslarda bulunan β_2 (Beta 2) tip reseptörlerin aktivasyonu ile bu kaslarda gevşeme meydana gelmektedir (Anonim, 2012c). Son yıllarda keşfedilen yeni bir tip olan β_3 (Beta 3) reseptörler ise çoğunlukla adipoz dokuda bulunmaktadır (Skeberdis, 2004). Bu reseptörün aktivasyonu ve etkisizleştirilmesi ile canlıların vücut ağırlığında değişimler meydana geldiği görülmüştür. Çiftlik hayvanlarında kullanılması konusunda çeşitli denemeler bu amaçla yapılmıştır (Mersmann, 1998). Farklı beta adrenerjik reseptör alt tipleri; karaciğer, akciğer, göz, damarlar ve özellikle kalpte bolca bulunmaktadır (Anonim, 2012d). Beta reseptörler sadece insanlara özgü olmayıp adrenerjik reseptörün kendisi veya yapı benzerleri balıklarda ve başka sucul canlılarda da bulunabilmektedir (Hugget et al., 2002; Dzialowski et al., 2006).

Beta adrenerjik reseptör antagonist etkili (Beta bloker) ilaçlar ilgili reseptörlere bağlanarak ligand veya agonist moleküllerin iş görmesini engellerler. Antagonist etki mekanizmasına dayalı birçok ilaç günümüzde piyasaya sunulmuştur (Prichard et al., 2001). Bu ilaçlar ile hastalığa neden olan fizyolojik süreçlerin yönlendirilmesi mümkün olmuştur. Beta bloker etkili ilaçlar bu

reseptörlere bağlanarak adrenalin ve noradrenalinin oluşturduğu etkinin tam tersi bir etki oluşturabilirler ve böylelikle örneğin kalp atım hızını dengelemeleri mümkün olur. İlk sentezlenen beta bloker etkili madde dichloroisoproterenol olmakla birlikte klinik olarak başarılı beta bloker etkili propranolol, 1962 yılında James Black tarafından kullanıma sunulmuştur (Frishman, 2008). Propranolol keşfinden sonra atenolol, surbutol ve nadolol gibi diğer bir çok beta adrenerjik reseptör antagonist etkili madde ilaç olarak piyasaya verilmiştir.

Tüm dünyada 50 yıldan fazla bir süredir kullanılan beta bloker etkili ilaçların çevreye yayılmaları diğer bir çok ilaç gibi olmaktadır. Herhangi bir ilaç piyasaya sunulduktan sonra kullanılsa da kullanılmasa da mutlaka çevreye giriş yapmaktadır.

İlaçların çevreye geçişlerinde temel yol ilacı kullanan canlılardır (Zuccato et al., 2006). A.B.D' nde 2006 yılında yapılan araştırmaya göre bu ülkede 13 yılda nüfus artış hızı %14 iken ilaç kullanımındaki resmi artış % 71 olarak gerçekleşmiştir (AnnPistell, 2007). Bir başka ifade ile ilaç kullanan insanların sayısı nüfus artışından daha fazla olmuştur. Organizma tarafından alınan ilaç metabolik yollar sonrasında hiçbir değişikliğe uğramadan atılabileceği gibi kısmi olarak metabolize olup bu şekilde de atılabilir. Beta bloker etkili ilaçlardan atenolol, ilacı kullanan hastalardan %90 oranında bozulmadan idrar yoluyla atılmakta ve atık su arıtım sistemlerinde ancak %80' i kadarı temizlenmektedir (Alder et al., 2005). Sadece Almanya' da yıllık 100 ton atenolol kullanılması (Ramil et al., 2010) ve diğer beta bloker etkili ilaçların eklemeli etkisi de düşünüldüğünde beta adrenerjik reseptör etkili maddelerin çevreye sürekli bir yayılımı olduğu söylenebilir. Beta bloker etkili maddelerden hidrofobik özelliğe sahip olanlar PAH' lardan daha fazla sedimentte birikme eğilimi göstermektedir (Kibbey et al., 2007; Yamamoto et al., 2009 ve Ramil et al., 2010). Lipofilik özellikteki propranolol ve metaprolol gibi beta bloker etkili ilaçlar çoğunlukla karaciğerde metabolize olurlar ve idrar yoluyla atımları oldukça düşüktür (Mehvar and Brocks, 2001). Beta adrenerjik reseptör antagonist etkili ilaçlar ister hidrofilik ister hidrofobik özellikte olsun ekosistemin çeşitli ögelerinde birikim özelliği göstermektedir. Yapılan araştırmalarda bu tip ilaçlara çevrede ng/g seviyesinden ppm düzeyine kadar artan oranlarda rastlanılmıştır (Doughton ve Ternes, 1999; Hugget et al., 2002; Huerta et al., 2012).

Farmasötik etkili maddeler çok düşük dozda canlıda fizyolojik etki meydana getirmek üzere tasarlandıkları için çevresel konsantrasyonlarının belirlenmesi önemli bir konu olmuştur. Bununla birlikte farklı laboratuvarlarda tek bir etken madde ile yapılan toksisite çalışmalarından elde edilen sonuçlara bakıldığında çevresel konsantrasyonların risk oluşturma potansiyellerinin düşük olduğu görülmektedir (Triebkorn, 2007). İlacın hedef organizmada etki gösterebilmesi için belli bir zamanda istenilen seviyede bulunması gereklidir. Bunun için ilaçlar tasarlanırken biyoyumluluklarının en üst seviyede olmasına dikkat edilir. İlacı belli seviyede tutabilmenin diğer bir yolu ise farmakokinetik özelliğine göre belirli zamanlarda ilacın tekrar vücuda verilmesidir. İnsanlarda tanımlanan bir çok hücresele reseptör balık gibi sucul omurgalılarda da aynı moleküler yapıda bulunmuştur (Owen et al., 2007; Tarazona et al., 2010). Herhangi bir reseptörde belirli bir yanıt oluşturmak üzere tasarlanan beta bloker gibi ilaçların balıklarda da insanlardakine benzer bir yanıt oluşturacağı beklenebilir. Bununla birlikte aynı ilacın hedef olmayan su piresi (*Daphnia magna*) gibi omurgasız canlılarda yol açacağı problemler konusunda tahminde bulunmak oldukça güçtür ve balıklarda dahi bu ilaçlar hücrealtı seviyede hasarlara neden olabilir (Oetken ve et al., 2005; Dzialowski et al., 2006 ve Triebkorn et al., 2007).

Deniz kestanesi uzun yıllardan beri çok çeşitli denemelerde test canlısı olarak kullanılmaktadır. Embriyonik gelişmenin nasıl gerçekleştiğini aydınlatmak için deniz kestanesi model organizma olarak 1800' lü yılların sonunda kullanılmaya başlanmış ve spermin dölllenme olayında rol aldığı bu canlılarla yapılan çalışmalar sonucu ortaya konmuştur (Hinegardner, 1969). Bir asırdan fazla bir süredir deniz kestanesi ile yapılan çalışmalar hem bu canlının gelişimsel sürecini aydınlatmış hem de omurgalılar da dahil olmak üzere bir çok canlı türünün embriyonik gelişiminde meydana gelen değişimleri tanımlamıştır. Biyolojik çalışmalardan elde edilen veriler bu canlıya ait gelişimsel özelliklerin iyi bilinmesi toksikolojik çalışmalarda da kullanılmasına olanak sağlamıştır. İlk kez 20. yy' da çeşitli maddelerin canlıların gelişimi üzerine etkilerine bakmak için deniz kestanesi yumurtaları ve embriyoları kullanılmaya başlanmıştır (Deeb, 1972; Hagström and Lönning, 1973; Bresh and Arendt, 1977; Pagano et al., 1978 ve Kobayashi, 1980). Yapılan denemelerde deniz kestanesi embriyo toksisite

denemelerinin bir çok avantaja sahip olduğu görülmüştür. Deniz kestanesinde gametlerin kolay elde edilmesi, laboratuvar şartlarında fertilizasyon işleminin yüksek teknolojik alet ve süreçlere ihtiyaç duymaması, bütün bir yıl boyunca denemenin yapılabilmesi, deneme maliyetinin düşük olması ve kısa sürede sonuç elde edilmesi bu denemenin avantajları arasında sayılabilmektedir (Arslan ve Parlak, 2008).

Deniz kestanesi embriyo toksisite denemeleri ile farklı sayıda ve çeşitte kimyasal bileşiğin etkileri incelenmiştir. Serotonin ve asetilkolinin deniz kestanesi embriyo gelişimini etkilediği yönündeki araştırmalar (Gustafson and Toneby, 1970) organoklorinli pestisitlerin olası etkilerinin araştırılmasıyla devam etmiştir (Bresh and Arendt, 1977). Lityum gibi elementlerin blastomer safhasında moleküler değişikliğe sebep olduğu Livingston ve Wilt (1989) tarafından deniz kestaneleri ile yapılan denemeler sonucu ortaya konmuştur. Ağır metallerin embriyo gelişimi üzerine etkileri Kobayashi ve Okamura (2005) tarafından deniz kestanesi kullanılarak çalışılmıştır. 1980' li yıllar deniz kestanesi denemelerinin belli standartlara oturtulmaya çalışıldığı süreçlerin optimize edildiği yıllar olmuştur (Hose, 1985; Dinnel et al., 1987; Pagona et al., 1989; Kobayashi, 1991).

Deniz kestanesi embriyo denemelerinde morfolojik kriterler günümüzde hala önemini korumakla birlikte moleküler yöntemler ve histolojik boyamalar da toksik etki nedeniyle meydana gelen değişimlerin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Garman et al., 1997; Saotome et al., 1999; Arslan ve Parlak, 2007).

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Deniz Kestanesi (*Paracentrotus lividus*)'nin Biyolojik Özellikleri

Dünyada 700' den farklı türle temsil edilen denizkestaneleri omurgasız hayvanlardan derisi dikenliler (echinodea) grubuna dahildirler. Bu canlılar embriyonal safhadan erişkin bireye başkalaşımın geçirek girerler. Larval aşamada bileteral simetriye sahipken erişkinleri radial simetriye sahiptir. Bentik makrofit komünitelerinin kontrolünde birinci derecede önem taşımaktadırlar (Pinna et al. 2006). Ülkemiz sınırlarında Akdeniz ve Ege denizi sahilleri boyunca özellikle *Paracentrotus lividus* ve *Arbacia lixula* türlerine sıkça rastlanılmaktadır. *P. lividus* türü için sınıflandırma aşağıdaki şekildedir.

Alem: Animalia

Alt Alem: Eumetazoa

Üst Şube: Deuterostamia

Şube: Echinodermata (Klein ,1734)

Alt Şube: Echinozoa

Üst Takım: Echinacea

Takım: Echinoida

Aile: Echinidae

Cins: *Paracentrotus*

Tür: *Paracentrotus lividus*

Paracentrotus lividus türü küresel bir yapıya sahip olup büyüklüğü 7 cm kadardır. Bununla birlikte dikenleri hariç çapı 7,5 cm'yi bulan deniz kestaneleri kaydedilmiştir (Bonnet, 1925; Boudouresque et al., 1989). Dikenleri uzun ve serttir. *P. lividus* türü Ege sahillerinde temiz alanlarda bulunurken bu türe kirli alanlarda rastlanılmadığı belirtilmiştir (Kocataş,1978). Genel adları mor deniz kestanesi olsa da; kahverenginin tonlarından açık yeşile kadar bir çok farklı renkte olabildikleri görülmüş ve buldukları derinlikle renkleri arasında bir ilişki olmadığı belirtilmiştir (Boudouresque, 2001).

Tüm dünyada yayılış gösteren deniz kestanelerinden *P. lividus* türü Kuzey doğu Atlantik'te İskoçya ve İrlanda kıyılarından başlayarak Azore adaları, Kanarya adaları ve Fas kıyılarını da içine alan bir bölgede ve tüm Akdeniz boyunca bulunmaktadır (Boudouresque,2001).

Genel olarak sublittoralde bulunan bu türler sert zeminlerde veya taş ve kayalarda oluşturdukları girintilerde yaşarlar. Özellikle *Posidonia oceanica* ve *Zostera marina* çayırlarının üstünde buldukları rapor edilmiştir (Boudouresque, 2001).

Yapılan denemelerde *P. lividus*' un beslenme tercihleri belirlenmeye çalışılmış ve *Posidonia oceanica*' nın tüm yapılarını tüketebildiği ve bu türün oluşturduğu çayırları tercih ettiği gözlemlenmiş ve bu türün çoğunlukla herbivor olduğu görülmüştür. Evsel kirleticilerin bulunduğu alanlarda yaşayan *P. lividus* türlerinin dikenlerinin daha uzun ve ince olduğu ayrıca porlu yapıda geliştiği bulunmuştur. Bu morfolojik adaptasyonun organik maddelerin alımını arttırmak için gerçekleştiği düşünülmektedir (Delmas ve Regis, 1985). Nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte *P. lividus* hem doğal çevresinde hem de laboratuvar şartlarında aboral kısmını çeşitli materyallerle (boş kabuk, algler veya bunların çeşitli yapıları v.b) örtmektedir. Bu türler genel olarak nokturnal (gece aktif) aktivite gösteren canlılardır. *P. lividus*' un parazitleri *Aeromonas* ve *Vibrio* cinslerine ait türlerdir.

Büyüme üzerinde temel olarak; su sıcaklığı, besin kalitesi ve gonad gelişimi gibi etmenler rol oynamaktadır. *P. lividus*' un optimum büyümeye 18 – 22 °C aralığında ulaştığı 7 °C altında ise büyümenin olmadığı gözlemlenmiştir (Le Gall et al., 1990).

P. lividus türünün gelişimde döllenme, segmentasyon, gastrulasyon, organogenez olmak üzere dört safha görülür:

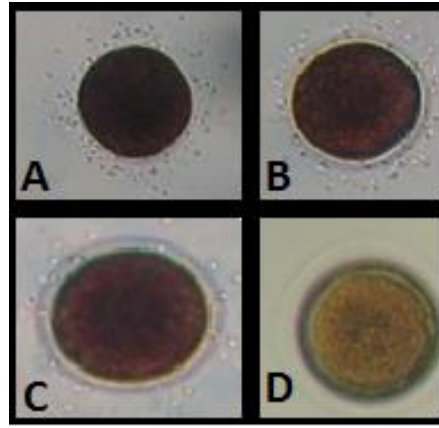
2.1.1. Döllenme

Bu türde olgun yumurtalarla dolu ovaryum kahverengimsi veya kırmızımsı, testisler az ya da çok beyazımsıdır. Spermatozoidin boyu 10 µm, oositin çapı ise 93,2 µm dir. Bu nedenle tek üreme hücrecini çıplak gözle görmek mümkün

değildir. Oosit deniz suyunda yaklaşık 20µm kalınlığına kadar şişecek bir jelatin tabaka ile çevrilidir (Hörstadius, 1973; Oral, 1997).

Yumurtalar alesital tipte olup sitoplazma, çekirdek ve hücre zarından oluşur ve vitellüs hücrenin her yanına homojen olarak dağılmıştır.

Yumurtaların dış yüzeyi eşit olarak dağılan az sayıda kırmızımsı pigment tanecikleri ile kaplıdır. Olgunlaşmayı takiben bu pigmentler vejetal kutba göç ederek ekvator altında bir bant oluşturur (Hörstadius, 1973).

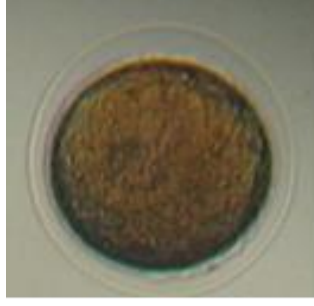


Şekil 2.1. *Paracentrotus lividus*'da dölleme ve dölleme zarının oluşumu. A) yumurta ve sperm, B) Yumurta zarının sperm tarafından eritilmesi, C) dölleme zarının oluşumu, D) perivitellin boşluk (Orijinal Fotoğraf).

Deniz kestanelerinde *P. lividus* türü de dahil olmak üzere dölleme yumurtaların ve spermelerin su içine bırakılmasıyla gerçekleşen dış döllemedir. Yumurtaların olgunlaşması ovaryumda tamamlanır ve daha sonra bu yumurtalar su içine serbest bırakılır. Doğal olarak boşalan yumurtalar su içinde serbesttirler ve dölleme sperm yumurta ile buluştuğu zaman gerçekleşir.

Fertilizasyonun ilk belirtisi; sperm yumurtaya girdiği andan birkaç saniye sonra başlayan fertilizasyon zarıdır (vitellin) (Şekil 2.1). Fertilizasyon zarı 20 µm kalınlığında olup jelatinimsi bir yapıdadır ve bu zar ile yumurta arasında “perivitellin boşluk” adı verilen bir alan bulunmaktadır. Fertilizasyon ile sperm ve yumurta çekirdekleri birleşmekte ve mitotik aktivite artarak yumurta aktif hale gelmektedir (Şekil 2.2)

2.1.2. Segmentasyon



Şekil 2.2. Dölllenmiş P. lividus yumurtası (Orijinal fotoğraf)

Fertilizasyondan sonra yaklaşık bir saatte, bir bölünme gerçekleşir ve segmentasyon hızlı bir şekilde devam eder. Animal ve vejetal eksene dik olarak gerçekleşen ilk iki bölünmede blastomerler birbirine eşittir ve her hücre aynı miktarda animal ve vejetal sitoplazma içerir. Bütün bölünmeler art arda embriyonun toplam hücre hacminde artış olmadan gerçekleşir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Segmentasyon evreleri (Orijinal fotoğraf)

Üçüncü bölünme animal-vejetal eksene paralel olarak gerçekleşir. Sonuçta 4 animal ve 4 blastomerli 8 hücreli safha oluşur. Bu hücrelerde de boyut ve şekil aynıdır fakat birbirlerinden farklı sitoplazma içerirler. Beşinci bölünmede 4 mikromerin bölünmesi geciktiği için 32 hücreli safhadan önce 28 hücreli safha gözlenir. Yedinci bölünmede 128 blastomer oluşur ve sekizinci bölünmede ise blastosölün oluşumu gerçekleşir.

Bölünmeler, embriyo 250 hücreye ulaşana kadar sabit hızla devam eder. Bölünmenin durduğu bu safhaya “blastula” adı verilir. Fertilizasyon zarı içinde harekete başlayan blastula, dış zar enzimlerin yardımıyla eriyince yüzmeye başlar ve gerçek larva oluşur.

2.1.3. Gastrulasyon

Gastrulasyon blastoderm hücrelerinin embriyoda yeni pozisyonları için hareket etmelerini kapsayan karmaşık bir işlemdir. Bu safhada vejetal kutuptaki hücreler blastula içine doğru göçe başlar. Bunlar daha sonra iskeleti oluşturacak primer mezenşim hücreleridir. Bu göçten sonra vejetal duvarın içeri çökmesi ile “gastrula” safhası gerçekleşir. Gastrula safhasında ektoderm, mezoderm (mezenşim hücreleri) ve endoderm olmak üzere üç farklı tabaka oluşur (Şekil 2.4).

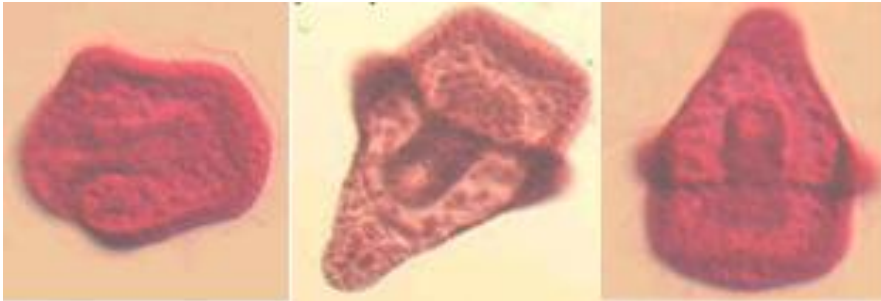


Şekil 2.4. Gastrula safhası (Orijinal Fotoğraf).

2.1.4. Organogenez

Endoderm çevresindeki primer mezenşim hücreleri ventral tarafın köşelerinde daha çok yoğunlaşarak iskeletin başlangıcı sayılan spikülleri oluşturur.

Endoderm özafagus, mide ve bağırsakları oluşturur. İskeletin oluşması ile larva “prizma safhasına” geçer (Şekil 2.5). Prizma safhası gastrulasyon ile Pluteus arasındaki geçiş aşamasıdır. Bu arada bacaklar belli olmaya başlar.



Şekil 2.5. Prizma safhası (Arslan, 2005).



Şekil 2.6. Pluteus larvası (Orijinal Fotoğraf).

Prizma aşamasından sonra iki bacaklı pluteus safhasına geçer. Bacaklar dar ve kısadır (Şekil 2.6). Bu safhada sindirim sistemi, özofagus ve barsaklar belirgindir. Deniz kestanesi larvası larval bacakları oluşturacak birkaç spikülden oluşan basit bir iskelet sistemine sahiptir.

Fertilizasyondan 48 saat sonra dört kollu “pluteus” larvası oluşur. Döllenen 6 hafta sonra ise metamorfoz geçirerek küçük bir kestaneyi oluşturur.

2.2. Biyodeneylelerin Yapılışı

2.2.1. Hazırlık aşaması

Test canlısı ile ilgili güncel literatür bilgileri araştırılmış ve bunlar derlenerek tez konumuzla ilgili olanlar dikkatle incelenmiştir. Özellikle proje kapsamında büyük önem taşıyan gamet eldesi konusu üzerinde durulmuştur. *Paracentrotus lividus*' un üreme biyolojisi ve ekolojisi üzerine mevcut bilgiler ve güncel literatür bilgileri harmanlanarak projede belirtilen materyal metot kısmı gözden geçirilmiş ve önemli bir değişikliğe gerek olmadığına karar verilmiştir. *P. lividus*' tan elde edilecek sperm ve yumurtalar için bir takvim belirlenmiş ve bu takvime göre yapılacak arazi çalışmaları planlanmıştır. Tüm cam malzeme ve kullanılacak makas, pens vb laboratuvar malzemelerinin sterilizasyonu yapılmıştır. Canlı örnek toplamak için arazi çalışmaları sabahın erken saatlerinde başlatılmıştır. Arazi bölgesi olarak daha önce çok defalar gidilen ve burarlardan toplanan *P. lividus* ile başarılı çalışmalar gerçekleştirildiği bilinen Seferihisar kıyıları seçilmiştir. Bununla birlikte gerek mevsimsel etmenler gerekse bölgede meydana gelen değişimler (İlçenin gelişmesi, inşaat alanlarının artması v.b) nedeniyle arazi bölgesi genişletilmiş farklı yerlerden de canlı örnekler

toplanmıştır. Gün içinde birden fazla arazi çalışması yapılarak gerekli döl kalitesine sahip örnekler toplanabilmektedir. Örnek toplama esnasında:

- Kıyının sığ alanlarından değil yaklaşık 1 m derinliğe sahip alanlarından örneklerin toplanması
- Toplanan örneklerin boyut olarak küçük olmamasına
- *Paracentrotus lividus* örneklerinin buldukları substratlardan alınmaları esnasında canlıyı çok rahatsız etmeden ona zarar vermeden toplanmasına
- Toplanan örneklerin mümkün olan en kısa sürede kuru ve soğuk bir şekilde transfer kabına aktarılmasına özellikle dikkat edilmiştir.

2.2.2. Stokların ve test konsantrasyonlarının hazırlanması Kimyasallar, üretici tarafından belirtilen şartlara uygun olarak ultra saf suda çözülmüştür. Hazırlanan stok çözeltiden uygun miktarlar alınarak konsantrasyonlar ayarlanmıştır. Embriyotoksisite denemesi için Atenolol 7 farklı konsantrasyonda, Nadolol 6 farklı konsantrasyonda, metaprolol ve nadolol ise 5 farklı konsantrasyonda denenmiştir (Çizelge2.1).

Çizelge 2.1. Embriyotoksisite çalışmalarında uygulanan test konsantrasyonları.

Kimyasal	Uygulanan Konsantrasyon (ppm)						
	10	20	40	60	80	100	120
Atenolol	10	20	40	60	80	100	120
Propranolol	0,5	1	2	2,5	3		
Metaprolol	20	40	60	80	100		
Nadolol	10	20	40	60	80	100	

Fertilizasyon başarısı ve sitotoksisite çalışmalarında kullanılan konsantrasyonlar ise Çizelge2.1.2' de gösterilmiştir. Çalışmalarda deniz kestanesi gonadları ortaya çıkarılmıştır (Şekil 2.7).

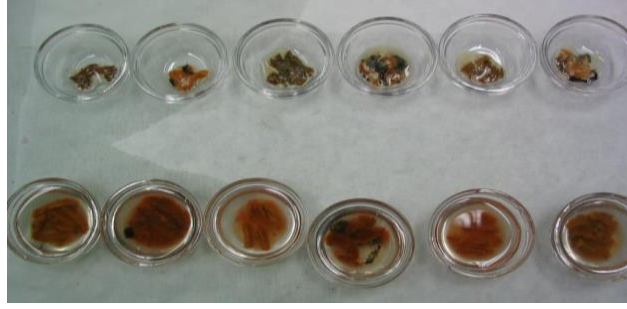
Çizelge 2.2. Fertilizasyon başarısı ve Sitotoksisite çalışmalarında uygulanan test konsantrasyonları.

Kimyasallar	Konsantrasyonlar (ppm)					
	10	20	40	60	80	100
Atenolol	10	20	40	60	80	100
Propranolol	0,25	0,5	1	1,5	2	2,5
Metaprolol	20	40	60	80	100	
Nadolol	10	20	40	60	80	100

Gonadlar kaşık yardımıyla çıkartılmış ve yumurtalar filtre edilmiş deniz suyu içinde bırakılmıştır (Şekil 2.8). Spermlerin deniz suyuyla temas etmesi aktifleşmelerine neden olacağından Spermier buz akülerinin üstünde kuru bir şekilde muhafaza edilmiştir. Daha sonra mikroskop altında yumurtalar incelenerek iyi kalitede olanlar biyodenemeler için ayrılmıştır.



Şekil 2.7. Paracentrotus lividus türüne ait dişi ve erkek gonadlar.



Şekil 2.8. P. lividus sperm ve yumurta taşıyan gonadlar.

Yumurtalar, 100 µm göz açıklığında plankton bezinden geçirilerek 250 ml'lik cam beherlerde toplanmıştır. Bunu takiben yumurtalar iki defa filtre edilmiş deniz suyu ile yıkananmış ve biyotestler için hazır hale gelmiştir.

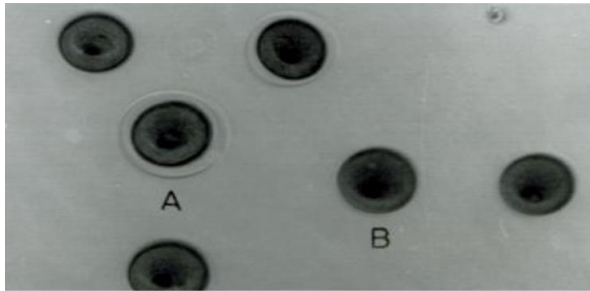
2.3. Biyodenemeler

Deniz kestanesi üzerine seçilen kimyasalların embriyotoksik ve genotoksik etkilerinin tespit edilebilmesi için çok çeşitli cevaplar veren denemeler düzenlenmiştir. Bu denemelerden; spermiyotoksisite, embriyotoksisite ve sitotoksisite testleri gerçekleştirilmiştir.

2.3.1. Embriyo denemeleri

Deniz kestanesi (*Paracentratus lividus*) embriyoları ile yapılan embriyotoksisite testlerinde 10 ml hacimde Kontrol (sadece Filtre Deniz Suyu) ve test edilecek ilaçları (Atenolol, propranolol ve metaprolol, nadolol) içeren küçük hacimli her birinde 6 odacık bulunan polistiren (Nunc, Danimarka) kaplar kullanılmıştır. Uygulanacak konsantrasyonlar hem kapların üstüne hem de ayrı bir yere kaydedilmiştir. Testler fertilizasyon gerçekleşikten 15 dakika sonra başlatılmış ve 72 saat sonunda pluteus larval safhasına ulaşıldıktan sonra sonlandırılmıştır. Uygun koşullar (Sıcaklık, sperm sayısının yumurta sayısına oranı) sağlandığında % 99 gibi bir oranda döllenme meydana gelmektedir. Bunun için öncelikle 20 µl konsantre (kuru) sperm 50 ml FDS içinde seyreltilmiştir ayrıca bu sayede spermiler aktif hale de geçmiştir. Bu sperm solüsyonundan 1ml alınarak 100 µm naylon filtreden geçirilerek yıkanmış 250 ml FDS içinde bulunan yumurtalara eklenmiştir. Bu gamet karışımı, yumurtaların zarar görmemesi için hafifçe karıştırılarak zigot oluşumu sağlanmıştır. Zigot oluşumu, döllenmiş yumurtalarda döllenme zarının oluşumu ile teyit edilmiştir (Şekil.2.9).

Oluşan zigot süspansiyonundan 1 ml alınarak daha önceden hazırlanmış negatif kontrol gurubu ve belli oranlarda deneme maddemizi (Beta bloker ilaç etken maddesi) içeren 9 ml FDS içine ilave edilmiştir. Kültür ortamında 1ml de yaklaşık olarak 30 embriyo bulunmaktadır. Embriyolar 72 saatlik pluteus larval aşamaya kadar 18 °C' de inkübe edilmiştir.

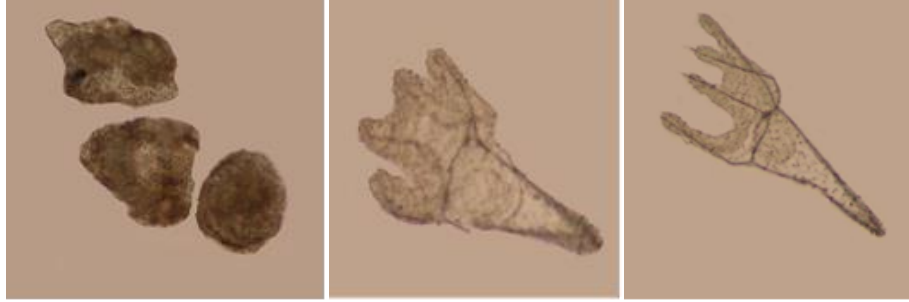


Şekil 2.9. Döllenmiş ve döllenmemiş yumurtalar. Dölenen yumurtaların (A) etrafında perivitellin zar mesafesi artarken Döllenmemiş yumurtalar (B)'da bu boşluk veya döllenme zarı görülmemektedir.

Bu süreç sonunda 10^{-4} M Krom sülfat ile hareketleri yavaşlatılan canlı bireyler üzerinde mikroskobik gözlemler yapılmıştır. Normal pluteus (Şekil 2.10) ve patolojik pluteuslar (Şekil 2.11) kaydedilmiştir.



Şekil 2.10. Normal Pluteus



Şekil 2.11. Patolojik Puteus

2.3.2. Spermiyotoksisite

Spermiyotoksisite denemelerinde olgun gametlere sahip 6 dişi ve altı erkek birey kullanılmıştır. 30 µm göz açıklığında filtreden süzölmüş konsantre sperm yığından 50 µl alınarak yaklaşık bir saat önce hazırlanan ve artan konsantrasyonlarda toksikant içeren, toksikant içermeyen (negatif kontrol) ve CdCl₂ içeren (pozitif kontrol) filtre edilmiş deniz suyuna (FDS) bırakılmıştır.

Spermler bu ortamlarda 30 dakika bekletilmiş ve bu sperm solösyonlarından 100 µl alınarak toksikantın etkisinde kalmamış yumurta içeren 20 ml FDS içine ilave edilmiştir (yaklaşık 50 yumurta/ml). In-vitro döllemeden 10 dakika sonra spermler ile taşındığı düşünölen toksikantların yoğunluğunu embriyotoksik seviyeden aşağı düşürmek için zigotlar 3 defa FDS ile yıkanmıştır.

Spermiyotoksisite denemelerinde 50 ml hacminde polistiren bardaklar kullanılmış ve bu materyal kontaminasyona sebebiyet vermemek amacı ile ikinci kez kullanılmamıştır.

Sperm fertilizasyon başarısı ve döl kalitesine bakılarak spermiyotoksisite sonuçları değerlendirilmiştir. Denemeler fertilizasyon başarısı ve spermiyotoksik

sonuçların tespiti için iki gurup şeklinde 6 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. İlk gurup, daha sonra optimum sıcaklıkta gelişmeye bırakılmıştır.

2.3.3. Fertilizasyon başarısı

Yapılan tüm işlemlerden sonra 6 tekrarlı ikinci gurup 30 dakika sonra %10 formol ile fikse edilmiştir. Fertilizasyon başarısı belirlenirken her bir örnekten rast gele 100 yumurta ya da embriyo ışık mikroskobu altında incelenerek döllenmiş ve döllenmemiş yumurta sayıları belirlenmiştir. Döllenmiş yumurtalar daha önce belirtildiği gibi döllenmiş zarının varlığına göre belirlenmiştir. Fertilizasyon başarısı belirlenirken Fertilizasyon Oranı (FO = % döllenmiş yumurta) dikkate alınmıştır. Negatif kontrol gurubunda gözlenen fertilizasyon oranı (FO kont) ve toksikant gurubunda gözlenen fertilizasyon oranı (FO göz) karşılaştırılarak düzeltilmiş endeks (DE) değerleri hesaplanmıştır (Pagano et al., 1986).

$$D.E = \frac{FO_{göz} - FO_{kont}}{FO_{kont}} \times 100$$

2.3.3.1. Döl Kalitesi

Spermlerin taşıyabileceği toksik etkileri belirleyebilmek için larvalar 72 saat sonra ışık mikroskobunda gözlenmiştir. Embriyolojik analizler gözlemlerden hemen önce 1-2 damla 10⁻⁴ M Krom Sülfat (CrSO₄) ilavesi ile hareketsiz hale getirilen ve rast gele seçilmiş 100 adet larva (ya da embriyo) üzerinde yapılmıştır.

2.3.4. Genotoksisite

Paracentrotus lividus ile yapılan genotoksisite denemelerinde kültür edilme aşamaları embriyotoksisite denemeler ibölümünde belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir. Fakat embriyolar fertilizasyondan 5-6 saat sonra “Karnoy sıvısı (Absolut etanol: Kloroform: Asetik Asit= 6:3:1) “ ile fiks edilmiştir. Fiksasyondan yaklaşık yarım saat sonra karnoy sıvısı alınarak yerine absolut etanol ilave edilmiştir. Bu işlemden 24 saat sonra etanol yenilenmiş ve embriyolar mikroskobik gözlemlere kadar bu şekilde saklanmıştır. Değerlendirme Çizelge 2.3'teki ölçütlere göre yapılmıştır.

Çizelge 2.3. Genotoksik etkilerin değerlendirilmesinde kullanılan sayısal ve morfolojik ölçütler (Oral, 1997).

SAYISAL ÖLÇÜT	MORFOLOJİK ÖLÇÜT
Embriyo başına düşen ortalama mitoz sayısı = EDM	Embriyo başına düşen toplam mitotik bozukluklar = TMB * Ana faz Köprüsü = (AK) * Kalan Kromozom = (KK)
İnterfaz embriyo yüzdesi = %İE	* Serbest Kromozom = (SK) * Kırık Kromozom (Fragmentasyon) = (F) * Çok Kutuplu Mekik = (ÇM) * Asentrik fragment = (AF)
c) Metafaz Ana faz oranı = M/A	b) >1 mitotik bozukluğa sahip embriyo yüzdesi = % E (+mb)

Sitogenetik analizler her bir kültür ortamında rastgele 30 embriyo seçilerek yapılmıştır. Bunun için embriyolar asetokarmin (Asetik asit + Karmen boyası) ile boyandıktan hemen sonra immersiyon yağı yardımı ile ışık mikroskopunda (x1000) incelenmiştir.

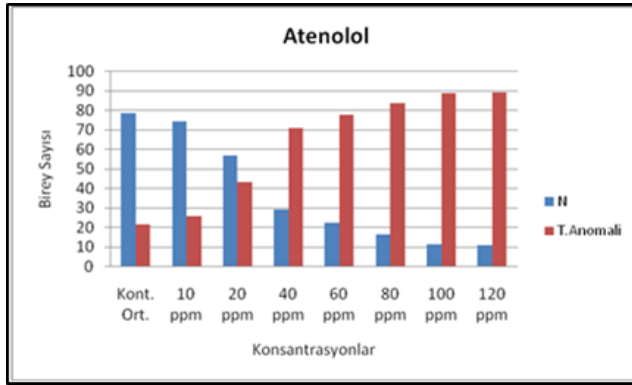
İstatistik değerlendirmeler için Student t testi uygulanmış ve EC değerinin hesaplanması için EPA' nın probit analiz programı kullanılmıştır. Denemeler süresince tüm istatistiksel analizlerde önemlilik % 95 güvenirlilik aralığında hesaplanmıştır (p<0,005).

3. BULGULAR

3.1. Embriyotoksisite Sonuçları

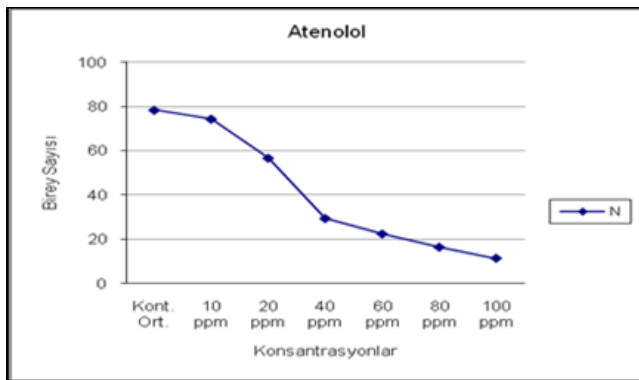
3.1.1. Atenolol uygulamaları bulguları

Atenolol ile yapılan embriyotoksik çalışmalarda 6 farklı konsantrasyonun etkileri araştırılmıştır. Buna göre; en düşük konsantrasyondan itibaren embriyotoksik etkiler görülmüştür. Doz cevap ilişkisine bakıldığında artan doza bağlı olarak etkinin de arttığı görülmüştür (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Atenolol için embriyotoksisite sonuçları. N: Normal birey; T. Anomali: Toplam anormal birey

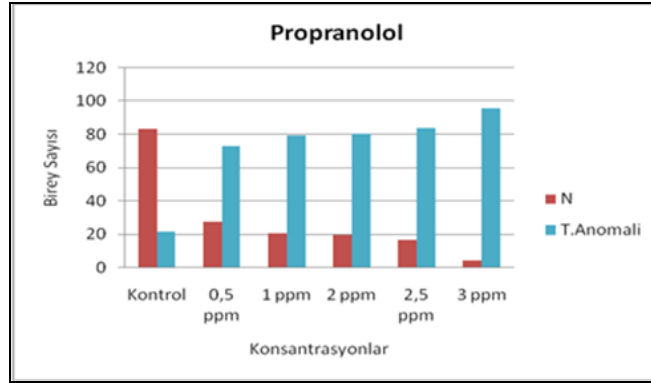
10 ppm konsantrasyondan itibaren 120 ppm'e kadar uygulanan tüm gruptaki normal embriyo sayısı Şekil 3.2' de görüldüğü gibi kontrol grubuna göre azalmıştır ($p < 0.005$). Embriyotoksisite çalışmalarından elde edilen bulgulara göre EC_{50} değeri 33,802 mg/l olarak bulunmuştur.



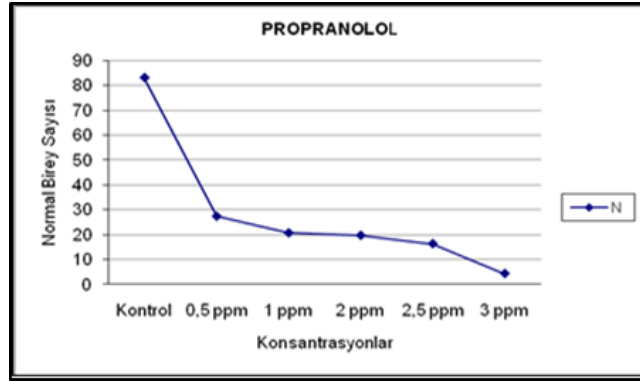
Şekil 3.2. Atenolol uygulanan deniz kestanesi embriyotoksisite denemesindeki normal birey sayısı

3.1.2. Propranolol uygulamaları bulguları

Propranolol için yapılan ön denemelerden elde edilen bulgulara göre; uygulanacak konsantrasyonun test edilen diğer beta blokerlerden daha düşük olması gerektiği saptanmıştır. Uygulanan doza verilen cevaplar artan doza bağlı olarak artmıştır (Şekil 3.3). Kontrol grubuna göre propranolol uygulanan denemelerde normal bireylerde istatistiki olarak anlamlı azalma olduğu görülmüştür ($p < 0.004$) (Şekil 3.4). Embriyotoksisite çalışmalarından elde edilen bulgulara göre EC_{50} değeri 0,232 mg/l olarak bulunmuştur.



Şekil 3.3. Propranolol için embriyotoksisite sonuçları. N: Normal birey; T. Anomali:
Toplam anormal birey sayısı



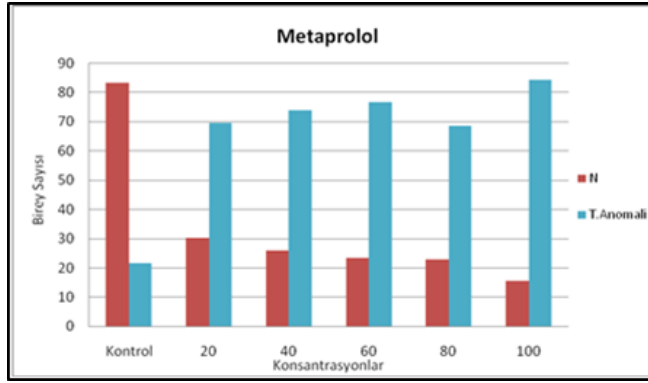
Şekil 3.4. Propranolol uygulanan deniz kestanesi embriyotoksisite denemesindeki normal birey sayısı

3.1.3. Metaprolol uygulamaları bulgular

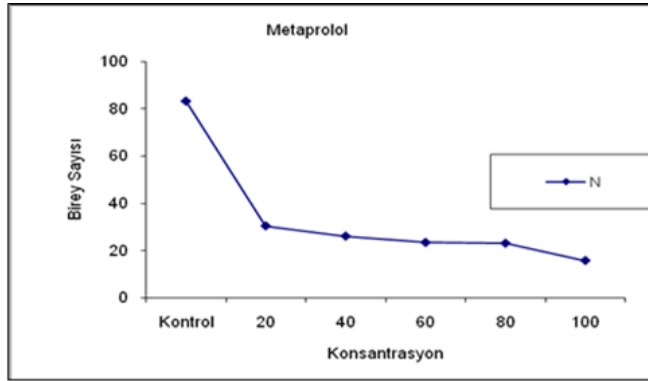
Metaprolol ile yapılan ön denemelerde bu etken maddenin etki oluşturduğu doz aralıklarının atenolol ile paralellik gösterdiği bulunmuştur. Deniz kestanelerinde oluşan toplam hasarın doza bağlı olarak değiştiği görülmüştür.

20'ppm'lik endüyük konsantrasyondan bile normal birey sayısı 30'a düşmüştür (şekil 3.5).

Kontrol gruplar ile karşılaştırıldığında uygulanan tüm konsantrasyonlardaki normal embriyo sayısındaki azalma (şekil3.6) istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.000002$).



şekil 3.5. Metaprolol için embriyotoksisite sonuçları

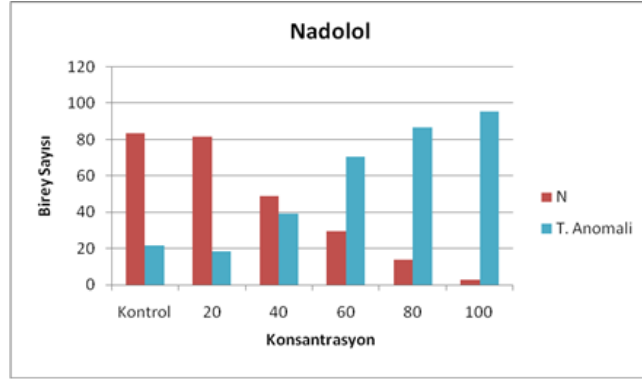


şekil 3.6. Metaprolol uygulanan deniz keşanesi embriyotoksisite denemesindeki normal birey sayısı

3.1.4. Nodolol uygulamaları bulgular

Nadolol deniz keşanelerinde hasar oluşturma potansiyeli açısından atenolol ve propranolol ile paralellik göstermiştir. Artan konsantrasyonlara bağlı olarak meydana gelen etki de artmıştır (şekil 3.7). Normal birey sayısında artan konsantrasyonlara bağlı olarak azalmalar görülmüştür.

3.2. Fertilizasyon Başarısı



Şekil 3.7. Nadolol uygulanan deniz kestanelerinde embriyotoksisite sonuçları

Fertilizasyon başarısının test edilmesi için çeşitli konsantrasyonlarda atenolol, propranolol, metaprolol ve nodolol'e maruz bırakılan spermiler ile yapılan spermiyotoksisite denemesi daha önce belirtildiği şekilde yapılmıştır. Elde edilen veriler ve düzeltilmiş endeks değerleri hesaplanarak grafikler halinde sunulmuştur. Atenolol, propranolol, metaprolol ve nadolol için %DE<0 olması bu kimyasalların deniz kestanesi fertilizasyon başarısı üzerinde anlamlı bir stres oluşturduğunu göstermektedir.

Atenololün fertilizasyon başarısı üzerine etkisinde kontrol grubunda döllenmemiş yumurta sayısı 6.5 iken ortalama 93.5 döllenmiş yumurta yani zigot sayılabılmıştır. Uygulanan ilk konsantrasyon olan 10 ppm'de Düzeltilmiş Endeks değeri -16.04 olarak bulunmuştur. Bu grupta döllenmeyen yumurta sayısı kontrol grubuna göre %300'den fazla artış göstermiştir. En yüksek konsantrasyon olan 100 ppm için döllenmemiş yumurta sayısı 45.5 olarak bulunurken D.E değeri -41.71 olarak hesaplanmıştır.

Propranololün uygulanan ilk konsantrasyonu 0.25 ppm için döllenmemiş yumurta sayısı kontrol grubuna göre artış göstermiştir (Kontrol grubunda 6.5 iken 0.25 ppm için 18). Propranololün artan konsantrasyonlarına bağlı döllenmemiş yumurta sayısında da artışlar gözlenmiştir. Fertilizasyon başarısının en yüksek konsantrasyon olan 2.5 ppm'de -31.55 D.E değeri hesaplanmıştır.

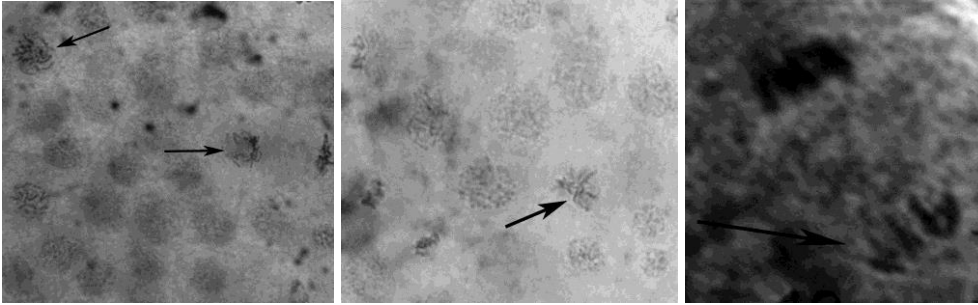
Metaprolol uygulanan deniz kestanesi spermelerinin fertilizasyon yeteneklerinde azalmalar meydana geldiği görülmüştür (Şekil 3.13). İlk konsantrasyondan itibaren görülen bu azalmalar uygulanan en yüksek

konsantrasyon olan 100 ppm'de pozitif kontroldeki azalmalara oldukça yaklaşmıştır. Döllenmemiş yumurtaların düzeltilmiş endek değerlerinde meydana gelen değişimler 100 ppm için D.E değeri -79.67 ve pozitif kontrol için -89.3.

Nadolol fertilizasyon başarısı üzerine olumsuz etkilere neden olmuştur. Uygulanan en düşük konsantrasyon olan 10 ppm için D.E değeri -19.25 iken 60 ppm için bu değer -30.48 olarak hesaplanmıştır. Uygulanan en yüksek konsantrasyon olan 100 ppm'de ise D.E değeri -54.01 olarak bulunmuştur.

3.3. Sitotoksiteden Elde Edilen Bulgular

Döllenmeden 5 – 6 saat sonra karnoy sıvısı ile fiks edilen örnekler mikroskopik incelemeye alınmıştır. Mikroskopik incelemede embriyonun bulunduğu mitotik evre ve mitoz bozuklukları incelenmiştir. Her bir kimyasal için yapılan incelemede doz artışına bağlı olarak interfaz evresinde kalan hücre sayısının arttığı bulunmuştur. Metafaz ve Anafaz safhasına geçenlerde çeşitli boyutlardaki kromozomal anomaliler görülmüştür (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Beta bloker etkili ilaç uygulanan deniz kestanesi embriyo hücrelerinde görülen sitogenetik bozukluklar.

Elde edilen sonuçlara göre; test edilen beta bloker etkili ilaçlardan Atenolol, 10 ppm konsantrasyonda embriyo başına düşen mitoz evresindeki ortalama hücre sayısını kontrol grubuna göre yaklaşık % 100 azaltmış ve bu azalma artan konsantrasyonlara bağlı olarak devam etmiştir (Çizelge3.1).

Çizelge 3.1. Atenolol, için elde edilen genotoksisite sonuçları. EBM: Embriyo başına düşen mitoz sayısı, % IE: İnterfaz evresindeki hücrelerin yüzde değeri, M/A: Metafaz evresindeki hücrelerin Anafaz evresindeki hücrelere oranı, % TMB/EMB: embriyo başına düşen toplam mitotik bozukluk.

Grup	EBM	%IE	M/A	%TMB/EMB
Kontrol	3,428	0,852	2,409	0,018
10 ppm	1,733	1,037	1,458	0,039
20 ppm	0,478	1,815	1,344	0,022
40 ppm	0,233	2,741	1,050	0,009
60 ppm	0,078	3,000	1,167	0,002
80 ppm	0,056	3,185	5,000	0,000
100 ppm	0,000	3,333	0,000	0,000

Embriyo başına düşen mitotik bozulmalar incelendiği zaman kontrol grubuna göre 10 ppm Atenolol'ün iki katı hasar oluşturduğu (Kontrol, 0.018 – 10 ppm Atenolol, 0.039) ancak konsantrasyon artışına bağlı olarak metafaz ve sonraki aşamalara geçemeyen embriyonik hücrelerde mitotik anomaliler sayılamamıştır. İnterfaz evresindeki hücrelerde meydana gelen artış nedeniyle (10 ppm, 1.45 ve 100 ppm'de 3.33) mitotik hasarlarda sayıca azalmalar oluşmuştur. Atenolol uygulanan deniz kestanesi embriyolarında Metafaz evresindeki hücrelerin Anafaz evresindeki hücrelere oranında 10 ppm konsantrasyonun kontrol grubuna göre % 65'lik azalmaya neden olduğu (Kontrol, 2.409, 10 ppm 1.45) görülmektedir.

Propranolol test edilen diğer beta blokerlere göre çok daha düşük konsantrasyonlarda etki göstermiştir. Uygulanan ilk konsantrasyon olan 0,1 ppm kontrol grubuna göre embriyo başına düşen mitoz hücre sayısında %150 azalmaya neden olmuştur (kontrol, 3.42, 0.1 ppm için 1.34). İnterfaz evresinde kalan ortalama hücre sayısı propranololün en düşük konsantrasyonunda 1.03 iken en yüksek konsantrasyonunda 2 katından fazla bir artışla 2,15 değerine ulaşmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Propranolol, için elde edilen genotoksisite sonuçları. EBM: Embriyo başına düşen mitoz sayısı, % IE: İnterfaz evresindeki hücrelerin yüzde değeri, M/A: Metafaz evresindeki hücrelerin Anafaz evresindeki hücelere oranı, % TMB/EMB: embriyo başına düşen toplam mitotik bozukluk.

Grup	EDM	%IE	M/A	%TMB/EMB
Kontrol	3,428	0,85	2,409	0,018
0,1 ppm	1,344	1,48	1,51	0,024
0,25 ppm	1,067	1,01	1,72	0,106
0,5 ppm	2,033	1,26	1,55	0,048
1 ppm	1,844	1,26	1,44	0,036
1,5 ppm	2,222	1,7	1,27	0,061
2 ppm	1,311	1,59	1,42	0,087
2,5 ppm	1,000	2,15	2,43	0,057

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 3 katlık bir artış olduğu görülmektedir (Kontrol grubu 0.85 ve 2.5 ppm için 2.15). Mitoz sürecindeki hücrelerde meydana gelen mitotik hasarlar Atenolol uygulanan gruptakine benzer olarak konsantrasyon artışına bağlı olarak artmamıştır. 0.1 ppm Propranolol uygulanan grupta ortalama hücre sayısı 0.024 iken 2 ppm uygulanan grupta 0.087 ve 2.5 ppm uygulanan grupta ise 0.057 değerine ulaşılmıştır. Propranolol uygulanan deniz kestanesi embriyolarında Metafaz evresindeki hücrelerin Anafaz evresindeki hücelere oranında kontrol grubuyla 0.1 ppm'lik grup arasında yaklaşık % 60'lık bir azalma görülmüştür (Kontrol, 2.409 ve 0.1 ppm 1.51).

Metaprolol uygulanan deniz kestanesi embriyolarının hücrelerinde meydana gelen sitotoksik etkiler incelendiğinde, mitozdaki hücre sayısını, uygulanan ilk konsantrasyonun propranolole benzer şekilde yaklaşık 1,5 misli düşürdüğü görülmüştür (Kontrol, 3.42 ve 10 pmm 1.4). Embriyo başına düşen mitoz evresindeki hücre sayısı artan konsantrasyonlarla birlikte azalış göstermiştir. İnterfaz evresinde bulunan ortalama hücre sayısı 10 ppm olan ilk konsantrasyonda 1.67 iken 100 ppm olan en yüksek konsantrasyonda 3.22 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.3. Metaprolol için elde edilen genotoksisite sonuçları. EBM: Embriyo başına düşen mitoz sayısı, % IE: İnterfaz evresindeki hücrelerin yüzde değeri, M/A: Metafaz evresindeki hücrelerin Anafaz evresindeki hücrelere oranı, % TMB/EMB: embriyo başına düşen toplam mitotik bozukluk.

Grup	EBM	%IE	M/A	%TMB/EMB
Kontrol	3,43	0,85	2,409	0,018
10 ppm	1,4	1,67	1,56	0,040
20 ppm	1,32	2,15	2,83	0,039
40 ppm	1,36	1,41	1,79	0,065
60 ppm	1,33	1,38	1,76	0,067
80 ppm	0,51	2,33	3,07	0,018
100 ppm	0,04	3,22	4	0,001

İnterfaz evresinde kalan ortalama hücre sayısı kontrol grubuna göre doz gruplarında artış göstermiştir. Ancak bu artışlar konsantrasyon artışlarıyla paralellik göstermemiştir (40 ppm ve 80ppm sırasıyla 1.79 ve 1.76). Bununla birlikte Tabla 3.3' de görüldüğü gibi en yüksek konsantrasyon olan 100 ppm ile kontrol grubu karşılaştırıldığında 4 katlık bir artış olmuştur (0.85 kontrol grubu ve 3.22 100 ppm grubu). Embriyo başına düşen toplam mitotik bozuklukların ortalama sayıları 10 ppm'lik ilk konsantrasyonda artış gösterirken daha yüksek konsantrasyonlarda benzer artışlar görülmemiştir (0.018 kontrol grubu, 0.04 değeri 10 ppm).

Test edilen beta blokerlerden nadolol deniz kestanesi embriyolarında mitoz süreci üzerine çeşitli düzeylerde hasarlar oluşturmuştur (Çizelge 3.4). Uygulanan dozlardan 60 ppm ve sonrasındaki konsantrasyonlarda metafaz safhasına geçen hücreye rastlanılmamıştır. 0 ppm'lik ilk konsantrasyondaki ortalama mitoz safhasındaki hücreler kontrol grubuna göre 4 kat azalmıştır. İnterfaz evresindeki hücreler ise artmıştır (0.85 kontrol grubu ve 3.33 100 ppm grubu için).

Nadolol digger beta bloker etkili ilaçlara göre hücrelerin interfaz evresini geçememesinde daha keskin etkiler yaratmıştır. Nadolol uygulanan deniz kestanesi embriyolarında metafaz evresindeki hücrelerin anafaz evresindeki hücrelere oranında kontrol grubuyla 10 ppm'lik grup arasında yaklaşık % 55'lik bir azalma görülmüştür (Kontrol, 2.409 ve 10 ppm 1.46).

Çizelge 3.4. Nadolol için elde edilen genotoksisite sonuçları. EBM: Embriyo başına düşen mitoz sayısı, % IE: İnterfaz evresindeki hücrelerin yüzde değeri, M/A: Metafaz evresindeki hücrelerin Anafaz evresindeki hücelere oranı, % TMB/EMB: embriyo başına düşen toplam mitotik bozukluk

Grup	EBM	%IE	M/A	%TMB/EMB
Kontrol	3,43	0,85	2,409	0,0180
10 ppm	0,88	2,33	1,46	0,0248
20 ppm	1,66	1,63	1,6	0,0344
40 ppm	0,49	2,48	0,98	0,0152
60 ppm	0	3,33	0	0
80 ppm	0	3,33	0	0
100 ppm	0	3,33	0	0

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Dünya nüfusundaki aşırı artış ve yaşam kalitesindeki yükselmenin belirgin sonuçlarından biri de tedavi ve önleyici amaçla kullanılan ilaç veya farmasötik kullanımının artmasıdır. Tüm dünyada insanlar çeşitli ilaç gruplarını düzenli olarak almakta ve çevreye yaymaktadır. İlaç endüstrisi 2010 yılı itibariye 880 milyar dolarlık bir büyüklüğe ulaşmıştır (IMAP, 2011). Beta bloker etkili ilaçlar, tüm dünyada çok kullanılan ilaç gruplarının başında gelmektedir. Sadece Fransa’da bir yılda 35 ton propranolol piyasaya sunulmuştur (Miege et al, 2006). Ülkemizde yaklaşık 2 milyon kişi bu hastalıklar nedeniyle tedavi görmektedir. İlaçlar, özellikle parçalanmaya karşı dirençli olacak şekilde ve düşük konsantrasyonlarda biyolojik etki göstermek üzere tasarlanırlar (Khetan ve Collins, 2007). Bu özellikleri ilaçların çevresel hasar oluşturma potansiyellerini arttırmaktadır. İlaçların çevresel konsantrasyonlarının her geçen gün arttığı bilinmektedir. Kütle spektrometresi gibi gelişen yeni analitik yöntemler farmasötiklerin ng/l seviyesinde belirlenmesine olanak sağlamıştır (Dzialowski et al, 2006).

Beta bloker etkili ilaçların deniz kestanesi fertilizasyon başarısını anlamlı bir şekilde düşürdüğü görülmüştür. Yapılan spermiyotoksisite çalışmasında; düzeltilmiş endeks değerinin negatif olması kimyasalın fertilizasyon başarısı üzerinde olumsuz etki yarattığının bir göstergesidir (Arslan, 2005).

Atenolol, beta 1 tip reseptöre özel seçici bir beta bloker etkili bileşiktir. Molekül ağırlığı 266 g/mol olan bu kimyasal oldukça yaygın kullanıma sahiptir. Hidrofilik özellikte olan Atenolol % 90 oranında değişmeden böbreklerden atılmaktadır. Cluvers (2005), *Lemna minor* ile yaptığı çalışmada büyüme inhibisyonu için 320 mg/l konsantrasyonunun NOEC değeri olduğunu ve *Desmodesmus subspicatus* için EC₅₀ değerinin 620 mg/l olarak hesaplandığını bildirmiştir. Fotosentetik canlıların toksikantlara karşı hassasiyetlerinin farklı olmasından ötürü kendi çalışmamızla ilişkili olabilecek omurgasız canlılarla yapılan çalışmalara bakılmıştır. Taranan çeşitli veritabanlarında Atenololün omurgasız canlılar üzerine toksik etkilerinin incelendiği az sayıda yayına ulaşılabilmektedir. Tatlı su kinideryası *H. vulgaris* ile yapılan 7 günlük toksisite

çalışmasında polip yapısı üzerine LOEC değeri yine 10 mg/l olarak bulunurken balıklardan *Pimephales promelas* ile yapılan 28 günlük çalışmada büyüme üzerine LOEC değeri 10 mg/L olarak hesaplanmıştır (Winter et al., 2006; Owen et al., 2007 ve Pascoe et al., 2003). Yaptığımız çalışmada ise deniz kestanesi *Paracentrotus lividus* için embriyotoksisite üzerine EC₅₀ değeri 33,8 mg/l olarak hesaplanmıştır. Bulunan bu sonuç literatür verileri ile paralellik göstermekte olup krustase grubuna dahil bir omurgasız olan *Ceriodaphnia dubia* ile yapılan denemede elde edilen 33,4 mg/l EC₅₀ değeri ile örtüşmektedir (Khetan ve Collins, 2007). Atenololün çevresel derişimleriyle karşılaştırıldığında bu kimyasalın hasar oluşturma potansiyelinin nispeten düşük olduğu sonucu; genel olarak yapılan toksikolojik çalışmalarda ve derlemelerde belirtilmektedir (Carlsson et al., 2006; Cleuvers, 2005 ve Dzialowski et al., 2006).

Propranolol, moleköl ağırlığı 295,3 g/mol olan hidrofobik karakterde seçici tipte bir beta adrenerjik reseptör antagonistidir. Diğer beta bloker etkili ilaçlarla karşılaştırıldığında propranololun daha toksik olduğu bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda hesaplanan EC₅₀ değerleri atenolol veya metaprololden oldukça düşüktür (Sanderson and Thomsen, 2009; Dorne et al., 2007; Dzialowski et al., 2006; Cleuvers, 2005). Propranolol ile yapılan akut çalışmalarda birbirinden farklı değerler elde edilmiştir. Huggett ve diğ. (2002) *Oryzias latipes*, *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia magna* ve *Hyaella azteca* kullanarak propranololün olası etkilerini araştırmışlardır. Elde ettikleri verilere göre; 0,5 mg/l' lik derişim medaka balığında büyümeyi engellemiş, 0,25 mg/l derişim ise; *Ceriodaphnia dubia*'da üremeyi olumsuz etkilemektedirler. Su piresinde (*Daphnia magna*) ise 1,6 mg/l LC₅₀ değerini bulmuşlardır. Deniz kestanesi *Paracentrotus lividus* embriyoları ile yapılan çalışmadan elde ettiğimiz verilere göre; embriyotoksisite için EC₅₀ değeri 0,232 mg/l olarak bulunmuştur. Bulduğumuz bu değer; Dorne ve diğ., (2007)'nin su piresi *D. magna* ile yaptıkları üreme ve büyüme üzerine etkilerin incelendiği çalışmada bulunan sırasıyla 0,11 ve 0,44 mg/l EC₅₀ değerleri ile paralellik göstermektedir. Propranolol hedef olmayan organizmalarda kalp fizyolojisinin bozulmasına neden olabilmektedir. *Daphnia magna*'nın propranololün 0,055 mg/l derişiminde kalp atış hızında belirgin azalmalar olduğunu gözlemleyen Dzialowski et al. (2006), tıpkı Dorne ve diğ. (2007) gibi 0,44 mg/l' lik propranolol derişiminin büyümeyi olumsuz yönde etkilediğini ileri sürmüşlerdir.

Propranololun sucul sistemdeki derişimleri 0,01 – 0,2 µg/l arasında değişmektedir (Kot – Wasik et al., 2007). Biyobirikim eğilimi dikkate alındığında ve toksisitesi 1 mg/l altında olduğundan propranololun çevresel hasar oluşturma riski nispeten daha yüksektir ve dikkat edilmesi gereken kimyasallardandır.

Metoprolol 267,364 g/mol moleköl ağırlığına sahip tip1 beta reseptörüne özgü bir beta bloker etkili ilaçtır. Lipofilik özelliği orta derecede ve yarılanma ömrü insanda düşüktür (Anonim, 2009c). Metoprolol ile yapılan çalışmalar son derece kısıtlıdır. *H. azteca* ile yapılan 48 saatlik LC₅₀ çalışmasında Huggett et al., (2002) metoprololün canlılık üzerine etkili olmadığını (>100 mg/l) ancak su piresinde 68 mg/l'lik derişimin olumsuz etkilere yol açabileceğini belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar metoprololün medaka balığında ölüm oranlarını arttırmadığını belirtmişlerdir. Metoprolol sucul alglerin büyümesi üzerine olumsuz etkilere neden olabilmektedir. Alglerde 7,3 mg/l EC₅₀ değerini saptayan Cleuvers (2005), *Daphnia* için 100 mg/l üzerindeki değerlere ulaştığından toksisite görülmediğini rapor etmiştir. Yaptığımız çalışmada ise; *P. lividus* embriyolarında EC₅₀ değeri 9,32 mg/l olarak hesaplanmıştır. Cleuvers (2005) yaptığı bir çalışmada *D. magna* için EC₅₀ değerini 438 mg/l olarak bulurken aynı canlı için istatistiksel olarak tahmin edilen değerin 8,2 mg/l olması gerektiğini belirtmiştir.

Nadolol seçici olmayan tipte bir beta bloker etkili ilaçtır. OECD sınıflandırmasına göre Atenolol gibi toksik olmayan sınıfta yer almaktadır. Yapılan çalışmalarda EC₅₀ değerleri Propranolol<Metoprolol<Atenolol<Nadolol şeklinde sıralanmaktadır. Buna göre; atenolol ile aynı sınıfta yer aldığı bildirilen nadolol, yaptığımız çalışmada da deniz keşanesi embriyo gelişimi üzerine atenololden daha toksik olduğu saptanmıştır.

Beta adrenerjik reseptör antagonist etkili ilaçların genotoksik etkilerinin incelenmesinde çoğunlukla omurgalı canlılar hatta memeliler kullanılmıştır (Robbiano et al., 1991; Telez et al, 2000 ve Brambelli and Martelli, 2005). Çeşitli veritabanlarının taranması sonucu sucul omurgasızlarla yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Sitotoksosite çalışmalarında konsantrasyon arttıkça embriyo başına düşen mitoz hücre sayısı azalmış buna bağlı olarak embriyo başına düşen mitotik hasarlı hücre sayısı da azalmıştır. Ancak mitoz görülen hücrelerdeki hasar oranı artmıştır. Artan konsantrasyonlara bağlı olarak interfaz

evresinde kalan hücre sayısı da artmıştır (Atenolol; 1.03-3.33, Propranolol; 1.48 – 2.15, metaprolol 1.6 -3.2 ve nadolol; 2,33 – 3,33).

Elde edilen tüm sonuçlara bakıldığında test edilen beta bloker etkili ilaçların deniz kestanesi embriyo gelişimi üzerine etkili olduğu ve bu etkinin, tüm embriyo, larva gelişimi ve hücresel toksisite düzeyinde kendini gösterdiği söylenebilir. Genel olarak, ilaçların akut toksisiteden çok kronik veya subkronik etkiler yarattığı yönünde bir görüş birliği vardır (Franzellitti et al., 2011).

İlaçlar; bitkilerin, hayvanların ve insanların sağlıklarını korumak büyüme ve gelişmelerini iyileştirmek için kullanılan doğal veya sentetik yollardan elde edilen kimyasallardır. Bu grup kimyasalların sağladığı yararlar göz ardı edilemez ve yaşam kalitesinin artırılmasında vazgeçilmez bir öneme sahip oldukları da bilinen bir gerçektir. Bununla birlikte; hiçbir canlı varlık ekosistemin diğer ögeleri olmadan yaşayamaz. Ekosistemler, canlılığın devamında hatta var olmasında kritik önemdedir. Son yıllarda ekolojik çalışmaların artması ve önem kazanması, çevresel kirleticilerin etkilerinin ekosistem ölçeğinde değerlendirilmesi bu temele dayanmaktadır. Ekosistem sağlığının değeri klasik ekonomik modellerle açıklanamaz. İnsanoğlu artık çevreyi yok sayarak sürdürülebilir bir gelişme sağlayamayacağını hatta hiçbir gelişme olamayacağını anlamıştır. Kirlilik, tüm sektörlerde maliyetleri artırma ve ürün verimliliğinin azalmasına neden olan önemli bir olgudur.

İlaç ve etken maddelerinin diğer endüstriyel kimyasallar gibi kullanımlarının yasaklanması veya azaltılması mümkün olmadığı gibi akılcı da değildir. Bununla birlikte; ilaç etken maddelerinin tasarlanırken doğa ile uyumlu ve hedef olmayan organizma üstüne etkilerinin azaltılması yönünden tedbirler alınması zorunluluktur. Aksi takdirde yaşam kalitesini sürdürmek bir yana yaşanılacak bir ortam bile bulamama durumunda olacağız.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alder, A. C., Richle, P., Mcardell, C. S. and Giger, W.,** 2005, Betablockers in Municipal Wastewaters in Switzerland Concentrations and Loads in a WWTP Comparison of PECs and MECs in Raw Wastewater, 8600.
- Andreozzi, R., Raffaele, M. and Nicklas, P.,** 2003, Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*, 50 (10), 1319-30.
- Anonim** 2012a, <http://www.cdc.gov/nchs/fastats/lcod.htm/> (Erişim Tarihi: 10.06.2012)
- Anonim,** 2012b. http://en.wikipedia.org/wiki/Adrenergic_receptor. (Erişim tarihi: 10.06.2012).
- Anonim,** 2012c. <http://pharmacologycorner.com/beta-receptors-1-2-3/>. (Erişim Tarihi: 21.07.2012).
- Anonim,** 2012d. Mechanism of Action of Beta blockers. [www.buzzle .com](http://www.buzzle.com) by Simita Pandit, (Erişim Tarihi 16.072012).
- Arslan, O. C. and Parlak, H.,** 2007, Embryotoxic effects of nonylphenol and octylphenol in sea urchin *Arbacia lixula*. *Ecotoxicology*, 16(6), 439-444 pages.
- Bartelt-Hunt, S. L., Snow, D. D., Damon, T., Shockley, J. and Hoagland, K.,** 2009, The occurrence of illicit and therapeutic pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters in Nebraska. *Environmental pollution* (Barking, Essex : 1987), 157(3), 786–91. doi:10.1016/j.envpol.2008.11.025.
- Beechinor, J.G.,** 2011, Report on Consumption of Veterinary Antimicrobial Drugs in Ireland in 2009, Irish Medicines Board, <http://www.imb.ie/images/uploaded/documents/Report%20on%20Consumption%20of%20Veterinary%20Antimicrobial%20Drugs%20in%20Ireland%20in%202009.pdf> (Erişim tarihi: 10.05.2012).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Birleşmiş Milletler**, 1999, Population Division Department of Economic and Social Affairs United Nations Secretariat ESA/P/WP.154, The World at Six Billion. 1999., <http://www.un.org/esa/population/publications/sixbillion/sixbilpart1.pdf>
- Bnc, P., Jm, C. and Graham, B.**, 2001, Beta-blockers in the third millennium - when are they really indicated. *Journal of Clinical and Basic cardiology*, 4(1), 3–9 pages.
- Bonnet A.** 1925, Documents pour servir a l etude des variations chez les Echinides. *Bull Inst. Oceanogr* 462: 1 – 28 pages.
- Boudouresque CF. and Verlaque M.**, 2001, Ecology of *Paracentrotus lividus*. John Miller Lawence (ed) Elsevier Science B.V Amsterdam, 177-183 pages.
- Boudouresque CF., Verlaque M., Azzolina JF., Meinesz A., Nedelec H., Rico V.**, 1989, Evolution des populations de *Paracentrotus lividus* et d'*Arbacia lixula* (Echinoidea) le long d'un transectpermanent a Galeria (Corse). *Trav. Sci. Parc. Nat. Reg. Res Nat Corse* 22; 65 – 82 pages.
- Bound, J. P. and Voulvoulis, N.**, 2004, Pharmaceuticals in the aquatic environment--a comparison of risk assessment strategies. *Chemosphere*, 56 (11), 1143-55 pages. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.05.010
- Boxall, A.B.A.**, 2004, The Environmental Side Effects of Medication. *EMBO Rep.* 5, 1110 – 1116 pages.
- Bökesoy T.A., Çakıcı İ., Melli M.**, 2000, *Farmakoloji Ders Kitabı*. Gazi Kitabevi - Ankara.
- Bresch, H. and Arendt U.**, 1977, Influence of different organochlorine pesticides on the development of the sea urchin embryo. *Environmental Research*, 13, (1), 121-128 pp., ISSN 0013-9351, 10.1016/0013-9351(77)90010-X.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Campbell, N.A. and Reece, J.B.**, 2006, *Biyoloji* 6. Baskı, Benjamin Cummings – Pearson Education, USA pp. 1247.
- Cooper, G.M. and Hausman, R.E.**, 2006. *Hücre Moleküler Yaklaşım* 3. Baskı, Boston University Press, Usa 714 pp.
- Daughton C.G. and Brooks B.W.**, 2011, "Active Pharmaceutical Ingredients and Aquatic Organisms," In: *Environmental Contaminants in Biota: Interpreting Tissue Concentrations*, W. Nelson Beyer and James P. Meador (Eds.), 2nd ed., CRC Press, Taylor and Francis, Boca Raton, FL; Chapter 8, p 286-347.; <http://www.taylorandfrancis.com/books/details/9781420084054>
- Daughton, C. G. and Ternes, T. A.**, 1999, Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? *Environ. Health Perspect.*, 107, 907-938.
- Deeb, S. S.**, 1972, Inhibition of cleavage and hatching of sea urchin embryos by serotonin. *J. Exp. Zool.*, 181: 79–86. doi: 10.1002/jez.1401810109.
- Delmas P. and Regis M.B.**, 1985, Impact of a massive domestic pollution on the biology and morphometry of the echinoid *Paracentrotus lividus*: preliminary data [urchin; sewage of Marseille's conurbation outlet, Mediterranean Sea; France]. *Comp. Rendus de l'Academie des Sciences Serie 3 Sci. de la Vie*
- Dzialowski, E. M., Turner, P. K. and Brooks, B. W.**, 2006, Physiological and reproductive effects of beta adrenergic receptor antagonists in *Daphnia magna*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 50(4), 503-10. doi:10.1007/s00244-005-0121-9
- Frishman WH.**, 2008, Fifty years of beta-adrenergic blockade: a golden era in clinical medicine and molecular pharmacology (commentary). *Am J Med.*;121:933-934.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Garman, G. D., Anderson, S. L. and Cherr, G. N.,** 1997, Developmental abnormalities and DNA-protein crosslinks in sea urchin embryos exposed to three metals, *Aquatic Toxicology*, 39 (3–4), 247-265 Pages, ISSN 0166-445X.
- Geng Y.J., Ishikawa Y., Vatner D.E., et al.,** 1999, Apoptosis of cardiac myocytes in Gs transgenic mice. *Circ Res* 84: 34–42.
- Gustafson T. and Toneby M.,** 1970, On the role of serotonin and acetylcholine in sea urchin morphogenesis, *Experimental Cell Research*, 62(1), 102-117 pages, ISSN 0014-4827, 10.1016/0014-4827(79)90512-3.
- Hagström, B. E. and Lönning, S.,** 1973, THE SEA URCHIN EGG AS A TESTING OBJECT IN TOXICOLOGY. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 32: 1–49. doi: 10.1111/j.1600-0773.1973.tb03312.x
- Helfand, M., Peterson, K., Christensen, V. and Dana, T.,** 2009, Drug Class Review Beta Adrenergic Blockers, Final Report Update (July). Oregon Health & Science University.
- Hinegardner R.T.,** 1969, Growth and Development of the Laboratory Cultured Sea Urchin *Biological Bulletin* 137(3), 465-475 pp. Published by: Marine Biological Laboratory.
- Huerta, B., Rodríguez-Mozaz, S. and Barceló, D.,** 2012, Pharmaceuticals in biota in the aquatic environment: analytical methods and environmental implications. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 404(9), 2611-2624 pages, doi:10.1007/s00216-012-6144-y.
- Huggett D.B., Brooks B.W., Peterson B., Foran C.M., Schlenk D.,** 2002, Toxicity of select beta adrenergic receptor-blocking pharmaceuticals (beta-blockers) on aquatic organisms. *Arch. Environ. Contain. Toxicol.* 43, 229–235.
- IFPMA,** 2011, International Federation of Pharmaceutical Manufacturers & Associations. http://www.ifpma.org/fileadmin/content/Publication/IFPMA_2011_Data_Exclusivity__En_Web.pdf (Erişim tarihi: 01.06.2012)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jenkinson, D.H.**, 1991, How we describe competitive antagonists: three questions of usage. *Trends in Pharmacological Sciences* 12 53-54 pages.
- Jones O.A.H, Voulvoulis N., Lester J.N.**, 2007, Ecotoxicity of pharmaceuticals. *Comprehensive Analytical Chemistry* 50, Petrovic and Barcelo (Eds).
- Jørgensen, S.**, 2000, Drugs in the environment. *Chemosphere*, 40(7), 691-699. doi:10.1016/S0045-6535(99)00438-5.
- Kibbey, T. C. G., Paruchuri, R., Sabatini, D. A. and Chen, L.**, 2007, Adsorption of beta blockers to environmental surfaces. *Environmental science & technology*, 41(15), 5349–56.
- Kobayashi N. and Okamura N.**, 2005, Effects of heavy metals on sea urchin embryo development. Part 2. Interactive toxic effects of heavy metals in synthetic mine effluents. *Chemosphere* vol:61(8), 1198 – 1203.
- Kobayashi, N.**, 1980, Comparative sensitivity of various developmental stages of sea urchins to some chemicals. *Journal of Marine Biology*, 58(3), 163 – 171, Doi: 10.1007/BF00391872.
- Kot-Wasik, A., Dębska, J. and Namieśnik, J.**, 2007, Analytical techniques in studies of the environmental fate of pharmaceuticals and personal-care products. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(6), 557-568. doi:10.1016/j.trac.2006.11.004
- Kramer, S.N.**, 1957, *L'histoire commence á Sumer*, The Falcon's Wing Press, Indian Hills, Colorado, pp. 313.
- Kümmerer, K.**, 2009, Antibiotics in the aquatic environment--a review--part I. *Chemosphere*, 75(4), 417-34. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.11.086
- Livingston, B. T.**, 1989, Lithium Evokes Expression of Vegetal-Specific Molecules in the Animal Blastomeres of Sea Urchin Embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(10), 3669–3673.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ma, Y.C. and Huang X.Y.**, 2002, Novel Signaling Pathway Through the β - Adrenergic Receptor. TCM. 12(1), 46 – 49 pages.
- Mehvar, R. and Brocks, D. R.**, 2001, Stereospecific pharmacokinetics and pharmacodynamics of beta-adrenergic blockers in humans. Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société canadienne des sciences pharmaceutiques, 4(2), 185–200.
- Mersmann, H.J.**, 1998, Overview of the effects of beta-adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. J. ANIM. SCI. 1998, 76:160-172.
- Miller, G.T.**, 1991, Environmental Science Sustaining the Earth, Wadsworth Pub. Com., California USA, 465 p.
- Oetken, M., Nentwig, G., Löffler, D., Ternes, T. and Oehlmann, J.**, 2005, Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part I. The antiepileptic drug carbamazepine. Archives of environmental contamination and toxicology, 49(3), 353–61. doi:10.1007/s00244-004-0211-0.
- Okay, O. S., Li, K., Yediler, A. and Karacik, B.**, 2012, Determination of selected antibiotics in the Istanbul strait sediments by solid-phase extraction and high performance liquid chromatography. Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering, 47(10), 1372–80. doi:10.1080/10934529.2012.672303.
- Owen, S.F., Giltrow, E., Huggett, D.B., Hutchinson, T.H., Saye, J., Winter, M.J., Sumpter, J.P.**, 2007, Comparative physiology, pharmacology and toxicology of beta- blockers: mammals versus fish. Aquat. Toxicol. 82, 145–162.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Özlem, Ç. A. and Hatice, P.** 2008, Effects of bisphenol A on the embryonic development of sea urchin (*Paracentrotus lividus*). *Environ. Toxicol.*, 23: 387–392. doi: 10.1002/tox.20349.
- Pagano G., Esposito A., Giordano G.G., Hagström B.E.,** 1978, Embryotoxic and teratogenic effects of styrene derivatives on sea urchin development. *Scand J Work Environ Health* 1978;4 suppl 2:136-141 doi:10.5271/sjweh.2753.
- Parlak H., Arslan O.C, Boyacıoğlu M., Karaaslan M.A.,** 2009, Ekotoksikoloji. Ege Üniversitesi Basımevi Bornova, İzmir. syf.289-306.
- Pinna S., Ceccherelli G. and Sechi N.,** 2006, Investigating on the occurrence of *Paracentrotus lividus* in rocky and *Posidonia oceanica* habitat. 16th Meeting of the Italian Society of Ecology.
- Pistell A.,** 2007, The Dilemma of Waste Pharmaceuticals. Presentation at Marine Department of environmental Protection, (207)287 287-7703. <http://www.neiwpsc.org/ppcpconference/ppcp-docs/AnnPistell.pdf> (Erişim tarihi 02.08.2012).
- Ramil, M., El Aref, T., Fink, G., Scheurer, M. and Ternes, T. A.,** 2010, Fate of beta blockers in aquatic-sediment systems: sorption and biotransformation. *Environmental science & technology*, 44(3), 962–70. doi:10.1021/es9027452.
- Saotome, K., Sofuni, T., Hayashi, M.** 1999, A micronucleus assay in sea urchin embryos. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 446(1), 121-127.
- Skeberdis, V. A.,** 2004, Structure and function of beta – adrenergic receptors. *APŽVALGINIAI STRAIPSNIAI, Medicina* 40(5), 407-413.
- Sun, L., Zha, J., Spear, P. A. and Wang, Z.,** 2007, Tamoxifen effects on the early life stages and reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental toxicology and pharmacology*, 24(1), 23-9. doi:10.1016/j.etap.2007.01.003.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tarazona, J.V., Escher, B.I., Giltrow, E., Sumpter, J., Knacker, T.,** 2010, Targeting the environmental risk assessment of pharmaceuticals: facts and fantasies. Integrated Environmental Assessment and Management Accepted Article Online: Feb 1 2010, DOI: 2010.1002/ieam.2059.
- Türk Dil Kurumu,** 2008, www.tdk.gov.tr (Erişim tarihi: 15.05.2012).
- Ternes, T.,** 1998, Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers, *Water Res.* 32 (11), 32.
- Triebkorn, R., Casper, H., Scheil, V. and Schwaiger, J.,** 2007, Ultrastructural effects of pharmaceuticals (carbamazepine, clofibric acid, metoprolol, diclofenac) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Analytical and bioanalytical chemistry*, 387(4), 1405–16. doi:10.1007/s00216-006-1033-x.
- Türkiye İstatistik Kurumu,** 2012, Sayı: 13140 <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=13140> 11/07/2012 (Erişim Tarihi: 25.07.2012)
- World Health Organisation,** 2009, ATC/DDD Index. http://www.whooc.no/atc_ddd_index/ (erişim Tarihi: 27.07.2012).
- Wollenberger, L., Halling-Sorensen, B., Kusk, K.O.,** 2000, Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 40, 723–730.
- Yamamoto, H., Nakamura, Y., Moriguchi, S., Nakamura, Y., Honda, Y., Tamura, I., Hirata, Y., Hayashi, A., Sekizawa, J.,** 2009, Persistence and partitioning of eight selected pharmaceuticals in the aquatic environment: Laboratory photolysis, biodegradation, and sorption experiments. *Water Res.*, 43, 351–362.
- Yaukey, D. and Douglas L. A.,** 2001, *Demography: The Study of Human Population*. Prospect Heights, IL: Waveland.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Zuccato E., Castiglioni S., Fanelli R., Reitano G., Bagnati R., Chiabrando C., Pomati F., Rossetti C., Calamari D., 2006, Pharmaceuticals in the environment in Italy: causes, occurrence, effects and control. Environ. Sci. Pollut. Res.;13(1):15–21.

ÖZGEÇMİŞ

Muhammet Ali Karaaslan 1980 yılında İstanbul’ da doğmuştur. Lisans eğitimini Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde tamandıktan sonra aynı bölümde yüksek lisans eğitimini bitirmiştir. Doktora eğitimine 2006 yılında Ege Üniversitesi Su ürünleri Fakültesinde başlamıştır. Evli ve 2 çocuk babası olan Muhammet Ali Karaaslan 2010 yılında başlamış olan Araştırma Görevliliğine halen devam etmektedir.