

**T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
HİDROBİYOLOJİ BİLİM DALI**

**İZMİR KÖRFEZİNDE YAŞAYAN MİDYE (*Mytilus galloprovincialis* Lamark, 1819)
TÜRÜNDE KİRLİLİĞİN İMMÜN SİSTEM HÜCRELERİNE ETKİLERİ**

Melike Merve AYHAN

**Danışman
Doç. Dr. Selma KATALAY**



MANİSA-2019

**Melike Merve
AYHAN**

**İZMİR KÖRFEZİNDE YAŞAYAN MİDYE (*Mytilus galloprovincialis* Lamark, 1819)
TÜRÜNDE KIRILICIĞIN İMMÜN SİSTEM HÜCRELERİNE ETKİLERİ**

2019

TEZ ONAYI

Melike Merve AYHAN tarafından hazırlanan " **İZMİR KÖRFEZİNDE YAŞAYAN MİDYE (*Mytilus galloprovincialis* Lamark, 1819) TÜRÜNDE KİRLİLİĞİN İMMÜN SİSTEM HÜCRELERİNE ETKİLERİ**"adlı tez çalışması **08.01.2019** tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman

Doç. Dr. Selma KATALAY
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi

Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU
Ege Üniversitesi

Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Ü. Fatma KOÇBAŞ
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

TAAHHÜTNAME

Bu tezin Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Melike Merve AYHAN



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	I
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	IV
ŞEKİL DİZİNİ.....	V
TABLO DİZİNİ.....	VI
TEŞEKKÜRLER.....	VII
ÖZET.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Biyo İzleme	4
2.2. Biyogösterge	4
2.2.1. Maruziyetin Biyogöstergeleri.....	5
2.2.2. Duyarlılığın Biyogöstergeleri.....	5
2.2.3. Etkinin Biyogöstergeleri	6
2.2.4. Hematotoksisite Biyogöstergeleri	6
2.3. Biyomarker Çeşitleri	6
2.4. Hemolenf Nedir ?.....	7
2.5. Omurgasız İmmünolojisi.....	8
2.6. Çift Kabuklu Yumuşakçaların İç Savunma Sistemleri	9
2.6.1. Çift Kabuklu Yumuşakçaların Hemositlerinin Özellikleri	9
2.6.1.1. Agranülosit.....	11
2.6.1.2. Granülosit.....	11
2.7. Doku Hasarına Yanıtlar.....	12
2.8. Genotoksisite.....	14
2.8.1. Mikronukleus Testi	15
2.8.1.1. MN Testinin İyi Bir Biyobelirteç Olarak Kabul Eden Sözleşmeler ve Kurullar.....	16
2.8.1.2. Mikronukleus Testinin Önemi.....	17
2.8.1.3. Mikronukleus Oluşum Mekanizması.....	18
2.8.1.4. Mikronukleus Testinin Avantajları ve Dezavantajları.....	19

2.8.1.5. Temel Mikronukleus Tanımlama Kriterleri.....	20
2.8.1.6. MN Testinin <i>Mytilus galloprovincialis</i> 'de Uygulanma Protokolü.....	20
3. MATERYAL VE METOD	22
3.1. Hayvanların Seçimi ve Toplanması	22
3.1.1. <i>Mytilus galloprovincialis</i> (Lamark, 1819) Genel Özellikleri.....	22
3.1.1.1. Sistematigi.....	22
3.1.1.2. Üremesi.....	26
3.1.1.3. Beslenmesi.....	27
3.1.1.4. Solunumu.....	27
3.2. Kan Örneklerinin Alınması.....	27
3.3. Arazi Haritası ve Arazi Genel Özellikleri.....	28
3.4. Diferansiyel Hemosit Sayımı	29
3.5. Wright Boyama Hazırlama ve Wright Boyama	29
3.6. Mikronukleus Testi	29
3.7. Giemsa Boyama	30
3.8. Total Hemosit Sayımı	30
3.9. Diff-Quick Boyama.....	31
4. BULGULAR	32
4.1. Total Hemosit Sayımı	32
4.2. Diferansiyel Hemosit Sayımı.....	34
4.2.1. İstasyonlara Göre İstatiksel Olarak Agranülosit Hemositlerin Karşılaştırılması.....	38
4.2.2. İstasyonlara Göre İstatiksel Olarak Bazofilik Granülosit Hemositlerin Karşılaştırılması	40
4.2.3. İstasyonlara Göre İstatiksel Olarak Eozinofilik Granülosit Hemositlerin Karşılaştırılması	42
4.3. Mikronukleus ve Nukleus Anomalileri	44
4.3.1. İstasyonlara Göre İstatiksel Olarak Mikronukleus Frekanslarının Karşılaştırılması	46
4.3.2. İstasyonlara Göre İstatiksel Olarak Binukleus Frekanslarının Karşılaştırılması.....	48
4.3.3. İstasyonlara Göre İstatiksel Olarak Nükleer Bud (NB) Frekanslarının Karşılaştırılması	50

5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	65
7. KAYNAKLAR	66
8. ÖZGEÇMİŞ.....	85



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AG	Agranülosit
BG	Bazofilik Granülosit
BN	Binukleus
Cu	Bakır
Cd	Kadmiyum
Cu⁺²	Bakır (II)
Cr (VI)	Kromium, Krom (VI)
CdCl₂	Kadmiyum klorür
DHS	Differeansiyel Hemosit Sayısı
EG	Eozinofilik Granülosit
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods
EMA	European Medicines Agency
HELCOM	Helsinki Komisyonu
HY	Hyalinosit
HYC	Hermosiyanin
MED POL	Akdeniz Kirliliği
MN	Mikronukleus
NB	Nüleer Bud
OECD	Organisation for Economic Operation and Development
RAMOGEPOL	Rapheal Monoca Cenova Kirliliği Programı
THS	Toplam Hemosit SayısıAvrupa Birliği
UNEP	Birleşmiş Milletler Çevre Programı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Omurgasız Dolaşım Sistemi	7
Şekil 2.2. OECD MN testi kabul belgesi	17
Şekil 2.3. ECVAM MN testi kabul belgesi.....	17
Şekil 2.4. Mikronukleus oluşum şeması	18
Şekil 2.5. Mikronukleus oluşumunu etkileyen faktörler.....	19
Şekil 3.1. Midye iç organları.....	23
Şekil 3.2. Midyenin kaslarının kabuğa bağlı olduğu noktalar	24
Şekil 3.3. Midyenin frontal düzlemi	25
Şekil 3.4. Midyenin iç organları (çizim)	25
Şekil 3.5. Midyeden hemolenfin alınması.....	27
Şekil 3.6. Örneklerin Toplandığı İstasyonlar	28
Şekil 3.7. Hemolenfin thoma lamına enjeksiyonu	30
Şekil 3.8. Diff-Quick boyama düzeneği.....	31
Şekil 4.1. Toplam Hemosit Sayısı Frekans Grafiği.....	32
Şekil 4.2. Diff-Quick boya ile boyanmış hyalinosit.....	33
Şekil 4.3. Diff-Quick boya ile boyanmış eozinofilik granülosit.....	33
Şekil 4.4. Diff-Quick boya ile boyanmış bazofilik granülosit	34
Şekil 4.5. Hemosit alt popülasyonları (Wright boyama, <: bölünmek üzere olan hücre.....	36
Şekil 4.6. Hemosit alt popülasyonları (Wright boyama, K: kamçı).....	36
Şekil 4.7. Hemosit alt popülasyonları (Wright boyama).....	37
Şekil 4.8. Hemosit alt popülasyonları (Wright boyama, K: kamçı, S: sil).....	37
Şekil 4.9. Hemosit alt popülasyonları (Wright boyama, SA: sitoplazmik anomali.....	38
Şekil 4.10. İstasyonlara Göre Agranular Hemosit (HY) Frekans Grafiği.....	38
Şekil 4.11. İstasyonlara Göre Bazofilik Granülosit (BG) Frekans Grafiği.....	40
Şekil 4.12. İstasyonlara Göre Eozinofilik Granülosit (EG) Frekans Grafiği.....	42
Şekil 4.13. Hemosit alt popülasyonları ve BN'li bazofilik granülosit	45
Şekil 4.14. Bazofilik granülosit ve NB	45
Şekil 4.15. MN'li eozinofilik granülosit ve bazofilik granülosit	46
Şekil 4.16. İstasyonlara Göre MN Frekans Grafiği.....	46
Şekil 4.17. İstasyonlara Göre BN Frekans Grafiği.....	48
Şekil 4.17. İstasyonlara Göre NB Frekans Grafiği.....	50

TABLO DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Sıkça kullanılan biyomarkerler ve tespit ettiği hasarlar.....	6
Tablo 2.2. Hemosit Alt Populasyonları.....	11
Tablo 3.1. Arazi Koordinatları	29
Tablo 4.1. Hemosit alt popülasyonu yüzdeleri.....	35
Tablo 4.2. İstasyonlara göre MN ve nükleer anamoli yüzdeleri	44



TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında bana destek olan, bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Selma KATALAY' ya, lisansüstü öğrenim hayatımın tüm zorlu aşamalarında maddi manevi her yönden yardımcı olan ve desteğini hiç eksik etmeyen, bu hayattaki en değerli varlığım aileme, istatistiksel hesaplamarımda bana yardımcı olan Prof. Dr. A. Çağlan GÜNAL'a, yaz dönemi boyunca bana laboratuvarını açan Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU ve öğrencilerine, çalışmalarım sırasında manevi desteğini esirgemeyen tüm arkadaşlarıma sonsuz teşekkürler.

Bu çalışmayı 2017-179 numaralı BAP projesi ile destekleyen Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkür ederim.



ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR KÖRFEZİNDE YAŞAYAN MİDYE (*Mytilus galloprovincialis* Lamark, 1819) TÜRÜNDE KİRLİLİĞİN İMMÜN SİSTEM HÜCRELERİNE ETKİLERİ

Melike Merve AYHAN

Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Hidrobiyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Selma KATALAY

İzmir körfezi antropojenik kaynaklı pek çok toksik madde tarafından kirletilmektedir. Bunun sonucunda toksik eşik maruziyet seviyesi oluşmakta ve bölgede yaşayan türler bu toksik etkiden etkilenmektedir.

Bu çalışmada İzmir Körfezi'nde kirleticilere maruz kalan midyelerde (*Mytilus galloprovincialis*) biyolojik zararı açıklamak amacıyla İzmir Körfezi'nde seçilen (Göztepe, Konak Alsancak, Pasaport, Bostanlı, Karşıyaka ve Foça) istasyonlarından alınan midye örneklerinin hemolenflerinde total hemosit sayısı, differansiyel hemosit sayımları ve mikronukleus testi biyobelirteçlerini kullanarak gerçekleştirdik.

Yapılan mikroskobik incelemeler sonucunda total hemosit sayısı differansiyel hemosit sayısı, nüklear anomaliler ve mikronukleus frekasında istatistiksel açıdan önemli farklılıklar gözlenmiştir.

En yüksek toplam hemosit sayısı Bostanlı istasyonunda, en düşük Pasaport istasyonunda olduğu gözlemlenmiştir.

Differansiyel hemosit sayısı alt populasyonlarında da istasyonlara göre farklılıklar gözlenmiştir. Agranülosit hemosit sayısı en yüksek Foça istasyonunda en düşük Bostanlı istasyonunda, bazofilik hemosit sayısı en yüksek Bostanlı istasyonunda en düşük Foça istasyonunda ve eozinofilik hemosit sayısı en yüksek Pasaport istasyonunda en düşük Foça istasyonunda olduğu saptanmıştır.

MN, BN ve NB frekansları, en yüksek Bostanlı istasyonunda en düşük Foça istasyonunda olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte hücre nükleusları hücre merkezinde uzaklaşmış durumda ve hücrelerin sitoplazmik çıkıntılarının yok olduğu bunun sonucunda da hücrelerin yuvaklaştığı gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak total hemosit sayısı, differansiyel hemosit sayısı ve MN testi biyomarkerlerinin biyolojik gözlem ve inceleme çalışmalarında kullanılabilirliği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Nüklear anomali, Genotoksisite, Mikronukleus Testi, *Mytilus galloprovincialis*, Total hemosit Sayısı.

2018, 85 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

The Effect of Pollution on the Immune System Cells of Mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lamark, 1819) Living In İzmir Bay

Melike Merve AYHAN

**Manisa Celal Bayar University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Hydobiology**

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Selma KATALAY

İzmir Bay has been contaminated by different anthropogenic pollutants. As a result of this, the toxic threshold exposure level occurs, and the organisms in the bay got affected.

In this study, the effects of the pollutants were examined on the mussels that have been sampled from different locations in the İzmir Bay (Göztepe, Konak Alsancak, Pasaport, Bostanlı, Karşıyaka ve Foça). Toxicity was determined on haemolymphs by biomarkers such as total haemocyte number, differential haemocyte count and micronucleus test.

The microscopic examinations have shown the statistical differences at total haemocyte numbers, differential haemocyte numbers, nuclear anomalies and micronucleus frequencies.

The highest total haemocyte number was determined in Bostanlı location and the lowest in Pasaport location.

Also, there have been significant differences in subpopulation according to differential haemocyte numbers. The results indicate that Foça has the highest agranulocyte number while Bostanlı has the lowest agranulocyte number. As for the basophilic haemocyte number, this situation was reversed (highest number Bostanlı and lowest Foça), and Pasaport has the highest eosinophilic haemocyte number while Foça has the lowest.

The highest MN, BN and NB frequencies were found in Bostanlı location and the lowest in Foça. In the cell morphology observations, the changes in the location of the cell nuclei and the disappearance of cytoplasmic extensions and as a result, separation of the cells were observed.

Consequently, the study has shown that biomarkers such as the total haemocyte number, differential haemocyte number and MN tests can be a useful tool for biomonitoring studies.

Key words: Nuclear abnormality, Genotoxicity, Micronucleus test, *Mytilus galloprovincialis*, Total haemocyte count,
2017, 85 pages.

1. GİRİŞ

Kıyusal deniz organizmaları, çok çeşitli toksik kirleticilere maruz kalma riski altındadır. Son yıllarda özellikle 19. yüzyıldan sonra sanayi faaliyetlerinin artması, sanayi atıklarının deniz ve denize girdisi olan akarsulara dökülmesi sonucu deniz çevresinde pek çok toksik madde birikmektedir. Deniz suyunun doğal bileşenleri olmasına rağmen metaller ve kompleks kirleticiler doğal veya antropojenik etkilerden kaynaklanan yüksek konsantrasyonlarda lokal olarak bulunmaktadır. Deniz kaynaklarındaki metal konsantrasyonları ve kompleks kirleticiler, akarsu salınımı nedeniyle mevsime göre değişir ve aynı zamanda gel-git döngüsü ve derinlik ile sivrulur. Ağır metaller ve kompleks kireticilerin deniz organizmalarındaki toksisitesi tür bazında olduğu kadar türler arasında da yerel koşullara bağlı olarak (Örn: tuzluluk, sıcaklık, pH vs.) değişir [1, 2].

Zehirlilik, yaşam döngüsü aşamaları ve metalin fizikokimyasal şekliyle de değişebilir. Böylece eşik toksisite çevresel parametrelerdeki farklılıklar ile değiştiğinden, ölümcül olmayan bir eşik maruz kalma seviyesinin belirlenmesi zordur [3]. Metal kirliliği ve kompleks kirleticiler, kıyı ekosistemlerinde ki biyotanın sağlığı için büyük bir tehdittir. Ekosistem sağlığını değerlendirmek için bu ortamda yaşayan indikatör türlerin biyolojik cevaplarını ve toksik etkinin bir göstergesi olarak kullanılan mekanizmalarını değerlendirmek gerekir. Günümüzde, hızlı endüstrileşmeye bağlı olarak çevresel kirliliğin giderek artmasıyla, canlılar daha fazla fiziksel ve kimyasal kirleticiye maruz kalmaktadır. Dolayısıyla güçlü toksik, mutajenik, karsinojenik ve teratojenik faktörlerin olumsuz etkilerini tespit etme ve önlemler alma ihtiyacı kaçınılmazdır.

Günümüzde, deniz çevresel izleme ve değerlendirilmesinde erken uyarı araçları olarak kirleticiye maruz kalmaya biyokimyasal ve hücrel tepkilerin (biyolojik belirteçlerin) kullanılması üzerine gidilerek daha fazla önem verilmektedir [4]. Vücut dokularında biriken kirleticilerin basitçe ölçülmesinin tersine, biyobelirteçler organizmaların sağlığındaki kirleticilerin potansiyel etkisi hakkında daha kapsamlı ve biyolojik açıdan daha yararlı bilgiler sunar [5]. Etki biyobelirteçleri, organizmalar üzerinde toksik bir etkinin ve doğrudan olumsuz sağlık etkileri riski ile değerlendirilmesini sağlar [6]. Birden fazla biyolojik belirteç,

birey ve ekosistem sağlığını bütünsel bir değerlendirme yapmak üzere birleştirilebilir [7, 8].

Deniz canlılarından çift kabuklu yumuşakçalar arasında özellikle midyeler, deniz çevresi izleme ve değerlendirme programında indikatör organizmalar olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Midyeler kirletici maddelerde dahil olmak üzere, sürekli değişen çevresel faktörlere maruz kalan açık bir dolaşım sistemine sahiptir. Midyeler kıyı ve gölet ekosistemlerinde çevresel risk değerlendirmesi için mükemmel sentinel türler olarak kanıtlanmışlardır [8]. Bunun nedeni, sesil özellikleri, organik ve inorganik kirleticiler için yüksek biyoakümüleyon faktörü ve metabolik detoksifikasyon oranları, süzerek beslenme tipi gibi faktörlerdir. Bulundukları ortamı filtre etmeye devam ettikçe, midyeler habitatlarının bozulmasına karşı fikirler verebilir [8,9]. Sonuç olarak, kirletici konsantrasyonlarının değerlendirilmesi ile deniz çevresindeki kimyasal kirliliğin izlenmesi için, özellikle *Mytilus* sp. uygundur [10].

Çevresel kirleticiler hemostatik doku ve organları toksik olarak etkilediğinden bağışıklık sistemi (immün sistem) gibi mekanizmaları da etkiler. Bağışıklık sistemi gibi entegre bir biyolojik sistemi oluşturan bir dizi bileşenin incelenmesi organizmanın sağlık durumunu hassas ve kapsamlı bir şekilde ölçümünü sağlayabilir [11]. Bu da kirletici kaynaklı stresin derecesini yansıtır ve dolayısıyla hastalığa yatkınlığının erken bir göstergesi olabilir [11]. Bu durum organizmanın çevresel kirleticilere karşı hayatta kalma kapasitesini belirler [12].

Son yıllarda hemolenf hücreleri (hemositler) ve hemolenf hücrelerinin çekirdek anomalilikleri biyolojik belirteç ölçümleri için daha sık kullanılmaktadır. Hemolenf özellikle toksikolojik, genotoksikolojik ve immünolojik açıdan ilginçtir, çünkü maruz kalan organizma boyunca kirleticileri taşıyabilir ve hücre iç savunma sistemine karışırlar. Bağışıklık savunması, hemosit hücrelerinin önemli bir rol oynadığı hücresel ve humoral mekanizmalardan oluşmaktadır [13]. Antijenik sorun, hemositlerin migrasyonunu, bunu takiben de litik enzimler [14] ya da fazlaca reaktif oksijen metabolitlerini üretmek suretiyle fagositoz ve hücre içi bozunumu uyarır [15]. Bu nedenle hemosit işlevindeki herhangi bir bozulma tüm organizmanın sağlığını değiştirebilir. Bivalve mollusklarda hemositler, bağışıklık sisteminde kritik

rol oynarlar. Hemositler; yara iyileştirme, besinlerin taşınması, besinlerin sindirimi ve bağışıklık savunması da dahil olmak üzere bir dizi süreç için gereklidir [13, 16, 17]. Çift kabuklu yumuşakçalarda iki ana tip hücre vardır. Bunlar sitoplazma içeriğinde granül bulundurmeyen agranüler hemositler ve sitoplazma içeriğinde granül bulunan granülositlerdir [13,16, 18].

Midyelerin, metaller ve kompleks kirleticilerin genotoksik etkilerine duyarlı olduğu düşünülmektedir [8, 19]. Mikronuklues testi genotoksik etkinin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan bir biyolojik belirteçtir. Aktif olarak bölünen hücre popülasyonlarında nükleer anormallikleri (örneğin; mikronukleus (MN), nükleer tomurcuklanma (nükleer bud (NB)), apoptozis ve binukleuslu hücre (BN) tespit eden basit, güvenilir ve düşük maliyetli bir testtir [8, 20].

Bu çalışmada İzmir Körfez'inden seçilen istasyonlarda (Konak, Alsancak, Göztepe, Karşıyaka, Pasaport, Foça ve Bostanlı) kıyı ve deniz ekosistemlerinin kirliliğini değerlendirmek için iyi bir biyolojik belirteç olarak kabul edilen midye türü, *Mytilus galloprovincialis* (Lamark,1819)' de Total Hemosit Sayımı (THS), Differansiyel Hemosit Sayımı ve Mikronukleus testi uygulanarak istasyonlar arası kirlilik derecesini belirlemek ve bu uygulanan testlerin immünolojik ve genotoksik bir biyo belirteç olarak kullanılabilirliği gözlemlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyoizleme

Biyolojik izleme insani faaliyetlerin neden olduğu çevresel değişimlerin biyolojik tepkiler yardımı ile değerlendirilmesi anlamına gelmektedir. Su kalitesinin sucul canlıların varlığı veya yokluğu, çeşitliliği ve bolluğu gibi faktörler göz önünde bulundurularak belirlenmesini sağlar. Ekolojik durum; indikatör organizmaların kalite bileşenleri kullanılarak belirlenmesidir. Canlı organizmaların tepkilerini kullanarak biyolojik değerlendirme yapılması yeni bir kavram değildir Tarihte, krallardan önce yemeği tadan çeşniciler biyolojik izlemenin ilk örnekleri olabilir

Biyolojik izleme (biyomonitoring) genel olarak; biyosferin belirli değişkenleri hakkında bilgi elde etmek amacıyla organizma veya organizma kısımlarının kullanılmasıdır. Biyolojik izleme çalışmalarında kullanılan organizmalara biyoindikatör (biyomonitor) denilmektedir.

2.2. Biyogösterge

Biyogöstergeler herhangi bir kimyasal maddeye maruziyetin saptanmasında, birey ve popülasyon düzeyinde duyarlılığın ve etkisinin belirlenmesinde, neden-sonuç ve doz-yanıt ilişkilerinin tanımlanmasında, etki kaynağının belirlenmesinde, eksternal ve internal doz arasındaki ilişkinin saptanmasında, büyük popülasyonları kapsayan popülasyon sağlığı çalışmalarında ve risk gruplarının değerlendirilmesinde kullanılır [21, 22, 23].

Biomarker ya da biyogösterge veya biyoindeks terimi ilk kez 1989 yılında Amerika Birleşik Devletleri National Academy of Sciences Report 'da kullanılmıştır. Özellikle son 25 yılı aşkın süredir kimyasal madde maruziyetine bağlı olarak meydana gelen biyolojik değişimleri tanımlamak için kullanılmaktadır. Asıl hedef, sorunu mümkün olduğu kadar erken teşhis etmek, bu sayede tüm popülasyonda olumsuz etkileri önlemek veya en aza indirebilmektir. Bunun için artık günümüzde ileri belirleme teknikleri ile uzun süreli etkileri tahmin edebilen birçok biyogösterge, risk değerlendirmelerinin yapılabilmesi için kullanılmaktadır [23, 24]. Biomarker terimi geniş anlamda kimyasal, biyolojik ve fiziksel ajanlar ile

biyolojik sistemler arasındaki etkileşmeyi yansıtan, hemen hemen bütün ölçümleri kapsamaktadır [25]. Maruziyeti, cevabın niteliğini ve niceliğini belirlemek ve oluşması muhtemel yanıtı öngörmek ekosistem ve popülasyon sağlık için oldukça önemlidir. Bu amaçla, dokularda ve biyolojik sıvılarda maruz kalınan etkenin doğrudan kendisi ve metabolitlerinin analiz edilmesi ve biyolojik sistemlerin bu maddelerle olan etkileşimlerinin incelenmesi amacıyla kullanılan parametreler biyogöstergelerdir [22, 25]. Maruziyet, duyarlılık ve etki biyogöstergeleri olarak üç gruba ayırmak mümkündür.

2.2.1. Maruziyet Biyogöstergeleri

Kimyasal maddenin doğrudan kendisinin veya metabolitlerinin ya da biyolojik molekülle etkileşim sonucu oluşan reaksiyon ürünlerinin biyolojik sıvılarda veya dokularda ölçülmesi esasına dayanır. Erken dönem biyogöstergeleridir. İnternal ve etkin doz biyogöstergeleri olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar: İnternal doz biyomarkerleri, bir bileşiğe maruz kalındığında bileşiğin ya da metabolitlerinin biyolojik sıvıda ölçülmesi esasına dayanır. Etkin doz biyogöstergeleri ise kimyasal bileşiğin kendisinin ya da metabolit yada metabolitlerinin belirli bir hedef yapıyla etkileşmesi sonucu oluşan değişimleri ifade eder [23]. Bileşiklerin metabolizma oranlarında ve metabolizma yollarında bireysel farklılıklar nedeni ile internal doz ve etkin doz arasında farklılıklar olabilir. Bu nedenle hedef organdaki etkin dozun ölçümü internal doz ölçümüne tercih edilir [23-25].

2.2.2. Duyarlılık Biyogöstergeleri

Kalıtsal ya da çevresel etkiler sonucu gelişen ve bireyde herhangi bir ksenobiyotiğe ya da benzer bir ksenobiyotik grubuna karşı hassasiyeti yansıtan göstergelerdir. Aynı madde maruziyetine karşı yanıtın bireyler arasında farklı olması, bileşiklerin biyotransformasyonunun genetik olarak farklı olmasından kaynaklanmaktadır [23-25].

2.2.3. Etki Biyogöstergeleri

Doğrudan sistemik hasarın tanımlanmasında, olası risklerin değerlendirilmesinde ve doz-cevap ilişkilerinin belirlenmesinde kullanılır [24]. Etkinin biyogöstergeleri kapsamında her sistemin kendine özgü biyogöstergesi vardır. Bunların bir kısmı rutin klinik kullanıma girmekle birlikte, bir kısmı henüz araştırma düzeyindedir [23].

2.2.4. Hematotoksisite Biyogöstergeleri

İlaç dahil çeşitli ksenobiyotiklere maruziyet sonrası, hastalık durumu, fiziksel değişiklikler gibi stresörler ile kan hücrelerinin şekilli elemanları ve albümin, hemoglobin gibi protein yapısındaki diğer bileşenlerinin modifiye olmasını gösteren biyomarkerleridir [23]. Biyomarker ve tesbit ettiği hasarlar Tablo.2.1’de gösterilmiştir.

Tablo.2.1. Sıkça Kullanılan Biyomarkerlar ve Tespit Ettiği Hasarlar.

Biyomarker / Test, Assay	Tespit
Balık karaciğer ve Midye hepatopankreas histopatolojisi	Hem maruziyet hem de patolojik değişikliklerin tespiti
Mikronukleus Testi	Genotoksik hasar tespiti
Comet Testi	Genotoksik hasar tespiti
Özel gen testleri	Genotoksik hasar tespiti
Ames mutajenite testi	Genotoksik hasar tespiti
İmmünolojik testler (RIA, ELIZA, Western blot, CYPIA, MTT, MTS, VT6, Differansiyel Hemosit Sayımı (DHS), Total Hemosit Sayımı (THS)	İmmünolojik hasar tespiti

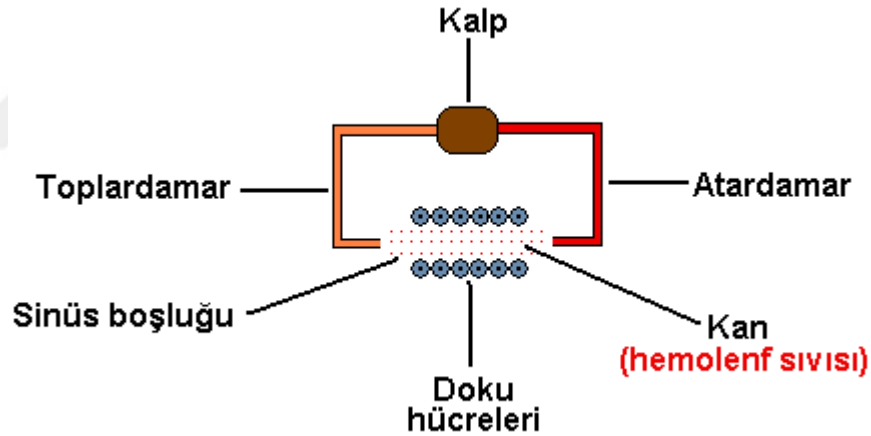
2.3. Biyogösterge Çeşitleri

1. Proteinler ve Enzimler
 - a. Sitokrom P-450 monooksijenazlar
 - b. Stres proteinleri
 - c. Faz II enzimleri

- d. Antioksidanlar
- e. Diğer potansiyel protein ve enzim biyomarkerleri
- 1. Biyokimyasal Biyomarkerlar
 - a. Ksenobiyotik kimyasalların metabolitleri
 - b. Endojen metabolitler
- 2. Moleküler Biyomarkerlar
 - a. DNA hasarları
 - b. Hormonların moleküler etkileri
- 3. İmmünolojik Biyomarkerlar
- 4. Histopatolojik Biyomarkerlar

2.4. Hemolenf Nedir ?

Açık dolaşıma sahip olan omurgasız canlılarda bulunan kanın diğer adıdır. Omurgasız dolaşım sistemi özellikleri şekil 2.1 verilmiştir.



Şekil.2.1. Omurgasız Dolaşım Sistemi.

Hemolenf sıvısı, damar dışına çıktığından doku sıvısı ile karışık halde bulunur. Hemolenf sıvısı bulunan canlılarda kılcal damar bulunmaz. Hemolenf vücudun içini (hemosöl) tamamen kapsar ve tüm hücreleri sarar. Hemolenf su, inorganik tuzlar ve organik bileşiklerden oluşur. Birincil oksijen taşıyıcı molekül ise hemosiyanindir [26].

2.5. Omurgasız İmmünolojisi

Omurgasızlarda immünolojik çalışma Haeckel tarafından başlatıldı [27, 28]. Bu alanda yapılan ilk modern çalışma ise 1914 yılında Cuenot tarafından yapıldı. 1950– 1959 yılları arasında Stauber ve öğrencisi istiridye *Crassostrea virginica* türünde yaptıkları çalışmalarında, vücuda alınan yabancı maddelerin çözündüğü ve tamamen vücuttan yok olduğunu gözlemledi [28].

Sefalopodlar dışında yumuşakçalarda, hemolenfin dolaştığı vücut boşluğuna hemosöl adı verilir. Hemolenf ve vücutu savunan diğer unsurlar yabancı ajanların istilasına karşı iç savunma sistemini oluşturur. Hemolenfte bulunan hemositler lökositiktir. Pigmentleri yoktur, çoğu durumda hızlı ameboid lokomasyon yeteneğine sahiptir ve bu nedenle amebosit olarakta adlandırılabilir. Hemosit hücrelerini sitoplazmalarında granüllü ve granülsüz hücreler bulunmasından dolayı bu hücreleri ayırt etmek adına göreceli olarak granülosit ve hyalinosit terimleri ortaya çıkmıştır [28].

Yumuşakçaların hemolenflerinin sıvı kısmının pıhtılaşma yeteneği oldukça azdır bu nedenle plazma olarak adlandırılır. Polyplacophora, gastropod ve sefalopod yumuşakçalar, baskın bir plazma bileşenine sahiptir. Bu plazmaya hernosiyanin (HCY) veya hemoglobin adı verilir. Çift kabuklu yumuşakçaların (Bivalvler) bazılarında eritrositlere rastlanıyor olsa da solunum pigmentleri yoktur. Diğer plazma bileşenleri birden fazla olmasına rağmen, zayıf karakteristik özellikler gösterir. Örneğin aglütininler, aglütinyen salkımlar içeren maddeler ortaya çıkarabilir ve opsonik özelliklere sahip olabilir, yani yabancı bir maddenin vücuda girmesi durumunda fagositotik aktiviteyi ve kapsülleme yeteneğini artırabilir [28].

Son olarak, iç savunma tepkileri doğuştan gelen lenfoid olmayan bağışıklık ya da edinilmiş bağışıklıktır [29, 30]. Doğuştan gelen cevaplar, yabancı bir ajanla ilk karşılaşmada ortaya çıkanlardır. Edinilmiş bağışıklık, bir ajan ile ikinci veya daha geç bir zamanda karşılaşıldığında doğuştan gelen bir tepkiden farklı olandır; bu nedenle edinilmiş bağışıklık, yabancı bir ajanla daha önceki deneyimin sonucudur. Dahası omurgalılarda olduğu gibi omurgasızlarda da bağışıklık ve nöroendokrin yanıtları arasında derin bir ilişki olduğu tespit edilmiştir [31].

2.6. Çift Kabuklu Yumuşakçaların İç Savunma Sistemleri

Çift kabuklu yumuşakçaların iç savunma istemi özellikleri alt başlıklarda detaylı olarak verilmiştir.

2.6.1. Çift Kabuklu Yumuşakçaların Hemositlerinin Özellikleri

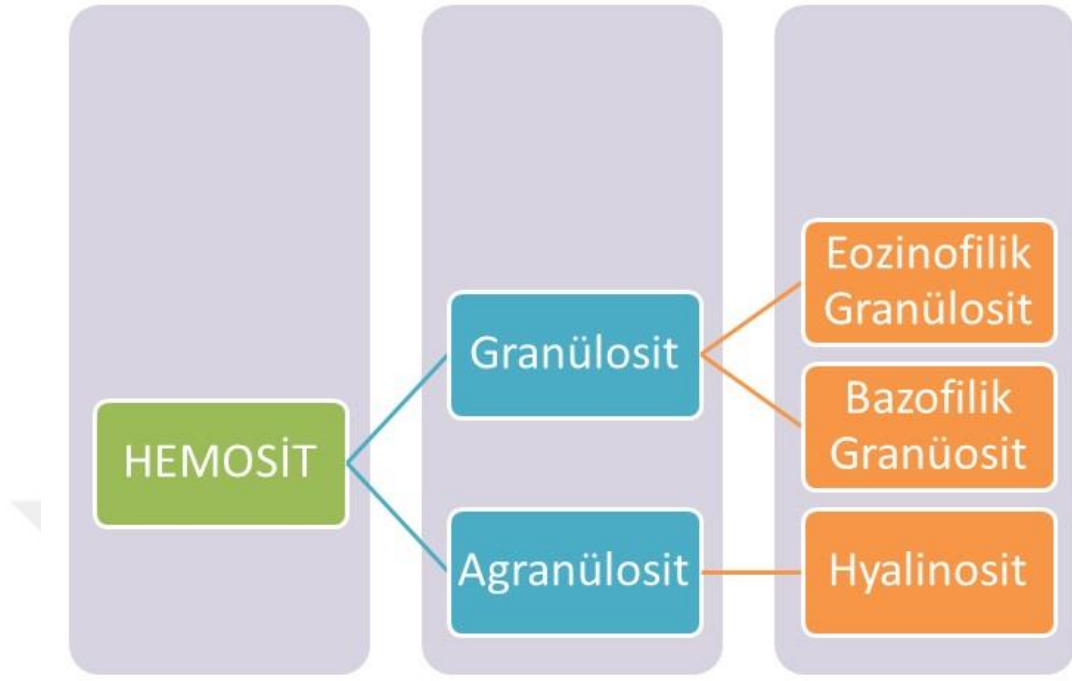
Çevresel kirleticilere maruz kalan hayvanların bağışıklık sisteminden kaynaklanan hastalığa duyarlılıkta artış daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir [32, 33]. Denizdeki bivalv molluskların iç savunma mekanizmaları hemosit hücrelerinin yapısal ve işlevsel bütünlüğüne dayanmaktadır [34]. Bağışıklık cevabı yabancı bir istilacının varlığında indüklenen hemosit aktivasyonunu gerektirir ve spesifik membran reseptörleri ile birçok hücre dışı ligand arasındaki etkileşimleri içerir [35, 36]. Aktifleşmiş hücreler yabancı parçacıklara doğru göç eder ve bunları fagositoz yolu ile ortadan kaldırır [37- 39]. Yabancı cisimlerin etkin bir şekilde ortadan yok edilmesini sağlamak için etkileşime giren çeşitli hücre tipleri efektör molekülleri içerir [29]. Bivalve molluskların kan hücreleri (hemosit) potansiyel patojenlere karşı savunmada önemli rol oynarlar [40]. Yani bivalve mollusklarda, çevresel, biyolojik ve hastalık stresine verilen tepkilerin bir kısmı hemolenfte dolaşan hemositler tarafından sağlanır [41, 42]. Hemositler çeşitli kritik bağışıklık fonksiyonlarını yerine getirir. Örneğin, potansiyel patojen ve yabancı maddeleri fagositozla öldürür [42, 43]. Fagositoz aynı zamanda yüksek bakterisidal etkinliğe sahip olan ana bileşenlerin, degradatif, oksidatif enzimlerin salınmasını reaktif oksijen metabolitlerinin oluşumunu içerebilen bir dizi öldürme mekanizması ile tamamlanmaktadır [15, 42, 44, 45]. Oluşan reaktif oksijen radikallerinden komşu doku ve hücrelerin potansiyel hasarını en aza indirmek için eşlik eden antioksidan enzimler bulunmaktadır [46]. Hemositler ayrıca aglütininler, lektinler ve antibakteriyel peptitler dahil olmak üzere savunma stratejilerinin bir parçası olarak diğer çözünebilir bileşikleri serbest bırakmaktadır [34, 47].

Hemosit morfoloji, sitokimya ve fonksiyonlarına göre farklı kriterlere veya yaklaşımlara göre sınıflandırılmıştır. Bivalve hemositlerinin türünü, yapısını, fonksiyonunu araştırmak için ışık mikroskopuyla [30, 42, 48], taramalı elektron mikroskopuyla (TEM) [30, 48, 49], gradiyent santrifüjleme yöntemi [50] ve monoklonal antikorlar kullanılarak bir dizi çalışma yapılmıştır [50]. Farklı kriterlere göre çift kabuklu yumuşakçaların farklı türlerinin hemositleri iki [48], yada üç çeşit

halinde sınıflandırılabilir [51]. Yapılan çalışmalarda çok benzer karakterlere sahip olan ancak farklı isimler verilen hemosit; örneğin agranular hemosit [48], şeffaf hücre [30] ve hyalinosit [52] bu üç hücre tipi çok benzer karakterleri ifade eder. Bununla birlikte kullanılan farklı yöntem ve kriterler nedeniyle bazı yazarlar aynı türe ait hemositleri farklı isimlendirmiştir.

Çift kabuklu yumuşakçalarda hemositler genellikle granülosit ve hyalinosit (agranülosit olarak da adlandırılır) olmak üzere iki gruba ayrılır [13, 30, 53]. Bununla birlikte tüm çift kabuklu yumuşakça türünde tüm hemosit tipleri bulunmayabilir [41]. Çift kabuklu yumuşakça türlerinin çoğunda granülositler hidroliklik, oksidatif enzimler içerir ve eozinofilik, bazofilik ve nötrofilik olarak veya daha küçük boyutlarda ve taneliğe göre farklı alt tiplere ayrılabilir [41]. Çift kabuklu yumuşakçalarda granülositler genellikle en bol hücre türüdür ve çok fazla sitoplazmik granül ile karakterizedir. Hyalinositlerin sitoplazmasında hiç granül bulunmadığı gibi az sayıda granül bulunabilir [41]. Granülositler yabancı maddeleri fagositoz etme özelliğine sahiptir ve hücre içi sindirime katkıda bulunan hidroliklik enzimlerin bir kısmını içerirler. Genellikle hyalinositlere kıyasla daha aktif fagositlerdir. Hyalinositler granülositlerden daha küçüktür. Bazıları birkaç tanecik içerir ve genellikle granülositlerden morfolojik olarak daha heterojendir. Hyalinositler iki veya üç tipe ayrılmıştır. Bunlar büyük çekirdekli ve az sitoplazmalı küçük hyalinositler [13], küçük çekirdekli bol sitoplazmalı hyalinositler [13] veya tip 1,2,3 tür [53]. Granülositler de de fagositik olmayan (Carballal et al., 1997) veya daha fazla fagositik olabilir [52]. Buna ek olarak apoptoz benzeri hücreler, seröz hücreler, fibrositler, morula benzeri hücreler ve vezküler hemositler de dahil olmak üzere diğer hücre tipleri tanımlanmıştır [48, 54-56]. Midye hemosit alt populasyonları Tablo.2.2.'de gösterilmiştir.

Tablo.2.2. Hemosit Alt Populasyonları [57,58].



2.6.1.1.Agranülosit

Hyalinosit;

- Bazofilik karakterde olup sitoplazma-nukleus oranı oldukça düşüktür ve granülleri yoktur.
- Ekstrasellüler matriks üretimini sağlar.
- Yaralanmada bağışıklık savunmasının ilk yanıtını verir.
- Bazofilik Granülostleri hasarlı bölgeye çağıran bir reseptör gibidir.
- Homeostatik fonksiyonda rol oynar [57].
- Elektron mikroskopuyla yapılan çalışmalara göre hyalinositlerin granüler hücrelerden daha küçük olduğu gözlenmiştir [30]. Hyalinositlerin bazılarında glikojen depozitleri gözlenmesine rağmen glikojen göllerinin mevcut olmadığı saptamıştır [30].

2.6.1.2. Granülosit

Elektron mikroskobu gözlemiyle [58] granülositler tipik olarak organel içermeyen bir ektoplazmik bölge ve membranla sınırlandırılmış endoplazmik bölgeye atfedilen ve asidofilik görülen granüllerle karakterizedir. Arilsülfataz, β -

glukoronidaz, Katepsin B antikoru, Katepsin G antikoru ve bir dizi hidrolitik enzim içerir.

Bazofilik granülosit [30];

- Bazofilik karakterde olup, sitoplazma-nukleus oranı yüksektir ve granülleri mevcuttur.
- Hyalinositlerden daha yüksek immünolojik aktiveye sahiptir.
- Fagositik kabiliyeti yüksektir, makrofaj benzeri özellikler taşır.
- Çeşitli lizozomal hidrolaz bileşenleri mevcuttur.
- Yaralı bölgeye nüfus eder ve yarayı kapatarak yabancı madde ve mikroorganizmalara karşı canlıyı savunur.
- Yara ilk bazofilik granülosit tarafından temizlenir.
- Elektron mikroskopuyla yapılan çalışmalara göre bazofilik granülositler, glikojen gölü olarak adlandırılan birleşik mitokondri halkası ve glikojen depozitlerine sahip olduğu saptanmıştır.
- Ayrıca belirgin bir şekilde golgi aparatı içerdiği saptanmıştır.

Eozinofilik granülosit [30];

- Asidofilik karakterde olup, sitoplazma-nukleus oranı yüksektir ve granülleri mevcuttur.
- Fagositik aktiviteye sahiptir.
- Bazofilik granülositler yarayı temizledikten sonra yaralı bölgede eozinofilik granülositler birikir ve iyileşme fazı gözlenir.
- Eozinofilik granülositler olası bir tehdide karşı yaralı bölgeyi savunmaya devam eder.
- Elektron mikroskopuyla yapılan çalışmalara göre eozinofilik granülositlerde lipid damlacıkları, glikojen tortuları ve önemli miktarda granülsüz endoplazmik retikulum içerdiği saptanmıştır.
- Ayrıca belirgin bir şekilde golgi aparatı içerdiği saptanmıştır.

2.7. Doku Hasarına Yanıtlar

Bivalvlerin gövde duvarında oluşan herhangi bir hasar sonucu, saniyeler içerisinde kaslar büzülmekte ve böylece hemolenf sızıntısı azaltılmaktadır [59]. Çok sayıda hemositin lokal birikimi olan iltihaplanma, yumuşak dokuya veya üstteki kabuğa saatlerce zarar verir. İstiridyelerde (*Crassostrea gigas*) başlangıçta yumuşak

doku hasarına verilen yanıt, bölgesel kararma, yeşillenme (muhtemelen bakır ile ilişkilidir) olarak görülür ve yaralanmadan yaklaşık 16 saat sonra başlar [60]. Bununla birlikte, hücresel cevap yaralanmadan 4 saat sonra mikroskopik olarak saptanabilir. Çok sayıda hemosit, bölgeye hemosolük sinüslerden bağ dokusuna geçerek girmektedir. Hasarın derecesine bağlı olarak, yaralar 1 – 6 gün içinde hemositler tarafından tıkanır [61].

Hasarlı hücreler fagositoziktir ve ilk olarak normalde küresel olan hemositlerin birçoğu uzar. *C. gigas* türünün adiktör kası leyding dokusundan hasara daha hızlı cevap verir ve onarır. Kollajen, skar dokusu içinde oluşmaktadır ve tüm vücuda yayıldıkça da dokular eski haline geri döner ve kollajen çıkartılır [59].

İstiridyelerdeki (*C.gigas*) infiltre edici hemositler üç tiptir. Bunlar; agranular amebositler, bazofilik granülositler, asidofilik granülositlerdir [57]. Benzer şekilde *Mytilus edulis* ve *M. californianus* türlerinde de üç tip hemosit tanımlanmıştır [62, 63]. Her iki türde de agranular amebositler (hyalinositler) immünolojik yanıtın erken dönemlerinde en sık görülen hücre tipidir. Buna baskın olarak küçük bazofilik granülositler yaralara nüfus eder [60, 63]. *Mytilus spp.* Bazofiller makrofaz benzeri özelliklere, yani iyi bir fagositik kabiliyete ve çeşitli lizozomal hidrolaz bileşenine sahiptir. Fakat *Crassostrea spp.* türünde hyalinositler fagositotik aktivitesi en yüksek olan hücrelerdir [60]. Yara ilk olarak bazofiller tarafından temizlendikten sonra, yarada asidofilik granülositler (eozinofilik granülositler) birikir ve bölgede iyileşme fazı izlenir ancak asidofilik granülositler olası bir tehdite karşı yaralı bölgeyi savunmaya devam eder [60].

İyileşme, lezyonun iç kısmından vücut yüzeyine doğru ilerler [61]. Bu dönemde yoğun hemosit kitlesi normal bağ doku ile yer değiştirir. ‘Fibroblastlar’ ve hemosit tıkaçlarındaki miyoblastlar yarada agranular hemositlerden türetilir [57]. Mitoz komşu epitelyumda meydana gelir ve bu da yara tıpası üzerinde büyür [60]. Epitelyal mitozlar *Mytilus spp.*, ve *Crassostrea spp.*, türlerinde de bildirilmiştir [63]. İstiridyeden alınan solungaç sıvısı in vivo olarak incelendiğinde hemositlerin kümelendiği gözlenmiştir [64].

Mytilus spp. türlerinde alt katmanda bulunan mantoya sızan hücre popülasyonlarının dizisi [62, 63] yaralı istiridye yumuşak dokularına benzerdir [57, 60]. Bununla birlikte kabuk da onarılmalıdır ve bu ihtiyacı karşılamak için, hemositler diyapedez yardımıyla manto epitelini boyunca göç etmektedir. Diapedez haftalar boyunca devam eder, bu süre boyunca epitel hücreleri boyut ve şekil olarak değişir [63]. Kabuğu hasarlı midyelerin küçük agranular bazofillerinde RNA sentezi artar [62].

2.8. Genotoksisite

Özellikle son bir asırdır yeryüzünde kullanılan genotoksik hasara neden olan maddelerin miktarında önlenemez bir artış gerçekleşmiştir. Bu nedenle son yıllarda habitat tahribatı ve insan yapımı kimyasalların kullanımının artmasıyla yeni bir anlam kazanmıştır.

İlk olarak 1927 yılında X- ışınlarının *Drosophila*’ da mutasyon oranının normalden 15.000 kat daha fazla arttığını belirleyen Muller’ in çalışmaları ile başlayan genetik toksikoloji bugün, gelişen teknoloji ile artan risk ve analiz yöntemlerine bağlı olarak en önemli araştırma dallarından biri haline gelmiştir.

Genetik toksikoloji, temel olarak kalıtım materyali olan DNA üzerinde meydana gelen toksik etkileri inceleyen bilim dalıdır. DNA içerisinde kimyasal olarak kodlanan genetik bilgi, replike edildikten sonra mümkün olduğunca aslına uygun oğul döllere aktarılmalı zorundadır. Bu esnada, gerek normal biyolojik süreçler sonucu gerekse DNA’nın doğrudan ya da dolaylı olarak fiziksel, kimyasal ve biyolojik etmenlerle etkileşimi sonucu çeşitli bozulmalar meydana gelebilmektedir [64, 65].

İşte bu şekilde kalıtım materyali olan DNA üzerinde hasarlara yol açan etmenleri tanımlamak için genotoksik terimi kullanılmaktadır.

Genotoksik maddeler etkilerini temel olarak iki yolla göstermektedirler [67];

a) Ya doğrudan ya da dolaylı olarak DNA üzerinde hasarlar meydana getirebilirler.

b) Ya da hücre içerisinde süregelen onarım mekanizmalarında bozukluklara neden olarak, kendiliğinden olan DNA hasarlarının frekansını yükseltebilirler.

Genetik toksikoloji testlerinde ana hedef DNA molekülü olduğundan dolayı elde edilen sonuçlar aynı insan sağlığı ile ilgili olarak ortaya çıkabilecek problemlerin tahmininde de kullanılmaktadır [68].

Bu nedenle bir tür de DNA hasarı olduğu bilinen bir kimyasal maddenin, diğer türlerde de benzer etkiler gösterebileceğini söylemek mümkündür.

Bugün genotoksik etkilerin incelenmesi amacı ile; mikroorganizmalar, böcekler, bitkiler, omurgasız ve omurgalı hayvanlar üzerinde uygulanabilecek olan 200'den fazla test metodu bulunmaktadır [68].

Bununla birlikte bir genotoksisite test yönteminin yaygınlaşabilmesi ve uygulanabilmesi için bazı temel kriterlere sahip olması istenir.

Bir genotoksisite test yönteminde olması istenen temel özellikleri şöyle sıralayabiliriz [67];

- Uygulama açısından basit olması.
- Genetik hasarları belirlemede güvenilir olması.
- Hızlı sonuç vermesi.
- Ekonomik açıdan ucuz olması.
- Analiz için az sayıda örneğin yeterli olması.

Günümüzde bu kriterleri sağlayan, birçok doku organizma üzerinde in vivo ve in vitro olarak en yaygın kullanılan test metodlarının başında mikronukleus (MN) testi gelmektedir.

2.8.1. Mikronukleus Testi

Ülke içindeki laboratuvar çalışmaları ile ülkeler arası laboratuvar çalışmalarını karşılaştırmaya izin veren standartlaştırılmış bir protokolün kullanımı

biyoizleme çalışmaları için büyük önem taşımaktadır [67]. Ayrıca, deniz kirliliği vakalarının artan sayısı hem ekolojik hem de ekonomik nedenlerle deniz organizmalarına verilen genetik hasarın önemi, bivalve mollusklarda kullanılmak üzere standartlaştırılmış bir MN protokolü kullanılmaktadır [67].

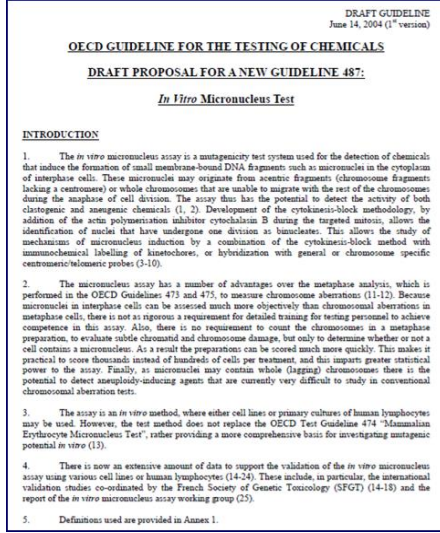
MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Bu amaçla yürütülen analizler, Mikronukleus Testi olarak adlandırılırlar [67, 68].

Mikronukleuslar (MN) hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır [68].

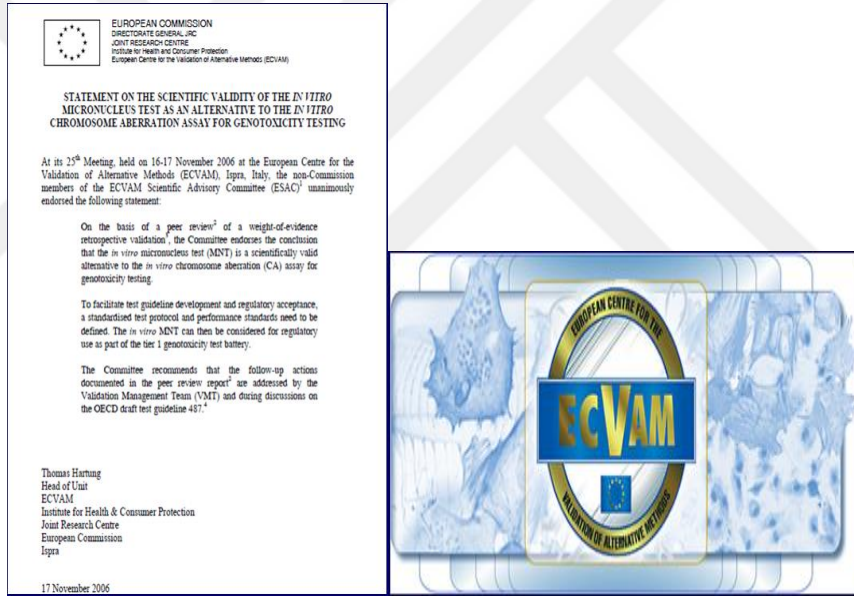
Anöploidiyi uyaran anojenler, sentromer bölünme hatalarına ve iğ ipliklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarak; klastrojenler ise kromozom kırıkları oluşturarak MN oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Bu sebeplerden dolayı MN testi hem sitojenik hem de augenik etkilerin gösterilmesin de yaygın olarak kullanılmaktadır [69].

2.8.1.1. MN Testinin İyi Bir Biyobelirteç Olarak Kabul Eden Sözleşmeler ve Kurullar

MN testinin duyarlılığı üzerine toplanan deneysel kanıtlar, midye izleme programlarındaki biyobelirteçleri dizisinde iyi bir test olarak önerilmesini sağlar. Gerçekten de MN testi uluslar arası deniz kirliliği programlarında Akdeniz Kirliliği (MED POL), Birleşmiş Milletler Çevre Programı (UNEP), Akdeniz Biyolojik İzleme Programı; Raphael Monaco Cenova Kirliliği Programı (RAMOGEPOL); Oslo ve Paris (OSPAR) gibi sözleşmeler ve Helsinki Komisyonu (HELCOM) sözleşmesi) tek çekirdekli genotoksisite biyobelirteçleri olarak önerilmiştir. MN Testi OECD kimyasal test rehberinde 2004 yılında yerini almıştır (Şekil.2.2.). MN Testinin geçerliliği ECVAM tarafından da kabul edilmiştir (Şekil.2.3).



Şekil.2.2. OECD MN Testi Kabul Belgesi.



Şekil.2.3. ECVAM MN Testi Kabul Belgesi

2.8.1.2. Mikronukleus Testinin Önemi

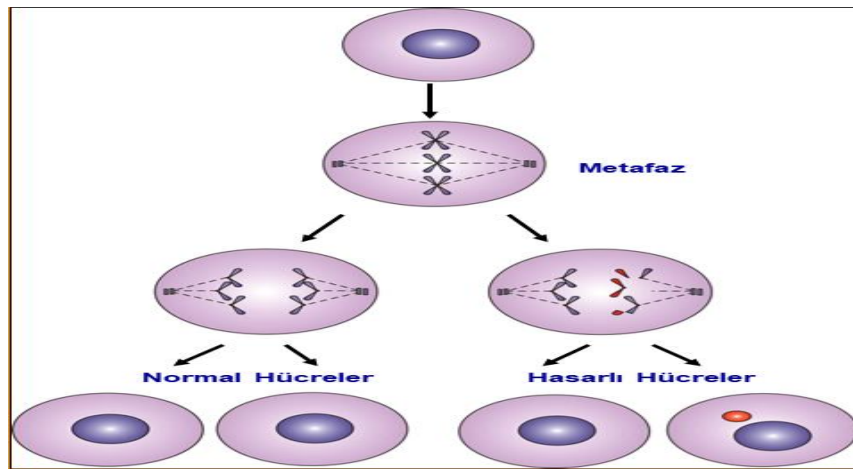
Hücre ömrü boyunca birikmiş genetik hasarın bir belirtici olan, suda yaşayan hayvanlarda en sık uygulanan genotoksisite biyobelirteçlerinden biridir. Mikronukleus (MN) testi, hem arazi hem de laboratuvar koşulları altında farklı bivalv mollusk türlerinde uygulanmıştır. Hemositler ve solungaç hücreleri en sık MN oluşumunun gözlemlendiği hedeflerdir [67, 70]. Mytilus cinsinde MN testinin uygulanması 20 yıldan daha uzun bir süre önce başlamıştır. Laboratuvar

koşullarında farklı kirleticilere maruz bırakılan midyelerde MN frekansları bildirilmiştir [67, 71, 72]. Önemli bir mortalite etkisi olmaksızın genotoksik bileşiklere sürekli maruziyetin ardından kontrol değerleri üzerinde beş ila altı kat MN frekasında zamana bağlı bir artış gözlemlenmiştir [67, 70, 74, 75].

MN testinin arazi çalışmalarında uygulanması, farklı kirletici sınıflarına (Örneğin; Polisiklik aromatik hidrokarbon, ağır metaller, organoklorlu bileşikler) maruz kalmanın etkilerini ortaya çıkarmıştır. Kirlilik artışı boyunca iyi bir ayırım derecesi göstermiş ve genotoksisite olaylarının tanımlanmasını mümkün kılmıştır [67, 70].

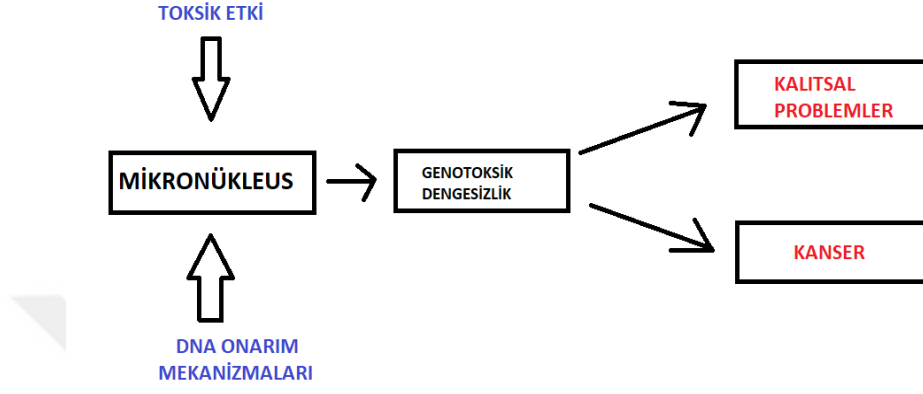
2.8.1.3. Mikronukleus Oluşum Mekanizması

Çeşitli yollarla ortaya çıkan genotoksik etkiler sonucunda hücre bölünmesinin metafaz evresinde gözlenebilen kromozomda kırık parçalar ya da tam iç ipliğine bağlanmayan tam kromozomlar, anafaz evresinde kutuplara çekilemezler. Bu nedenle ortada kalan tam kromozom ve kromozom parçaları hücre bölünmesinin son safhalarında yani telofaz evresinde ana nükleus içerisinde dail olmazlar (Şekil.2.4). Oluşan bu yapılar hücre bölünmesi sonucunda ana nükleusu oluşturacak diğer kromozomlar ile tekrar kromatin hale dönüştüklerinde, sitokinez (sitoplazma bölünmesi) ile birlikte oluşan kardeş hücrelerden birinde ana nükleus yanında ikinci bir küçük nükleus (mikronükleus) halinde kendilerini gösterirler [68].



Şekil.2.4. Mikronukleus Oluşum Şeması.

Bir toksik etki ile DNA onarım mekanizmaları arasındaki etkileşim sonucu ortaya çıkabilecek bir mikronükleus gelecekteki olası bir genomik dengesizliğe ve beraberinde kanser ve çeşitli kalıtsal problemlerin (Şekil.2.5) oluşma riskine işaret eder [76].



Şekil.2.5. Mikronukleus Oluşumunu Etkileyen Faktörler.

2.8.1.4. Mikronükleus Testinin Avantajları ve Dezavantajları

Avantajları;

- Birçok hücre tipine uygulanabilir.
- Hızlı, ucuz ve basit bir test sistemidir.
- Otomasyon potansiyeli vardır.
- İstatistik olarak güçlü sonuçlar verir.
- Klastojen ve anajen maddelerin ayırımına olanak tanır.
- Apoptoz ve Nekroz'un da görülmesini sağlar.

Dezavantajları;

- Tüm yapısal kromozom aberasyonlarını belirleyemeyiz.
- MN ifadesi için hücrenin bir bölünme geçirmesi gereklidir.
- Sitoklasin-B ile test edilen kimyasal arasındaki olası etkileşimler.

2.8.1.5. Temel Mikronukleus Tanımlama Kriterleri

- a) MN ana nükleusun 1/3'ünden daha küçük olmalıdır.
- b) MN ana nükleustan belirgin bir biçimde ayrılmış olmalıdır.
- c) MN ana nükleus ile aynı renk, doku ve fokus planına sahip olmalıdır.
- d) MN mutlaka sağlam, ve sitoplazması korunmuş olan hücrelerde analiz edilmelidir [76].

Mikronukleus test yöntemi ilk defa 1970'lerin ortasında tanımlanmıştır. Öncelikli olarak memeli sistemler için geliştirilmiş olan mikronukleus testi, farklı etmenlerin genotoksik etkilerinin araştırılmasında oldukça yaygın olarak kullanılan bir test metodu haline gelmiştir [76, 77].

İnterfaz hücrelerinde mikronukleus sayımı teknik açıdan metafaz analizlerine oranla çok daha kolay ve hızlı yöntemdir. Bu nedenle son yıllarda bir genotoksisite test metodu olarak mikronukleus testine olan ilgi artmış ve memeliler dışında diğer omurgalıları yanında bazı omurgasız hayvanlar ile birlikte bitkilere de uygulanmaya başlanmıştır.

Mikronukleus testi insan, midye, balık, kurbağa, birçok farklı organizmada uygulanmaktadır. İnsanda bukkal hücreleri ve lenfositler, balıklarda eritrositler ve midyelerde hemosit, mikronukleus testi için hücre kaynaklarıdır.

2.8.1.6. MN Testinin *Mytilus galloprovincialis*' de Uygulanma Protokolü

Hücrelerde MN oluşumunu gözlemlemek için tek hücreli süspansiyon elde etmek gerekir. Tek hücreli süspansiyonu elde etmek için de solungaçların enzimatik işlevlerini içeren mevcut protokol daha önce ki laboratuvar çalışmalarından örnek alınarak geliştirilmiştir [67,78-81]. Deneyin bir vadilasyon programı, doğal substratlardan toplanan *Mytilus galloprovincialis*' in yetişkinleri alınıp bazı yaygın deniz kirleticileri kontrollü koşullar altında kullanılarak laboratuvar çalışması yapılmıştır [73]. Bu da büyük ölçekli biyoizleme programlarından olan Akdeniz Kirliliği Programı'nda (MED POL) önerilen biyobelirteç tanımı, midyelerin hem hemositleri hem de solungaç hücrelerinde MN testi için standartlaştırılmış bir protokolün geliştirilmesine yol açmıştır [82 - 85]. Protokol *M. galloprovincialis* kullanılarak [84, 85] kıyı bölgelerinde biyoizleme çalışmalarında ve bir petrol

sızıntısı kazasının uzun süreli etsini izlemede midye ve istiridyelerin farklı beslenme habitatlarına sahip biyoindikatör türler olarak doğrulanmıştır [86, 87]. Aynı protokol deney sularındaki su dezenfektanlarına maruz kalan *Dreissena polymorpha* gibi tatlı su midyelerinde de başarıyla uygulanmıştır [88]. MN testi için deney protokolü, memeli hücrelerinde hali hazırda uygulanan cytome yaklaşımını takip eder, nükleer tomurcuklar (nükleer bud (NB)), apoptotik ve nekrotik hücreler gibi diğer nükleer değişikliklerin değerlendirilmesi kriterlerini içerecek şekilde laboratuvarlarda daha da rafine edilmiş ve güncelleştirilmiştir [76].

Arazi ve laboratuvar çalışmalarında *M. galloprovincialis* hemositlerinin toplanması ve preparasyonu için uygulanan yöntem bivalve mollusk kullanılan makalelerin büyük çoğunluğunda bildirilmiştir [89, 90]. Arazi çalışmalarında hipodermik iğne ile midyenin posterior yada addüktör kasından hemolenfin toplanması, hayvanı öldürmeden tekrarlanan örneklemelere izin verir ancak bu hemolenfin ne kadar özütlendiğine bağlıdır. Solungaç hücreleri ve hemositlerde MN sıklığını değerlendirmek için doğrulanan teknik farklı deniz bivalv [71, 73, 79, 87, 89, 91-95] ve tatlı su bivalvleri [88, 96, 97], arazi ve laboratuvar çalışmaları için en sık uygulanan yöntemlerdir. Ancak arazi çalışmalarında örnekler 24 saat içinde laboratuvara aktarılmalıdır [67]. Büyük ölçekli biyoizleme çalışmalarında solungaç hücreleri ve hemositlerin, hücre preparasyonuna yönelik ana sınırlama, tek hücreli süspansiyon elde edebilmek için tamponlarla enzimatik işlem, yıkım ve inkübasyon gerektirmesidir [67].

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Hayvanların Seçimi ve Toplanması

Konak, Alsancak, Göztepe, Pasaport, Karşıyaka, Bostanlı ve Foça istasyonlarından toplanan *Mytilus galloprovincialis* soğuk zincir yöntemi uygulanarak laboratuvara taşınmıştır.

3.1.1. *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) Genel Özellikleri

Mytilus galloprovincialis genel özellikleri alt başlıklarda detaylı bir şekilde verilmiştir.

3.1.1.1. Sistematigi

Midye, omurgasız filumunun mollusca (yumuşakça) şubesinde bivalvia (çift kabuklular) sınıfında mytilidae familyasına ait bir türdür (Şekil.3.1, Şekil.3.4). Midyeler sesil olarak yaşayan, deniz suyunu filtre eden, su içindeki süspansiyon ile beslenen canlılardır. Sistematigi aşağıdaki gibidir.

Phylum: Mollusca

Clasis: Bivalvia

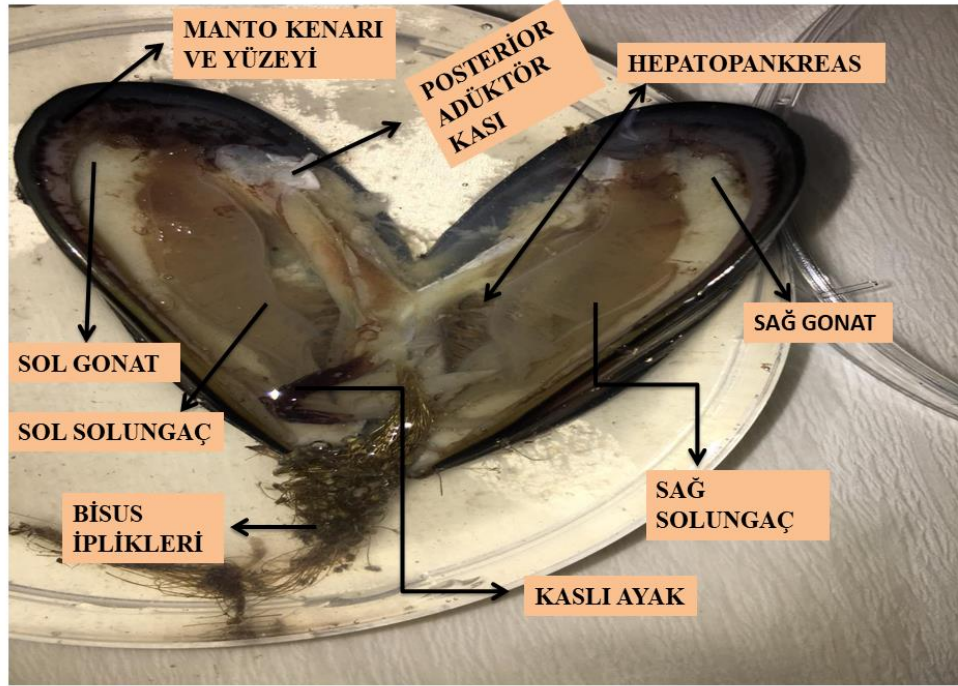
Ordo: Filibranchiata

Familya: Mytilidae

Genus: Mytilus

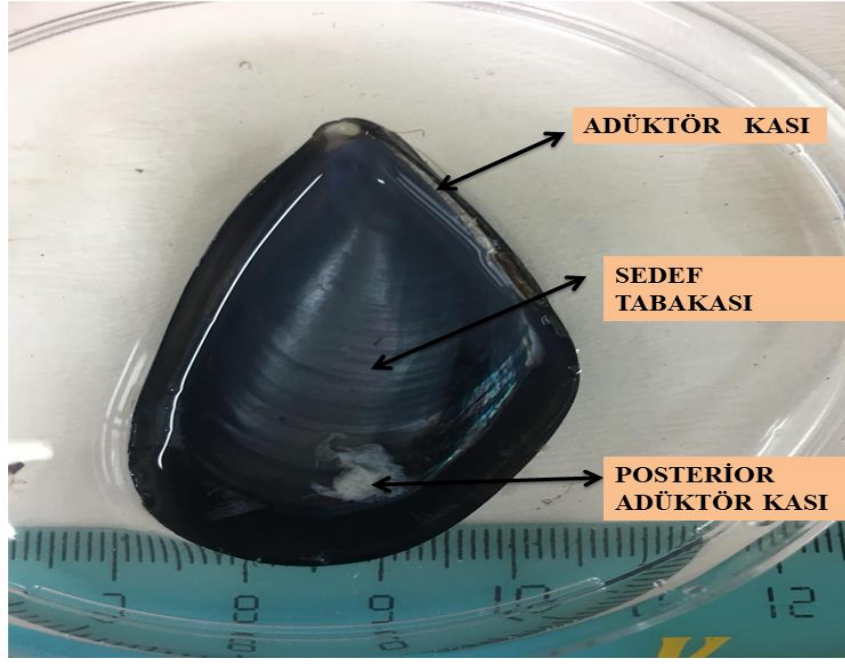
Species: *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck,1819).

Akdeniz midyesi (*Mytilus galloprovincialis*) türünde iki eşit parça şeklinde olan kabukların anterior, posterior, ventral ve dorsal kenar olmak üzere dört kısma ayrılır. Anterior bölgesi oldukça kısa olup kabuklar burada birbirlerine bağlanmıştır [98]. Posterior bölgesi oval, ön taraf ise üçgen biçimindedir (Şekil.3.3). İki kabuk kısa olan ön kenarda ligament ile birbirlerine bağlanmıştır. Ön kenarda yer alan ligament yarığı içine yerleşmiş olan ligament, öne doğru uzanan ve kabukları birbirine bağlayan kahverengi elastik bir şerit gibidir. Bu şeride paralel ve bitişik olan, mat ve beyaz renkte, üzerinde bir dizi halinde çukurluklar yer alan ligament çıkıntıları bulunur.



Şekil.3.1. Midye İç Organları.

Ligament, kapama kaslarının kapama kuvvetlerinin aksi yönünde bir kuvvete sahiptirler. Midyeler öldüklerinde, kaslar kapama kuvvetlerini kaybettiklerinden ötürü kabuklar açılır. Midyelerde kabukların bağlantı yerine yakın bir konumda her iki kabuk üzerinde umbo adı verilen bir şişkinlik mevcuttur ve kabukların üzerinde, bu şişkinlikten kenara paralel giden küçük eliptik daireler şeklinde büyüme çizgileri bulunur (Şekil.3.2). Kabuk rengi genel olarak siyah, siyahımsı mavi, koyu mor ve kahverengimsi tonlarda olup, ekolojik koşullara bağlı olarak değişiklik göstermektedir.



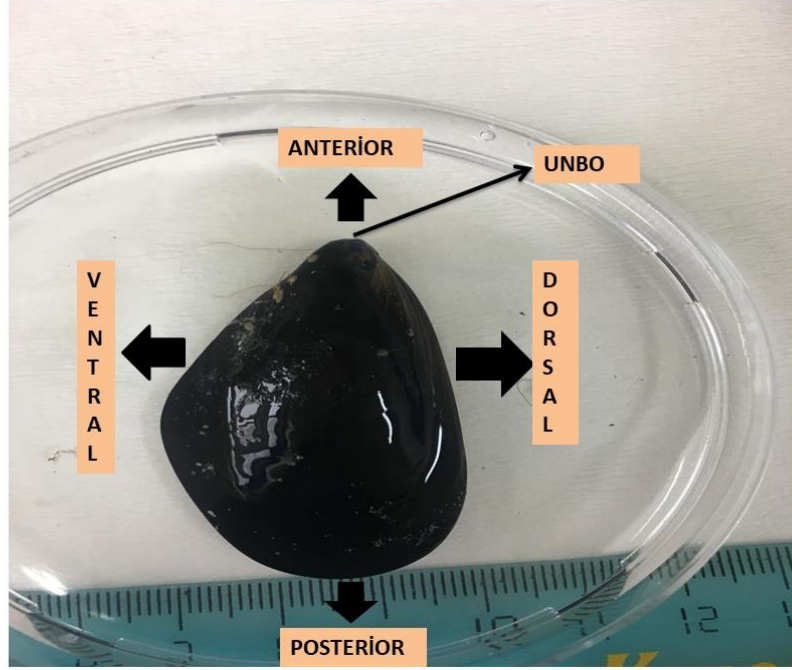
Şekil.3.2. Midyenin Kaslarının Kabuğa Bağlı Olduğu Noktalar.

Kabukların iç kısmı pürüzsüz olup bakıldığında kolayca fark edilebilen iki renge sahiptir. Orta kısım inci beyazı parlaklığındadır, kenarlara doğru renk koyu maviye dönüşür. Kabuklar bissus denen ipliklerle kendilerini bir nesnede tespit ederler. Kabuğun ventralinde yer alan bissus yarığı, periostrakum kıvrımlarıyla örtülmüştür ve bunlar, kabuklar kapandığında bissus iplikleri yardımıyla aralanan kabukların iç tarafına su ve yabancı cisim girmesine engel olurlar [99].

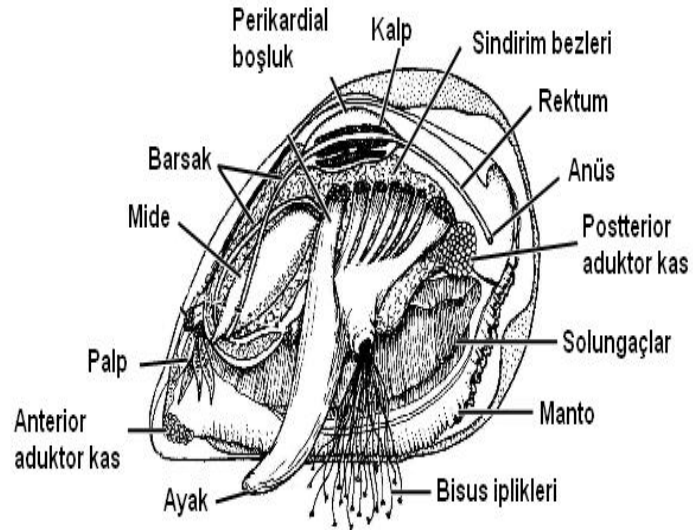
Midyelerde iki kabuk arasında menteşe bulunur. Dişlerin (radula) bulunduğu bu menteşenin dışını çevreleyen kısma lunula adı verilir. Sivri bir gaga şeklinde olan lunula, umbonun anterior ucunda ve periostrakum ile örtülü olması, burada bulunan diş şeklindeki çıkıntıların kolayca görünmesini engeller. Midyelerdeki dişler, sivrilmiş lamel şeklindedir ve her kabuktaki diş diğer kabuktaki çukurluğa uyum sağlayacak yapıdadır [99].

2–100 µm boyutlarında olan organik ve inorganik her türlü partikülü süzerek beslenen midyeler (ortalama 7-8 cm boyutunda olan) saatte 10-15 litre suyu süzme özelliğine sahiptir. Midye büyüklüğü, partikül yoğunluğu, partikül büyüklüğü,

partikül türü, su sıcaklığı ve su akıntısı gibi bazı parametreler midyelerin filtrasyon hızını doğrudan etkilemektedir [99].



Şekil.3.3. Midyenin Frontal Düzlemi.



Şekil.3.4. Midyenin iç organları (çizim).

3.1.1.2. Üremesi

Midyelerin üreme organları, kasları, solungaçları ve ayakları hariç vücudunun her tarafına dağılmış kanal ve kanalcıklar şeklindedir. Üreme döneminde mantoya dağılmış olan genital organında çok belirgin cinsiyet hücrelerine rastlamak mümkündür [99, 100].

Midyelerde mantonun genital hücrelerle tamamen dolu olması ve mantonun rengine göre cinsiyet ayrımı yapılır. Yumurtlama dönemlerinde manto rengi gözle görülebilen bir değişime uğrar. Olgun midyelerde gametler nedeniyle manto rengi dişilerde portakal rengi ya da kırmızımsı olurken erkeklerde kirli beyaz ya da süt beyazıdır [99, 100].

Su sıcaklığı, tuzluluk miktarı ve besin maddeleri midyelerin yumurta bırakma süresini ve yumurta bolluğunu etkileyen unsurlar arasında yer almaktadır. Midyelerde üreme dönemleri sonbahar ile ilkbahar mevsimlerinde sonlarıdır. Bu dönemlerde gametlerin atılması dalgalar, akıntı, tuzluluk ve sıcaklıkta olan ani değişimler gibi birçok çevresel faktöre bağlıdır [99, 101].

Manto içerisindeki dokularda gelişimlerini tamamlayan sperm ve yumurtalar genital kanallar aracılığıyla suya bırakılır. Yumurtalar gruplar halinde suya bırakılır. Suda birbirinden ayrılan yumurtalar pembe veya kırmızımsı bir renk olarak su yüzeyinde birikirler. Sperm bırakma ise aralıklı olarak yaklaşık 2-3 saat sürer. Spermier midye etrafında toplandıktan sonra su beyazımsı bir renk alır. Sudaki dalga ve diğer hareketler yumurtaların döllenmesinde oldukça önemli etkenlerdir [99].

Midyelerde suya bırakılan spermier kuyrukları ile yumurtaya kendilerini sararlar ve armut şeklindeki başlarıyla yumurta zarını delerek içeri girerler. Sperm yumurtaya girdikten 1 ile 5 dakika içinde döllenme zarı oluşur. Döllenmeden yaklaşık 4 saat 20 dakika sonra siler meydana gelir ve embriyonun vücudunun yüzeyinde siler oluşunca, büyüme ve hareket başlar [102].

3.1.1.3. Beslenmesi

Diğer filtre ediciler gibi midyelerde suda süspansiyon halindeki mikroorganizmalarla beslenir. Hayat tarzı sedenter olup beslenme için herhangi bir hareket görülmez. Solungaçları ile bir taraftan solunup yaparken diğer taraftan suyun hareketliliğini sağlar [100].

3.1.1.4. Solunumu

Mollusca türlerin beslenmesinde solunum oldukça önemli role sahiptir. Çünkü bu türde solunum organı olarak solungaçlar mevcuttur. Mantoları, direkt olarak çevresindeki suda mevcut olan gazla temas halinde olduğu için solunuma yardımcı olur. Birçok araştırmacı midyelerin oksijen tüketimi ile ilgili faktörleri araştırmıştır. Bu faktörlerden oksijen tüketiminin, hayvanın ağırlığı, beslenmesi ve ortam sıcaklığıyla ilgili olduğu tespit edilmiştir [100].

3.2. Kan Örneklerinin Alınması

Toplanan 15 adet midye 1 mL'lik enjektör yardımı ile addüktör kasları uyarılarak sıvısı alınmıştır (Şekil.3.5). Hemolenf örnekleri 3:1 oranında metanol asetik asit çözeltisinde fikse edilip, 1000 rpm' de santrifüjlenmiştir.



Şekil.3.5. Midyeden Hemolenfin Alınması.

3.3. Arazi Haritası ve Arazi Genel Özellikleri

İzmir Körfezi Türkiye'nin batı sahilinde ve Ege Denizi'ne açılan doğal bir körfezdır. 410,3 km²' lik bir alanda 38° 20N 38° 40N enlem, 26° 30E ve 27° 10E boylamında yer almaktadır [103]. İzmir Körfezi; dış, orta ve iç olmak üzere üç kesimden oluşur. Bu çalışma iç ve dış körfezden seçilen istasyonları (Göztepe, Alsancak, Pasaport, Konak, Bostanlı, Karşıyaka ve Foça) kapsamaktadır. Örnek toplanan istasyon haritası Şekil.3.6.'da koordinatları da Tablo.3.1.'de gösterilmiştir.



Şekil.3.6. Örneklerin Toplandığı İstasyonlar.

Tablo.3.1. Arazi Koordinatları

İSTASYON ADI	KOORDİNAT (Lat/ Long)	
	N	E
GÖZTEPE	38 24 03,4	27 05 13,8
KONAK	38 25 08,6	27 07 26,3
PASAPORT	38 25 27,5	27 07 38,8
ALSANCAK	38 25 47,9	27 07 57,4
KARŞIYAKA	38 26 54,1	27 06 44,6
BOSTANLI	38 27 05,9	27 05 50,5
FOÇA	38 00 00,8	26 04 53,6

3.4. Diferansiyel Hemosit Sayımı

Wright boya ile hazırlanan preparatlar hücre tiplerine göre sayılmıştır. İstatiksel değerlendirmede Kruskall Wallis testi uygulanmıştır [8].

3.5. Wright Boya Hazırlama ve Wright Boyama

0.30 g Wright toz boya 100 mL methanol ile manyetik karıştırıcıyla karıştırılır. 48 saat 37 °C etüvde bekletilir. Daha önceden 3:1 oranında metanol asetik asit çözeltisinde fiske edilmiş ve santrifüjden geçirilmiş hemolenf peletleri lama yayılıp kurutulurmuştur. Kuruduktan sonra 10 dakika methanol ile yıkama işlemi yapılır. Yıkama işlemi bittikten sonra tekrar kurutmaya bırakılır. Kuruma işlemi tamamlandıktan sonra lamaların üzerine Wright boya dökülür 2 dakika bekletilir. Tekrar üzerine boyayı yıkamayacak şekilde taze saf su dökülerek 10 dakika bekletilir. Lamalar saf su ile durulanır ve kurutmaya bırakılır. Kuruma işlemi bitince entellan ile lam kapatıldı [8].

3.6. Mikronukleus Testi

Giemsa boya ile hazırlanan preparatlar hücre nukleusu farklılıklarına (mikronukleus, binukleus,) göre sayım yapılmıştır [67].

3.7. Giemsa Boyama

Genotoksik etkiyi belirlemeye yönelik olarak mikronukleus sayımları için midyelerin hemolenf dokuları adüktör kası uyarılarak enjektörle alındıktan sonra 3/1 metanol asetik asit karışımı eklenir ve santrifüjden geçirilmiş hemolenf peletleri lama yayılıp kurutulmuştur. Yayma preparatların 1 saat süreyle kuruması beklendikten sonra , metanolde 10 dakika bekletilip %5 'lik Giemsa ile 20 dakika süre ile boyanmıştır. Yıkama işlemi bittikten sonra tekrar kurutmaya bırakılır. Lamlar saf sudan geçirildikten sonra kurutulup entallan ile kapatılmıştır [105].

3.8. Total Hemosit Sayımı

Hemolenf örnekleri 1:1 oranında hemolenf ve %4 lük formalin olacak şekilde 2.5 mL'lik enjektörlerle alınmıştır. (Şekil.3.7). Daha sonra toma lamı yardımıyla ışık mikroskobu altında toplam hemosit sayısı sayılmıştır. Hücrelerin fotoğraflanması için Diff-Quick boyama yapıldı. İstatistik değerlendirmede Kruskall Wallis testi uygulanmıştır [12].



Şekil.3.7. Hemolenfin Thoma Lamına Enjektesi.

3.9. Diff-Quick Boyama



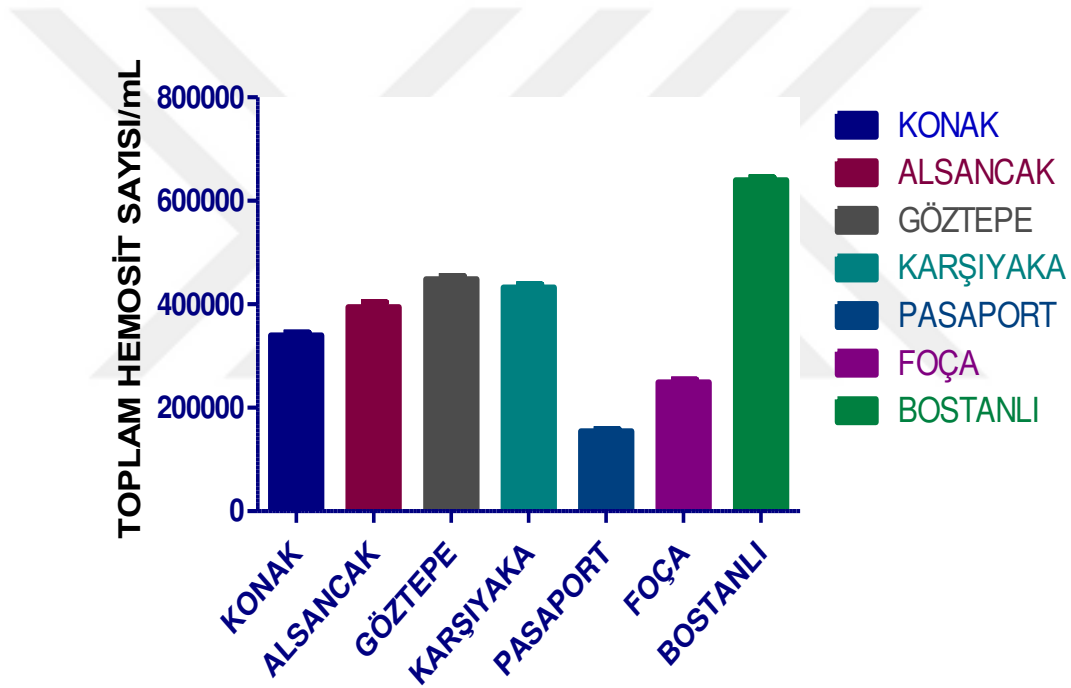
Şekil.3.8. Diff-Quick Boyama Düzenegi

Canlı yayma yapılan lamalar 1.aşamada metanol çözeltisinde 30 saniye bekletilip ve çıkartıldı. Lamin üzerindeki fazlalık metanolün süzülmesi sağlanır. Bu işlem sona erdikten sonra, 2. aşamada lam Eozin boyasında 30 saniye bekletilip ve çıkartıldı. Methanol çözeltisinde uygulanan prosedür gibi Eozin boyasının fazlalığının süzülmesi sağlandı. 3. aşamada numaralı şalede bulunan methilen mavisi boyasında 30 saniye bekletilip ve çıkartılıp fazlalık boyanın lamdan süzülmesi beklenir ve son basamak olan saf suda yıkama işlemi gerçekleştirildi. Boyama işlemi biten lamalar dikey şekilde kurumaya bırakılır. Kuruyan lamalar entallen ve lamel ile kapatılıp incelenmiştir (Şekil.3.8).

4. BULGULAR

4.1. Total Hemosit Sayımı

Nonparametrik istatistiksel testlerden Kruskal-Wallis testi yapıldı. Pasaport istasyonunda total hemosit sayısı (THS) ($154,33 \pm 433$) en düşük, Bostanlı istasyonunda da ($639,66 \pm 553,95$) en yüksek olduğu saptanmıştır. Referans istasyonu olarak seçilen Foça istasyonu diğer istasyonlarla karşılaştırıldığında yalnızca Pasaport istasyonunun THS sayısı düşük, diğer istasyonların yüksek çıkmıştır ($p < 0,05$).

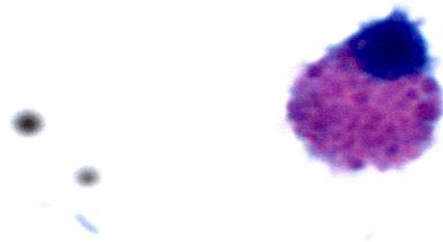


Şekil.4.1. Toplam Hemosit Sayısı Frekans Grafiği

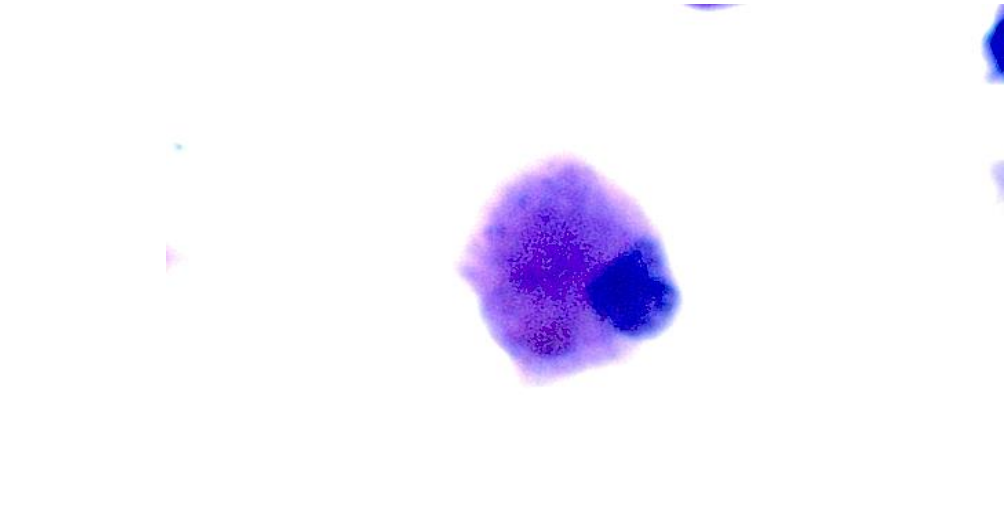
Göztepe- Karşıyaka, Alsancak- Göztepe, Konak- Alsancak istasyonları arasında istatistiksel olarak fark yoktur ($p > 0,005$). Pasaport istasyonu diğer istasyonlarla karşılaştırıldığında THS sayısının düşük olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$). Bostanlı istasyonunda THS sayısı diğer istasyonlara göre yüksek olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$). Şekil.4.1’de Toplam hemosit sayısı frekans grafiği gösterilmiştir. Hemosit alt popülasyonlarını görüntüleyebilmek için canlı yayma yapılan örnekler Diff-Quick boya ile boyanmıştır (Şekil.4.2, Şekil.4.3, Şekil.4.4).



Şekil.4.2. Diff-Quick Boya ile Boyanmış Hyalinosit (X 100)



Şekil.4.3. Diff-Quick Boya ile Boyanmış Eozinofilik Granülosit



Şekil.4.4. Diff-Quick Boya ile Boyanmış Bazofilik Granülosit (X 100)

4.2. Diferansiyel Hemosit Sayımı

Wright boyama yöntemiyle boyanan preparatlar, ışık mikroskobu ile incelendiğinde granülosit ve agranülosit olmak üzere iki hücre tipi gözlemlenmiştir. *Mytilus galloprovincialis*'de agranülosit hücrelerden biri olan hyalinositler saptanmıştır. Granülositlerde de bazofilik granülosit ve eozinofilik granülosit saptanmıştır.

Hyalinositler bazofilik karakterde olup nükleus sitoplazma oranının düşük olduğu gözlemlenmiştir. Eozinofilik granülositlerin sitoplazması pembe-mor renkte olup nükleusları küçüktür ve fagositik aktiviteye sahip oldukları için sitoplazmik çıkıntılar (sil, kamçı) bulundurmaktadır. Bazofilik granülositler mavi- mor renkte olup bol sitoplazma ve sitoplazmik çıkıntılara sahip olduğu gözlemlenmiştir. Hemosit alt popülasyonları Şekil.4.5-Şekil.4.9'a kadar gösterilmiştir.

Bazı granüllü hücrelerin sitoplazmik çıkıntıları yok olmuştur. Bunun sonucunda da hücre yuvarlaklaşmıştır.

Tablo.4.1. Hemosit Alt Populasyonu Yüzdeleri.

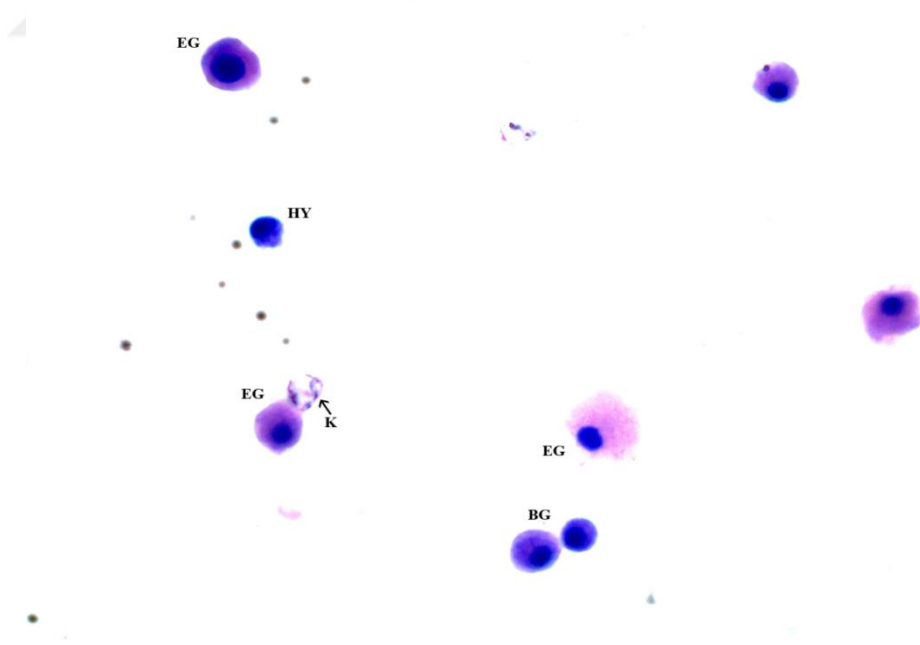
		%		
		AG (HY)	EG	BG
İSTASYONLAR	FOÇA	77	19	4
	BOSTANLI	27	47	26
	KONAK	60	36	4
	ALSANCAK	50	36	11
	GÖZTEPE	52	34	14
	KARŞIYAKA	35	53	12
	PASAPORT	36	58	6

Tablo.4.1'e göre referans istasyonu olan Foça istasyonuna göre diğer istasyonlarda eozinofilik granüler hemosit ve bazofilik granüler hemosit oranında artış, agranüler hemosit (hyalinosit) oranında da azalma söz konusudur. En yüksek hyalinosit miktarı %77'lik oranla referans istasyonu olan Foça istasyonunda, en düşük hyalinosit miktarıda %27'lik oranla Bostanlı istasyonunda olduğu bulunmuştur. En yüksek eozinofilik granülosit miktarı %58'lik oranla Pasaport istasyonunda, en düşük eozinofilik granülosit miktarı da %19'luk oranla Foça istasyonunda olduğu bulunmuştur. En yüksek bazofilik granülosit miktarı %26'lık oranla Bostanlı istasyonunda, en düşük bazofilik granülosit miktarı da %4'lük oranla referans istasyonu olan Foça istasyonunda bulunmuştur.

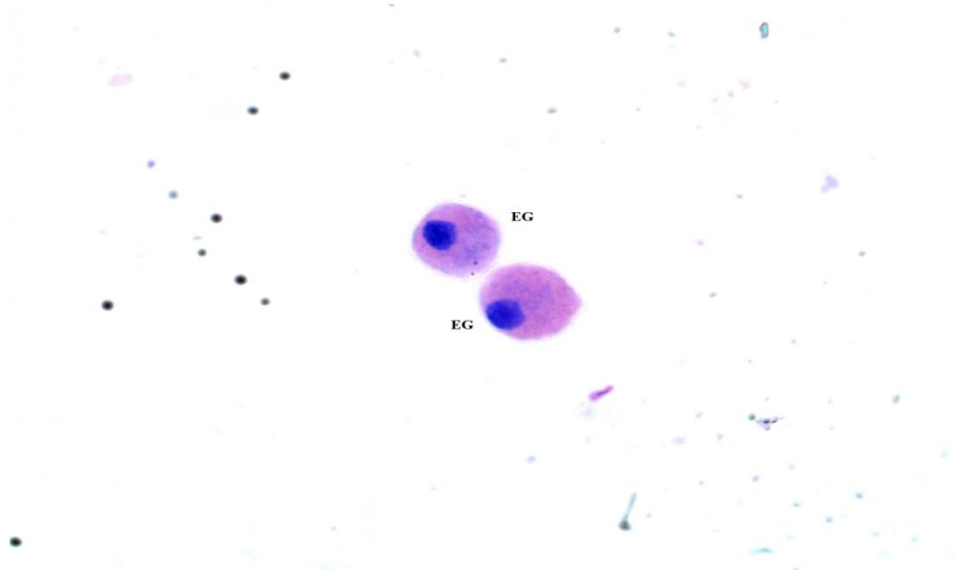
Bu gözlemlenen hücre tipleri dışında nekrotik ve apoptotik hücreler de gözlemlenmiştir. Fakat çok sık görülmediği için istatistiksel değerlendirilmeye alınmamıştır.



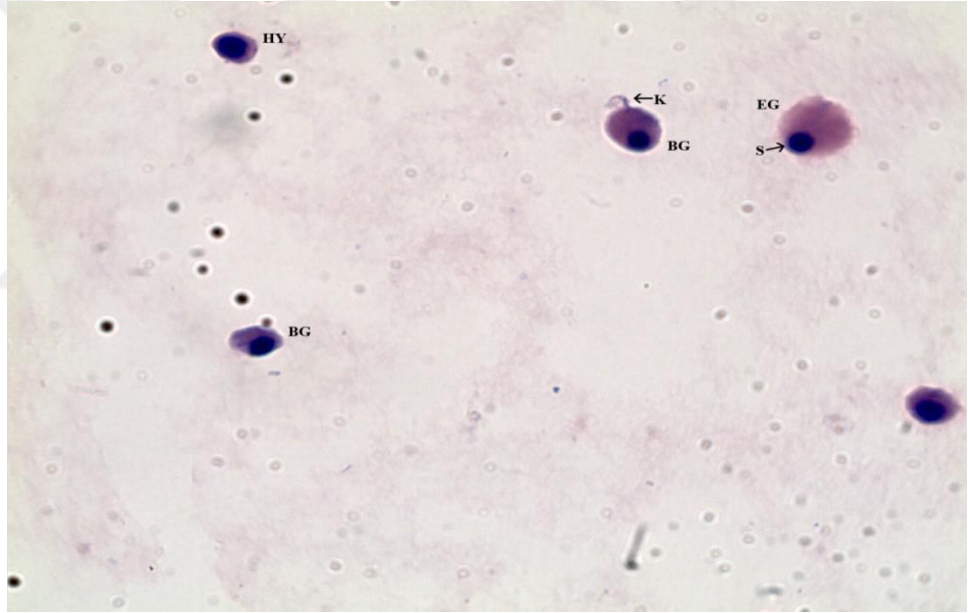
Şekil.4.5. Hemosit Alt Populasyonları (Wright boyama, < : bölünmek üzere olan hücre).



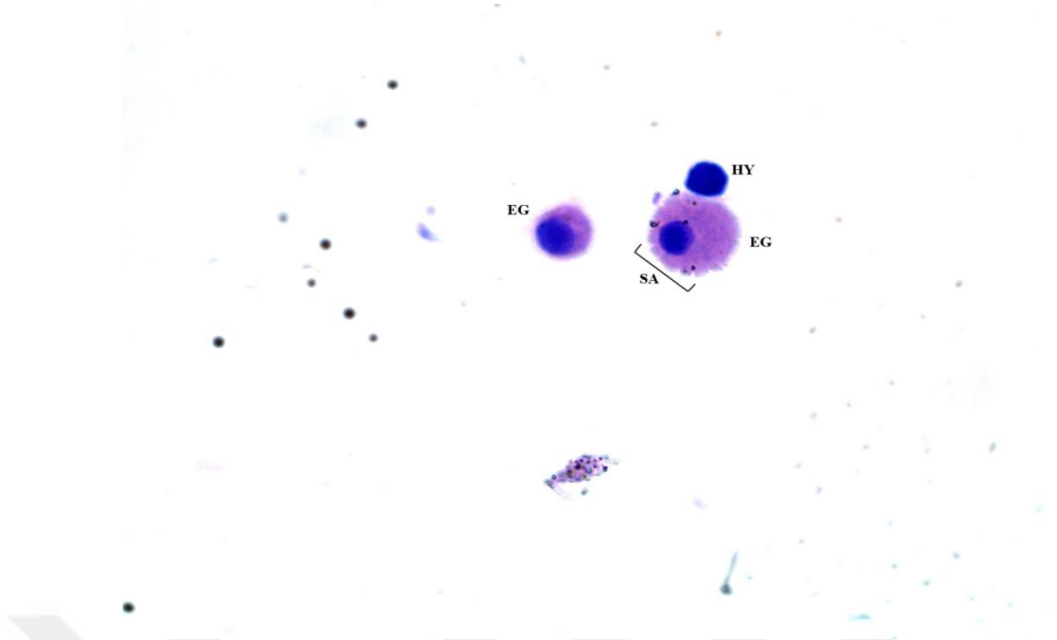
Şekil.4.6. Hemosit Alt Populasyonları (Wright boyama, K: kamçı, Büyütme: X 100).



Şekil.4.7. Hemosit alt populasyonları (Wright boyama, Büyütme: X 100).

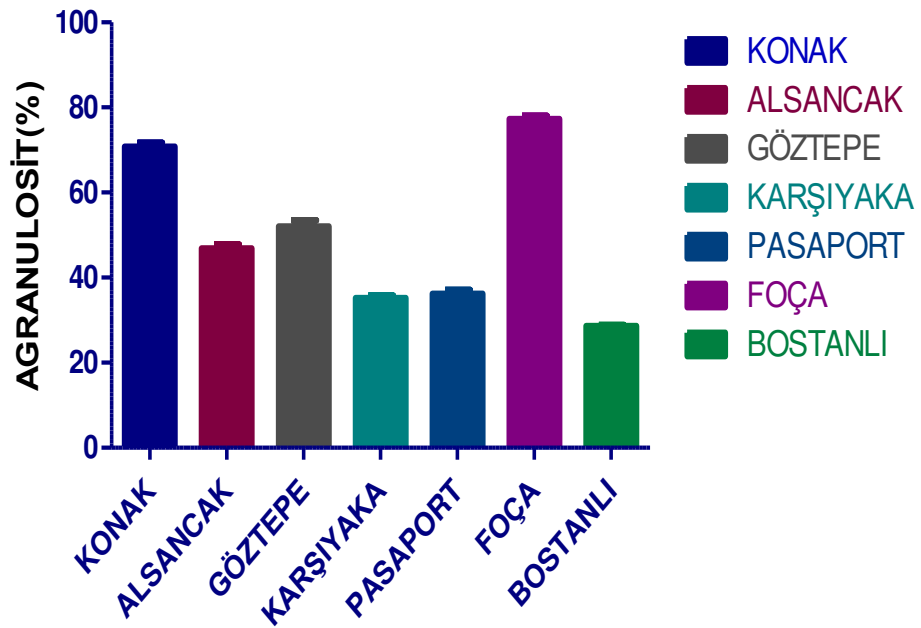


Şekil.4.8. Hemosit alt polulasyonları (Wright boyama, K: kamçı, S: sıl, Büyütme: X 100).



Şekil.4.9. Hemosit alt polulasyonları (Wright boyama SA: sitoplazmik anamoli, Büyütme: X 100).

4.2.1. İstasyonlara Göre İstatiksel Olarak Agranülosit Hemositlerin Karşılaştırılması



Şekil.4.10. İstasyonlara Göre Agranular Hemomsit (HY) Frekans Grafiği.

Nonparametrik istatistiksel testlerden Kruskal-Wallis testi yapılmıştır. Agranülosit hemosit sayısı en düşük Bostanlı istasyonunda, en yüksek Foça istasyonunda olduğu saptanmıştır (Şekil.4.10).

Referans bölgesi olarak seçilen Foça istasyonundaki agranülosit hemosit sayısı ile Alsancak, Karşıyaka ve Pasaport istasyonlarının agranülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Referans bölgesi olarak seçilen Foça istasyonundaki agranülosit hemosit sayısı ile Konak ve Göztepe istasyonlarının agranülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Alsancak istasyonundaki agranülosit hemosit sayısı ile Bostanlı istasyonunun agranülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Alsancak istasyonundaki agranülosit hemosit sayısı ile Konak, Göztepe, Karşıyaka ve Pasaport istasyonlarının agranülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Konak istasyonundaki agranülosit hemosit sayısı ile Karşıyaka, Pasaport ve Bostanlı istasyonlarının agranülosit hemosit sayılarındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Konak istasyonundaki agranülosit hemosit sayısı ile Göztepe istasyonunun agranülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Göztepe istasyonundaki agranülosit hemosit sayısı ile Bostanlı istasyonunun agranülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

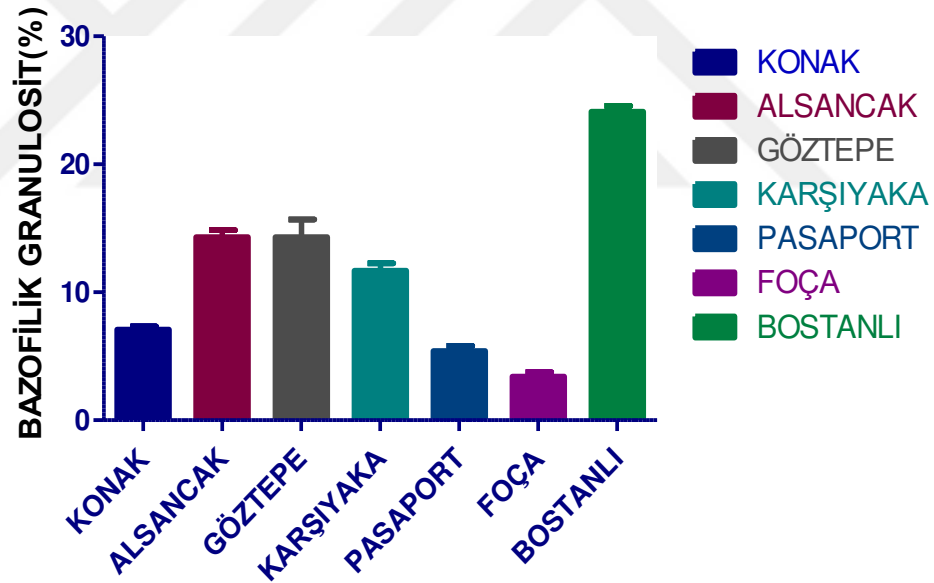
Göztepe istasyonundaki agranülosit hemosit sayısı ile Karşıyaka ve Pasaport istasyonlarının agranülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Karşıyaka istasyonundaki agranülosit hemosit sayısı ile Pasaport ve Bostanlı istasyonlarının agranülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Pasaport istasyonundaki agranülosit hemosit sayısı ile Bostanlı istasyonunun agranülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

4.2.2. İstasyonlara Göre İstatistiksel Olarak Bazofilik Granülosit Hemositlerin Karşılaştırılması

Nonparametrik istatistiksel testlerden Kruskal-Wallis testi yapıldı. Bazofilik granülosit hemosit sayısı en düşük Foça istasyonunda en yüksek Bostanlı istasyonunda olduğu saptanmıştır (Şekil.4.11).



Şekil.4.11. İstasyonlara Göre Bazofilik Granülosit (BG) Frekans Grafiği.

Referans bölgesi olarak seçilen Foça istasyonundaki bazofilik granülosit hemosit sayısı ile Alsancak, Göztepe ve Karşıyaka istasyonlarının bazofilik granülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Referans bölgesi olarak seçilen Foça istasyonundaki bazofilik granülosit hemosit sayısı ile Konak ve Pasaport istasyonlarının bazofilik granülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Alsancak istasyonundaki bazofilik granülosit hemosit sayısı ile Pasaport istasyonunun bazofilik granülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Alsancak istasyonundaki bazofilik granülosit hemosit sayısı ile Konak, Göztepe, Karşıyaka ve Bostanlı istasyonlarının bazofilik granülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Konak istasyonundaki bazofilik granülosit hemosit sayısı ile Bostanlı istasyonunun bazofilik granülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Konak istasyonundaki bazofilik granülosit hemosit sayısı ile Göztepe, Karşıyaka ve Pasaport istasyonlarının bazofilik granülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Göztepe istasyonundaki bazofilik granülosit hemosit sayısı ile Pasaport istasyonunun bazofilik granülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

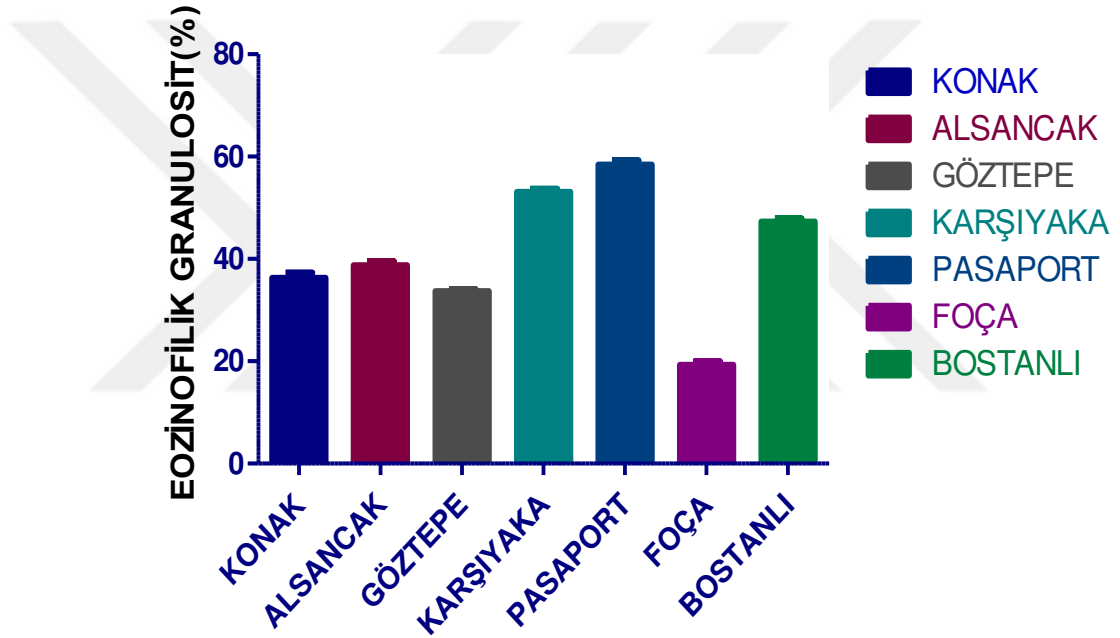
Göztepe istasyonundaki bazofilik granülosit hemosit sayısı ile Karşıyaka ve Bostanlı istasyonlarının bazofilik granülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Karşıya istasyonundaki bazofilik granülosit hemosit sayısı ile Pasaport ve Bostanlı istasyonlarının bazofilik granülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Pasaport istasyonundaki bazofilik granülosit hemosit sayısı ile Bostanlı istasyonunun bazofilik granülosit hemosit sayısının istatistiksel farkı anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

4.2.3. İstasyonlara Göre İstatistiksel Olarak Eozinofilik Granülosit Hemositlerin Karşılaştırılması

Nonparametrik istatistiksel testlerden Kruskal-Wallis testi yapıldı. Eozinofilik hemosit sayısı en düşük Foça istasyonunda en yüksek Pasaport istasyonunda olduğu saptanmıştır (Şekil.4.12).



Şekil.4.12. İstasyonlara Göre Eozinofilik Granülosit (EG) Frekans Grafiği.

Referans bölgesi olarak seçilen Foça istasyonundaki eozinofilik granülosit hemosit sayısı ile Karşıyaka, Pasaport ve Bostanlı istasyonlarının eozinofilik granülosit hemosit sayısındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Referans bölgesi olarak seçilen Foça istasyonundaki eozinofilik granülosit hemosit sayısı ile Alsancak, Konak ve Göztepe istasyonlarının eozinofilik granülosit hemosit sayısındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Alsancak istasyonundaki eozinofilik granülosit hemosit sayısı ile Pasaport istasyonunun eozinofilik granülosit hemosit sayısının istatistiksel farkı anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$)

Alsancak istasyonundaki eozinofilik granülosit hemosit sayısı ile Konak, Göztepe, Karşıyaka, Bostanlı istasyonlarının eozinofilik granülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Konak istasyonundaki eozinofilik granülosit hemosit sayısı ile Pasaport istasyonunun eozinofilik granülosit hemosit sayısının istatistiksel farkı anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Konak istasyonundaki eozinofilik granülosit hemosit sayısı ile Göztepe, Karşıyaka ve Bostanlı istasyonlarındaki eozinofilik granülosit hemosit sayılarında istatistiksel fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Göztepe istasyonundaki eozinofilik granülosit hemosit sayısı ile Karşıyaka ve Pasaport istasyonlarının eozinofilik granülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel farkı anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Göztepe istasyonundaki eozinofilik granülosit hemosit sayısı ile Bostanlı istasyonunun eozinofilik granülosit hemosit sayısının istatistiksel farkı anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Karşıyaka istasyonundaki eozinofilik granülosit hemosit sayısı ile Pasaport ve Bostanlı istasyonlarının eozinofilik granülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel farkı anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Pasaport istasyonundaki eozinofilik granülosit hemosit sayısı ile Bostanlı istasyonunun eozinofilik granülosit hemosit sayısının istatistiksel farkı anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

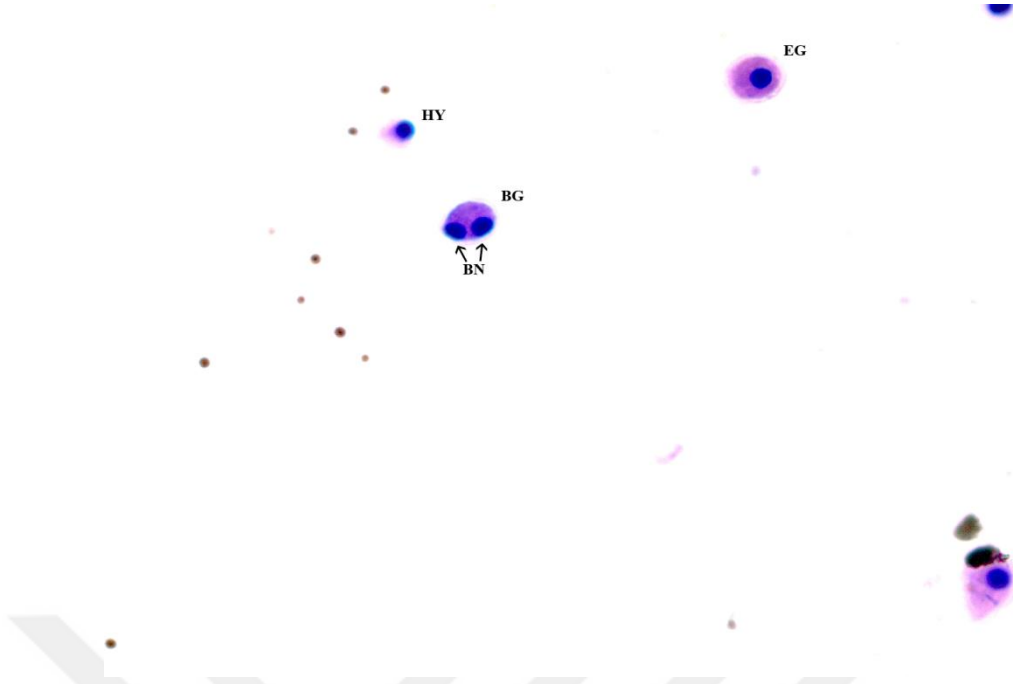
4.3. Mikronukleus ve Nukleus Anomalileri

Giemza boyama yöntemiyle boyanan preparatlar ışık mikroskopunda incelendiğinde nukleus anomaliliklerinden mikronukleus (MN) nükleer tomurcuklanma (BUD) ve binukleus (BN) bulunduran hücreler gözlemlenmiştir. Mikronukleus ve nükleus anomalilikleri Şekil.4.13- Şekil.4.15'e kadar gösterilmiştir.

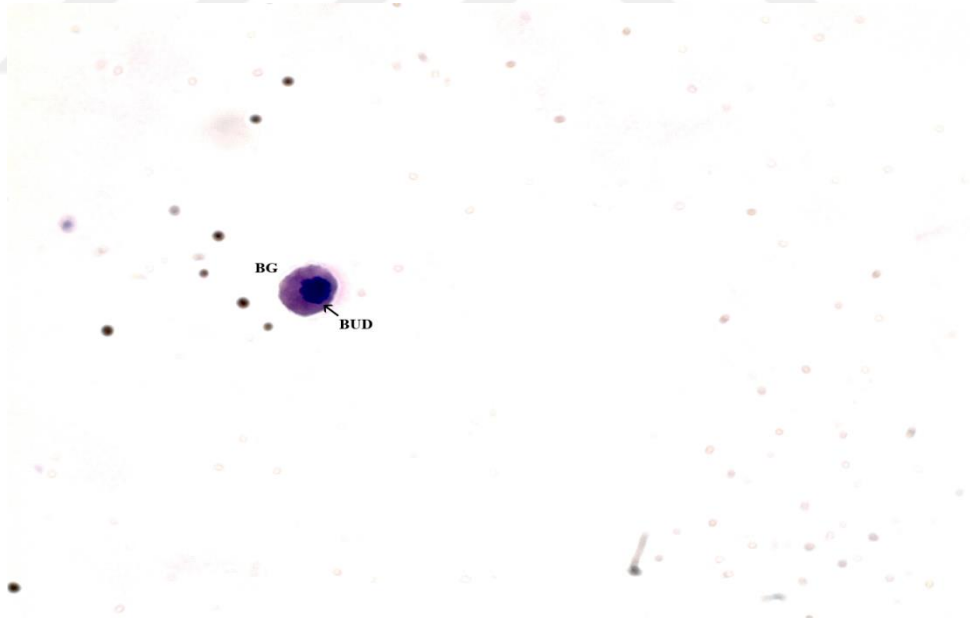
Tablo.4.2. İstasyonlara Göre MN ve Nükleer Anamoli Yüzdeleri.

		%			
		MN	BN	BUD	NORMAL
İSTASYONLAR	FOÇA	2,84	1,16	0,40	95,60
	BOSTANLI	11,40	4,28	3,28	82,38
	KONAK	4,31	3,16	2,01	90,12
	ALSANCAK	7,58	2,13	0,92	89,37
	GÖZTEPE	6,44	2,11	0,77	90,60
	KARŞIYAKA	8,53	2,02	2,40	87,01
	PASAPORT	5,70	3,90	2,43	87,97

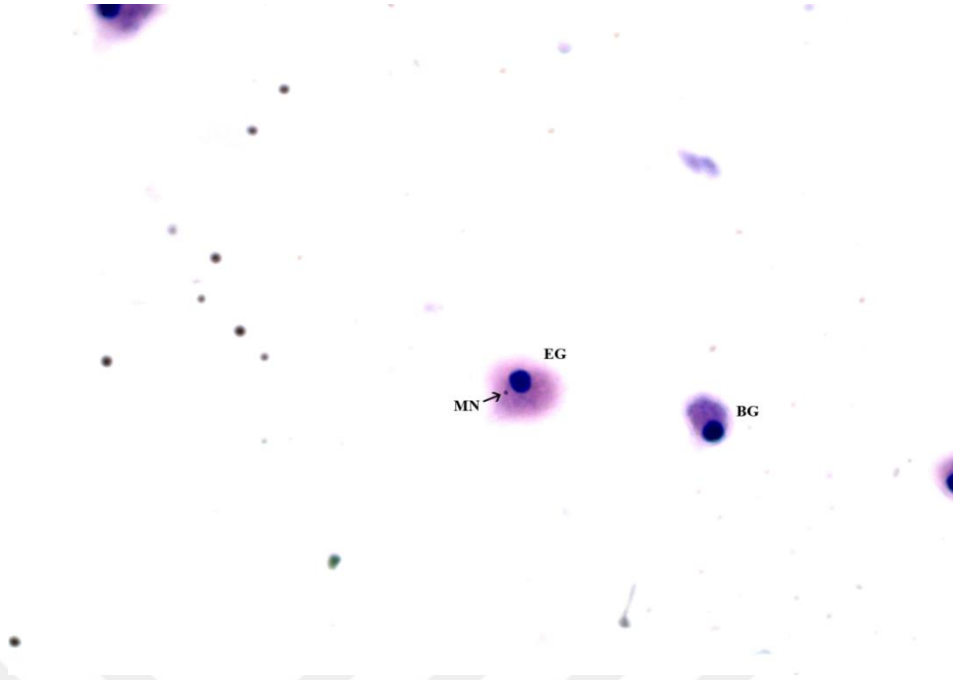
Tablo.4.2'ye göre referans bölgesi olan Foça istasyonuna göre diğer istasyonların nukleus anomaliliklerinde artış söz konusudur. En yüksek MN frekansı % 11,40' lık oranla Bostanlı istasyonunda, en düşük MN frekansı % 2,84' lük oranla referans istasyonu olan Foça istasyonunda olduğu saptanmıştır. BN frekansının en yüksek oranı % 4, 28 oranla Bostanlı istasyonunda, en düşük oranın da % 1,16' lık oranla Foça istasyonunda olduğu belirlenmiştir. BUD frekansı oranları karşılaştırıldığında da en yüksek BUD frekansı % 3,28'lik oranla Bostanlı istasyonunda en düşük % 0,40'lık oranla Foça istasyonunda olduğu saptanmıştır.



Resim.4.13. Hemosit Alt Populasyonları ve BN'li Bazofilik Granülosit (Büyütme : X 100).

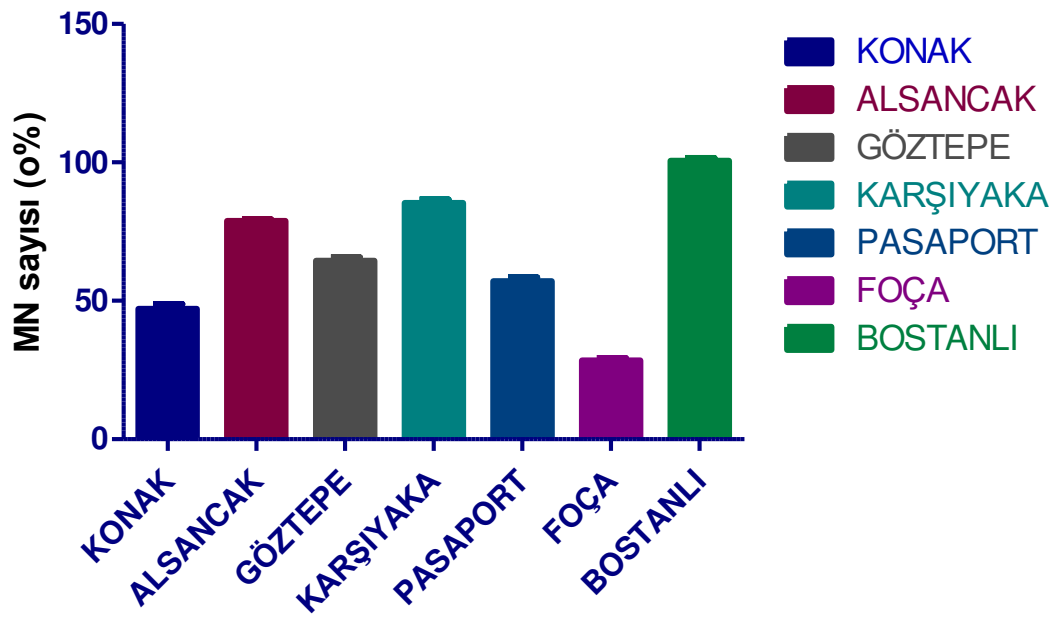


Resim.4.14. Bazofilik Granülosit ve NB (Büyütme: X 100).



Resim.4.15. MN'li Eozinofilik Granülosit ve Bazofilik Granülosit (Büyütme: X 100).

4.3.1. İstasyonlara Göre İstatiksel Olarak Mikronukleus Frekanslarının Karşılaştırılması



Şekil.4.16. İstasyonlara Göre MN Frekans Grafiği.

Nonparametrik istatistiksel testlerden Kruskal-Wallis (Nonparametrik ANOVA) Testi kullanılmıştır. Mikronukleus frekansı en yüksek Bostanlı istasyonunda en düşük Foça istasyonunda olduğu saptanmıştır (Şekil.4.16).

Referans bölgesi olarak seçilen Foça istasyonunun MN frekansı ile Alsancak, Göztepe, Karşıyaka ve Bostanlı istasyonlarının MN frekanslarının istatistiksel farkı anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Foça istasyonunun MN frekansı ile Konak ve Pasaport istasyonlarının MN frekanslarının istatistiksel farkı anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Alsancak istasyonu MN frekansı ile Konak istasyonunun MN frekansının istatistiksel farkı anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Alsancak istasyonunun MN frekansı ile Göztepe, Karşıyaka, Pasaport ve Bostanlı istasyonlarının MN frekanslarının istatistiksel farkı anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Konak istasyonu MN frekansı ile Karşıyaka ve Bostanlı istasyonlarının MN frekanslarının istatistiksel farkı anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Konak istasyonu MN frekansı ile Pasaport istasyonunun MN frekansının istatistiksel farkı anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Göztepe istasyonu MN frekansı ile Bostanlı istasyonlarının MN frekansının istatistiksel farkı anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Göztepe istasyonu MN frekansı ile Karşıyaka ve Pasaport istasyonlarının MN frekansının istatistiksel farkı anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

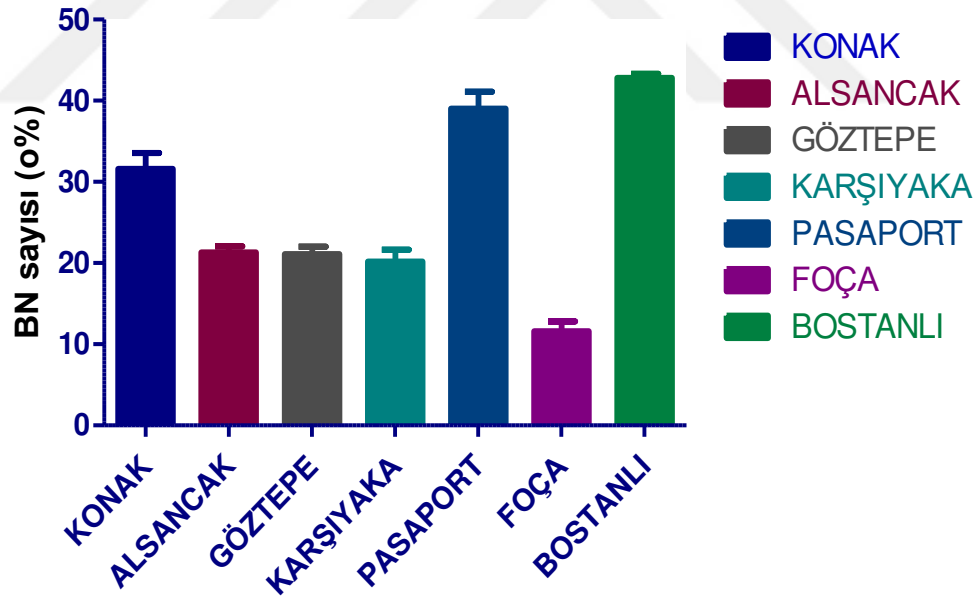
Karşıyaka istasyonu MN frekansı ile Pasaport istasyonunun MN frekansının istatistiksel farkı anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Karşıyaka istasyonu MN frekansı ile Bostanlı istasyonunun MN frekansının istatistiksel farkı anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Pasaport istasyonu MN frekansı ile Bostanlı istasyonu MN frekansının istatistiksel farkı anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

4.3.2. İstasyonlara Göre İstatistiksel Olarak Binukleus Frekanslarının Karşılaştırılması

Nonparametrik istatistiksel testlerden Kruskal-Wallis (Nonparametrik ANOVA) Testi kullanılmıştır. Mikronukleus frekansı en yüksek Bostanlı istasyonunda en düşük Foça istasyonunda olduğu saptanmıştır (Şekil.4.17).



Şekil.4.17. İstasyonlara Göre BN Frekans Grafiği.

Referans bölgesi olarak seçilen Foça istasyonu BN frekansı ile Konak, Pasaport ve Bostanlı istasyonlarının BN frekanslarının istatistiksel farkı anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Foça istasyonu BN frekansıyla Alsancak, Göztepe ve Karşıyaka istasyonlarının BN frekanslarının istatistiksel farkı anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Alsancak istasyonu BN frekansıyla Konak, Göztepe, Karşıya istasyonlarının BN frekanslarının istatistiksel farkı anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Alsancak istasyonu BN frekansıyla Pasaport ve Bostanlı istasyonlarının BN frekanslarının istatistiksel farkı anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Konak istasyonu BN frekansıyla Göztepe, Karşıyaka, Pasaport ve Bostanlı istasyonlarının BN frekanslarının istatistiksel farkı anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Göztepe istasyonu BN frekansıyla Pasaport ve Bostanlı istasyonlarının BN frekanslarının istatistiksel farkı anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

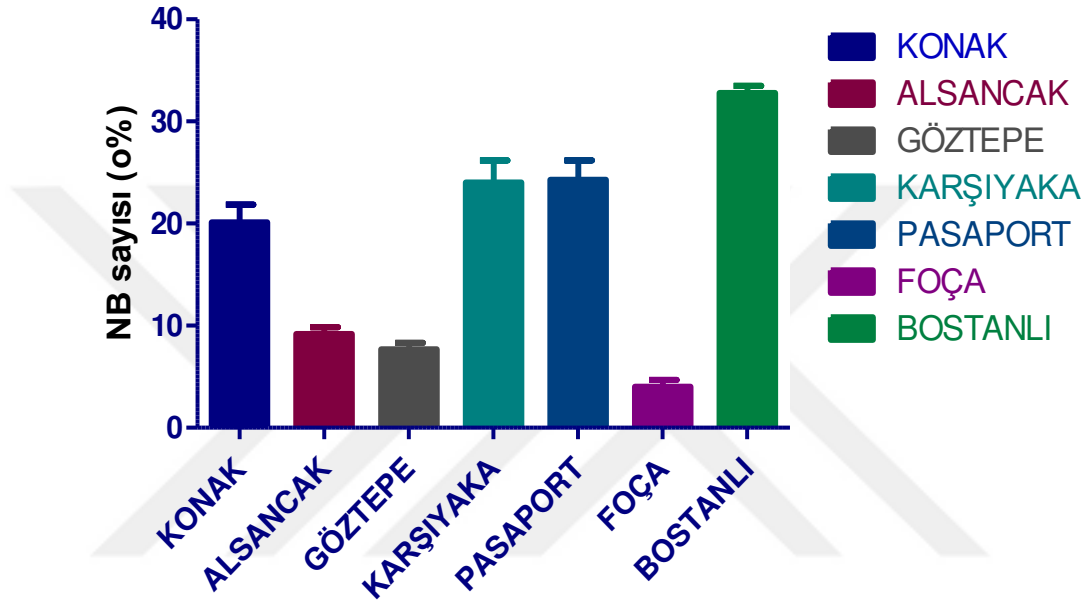
Göztepe istasyonu BN frekansıyla Karşıyaka istasyonu BN frekansının istatistiksel farkı anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Karşıyaka istasyonu BN frekansıyla Pasaport ve Bostanlı istasyonlarının istatistiksel farkı anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Pasaport istasyonu BN frekansıyla Bostanlı istasyonu BN frekansının istatistiksel farkı anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

4.3.3. İstasyonlara Göre İstatiksel Olarak Nükleer Bud (NB) Frekanslarının Karşılaştırılması

Nonparemetrik istatistiksel testlerden Kruskal-Wallis Testi uygulanmıştır. Nükleer bud (NB) frekansı en yüksek Bostanlı istasyonunda en düşük Foça istasyonunda olduğu saptanmıştır (Şekil.4.18).



Şekil.4.18. İstasyonlara Göre NB Frekans Grafiği.

Referans bölgesi olarak seçilen Foça istasyonu NB frekansı ile Konak, Karşıyaka, Pasaport ve Bostanlı istasyonlarının NB frekanslarının istatistiksel farkı anlamlıdır ($p < 0,05$).

Foça istasyonu NB frekansı ile Göztepe istasyonunun NB frekansının istatistiksel farkı anlamlı değildir ($p > 0,05$).

Konak istasyonu NB frekansı ile Pasaport ve Bostanlı istasyonlarının NB frekanslarının istatistiksel farkı anlamlı değildir ($p > 0,05$).

Göztepe istasyonu NB frekansı ile Karşıyaka ve Bostanlı istasyonlarının NB frekanslarının istatistiksel farkı anlamlıdır ($p < 0,05$).

Karşıyaka istasyonu NB frekansıyla Pasaport ve Bostanlı istasyonlarının NB frekanslarının istatistiksel farkı anlamlı değildir ($p>0,05$).

Pasaport istasyonu NB frekansıyla Bostanlı istasyonunun NB frekansının istatistiksel farkı anlamlı değildir ($p>0,05$).



5. TARTIŞMA

Bu araştırma midye *Mytilus galloprovincialis*'in toksisite çalışmalarında hematolojik ve genotoksik yanıtların kullanılması ve değerlendirilmesi için bir ön çalışma niteliğindedir.

Birçok kirleticinin, omurgasız iç savunmasında önemli rolleri olan hemositlerin fonksiyonlarında değişikliğe ve nükleus anomaliliklerine sebep olduğu bilinmektedir. Toplam hemosit sayısı [12]; fagositoz, reaktif oksijen (ROS) türlerinin üretimi [15, 115] ve lizozomal membran stabilitesi [106], genel olarak midyelerde kirleticili kaynaklı immünotoksikite değişiklikleri olarak kabul edilmektedir.

Kompleks kirleticilere karşı en belirgin tepki Toplam Hemosit Sayısı'nda değişiklik (artış ya da azalma), diferansiyel hücre sayımında da granülosit hücre sayısındaki artış ve agranülositlerde azalma olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu da toksik maddeye maruz kalan midye hemolenf hücrelerinin (hemosit) hasarı sonucunda hematopoietik dokuya geçerek hemolenfte dolaşan hemosit sayısında azalmaya, hematopoietik dokuda üretilen hemosit hücrelerinin diapedesiz ile hemolenfe geçmesiyle de hemolenfteki hemosit sayısında artışa sebep olmaktadır. Bununla birlikte nükleer anomaliliklerin sayısında da artışa sebep olmaktadır. Bu artış yada azalma toksik madde ve kompleks kirleticilerin immünolojik ve genotoksik etkilerine göre değişmektedir. Aynı zamanda granüllü hücrelerin sitoplazmik çıkıntılarının yok olduğu bunun sonucunda da hücrelerin yuvarlaklaştığı gözlemlenmiştir.

Çevresel gözlem çalışmalarının büyük bir kısmında Toplam hemosit sayısı, Diferansiyel hemosit sayımları, (granülosit ve agranulosit hücre tipleri) ve nükleer anomali gibi elde edilen veriler kullanılmaktadır. Çalışmamızda yukarıda sözü edilen parametreler ölçülerek çevresel kirliliğin etkileri ortaya konulmaya çalışılmış ve çevresel gözlem ve inceleme çalışmalarında immünolojik ve genotoksik parametrelerin incelenmesi fizyolojik bir yaklaşım olarak ele alınmıştır. Bu amaçla seçilen 7 istasyondan (Göztepe, Alsancak, Pasaport, Konak ,Bostanlı, Karşıyaka ve Foça) alınan örneklerin hemolenflerinde total hemosit sayısı ve

diferansiyel hemosit sayımları ve mikronukleus testini uygulanmıştır. Yapılan çalışmanın sonuçlarına göre, MN frekansı, total ve diferansiyel hemosit sayımları referans istasyonunun olan Foça istasyonu ile kıyaslandığında, kirliliğin yoğun olduğu Bostanlı ve Pasaport istasyonlarında değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir.

Nonparametrik istatistiksel testlerden Kruskal-Wallis testi yapıldı. Pasaport istasyonunda total hemosit sayısı (THS) ($154,33 \pm 433$) en düşük, Bostanlı istasyonunda da ($639,66 \pm 553,95$) en yüksek olduğu saptanmıştır. Referans istasyonu olarak seçilen Foça istasyonu diğer istasyonlarla karşılaştırıldığında yalnızca Pasaport istasyonunun THS sayısı düşük, diğer istasyonların yüksek çıkmıştır ($p < 0,05$).

Göztepe- Karşıyaka, Alsancak- Göztepe, Konak- Alsancak istasyonları arasında istatistiksel olarak fark gözlenmemiştir ($p > 0,005$). Pasaport istasyonu diğer istasyonlarla karşılaştırıldığında THS sayısının düşük olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$). Bostanlı istasyonunda THS sayısı diğer istasyonlara göre yüksek olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$).

Pipe ve Coles, [1995], Venedik lagününde *Mytilus edulis* türünde yaptıkları araştırmada çevresel toksik maddelere maruz kalmaya yanıt olarak dolaşımdaki hemosit sayındaki artışın en yaygın görülen değişikliklerden biri olduğunu göstermiştir. Buna karşın *M. edulis* türünün kadmiyuma maruz kalması sonucu dolaşımdaki hemosit sayısını düşürmüştür [107, 108].

Novoa ve ark., [1998], *Ruditapes decussates* ve *Ruditapes phillipinarum* türleri *Vibrio tapetis* ile yaptıkları çalışmada inoküle edildikten sonra dolaşımdaki hemosit sayısında artış olduğu gözlemlenmiştir [109].

Pipe ve Coles tarafında 1994 yılında yapılan araştırmada önceden bakıra maruz kalmış *M. edulis* türünün *Vibrio tubiashii* türüne maruz kalmanın ardından, *V. tubiashii* türüne maruz kalmamış midyelerle karşılaştırıldığında dolaşımdaki hemosit sayısını düşürdüğü tespit edilmiştir [33].

Parry ve Pipe tarafından 2004 yılında yapılan araştırmada iki deney yapılmıştır. Birinci çalışmada 0,02 ve 0,05 ppm'de bakır ile ardışık olarak maruz bırakıldıktan sonra *V. tubiashii* bakterisi ile maruz bırakılmıştır. İkinci çalışmada, midye eşzamanlı olarak bakır ve *V. tubiashii*'ye maruz bırakılmıştır. Her iki çalışma da sıcaklığın immün yanıt üzerinde ek bir etkiye sahip olup olmadığını belirlemek için 10 ve 15 ° C'de gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu çalışmada sıcaklığın 5°C yükselmesi bakıra ön maruziyetinden sonra *V. tubiashii*'ye maruz bırakılan midyelerin dolaşımdaki toplam hemosit sayısını arttırmıştır. Sonuç olarak her iki çalışmada da 10 ve 15 ° C'de sıcaklığa maruz bırakılan midyeler, düşük bakır konsantrasyonuna maruz bırakıldığında dolaşımdaki toplam hemosit sayısında artış gözlenmiştir ancak, daha yüksek seviyedeki bakır konsantrasyonuna maruz kalan midyelerin dolaşımdaki toplam hemosit sayısında azalma söz konusu olduğu saptanmıştır. Hemosit sayısında artış, düşük kirletici seviyelerine nispeten hızlı tepki göstermesine, bakteri yüklemesinin de kan hücrelerinin poliferasyonunu uyarmaktan çok hematopoietik dokulardan salınımına neden olduğu yorumu yapılmıştır [107]. Bununla birlikte, midyeler aynı zamanda *V. tubiashii*'ye ve 0,02 ppm bakıra maruz bırakıldığında dolaşımdaki toplam hemosit sayısının azaldığı ve daha sonra 0,05 ppm bakır eklendiğinde dolaşımdaki toplam hemosit sayısının tekrar arttığı saptanmıştır. Hemosit sayısında azalma hematopoiezis azalması veya hemositlerin dolaşım sisteminden dokulara göçüne bağlı olduğunu belirtmişlerdir [2, 107]

Ciacchi ve ark., [2011], midye *M. galloprovincialis* türü 0.1–1–10–100 µM konsantrasyonlar 96 saat Cr (VI)'ya maruz bırakılmıştır. Buna bağlı olarak Cr (VI)'nın düşük konsantrasyonunda bile dolaşımdaki total hemosit sayısında azalma olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada olduğu gibi bizim çalışmamızda da referans istasyonuna göre Pasaport istasyonunun total hemosit sayısında azalma olduğu saptanmıştır [110].

Pipe ve ark., [1999], *M. edulis* türü 7 gün boyunca 0,02 ve 0,05 ppm bakıra maruz bırakıldığında dolaşımdaki toplam hemosit sayısında belirgin bir artış olduğu belirtilmiştir. Dolaşımdaki toplam hemosit sayısının yükselmesi, çevresel stres faktörlerine bir tepki olduğu belirtilmiştir. Yine aynı konu üzerinde çalışma yapan araştırmacılar *M. edulis*'in flüoranten [111], kadmiyum [33] hem fenol hem de sıcaklık stresine [112] maruz kalması sonucu dolaşımdaki toplam hemosit sayısında

artışa sebep olduğunu gözlemlemişlerdir. Belirtilen stresörlerin geri çekilmesiyle bu tepkinin geri dönüşümlü olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada olduğu gibi bizim çalışmamızda da referans istasyonuna göre Bostanlı istasyonunun total hemosit sayısında artış oldu saptanmıştır [11].

Bivalv molluskların hemosit alt populasyonlarının sınıflandırılması hala tartışma konusudur ve mevcut hemolitik adlandırmalar tutarsızdır. İlk olarak bivalve mollusk hemositlerinin sinaptik ve tutarlı bir sınıflandırmasını önermek için literatür bilgileri hala yetersizdir. İkinci olarak tanımlanan hemosit alt populasyonlarındaki çeşitlilik kullanılan deney ve yöntemlere atfedilebilir. Bivalve mollusk hemositlerinin tayini ile ilgili tartışmalara rağmen hemosit hücrelerinin iki alt populasyonu belirlenmiştir ve çeşitli araştırmacılar tarafından kabul edilmiştir. Bu çalışmada wright boyama yöntemiyle boyanan preparatlar, ışık mikroskobu ile incelendiğinde granülosit ve agranülosit (hyalinosit) olmak üzere iki hemosit alt populasyonu gözlemlenmiştir. *Mytilus galloprovincialis*'de agranülosit hücrelerden biri olan hyalinositler saptanmıştır. Granülositlerde de bazofilik granülosit ve eozinofilik granülosit saptanmıştır. Benzer sonuçlar istiridye [117], kum midyesi [52, 54, 55] , midye [114] ve taraklılarda da [49-51], bulunmuştur.

Hyalinositler bazofilik karakterde olup nükleus sitoplazma oranının düşük olduğu gözlemlenmiştir. Eozinofilik granülositlerin sitoplazması pembe-mor renkte olup nukleusları küçüktür ve fagositik aktiviteye sahip oldukları için sitoplazmik çıkıntılar (sil, kamcı) bulundurmaktadır. Bazofilik granülositler mavi- mor renkte olup bol sitoplazma ve sitoplazmik çıkıntılara sahip olduğu gözlemlenmiştir.

Bazı granüllü hücrelerin sitoplazmik çıkıntıları yok olduğu ve bunun sonucunda da hücre yuvarlaklaştığı bulunmuştur.

Fagotti ve ark., [1996], yapılan çalışmada Cu^{2+} , ye maruz bırakılan *Mytilus galloprovincialis*'in eozinofilik granüler hemositlerinin sitoplazmik çıkıntılarının yok olduğu saptanmış, bununla birlikte kontrol grubuna göre daha yüksek nükleo sitoplazmik orana sahip olduğu belirtilmiştir [115].

Kadmiyum (Cd), bakır (Cu) ve organik ksenobiyotiklerin (parakuat ve benzo [a] piren) mevcudiyetinde *M.galloprovincialis* hemositlerinin hücre uzantılarının yok olduğunu ve hücrelerin yuvarlak bir şekil aldığı belirtilmiştir [116, 117].

Mottin ve ark., [2010], *H. tuberculata*'nın 100 ve 1000 μ M çinko maruziyeti sonrası hemositleri incelendiğinde, hemositlerin kontrol grubuna göre yuvarlaklaştığı ve hücre alanlarının sırasıyla %36 ve %56 oranlarında azaldığını belirtmiştir. Benzer şekilde Latire ve ark., 2012 *H. tuberculata*'nın kadmiyum maruziyeti sonrası hemosit hücrelerinin daha yuvarlak hale geldiğini tespit etmişlerdir [117, 118, 129].

Yukarıda sözü edilen çalışmaların sonuçlarıyla bizim yaptığımız gözlem ve çalışmalarla paralellik gösterdiği bulunmuştur.

Tablo.4.1'e göre referans istasyonu olan Foça istasyonuna göre diğer istasyonlarda eozinofilik granüler hemosit ve bazofilik granüler hemosit oranında artış, agranüler hemosit (hyalinosit) oranında da azalma söz konusudur. En yüksek hyalinosit miktarı %77'lik oranla referans istasyonu olan Foça istasyonunda, en düşük hyalinosit miktarıda %27'lik oranla Bostanlı istasyonunda olduğu bulunmuştur. En yüksek eozinofilik granülosit miktarı %58'lik oranla Pasaport istasyonunda, en düşük eozinofilik granülosit miktarı da %19'luk oranla Foça istasyonunda olduğu bulunmuştur. En yüksek bazofilik granülosit miktarı %26'lık oranla Bostanlı istasyonunda, en düşük bazofilik granülosit miktarı da %4'lük oranla referans istasyonu olan Foça istasyonunda bulunmuştur.

Nonparametrik istatistiksel testlerden Kruskal-Wallis testi yapılmıştır. Agranülosit hemosit sayısı en düşük Bostanlı istasyonunda, en yüksek Foça istasyonunda olduğu tespit edilmiştir. Bazofilik granüler hemosit sayısı en düşük Foça istasyonunda en yüksek Bostanlı istasyonunda olduğu bulunmuştur. Eozinofilik granüler hemosit sayısı en düşük Foça istasyonunda en yüksek Pasaport istasyonunda olduğu saptanmıştır.

Referans bölgesi olarak seçilen Foça istasyonundaki agranülosit hemosit sayısı ile Alsancak, Karşıyaka ve Pasaport istasyonlarının agranülosit hemosit

sayılarındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) ancak Konak ve Göztepe istasyonlarının agranülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Foça istasyonundaki bazofilik granülosit hemosit sayısı ile Alsancak, Göztepe ve Karşıyaka istasyonlarının bazofilik granülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) ancak Konak ve Pasaport istasyonlarının bazofilik granülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Foça istasyonundaki eozinofilik granülosit hemosit sayısı ile Karşıyaka, Pasaport ve Bostanlı istasyonlarının eozinofilik granülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) ancak Alsancak, Konak ve Göztepe istasyonlarının eozinofilik granülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Alsancak istasyonundaki agranülosit hemosit sayısı ile Bostanlı istasyonunun agranülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Alsancak istasyonundaki bazofilik granülosit hemosit sayısı ile Pasaport istasyonunun bazofilik granülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Alsancak istasyonundaki eozinofilik granülosit hemosit sayısı ile Pasaport istasyonunun eozinofilik granülosit hemosit sayısının istatistiksel farkı anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Konak istasyonundaki agranülosit hemosit sayısı ile Karşıyaka, Pasaport ve Bostanlı istasyonlarının agranülosit hemosit sayılarındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Konak istasyonundaki bazofilik granülosit hemosit sayısı ile Bostanlı istasyonunun bazofilik granülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Konak istasyonundaki eozinofilik granülosit hemosit sayısı ile Pasaport istasyonunun eozinofilik granülosit hemosit sayısının istatistiksel farkı anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Göztepe istasyonundaki agranülosit hemosit sayısı ile Bostanlı istasyonunun agranülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Göztepe istasyonundaki bazofilik granülosit hemosit sayısı ile Pasaport istasyonunun bazofilik granülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Göztepe istasyonundaki eozinofilik granülosit hemosit sayısı ile Karşıyaka ve Pasaport istasyonlarının eozinofilik granülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel farkı anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Karşıyaka istasyonundaki agranülosit hemosit sayısı ile Pasaport ve Bostanlı istasyonlarının agranülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Karşıya istasyonundaki bazofilik granülosit hemosit sayısı ile Pasaport ve Bostanlı istasyonlarının bazofilik granülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Karşıyaka istasyonundaki eozinofilik granülosit hemosit sayısı ile Pasaport ve Bostanlı istasyonlarının eozinofilik granülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel farkı anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Pasaport istasyonundaki agranülosit hemosit sayısı ile Bostanlı istasyonunun agranülosit hemosit sayılarındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Pasaport istasyonundaki bazofilik granülosit hemosit sayısı ile Bostanlı istasyonunun bazofilik granülosit hemosit sayısının istatistiksel farkı anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Pasaport istasyonundaki eozinofilik granülosit hemosit sayısıyla Bostanlı istasyonunun eozinofilik granülosit hemosit sayısının istatistiksel farkı anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Kan hücre türlerinin oranlarındaki değişim çeşitli stres faktörlerine tepki olarak yorumlanmıştır [112].

Midye ve İstiridyede bakır maruziyetinin hyalinosit yüzdesini düşürdüğü, granülosit yüzdesini arttırdığı tespit edilmiştir [121, 122,].

Coles ve ark., [1995], yapılan çalışmada *M. edulis* türünün kadmiyuma maruz kalması sonucu dolaşımdaki eozinoflik ve bazofilik hemosit hücrelerinin oranları üzerinde herhangi bir etki yaratmamasına rağmen dolaşımdaki toplam hemosit sayısını düşürmüştür [108].

Pipe ve Coles, [1995], önceden bakıra maruz kalmış *M. edulis* türünün *V. tubiasshii* türüne maruz kalmanın ardından, *V. tubiasshii* türüne maruz kalmamış midyelerle karşılaştırıldığında dolaşımdaki hemosit sayısını düşürdüğü ancak hemolenfteki eozinoflik hemositlerin oranını arttırdığı tespit edilmiştir [107].

Pipe ve ark., [1999], türü 7 gün boyunca 0,02 ve 0,05 ppm bakıra maruz bırakıldığında *M. edulis* türü midyelerde bazofilik hemositlere kıyasla dolaşımdaki eozinofilik hemosit yüzdesinde doza bağlı bir azalma olduğu belirlenmiştir [11].

Parry ve Pipe, [2004], *M. edulis* türünün bulunduğu ortam sıcaklığının 5°C yükselmesi ve bakıra ön maruziyetinden sonra *V. tubiashii*'ye maruz bırakılan midyelerin dolaşımdaki toplam hemosit sayısını arttırmıştır buna ek olarak bazofilik hemosit yüzdesini de arttırmıştır [2].

Tame ve ark., [2015], *Bathymodiolus japonicus*, *B.platiforans* ve *B. septemdiarum* simbiyotik midyelerinin hemosit morfoloji çalışılması sonucunda dolaşımdaki hemosit alt populasyonları sırasıyla %44,7- %48,5, %14,3-%17,6,

%34,3-%41,0 oranında agranülosit ve eozinofilik granülosit oranlarına sahipken, dolaşımdaki bazofilik granülositler %13,3, %17,6 oranlarında olduğu saptanmıştır [17].

Victor, [1993], *Paratelphusa hidrodromlu* (Herbst) 30 gün boyunca subletal 0.02-0.50 $\mu\text{M/L}$ kadmiyum klorürün (CdCl_2) ekilerinin araştırıldığı çalışmasında dolaşımdaki hemosit sayısında önemli değişiklikler belirlenmiştir. Genel olarak her iki dozda da kontrol grubuna göre hemosit sayısı azalmıştır. 0.50 $\mu\text{M/L}$ CdCl_2 maruziyetinde hyalinosit ve eozinofilik granülositlerin yüzdesini sırasıyla %21 ve %32 oranında azaltmıştır. Prohemosit ve intermediet granülositlerin sayısını sırasıyla %69 ve %18 oranında arttırmıştır [123].

Yukarıda sözü edilen çalışmaların sonuçlarıyla bizim yaptığımız gözlem ve çalışma ile paralellik göstermektedir

Çalışmamızda kirliliğin midyeler üzerindeki etkisini mikronukleus testi yardımıyla araştırmaya çalıştık. Seçilen istasyondan (Alsancak, Konak, Bostanlı, Karşıyaka, Göztepe, Pasaport, Foça) alınan örneklerin hemolenflerinde mikronukleus testini gerçekleştirdik. Yaptığımız çalışmanın sonuçlarına göre, Nonparametrik istatistiksel testlerden Kruskal-Wallis (Nonparametrik ANOVA) Testi kullanılmıştır. Tablo. 4.2'ye göre mikronukleus frekansı en yüksek Bostanlı istasyonunda en düşük Foça istasyonunda olduğu saptanmıştır. Binukleus frekansı en yüksek Bostanlı istasyonunda en düşük Foça istasyonunda olduğu saptanmıştır. Nükleer bud (NB) frekansı en yüksek Bostanlı istasyonunda en düşük Foça istasyonunda olduğu saptanmıştır.

Referans bölgesi olarak seçilen Foça istasyonunun MN frekansı ile Alsancak, Göztepe, Karşıyaka ve Bostanlı istasyonlarının MN frekanslarının istatistiksel farkı anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$) ancak Konak ve Pasaport istasyonlarının MN frekanslarının istatistiksel farkı anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Referans bölgesi olarak seçilen Foça istasyonu BN frekansı ile Konak, Pasaport ve Bostanlı istasyonlarının BN frekanslarının istatistiksel farkı anlamlı

bulunmuştur ($p<0,05$) ancak Alsancak, Göztepe ve Karşıyaka istasyonlarının BN frekanslarının istatistiksel farkı anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Referans bölgesi olarak seçilen Foça istasyonu NB frekansı ile Konak, Karşıyaka, Pasaport ve Bostanlı istasyonlarının NB frekanslarının istatistiksel farkı anlamlıdır ($p<0,05$) ancak Göztepe istasyonunun NB frekansının istatistiksel farkı anlamlı değildir ($p>0,05$).

Alsancak istasyonu MN frekansı ile Konak istasyonunun MN frekansının istatistiksel farkı anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) ancak Göztepe, Karşıyaka, Pasaport ve Bostanlı istasyonlarının MN frekanslarının istatistiksel farkı anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Alsancak istasyonu BN frekansı ile Konak, Göztepe, Karşıyaka istasyonlarının BN frekanslarının istatistiksel farkı anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$) ancak Pasaport ve Bostanlı istasyonlarının BN frekanslarının istatistiksel farkı anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Konak istasyonu MN frekansı ile Karşıyaka ve Bostanlı istasyonlarının MN frekanslarının istatistiksel farkı anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) ancak Pasaport istasyonunun MN frekansının istatistiksel farkı anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Konak istasyonu BN frekansı ile Göztepe, Karşıyaka, Pasaport ve Bostanlı istasyonlarının BN frekanslarının istatistiksel farkı anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Konak istasyonu NB frekansı ile Pasaport ve Bostanlı istasyonlarının NB frekanslarının istatistiksel farkı anlamlı değildir ($p>0,05$).

Göztepe istasyonu MN frekansı ile Bostanlı istasyonlarının MN frekansının istatistiksel farkı anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) ancak Karşıyaka ve Pasaport istasyonlarının MN frekansının istatistiksel farkı anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Göztepe istasyonu BN frekansı ile Pasaport ve Bostanlı istasyonlarının BN frekanslarının istatistiksel farkı anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) ancak Karşıyaka istasyonu BN frekansının istatistiksel farkı anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Göztepe istasyonu NB frekansı ile Karşıyaka ve Bostanlı istasyonlarının NB frekanslarının istatistiksel farkı anlamlıdır ($p<0,05$).

Karşıyaka istasyonu MN frekansı ile Pasaport istasyonunun MN frekansının istatistiksel farkı anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) ancak Bostanlı istasyonunun MN frekansının istatistiksel farkı anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Karşıyaka istasyonu BN frekansı ile Pasaport ve Bostanlı istasyonlarının istatistiksel farkı anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Karşıyaka istasyonu NB frekansı ile Pasaport ve Bostanlı istasyonlarının NB frekanslarının istatistiksel farkı anlamlı değildir ($p>0,05$).

Pasaport istasyonu MN frekansı ile Bostanlı istasyonu MN frekansının istatistiksel farkı anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Pasaport istasyonu BN frekansı ile Bostanlı istasyonu BN frekansının istatistiksel farkı anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Pasaport istasyonu NB frekansı ile Bostanlı istasyonunun NB frekansının istatistiksel farkı anlamlı değildir ($p>0,05$).

Klobučar ve ark., [2008], yapılan bu çalışmada midye çeşitliği, tersane, yat limanı, Adriavini ve Vranjic' in kıyı şeridi, Split Limanı, Nečujam Koy' unda yapılan 2 yıllık inceleme sonucu MN frekansında artış olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçların yanı sıra Adriyatik'te yapılan başka çalışmada Vranjic' in kıyı şeridinin en yüksek genotoksik kirlenici yüküne sahip olduğu tespit edilmiştir [124, 125].

Klobučar ve ark., [2003], *Dreissena polymorpha*' da (Zebra midyesi) yapılan 2000-2001 yıllarının Mayıs ve Haziran aylarını kapsayan biyolojik izleme çalışmasında, referans istasyonu olarak Drava nehri, Zagreb, Oborova, Sisak, Lukave istasyonları da genotoksik kirletici barındıran Sava nehrinden belirlenmiştir [128]. Bu çalışma sonucunda MN frekansı en yüksek MN frekansı Oborova istasyonu ve Sisak istasyonunda ($p \leq 0,01$) olduğu saptanmıştır.

Bolognesi ve ark., [2004], *M. galloprovincialis* ile yapılan biyolojik izleme çalışmasında endüstriyel kirlenmenin yüksek olduğu Cornigliano, Ticaret Limanı Voltri, Zinola Tersanesi, Sonremo açıkları ve referans olarak Palmoria' da bulunan midye çiftliği istasyonlar olarak belirlenmiş, midyenin solungaç dokusunda MN frekansları değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda referans istasyonuna göre diğer istasyonların MN frekansında artış söz konusudur. En yüksek MN frekansı endüstriyel kirlenmenin yoğun olduğu Cornigliano istasyonunda olduğu saptanmıştır [84].

Cavas ve Konen., [2008], balık *Oreochromis niloticus* (Nil Tilapyası) 72 saat boyunca 1µg/g, 5µg/g, 10µg/g Domaik aside maruz bırakılmıştır. Yapılan incelemeler sonucunda negatif kontrol grubuna göre süre doza bağlı olarak MN frekasında artış olduğu saptanmıştır [127].

Baršiene ve ark., [2006], midye *M. edulis* solungaç hücreleri ile yapılan bu çalışmada 50 ppb Bifenol-A, 50 ppb diallil fatalat ve BDE-47' ye subletal konsantrasyonda 3 hafta boyunca maruz bırakılmıştır. Yapılan preparasyon işleminden sonra kontrol grubu MN, BN ve NB frekansları sırasıyla %0,1, %0,1,2, %0,2,9 iken Bifenol-A, Diallil fatalat ve BDE-47 maruziyesi sonrası MN frekansları sırasıyla %0,2, %0,3,1, %0,3,9 BN frekansları sırasıyla %0,1,9, %0,2,1, %0,3,3 NB frekansları sırasıyla %0,3, %0,3,4, %0,4,5 olarak saptanmış ve nükleer anomaliklerde bir artış söz konusu olduğu gözlemlenmiştir [128].

Fernández ve ark., [2011], İspanya'nın akdeniz kıyılarından (İber Yarımadası) 17 adet istasyon belirlenmiş ve *Mytilus galloprovincialis*'in nükleer anomaliliklerine bakılarak biyomonitoring çalışma gerçekleştirilmiştir. İstasyonlar sırasıyla Cadaqués, Medas Adası (koruma altında), Barselona (endüstri ve

şehirleşmeden etkilenmiş bölge), Vallcarca (PAH ve PCB'ce zengin), Torragona (PAH ve PCB'ce zengin), Columbrete Adası (koruma altında), Valencia, Cullera, Portman (maden işletmeciliği yüzünden etkilenmiş bölge ve PAH, PCB'ce zengin), Cartagena, Almunecar, La Herradura, Torrox, Fuengirola, Manilva, Punta Carnero (Algericas1), Guadamnaque (Algaricas2) olarak belirlenmiştir. Yapılan mikroskobik incelemeler sonucunda en yüksek MN, BN ve NB frekansı sırasıyla %11,6 oranında Cartagene istasyonunda, %3,9 oranında Vallarca istasyonunda , %4,6 oranında Cartagene isyonunda olduğu gözlemlenmiştir. En düşük MN, BN, NB frekansları sırasıyla %2,1 oranında Cullera istasyonunda, %0 oranında Cullera ve Fuengirola istasyonlarında, %0,3 oranında Tarregona, Barselona ve Cadaques istasyonlarında olduğunu belirtmişlerdir [129].

Taleb ve ark., [2009], Cezayir kıyısından 3 istasyon belirlenmiştir. Bu istasyonlardan Kristel istasyonu referans istasyonu, ağır metal, polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) ve organoklorlu bileşiklerce zengin olan Oran limanı ve Mostaganem limanı seçilmiştir. Bu istasyonlardan *M. galloprovincialis* cinsi midyeler toplanarak solungaç ve hemolenfinde mikronukleus frekansları karşılaştırılmıştır. İncelemeler sonucunda Oran limanı ve Mortaganem limanı midyelerinin hemolenfinde kaydedilen MN frekansları sırasıyla 5.5%- 9.44% ve 5.11%- 9.89% arasında değişmiştir. Bu değerler, Kristel midyelerinin hemolenfinde kaydedilenlerden, (%1.6- %2.4) anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Oran limanı ve Mortaganem limanı midyelerinin solungaç hücrelerindeki MN frekansı %5,67- %11,78 ve %4,46 ve % 6,47 oranların da değişiklik gösterirken, referans istasyonunda MN frekansı %0 ve %1,18 oranında olduğu belirlenmiştir [130].

Arslan ve ark., [2010], Kirliliğin gözlemlendiği 4 istasyondan (Alaybey Tersane, Alsancak Limanı, Pasaport ve Bostanlı) alınan midye örneklerinin hemolenf ve solungaçlarında mikronukleus testi gerçekleştirilmiştir. Midyelerdeki, mikronukleus testinin, kirliliğin ve özellikle liman kirliliğinin izlenmesinde hassas sonuçlar verdiğini ve buna bağlı olarak, kıyısız ekosistem kirliliğinin düzenli olarak izlenmesinde standart metod olarak kullanılabileceği görülmüştür. Bu da yaptığımız çalışmanın sonuçları ile paralellik göstermektedir [131].

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma sonucunda, *M. galloprovincialis* türü midyelerle yapılan toplam hemosit sayımları, differansiyel hemosit sayımları sonuçları immünolojik olarak ve MN testinde genotoksik açıdan hassas sonuçlar verdiği, buna bağlı olarak da biyolojik izleme çalışmalarında kullanılabilecek iyi bir biyobelirteç oldukları tespit edilmiştir. Midye hemositlerinin sindirim, besin taşıma, boşaltım, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, rejenerasyon, onarım ve bağışıklık savunmasında önemli rol oynadıkları için deniz kirliliği çalışmalarında immünolojik ve genotoksik etkilerin değerlendirilmesinde daha etkili yöntemler olarak önemli yararlar sağlayacağı sonucuna varılmıştır. Midye (*M. galloprovincialis*) hemolenfinde yapılan mikronukleus testlerinin, Total hemosit sayısının sayısının deniz kirliliği çalışmalarında denizel ekosisteme etkisini göstermede basit, hızlı ve iyi bir biyobelirteç olduğu belirlenmiştir.

Midye (*M. galloprovincialis*) hemolenfinde yapılan mikronukleus testlerinin kirlilik izleme çalışmalarında güvenilir testler olduğu ve immunolojik parametrelerle beraber çalışılmasının daha yararlı sonuçlar ortaya çıkarabileceği önerilmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Maung Myint, U., Tyler, P. A. Effects of Temperature, Nutritive and Metal Stressors on the Reproductive Biology of *Mytilus edulis*. Marine Biology. 1982, 67(2), 209-223.
2. Parry H.E., Pipe R.K. Interactive effects of temperature and copper on immunocompetence and disease susceptibility in mussels (*Mytilus edulis*). Aquatic Toxicology. 2004, 69(4), 311–325.
3. Scott, D.A., Major, C.A. The effect of copper (II) on survival, respiration, and heartrate in the common blue effect of copper (II) on survival, respiration, and heartrate in the common blue mussel *Mytilus edulis*. Biological Bulletin. 1972, 143(3), 679-688.
4. McCarthy, J.F., Shugard, L.R. Biomarkers of Environmental Contamination. CRS press, New York, 1990, 468s.
5. Van der Oost, R., Vindimian, E., van den Brink, P. J., Satumalay, K., Heida, H., Vermeulen, N. P. E. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). III. Statistical analyses of relationships between contaminant exposure and biomarkers. Aquatic Toxicology. 1997, 39(1), 45–75.
6. Suter, G. W. A critique of ecosystem health concepts and indexes. Environmental Toxicology and Chemistry. 1993, 12(9), 1533–1539.
7. Tsangaris, C., Kormas, K., Strogyloudi, E., Hatzianestis, I., Neofitou, C., Andral, B., Galgani, F. Multiple biomarkers of pollution effects in caged mussels on the Greek coastline. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology. 2010, 151(3), 369–378.
8. Chandurvelan, R., Marsden, I. D., Gaw, S., Glover, C. N. Biochemical biomarker responses of green-lipped mussel, *Perna canaliculus*, to acute and subchronic

- waterborne cadmium toxicity. *Aquatic Toxicology*, 2013, (140-141), 303–313.
9. Rainbow, P. S. Trace metal bioaccumulation: Models, metabolic availability and toxicity. *Environment International*. 2007, 33(4), 576–582.
 10. Farrington, J. W., Goldberg, E. D., Risebrough, R. W., Martin, J. H., Bowen, V. T. U.S. “Mussel Watch” 1976-1978: an overview of the trace-metal, DDE, PCB, hydrocarbon and artificial radionuclide data. *Environmental Science & Technology*, 1983, 17(8), 490–496.
 11. Pipe, R., Coles, J., Carissan, F. M., Ramanathan, K. Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*. 1999, 46(1), 43–54.
 12. Dyrinda, E. A., Pipe, R. K., Burt, G. R., Ratcliffe, N. A. Modulations in the immune defences of mussels (*Mytilus edulis*) from contaminated sites in the UK. *Aquatic Toxicology*. 1998, 42(3), 169–185.
 13. Cheng, T. C. Bivalves .In “ Invertebrate Blood Cells” Ed: Ratcliffe, N. A and Rowley, A.F. Academic Press, New York, 1981, 64
 14. Pipe, R. K. Hydrolytic haemocytes enzymes associated with the granular of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochemical Journal*. 1990, 22(11), 595-603
 15. Pipe, R. K. Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Developmental & Comparative Immunology*. 1992, 16(2-3), 111–122.
 16. Rebelo, L. M., de Sousa, J. S., Mendes Filho, J., Radmacher, M. Comparison of the viscoelastic properties of cells from different kidney cancer phenotypes measured with atomic force microscopy. *Nanotechnology*. 2013, 24(5), 055102.

17. Tame, A., Yoshida, T., Ohishi, K., Maruyama, T. Phagocytic activities of hemocytes from the deep-sea symbiotic mussels *Bathymodiolus japonicus*, *B. platifrons*, and *B. septemdirum*. *Fish & Shellfish Immunology*. 2015, 45(1), 146–156.
18. Donaghy, L., Lambert, C., Choi, K.S., Soudant, P. Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): Current knowledge and future prospects. *Aquaculture*. 2009, 297(1-4), 10–24.
19. Bolognesi, C., Rabboni, R., Roggieri, P. Genotoxicity biomarkers in *M. galloprovincialis* as indicators of marine pollutants. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 1996, 113(2), 319–323.
20. Fenech, M., Chang, W., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2003, 534(1-2), 65–75.
21. Timbrell JA, Draper R, Waterfield CJ. Biomarkers in toxicology: New uses for so me old markers?. *Biomarkers* 1996, 1(1), 1-11.
22. Timbrell, J. A. Biomarkers in toxicology. *Toxicology*. 1998, 129(1), 1–12.
23. Baydar, T., Palabıyık, S., Şahin, G., Neopterin: günümüzün popüler biyogöstergesi mi? *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 2009, 29(5), 1280-1291.
24. Waterfield CJ, Timbrell JA. Biomarkers-an overview. In: Ballantyne B, Marrs TC, Syversen T, eds. *General and Applied Toxicology*. 2nd ed. New York: Grove's Dictionaries INC; 1999. p.1841-54.

25. IPCS. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Environmental Health Criteria No.155. Geneva: World Health Organization, International Programme on Chemical Safety, 1993.
26. www.biyodoc.com/013/hemolenf-sivisi-nedir-hangi-canlilarda-bulunur.html. Erişim: 17.12.2018.
27. Malek, E.A., Cheng, T.C. Medical and economic malacology. Academic Press, Inc. New York, USA, 1974,398.
28. Bayne, B. L., Newell, R. C. Physiological Energetics of Marine Molluscs. The Mollusca. 1983, 4(1), 407-515.
29. Ratcliffe, N. A., Rowley, A. F., Fitzgerald, S. W., Rhodes, C. P. Invertebrate Immunity: Basic Concepts and Recent Advances. International Review of Cytology. 1985, 97, 183–350.
30. Wootton, E. C., Pipe, R. K. Structural and functional characterisation of the blood cells of the bivalve mollusc, *Scrobicularia plana*. Fish & Shellfish Immunology. 2003, 15(3), 249-262.
31. Ottaviani, E., Franceschi, C. The invertebrate phagocytic immunocyte: clues to a common evolution of immune and neuroendocrine systems. Immunology Today. 1997, 18(4), 169-174.
32. Sinderman, C. J. Principal diseases of marine fish and shellfish 2. San Diego. CA: Academic Press; 1990: 413-416.
33. Coles, J. A., Farley, S. R., Pipe, R. K. Effects of fluoranthene on the immunocompetence of the common marine mussel, *Mytilus edulis*. Aquatic Toxicology. 1994, 30(4), 367-379.
34. Renwranzt, L. Involvement of agglutinins (lectins) in invertebrate defense reactions: The immuno-biological importance of carbohydrate-specific

- binding molecules. *Developmental & Comparative Immunology*. 1983, 7(4), 603–608.
35. Renwrautz, L., Daniels, J., Hansen, P.D. Lectin-binding to hemocytes of *Mytilusedulis*. *Developmental & Comparative Immunology*. 1985, 9(2), 203–210.
 36. Pipe, R. K. Differential binding of lectins to haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Cell and Tissue Research*. 1990, 261(2), 261-268.
 37. Cheng. T. C., Combes, C. Biological Invasions in Europe and the Mediterranean Basin. Ed: di Castri, F., Hansen, A. J., Debussche, M. Kluwer Academic Publishers/ Influence of environmental factors on the invasion of molluscs by parasites: with special reference to Europe, Dordrecht, Boston, London, UK, 1990, 307-332.
 38. van der Knaap, W. P. W., Adema, C. M., Sminia, T. Invertebrate blood cells: Morphological and functional aspects of the haemocytes in the pond snail *Lymnaea stagnali*. *Comparative Haematology Internationa*. 1993, 3(1), 20-26.
 39. Noel, D., Bachere, E., Mialhe, E. Phagocytosis associated chemihuninescence of hemocytes in *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Developmental & Comparative Immunology*. 1993, 17,483-493.
 40. Auffret M. Bivalve hemocyte morphology. In: Fisher WS, editor. Disease processes in marine bivalve molluscs American Fisheries Society special publication 18. Bethesda, MD: American Fisheries Society 1988, pp. 169–77.
 41. Hine, P. The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology*. 1999, 9(5), 367–385.
 42. Wang, Y., Hu, M., Chiang, M. W. L., Shin, P. K.S., Cheung, S. G. Characterization of subpopulation and immune-related parameters of

hemocytes in the green-lipped mussel *Perna viridis*. Fish & Shellfish Immunology. 2012, 32, 381-390.

43. Malagoli, D., Casarini, L., Ottaviani, E. Effects of the marine toxins okadaic acid and palytoxin on mussel phagocytosis. Fish & Shellfish Immunology. 2008, 24(2), 180–186.

44. Aruguman, M., Romestand, B., Torreilles, J ., Roch, P. In vitro production of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis. European Journal of Cell Biology. 2000, 79(7), 513–519.

45. Novas, A., Barcia, R., Ramos-Martínez, J. I. After the Prestige oil spill modifications in NO production and other parameters related to the immune response were detected in hemocytes of *Mytilus galloprovincialis*. Aquatic Toxicology. 2007, 85(4), 285–290.

46. Pipe, R. K., Porte, C., Livingstone, D. R. Antioxidant enzymes associated with the blood cells and haemolymph of the mussel *Mytilus edulis*. Fish & Shellfish Immunology. 1993, 3(3), 221–233.

47. Leippe, M., Renwranzt, L. Release of cytotoxic and agglutinating molecules by *Mytilus* hemocytes. Developmental & Comparative Immunology. 1988 12(2), 297–308.

48. Nakayama K, Nomoto AM, Nishijima M, Maruyama T. Morphological and functional characterization of the hemocytes in the giant clam *Tridacna crocea*. Journal of Invertebrate Pathology. 1997, 69, 105-11.

49. Zhang W, Wu X, Wang M. Morphological, structural, and functional characterization of the hemocytes of the scallop, *Argopecten irradians*. Aquaculture. 2006, 251,19-32.

50. Xing J, Zhan WB. Characterization of monoclonal antibodies to hemocyte types of scallop (*Chlamys farreri*). Fish & Shellfish Immunology. 2005, 19, 17-25.
51. Zhang YY, Ren SL, Wang DX, Song WB. Structure and classification of hemocytes in the bivalve mollusc *Meretrix meretrix*. J Ocean Univ China. 2006, 5, 132-6.
52. Lopez C, Carballal MJ, Azevedo C, Villalba A. Morphological characterization of the hemocytes of the clam, *Ruditapes decussates* (Mollusca: Bivalvia). Journal of Invertebrate Pathology. 1997, 69, 51-57.
53. Cheng, T. C., Downs, J. C. U. Intracellular acid phosphatase and lysozyme levels in subpopulations of oyster, *Crassostrea virginica*, hemocytes. Journal of Invertebrate Pathology. 1988, 52(1), 163–167.
54. Cheng, T. C., Foley, D. A. Hemolymph cells of the bivalve mollusc *Mercenaria mercenaria*: An electron microscopical study. Journal of Invertebrate Pathology. 1975, 26(3), 341–351.
55. Cima, F., Matozzo, V., Marin, M. G., Ballarin, L. Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850): morphofunctional characterisation. Fish & Shellfish Immunology. 2000, 10(8), 677–693.
56. Foley, D. A., Cheng, T. C. Morphology, hematologic parameters, and behavior of hemolymph of the quahog clam, *Mercenaria mercenaria*.. The Biological Bulletin. (1974), 146(3), 343–356.
57. Ruddell, C. L. The fine structure of the granular amebocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Journal of Invertebrate Pathology. 1971, 18(2), 269–275.
58. Cajaraville, M. P., Pal, S. G. Morphofunctional Study of the Haemocytes of the Bivalve Mollusc *Mytilus galloprovincialis* with Emphasis on the

Endolysosomal Compartment. *Cell Structure and Function*. 1995, 20(5), 355–367.

59. Pauley, G. B., Sparks, A. K. Observations on experimental wound repair in the adductor muscle and the Leydig cells of the oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1967, 9(3), 298–309.
60. Ruddell, C.L. Elucidation of the Nature and Function of the Granular Oyster Amebocytes through Histochemical Studies of Normal and Traumatized Oyster Tissues. *Histochemistry and Cell Biology*. 1971, 26(2), 98-112.
61. DesVoigne, D. M., Sparks, A. K. The reaction of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, to homologous tissue implants. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1969, 14(3), 293–300.
62. Bubel, A., Moore, M.N., Lowe, D. Cellular responses to shell damage in *Mytilus edulis* L.J. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 1977, 30, 1-27.
63. Bayne, B. L., Moore, M. N., Widdows, J., Livingstone, D. R., Salkeld, P., Crisp, D. J., McIntyre, A. D. Measurement of the Responses of Individuals to Environmental Stress and Pollution: Studies with Bivalve Molluscs [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 1979, 286(1015), 563–581.
64. Bang, F. B. Reaction to injury in the oyster (*Crassostrea virginica*). *The Biological Bulletin*. 1961, 121(1), 57–68.
65. Sasaki, M. Current status of cytogenetic studies in animal tumors with special reference to nonrandom chromosome changes. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 1982, 5(2), 153–172.

66. Miller, D., Choi, Y., Miller, O. Chromosome localization of highly repetitive human DNA's and amplified ribosomal DNA with restriction enzymes. *Science*. 1983, 219(4583), 395–397.
67. Bolognesi, C., Fenech, M. Mussel micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*. 2012, 7(6), 1125–1137.
68. Fenech, M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2000, 455(1-2), 81–95.
69. Norppa H, Flack CM. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis*. 2003, 18(3), 221-233.
70. Bolognesi, C., Hayashi, M. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*. 2010, 26(1), 205–213.
- 71 Majone, F., Brunetti, R., Gola, I., Gino Levis, A. Persistence of micronuclei in the marine mussel, *Mytilus galloprovincialis*, after treatment with mitomycin C. *Mutation Research Letters*. 1987, 191(3-4), 157–161.
72. Bolognesi, C., Landini, E., Roggieri, P., Fabbri, R., Viarengo, A. Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: Experimental studies. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 1999, 33(4), 287–292.
73. Bolognesi, C., Rabboni, R., Roggieri, P. Genotoxicity biomarkers in *M. galloprovincialis* as indicators of marine pollutants. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 1996, 113(2), 319–323.
74. Jha, A.N., Dogra, Y., Turner, A. & Millward, G.E. Impact of low doses of tritium on the marine mussel, *Mytilus edulis*: genotoxic effects and tissue-specific bioconcentration. *Mutation Research*. 2005, 586, 47–57.

75. Koukouzika, N., Dimitriadis, V. K. Aspects of the usefulness of five marine pollution biomarkers, with emphasis on MN and lipid content. *Marine Pollution Bulletin*. 2008, 56(5), 941–949.
76. Fenech, M. Genome health nutrigenomics: nutrition and the science of optimal genome maintenance. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 2004, 13, 15.
77. EMEA (1998), Genotoxicity: A Standart Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals.
78. Majone, F., Brunetti, R., Fumagalli, O., Gabriele, M. & Levis, AG. Induction of micronuclei by mitomycin C and colchicine in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mutatiin Research*. 1990, 244, 147–151.
79. Wrisberg, M. N., Bilbo, C. M., Spliid, H. Induction of micronuclei in hemocytes of *Mytilus edulis* and statistical analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1992, 23(2), 191–205.
80. Scarpato, R., Migliore, L., Alfinito-Cognetti, G., Barale, R. Induction of micronuclei in gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* exposed to polluted marine waters. *Marine Pollution Bulletin*. 1990, 21(2), 74–80.
81. Bolognesi, C., Parrini, M., Roggieri, P., Ercolini, C., Pellegrino, C. Carcinogenic and mutagenic pollutants: impact on marine organisms. in *Proc. FAO/UNEP/IOC Workshop on the Biological Effects of Pollutants on Marine Organisms (Malta, 1991)*. *Technology Maps*. 1992, 69, 113–122.
82. UNEP/RAMOGE. Manual on the Biomarkers Recommended for the MED POL Biomonitoring Programme (UNEP, Athens, Greece, 1999).
83. Bolognesi, C., Degan, P. Genotoxicity biomarkers in aquatic organism an indicators of carcinogenic .marine pollutants. *Biomarkers in Marine Organisms*. 2001, 45–64.

84. Bolognesi, C., Frenzilli, G., Lasagna, C., Perrone, E., Roggieri, P. Genotoxicity biomarkers in *Mytilus galloprovincialis*: wild versus caged mussels. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2004, 552(1-2), 153–162.
85. Magni, P., De Falco, G., Falugi, C., Franzoni, M., Monteverde, M., Perrone, E. Bolognesi, C. Genotoxicity biomarkers and acetylcholinesterase activity in natural populations of *Mytilus galloprovincialis* along a pollution gradient in the Gulf of Oristano (Sardinia, western Mediterranean). *Environmental Pollution*. 2006, 142(1), 65–72.
86. Bolognesi, C., Perrone, E., Roggieri, P., Pampanin, D. M., Sciutto, A. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquatic Toxicology*. 2006, 78, 93–98.
87. Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2007, 146(3), 281–300.
88. Bolognesi, C., Buschini, A., Branchi, E., Carboni, P., Furlini, M., Martino, A., Rossi, C. Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. *Science of The Total Environment*. 2004b, 333(1-3), 127–136.
89. Dolcetti, L., Venier, P. Susceptibility to genetic damage and cell types in Mediterranean mussels. *Marine Environmental Research*. 2002, 54(3-5), 487–491.
90. Binelli, A., Cogni, D., Parolini, M., Provini, A. Multi-biomarker approach to investigate the state of contamination of the R. Lambro/R. Po confluence

(Italy) by zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). Chemosphere. 2010, 79(5), 518–528.

91. Venier, P., Maron, S., Canova, S. Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzo[a]pyrene. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 1997, 390(1-2), 33–44.
92. Brunetti, R., Majone, F., Gola, I., Beltrame, C. The micronucleus test: example of application to marine ecology. Marine Ecology Progress Series. 1988, 44, 65–68.
93. Dailianis, S., Domouhtsidou, G. P., Raftopoulou, E., Kaloyianni, M., Dimitriadis, V. K. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. Marine Environmental Research. 2003 56(4), 443–470.
94. Kalpaxis, D. L., Theos, C., Xaplanteri, M. A., Dinos, G. P., Catsiki, A. V., Leotsinidis, M. Biomonitoring of Gulf of Patras, N. Peloponnesus, Greece. Application of a biomarker suite including evaluation of translation efficiency in *Mytilus galloprovincialis* cells. Environmental Research. 2004, 94(2), 211–220.
95. Revankar, P. R., Shyama, S. K. Genotoxic effects of monocrotophos, an organophosphorous pesticide, on an estuarine bivalve, *Meretrix ovum*. Food and Chemical Toxicology. 2009, 47(7), 1618–1623.
96. Mersch, J., Beauvais, M. N. The micronucleus assay in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, to in situ monitor genotoxicity in freshwater environments. Mutation Research. 1997, 393, 141/149.
97. Vincent-Hubert, F., Arini, A., Gourlay-Francé, C. Early genotoxic effects in gill cells and haemocytes of *Dreissena polymorpha* exposed to cadmium, B[a]P

and a combination of B[a]P and Cd. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2011, 723(1), 26–35.

98. Tosyalı, C., 2005, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) Midyesinde Pişirmenin Çeşitli Ağır Metal Düzeylerine Etkisi, Doktora tezi Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü.
99. Aslan, E., 2010, İzmir Körfezindeki Kara Midyelerinin (*Mytilus galloprovincialis*) ve Bazı Balık Türlerinin Farklı Organve Dokularındaki ²¹⁰Po Konsantrasyonu ile Lipid Peroksidasyonu (LPO), H₂O₂ ve Prolin Arasındaki Korelasyonunun İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nükleer Bilimler ABD.
100. Geldiay, R., Kocataş, A., 2001, Deniz Biyolojisine Giriş, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, No: 31.
101. Kocataş, A., Bilecik, N., 1992, Ege Denizi ve Canlı Kaynakları, Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Bodrum.
102. Yılmaz, N., 1989, Doğu Karadeniz Midyelerinin (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck) bazı biyo-ekolojik özellikleri ve biyokimyasal yönden araştırılması, Karadeniz Teknik Üniv., Fen Bil. Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
103. Gençay Aydın. H., Büyükkışık. B. Effect of sewage outfall on phyoplankton community structure in İzmir Bay. Jornal of fisheries & Aquatic Sicience. 2004, 21, 107-111.
104. Arslan, F. D., 2005, Ege denizinin farklı bölgelerindeki plankton örneklerinde ²¹⁰Po birikiminin incelenmesi, Ege Üniv., Fen Bil. Enstitüsü, Nükleer Bilimler Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
105. Gómez-Mendikute, A., Etxeberria, A., Olabarrieta, I., Cajaraville, M. P. Oxygen radicals production and actin filament disruption in bivalve

haemocytes treated with benzo(a)pyrene. Marine Environmental Research. 2002, 54(3-5), 431–436.

106. Lowe, D. M., Valentino, U. F., Michael, H. D. Contaminant induced lysosomal membran damage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from the Venice Lagoon: on in vitro study. Marine Ecology Progress Series. 1995, 129, 189-196.
107. Pipe, R. K., Coles, J. A. Environmental contaminants influencing immunefunction in marine bivalve molluscs. Fish & Shellfish Immunology. 1995, 5(8), 581–595.
108. Coles, J., Farley, S., Pipe, R. Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. Diseases of Aquatic Organisms. 1995, 22, 59–65.
109. Novoa, B., Luque, A., Castro, D., Borrego, J.J., Figueras, A. Characterisation and infectivity of four bacterial strains isolated from brown ring disease-affected clams. Journal of Invertebrate Pathology. 1998, 71, 34–41.
110. Ciacci, C., Barmo, C., Fabbri, R., Canonico, B., Gallo, G., Canesi, L. Immunomodulation in *Mytilus galloprovincialis* by non-toxic doses of hexavalent Chromium. Fish & Shellfish Immunology. 2011, 31(6), 1026–1033.
111. Coles, J. A., Pipe, R. K. Phenoxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. Fish & Shellfish Immunology. 1994, 4(5), 337–352.
112. Renwants.L. Neurobiology of *Mytilus edulis*. Ed: Stefano George. B, Manchester University Press, New York, USA. 1990, 319

113. Auffret, M. Histopathological changes related to chemical p. Vol. 46: 101-107, 1988 contamination in *Mytilus edulis* from field and experimental conditions. Arine Ecology -Progress Series. 1988, 46, 101-107.
114. Cajaraville, M. P., Abascal, I., Etxeberria, M., Marigómez, I. Lysosomes as cellular markers of environmental pollution: Time- and dose-dependent responses of the digestive lysosomal system of mussels after petroleum hydrocarbon exposure. Environmental Toxicology & Water Quality. 1995, 10(1), 1–8.
115. Fagotti, A., Di Rosa, I., Simoncelli, F., Pipe, R.K., Panara, F., Pascolini, R. The effects of copper on actin and fibronectin organization in *Mytilus galloprovincialis* haemocytes. Developmental & Comparative Immunology. 1996, 20, 383–391.
116. Gómez-Mendikute, A., Cajaraville, M. Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. Toxicology in Vitro. 2003, 17(5-6), 539–546.
117. Ladhar-Chaabouni, R., Machreki-Ajmi, M., Serpentine, A., Lebel, J.A., Hamza-Chaffai, A. Does a short-term exposure to cadmium chloride affects haemocyte parameters of the marine gastropod *Haliotis tuberculata*? Environmental Science and Pollution Research. 2015, 22(22), 17343-17349.
118. Mottin, E., Caplat, C., Mahaut, M.-L., Costil, K., Barillier, D., Lebel, J.-M., Serpentine, A. Effect of in vitro exposure to zinc on immunological parameters of haemocytes from the marine gastropod *Haliotis tuberculata*. Fish & Shellfish Immunology. 2010, 29(5), 846–853.
119. Latire, T., Le Pabic, C., Mottin, E., Mottier, A., Costil, K., Koueta, N., Serpentine, A. Responses of primary cultured haemocytes from the marine

- gastropod *Haliotis tuberculata* under 10-day exposure to cadmium chloride. *Aquatic Toxicology*. 2012, 109, 213–221.
120. Anderson, R.S., Modulation of nonspecific immunity by environmental stressors. In: Couch, J.A., Fournie, J.W. (Eds.), *Advances in Fisheries Science: Pathobiology of marine and estuarine organisms*. CRC Press, London, 1993, 483–510.
121. Ruddell, C. L., Rains, D. W. The relationship between zinc, copper and the basophils of two crassostreid oyster, *C. gigas* and *C. virginica*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. 1975, 51(3), 585–591.
122. Pickwell, G.V., Steinert, S.A. Serum biochemical and cellular responses to experimental cupric ion challenge in mussels. *Marine Environmental Response*. 1984, 14, 245–265.
123. Victor, B. Responses of hemocytes and gill tissues to sublethal cadmium chloride poisoning in the crab *Paratelphusa hydrodromous* (Herbst). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 1993, 24(4), 432–439.
124. Klobučar, G. I. V., Štambuk, A., Hylland, K., Pavlica, M. Detection of DNA damage in haemocytes of *Mytilus galloprovincialis* in the coastal ecosystems of Kaštela and Trogir bays, Croatia. *Science of The Total Environment*. 2008, 405(1-3), 330–337.
125. Jakšić, Ž., Batel, R., Bihari, N., Mičić, M., Zahn, R. K. Adriatic coast as a microcosm for global genotoxic marine contamination—A long-term field study. *Marine Pollution Bulletin*. 2005, 50(11), 1314–1327.
126. Klobučar, G. I. V., Pavlica, M., Erben, R., Papeš, D. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquatic Toxicology*. 2003, 64(1), 15–23.

127. Cavas, T., Konen, S. In vivo genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay. *Aquatic Toxicology*. 2008, 90(2), 154–159.
128. Baršienė, J., Šyvokienė, J., Bjornstad, A. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in mussels exposed to bisphenol A, diallyl phthalate and tetrabromodiphenyl ether-47. *Aquatic Toxicology*. 2006, 78(1), 105–108.
129. Fernández, B., Campillo, J. A., Martínez-Gómez, C., Benedicto, J. Micronuclei and other nuclear abnormalities in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) as biomarkers of cyto-genotoxic pollution in mediterranean waters. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2011, 52(6), 479–491.
130. Taleb Z.M., Benali I., Gherras H., Ykhlef-Allal A., Bachir-Bouiadjra B., Amiard J.-C., Boutiba Z. Biomonitoring of environmental pollution on the Algerian West coast using caged mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Oceanologia*. 2009, 51(1), 63-84.
131. Çakal Arslan, Ö., Parlak, H., Katalay, S., Boyacioglu, M., Karaaslan, M. A., Guner, H. Detecting micronuclei frequency in some aquatic organisms for monitoring pollution of Izmir Bay (Western Turkey). *Environmental Monitoring and Assessment*. 2009, 165(1-4), 55–66.

8. ÖZGEÇMİŞ

Melike Merve AYHAN

Meriç mah. 5711/ 5 sok. No:10 Çamdibi Bornova / İZMİR

Cep: (554) 576 48 04 - Ev: (232) 449 50 14

melikemerveayhan1992@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Üniversite	Manisa Celal Bayar Üniversitesi.	2011 - 2016
Lise	Sıdika Rodop Lisesi	2007 - 2011

TEZ & PROJELER

Yüksek Lisans Tezi: İZMİR KÖRFEZİNDE YAŞAYAN MİDYE (*Mytilus galloprovincialis* Lamark, 1819) TÜRÜNDE KİRLİLİĞİN İMMÜN SİSTEM HÜCRELERİNE ETKİLERİ 2016-2018

Lisans Bitirme Projesi: Antifouling Biyositlerin Sucul Ekosistemdeki Canlılara Etkileri 2016

YAYINLAR

Günel, A.C., Katalay, S., Erkmen, B., Ayhan, M.M., Gül, G., Erkoç, F. Antifouling bakır prityonun midye (*Mytilus galloprovincialis*)’ de toplam hemosit sayıları üzerine etkilerinin belirlenmesi. Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 2018, 35(1), 15-17

SUNUM & KONGRELER

KARASU BENLİ AYSEL ÇAGLAN, ERKMEN BELDA, KATALAY SELMA, MELIKE AYHAN, ERKOÇ FIGEN (2015). Antifouling Bakır Piritiyon un *Mytilus galloprovincialis* Lamark 1819 lerin Toplam Hemosit Sayıları Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi. 2. ULUSAL BIYOSİDAL KONGRESİ (Yayın No:2535759) POSTER SUNUM

KARASU BENLİ AYSEL ÇAĞLAN,KATALAY SELMA,ERKMEN BELDA, AYHAN MELİKE ,ERKOÇ FİGEN 2016 Antifouling Çinko piritiyonun Akdeniz Midyeleri (*Mytilus galloprovincialis*)Toplam Hemosit sayılarına Etkileri 19.09.2016 Ortadoğu teknik Üniversitesi türkiye deniz Bilimleri Konferansı poster sunum, sadece özet olarak bastırılmıştır).

KATALAY SELMA,KARASU BENLİ AYSEL ÇAĞLAN,Ayhan Melike Merve,OLTULU FATİH,YİĞİTTÜRK GÜRKAN,ERKOÇ FİGEN 2016 Cinko piritiyon un Akdeniz Midye *Mytilus galloprovincialis* Lamarck 1819 lerinde Mikronukleus testi ile Genotoksik Etkisinin Belirlenmesi 3. Uluslararası Biyosidal Kongresi 3. Uluslararası Biyosidal Kongresi 22-25 Kasım ANTALYA

Merve Melike AYHAN Katalay Selma Günel ÇAĞLAN , KARABAY YAVAŞOĞLU Nü 2018 İzmir Körfezi'nde Yaşayan Midye (*Mytilus galloprovincialis* Lamark,1819) Türünde Kirliliğin Toplam Hemosit Sayısı Üzerine Etkilerin Belirlenmesi 24. Ulusal Biyoloji Kongresi 10-14 Eylül Manisa sözlü sunum

KURS / SERTİFİKA BİLGİLERİ

Pedagojik Formasyon Belgesi
2017

Manisa Celal Bayar Üniversitesi

BİLGİSAYAR BİLGİSİ

Word, Excel, Powerpoint, Outlook: Çok iyi
SPSS, PAST3, PCOR, CAP 4: İyi

YABANCI DİL BİLGİSİ

İngilizce Okuma: Çok iyi, Yazma: Çok iyi, Konuşma: Orta

HOBİLER

Yüzme, doğa yürüyüşleri, Tiyatro, Sinema

REFERANSLAR

Doç.Dr.Selma KATALAY	MCBÜ	0 (236) 201 32 71
Prof. Dr. A. Çağlan GÜNAL	GÜ	0 (312) 202 16 38
Prof. Dr. Figen ÜNLÜ ERKOÇ	GÜ	

KİŞİSEL BİLGİLER

Cinsiyet : Kadın
Doğum Tarihi : 01/12/1992
Medeni Durum : Bekar
Uyruk : T.C.