

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**BİYOMONİTORİZASYON İLE
ALİAĞA KÖRFEZİ TOKSİSİTESİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dilara ÖZKAN

Tez Danışmanı Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU

Çevre Bilimleri Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 615.01.00

Sunuş Tarihi : 18 04.2014

Bornova-İZMİR

2014

Dilara Özkan tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak sunulan "Biyomonitorizasyon İle Aliğa Körfezi Toksisitesinin Değerlendirilmesi" başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 18.06.16 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı

: Prof. Dr. N. İ. K. Yavaşoğlu

Raportör Üye

: Doç. Dr. Altuğ Yavaşoğlu

Üye

: Doç. Dr. Selma Katalay



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Biyomonitorizasyon İle Aliğa Körfezi Toksisitesinin Değerlendirilmesi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

28/ 04/ 2014

İmzası

Adı-Soyadı

Dilra Öelkan

ÖZET

BİYOMONİTORİZASYON İLE ALİAĞA KÖRFEZİ TOKSİSİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZKAN, Dilara

Yüksek Lisans Tezi, Çevre Bilimleri Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Doç. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU
Nisan 2014, 58 sayfa

Bu çalışmada Aliğa Körfezi'ndeki kirliliğin canlılara etkisini belirlemek amacıyla Aliğa ve Foça istasyonlarından önemli bir sucul biyomonitor organizma olan *Mytilus galloprovincialis* örnekleme yapılmıştır.

Disekte edilen solungaç ve hepatopankreas dokularında ağır metal maruziyeti, biyokimyasal ve sitogenetik biyomarkerlar incelenmiş ve apoptotik süreç izlenmiştir. Analiz sonunda elde edilen verilerle Aliğa'daki kirliliğin canlıların üzerinde yarattığı oksidatif stres belirlenmiştir. Bununla beraber apoptoz mekanizmalarını da indüklediği ortaya konmuştur.

Anahtar sözcükler: *Mytilus galloprovincialis*, Aliğa, toksisite, oksidatif stres; apoptoz; metallothionein.

ABSTRACT

**TOXICITY ASSESSMENT OF
ALIAGA BAY
WITH BIOMONITORING**

OZKAN, DİLARA

MSc in Environmental Science

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU

April 2014, 58 pages

In this study, in order to determine the effects of pollution on biota in the Aliaga Bay, *Mytilus galloprovincialis*, an important aquatic biomonitoring organisms samplings are done from Aliaga and Foca stations.

Heavy metal exposure, biochemical and cytogenetic biomarkers were examined and apoptotic process was monitored in dissected gill and hepatopancreas tissues. With the data gathered at the end of analysis oxidative stress on biota was determined caused by pollution. Also it was shown that induce apoptosis mechanisms.

Keywords: *Mytilus galloprovincialis*, Aliaga, toxicity, oxidative stress; apoptosis; metallothionein.

TEŞEKKÜR

Çalışmam sırasında bilimsel katkıları ile bana yardımcı olan, eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen, tez danışmanım ve hocam Doç. Dr. N. Ülkü Karabay Yavaşoğlu'na,

Ayrıca çalışmanın çeşitli aşamalarında benden yardımlarını esirgemeyen sayın Doç. Dr. Altuğ Yavaşoğlu ve Doç. Dr. Selma Katalay'a, analizlerim sırasında değerli katkılarını aldığım Ar. Gör. Melih Dađdeviren ve Biyolog Sadi Kızılsahin'e,

Hayatımın her aşamasında sonsuz desteklerini hissettiğim aileme en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Bu projenin mali desteği 2012-ÇSUAM-003 nolu proje tarafından sağlanmıştır. Çevre Sorunları Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne, ağır metal analizlerinin gerçekleştirilmesinde katkıda bulunan Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma Uygulama Merkezi (ARGEFAR)'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xix
1.GİRİŞ.....	1
1.1 Kimyasal Kirleticiler	1
1.1.1 Ağır metaller.....	2
1.1.2. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH)	4
1.1.3. Poliklorlu Bifeniller (PCB)	4
1.2. Biyogöstergeler ve Biyoizleme	5
1.2.1. <i>Mytilus galloprovincialis</i> (Kara Midye)	7
1.3. Biyomarker (Biyoişaretleyiciler)	8
1.3.1. Maruziyet göstergesi olarak Metallothioneinler.....	8
1.3.2. Sitogenetik biyomarkerlar	9
1.3.3. Biyokimyasal biyomarkerlar	8

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
1.4. Araştırma Bölgesi	11
1.4.1. Araştırma bölgesinde önceden yapılan çalışmalar	11
1.5. Amaç.....	14
2. MATERYAL ve METOT.....	15
2.1. Materyal.....	15
2.1.1. Örneklerin temini.....	15
2.2. Metot.....	16
2.2.1. Ağır metal analizi	16
2.2.2. Enzimatik analizler	17
2.2.3. Gen ekspresyonu.....	21
2.2.4. Mikronükleus tayini.....	23
2.2.5. Histopatoloji	24
3. BULGULAR.....	26
3.1. Midyelerin Ağırlık ve Boy Ortalamaları	26
3.2. Spektrometrik Analizler.....	26
3.2.1. Ağır metal analizi bulguları	26

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.3. Biyokimyasal Analizler.....	26
3.3.1. Total protein tayini bulguları.....	26
3.3.2. Glutasyon-S-Transferans (GST; EC 2.5.1.18) seviyesi bulguları	27
3.3.3. Superoksit Dismutaz (SOD: EC 1.15.1.1) aktivitesi bulguları.....	28
3.3.4. Katalaz (CAT: EC 1.11.1.6) aktivitesi bulguları.....	28
3.3.5. Lipid peroksidasyonu seviyesi belirlenmesi.....	28
3.3.6. Asetilkolinesteraz (AChE; EC 3.1.1.17) aktivitesi belirlenmesi.....	29
3.4. Genotoksisite Belirlenmesi.....	29
3.4.1. Mikronükleus analizi bulguları	29
3.5. Histolojik Analizler	30
3.5.1. Rutin Hemotoksilen & Eozin boyama.....	30
3.5.2. Tunel ekspresyonu.....	35
3.6. Gen Ekspresyon Profilinin Belirlenmesi.....	39
3.6.1. Metallothioneinler (Metal bağlayan proteinler)	39
3.6.2. Kaspazlar	39
4. TARTIŞMA.....	41

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
5. SONUÇ	47
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	48
ÖZGEÇMİŞ.....	59
EKLER	

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Mytilus galloprovincialis.....	7
2.1. Aliğa ve Eski Foça Balıkçı Barınağı istasyonları	15
2.2. Toplanan midyelerin genel görünümü	16
2.3. ICP-MS sistemi	17
2.4. AChE aktivite tayini için gerekli solüsyon miktarları.....	19
2.5. Katalaz aktivite tayini için gerekli solüsyon miktarları.....	20
3.1. Gözlemlenen nükleus çeşitleri.....	29
3.2. Foça bölgesi midyelerinin hepatopankreas dokusu histolojik kesiti	31
3.3. Aliğa bölgesi midyelerinin hepatopankreas dokusu histolojik kesiti	32
3.4. Foça bölgesi midyelerinin solungaç dokusu histolojik görüntüsü	33
3.5. Aliğa bölgesi midyelerinin solungaç dokusu histolojik görüntüsü	34
3.6. Foça bölgesi midyelerinin solungaç dokusunda TUNEL ekspresyonu....	35
3.7. Aliğa bölgesi midyelerinin solungaç dokularında TUNEL ekspresyonu...	36
3.8. Foça bölgesi midyelerinin hepatopankreas dokularında TUNEL ekspresyonu.....	37
3.9. Aliğa bölgesi midyelerinin hepatopankreas dokularında TUNEL ekspresyonu.....	38

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.10. Aliğa ve Foça istasyonlarında toplanan midyelerdeki Metalotionein genlerinin (MT10 ve MT20) ekspresyon seviyeleri.....	39
3.11. Aliğa ve Foça istasyonlarında toplanan midyelerdeki başlatıcı kaspaz genleri.....	40
3.12. Aliğa ve Foça istasyonlarında toplanan midyelerdeki Efektör kaspaz genleri.....	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Örnekleme yapılan midyelerin boy, en ve ağırlık ortalamaları	26
3.2. Aliğa ve Foça istasyonlarında toplanan midyelerdeki ağır metal miktarları($\mu\text{g}/\text{kg}$ kuru ağırlık)	27
3.3. Aliğa ve Foça istasyonlarından alınan örneklerin toplam protein miktarı (mg/ml)	26
3.4. Örneklerde belirlenen GST aktivitesi (nmol/min/mg)	27
3.5. Örneklerde belirlenen SOD aktivitesi (mol/min/mg)	28
3.6. Örneklerde belirlenen CAT aktivitesi (mol/min/mg)	28
3.7. Örneklerde belirlenen TBARS miktarı (nmol)	28
3.8. Aliğa ve Foça örneklerinde belirlenen AChE aktivitesi	29
3.9. Örneklenen midyelerin kromozomal hasar çeşit ve sayıları.....	30

1. GİRİŞ

Çağın en büyük sorunlarından biri olan çevre kirliliği, gözden gelinmeye çalışılsa da her daim kendini hatırlatmaktadır. İnsanoğlunun sonu gelmez istekleri ve müsrifliği karşısında sömürülen doğal kaynaklar yerine konulamamasından dolayı giderek azalmış ve imal işlemleri sırasında ve sonrasında oluşan atıkların depo yerleri haline gelmişlerdir. Kaynak kıtlığının başgöstermesi ile birlikte yeni arayışlarla geri dönüşüm ve arıtım işlemlerine dikkat çekilmeye başlanmış, halihazırda kirlenen bölgeler içinse kurtarma ve temizleme projeleri geliştirilmiştir.

Bu önlemlerin alınmasına dikkati çekense ne yazık ki yine büyük çevre felaketleri olmuştur. Aşırı avlanma, plansız şehir ve sanayi yerleşimi, arıtım olmadan atıkların sucul, karasal ortamlara deşarjı ya da havaya salınımı, denetimsiz pestisit kullanımı gibi sorumsuz hareketler çevrenin bertarafına, bununla birlikte canlılığın da etkilenmesine zemin hazırlamıştır.

Bugünkü kirliliğin nedenlerinin temeli olduğu düşünölen Sanayi Devrim'i getirdiği yeniliklerle her açıdan iz bırakıcı olmuştur. Özellikle gelişmekte olan ölkeler çağa ayak uydurabilmek için bir çok taviz vermek durumunda kalmış, bunun sonucunda oluşan kirlilik ve doğal bozunum sonradan korunmaya çalışılmıştır.

1983 tarihli Çevre Kanunu'nda çevre kirliliği; 'Çevrede meydana gelen ve canlıların sağlığını, çevresel değeri ve ekolojik dengeyi bozabilecek her türlü olumsuz etki' olarak tanımlanmıştır. İnsan eliyle üretilmiş çeşitli ksenebiyotikler bütün ekolojik ortamlarda (hava, su, toprak) yoğun bir kirlilik yükü oluşturmaktadır. Türkiye Çevre Sorunları Vakfı su kirliliğini, 'İnsandan kaynaklanan etkiler sonucunda ortaya çıkan, kullanımı kısıtlayan ya da tamamen engelleyen, ekolojik dengeyi bozan nitelik değışimleri' olarak belirtmektedir (TÇSV, 1989).

Kimyasalların ve toksik ajanların canlılar üzerindeki etkilerini araştıran bir bilim dalı olarak toksikolojinin önemli alt dallarından biri olan çevresel toksikoloji genel alıcı ortamlardaki kirliliğin canlı organizmalar üzerindeki etkileriyle ilgilidir. Bunun dahilinde sucul toksikoloji ise endüstriyel kimyasallar, antropojenik ve doğal maddelerin akuatik organizmalara, populasyon ve ekosistemlere etkilerini hücre seviyesinden tüm vücut seviyesine kadar farklı aşamalarda inceleyen bir bilimdir (Rand, 1995).

1.1. Kimyasal Kirleticiler

İnsanoğlunun kullanımına sunulan kimyasalların sayısı her geçen gün katlanarak artmaktadır. Sayıları milyonları bulan bu maddelerin ne yazık ki çoğunun etki mekanizmaları bilinmemektedir. Etkileri kanıtlanmış ve üzerinde hala devam eden çalışmalar olan poliaromatik hidrokarbonlar, poliklorlu bifeniller, çeşitli pestisitler ve deterjanlar önemli ksenobiyotikler arasında yer almaktadır. Tüm bu kimyasallarla birlikte doğada belirli miktarda var olan ağır metallerin kullanım ve işleme amaçlı çıkarılması ve arıtma ve saklama gereklilikleri yerine getirilmeksizin doğaya salınması tüm canlılar için büyük bir tehlike oluşturmaktadır.

1.1.1. Ağır metaller

Sucul ekosisteme deşarj edilen ve çeşitli formlarda bulunan ağır metaller deniz canlıları tarafından çeşitli yollarla alınırlar ve besin döngüsüne girerler (Merlini, 1980). Canlılar üzerinde konsantrasyonlarına bağlı olarak ciddi etkiler yaratan ağır metaller grubuna Sb, Ag, As, Be, Cd, Cr, Cu, Pb, Mn, Hg, Ni, Se, T, U, V, Zn elementleri başta olmak üzere yoğunluğu 5 gr/cm³'den büyük elementler dahildir (Yiğit ve Altındağ, 2002). Parçalanmaya dayanıklı olduklarından lipofilik özellikleri sayesinde sucul organizmaların dokularında birikebilirler.

Denizel ortamlarda genellikle kolloidal ve partikül veya çok düşük seviyede çözünmüş halde iyonlar ve şelatlar olarak bulunurlar. Ağır metallerin çözünebilirlikleri ortamın pH değeri ile bağlantılıdır. Ağır metal kirliliğinin genel olarak kaynakları antropojeniktir. Doğal kaynaklardan gelen kontaminasyonlar çok düşük seviyelerdedir (Karakaş, 2003). Metal toksitesinde pH oldukça etkilidir (Mutluay, 1996).

1.1.1.1. Kadmiyum

Önemli ağır metallerden biri olan kadmiyumun doğadaki yarılanma ömrü 10-15 yıl iken canlılardaki yarılanma ömrü oldukça uzundur ki deneysel çalışmalarda bu sürecin 38 yıla kadar çıktığı gözlemlenmiştir (HHS, 1999). Doğal sularda genellikle 0,001 mg/l civarında seyreden kadmiyum miktarının 0,010 mg/l civarına çıktığı da gözlenmiştir. Bununla birlikte 1 mg/l'den fazla miktarda kadmiyum içeren suların kirlilik kaynağının antropojenik olduğunu söylemek mümkündür. Yüzey suyu derişiminin sucul canlılığı korumak açısından 0,0002 mg/l'den fazla olmaması gerektiği belirtilmektedir. Çinko, bakır gibi metallerle birlikte bulunması toksisite riskini arttırmaktadır (Bebek, 2001). Ayrıca DNA, RNA ve ribozom sentezini engelediği belirlenmiştir (Gerhard et al., 1998). Kabuklu deniz canlıları tarafından akümüasyonu kadmiyum bağlayan peptidler sayesinde gerçekleşmektedir (Goyer, 1986).

1.1.1.2. Nikel

Nikel etkili bir genotoksik karsinojendir. *In vivo* olarak metallothionein ile bağlandığı gözlenen nikelin ayrıca böbrek ve karaciğerde metallothionein sentezini arttırdığı da belirlenmiştir (Vural, 2005). Deniz suyunda NiS formunda bulunan nikel sulardaki miktarı 6 mg/l olduğunda mikrobiyolojik olayları inhibe edebilir (Uzunoğlu, 1999).

1.1.1.3. Cıva

Cıva konsantrasyonları karada yaklaşık 7×10^{-2} iken okyanuslarda 3×10^{-5} 'tir (Krabbenhoft and Schuster, 2002). Cıva metilasyonunun esas kaynağı akarsu ve okyanuslardır. Besin zinciri yoluyla tüm canlıları etkileyen cıvanın neden olduğu çokça büyük epidemiyolojik olgular vardır. Metil cıvanın besin zincirindeki en önemli kaynağının deniz ürünleri olduğu belirtilmiştir (WHO, 1976). Sucul sistemlerde *Desulfovibrio desulfuricans* LS gibi bakteriler tarafından yüksek lipofilik özelliği olan organik cıvaya dönüştürülmesi cıvanın sucul canlılarda birikmesini kolaylaştırmaktadır (Goyer, 1986).

1.1.1.4. Krom

Cr^{+3} ve Cr^{+6} olmak üzere iki formu bulunan kromun sucul ortamlardaki varlığı kayalardan ya da çoğunlukla endüstriyel faaliyetlerden kaynaklanır. Yüksek çözünürlüğe sahip olmaması nedeniyle genellikle 0,01 mg/l'nin altındaki konsantrasyonlarda bulunur. Kirlenmiş sulara hem anyon hem de katyon şeklinde bulunabilmesiyle beraber anyon şekli daha tehlikelidir (Bebek, 2001). Toksikite ve subletal özellikleri ortam koşullarına ve türlere göre farklılık göstermektedir (Eisler, 1986). Çeşitli türlerde yapılan araştırmalara göre Cr^{+6} 'nın bağışıklık sistemi zayıflatıp patojenlere karşı dirençlerini düşürmekle birlikte morfolojik ve histopatolojik değişimlere sebep olduğu da gözlenmiştir (Synder et al., 1991).

Krom gibi bakır da sudaki çözünürlüğü düşük olduğundan konsantrasyonu düşük bir elementtir. Genelde 0,05 mg/l oranında bulunurken yeraltı sularında bu değer 12 mg/l'ye kadar çıkabilir (Bebek, 2001). Deniz suyundaki konsantrasyonları ise 0,001- 0,020 mg/l arasında değişir. Sert sulara daha az etkisi gözlenen bakırın yumuşak sulara 0,015-3 mg/l arasındaki konsantrasyonlarda birçok sucul organizmaya toksik etkisi olduğu gözlemlenmiştir (Uzunoğlu, 1999). Balıklarda gelişmeyi yavaşlattığı (Martinez et al., 2004), bağışıklık sistemini yavaşlattığı (Ay ve ark., 1999) bilinmektedir. Omurgasız deniz canlılarının ise diğerlerine göre daha duyarlı olduğu belirlenmiştir (Topcuoğlu, 2005).

1.1.1.5. Çinko

Protein metabolizmasına giren ve enzim işlevinde rol oynayan çinko esansiyel bir elementtir. Ancak çok yüksek konsantrasyonlarda toksik etkiye sahiptir ve toksisitesi düşük pH değerlerinde daha fazladır. Bununla birlikte deniz canlılarında ihtiyaçtan daha fazla olarak biriktirilebilir (Topçuoğlu, 2005). Kirlenmiş çevrelerde kadmiyumdaki daha az hareketlidir (John and Leventhal, 1995).

Arseniğin 3 formu bulunur. Yükseltgenmiş hali olan arsenik trioksit zehirli bir maddedir. Deniz ürünleri ile alınan arseniğin insanlarda atılımı daha çok kakodilik asit şeklinde olmaktadır (Bucket et al., 1980).

Muhtemel insani karsinogen grubunu belirten 2A grubuna dahil olan kurşunun denizel organizmalar tarafından alınan bir kısmının atıldığı bir kısmının ise tutularak besin zincirine geçtiği belirlenmiştir. Toksikitesi türden türe göre değişmektedir (Egemen ve Sunlu, 1996).

1.1.2. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH)

Polinükleer aromatik hidrokarbonlar olarak da bilinen PAH'lar petrol türevleridir. Çevrede yaklaşık olarak 250 PAH türevi vardır ve bunların 30'a yakınının kanserojen olduğunun bilinmesine rağmen yalnızca 16 tanesi EPA'nın öncelikli kirleticiler listesine girebilmiştir (EPA, 1999). Sudaki çözünürlükleri oldukça düşüktür ve genelde partikül halinde sedimana yapışırlar. Genelde yetersiz yanma sonucu oluşan bu organik kirleticiler kaza sonucu dökülme veya sızıntıyla birlikte de sucul ortamları kirletebilirler. Bununla birlikte evsel ve endüstriyel atıklarda da bulunabilirler (Rand and Petrocelli, 1985).

Hidrofobik bir yapıya sahip olan PAH'lar süspanse olmuş partikülleriyle suyu sararlar (Means et al., 1980). Lipofilik yapılarından dolayı yüksek miktarlarda dokularda birikme eğilimi göstermektedir. Molekül ağırlığı yüksek olanların sudaki çözünürlüğü azalırken toksisitesi artmaktadır (Wenzl et al., 2006; Ferrarese et al., 2008).

Bazı PAH bileşiklerinin hücre bölünme mekanizmaları üzerinde geri dönüşsüz hasara yol açtığı ve bazı memeli ve balık türlerinde kanser oluşturduğu gözlenmiştir (Gaga, 2004).

1.1.3. Poliklorlu Bifeniller (PCB)

Şimdiki yıllarda üretilmese de geçmişte üretilen, toprak ve sedimanda birikerek günümüze kadar gelen sentetik kimyasallar olan poliklorlu bifenillerin doğada yarılanma süreleri 57 yıldır. Hidrofobik özellikleri sayesinde canlılarda yüksek oranda birikim yapabilme kabiliyetine sahiptirler (Wang et al., 1998). Çok sayıda klorlu bileşikleri aynı zamanda hidrofobiktiler ve ancak anaerobik ortamda parçalanabilirler (Abraham et al., 2002). Sucul ortamda organik maddeler ve

sedimana absorbe olurlar. Genelde kirliliğin kaynağı atık suların arıtımsız denizlere deşarjıdır (Dobson and Van Esch, 1993).

PCB'lerin toksik etkileri ilk defa balık ve kuş örneklerinde pestisit analizi yapılırken ortaya çıkarılmıştır (Jensen, 1966). Sucul ekosistemlerde PCB'lerin organizmaya alımı sıcaklık artışıyla birlikte artış göstermektedir. Vücuda alınımı genellikle solungaçlarla olmakla beraber farklılık gösterebilir. Buna nazaran PCB'lerin vücuttan atılımı çok yavaştır. Ancak maruziyet sona erdikten sonra organizmalardaki kalıntı miktarlarında düşüş gözlemlenir. PCB kalıntıları sucul omurgasızları tüketen predatörlere geçmekte bu yolla besin zinciri içerisine katılmaktadır (Dobson and Van Esch, 1993). 10-25 ppb gibi düşük PCB konsantrasyonlarının bitkisel planktonlar ve kabukluların ölümüne sebep olduğu belirlenmiştir (Kaya ve Pirinçci, 2002; Güvenç ve Aksoy, 2007).

PCB'lerin T lenfosit aktivitesi ve antikor üretimini azaltarak immün sistemi baskıladığı gözlenmiştir (Seyran ve Erişir, 2008). Ayrıca doz ve zamana bağlı olarak apopotozisi hızlandırdığı da rapor edilmiştir (Yoo et al., 1997).

PCB'lerin kanserojen etkisini kanıtlayan pek çok çalışma vardır (Oakley et al., 1996; Brunner et al., 1996; Mayes et al., 1998). Planar PCB bileşenlerinin asıl karsenojenler olduğu düşünülse de non-planar olup yüksek düzeyde klorlu olan PCB'lerin de karsinojenik olduğu belirlenmiştir (Carpenter, 1998).

1.2. Biyogöstergeler ve Biyoizleme

Düşünmeden kullanılıp tahrip edilen çevre, kendisini yenileme kapasitesinin üzerindeki kirlenmelerle telafi edilmesi oldukça zor olan veya hiç olmayan bir durumla karşı karşıya kalmaktadır. Bu sebepten dolayı, öncelikle insanlar ve tüm canlı-cansız çevre büyük bir tehlike altındadır. Bu tehlikenin bir miktar önlenmesi için kirliliğin belirlenip izlenmesi ve bu araştırmalarda canlılardan yararlanılması büyük önem taşımaktadır. Hava, su ve toprak kirliliğinin ya da genel olarak çevre kirliliğinin canlılarla saptanıp izlenebilmesi biyoizleme (biyomonitorizasyon) olarak ifade edilmektedir. Biyomonitorizasyon, ekosistemin veya doğal çevrenin genel özelliklerini, çevredeki sorunların durumunu saptayabilmek için ekosistemde, populasyonda, bireyde, doku ve hücreseel seviyelerde yaşayan organizmaları inceleyen bir bilimdir.

Bütün ekosistemlerde yaşayan canlılar maruz kaldıkları kirliliğe çeşitli şekillerde yanıt verirler. Bu kirlilik genellikle çoğu türün yer değiştirme veya yok olması gibi sonuçlar getirirse de bazı dirençli türlerin ortamda daha rahat büyümesine, rekabette avantajlı duruma geçmesine olanak tanımaktadır. Çeşitli kirleticilere maruz kalan deniz ve okyanusların kirliliği daha önceleri kimyasal parametrelere bakılarak belirlenmekteydi. Fakat bu değerler canlılık üzerine etkiler hakkında çok fazla fikir vermemekteydi (Rainbow and Phillips, 1993; Webb and Gagnon, 2002). Bu nedenle kirleticilerin metabolizmaya etkilerini belirlemek için canlı çalışmaları ile kirlilik izlemleri yapılmaktadır.

Sucul ekosistemlerde genellikle hareket edemeyen ve dipte yaşayan canlıların büyük çoğunluğunu kirlilik biyoindikatörü olarak kullanılır. Su kalitesini kirlilik göstergesi türlerle belirlemede balıklar, bentik canlılar, algler, bakteriler (indikatör bakteriler) ve plankton (plankton indikatör türler) kullanılmaktadır (Başçınar, 2009). Bu tip organizmalar genelde maruz kaldıkları kimyasalları bünyelerinde biriktirirler. Biyomonitor olarak seçilen organizmaların kirleticilere karşı oluşturduğu cevabın şiddetinin saptanması amacıyla vücut sıvılarının, hücrelerinin ya da dokularının, biyokimyasal ve hücre bazda ölçümüne biyogösterge denir (Bodin et al., 2004).

İlgili biyogösterge canlıının maruziyetini ve oluşturduğu cevabın şiddetini gösterebilmektedir (Sarkar ve ark., 2006). Biyogöstergelerin en önemli özellikleri;

- Maruz kalınan kimyasal ve organizma arasında lethal doza kadar olan etkileşimler saptanabilir ve ölçülebilir.
- Kimyasal ölçümlerin tersine organizmada oluşabilecek advers etkiler belirlenebilir.
- Bilinen ve bilinmeyen tüm kontaminantlar hakkında bilgi verebilirler.
- Erken tanı ile koruyucu önlemlerin alınması için uyarı oluştururlar.
- Bölgesel ve kısa dönemli olarak kirlilik biyolojik olarak belirlenebilir.
- Kirlilik şiddetiyle orantılı olarak ekosistem bozulmalarını gösterebilirler.
- Ekotoksikolojik evrim hakkında bilgi kaynağı olarak kullanılabilir.
- Bir çok kirleticinin aynı anda belirli bir organ, doku üzerinde ya da moleküler düzeyde oluşturacağı kümülatif etkinin düzeyini ortaya koyabilirler.
- Hem laboratuvar hem de yerinde çalışmalar için uygundur.

Ekotoksikoloji günümüzde gelişen teknoloji ve sanayileşmenin bir getirisi olarak önemli bir bilim dalı haline gelmiştir. İnsan eliyle yaratılan kirliliğin etkilerinin belirlenmesi ve bunların giderilmesi yönünde çalışmalar ortaya konarak yapılan yıkımın telafisi sağlanmaya çalışılmaktadır. Özellikle Avrupa'da yükselen çevre bilinciyle birlikte bu yöndeki çalışmalar paralellik göstermektedir. Kirlilik oluşturan mutajen ve kanserojen maddelerin yıllar içerisinde deniz canlılarında genetik hasar oluşturması üzerine bir çok bulgu ortaya konmuştur (Galindo and Moreira, 2009; Grisolia et al., 2009). Kirleticilerin doğal su ekosistemlerindeki davranışlarının izlenmesi amacıyla su ve sedimentte sistematik olarak ölçümler yapılmakta ve ortamdaki organizmalar ile ilişkileri incelenmektedir. Bu kapsamda yürütülen çalışmalarda; kıyısız sular, körfezler ve iç sularda kalıcı, toksik ve mutajen/kanserojen özellikleri olan organik ve inorganik kirleticiler su ve dip çamurunda izlenerek organizmaların davranışları ile birlikte kirlenmenin boyutları saptanmaktadır. Kirliliğin etkisi genellikle dipte yaşayan canlılarda daha yüksek düzeyde görülmektedir. Yumuşakçalar (mollusk) sınıfına ait midyeler kolay bulunması, suyu süzerek besinlerini sağlaması ve metalleri yüksek yoğunluklarda bünyelerinde biriktirip bunları uzunca bünyelerinde tutmalarından dolayı biyomonitör tür olarak tercih edilmektedir (Kayhan ve ark., 2006; Başçınar, 2009). Yine midyeler çevreden yoğun olarak etkilenirler ve bu nedenle ekotoksikolojik çalışmalarda biyoindikatör olarak kullanılırlar (Farris and Van Hassel, 2006; Zorita et.al., 2007).

1.2.1. *Mytilus galloprovincialis* (Kara Midye)

Suyu süzerek beslenmeleri, çeşitli kirleticilere karşı görece olarak daha dirençli olmaları, buldukları yere sabit yaşamaları, ekotoleranslarının yüksek olması nedeniyle midyeler sucul ortamlar için en iyi monitor organizmalardır (Şekil 1.1.)



Şekil 1.1. *Mytilus galloprovincialis*

Ülkemizde bol bulunması ve geniş alanlarda dağılım göstermesi sebebiyle de *Mytilus galloprovincialis* indikatör organizma olarak kullanılmaktadır.

Taksonomisi;
Sınıf: Bivalvia
Takım: Mytiloidea
Familya: Mytilidae
Cins: *Mytilus*
Tür: *galloprovincialis*

Bu türün başlıca yaşam alanları; Akdeniz, Adriyatik Denizi ve Karadeniz'dir. Suyu pompalayarak solungaçları yardımıyla suda bulunan organik madde ve fitoplanktonlarla beslenir. Elverişli ortamlarda bir yıl içinde 70 mm'ye ulaşabilir (Picker and Griffiths, 2011). 28 °C sıcaklık ve % 0,40 tuzluluğun üzerinde hayati faaliyetleri durur (Çağlar, 1974).

İzmir körfezinde *Mytilus galloprovincialis* kullanılarak yapılan çevre kirliliği ile ilgili ilk çalışmada İzmir-Mektupçu'dan toplanan midyelerde ağır metal içeriği belirlenmiştir (Uysal, 1974).

1.3. Biyomarker (Biyoişaretleyiciler)

Bir ya da daha fazla kontaminatın maruziyet ya da etkisinin kanıtlanması için dokuda, sıvı vücut örneklerinde veya vücudun tüm seviyelerinde ölçülebilen biyokimyasal, hücrenel, fizyolojik ya da davranışsal değişimlere biyomarker – biyolojik işaretleyiciler denir (Depledge, 1994).

1.3.1. Maruziyet göstergesi olarak Metallothioneinler

Metallothioneinler (MT) düşük moleküler ağırlığa sahip metal bağlayan proteinlerdir ve metaller tarafından uyarılma yeteneğine sahiptirler. Metallothioneinlerin uyarılması; metal kirlenmesine, özellikle de kadmiyum (Cd), civa (Hg), gümüş (Ag), altın (Au), kobalt (Co), nikel (Ni), bizmut (Bi), ve bazen de bakır (Cu) ve farklı metal karışımlarına maruz kalındığının göstergesidir (Kágy, 1991, Bebianno and Serafim, 1998; Mourgaud et al., 2002). Bir çok araştırmacı MT'lerin doku ve organları hasardan korumak için rol aldığını rapor etmiştir (Sato and Bremner, 1993; Viarengo et al., 2000). MT'ler vücuda alınan metallerle bağlanarak onların detoksifikasyon sürecine katkıda bulunmaktadır. MT indüksiyonu, kirli alanlardaki canlı organizma popülasyonlarında gözlenmektedir ve son zamanlarda bimonitorizasyon programlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (UNEP/RAMOGGE, 1999; Carajaville et al., 2000; Amiard et al., 2006). Yapılan çalışmalarda yumuşakçalardaki MT konsantrasyonu ve metaller arasında önemli korelasyonlar bulunmuştur (Amiard et al., 2006). MT'ler midyelerde farklı dokularda belirlenebilmektedir (Ramsak et al., 2012). *Mytilus galloprovincialis* midye türünde yapılan moleküler çalışmalar farklı MT izoformlarının varlığını ortaya koymuştur ki bu izoformlar 2 multigen familyası tarafından kodlanmaktadır: MT-10 ve MT-20 (Grattarola et al., 2006; Fasulo et al., 2008). MT-10 mRNA' sı temel seviyede ekspresyon olurken, MT-20 ekspresyonu bazal koşullar altında çok düşüktür. Buna ek olarak, Cd, Zn, Cu, ve Hg iyonları MT-10 gen ekspresyonunu indüklerken, Cd ve Hg maruziyeti ve özellikle de Cu kirliliği durumunda MT-20 gen ekspresyonunda artış oluşmaktadır (Dondero et al., 2005; Aceto et al., 2011).

1.3.2. Sitogenetik biyomarkerlar

Hücre ölüm mekanizmalarından biri olan programlanmış hücre ölümü (apoptozis), mollusklarda larval gelişim sürecinde yoğun olarak gözlenmektedir. Ayrıca ortamda bulunan stres faktörleri, toksik kimyasallar gibi bir çok indükleyici tarafından da hücre ölümü oluşabilmektedir (Gifondorwa and Leise, 2006; Terahara and Takahashi, 2008; Sokolova, 2009). Apoptozis midyelerin çeşitli dokularında oluşan hasarın temizlenmesinde gözlenen önemli bir hücrenel süreçtir (Sokolova et al., 2009; Romero et al., 2011). Bununla birlikte apoptoz mekanizmasında rol oynayan genler ve bunların regülasyonu hakkında bilinenler sınırlıdır. Apoptozun erken evrelerinde kaspaz proteinleri sentezlenir ve bu proteinler hücrenel birçok bileşenin hidrolizinde görev alırlar. Kaspaz proteinleri apoptozun merkezinde rol alan proteinlerdir (Chowdhury et al., 2008). Bu proteinler iki temel göreve sahiptir: ölüm sinyalinin iletilmesi ve apoptozda ortaya çıkan biyokimyasal ve morfolojik değişikliklere sebep olan birçok hücrenel proteinin parçalanması (Hale ve ark., 1996). Apoptoziste rol alan kaspazlar, apoptotik süreçteki fonksiyonlarına bağlı

olarak başlatıcı ve efektör olmak üzere sınıflandırılırlar (Riedl and Shi, 2004). Apoptoz sırasında kaspazlardan ilk görev alanlar başlatıcı kaspazlardır. Efektör kaspazlar ise başlatıcı kaspazlar tarafından aktive edilirler. Kaspaz zincirinde yer alan enzimler bir kere aktive oldukları zaman geriye dönüş yoktur ve buldukları hücreyi ölüme sürüklerler. Midye için kaspaz 2 ve kaspaz 8 başlatıcı, kaspaz 3/7-1, kaspaz 3/7-2, kaspaz 3/7-3 ve kaspaz 3/7-4 efektör kaspaz olarak tanımlanmıştır (Romero et al., 2011).

Kromozomal hasarın bir göstergesi olarak mikronükleus testi mutajenler ve klastojenlerin genotoksik aktivitelerinin belirlenmesinde hassas bir biyoindikatör olarak kullanılmaktadır (Mersh et al., 1996; Venier et al., 1997). Hücre bölünmesinden sonra kromozom parçaları ya da kromozomun tümünün yavru hücreye çekirdeğe katılmadan aktarılmasının belirlenmesine dayalı bir testtir. Mikronükleuslar hücre bölünmesi sırasında kromozomal kırılma veya anöploididen kaynaklanan küçük, intrasitoplazmik kromotinlerdir.

1.3.3. Biyokimyasal biyomarkerlar

1.3.3.1. Glutasyon-S-Transferans (GST; EC 2.5.1.18)

Oksidatif stres sonucu oluşan metabolitlerin detoksifikasyonunda rol oynayan bir enzim ailesidir (Clark, 1989). Glutasyon (indirgenmiş biçimi GSH) oksijen radikallerinin hücre zarından girişini engelleyerek hücre zarını lipid peroksidasyonundan koruması dolayısıyla en önemli antioksidan ajanlardan biri olarak kabul edilir (Meister, 1989).

Ayrıca glutasyon detoksifikasyonu katalizleyen birçok enzimin kofaktörüdür. Bu enzimler arasında hidrojen peroksit ve organik hiperoksitleri azaltmasıyla oksidatif hasar ve serbest radikallere karşı etkili bir koruma sağlayan glutasyon peroksidazlar bulunmaktadır. Diğer bir enzim grubu olan glutasyon-S-transferanzlar, elektrofilik bir merkez içeren ksenobiyotiklerle glutasyonların çok geniş çeşitlilikteki konjugasyon reaksiyonlarının katalizörü olarak hareket ederler (Regoli and Primcipato, 1995). Midyelerdeki GST seviyesi kimyasal kirliliğe maruziyetin göstergesidir (Fitzpatrick and Sheehan, 1993).

1.3.3.2. Süperoksit Dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1)

Süperoksit anyonlarını (O_2^-) hidrojen peroksit ve oksijene çeviren süperoksit dismutaz enzimi önemli bir antioksidatır. Çevresel baskılara nispeten kısa süreli yanıtlar verdiği için kirlilik açısından iyi bir biyomarker olarak kabul edilir (Nasci et al., 2002).

1.3.3.3. Katalaz (CAT: EC 1.11.1.6)

Enzimatik antioksidant savunmasındaki rolünden dolayı önemli bir oksidatif stres biyomarkırır (Livingstone, 2001). Katalaz inhibisyonu akut kirliliğe geçici bir tepki olarak da ileri sürülmüştür (Regoli and Principato, 1995).

1.3.3.4. Lipid Peroksidasyonu Seviyesi belirlenmesi

Lipit peroksidasyonu (LP) karbon-karbon çift bağı içeren bir dizi lipidin oksidatif bozulması olarak tanımlanabilir. Membran lipitleri genellikle LP'ye oldukça duyarlıdır ve bu hücrede bulunan bir çok zarlı organelin ve hücrenin kendisinin hayatta kalma ve işleyişine zarar vermektedir. Önceki çalışmalarda sucul canlılarda toksikantlara bir yanıt olarak lipit peroksidasyonunda artış görülmektedir (Thomas and Wofford, 1993; Remeo and Gnassia-Barelli, 1997; Sridevi et al., 1998). Yüksek düzeyde ağır metal bulunduran ortamlara maruz kalmak midyelerde metal kontamine çevrelerdeki organizmaların tersiyer lisosomlarında lipofusin birikimin artışıının da gösterdiği gibi lipit ,peroksidasyonunun artışıına sebep olur (Regoli, 1992). Lipofusin birikimi mavi midyelerde sağlık durumu belirlemek için kullanılır. Ayrıca yaş pigmenti olarak bilinen lipofusin oksidatif stres nedeniyle protein ve lipit peroksidasyonun son ürünü olarak kabul edilir (Au et al., 1999; Au, 2004; Terman and Brunk, 2004). Midye sindirim bezi dokularındaki lizozomlarda lipofusin birikimi antropojenik kirleticilerle bağlantısı olarak oksiradikal hasarın göstergesi olarak kabul edilir (Krishnakumar et al., 1994, 1997; Au et al., 1999; Au, 2004). Ayrıca sitoplazmada nötral lipitlerin oluşturduğu lipid damlaları birikimlerinin apoptoz indüklemesine dahil olduğu bilinmektedir (Boren and Brindle, 2012). Lizozomların depolama kapasiteleri aşırı olarak dolduğunda lizozomal membran kararsız ve sızdırır hale gelebilir. Kirleticiler ve hidrolitik lisosomal enzimler sitoplazmaya bir çok ölüm riskiyle beraber tekrar girebilir (Koehler et al., 2002).

Solungaç ve hepatopankreas doku örneklerinden lipit peroksidasyonu belirlemesi için tiyobarbitürik asit reaktif maddeler içeren spektrofotometrik bir yöntem kullanılmıştır (Ohkawa et al., 1979).

1.3.3.5. Asetilkolinesteraz (AChE; EC 3.1.1.17) aktivitesi

Sinir uyarılarının iletilmesine katılan bu enzim yaygın olarak nörotoksisite indikatörü olarak kullanılır (Peakall, 1992). Organofostat ve karbamatlı pestisitlere spesifik bir biyomarker olduğu bilinen AChE'nin son yıllarda artan çalışmalarla birlikte ağır metal, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), deterjanlar gibi çeşitli kirleticilerle de inhibisyonunun meydana geldiği gözlenmiştir (Lionetto et al., 2003; Lionetto et al., 2004; Caricato et al., 2010; Vioque-Fernández et al., 2007).

1.4. Araştırma Bölgesi

Türkiye'nin en büyük şehirlerinden biri olan İzmir aynı zamanda önemli bir liman kentidir. Bünyesinde var olan endüstriyel, ticari, sosyal aktiviteler sonucunda yoğun kirliliğe maruz kalmıştır ve göreceli olarak kısa sürede meydana gelen bu bozunmaların telafisi için uzun yıllardır uğraşılmaktadır.

İzmir ili içerisinde Ege Denizi'nin kıyısında yer alan Aliağa ilçesi'nin yüzölçümü 412,5 km²'dir. Doğusunda Manisa, Kuzeyinde Bergama, Güneyinde Menemen, Güney batısında Foça bulunmaktadır. 1961 yılı Anayasası'nda 'ağır sanayi bölgesi' olarak ilan edilmesinden beri giderek büyümüş 1997 yılında kurulan Aliağa Organize Sanayi Bölgesi ile tarımsal kimliğini kaybedip tamamen bir sanayi kenti haline gelmiştir.

Aliağa Bölgesi'nde; makine-kimya endüstrisine ait tesisler, TÜPRAŞ, PETKİM, Petrol Ofisi ve çeşitli sıvılaştırılmış gaz depo ve dolun tesisleri, akaryakıt depolama ve dağıtım tesisleri, demir-çelik tesisleri, gemi söküm tesisleri, kağıt fabrikası, gübre tesisleri, ark ocakları bulunmaktadır. Aliağa'da bulunan demir-çelik sektörü Türkiye'nin demir ihtiyacının % 25'ini karşılamakta ve hammadde olarak tamamen hurda demir kullanmaktadır. 2005 verilerine göre Türkiye Dünya'nın çelik üreticisi ve üretiminin tümü hurda demire bağlı olduğundan hurda demir ithalatında Dünya'da lider ülkelerden biridir (OECD, 2011).

Güzelhisar Çayı'nın yakınında olması nedeniyle su gereksinimi duyan kimya sektörü Aliağa'da, demir-çelik ve haddeleme tesislerini Nemrut Körfezi'nde kurulmuştur. Güzelhisar Çayı üzerinde kurulmuş olan Güzelhisar Barajı daha çok petro-kimya tesislerine hizmet vermektedir. Rafineri ise güneyde, Menemen yolu üzerinde, Gediz'den özel su alma yapılarıyla suyunu 20 km. uzaklıktan getirmektedir (Aliağa Ticaret Odası © 2009). Bölgenin enerji santralleri; Çakmaktepe Doğalgaz Enerji Çevrim Santrali, EÜAŞ Aliağa Gaz Türbinleri ve Kombine Çevrim Santrali, ENKA Aliağa (İzmir) Doğalgaz Çevrim Santrali'dir.

İyonyan antik kenti Kyme'i de sınırları içerisinde bulunduran Aliağa sanayi bölgesine dönüşmesine rağmen turistik değerini henüz kaybetmemiştir. Sanayileşmeden önce tarım ve hayvancılıkla uğraşılan bölgede şimdi sadece Güzelhisar ve Helvacı bölgesinde tarım yapılmaktadır.

1.4.1. Araştırma bölgesinde önceden yapılan çalışmalar

Sınırları içerisinde bulunan Bakırçay Nehri beraberinde getirdiği evsel ve endüstriyel atıklarla birlikte Çandarlı Körfezi'ne dökülmekte ve yoğun kirlilik yükü taşımaktadır (Taş ve ark., 2007).

Çandarlı Körfezi genelinde kökenleri itibarıyla balık türlerinin; %85,7'si Atlanto-mediterran, %8,4'ü Endemik, %5,9'u Kozmopolit özelliktedir. Habitat

dağılımında %80,68'i demersal türlerden oluşmuştur. Pelajik türlerin (%19,32) %10,08'i epipelajik, %0.84'ü mezopelajik, %2.52'i batipelajik, %3.36'ı semipelajik özelliktedir (Çoker ve Akyol, 2012).

Ayrıca yapılan çalışmalarda Yenişakran Kıyısı'nın IUCN'nin kırmızı listesinde belirttiği Syngnathidae türlerinin önemli bir üreme merkezi olduğu halde, bu türlerin kıyıdağı larval beslenme alanı olan Posidonia yataklarının petrol türevli kirliliğe maruz kaldığına dikkat çekilmiştir (Çoker ve ark., 2011).

1960'lı yıllarda gelişmeye başlayan sanayileşme hareketi arazi kullanım oranlarını da fazlasıyla değiştirmiştir. 1990 ve 2005 yılları arasında uzaktan algılama sistemleri kullanılarak yapılan bir çalışmada bu değişiklikler belirtilmiştir. Buna göre; tarımsal alanlar %4.21, kıyısız sulak alanlar %10.42, yarı doğal alanlar %29.67 oranında azalmış buna karşın kent dokusu %32.22 artmıştır. Araştırmanın sonuçları sadece 15 yılda kullanım alanının ne kadar değiştiğini çarpıcı biçimde ortaya koymuştur (Keskin ve Nurlu, 2009).

Tüm bu değişimler hava, su, toprak olmak üzere bütün ekolojik ortamlara ve bu ortamlarda yaşamını sürdüren canlılara direkt ya da dolaylı olarak etkide bulunmaktadır. Göze çarpan ilk parametrelerden biri ortamdaki ağır metal yoğunluğudur. 1995 yılında İzmir körfezi'ne derelerden taşınan çeşitli kirlilik yükleri belirlenmiştir. O dönemde Aliğa Rafinerisi'nin yılda 149.822 kg kurşun yükünü denize deşarj ettiği belirlenmiş, bu rakama daha sonra giderek diğer işletmelerin de yükü eklenmiştir (Aslan, 1995).

1996-1998 yılları arasında Kıрма Mercan (*Pagellus erythrinus*) kas dokusunda yapılan çalışmada Cd değerleri düşük çıkmasına rağmen Hg, Pb ve Cr seviyeleri Akdeniz'deki diğer balıklarla paralel sonuçlar vermiştir. Bu durumda güney ege kıyılarındaki kirlilik tehdidi altında olduğu yorumu yapılabilir (Ulutarhan ve ark., 2005).

Doğu Ege Denizi'ndeki istasyonlardan örnekleme yapılan yine aynı türün kas, karaciğer ve gonadları arasındaki ağır metal konsantrasyonunun incelendiği bir çalışmada ise kaslarda kurşun seviyesi en yüksek Aliğa İstasyon'unda bulunmuş, gonadta ise en yüksek Hg, Cd, Pb and Zn seviyeleri yine Aliğa'da kaydedilmiştir. Cd seviyeleri de Edremit hariç diğer istasyonlardan oldukça farklı olduğu belirtilmiştir (Ulutarhan ve Kucuksezgin, 2007).

Daha sonra 2002 yılında yapılan araştırmada toprak ve akarsu sedimeninde bulunan ağır metal miktarları tarımsal aktivite için uygun olan miktarlardan hayli yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Çakmaklı Köyü'ndeki içme suyu artezyen suyunda ve fabrika atıksularında ve de hem inceleme alanında hem de tarımsal aktivitede kullanılan nehir sularında toksisite analizleri de yürütülmüştür. İçme suyunda yapılan analiz sonuçlarının kabul edilen değerlerin çok üstünde ve zararlı olduğuna dikkat çekilmiştir. Yapılan önceki çalışmalara göre ise ağır metal seviyesinin yıllara göre arttığını fabrika mesafesinden uzaklaştıkça da azaldığını belirtmişlerdir. Kızılçam meşe ve yosun örneklerinde yapılan ağır metal analizleri

de diğ er analizlere paralellik göstermiştir. Hava Kalitesi Önleme Tüzüğüne göre bu bölgelerdeki Fe, Zn, Pb ve Cu yüksek bulunmuştur (Sponza ve Karaoglu, 2002).

Çalışmanın sonuçlarına göre metal endüstri sahasının civarındaki toprak örneklerinde Fe, Ti, Mn, Cr, Ni, Cu, Pb, ve Zn tespit edilmiş, az oranda Mo ve Cu su örneklerinde bulunmuştur (Sponza ve Karaoglu, 2002).

Bakırçay Nehri üzerinde santral çıkış noktasındaki nehir suyu ölçümlerinde Cu ve Pb konsantrasyonlarının yüksek olduğu farkedilmiştir. Bunun sebebininse santralden kaynaklanan baca gazı emisyonu ve endüstriyel faaliyetler olduğu öngörülmektedir (Gündoğdu ve Turhan, 2004).

Çandarlı Körfezi sedimanında yapılan bir başka çalışmada Soma termik santralinden kaynaklanan girdiler nedeniyle olduğu düşünülen yüksek miktarda Cu, Pb, Zn birikimi tespit edilmiştir. Fe konsantrasyonunun yüksek bulunduğu bölgede ise demir-çelik işletmelerinin ve gemi söküm tesislerinin bölgeyi kontamine ettiği düşünülmektedir (Taş ve ark., 2007).

Kefal balıklarının karaciğ er enzim aktivitesinin biyogösterge olarak kullanıldığı çalışmada rafineri bölgesindeki istasyonlardan elde edilen sonuçlara göre kurşun miktarı değerlendirilmiş ve alanın bölgedeki gemi trafiğ i, rafineri atıkları ve kentsel atık kaynaklı aldığı kurşun miktarı ile kirlenmiş olduğu öne sürülmüştür. Rafineri bölgesinde ölçülen kurşun değerleri Türk Gıda Kodeksi'nin izin vermiş olduğu 1 mg/kg sınırını geçmektedir. Krom ölçümünde ise referans bölgede ölçülen değer 22,49 ng/g bulunurken rafineri bölgesi için ölçülen değer 113,14 ng/g'dır. Bu yapılan araştırmaya göre Aliğa Körfezi'nden elde edilen kefal balığı karaciğ erindeki erod enzimi aktivitesi ve CYP1A1'in immunokimyasal olarak belirlenimi PAH maruziyeti biyomarkerı olarak kullanılmıştır. Çalışmanın sonuçları Aliğa Körfezi'ndeki organik kirleticilerin özellikle de PAH ve klorlu hidrokarbonların varlığına kanıt olmuştur (Ulutaş, 2007).

2009'da Çandarlı Körfezi'nde yapılan örneklemede özellikle Petkim işletmesinin yakınındaki istasyondan alınan örneklerde Hg (6.3 mg/kg) Pb (138 mg/kg), Zn (358 mg/kg) değerinde bulunmuştur. Enrichment factor (emiyon etkeni) Cr'da (44.6 mg/kg) 1.5in altında bulunduğu için ş u anda bir tehlike arz etmediğ i ancak gelecek için riskin birikimle birlikte artacağı işaret edilmiştir. Hg, Pb ve Zn ise 1.5 üstünde emiyon etkenine sahip bulunmuş bu da insan kaynaklı kirliliğ in iş areti olarak gösterilmiştir (Pazi ve ark., 2010).

2009-2010 yılları arasında yapılan araştırmada elde edilen değerler Aliğa Kıyıları sedimentinin akut toksik PAH içerikleri tarafından kontamine edilmiş olma ihtimalinin yüksek olduğu gösterilmiştir (Neş er ve ark., 2012).

Bir başka çalışmada Çandarlı Körfezi'ndeki gemi emiyonları incelenmiştir. Buna göre körfezde yıllık; NO_x, 631.2 t/yıl, SO₂ 573.6 t/yıl, CO₂ 33,848.9 t/ yıl, HC 32.3 t/yıl ve PM 57.4 t/yıl olarak belirlenmiştir. Ölçümler gemiler demir atmış, manevra yaparken ve de seyir halindeyken olmak üzere üç katagoride yapılmış en yüksek değer demirlemiş durumdayken gözlenmiştir. En yüksek emiyonlar kargo

gemileri, petro-kimya gemileri ve likit gaz gemilerinden kaynaklanmaktadır (Deniz ve ark., 2010).

2009'da Ege Denizi Kıyıları sedimentinde yapılan çalışmada toplam butilkalay miktarları ölçülmüş ve mevsimsel farklılık gözlenmiştir. Denizcilik faaliyetleri açısından yoğun bölgenin hem yüksek hem de düşük değerleri ölçülmüştür. En yüksek bütülin seviyesi Aliğa'da gözlenmiştir. Özellikle halkın yüzmek için kullandığı plaj alanlarının OTC'lerle kontamine olduğu belirtilmiştir. Bu durumda yasadışı TBT bazlı boyaların kullanımından kaynaklı kontaminasyon olasılığı da düşünülmektedir (Yozukmaz ve ark., 2011).

2011'de Nemrut Körfezinde yapılan çalışmada ise belirlenebilecek düzeyde TBT bulunmamış, ölçülen inorganik kalayın ise aynı şekilde belirlenebilecek limitin altında olduğu gözlenmiştir (Ay ve ark., 2011).

1999-2000 yılları arasında yapılan midye (*Mytilus galloprovincialis*) örneklerinde gözlenen ^{210}Po ve ^{210}Pb radyonüklit değerleri oldukça yüksek gözlenmiştir (Uğur ve ark., 2002). 2004-2006 arasında farklı balık türlerinde yapılan örneklemede belirlenen radyonüklit değerlerinin sebeplerinden biri olarak bakırçay aracılığı ile Ege Denizi'ne yayılan Aliğa Petrokimya Endüstrisi ve Soma'daki kömür yakıtlı termik santralin olabileceği öngörülmüştür (Çatal ve ark., 2012). 2010 yılında planktonların kullanıldığı bir başka çalışmada ise endüstriyel bölgede daha yüksek oranda ^{210}Po bulunduğu belirtilmiştir (Arslan ve ark., 2010).

1.5. Amaç

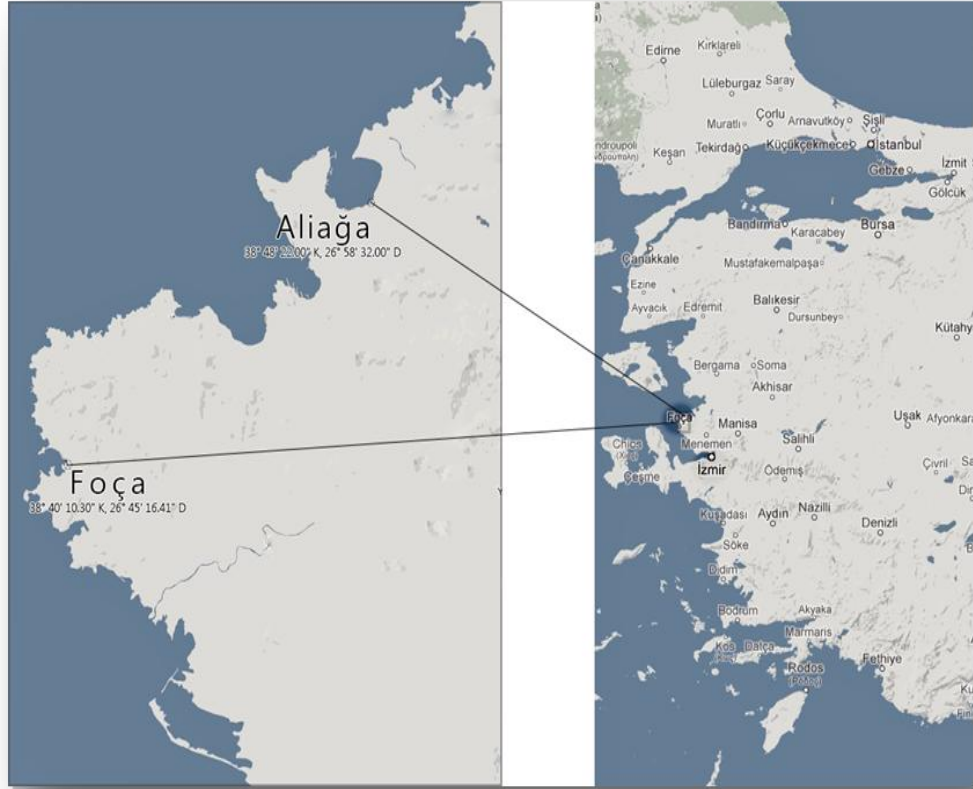
Etrafında bulunan bir çok sanayi tesisi nedeniyle kirlilik yükü her geçen gün artan Aliğa Körfezi ve çevresi, canlılar için yaşanamaz bir hale gelmektedir. Çeşitli ağır metal ve ksenobiyotiklerce kirlenen körfezde sucul yaşam da oldukça etkilenmiştir. Akuatik organizmaların bu kirlilikten etkilenerek besin zincirine dahil olması bütün canlılar açısından tehlike oluşturmaktadır. Metabolize edilemeyip biriken kirlenmeler besin zincirinin üst basamağındaki canlılara daha yüksek konsantrasyonlarda ulaşabilmektedir. Bu zincirin halkalarından biri olan *Mytilus galloprovincialis*'in (kara midye) biyomonitor olarak kullanılıp, oluşan ağır metal kirlilik yükünü hem ağır metal analizi yaparak hem de metalotionein gen ekspresyon seviyelerini ortaya koyarak belirlemek ve bunun ne gibi toksikolojik hasarlara yol açtığını oksidatif strese rol oynayan enzimatik parametreler ve apoptotik süreçte rol oynayan kaspaz gen ekspresyon seviyelerini belirleyerek ortaya koymak bu projenin kapsamı içerisindedir. Yapılacak bu araştırma sonucunda Aliğa Körfezindeki kirliliğin canlılık üzerine ne kadar etkisi olup olmadığı anlaşılacak ve bölgede söz konusu olan çevresel tahribatın sonuçlarından biri olarak hem akademik hem sosyal alanda kendisinden sonra gelecek çalışmalara bir öncü olacaktır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Örneklerin temini

Araştırma Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Balıkçılık ve Su Ürünleri Genel Müdürlüğü'nün (Sayı: 83364995-67852565/140.03.03-3040) izni ve Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü'nün (Sayı:80202595-488.04/358) izni ile gerçekleştirilmiştir. Bu izinler doğrultusunda Ekim-Kasım ayları içinde Aliğa Balıkçı Barınağı istasyonu ve Eski Foça istasyonundan 50'şer adet midye toplanmıştır (Şekil 2.1.). Seçilen midyelerin en, boy ve ağırlıklarının yaklaşık olarak birbirlerine yakın olmalarına dikkat edilmiştir.



Şekil 2.1. Aliğa ve Eski Foça Balıkçı Barınağı istasyonları

Midyeler deniz suyuyla laboratuvara getirilmiş ve diseksiyon işlemine kadar +4 °C'de bekletilmiştir (Şekil 2.2).



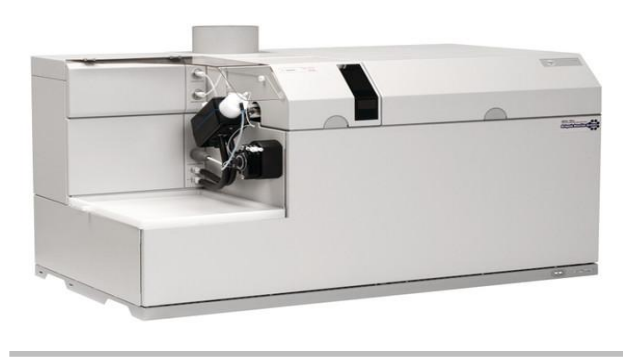
Şekil 2.2. Toplanan midyelerin genel görünümü

2.2. Metot

2.2.1. Ağır metal analizi

Ağır metal analizi için Ege Üniversitesi, İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma-Uygulama Merkezi'nde (ARGEFAR) bulunan ICP-MS cihazı (Şekil 2.3) kullanılmıştır. Disekte edilen solungaç ve hepatopankreas doku örnekleri (her istasyon için 10'ar adet) analiz edilinceye kadar $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilmiştir. Analiz sırasında cihaz operatörüne teslim edilmiş ve Environmental Pollution Agency (EPA) Method 3051A' ya göre ağır metal analizi cihaz operatörü tarafından yapılmıştır.

Arsenik, Kadmiyum, Civa, Kurşun, Vanadium, Krom, Mangan, Kobalt, Nikel, Bakır, Çinko, Selenyum, Antimon, Baryum ağır metallerinin analizi için 0.300 gr doku mikrodalga kabında tartılıp üzerine 3 ml nitrik asit eklenmiştir. Daha sonra kaplar kapatılarak mikrodalga cihazına yerleştirilip çözündürme işlemine başlanmıştır. Bu işlemde sonra kaplar oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. Soğutma işleminden sonra örneklere mezür yardımıyla 30 ml'ye tamamlanacak şekilde saf su eklenmiştir ve ICP-MS cihazında analiz edilmiştir. Analiz sürecinde 100 kat seyreltilen örneklerin sonuçları 100 ile çarpılıp $\mu\text{g/g}$ ' a dönüştürülmüştür.



Şekil 2.3. ICP-MS sistemi

2.2.2. Enzimatik analizler

2.2.2.1. Homojenizasyon

Analiz anına kadar -80°C 'de bekletilen örnekler çözündürülür ve tartılır. Tartılan örneklerin her 1 gramı için 3ml olacak şekilde homojenizasyon tamponu eklenir. Homojenizatör ile kuru buz içinde parçalanan örnekler tekrar ependorflara konur ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dk 15000 g'de santrifüjlenir. Oluşan süpernatant enzimatik analizler için alikuatlara ayrılır ve analiz anına kadar -80°C 'de muhafaza edilir.

Kullanılan reaktifler ve malzemeler;

Homojenizasyon tamponu;

- 100 mM'lık fosfat tamponundan 12,5 ml
- 10 mM EDTA 2,5 ml
- MgCl_2 0,0255g
- DTT 125 μl
- PMSF 125 μl ve dH_2O 9,75 ml eklenerek tampon hazırlanır.

2.2.2.2. Total protein tayini

Örneklerin toplam protein tayini yüksek hassasiyetli Coomassie Blue (Bradford) yöntemi ile yapılmıştır. Yöntemin esası proteinlerin asidik ve bazik grublarının organik boya ile etkileşmesi sonucunda oluşan renk değişimlerinin kolorimetrik olarak ölçümüne dayanır. Maksimum absorbanans 595 nm dalga boyunda gözlemlenir (Bradford, 1976). Homojenize edilen örnekler 1/100 oranında seyreltilmiştir. Microplate kuyucuklarına standart ve örneklerden 12,5 μl koyulur. Kör için aynı miktarda dH_2O kullanılır. Bütün kuyucuklara 237,5 μl Bradford reagenti eklenerek 250 μl 'ye tamamlanır ve oda ısısında 10 dakika karanlıkta inkübe edilir. Daha sonra 595 nm dalga boyunda microplate reader'da okutulur.

Kullanılan reaktifler ve malzemeler;

Bradford reagent;

- 0.04 g Coomassie Brilliant Blue (G 250) tartılır ve 50 ml (%99) etanol ile çözdürülür.
- Üzerine %85'lik fosforik asit eklenir ve karıştırılır.
- 800 ml distile su eklenir.
- Whatman no:1 filtresi ile süzülür
- Distile su ile bir litreye tamamlanır.

Bradford standartları;

2mg/ml stok için 0,002 BSA tartılır 1 ml distil su ile seyreltilir

- 0.02 mg/ml standart: 2 µl stok + 198 µl dH₂O
- 0.04 mg/ml standart: 4 µl stok + 196 µl dH₂O
- 0.08 mg/ml standart: 8 µl stok + 192 µl dH₂O
- 0.16 mg/ml standart: 16 µl stok + 184 µl dH₂O
- 0.20 mg/ml standart: 20 µl stok + 180 µl dH₂O

kullanılarak standartlar oluşturulur.

2.2.2.3. Glutasyon-S-Transferans (GST; EC 2.5.1.18)

Glutasyon-S-Transferans (GST) hücrel antioksidan savunmasıyla ilgili olarak biotransformasyonun faz II aşamasına dahil olan çok fonksiyonlu bir enzim ailesidir. Oksidatif stres sonucu oluşan metabolitlerin detoksifikasyonunda rol oynar. Substrat olarak bir sitozolik protein olan 1- chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) ve glutasyonun redüklenmiş formu GSH kullanılmıştır. Örnek kuyucuklarına 175 µl, kör kuyucuklarına ise 187,5 µl distil su konulmuştur. Bütün kuyucuklara 50 µl kombinasyon tamponu ve 12,5 µl CDNB eklenmiştir. Son olarak örnek kuyucuklarına 12,5 µl örnek eklenmiş ve 340 nm dalga boyunda kinetik olarak 10 dakika boyunca okutulmuştur.

Kullanılan reaktifler ve malzemeler;

- 1) Kombinasyon tamponu; 0,0308 gr GSH 20 ml 50 mM'lık fosfat tamponunda çözdürülür.
- 2)CDNB; 0,0202 gr CDNB 3 ml etanolde çözdürülür. Daha sonra üzerine 2 ml distil su eklenir (Karışımın siyah bir şışede hazırlanması gerekmektedir.).

2.2.2.4. Superoksit Dismutaz (SOD: EC 1.15.1.1)

Süperoksit anyonlarını (O₂) hidrojen peroksit ve oksijene çeviren süperoksit dismutaz enzimi önemli bir antioksidatiftir. Bu enzim aktivitesini ölçmek için SOD Assay Kit kullanılmıştır. WST-1 substratı (suda çözünebilir bir tetrazolyum boya) ve ksantin oksidaz enzim ile yüzde reaksiyon inhibisyon oranı belirlenmiştir. 3 farklı kör hazırlanır. Birincisine 20 µl dH₂O, 200 µl WST, 20 µl enzim solüsyonu, ikincisine 20 µl örnek, 200 µl WST, 20 µl dilüsyon tamponu, üçüncüsüne ise 20 µl

dH₂O, 200 µl WST, 20 µl dilüsyon tamponu eklenir. Örnek kuyucuklarına ise 20 µl örnek, 200 µl WST, 20 µl enzim solüsyonu eklenir. 37°C'de 20 dakika inkübe edildikten sonra 450 nm'de okutulur. Total protein miktarına göre normalize edilerek sonuçlar sunulur.

Kullanılan reaktifler ve malzemeler;

- 1) SOD Assay Kit
- 2) WST solüsyonu; 1ml WST'ye 19 ml tampon solüsyonu eklenir.
- 3) Enzim solüsyonu; Enzim 5 sn. Santrifüj edilir. 15 µl enzim solüsyonu 2,5 ml dilüsyon tamponu ile seyreltilir.

2.2.2.5. Asetilkolin Esteraz (AChE) enzimi tayini

Alınan dokulardan AChE tayini için spektrofotometrik bir ölçüm kullanılmıştır. Asetilkolinler, kolinesteraz (ChE) tarafından yağ asitleri ve tiokoline hidrolizlenirler. Tiokolinin oluşum oranı, sarı bir anyon oluşturan 5,5'-ditiobis-(2-nitro-benzoik asit)- DTNB-, 5-tio-2-nitrobenzoat ve diğer ürünlerden oluşan tiol grubunun sürekli reaksiyonuyla ölçülebilmektedir. Sarı anyonun oluşum oranı 405 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülebilir.

Kullanılan reaktifler ve solüsyonlar

- 1) Sorensen fosfat tamponu; (67 mmol/l 37° C pH 7,4)

150 ml saf su içerisinde; -1,919 gr Na₂HPO₄.2H₂O ve -0,348 gr. KH₂PO₄ çözüldü. 200ml'ye tamamlanıp pH'ı kontrol edildi.

- 2) Tamponlanmış Ellman's reaktifi

100 ml tampon (1) çözeltisi içinde 0,0107 gr DTNB çözülür.

Koyu renkli şişe içinde +4° C'de en az bir gün saklanır

- 3) Asetilkolin klorür

100 ml distil su içinde 0,0155 gr asetilkolin klorür çözülür.

-80°C'den çıkartılan doku homojenatları çözdürüldü ve microplate içine solüsyonlarla beraber yüklendi.

	Örnek	Kör
Sorensen Tamponu	224 µl	232 µl
DTNB solüsyonu	8 µl	8 µl
Asetilkolin klorür solüsyonu	8 µl	-
Örnek	1,6 µl	1,6 µl
Toplam hacim	241,6	241,6 µl

Şekil 2.4. AChE aktivite tayini için gerekli solüsyon miktarları

405 nm'de 5 dakika aralıkla ikişer okuma ELİSA plate reader aracılığı ile yapılmıştır.

Hesaplama:

$$U/ml = \frac{\Delta OD}{t} \times \frac{Vt}{Vö} \times 13,6$$

2.2.2.6. Katalaz enzim aktivitesi tayini (CAT: EC 1.11.1.6)

Kullanılan kimyasallar,

- 1) 0,1 mM EDTA'lı 50 mM Na-P tamponu, pH: 7.0

Hazırlanışı;

0,5 M dibazik sodyum fosfat hazırlamak için 0,071 gr tartılıp 100 ml'ye tamamlanır.

0,5 M monobazik sodyum fosfat hazırlamak için 0,069 gr tartılır ve 100 ml'ye tamamlanır.

Dibazik çözeltiliye monobazik çözeltili titre edilerek pH 7.0 olarak ayarlanır.

Ardından 0,001 M EDTA bulunması için toplam solüsyonun hacmine göre tartılır.

- 2) %3'lük H₂O₂

- 3) 9125 µl tampon ve 875 µl stok H₂O₂ karıştırılır.

240 nm'de kuvars küvetlerde 180 saniye kinetik olarak okutulur

	Kör (µl)	Örnek (µl)
50 mM Na-P buffer with 0.1 mM EDTA, pH:7.0	920.0	920.0
dH ₂ O	10.0	–
Sample (diluted)	70.0	70.0
3 % H ₂ O ₂	–	10.0

Şekil 2.5. Katalaz aktivite tayini için gerekli solüsyon miktarları

2.2.2.7. Lipit peroksidasyonu

Solungaç ve hepatopankreas doku örneklerinden lipit peroksidasyonu belirlemesi için tiyobarbitürik asit reaktif maddeler içeren spektrofotometrik bir yöntem kullanılmıştır (Okhawa et al., 1979). Doku örnekleri % 0,1'lik trikloroasetik asit (TCA) çözeltilisiyle 1:6 oranında homojenize edilmiştir. Homojenizasyondan sonra tüpler 10000 rpm'de 5 dk +4°C'de santrifüjlenmiştir. Daha sonra süpernatanttan 250 µl ependorflara alınmış üzerine 1 ml reaksiyon karışımı eklenerek 95 °C su banyosunda 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Örnek

eklenmeyen kör de aynı şekilde inkübasyona bırakılır. Bu aşamadan sonra 10000 rpm'de 15 dk bir santrifüj aşamasından daha geçirilir. Süpernatanttan 1 ml küvetlere alınıp 532 nm ve 600 nm'de absorbansı ölçülür.

Kullanılan reaktifler ve malzemeler:

- Reaksiyon karışımı; %10 TCA ve % 0,5 TBA içerir

2.3.3. Gen Expresyonu

2.3.3.1. Total RNA izolasyonu prosedürü

Toplanan midyeler laboratuara getirildikten sonra hızla açılmış, solungaç ve hepatopankreas dokuları ayrılmıştır. Daha sonra TriPure Isolation kiti (Roche, Cat No 11 667 157 001) kullanılarak ve aşağıdaki protokol takip edilerek solungaç ve hepatopankreas dokularından ayrı ayrı total RNA izolasyonu yapılmıştır (her istasyon için 3 örnek);

1. Her örnek için steril polipropilen santrifüj tüpüne 1 ml TriPure Isolation Reagent kondu ve tüp içine 50 mg doku eklendi
2. Cam-teflon homojenizatör yardımı ile dokular homojenize edildi ve nükleoprotein kompleksinin ayrılması için homojenatlar 25 °C'de 5 dk inkübe edildi
3. Her örneğe 0.2 ml olacak şekilde kloroform eklendi. Tüplerin kapağı kapatıldı ve 15 sn güçlü bir şekilde çalkalandı. Daha sonra örnekler 25 °C'de 15 dk inkübe edildi
4. Faz ayırımı yapmak için +4°C'de 12000g'de 15 dk santrifüj yapıldı.
5. Santrifüj sonrasında 3 faz oluştu (renksiz üst sulu faz RNA izolasyonu için kullanıldı) ve renksiz üst faz polipropilen santrifüj tüpüne aktarıldı
6. Bu fazdan RNA' nın çöktürülmesi için 0.5 ml olacak şekilde izopropanol eklendi. Tüplerin kapağı kapatıldı ve birkaç kez ters-yüz edildi. Daha sonra örnekler 25 °C'de 10 dk inkübe edildi
7. +4°C'de 12000 g' de 10 dk santrifüj yapıldı ve süpernatant atıldı
8. Tüplere 1 ml %75 etanol eklendi ve örnekler vorteksenerek etanolde yıkandı
9. +4°C'de 7500 g' de 5 dk santrifüj yapıldı ve süpernatant atıldı
10. Hava akımı ile RNA' dan etanol uzaklaştırıldı ve RNA pelleti 50 µL RNaz-free su ile resüspande edildi. RNA bir pipet yardımı ile çözüldü, 10 dk 55-60 °C'de inkübe edildi ve kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı.

Total RNA'lar izole edildikten sonra RNA izolasyon kontrolü için Nano-Drop cihazında ölçüm yapılmış ve daha sonra cDNA sentez aşamasına geçilmiştir

2.2.3.2. Total RNA'dan cDNA sentezi

Real-Time PCR cihazında gen ekspresyon profilinin incelenebilmesi için elde edilen total RNA'lardan cDNA sentezlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle cDNA sentezi, cDNA sentez kiti, Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Cat No 04 379 012 001) kullanılarak gerçekleştirildi kullanılarak aşağıdaki protokole göre gerçekleştirilmiştir;

1. Kullanılan tüm kitler çalışma öncesinde çözüldü ve birkaç sn santrifüjledi
2. Steril PCR tüplerine Template primer karışımı hazırlandı: 9.4 µl Total RNA ve 2 µl Random Hexamer primer (600 pmol/µl)
3. Template primer karışımını denatüre etmek için tüpler 10 dk 65 °C' de bekletildi ve hemen buz üzerine alındı
4. Tüplere final hacim 20 µl olacak şekilde; 4 µl Reaksiyon tamponu, 0.5 µl RNaz inhibitörü, 2 µl Deoksiniükleotid karışımı (dNTP), 1.1 µl Revers Transkriptaz enzimi ve 1 µl DDT eklendi
5. Karışım dikkatlice karıştırıldı (birkaç sn santrifüjlendi) ve termal cycler'a kondu
6. Revers transkriptaz reaksiyonu için 25 °C'de 10 dk'yı takiben 55°C'de 30 dk inkübasyon gerçekleştirildi.
7. 85 °C'de 5 dk bekletilerek Revers transkriptaz enzimi inaktive edildi ve tüpler soğuk buz üzerine alınarak reaksiyon durduruldu. cDNA içeren tüpler kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

2.2.3.3. Real-Time PCR ile gen ekspresyonunun belirlenmesi

Real-Time PCR cihazında gen ekspresyon profilinin incelenebilmesi için LightCycler SYBR Green (Roche, Cat no: 03 003 230 001) kullanılarak aşağıdaki protokol uygulanmıştır;

1. Dokuz gen (Beta actin, MT10, MT20, Casp-2, Casp-3/7-1, Casp-3/7-2, Casp-3/7-3, Casp-3/7-4, Casp-8) için 9 tüp hazırlandı.
2. PCR karışımı hazırlandı (1 tüp için): 11 µl dH₂O, 1.6 µl Mg⁺², 0.2 µl F primer, 0.2 µl R primer ve 2 µl SYBR Green I enzim karışımı.
3. LightCycler kapiller tüpleri soğuk akü üzerine yerleştirildi ve 18 µl PCR karışımı kapiller tüplere aktarıldı.
4. Üzerine 1.5 µl cDNA ilave edildi ve kapakları kapatıldı.
5. Kapiller tüpler 5 sn 700 g' de santrifüjlendi.
6. Kapiller tüpler Roche 1.5 LightCycler cihazına yerleştirildi. LightCycler koşulları:

Denatürasyon:	95 °C	10 dk	
Amplifikasyon:	95 °C	10 sn	} 45 döngü
	60 °C	10 sn	
	72 °C	10 sn	
Melting:	95 °C	15 sn	} 1 döngü
	60 °C	10 sn	
	95 °C	10 sn	
Soğutma:	40 °C	30 sn	

Kullanılan Primer Sekansları aşağıda verilmiştir;

Kontrol gen:

Beta Actin Forward 5'AACCGCCGCTTCTTCATCTTC
Reverse 5'TACCACCAGACAAGACGG

Metallotionein genleri:

Mt10 Forward 5'GGGCGCCGACTGTAAATGTTC
Reverse 5'CACGTTGAAGGYCCTGTACACC

Mt20

Forward 5'TGTGAAAGTGGCTGCGGA
Reverse 5'GTACAGCCACATCCACACGC

Apoptozisin belirlenmesi için Kaspaz enzim genleri:

Casp-2 Forward 5'GATATATGACAAGGGTGGCAATG
Reverse 5'GACTTTACAGCATCCAGGACATC

Casp-3/7-1

Forward 5'GATCTTGGAAGTGGTGTAGAACG
Reverse 5'CACTGCTAGGAAATCTGCTTCAT

Casp-3/7-2

Forward 5'CCTGTAGAGGAGGAGGATTAGGAC
Reverse 5'GGAAGGATCCATAACCAGCAG

Casp-3/7-3

Forward 5'CAATGTGTAAAAACGAGAGACATTG
Reverse 5'GTTAGTATATGCCCACTGTCCATTC

Casp-3/7-4

Forward 5'GATTTCCCTTGAAGTCTTTTCTACGTC
Reverse 5'AATATCATCGTCTTCCCTGGATGTTAT

Casp-8

Forward 5'CCCAACCAGTAGTAACACCAGAC
Reverse 5'GTATGAACCATGCCCTATATCA

Analiz sonunda LightCycler cihazından C_t değerleri elde edilmiş ve $\Delta\Delta C_t$ Metodu kullanılarak elde edilen verilerden gen ekspresyon düzeyleri hesaplanmıştır (Livak and Schmittgen, 2001).

2.2.4. Mikronükleus tayini

Midyelerin adductor bölgesinden sıringe yardımıyla alınan 100 ml hemolenf örneği lamlara damlatılmıştır. Daha sonra humid chamberda 30 dakika, ardından

saf metanol içeren şalelerde 20 dakika bekletilip fiksasyon sağlanmıştır. Boyama için %10'luk Giemsa solüsyonu hazırlanmış 20 dakika boyunca boyanması beklenmiştir. Daha sonra iki kez yıkama bufferı ile 5'er dakika muamele edilip kurutulmaya bırakılmıştır. 100x'lik büyütme ile preparatlardan hücrelerin granüler, agranüler, bud, mikronükleus, oligo-binükleus özelliklerine göre sayım yapılmıştır.

2.2.5. Histopatoloji

2.2.5.1. Boyama öncesi işlemler:

Alınan örnekler % 4'lük Paraformaldehit içerisinde 1 gece bekletilmiştir. Daha sonra aşağıdaki uygulamalar sırasıyla gerçekleştirilmiştir.

Akarsuda 1 gece bekletme
 %80'lik Alkolde 2 saat bekletme
 % 95'lik Alkolde 2 saat bekletme
 % 95'lik Alkolde 4 saat bekletme
 % 95'lik Alkol çözeltisinde 1 gece bekletme
 % 100'lük Alkol içerisinde 2 saat bekletme
 %100'lük Alkol içerisinde 2 saat bekletme
 %100'lük Alkol içerisinde 2 saat bekletme
 Alkolden çıkartılan örnekler havada kurutmaya bırakılmıştır.

Kuruyan örnekler, şeffaflaşana kadar 30 dk' lık 3 defa Xylol'den geçirilmiştir. Parafine koyulan örnekler, 58 C°'lik etüvde 1 gece bekletilmiştir.Parafin yenilenmiş ve 2 saat beklenmiştir.Tekrar parafin yenilenmiş ve 2 saat beklenmiştir.Son işlem olarak örnekler parafine gömülmüştür.

Buzdolabında donmaya bırakılan örnekler kesim için çıkarılmış ve bloklar traşlanmıştır (trimleme). Bloklar sırasıyla mikrotoma yerleştirilmiştir. Kesit alındıktan sonra lamlara alınan örnekler havada kurutulmuştur. Boyama öncesi 58 C°'lik etüvde 1.5 saat tutulmuştur.

2.2.5.2. Hemotoksilen -Eozin boyama

Etüvden çıkarılan örnekler Xylol içerisine konmuş, 58 C°'lik etüvde 20 dakika beklenmiştir. Xylol'den çıkarılıp havada kurutulmaya bırakılmıştır.

% 100'lük Alkol içerisinde 2 dakika
 % 100'lük Alkol içerisinde 2 dakika
 % 95'lik Alkol içerisinde 2 dakika
 %80'lik Alkol içerisinde 2 dakika
 Distile suda 5 dakika
 Hemotoksilen boyasında 2.5 dakika
 Akar sudan geçirme 5 dakika
 Asit Alkol içerisinde pembe renk oluşana kadar bekletilmiştir.
 Akar sudan geçirilmiştir.
 Amonyaklı suda mor renk olana kadar bekletilmiştir.

Akar sudan geçirilmiştir.
Distile suda 5 dakika bekletilmiştir.
Kurutmaya bırakılmıştır.
Eozin boyasında 2.5– 3 dakika bekletilmiştir.
% 95'lik Alkol içerisinde 2 dakika bekletilmiştir.
% 100'lük Alkol içerisinde 2 dakika bekletilmiştir.
% 100'lük Alkol içerisinde 2 dakika bekletilmiştir.
Kurutmaya bırakılmıştır.
Xylol içerisinde 3 kez 10'ar dakika bekletilmiştir.
Havada kurutmaya bırakılmıştır.
Entellan ile lamel kapatılıp 10 gün beklenmiştir.

2.2.5.3. Apoptozis'in belirlenmesi

Karaciğer ve solungaç hücrelerinde apoptoz varlığı Promega DeadEnd™ Colorimetric Apoptosis Detection System (TUNEL) (Promega Corp. Madison, USA, Cat No: G7130) (O'Brien et al., 1998) kiti ile belirlenmiştir. TUNEL için, oda sıcaklığında 25 dak. süre ile %4'lük paraformaldehitte fikse edilecek kesitler PBS'de yıkanacak ve lam başına 20µg/ml Proteinase K solutionu ile permeabilize edilecektir. Kesitler, 37°C'de 60 dak boyunca biotinlenmiş nükleotid ve terminal deoxynucleotidyl transferase (rTdT) içeren reaksiyon karışımı ile inkübe edilecektir. Süre sonunda sodyum klorür-sodyum sitrat tamponu (SSC) ve PBS ile yıkanacaktır. Her lama Streptavidin HRP (horseradish peroxidase) eklenecek ve oda sıcaklığında 30 dak. inkübasyona bırakılacaktır. Lamalar daha sonra diaminobenzidine system (DAB) ile boyanacak ve apoptotik hücrelerin varlığı açısından incelenecektir.

3. BULGULAR

3.1. Midyelerin Ağırlık ve Boy Ortalamaları

Toplanan midyelerin toplam doku ağırlıkları hassas terazi ile, boy ve enleri ise cetvelle ölçülmülmüş ve ortalamaları alınmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Örnekleme yapılan midyelerin boy, en ve ağırlık ortalamaları

	Boy (cm)	En (cm)	Ağırlık (gr)
Aliğa	4,3182 ± 0,0961	2,7364 ± 0,0907	2,8236 ± 0,2456
Foça	4,7882 ± 0,1336	2,9706 ± 0,1021	2,8571 ± 0,1243

3.2. Spektrometrik Analizler

3.2.1. Ağır metal analizi bulguları

Her istasyondan 10 adet örneklenen midyelerin hepatopankreas ve solungaç dokularındaki ağır metal miktarı Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma-Uygulama Merkezi (ARGEFAR)'inde bulunan ICP-MS cihazıyla gerçekleştirilmiştir. Analizler Environmental Pollution Agency (EPA) Method 3051A' ya göre yapılmıştır.

14 farklı ağır metal içeriğinin miktarları istasyon ve dokusal farklılıklarına göre Çizelge 3.2.'de gösterilmiştir.

3.3. Biyokimyasal Analizler

3.3.1. Total protein tayini bulguları

Dokulardaki toplam protein yüksek hassasiyetli Coomassie Blue (Bradford) yöntemi ile belirlenmiştir. Temel biyokimyasal işlemlerde spesifik aktivite tanımı için biyolojik örneğin protein miktarından yararlanır (aktivite/mg protein). Aliğa istasyonundaki örneklerin toplam protein miktarının Foça'dakilere oranla daha yüksek olduğu gözlenmiş, değerler Çizelge 3.3. 'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. Aliğa ve Foça istasyonlarından alınan örneklerin toplam protein miktarı (mg/ml)

Total Protein mg/ml	Solungaç	Hepatopankreas
Aliğa	6,5526 ± 0,5069	16,6187 ± 2,0073
Foça	5,2126 ± 0,7891	11,1628 ± 2,0624

Çizelge 3.2. Aliğa ve Foça istasyonlarında toplanan midyelerdeki ağır metal miktarları($\mu\text{g}/\text{kg}$ kuru ağırlık)

Ağır Metaller	Hepatopankreas		Solungaç	
	Foça	Aliğa	Foça	Aliğa
Arsenik	9,59 \pm 2,18	7,57 \pm 0,48	3,45 \pm 0,37	3,99 \pm 0,06
Kadmiyum	0,34 \pm 0,11*	0,09 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	0,08 \pm 0,05
Cıva	0,05 \pm 0,008*	0,02 \pm 0,003	0,01 \pm 0,005*	0,00 \pm 0,00
Kurşun	2,34 \pm 0,64*	0,49 \pm 0,13	0,36 \pm 0,08	0,54 \pm 0,13
Vanadium	1,46 \pm 0,36*	0,30 \pm 0,18	0,04 \pm 0,01	0,04 \pm 0,006
Krom	1,51 \pm 0,33*	0,22 \pm 0,14	0,11 \pm 0,08	0,08 \pm 0,01
Mangan	9,64 \pm 2,18*	1,61 \pm 0,45	0,97 \pm 0,31	1,34 \pm 0,15
Kobalt	0,71 \pm 0,20*	0,15 \pm 0,04	0,02 \pm 0,006	0,03 \pm 0,01*
Nikel	2,67 \pm 0,70*	0,54 \pm 0,12	0,44 \pm 0,47	0,12 \pm 0,06
Bakır	15,51 \pm 6,68	7,06 \pm 0,93	10,47 \pm 5,23	14,08 \pm 5,5
Çinko	22,4 \pm 3,8	24,3 \pm 4,99	12,28 \pm 4,56	38,55 \pm 16,53
Selenyum	1,06 \pm 0,17	0,86 \pm 0,17	1,20 \pm 0,2	1,79 \pm 0,19
Antimon	0,04 \pm 0,01*	0,007 \pm 0,001	0,002 \pm 0,001	0,0015 \pm 0,001
Baryum	3,59 \pm 1,05*	0,1 \pm 0,2	0,16 \pm 0,08	0,09 \pm 0,03

* Aliğa istasyonuna göre istatistiksel olarak önemli fark.

3.3.2. Glutatyon-S-Transferans (GST; EC 2.5.1.18) seviyesi bulguları

Bu çalışmadaki istasyonlar arasında GST seviyelerinde anlamlı fark gözlemlenmiştir (Çizelge 3.4.).

Çizelge 3.4. Örneklerde belirlenen GST aktivitesi (nmol/min/mg)

GST (nmol/min/mg)	Aliğa	Foça
Hepatopankreas	0.0726 \pm 0.02	0.7039 \pm 0.57
Solungaç	0.4148 \pm 0.10*	3.4013 \pm 2.40

*Foça'ya göre istatistiksel olarak önemli fark ($p>0.05$)

3.3.3. Superoksit Dismutaz (SOD: EC 1.15.1.1) aktivitesi bulguları

Bu enzim aktivitesini ölçmek için SOD Assay Kit (Fluka 19160-1KT-F) kullanılmıştır. Gruplar ve istasyonlar arasında önemli bir fark elde edilmemiştir (Çizelge 3.5.).

Çizelge 3.5. Örneklerde belirlenen SOD aktivitesi (mol/min/mg)

SOD (mol/min/mg)	Aliağa	Foça
Hepatopankreas	0.0372 ± 0.006	0.0362 ± 0.012
Solungaç	0.0451 ± 0.018	0.0853 ± 0.028

3.3.4. Katalaz (CAT: EC 1.11.1.6) aktivitesi bulguları

Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.6.'da gösterilmiştir. Gruplar ve istasyonlar arasında önemli bir fark elde edilmemiştir

Çizelge 3.6. Örneklerde belirlenen CAT aktivitesi (mol/min/mg)

CAT (mol/min/mg)	Aliağa	Foça
Hepatopankreas	0.00014 ± 0.00005	0.00020 ± 0.00004
Solungaç	0.00072 ± 0.00034	0.00036 ± 0.00007

3.3.5. Lipid Peroksidasyonu seviyesi belirlenmesi

Analizler sonucunda Aliağa'da Foça'ya oranla istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilmiştir (Çizelge 3.7.).

Çizelge 3.7. Örneklerde belirlenen TBARS miktarı (nmol)

TBARS (nmol)	Foça	Aliağa
Hepatopankreas	6.68 ± 2.48	12.74 ± 1.47*
Solungaç	4.40 ± 0.87	11.34 ± 1.49*

*Foça'ya göre istatistiksel olarak önemli fark (p>0.05)

3.3.6. Asetilkolinesteraz (AChE; EC 3.1.1.17) aktivitesi belirlenmesi

Projede AChE enzim aktivitesi Ellman yöntemi ile ölçülmüştür (Ellman et al., 1961). Elde edilen değerler Çizelge 3.8.'de gösterilmiştir. Gruplar ve istasyonlar arasında önemli bir fark elde edilmemiştir.

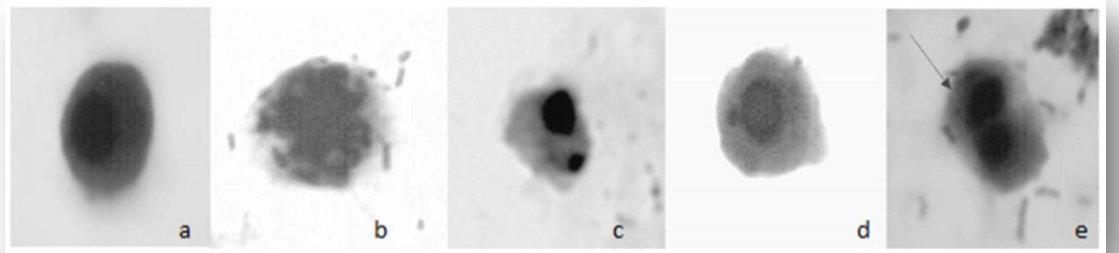
Çizelge 3.8. Aliğa ve Foça örnekleri nde belirlenen AChE aktivitesi

AChE ($\mu\text{mol/dak}$)	Foça	Aliğa
Hepatopankreas	0.1138 \pm 0.049	0.2202 \pm 0.104
Solungaç	0.1902 \pm 0.136	0.2928 \pm 1.34

3.4. Genotoksisite Belirlenmesi

3.4.1. Mikronükleus analizi bulguları

Mikronükleus testi kromozomal hasarın bir göstergesi olarak mutajenler ve klastojenlerin genotoksik aktivitelerinin belirlenmesinde hassas bir biyoindikatör olarak kullanılmaktadır (Merish et al., 1996; Venier et al., 1997). Hücre bölünmesinden sonra kromozom parçaları ya da kromozomun tümünün yavru hücreye çekirdeğe katılmadan aktarılmasının belirlenmesine dayalı bir testtir. Mikronükleuslar hücre bölünmesi sırasında kromozomal kırılma veya anöploididen kaynaklanan küçük, intrasitoplazmik kromotinlerdir. Mikroskopla tayin sırasında granüllü, granülsüz, mikronükleuslu, bud (tomurcuklu), binükleus ve oligonükleuslu hücreler tespit edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Gözlemlenen nükleus çeşitleri; a) granülsüz hücre, b) granüllü hücre, c) mikronükleuslu hücre, d) bud, e) binükleus

Elde edilen bulgularda Aliğa istasyonundan alınan midyelerin Foça istasyonundakilere göre daha fazla kromozomal hasara uğradıkları belirlenmiştir (Çizelge 3.9.).

Çizelge 3.9. Örneklenen midyelerin kromozomal hasar çeşit ve sayıları

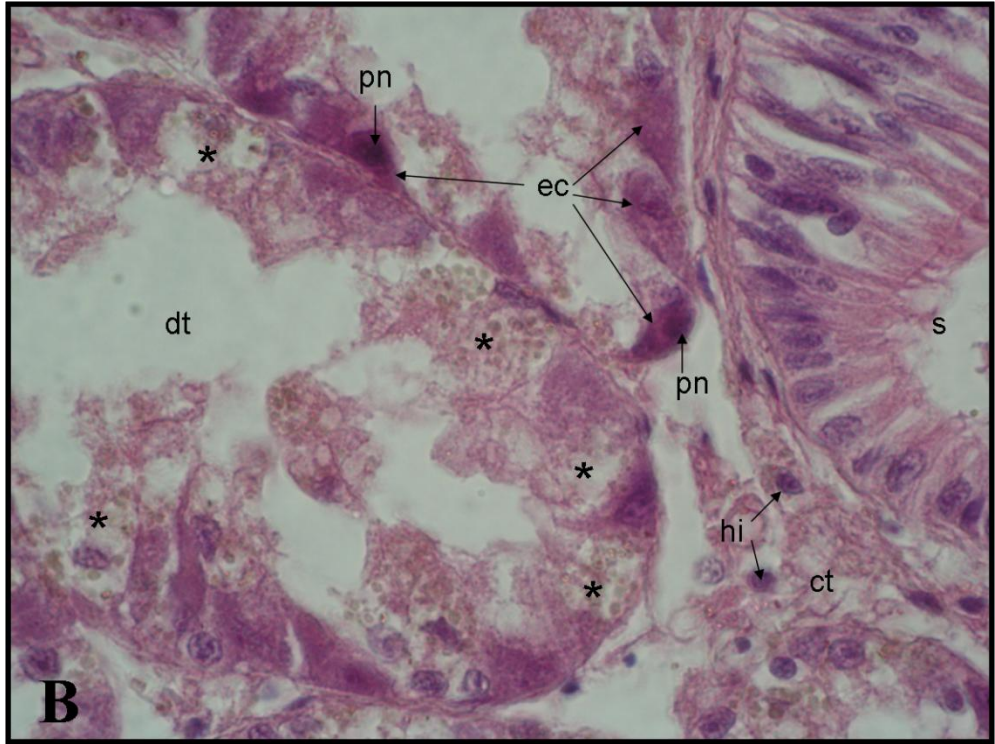
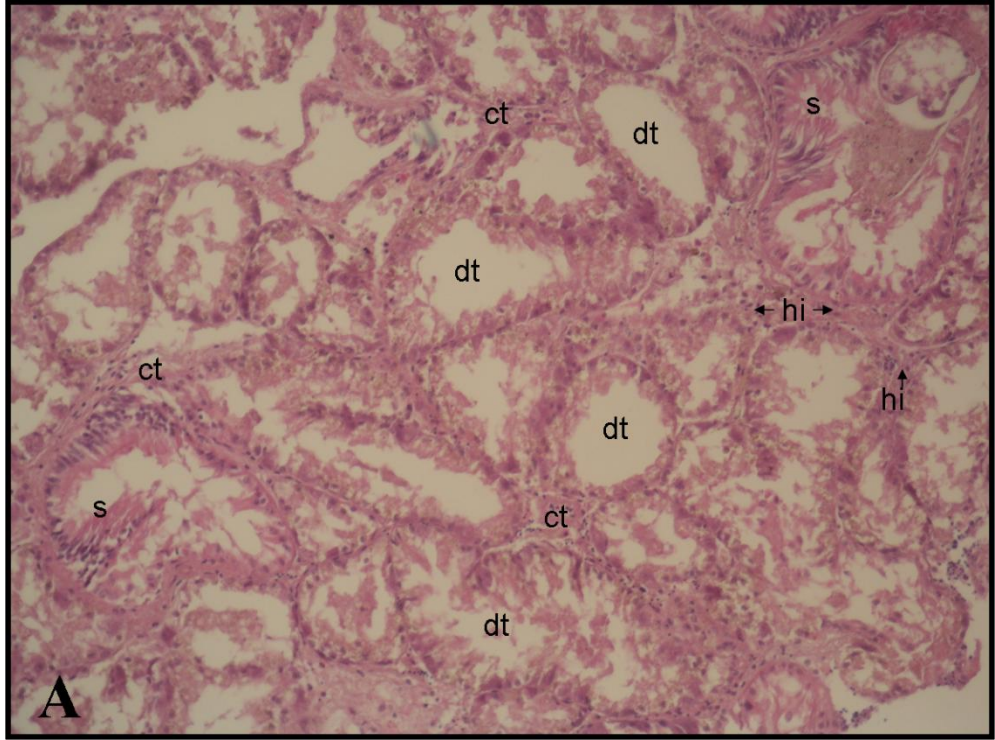
	Granüllü	Mikronükleus	Bud	Binükleus/oligonükleus	Toplam
Foça	27	16	2	9	1007
Aliğa	161	17	4	17	1002

3.5. Histolojik Analizler

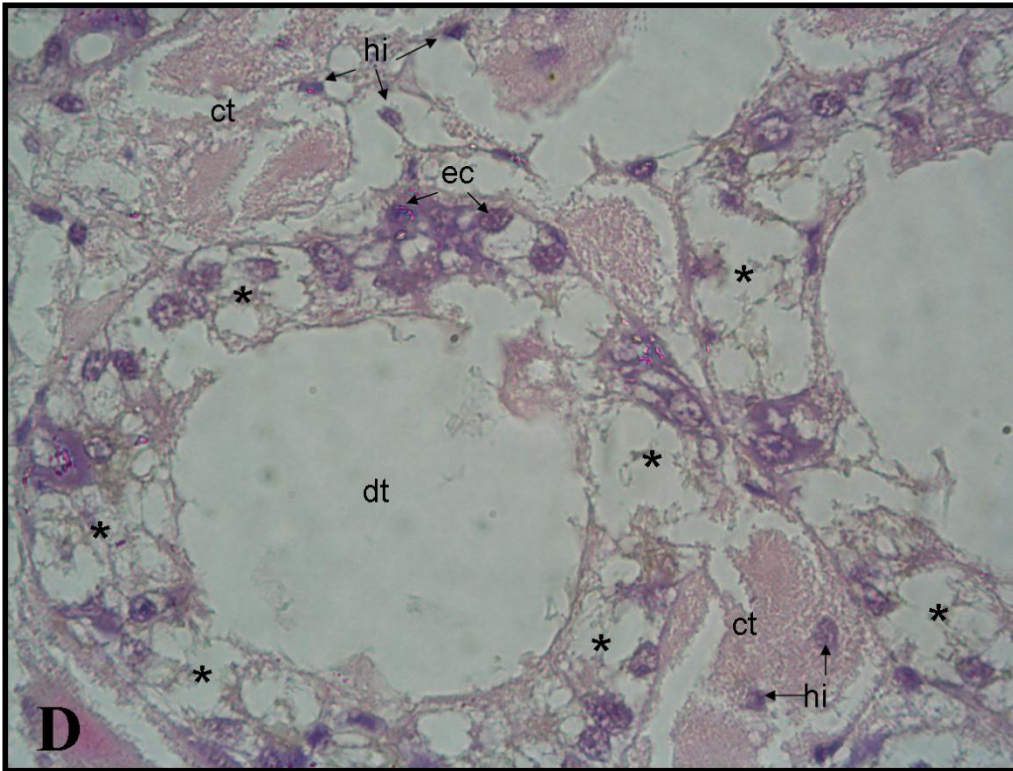
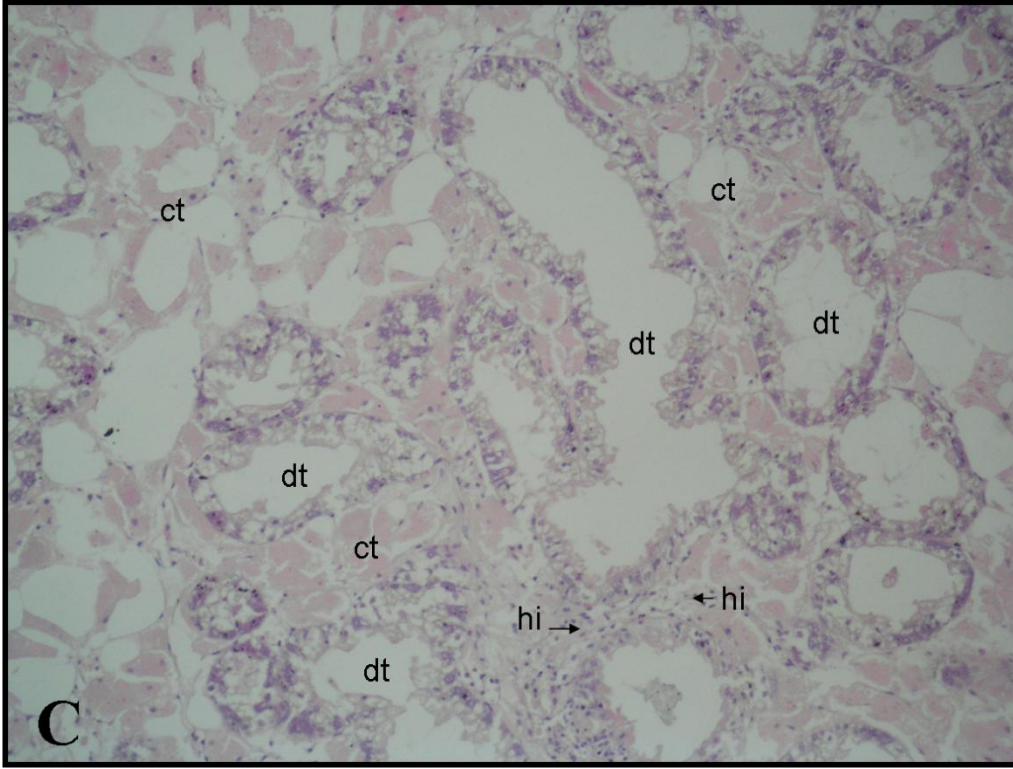
3.5.1. Rutin Hemotoksilen & Eozin boyama

Midyelerin solungaçları ve hepatopankreas dokuları çıkarılmış ve %4 paraformaldehit içerisinde 1 gece tespit edilmiştir. Sonra rutin takip işlemlerinden geçirilerek Hemotoksilen & Eozin ile boyama işlemine tabi tutulmuştur.

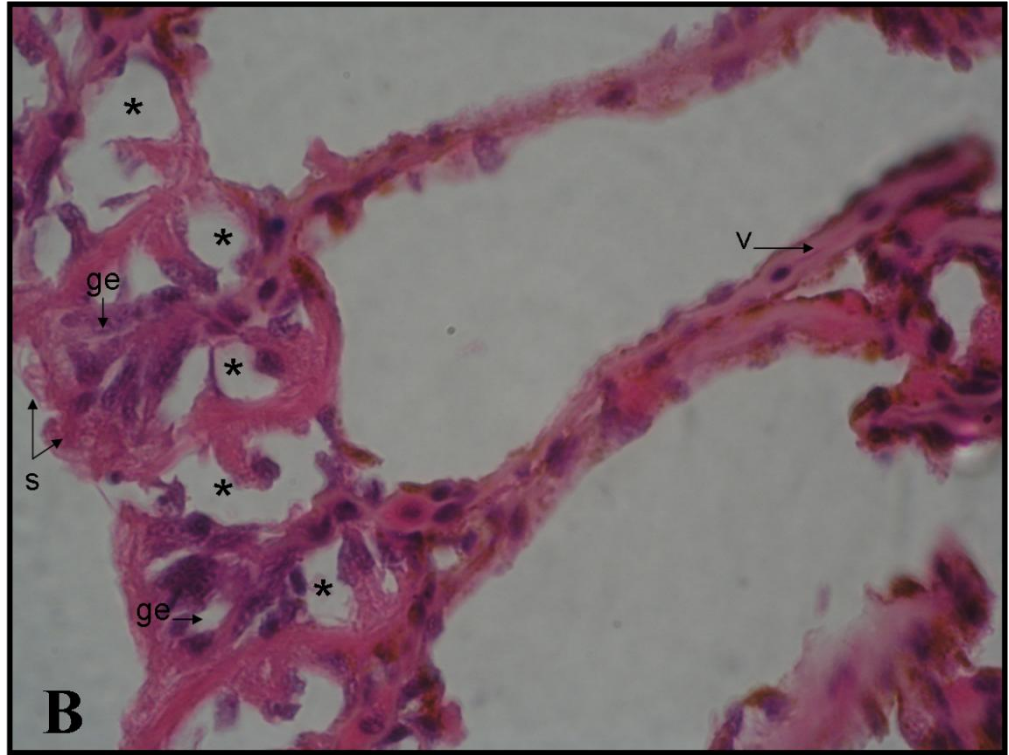
Gözlemlenen hücresel kayıplar ve dejenerasyonlar Şekil 3.2., Şekil 3.3., Şekil 3.4., Şekil 3.5.'de gösterilmiştir.



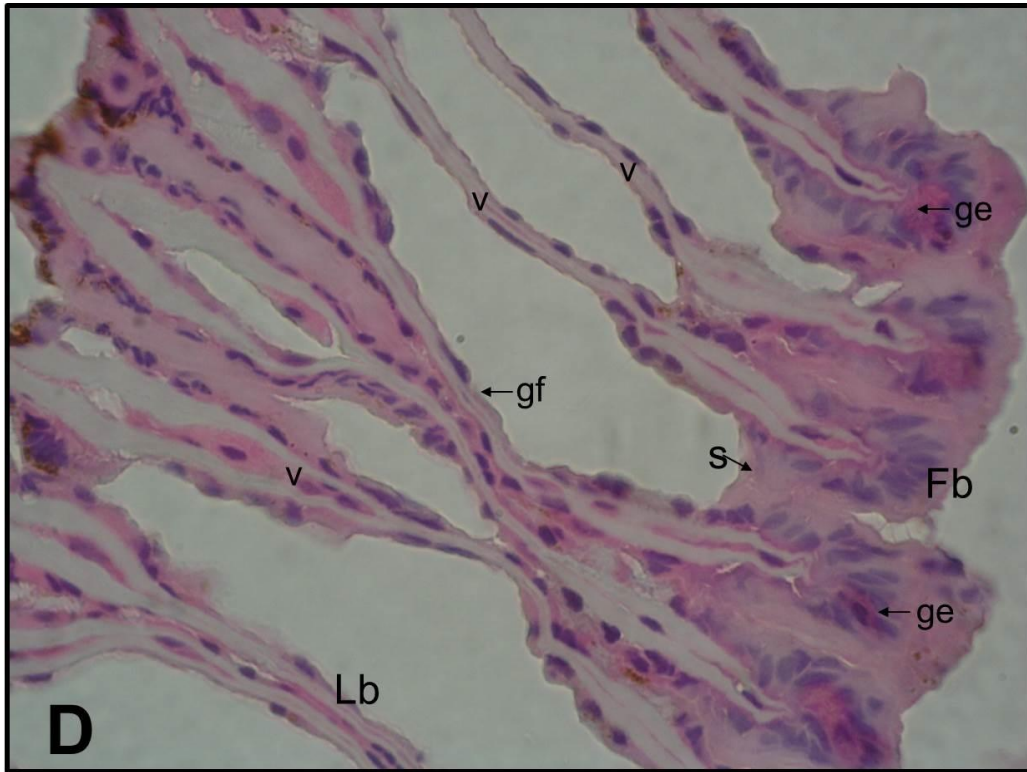
Şekil 3.2. Foça bölgesi midyelerinin hepatopankreas dokusu histolojik kesiti (A- B). Digestif tübüllerde (dt) vakuolar dejenerasyon ve nekroza bağlı hücre kayıpları (*) görülmektedir. Tübül epitel bütünlüğü kaybolmuş olarak izlenmektedir. Mevcut digestif tübül epitel hücrelerinde eozinofilik sitoplazma (ec) ve piknotik nükleus (pn) görülmektedir. Vesiküler bağ dokusunda (ct) yaygın hemositik infiltrasyon (hi) izlenmektedir. Mide (s). H&E boyama; A x20, B x100 büyütme.



Şekil 3.3. Aliğa bölgesi midyelerinin hepatopankreas dokusu histolojik kesiti (C- D). Digestif tübüllerde tübül epitel bütünlüğü korunmasına rağmen vakuolar dejenerasyon ve nekroza bağlı hücre kayıpları (*) görülmektedir. Vesiküler bağ dokusunda (ct) yaygın hemositik infiltrasyon (hi) izlenmektedir. H&E boyama; C x20, D x100 büyütme.



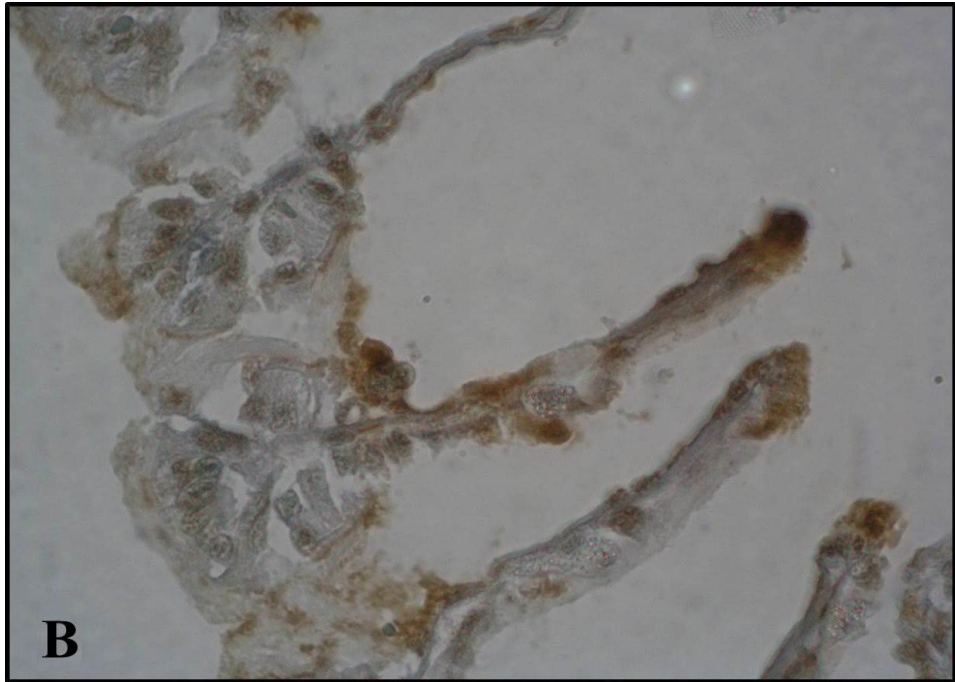
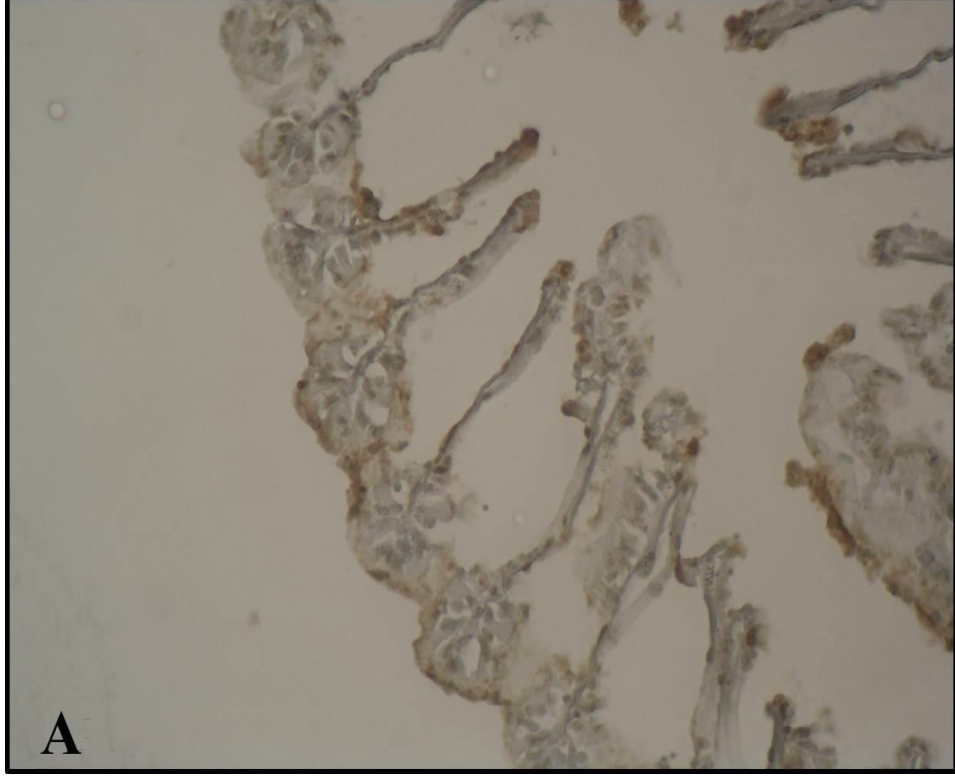
Şekil 3.4. Foça bölgesi midyelerinin solungaç dokusu histolojik görüntüsü (A ve B). Solungaç filamenti frontal bölgesi epitel hücrelerinde (ge) dejenerasyon, nekrotik değişiklikler ve hüresel şişme (*) görülmektedir. Epitel hücrelerinde siliar dejenerasyon ve erezyon (s) ile birlikte solungaç filamenti hemolenfatik damarlarda daralma ve yapışmalar (v) izlenmektedir. Fb: Frontal bölge, Lb: Lateral bölge, gf: solungaç filamenti. H&E boyama; A x40, B x100 büyütme.



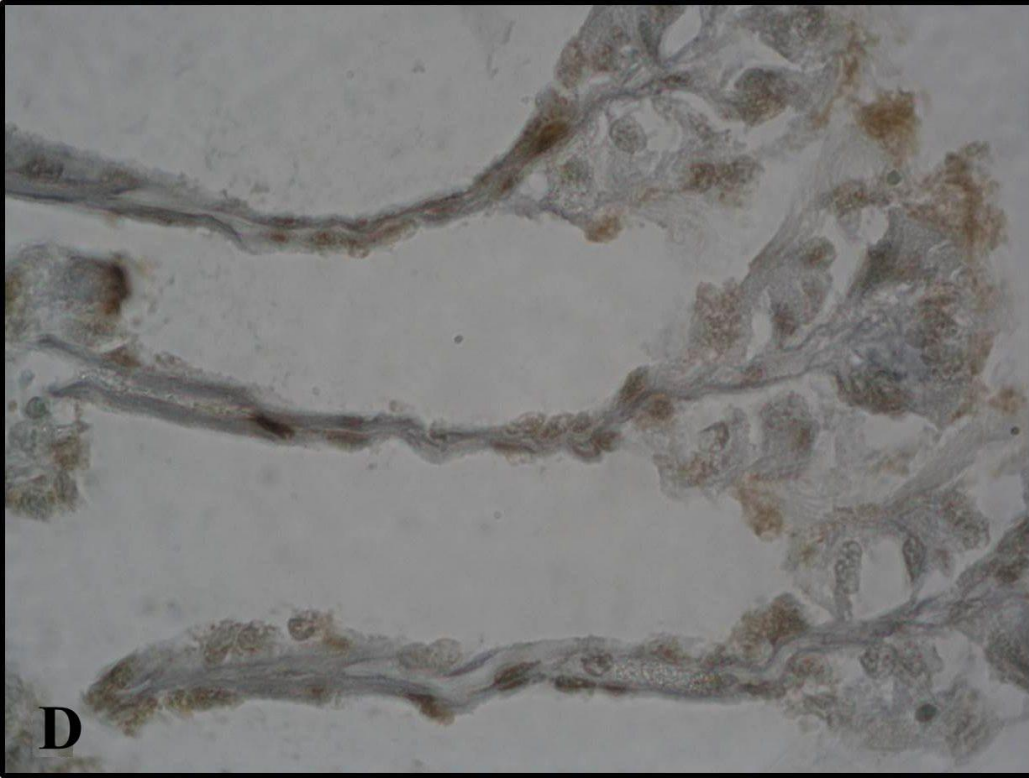
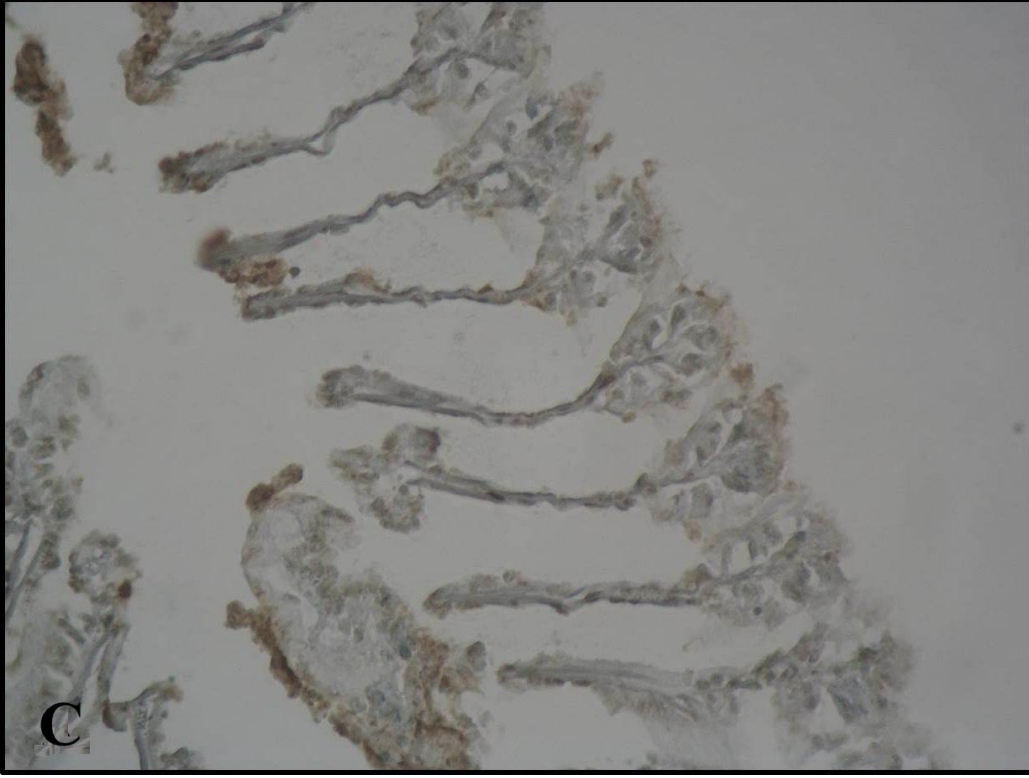
Şekil 3.5. Aliğa bölgesi midyelerinin solungaç dokusu histolojik görüntüsü (C ve D). Solungaç filamentleri frontal ve lateral bölgesi epitel hücreleri (ge) normal histolojik görünümündedir. Sadece solungaç filamentleri hemolenfatik damarlarda daralma ve yapışmalar (v) izlenmektedir. Fb: Frontal bölge, Lb: Lateral bölge, gf: solungaç filamentleri. H&E boyama; C x40, D x100 büyütme.

3.5.2. TUNEL Ekspresyonu

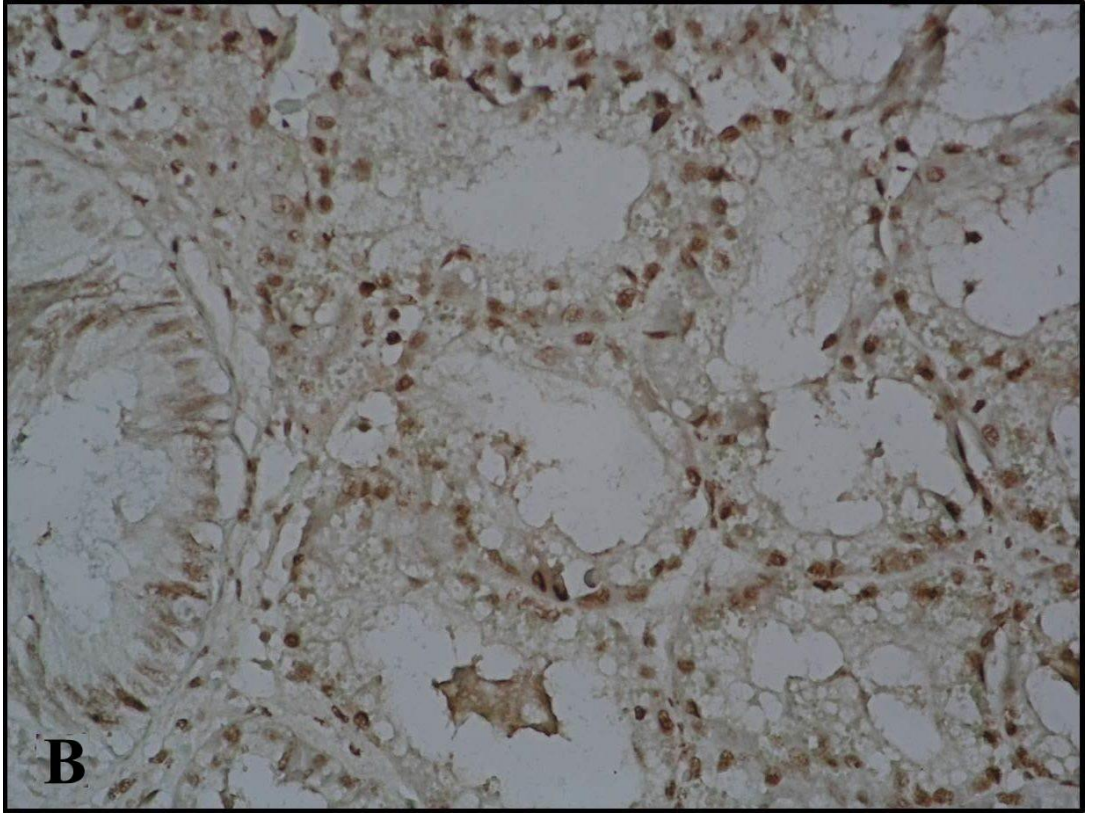
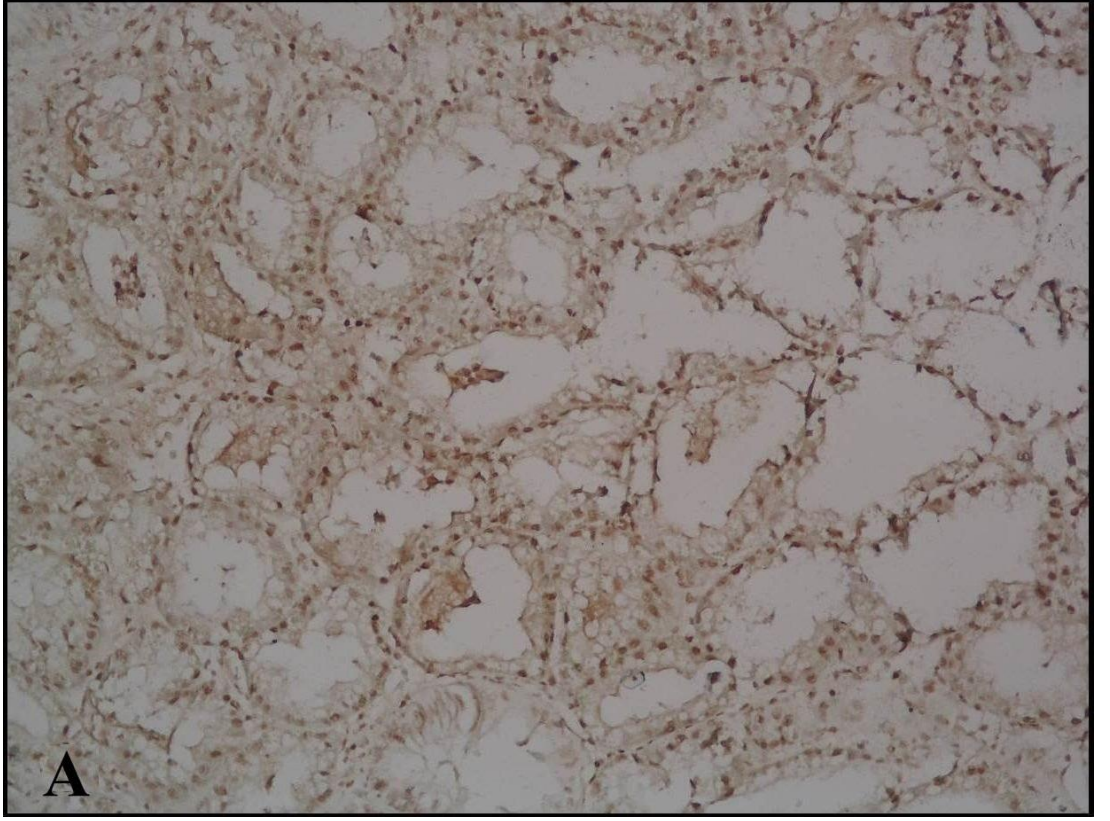
Apoptotik hücre çekirdeklerinin tanımlanmasını sağlayan histokimyasal bir yöntemdir. Apoptotik süreci başlayan hücreler Şekil 3.6., 3.7., 3.8. ve 3.9'da görülmektedir.



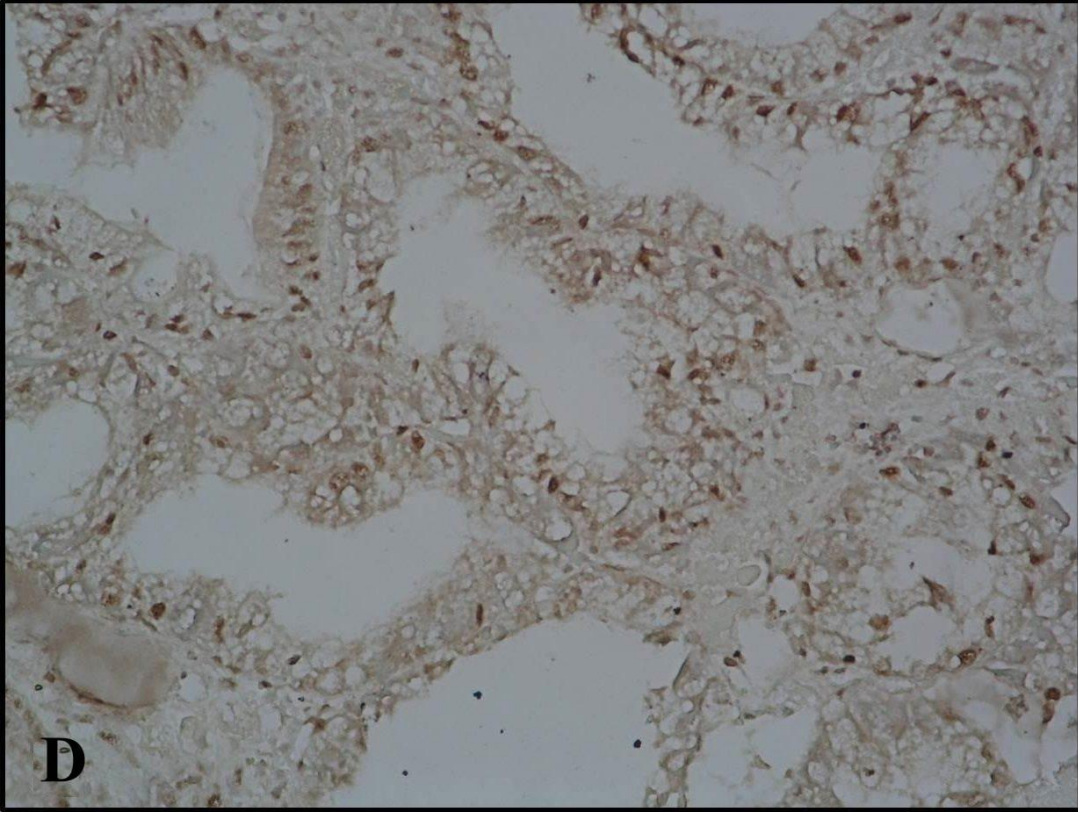
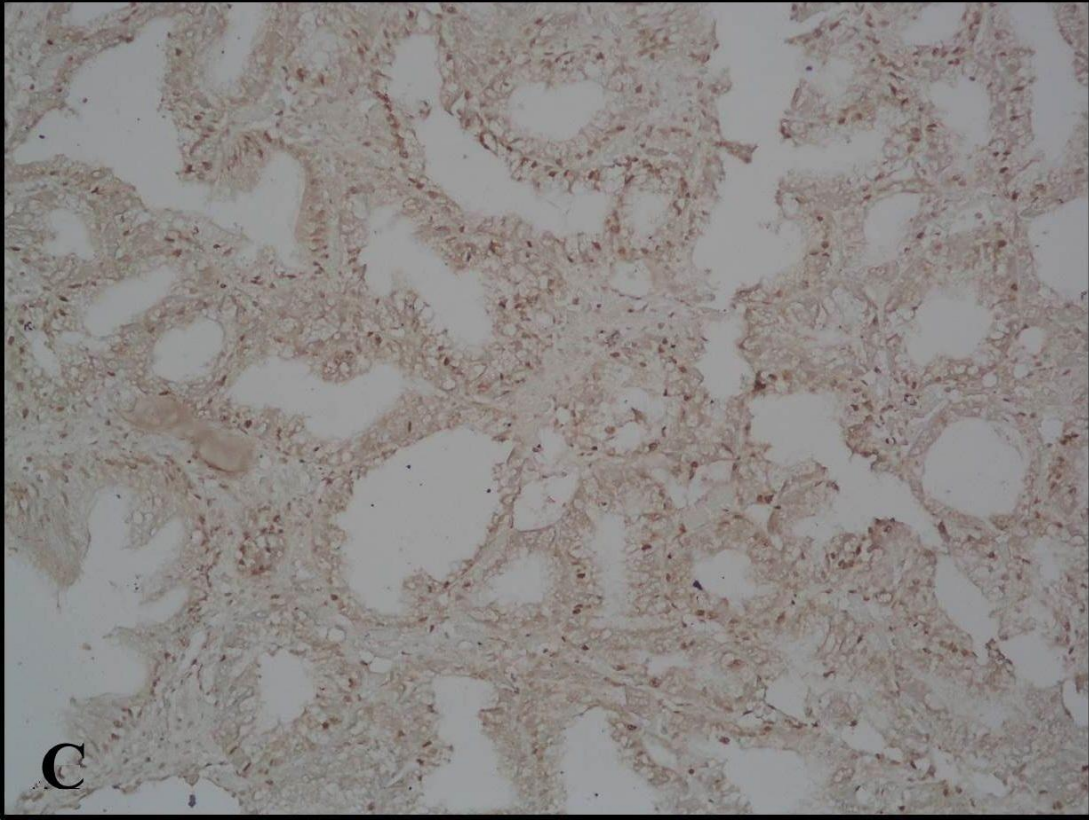
Şekil 3.6. Foça bölgesi midyelerinin solungaç dokusunda TUNEL ekspresyonu(A ve B). Kahverengi boyanan bölgeler apoptotik hücreleri göstermektedir.



Şekil 3.7. Aliğa bölgesi midyelerinin solungaç dokusunda TUNEL ekspresyonu (C ve D).



Şekil 3.8. Foça bölgesi midyelerinin hepatopankreas dokularında TUNEL ekspresyonu(A ve B).



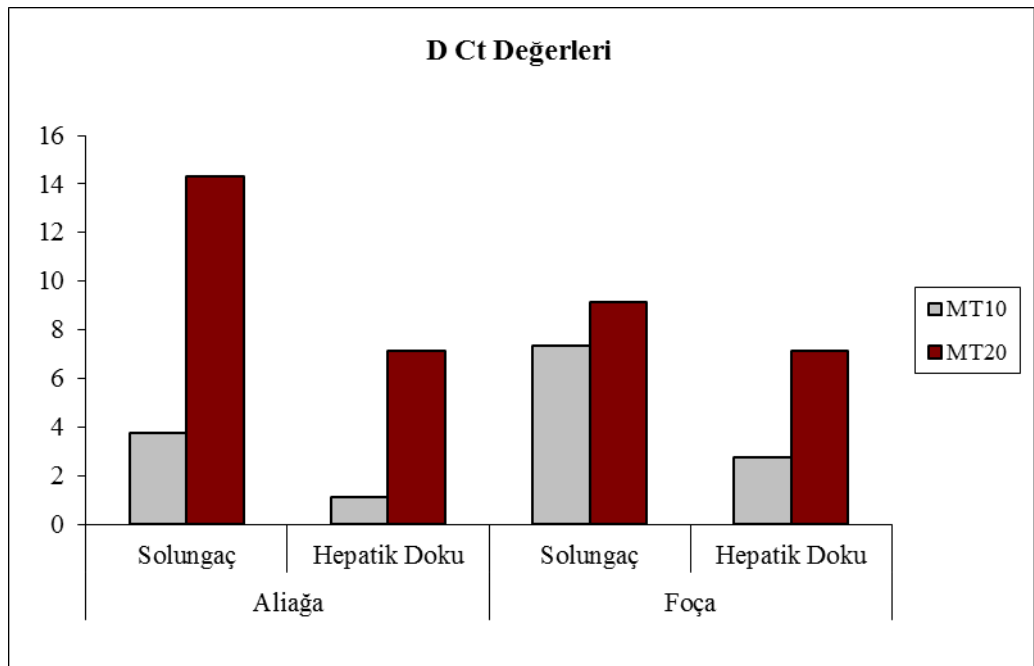
Şekil 3.9. Aliğa bölgesi midyelerinin hepatopankreas dokularında TUNEL ekspresyonu (C ve D).

3.6. Gen Ekspresyon Profilinin Belirlenmesi

Çevresel Şartların gen profiline etkisini belirleyebilmek için metal bağlayan proteinler olan metallothioneinler ve programlanmış hücre ölümü (apoptozis) sürecinin başlangıcında rol oynayan kaspaz proteinleri dikkate alınmıştır.

3.6.1. Metallothioneinler (Metal bağlayan proteinler)

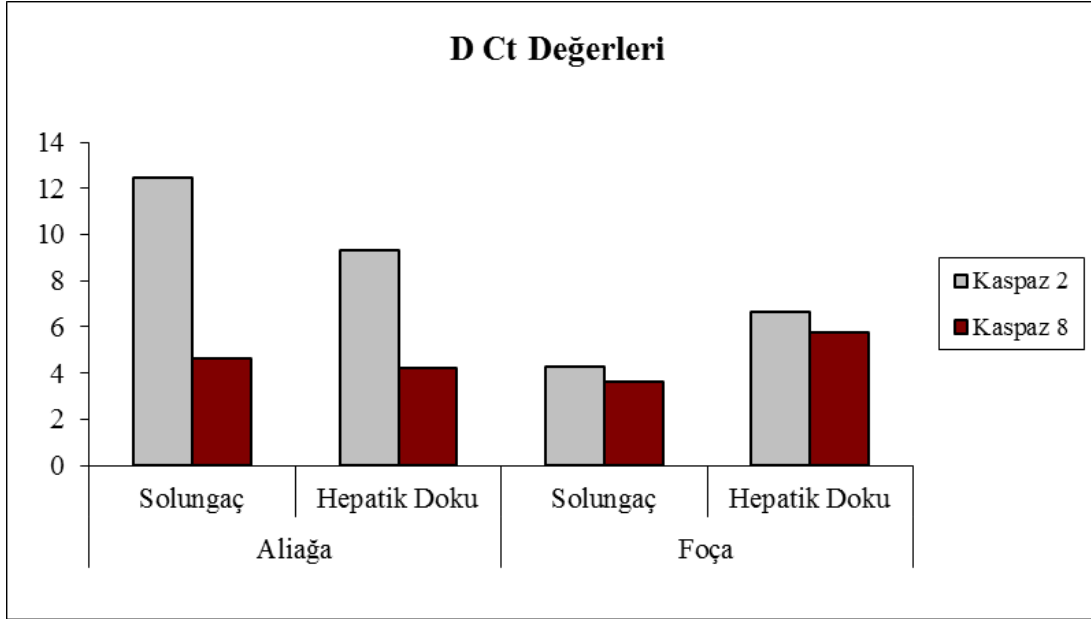
Analizlerde kontrol geni olarak Beta Actin geni kullanılmıştır. Metallothionein genleri ekspresyonları arasında iki istasyon arasında ciddi farklar vardır. Özellikle MT20 geninin daha fazla eksprese olması midyelerin ağır metaller tarafından oluşturulan oksidatif hasara maruz kaldığını göstermektedir (Şekil 3.10.).



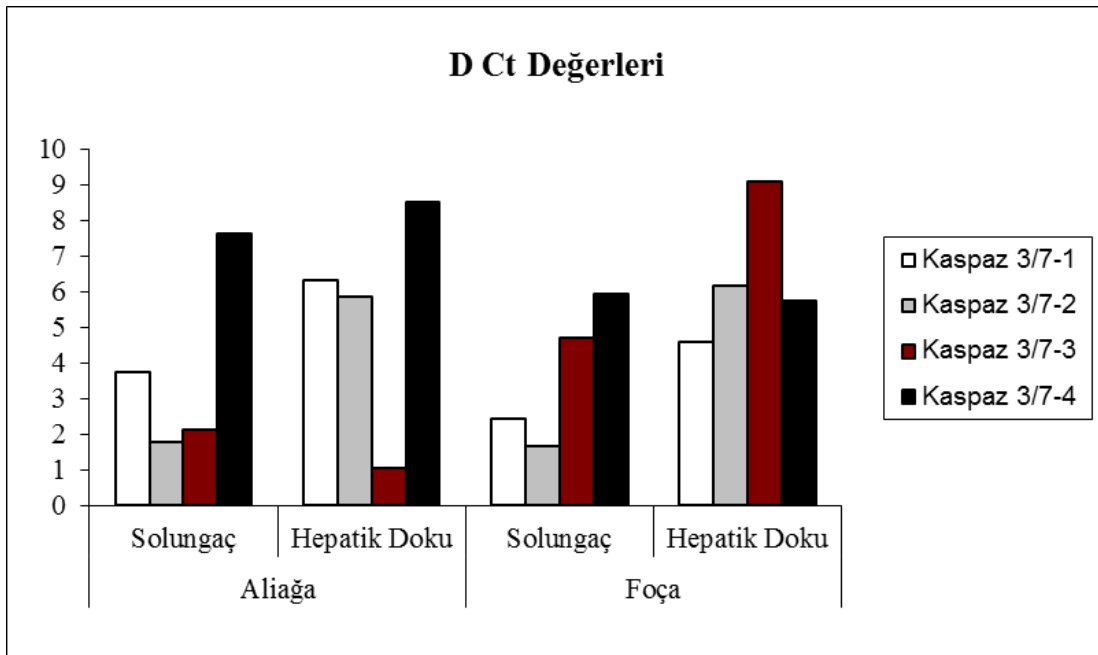
Şekil 3.10. Aliğa ve Foça istasyonlarında toplanan midyelerdeki Metallothionein genlerinin (MT10 ve MT20) ekspresyon seviyeleri

3.6.2. Kaspazlar

Analizlerde kontrol geni olarak Beta Actin geni kullanılmıştır. Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz değerler midyelerde apoptotik sürecin başladığını ve organizmanın hasar onarımı yapamadığı hücrelerini ölüme gönderdiğini ortaya koymaktadır (Şekil 3.11. ve Şekil 3.12.).



Şekil 3.11. Aliğa ve Foça istasyonlarında toplanan midyelerdeki başlatıcı kaspaz genleri (Kaspaz-2 ve Kaspaz-8) ekspresyon seviyeleri



Şekil 3.12. Aliğa ve Foça istasyonlarında toplanan midyelerdeki Efektör kaspaz genleri (Kaspaz-3/7-1, Kaspaz-3/7-2, Kaspaz 3/7-3 ve Kaspaz-3/7-4) ekspresyon seviyeleri

4. TARTIŞMA

Endüstri ve nüfusun yoğun olduğu bölgelerde meydana gelen kirletici yük birikimi denizel ortamlarda ilk olarak dipte yaşayan canlıları etkiler. Bu kirleticiler arasında PAH'lar, PCB'ler, organoklorlu pestisitler, klorlu organik bileşikler, radyonüklidler ve ağır metaller gibi pek çok kimyasal ajan bulunmaktadır. Bu ajanlar doğada uzun süre bozunmadan birikim yapabilme ve biyobirikim aracılığı ile besin zinciriyle bir çok ortama ve canlıya ulaşabilmektedir.

Kirliliğin varlığının tespiti çözüm için yeterli olmadığından ortamdaki canlılara yaptığı etkilere dikkat çekmek amacıyla biyomonitör türler aracılığı ile kirlilik ve etki belirlemesi yapılmaktadır. Bu canlılara uygulanan analizler sonucu elde edilen metabolik ve genetik yanıtlar maruziyet tespiti yapmak için gerekli verileri oluştururlar. Dipte yaşayan ve suyu süzerek beslenen bir organizma olan *Mytilus Galloprovincialis* bizim çalışmamız için de monitor organizma olarak seçilmiştir.

Yapılan ağır metal analizi sonunda elde edilen veriler Çizelge 3.2.'de görülmektedir. Çalışmamız sonucuna hem Aliğa hem de Foça istasyonundan toplanan midyelerde ağır metal tespit edilmiş ve tüm ağır metallerin Foça istasyonunda Aliğa istasyonuna göre daha fazla miktarda bulunduğu ortaya konmuştur. Genellikle çinko diğer metallerle karşılaştırıldığında midye dokusunda en yüksek konsantrasyonda bulunan metaldir (Chafik ve ark., 2001) ki çalışmamızda da çinko hem solungaç hem de hepatopankreas dokusunda en yüksek konsantrasyonda bulunmuştur.

Karşılaştırma yapmak amacıyla İzmir Körfezi'nde yapılan çalışmalara bakıldığında İzmir Körfezi'nde de *M. galloprovincialis* türünde en yüksek oranda Çinko (9,55 - 58,50 µg/g yaş ağırlık) bulunurken Kurşun (0,58 - 1,82 µg/g yaş ağırlık), Bakır (0,32 - 3,25 µg/g yaş ağırlık) Kadmiyum (0,04 - 1,12 µg/g yaş ağırlık) ve Nikel (0,30 - 3,25 µg/g yaş ağırlık) tespit edilmiştir (Egemen ve ark., 1998). Başka bir çalışmada ise İnciraltı ve Urla kıyısından toplanan *M. galloprovincialis* örneklerinde Cd, Cu, Zn, Pb, Hg ve As tayini yapılmış ve İnciraltı bölgesinde en yüksek oranda Çinko (13,9 mg/kg) daha düşük oranlarda da Bakır (1,2 mg/kg), Kadmiyum (0,02 mg/kg), Civa (0,003 mg/kg), Kurşun (0,13 mg/kg) ve Arsenik (1,03 mg/kg) değerlerine rastlanmıştır (Esen, 2006). İç Körfez için ortalama değerler (µg/g kuru ağırlık) ise Hg 0.018± 0.0001, Cd 0.028± 0.004, Pb 0.40± 0.026, Cr 0.17± 0.0014, Cu 5.28± 0.023, Zn 27.7± 1.09, Mn 4.49± 0.37, 49.3± 0.94 , Orta Körfez için ortalama değerler (µg/g kuru ağırlık); Hg 0.0175± 0.0007, Cd 0.011±0.002, Pb 0.075±0.0056, Cr 0.116±0.002, Cu 3.67±0.11, Zn 17.9±0.062, Mn 2.66±0.018, Fe 49.4±0.48 olarak ölçülmüştür (Küçüksezgin ve ark., 2008). Kuzey Ege Denizi'nde Edremit, Dikili ve Çandarlı körfezi boyunca 11 istasyondan yapılan örneklemelerde ortalama olarak Bakır; 0,53 - 8,40 µg/g, Çinko; 7 - 40,37 µg/g, Kadmiyum; 0,86 - 1,22 µg/g, Kurşun; 0,53 - 7,96 µg/g yaş ağırlık olarak belirlenmiştir (Koçbaş, 2005).

Çinko oranının yüksek olmasının midyenin toplandığı bölgenin körfez ya da liman gibi bölgeler olması ile bağlantılı olduğu görülmektedir. Çinko ile kontamine olmuş midyelerin besin zincirine dahil olmasının kaçınılmaz olduğu bilinmektedir

(Wang et al., 1996). Çinko belli seviyelerde hem insanlar hem de hayvanlar için gerekli bir elementtir ve günlük alınabilir değeri çocuklar için 10 mg/gün, yetişkinler için 15 mg/gündür (Sivaperumal et al., 2007). Elde ettiğimiz veriler doğrultusunda bu bölgelerden toplanan midyelerden günde 10-15 adet tüketilmesi yetişkinlerdeki çinko için günlük alınabilir dozun üstüne çıkmaktadır. Yine bir çok araştırmacı tarafından yüksek çinko ve bakıra kronik olarak maruz kalımın Parkinson hastalığı ile bağlantılı olduğu rapor edilmiştir (Gorell et al., 1997). Daha önce yapılan çalışmalarda *M. galloprovincialis* örneklerinde bakırın çinkoya göre daha düşük konsantrasyonda bulunduğu ortaya konmuştur (Rouane-Hacene et al., 2012). Çalışmamızda da analiz edilen midyelerde çinkodan sonra en fazla miktarda bakır birikimi gözlenmiştir. Bakır özellikle hemoglobinin sentezinde gerekli bir element olmasına rağmen yüksek miktarda alındığında ciddi sağlık problemlerine sebep olmaktadır (Gorell et al., 1997).

Bakırdan sonra midye dokularında yüksek oranda arsenik ve mangan daha düşük oranlarda da nikel, civa, kurşun ve kadmiyum gibi ağır metaller tespit edilmiştir. Kadmiyum ise midyelerin yumuşak dokularında daha az konsantrasyonda birikim yapan bir metaldir ve deniz organizmalarında doğal olarak birikim yapma özelliği bulunmaktadır. Yaptığımız çalışmada bulduğumuz kadmiyum miktarının Türk Gıda Kodeksi (2008)'ne göre yüksek olmadığı belirlenmiştir. Yine kurşunun Türk Gıda Kodeksi'ne göre 1.5 µg/g konsantrasyonuna izin verilirken, bizim çalışmamızda özellikle hepatopankreas dokusunda daha yüksek oranda kurşun tespit edilmiştir. Bu toksik metalleri yüksek konsantrasyonlarda taşıyan midyelerin tüketilmesi tüketicilerde ciddi sağlık sorunlarına sebep olabilmektedir. Dahası kurşun, kadmiyum gibi kümülatif zehirler, düşük konsantrasyonlarda düzenli yiyecek tüketiminde tehlike oluşturmaktadır.

Bu bulgulara ek olarak midyelerin ağır metale maruz kalımı metalotionein gen ekspresyonu ile de gösterilmiştir. Çalışmamızda ağır metallerin birikimine bağlı olarak dokuda oksidatif stres oluşumu ve bunun sonucu da MT10 ve MT20 gen ekspresyon seviyelerinde artış olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.10). Özellikle MT20 geninin daha fazla eksprese olması midyelerin ağır metaller tarafından oluşturulan oksidatif hasara maruz kaldığını göstermektedir. Midyeler bu hasarı tamir edebilmek için MT genlerini eksprese ederek detoksifikasyon mekanizmalarını aktive etmektedirler. Çalışmamızda elde ettiğimiz ağır metal analiz verileri ile MT gen ekspresyon seviyelerindeki artış birbiri ile korelasyon göstermekte ve çalışılan her iki istasyondaki ağır metal kirliliğini açıkça ortaya koymaktadır.

Tunus sahillerinde transplante edilen *Mytilus galloprovincialis*'lerin sindirim bezlerinde yapılan analizlerde elde edilen değerler referans bölgeye göre normalize edildiğinde ekspresyon artışını göstermektedir (Banni et al., 2007). İspanya kıyılarında ise meydana gelen bir kaza sonucu oluşan etkilenimi belirlemek için yapılan MT10 ve MT20 ekspresyon analizlerinde elde edilen değerler, kazadan sonra hem temiz hem de kirli kabul edilen bölgelerden ikisinin de MT ekspresyonlarının arttığını ortaya koymuştur (Sureda et al., 2011). Metalotioneinler düşük moleküler ağırlıklı, sistin bakımından zengin metal bağlayan proteinlerdir. Sitosol içinde mevcut spesifik ligandlar yoluyla iki değerli metalleri bağlayan bir

detoksifikasyon mekanizması olarak işlev görür, iki aşamalı olarak görev yaparlar. Öncelikle hücre içi geçişi serbest metal iyonlarını yakalar ve bağlar ardından toksiste oluşturabilecek thionein içermeyen ligandların dışarı atılımını sağlar (Van der Oost et al., 2003). Mollusklarda bulunan metallothioneinler omurgalılar ve kabuklularla aynı sınıftan olan MT1 sınıfındandır. Bununla birlikte diğerlerine göre daha uzun dizilere, AT miktarı fazla olan intron dizilerine (%70) ve daha fazla glisin konsantrasyonuna (%15) sahip olmak gibi farklılıklar gösterir. *Mytilus* cinsi hem fizyolojik fonksiyonları hem de primer dizileri farklı iki farklı MT izoformu ifade eder. Esas izoform MT-10 iken kadmiyuma duyarlı izoform MT-20'dir. MT-10 transkripsiyonu MT-20'ye göre daha fazladır. Bu farklılık metallerin farklılığından kaynaklanır. MT-10 temel toksik metal iyonları tarafından uyarılırken (Limoine et al., 2000) MT-20 özellikle kadmiyum (Raspor et al., 2004) ve cıva (Dondero et al., 2005) iyonları tarafından uyarılır. Ayrıca MT-20'nin oksiradikal sentezi ile de aktive edildiği belirlenmiştir (Dondero et al., 2005). MT seviyelerindeki yükselmeler özellikle sanayi bölgelerindeki kıyısız alanlarda kirlenmenin bir göstergesi olarak erken uyarı niteliğindedir. (Roesijadi, 1996; Viarengo et al., 1999). MED POL III Programı tarafından ağır metallere maruziyet açısından hassas bir biyogösterge olarak kabul edilmiştir. (UNEP/MAP, 1999).

Bütün bu çevresel kirliliğin oluşturduğu stres ve baskıya karşı organizmanın oksidatif stres mekanizmalarının çalışmaya başladığını yaptığımız analizler sonucu elde ettiğimiz veriler göstermiştir. Kirletici ajanların detoksifikasyonu sırasında ortaya çıkan sekonder metabolitlerin zararsızlaştırılmasında etkili bir enzim olan glutatyon-s-transferans enzimi oksidatif stresin önemli biyomarkerlerindedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz değerler (Çizelge 3.4.) GST aktivitesinde artışı gösterirken özellikle solungaç dokularında istasyonlar arasında da anlamlı fark gözlemlenmiştir. Fransa'da temiz bölgelerden toplanan midyelerin transplantasyonu ve yerinden örneklemeyle Temmuz ve Ekim aylarında gerçekleştirilen çalışmada solungaç ve sindirim dokularında bakılan GST aktivitesi ölçümlerinde hem istasyonlar arası hem de örnekleme arasında anlamlı fark ortaya çıkmıştır. Solungaçlarda ölçülen değerler sindirim dokularına oranla çok daha yüksek bulunmuştur (Roméo et al., 2003). Yunan kıyılarında 18 istasyonda transplante midyelerin solungaç ve sindirim bezlerinden yapılan örnekleme (sindirim dokularında) 35.9 - 70.4 nmol/min/mg prot aralığında değerler bulunmuştur (Tsangaris et al., 2010). Fransa Le Havre Limanı'nda 4 istasyondan 4 mevsim yapılan örnekleme ise solungaçlarda; 500-4000 nmol GSH min/mg prot arasında sindirim dokularında ise; 250-2500 nmol GSH.min/ mg prot arasında ölçümler yapılmış ve referans alınan bölgeye göre önemli farklılık gözlemlenmiştir (Manduzio et al., 2004).

Süperoksit anyonlarının detoksifikasyonunda görevli süperoksit dismutaz enzimi aktivitesinde istasyonlar arasında bir fark bulunmama beraber SOD aktivitesi akut kirlilik için önemli bir biyomarker olan görülmektedir (Çizelge 3.5.). İzmir Körfezi'nde yapılan bir çalışmada iki istasyondan (iç körfez ve orta körfez) toplanan midyelerin sindirim dokularından yapılan ölçümlerde 1,5-3,5 U/mg prot değerleri ölçülmüş ve istasyonlar arasında anlamlı fark bulunmuştur (Küçüksezgin ve ark., 2008). Balearik Adaları ve referans bölge olarak Santa Maria Limanı seçilen çalışmada transplante midyelerin solungaç ve sindirim bezleri kullanılmıştır. Sindirim dokularında bulunan değerler solungaçlara oranla daha yüksektir. Solungaç dokularında kirli ve kirli olmayan bölgeler arasında önemli

farklılıklara rastlanmıştır. Solungaç dokularından yapılan örneklemelerde; 7-13 pmol/min/mg prot değerleri bulunmuştur. Sindirim dokularında ise bu değerler 15-19 pmol/min/mg prot arasındadır (Box et al., 2007). Portekiz Kıyıları'nda petrokimya kirlilik düzeyine göre seçilmiş 5 ayrı bölgede *Mytilus galloprovincialis*'in solungaç ve sindirim bezi dokularından örnekleme yapılmıştır. Solungaç için; 15-25 U/ mg prot, sindirim bezleri için; 20-60 U/mg prot olarak bulunmuştur (Lima et al., 2007).

Akut kirliliğe karşı geçici bir tepki olan bir diğer enzim olan katalaz aktivitesinde çalışmamızda istasyonlar arasında bir fark bulunmamıştır (Çizelge 3.6.). Yunan kıyılarında 18 istasyonda transplante midyelerin solungaç ve sindirim bezlerinden örnekleme yapılmış bütün aktiviteler 0.7 to 3.6 U/mg protein aralığında belirlenmiş, referans bölgeye oranla (1.9-3.4 U/mg protein) antropojenik aktivitenin yoğun olduğu bölgede CAT aktivitesi daha düşük (0.7-1.8 U/mg protein) olduğu belirtilmiştir (Tsangaris et al., 2010). İtalya'da ise 8 istasyondan 4 tanesi şehirleşmenin olmadığı bölgeler diğer 4'ü antropojenik etkiye maruz kalan bölgeler olarak seçilmiştir. Midyelerin sindirim bezlerinde yapılan ölçümlerde 30-80 U x mg⁻¹ aralığında değerler bulunmuştur (Lionetto et al., 2003). Portekiz Kıyıları'nda petrokimya kirlilik düzeyine göre seçilmiş 5 ayrı bölgede *Mytilus galloprovincialis*'in çeşitli dokularında 10-50 µmol min⁻¹ mg⁻¹ protein aralığında ölçüm kaydedilmiştir (Lima et al., 2007).

Hücre zarı bütünlüğünün bozulmasına neden olan lipit peroksidasyonu ölçümlerinde Aliğa istasyonundan örneklenen dokularda Foça istasyonuna göre daha yüksek oksidasyon belirlenmiştir (Çizelge 3.7.). Portekiz kıyılarında yapılan çalışmada az ve kış mevsimlerinde 9 istasyondan yapılan örnekleme analiz için solungaç kullanılmıştır. Yaz örnekleme; 1-2, kış örnekleme; 1-4 MDA + 4-HNE mmol g/prot olarak gözlenmiştir (Almeida et al., 2011). Portekiz'deki başka bir çalışmada 5 istasyonda sindirim bezlerinde; 5-20, solungaçlarda ise; 5-15 nmol MDA mg/prot değerleri bulunmuştur (Lima et al., 2007). Saranikos Körfezi'ndeki bir çalışmada ise 2 istasyon ve 4 mevsim yapılan örnekleme mantoda 300-800 nmol g/w.w.t solungaçta 500-1000 nmol g/w.w.t değerleri bulunurken referans bölge istasyonunda mantoda 200-360, solungaçlarda 500-570 değerleri gözlenmiştir (Vlahogianni et al., 2007). Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşurlar. Ekzojen kaynaklı etmenler arasında kimyasalların etkisi altında kalma, karbon tetraklorür, parasetamol gibi ilaç toksikasyonları, iyonize ve ultraviyole radyasyon, hava kirliliği yapan fitokimyasal maddeler yer almaktadır. Ayrıca sigara dumanı, solventler gibi çevresel faktörler ile alkol ve uyuşturucu gibi alışkanlık yapıcı maddeler de serbest radikallerin oluşumunu tetiklemesi nedeniyle toksikolojik açıdan önemlidir (Seo et al., 2004). Klinik ve deneysel çalışmalar serbest radikallerin birçok fizyolojik ve patolojik olayda önemli rol oynadığını göstermektedir. Egzersiz, açlık, ağır metaller, soğuk ve hareketsizlik gibi birçok stres modelinin serbest radikal oluşumunu artırdığı ve bu radikallerin de lipit peroksidasyonunu uyardığı bilinmektedir. Lipit peroksidasyonu serbest radikallere bağlı gelişen hasarın tespitinde önemli bir göstergedir ve membran akışkanlığında azalma, fonksiyonlarında bozulma, membran reseptörlerinin ve enzimlerinin inaktivasyonu, membran permeabilitesinin artışı ve özellikle hücre içinde kalsiyum iyon seviyelerinde artışa neden olarak hücrenin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin bozulmasına sebep olmaktadır.

Çeşitli kirleticilere karşı nörotoksisite biyomarkeri olarak kullanılan asetilkolin esterase enzim aktivitesi için yaptığımız ölçümlerde istasyonlar arası bir farklılık elde edilmemiştir (Çizelge 3.8.). Akdeniz'de iki bölgeden (Carteau ve La Fourcade) transplante midyelerin solungaç dokuları aylık olarak örneklemeden ortalama; 40,4-45,7 (nmol min⁻¹ mg protein⁻¹) değerleri elde edilmiştir (Bodin et al., 2004). 1996'da 5 istasyondan (Barcelona, Ebro Delta, Alboraya, Cullera, Denia) yapılan örneklemede solungaç dokusu kullanılmış ve elde edilen ortalama değerler Barcelona; 25.8 ± 3.9, Ebro Delta; 25.7 ± 3.1, Alboraya; 31.1 ± 1.6, Cullera -referans bölge- ; 23.6 ± 1.6, Denia; 29.9 ± 4.3 olarak kaydedilmiştir (nmol min⁻¹ mg protein⁻¹) (Porte et al., 2001). Portekiz kıyılarında 4 farklı istasyon ve dört periyotta yapılan örneklemede hemolenf ve solungaç dokuları kullanılmış ve referans bölgeye göre anlamlı bir fark rapor edilmiştir Referans istasyon; 74.03 ± 5.92 (U mg⁻¹ protein) elde edilen en düşük; (31.37 ± 6.79 U mg⁻¹ protein) ve en yüksek (74.03 ± 5.92 U mg⁻¹ protein) değerler belirtilmiştir (Moreira and Guilhermino, 2005). Danimarka'da *Mytilus Edulis* (mavi midye) türünde yapılan araştırmada 2002–2005 yılları arasında yapılan örneklemelemlerden solungaç dokuları kullanılmış, en yüksek (54.1±6.1 nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein, mean±S.E.) ve en düşük AChE aktivitesi (30.1±3.6 nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein) belirtilmiştir (Rank et al., 2001).

Aerobik metabolizmada enerji üretimi ile moleküler oksijen indirgenmesinin birlikte gerçekleşmesi serbest oksiradikallerden biyomoleküllere hasar gibi oksidatif stres için potansiyel yaratır. Oluşabilecek zararları önleyebilmek amacıyla antioksidanlar ya da stres enzimleri devreye girer. Bunların arasında süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi enzimler bulunmaktadır (Newman, 2010). Organik kirliliğe maruz kalan *Mytilus* türlerinde katalaz, hidrojen peroksidi suya dönüştürebilmesinden dolayı erken antioksidan enzimlerinden biridir (Porte et al, 1991). Artan serbest radikal konsantrasyonları lipit peroksidasyonuna dayanan membran işlevi bozukluklarına neden olur. Malondialdehit bir lipit peroksidasyon ürünüdür ve varlığı kirleticilerden kaynaklanan lipitlerin oksidatif hasarının bir göstergesidir (Thomas, 1990). Lipit peroksidasyonu çevresel kirlilik maruziyeti sonucu oluşan hücresel bozulmalar açısından çevresel risk değerlendirmede önemli bir biyomarker olarak kabul edilmektedir (Stegeman et al., 1992). İncelediğimiz bu biyogöstergeler araştıma bölgesinde kirlilik yükünün baskısıyla meydana gelmiş oksidatif stresi açıkça ortaya koymuştur. Antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz kaldığı boyutlarda hücresel hasar görülmeye başlanmıştır.

Genotoksik hasarın bir göstergesi olarak ele aldığımız mikronükleus ve diğer nükleus anormalileri hem Aliğa hem de Foça istasyonunda rastlanmıştır (Çizelge 3.9.). İzmir Körfezi'nde 7 istasyondan örneklenen midyelerden yapılan örneklemelemlerde solungaç ve hemolenf örnekleri kullanılmıştır. Bu çalışma sonucunda İzmir Körfezi'ndeki kirleticilerin mevcut tehlikesine dikkat çekilmiştir (Cakal ve ark., 2010). İtalya Lingurian kıyılarına transplante edilen ve doğal ortamdaki midyelerden iki sefer örnekleme yapılmıştır. Midyelerin solungaç dokularında yapılan analizde transplante edilen midyelerin MN frekansı diğerlerine göre daha düşük çıkmıştır. Elde edilen sonuçlara göre endüstriyel bölgelerdeki MN miktarı daha yüksek bulunmuştur (Bolognesi et al., 2004).

Çalışmamızda farklı dokulardaki (solungaç ve hepatopankreas) kaspaz ekspresyon seviyelerinin analiz sonuçları Şekil 3.11. ve 3.12.'de gösterilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalar midyelerde apoptozis sürecinin omurgalı canlılarla benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca midyeler iklim değişikliklerine ve kirliliğe oldukça duyarlıdırlar ve bu yüzden apoptotik prosesi yoğun olarak kullanmaktadırlar (Pipe ve Coles, 1995). Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz değerler midyelerde apoptotik sürecin başladığını ve organizmanın hasar onarımı yapamadığı hücrelerini ölüme gönderdiğini ortaya koymaktadır. Her ne kadar metallothionein gen seviyelerindeki artış midyelerin ağır metalleri detoksifiye etme yeteneğini gösterse de çok fazla ağır metal kontaminasyonu ya da diğer toksik kimyasalların varlığı çalıştığımız midyelerde apoptotik sürecin kullanıldığını ortaya koymaktadır.

Apoptoz varlığını direk olarak dokularda ortaya koyabilmek için histokimyasal bir yöntem olan TUNEL ve histolojik etkinin belirlenmesinde kullanılan bir görüntüleme yöntemi olan hemotoksilen - eozin boyama çalışmamızda kullanılmıştır. Bütün analizlerde elde edilen veriler gözlemlenen hücresel kayıplar ve dejenerasyonlar Şekil 3.2., Şekil 3.3., Şekil 3.4., Şekil 3.5. Şekil 3.6., Şekil 3.7., Şekil 3.8. ve Şekil 3.9'da gösterilmiştir. Foça bölgesi hepatopankreas dokularında digestif tübüllerde vakuolar dejenerasyon ve nekroza bağlı hücre kayıplarına rastlanmış, tübül epitelin bütünlüğü kaybolmuş olarak izlenmiştir. Mevcut digestif tübül epitel hücrelerinde eozinofilik sitoplazma ve piknotik nükleus tespit edilmiştir. Vesiküler bağ dokusunda ise yaygın hemositik infiltrasyon gözlenmiştir. Aliğa bölgesindeki hepatopankreas dokularında ise digestif tübüllerde tübül epitel bütünlüğü korunmasına rağmen vakuolar dejenerasyon ve nekroza bağlı hücre kayıpları görülmektedir. Vesiküler bağ dokusunda da yaygın hemositik infiltrasyon izlenmektedir. Foça bölgesi solungaç filamentleri frontal bölgesi epitel hücrelerinde dejenerasyon, nekrotik değişiklikler ve hücresel şişme tespit edilmiş, epitel hücrelerinde siliar dejenerasyon ve erezyon ile birlikte solungaç filamentleri hemolenfatik damarlarda daralma ve yapışmalar gözlenmiştir. Aliğa bölgesindeki örneklemelerde solungaç filamentleri frontal ve lateral bölgesi epitel hücrelerinin normal histolojik görünümde olduğu gözlemlenmiş, sadece solungaç filamentleri hemolenfatik damarlarda daralma ve yapışmalar tespit edilmiştir. Foça ve Aliğa bölgesinde her iki dokuda da apoptotik sürecin başladığı kahverengi boyanmış bölgelerle tespit edilmiştir.

Herhangi bir hasara uğramış ya da risk altındaki hücre, ölüm ve çevre dokudan uzaklaştırma sürecine girer ve bu sürecin başrolünde özel bir proteaz ailesinden olan kaspaz enzimleri bulunmaktadır. Apoptoz kaspazların devreye girmesi ve mitokondrinin zar stabilitesinin bozulması ile başlar, hücresel bağlantılar ve geçişlerde değişimler oluşur, kromatin yoğunlaşır ve DNA parçacıkları oluşur (Sweet et al.,1999; Jaeschke, 2008; Plaa and Charbonneau, 2008). Reaktif oksijen türlerinin yüksek konsantrasyonlara çıktıklarında apoptotik sinyal yolağını hücrenin silinmesi için uyardığı belirlenmiştir (Dybbukt et al., 1994). Çalışmamızda da örnekleme yaptığımız bölgelerdeki midyelerde apoptotik sürecin başladığı mikronükleus anormalilerinin gözlemlenmesi ve histolojik kesitlerde ortaya çıkan apoptotik hücrelerin varlığıyla belirlenmiştir. Ayrıca kaspaz gen ifadesinin yoğunluğu da bu yargıyı destekler niteliktedir.

5. SONUÇ

Çeşitli çevresel ortamlarda endüstriyel ve antropojenik kirliliğe maruz kalan biyotanın tüm elemanlarının etkilenimi geçmişten bugüne araştırılmaktadır. Yapmış olduğumuz bu çalışma Aliğa çevresindeki kirliliğin midyeler üzerindeki etkisini ortaya koyan ilk etkilenim değerlendirme çalışmasıdır. Yine bu çalışma ile, bu bölgedeki midyelerde bir kirlilik biyomarkeri olan metallothionein gen ekspresyon seviyeleri ile apoptozisin göstergesi olan kaspaz gen ekspresyon seviyeleri ilk kez ortaya konmuştur. Çalışma sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda Aliğa bölgesindeki midyelerin Foça'dakilerden daha fazla oksidatif strese maruz kaldıkları fakat sürekli kirlilikten ötürü bu durumu karşı direnç geliştirdikleri tespit edilmiştir. Foça'da tespit edilen kirliliğin ise Gediz Nehri ile birlikte gelen kirleticiler tarafından oluşturulduğu tahmin edilmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abraham, W.R., Nogales B., Golyshin P.N., Pieper D.H. and Timmis K.N.,** 2002, Polychlorinated Biphenyl-Degrading Microbial Communities in Soils and Sediments, *Curr Opin Microbiol*, 5, 246-253 pp.
- Aceto, S., Formisano, G., Carella, F., De Vico, G. and Gaudio, L.,** 2011, The Metallothionein Genes of *Mytilus Galloprovincialis*: Genomic Organization, Tissue Expression and Evolution, *Marine Genomics*, 4, 61–68 pp.
- Almeida, C., Pereira, C., Gomes, T., Bebianno, M.J. and Cravo, A.,** 2011, DNA Damage as A Biomarker of Genotoxic Contamination in *Mytilus Galloprovincialis* From The South Coast Of Portugal, *J. Environ. Monit.*, 13, 2559 p.
- ALTO,** Aliğa'da Ekonomi, <http://www.alto.org.tr/tr/aliaga/aliaga-ekonomi.html> (Son erişim tarihi; 15.04.2013).
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J. and Rainbow, R.S.,** 2006, Metallothioneins in Aquatic Invertebrates: Their Role in Metal Detoxification And Their Use As Biomarkers, *Aquat. Toxicol.*, 76: 160-202 pp.
- Au, D.W.T., Wu, R.S.S., Zhou, B.S. and Lam, P.K.S.,** 1999, Relationship Between Ultrastructural Changes And EROD Activities İn Liver of Fish Exposed To Benzo[A] Pyrene. *Environ. Pollut.* 104, 235-247 pp.
- Au, D.W.T.,** 2004, The Application of Histo-Cytopathological Biomarkers in Marine Pollution Monitoring: A Review. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 817-834 pp.
- Ay, Ö., Kalay, M., Tamer, L. and Canlı, M.,** 1999, Copper and Lead Accumulation in Tissues of Freshwater Fish *Tilapia zilli* and its Effects on the Branchial Na, K-ATPase Activitiy. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 62, 160-168 pp.
- Banni, M., Dondero, F., Jebali, J., Guerbej, H., Boussetta, H. and Viarengo, A.,** 2007, Assessment of Heavy Metal Contamination Using Real-Time PCR Analysis of Mussel Metallothionein Mt10 And Mt20 Expression: A Validation Along The Tunisian Coast, *Biomarkers*, July – August, 12(4), 369 – 383 pp.
- Başçınar, S.N.,** 2009, Bentik Canlılar ve Biyoindikatör Tür, *SÜMAE YUNUS Araştırma Bülteni* 9, 1 s.
- Bebek, M.T.,** 2001, Ulubat Gölü ve Gölü Besleyen Su Kaynaklarında Ağır Metal Kirliliğinin Araştırılması, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Haziran, 16-65 s.
- Bebianno, M.J. and Serafim, M.A.,** 1998, Comparison Of Metallothionein Induction in Response to Cadmium in The Gills of The Bivalve Mollusc *Mytillus Galloprovincialis* and *Ruditapes Decussatus*, *Sci. Total Environ.*, 214, 123- 131 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Bodin, N., Burgeot, T., Stanisiere, J.Y., Bocquene, G., Menard, D., Minier, C., Boutet, L., Amat, A., Cherel, Y. and Budzinski, H.,** 2004, Seasonal Variations of a Battery of Biomarkers and Physiological Indices for The Mussel *Mytilus Galloprovincialis* Transplanted into The Northwest Mediterranean Sea, *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, 138, 411-27 pp.
- Bolognesi, C., Frenzilli, G., Lasagna, C., Perrone, E. and Roggieri, P.,** 2004, Genotoxicity Biomarkers in *Mytilus Galloprovincialis*: Wild Versus Caged Mussels, *Mutation Research*, 552, 153–162 pp.
- Boren, J. and Brindle, K.M.,** 2012. Apoptosis-Induced Mitochondrial Dysfunction Causes Cytoplasmic Lipid Droplet Formation, *Cell Death Differ*, 19, 1561-1570 pp.
- Brunner, M.,J, Sullivan, T.M. and Singer, A.W.,** 1996, An Assessment of The Chronic Toxicity and Oncogenicity of Arocolor 1016, Arocolor 1242, Arocolor 1254 and Arocolor 1260 Administered in Diet to Rats, Battelle Study, No: SC92192 Colombus, OH, USA.
- Box, A., Sureda, A., Galgani, F., Pons, A. and Deudero, S.,** 2007, Assessment of Environmental Pollution at Balearic Islands Applying Oxidative Stress Biomarkers in The Mussel *Mytilus Galloprovincialis*, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 146 , 531–539 pp.
- Cakal, A.O., Parlak, H., Katalay, S., Boyacioglu, M., Karaaslan, M A. and Guner, H.,** 2010, Detecting Micronuclei Frequency in Some Aquatic Organisms for Monitoring Pollution of Izmir Bay (Western Turkey), *EnvironMonit Assess*, 165, 55–66 pp.
- Carajaville, M.R, Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C. and Viarengo, A.,** 2000, The Use of Biomarkers to Assess The Impact of Pollution in Coastal Environments of The Iberian Peninsula: A Practical Approach, *Sei. Total Environ.*, 247: 295-311 pp.
- Caricato, R., Lionetto M.G. and Schettino T.,** 2010, Seasonal Variation of Biomarkers in *Mytilus Galloprovincialis* Sampled Inside and Outside Mar Piccolo of Taranto (Italy), *Chem Ecol* , 26: 143-53 pp.
- Carpenter, D.O.,** 1998, Polychlorinated Biphenyls and Human Health. *Int J Occup Med Environ Health* , 11: 291-303 pp.
- Chowdhury, I., Tharakan, B. and Bhat, G.K.,** 2008, Caspases An Update, *Comp Biochem Phys.*, 151: 10–27 pp.
- Clark, A.G.,** 1989, ‘The Comparative Enzymology of The Glutathione S-Transferases from Non- Vertebrate Organisms’, *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.*, 92, 419–446 pp.
- Çağlar, M.,** 1974, Omurgasız Hayvanlar, *Anatomi-Sistematik*, İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, İstanbul.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Dobson, S. and Van Esch, G.J.**, 1993, Polychlorinated Biphenyls and Terphenyls (Second Edition), Environmental Health Criteria 140. IPCS International Programme on Chemical Safety, 683 pp. World Health Organization, GENEVA.
- Dondero, F., Piacentini, L., Banni, M., Rebelo, M., Burlando, B. and Viarengo, A.**, 2005, Quantitative PCR Analysis of Two Molluscan Metallothionein Genes Unveils Differential Expression and Regulation, *Gene*, 345, 259–270 pp.
- Dydbukt, J.M., Ankarcrona, M., Burkitt, M., Sjöholm, A., Strom, K. and Orrenius, S., Nicotera, O.**, 1994, Different Prooxidant Levels Stimulate Growth, Trigger Apoptosis, or Produce Necrosis of Insulinsecreting RINm5F Cells, The Role of Intracellular Polyamines, *J. Biol. Chem.*, 269, 30553– 30560 pp.
- Egemen, Ö. ve Sunlu, U.**, 1996, Su Kalitesi, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları. No: 14, İzmir.
- Eisler, R.**, 1986, Chromium Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review, U.S. Fish And Wildlife Service Biological Report, 85, 60 pp.
- Environmental Protection Agency (EPA)**, 1999, Compendium Method TO-13A, Cincinnati, OH, USA.
- Erna, M., Harazono, A., Miyawaki, E. and Ogawa, Y.**, 1996, Developmental Toxicity of Mono-N-Benzyl Phthalate, One of The Major Metabolites of The Plasticizer N-Butyl Benzyl Phthalate in Rats, *Toxicology Letters*, 86, 19-25 pp.
- Esen, Ö.**, 2006, İzmir Körfezindeki Kara Midye *Mytilus Galloprovincialis* Lamarck, 1819 'de Bulunan Toksik Maddelerin Araştırılması, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Bornova- İzmir, 75 s.
- Farris, J.L. and Van Hassel, J.H.**, 2006, Freshwater Bivalve Ecotoxicology in Taylor and Francis Inc editors. CRC Press England.
- Fasulo, S., Mauceri, A., Giannetto, A., Maisano, M., Bianchi, N. and Parrino, V.**, 2008, Expression of Metallothionein mRNAs By In Situ Hybridization in The Gills of *Mytilus Galloprovincialis*, from Natural Polluted Environments, *Aquat. Toxicol.*, 88, 62–68 pp.
- Ferrarese, E., Andreottola, G. and Oprea, I.A.**, 2008, Remediation of PAH Contaminated Sediments By Chemical Oxidation. *Journal of Hazardous Materials*, 152, 128–39 pp.
- Fitzpatrick, P. J. and Sheehan, D.**, 1993, Separation of Multiple Forms of Glutathione S-Transferase from The Blue Mussel; *Mytilus Edulis*, *Xenobiotica* 23, 851–861 pp.
- Gaga, E.O.**, 2004, Investigation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Deposition in Ankara, Middle East Technical University, The Graduate School of Natural and Applied Sciences, Doktora Tezi, Ankara.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Galindo, P.T. and Moreira, M.L.**, 2009, Evaluation of Genotoxicity Using The Micronucleus Assay and Nuclear Abnormalities in The Tropical Sea Fish *Bathygobius Soporator* (Valenciennes, 1837) (Teleostei, Gobiidae), *Genetics and Molecular Biology*, 32: 394-398 pp.
- Gerhard, I., Monga, B., Waldbrenner, A. and Runnenbaum, B.**, 1998, Heavy Metals and Fertility. *J. Toxicol. Environ. Health*, 54, 593–611 pp.
- Gifondorwa, D.J. and Leise, E.M.**, 2006, Programmed Cell Death in The Apical Ganglion During Larval Metamorphosis of The Marine Mollusc *Ilyanassa Obsolete*, *Biol Bull*, 210: 109–120 pp.
- Goyer, R.A.**, 1986, Toxic Effects of Metals in Casarett and Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons, 3rd edition, MacMillan Publisng Company, New York.
- Grattarola, M., Carloni, M., Dondero, F., Viarengo, A. and Vergani, L.**, 2006, Expression, Purification and Preliminary Characterization of Mussel (*Mytilus Galloprovincialis*) Metallothionein MT20, *Mol. Biol. Rep.*, 33, 265–272 pp.
- Grisolia, K. C., Rivero, C. L. G., Starling, F. L. R. M., Silva, I. C. R., Barbosa, A. C. and Dorea, J. G.**, 2009, Profile of Micronucleus Frequencies and DNA Damage in Different Species of Fish in A Eutrophic Tropical Lake, *Genetics and Molecular Biology*, 32, 138-143 pp.
- Güvenç, D., ve Aksoy A.**, 2007, Poliklorlu Bifenillerin Toksikolojisi. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 2, 78 s.
- Hale, J., Smith, A., Sutherland, C., Stoneman, E.A. and Longthorne, L.**, 1996, Apoptosis: molecular regulation of cell death, *Eur J Biochem*, 236, 1–26 pp.
- Jaeschke, H.**, 2008, Chapter 13, Toxic Responses of The Liver, Casaret & Doull's Toxicology, The Basic Science of Poison, 7th Edition, Klassen, C.D., Ed., McGraw Hill.
- Jensen, S.**, 1966, Report of A New Chemical Hazard, *New Scientist*. 32, 312 p.
- John, D. A. and Leventhal, J. S.**, 1995, Bioavailability of Metals. in: du Bray, E. A. (Ed). Preliminary Compilation of Descriptive Geoenvironmental Mineral Deposit Models, U.S. Department of The Interior, U.S. Geological Survey, Denver, Colorado, 10-18 pp.
- Kägi, J.H.R.**, 1991, Overview of Metallothionein. in: Metallothionein and Related Molecules. Part B Metallobiochemistry, Riorda, J.F. and Valle, B.L. (Editors). Academic Press, 205, 613-626 pp.
- Karakaş, D.**, 2003, Ağır Metallerin Toksik Etkileri, TÜBİTAK-Marmara Araştırma Merkezi, Eğitim Notları.
- Kaya, S. ve Pirinçci, İ.**, 2002, Çevre Toksikolojisi, Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji, Medisan Yayınevi, Ankara, 731- 736 s.
- Kayhan, F. E., Balkıs, N., Aksu, A.**, 2006, İstanbul Balık Halinden Alınan Akdeniz Midyelerinde (*Mytilus galloprovincialis*) Arsenik Düzeyleri, *Ekoloji*, 15(61): 1-5 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kelly, K.J., Sandoval, R.M., Dunn, K.W., Molitoris, B.A. and Dagher, P.C.**, 2003, A Novel Method to Determine Specificity and Sensitivity of The TUNEL Reaction in The Quantitation of Apoptosis, *Am J Physiol Cell Physiol*, 284:C1309-C1318 pp.
- Koçbaşı, F.**, 2005, Kuzey Ege Kıyılarında Yayılış Gösteren *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) ve Ortam Sedimentlerinde Bazı Ağır Metal(Cu, Zn, Pb ve Cd) Dağılımlarının Araştırılması, Doktora Tezi, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Demirci/Manisa, 178 s.
- Koehler, A., Wahl, E. and Soeffker, K.**, 2002, Functional And Morphological Changes of Lysosomes As Prognostic Biomarkers of Toxic Liver Injury in A Marine Flatfish (*Platichthys flesus* L.), *Environ. Toxicol. Chem.*, 21 (11), 2434-2444 pp.
- Krabbenhoft, D. and Schuster, P.**, 2002, Atmospheric Mercury Deposition For The Last 270 Years: A Glacial Ice Core Record of Natural and Anthropogenic Sources, *Environ. Sci. Technol.*, 36 (11), 2303–2310 pp.
- Krishnakumar, P.K., Casillas, E. and Varanasi, U.**, 1994, Effect of Environmental Contaminants on The Health of *Mytilus Edulis* from Puget Sound, Washington, USA. 1. Cytochemical Measures of Lysosomal Responses in The Digestive Cells Using Automatic Image Analysis, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 106, 249-261 pp.
- Küçüksezgin, F., Kayatekin, B.M., Uluturhan, E., Uysal, N., Acikgoz, O. and Gonenc, S.**, 2008, Preliminary Investigation of Sensitive Biomarkers of Trace Metal Pollution in Mussel (*Mytilus Galloprovincialis*) From Izmir Bay (Turkey), *Environ Monit Assess*, 141, 339–345 pp.
- Lemoine, S., Bigot, Y., Sellos, D., Cosson R.P. and Laulier, M.**, 2000, Metallothionein Isoforms in *Mytilus Edulis* (Mollusca, Bivalvia): Complementary DNA Characterization and Quantification of Expression in Different Organs After Exposure to Cadmium, Zinc, and Copper, *Mar. Biotechnol.* (NY), 2, 195–203 pp.
- Lima, I., Moreira, S.M., Osten, J., Soares, A.M.V.M. and Guilhermino, L.**, 2007, Biochemical Responses of The Marine Mussel *Mytilus Galloprovincialis* to Petrochemical Environmental Contamination Along The North-Western Coast of Portugal, *Chemosphere*, 66, 1230–1242 pp.
- Lionetto, M.G., Caricato, R., Giordano, M.E. and Schettino, T.**, 2004, Biomarker Application for The Study of Chemical Contamination Risk on Marine Organisms in The Taranto Marine Coastal Area. *Chem Ecol*, 20: S333-43 pp
- Lionetto, M.G., Caricato, R., Giordano, M.E., Marinosci, L. and Schettino, T.**, 2003, Pascariello MF, Integrated Use of Biomarkers (Acetylcholinesterase and Antioxidant Enzyme Activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in An Italian Coastal Marine Area, *Mar Pollut Bull*, 46, 324-30 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Livingstone, D.R.**, 2001, Contaminant-Stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms, *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656–666 pp.
- Manduzio, H., Monsinjon, T., Galap, C., Leboulenger, F. and Rocher, B.**, 2004, Seasonal Variations in Antioxidant Defences in Blue Mussels *Mytilus Edulis* Collected from A Polluted Area: Major Contributions in Gills of An Inducible Isoform of Cu/Zn-Superoxide Dismutase and of Glutathione S-Transferase, *Aquatic Toxicology*, 70, 83–93 pp.
- Martinez, C.B.R., Nagae, M.Y., Zaia, C.T.B.V. and Zaia, D.A.M.**, 2004, Acute Morphological and Physiological Effects of Lead in the Neotropical Fish *Prochilodus lineatus*, *Brazilian Journal of Biology*, 64(4), 797-807 pp.
- Mayes, B.A., McConnell, E.E., Neal, B.H., Brunner, M.J., Hamilton, Z.B., Peters, A.C., Ryan, M.J., Toft, J.D., Singer A.W., Brown Jr., J.F., Menton, R.G. and Moore Jr., J.A.**, 1998, Comparative Carcinogenicity in Sprague-Dawley Rats of The Polychlorinated Biphenyl Mixtures Aroclor 1016, 1242, 1254, and 1260, *Toxicological Sciences*, 41, 62-76 pp.
- Means, J.C., Hasett, J.J., Wood, S.G. and Banwart, W.L.**, 1980, Sorption Properties of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons By Sediments and Soils, *Environ. sci. Technol.*, 14, 1524-1528 pp.
- Meister, A.**, 1989, On the biochemistry of glutathione. In: *Glutathione Centennial. Molecular Perspectives and Clinical Implications*, edited by N. Taniguchi, T. Higashi, S. Sakamoto and A. Meister. Academic Press, San Diego, CA, 3-22 pp.
- Mersh, J., Beauvais, M.N. and Nagel, P.**, 1996, Induction of Micronuclei in Haemocytes and Gill Cells of Zebra Mussels, *Dreissena Polymorpha*, Exposed to Clastogens. *Mutation Research*, 371, 47–55 pp
- Merlini, M.**, 1980, Some Considerations on Heavy Metals in the Marine Hydrosphere – Biosphere, *Thalassia Jugoslavica*, 16 (2 – 4), 367-376 pp.
- Moreira, S. M. and Guilhermino, L.**, 2005, The Use of *Mytilus Galloprovincialis* Acetylcholinesterase and Glutathione S-Transferases Activities as Biomarkers of Environmental Contamination Along the Northwest Portuguese Coast, *Environmental Monitoring and Assessment*, 105, 309–325 pp.
- Mourgaud, Y., Martinez, E., Geffard, A., Andral, B., Stanisiere, J.Y. and Amiard, J.C.**, 2002, Metallothionein Concentration in The Mussel *Mytilus Galloprovincialis* As A Biomarker of Response to Metal Contamination: Validation in The Field, *Biomarkers*, 7, 479-490 pp.
- Mutluay, H. ve Demirak., A.**, 1996, Su Kimyası, Beta Basım Yayım Dağıtım AŞ, İstanbul.
- Nasci, C., Nesto, N., Monteduro, R.A. and Da Ros, L.**, 2002, Field Application of Biochemical Markers and A Physiological Index in The Mussel, *Mytilus Galloprovincialis*: Transplantation and Biomonitoring Studies in The Lagoon of Venice (NE Italy). *Mar. Environ. Res.* 54, 811–816 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Newman, M.C.**, 2010. Fundamentals of Ecotoxicology, Third Edition. Taylor & Francis/CRC Press, Boca Raton, FL.
- Oakley, G.G., Devanaboyina, U., Robertson, L.W. and Gupta, R.C.**, 1996, Oxidative DNA Damage Induced By Activation of Polychlorinated Biphenyls (Pcbs): Implications for PCB Induced Oxidative Stress in Breast Cancer, *Chem Res Toxicol.* 9 , 1285-1292 pp.
- O'Brien M., Okragly A., Warner T., Kalil R. and Wolswijk G.**, 1998, DeadEnd™ Colorimetric Apoptosis Detection System: Applications in Pathology. *Promega Notes*, 69, 2-5 pp.
- OECD**, 2011, OECD Council Working Party on Shipbuilding (WP6) The Shipbuilding Industry in Turkey.
- Peakall, D. B.**, 1992, Animal Biomarkers as Pollution Indicators, Chapman and Hall, London.
- Picker, M.D. and Griffiths, C.L.**, 2011, Alien and Invasive Animals – A South African Perspective. Randomhouse/Struik Cape Town. 240 pp.
- Plaa, G.L. and Charbonneau, M.**, 2008, Deetection and Evaluation of Chemically Induced Liver Injury, Principles and Methods of Toxicology, 5th Edition, Chapter 29, Hayes W, editor New York, NY, USA: Raven Press, 1145–1178 pp.
- Porte, C., Sole', M., Albaiges, J. and Livingstone, D.R.**, 1991, Responses of Mixed-Function Oxygenase and Antioxidase Enzyme System of *Mytilus sp.* to Organic Pollution, *Comp. Biochem. Physiol.*, 100C, 183–186 pp.
- Porte, C., Soleâ, M., Borghi, V., Martinez, M., Chamorro, J., Torreblanca, A., Ortiz, M., Orbea, A., Soto, M. and Cajaraville M. P.**, 2001, Chemical , Biochemical and Cellular Responses İn The Digestive Gland Of The Mussel *Mytilus Galloprovincialis* from The Spanish Mediterranean Coast, *Biomarkers*, vol. 6, no. 5, 335-350 pp
- Rainbow, P.S. and Phillips, D.J.H.**, 1993, Cosmopolitan Biomonitors of Trace Metals, *Marine Pollution Bulletin*, 26, 11, 593-601 pp.
- Ramsak, A., Scancar, J. and Horvat, M.**, 2012, Evaluation of Metallothioneins in Blue Mussels (*Mytilus galloprovincialis*) as a Biomarker of Mercury and Cadmium Exposure in the Slovenian waters (Gulf of Trieste): A Long-term Field Study, *Acta Adriat.*, 53(1): 71 – 86 pp.
- Rand, G.M., and Petrocelli, S.R.**, 1985, Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications, McGraw-Hill International, Washington, DC, 666 pp.
- Rand, G.M.**, 1995, Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment, Taylor and Francis, Washington, D.C.
- Rank, J., Lehtonen, K.K., Strand, J. and Laursen, M.**, 2007, DNA Damage, Acetylcholinesterase Activity and Lysosomal Stability in Native and Transplanted Mussels (*Mytilus Edulis*) in Areas Close to Coastal Chemical Dumping Sites in Denmark, *Aquatic Toxicology*, 84, 50–61 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Raspor, B., Dragun, Z., Erk, M., Ivankovic, D. and Pavicic, J.,** 2004, Is The Digestive Gland of *Mytilus Galloprovincialis* a Tissue of Choice for Estimating Cadmium Exposure by Means of Metallothioneins?, *Sci. Total Environ.*, 333, 99–108 pp.
- Regoli, F.,** 1992, Lysosomal Responses As A Sensitive Stress Index in Biomonitoring Heavy Metal Pollution, *Mar. Ecol. Prog.*, 84, 63-69 pp.
- Regoli, F. and Principato, G.,** 1995, Gluatathione, Glutathione-Dependent and Antioxidant Enzymes in Mussel, *Mytilus Galloprovincialis*, Exposed to Metal Under Field and Laboratory Conditions: Implications for The Use of Biochemical Biomarkers, *Aquatic Toxicol.* 31, 143–164 pp.
- Remeo, M. and Gnassia-Barelli, M.,** 1997, Effect Of Heavy Metals On Lipid Peroxidation In The Mediterranean Clam *Ruditapes Decussatus*, *Comp. Biochem. Physiol.*, C 118, 33–37 pp.
- Riedl, S.J. and Shi, Y.,** 2004, Molecular Mechanisms of Caspase Regulation During Apoptosis, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 5: 897–907 pp.
- Roesijadi, G.,** 1996,. Metalothionein and Its Role in Toxic Metal Regulation, *Comp. Biochem. Physiol.*, 113C, 117-123 pp.
- Roméo, M., Mourgaud, Y., Geffard, A., Gnassia-Barelli, M., Amiard, J.C. and Budzinski, H.,** 2003, Multimarker Approach in Transplanted Mussels for Evaluating Water Quality in Charentes, France, Coast Areas Exposed to Different Anthropogenic Conditions, *Environmental Toxicology*, Vol. 18, 5, 295-305 pp.
- Romero, A., Este´vez-Calvar, N., Dios, S., Figueras, A. and Novoa, B.,** 2011, New Insights into the Apoptotic Process in Mollusks: Characterization of Caspase Genes in *Mytilus galloprovincialis*, *PLoS ONE*, 6 (2): 17003 pp.
- Sarkar, A., Ray, D. and Shrivastava, A.N.,** 2006, Molecular Biomarkers: Their Significance and Application in Marine Pollution Monitoring, *Ecotoxicology*, 15, 333-340 pp.
- Sato, M. and Bremner, I.,** 1993, Oxygen Free Radicals and Metallothionein, *Free Radic. Biol. Med.*, 14, 325– 337 pp.
- Seo, W.K., Kim, B.K., Kim, J.Y., Choi, Y.J., Lee, T.K. and Choi, S.K.,** 2004, Comparison of oxidative stress and changes of xenobiotic metabolizing enzymes induced by phthalates in rats, *Food and Chemical Toxicology*, 42, 107-114 pp.
- Seyran A. ve Erişir, M.,** 2008, M. Poliklorlu Bifeniller ve Sağlık Üzerine Etkileri, *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 22(1), 33-40 s.
- Sokolova, I.M.,** 2009, Apoptosis in Molluscan Immune Defense, *Inv Survival J.*, 6: 49–58 pp.
- Sridevi, B., Reddy, K.V. and Reddy, S.L.N.,** 1998, Effect of Trivalent and Hexavalent Chromium on Antioxidant Enzyme Activities and Lipid Peroxidation in A Freshwater Field Crab, *Barytelphusa Guerini*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 384–390 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Sureda, A., Box, A., Tejada, S., Blanco, A., Caixach, J. and Deudero, S.,** 2011, Biochemical Responses of *Mytilus Galloprovincialis* As Biomarkers of Acute Environmental Pollution Caused by The Don Pedro Oil Spill (Eivissa Island, Spain), *Aquatic Toxicology*, 101, 540–549 pp.
- Stegeman, J.J., Brouwer, M., Richard, T.D.G., Forlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M. and Van Veld, P.A.,** 1992, Molecular Responses to Environmental Contamination: Enzyme and Protein Systems as Indicators of Chemical Exposure and Effect, in *Biomarkers, Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*, Huggett, R. J., Kimerly, R. A., Mehrle, P. M., and Bergman, H. L., Eds., Lewis, Chelsea, MI, 235–335 pp.
- Synder, C.A. and Valle, C.D.,** 1991, Immune Function Assays as Indicators of Chromate Exposure, *Environmental Health Perspectives*, 92, 83-86 pp.
- Sweet, L.I., Passino-Reader, Meier, P.G. and Omann, G.M.,** 1999, Xenobiotic Induced Apoptosis: Significance and Potential Application As A General Biomarker of Response, *Biomarkers*, 4, 237-253 pp.
- Terahara, K. and Takahashi, K.,** 2008, Mechanisms and Immunological Roles of Apoptosis in Molluscs, *Curr Pharm Design*, 14: 131–137 pp.
- Terman, A. and Brunk, U.T.,** 2004, Lipofuscin, *The Int. J. Biochem, Cell Biol.* 36, 1400 – 1404 pp.
- Thomas, P.,** 1990, Molecular and Biochemical Responses of Fish to Stressors and Their Potential Use in Environmental Monitoring, *Am. Fish. Soc. Symp.*, 8, 9-20 pp.
- Thomas, P. and Wofford, H.W.,** 1993, Effects of Cadmium and Aroclor 1254 on Lipid Peroxidation, Glutathione Peroxidase Activity and Selected Antioxidants in Atlantic Croaker Tissues. *Aquat. Toxicol.* 27, 159–178 pp.
- Topcuoğlu, S.,** 2005. Denizel Biota Örneklerinde Ağır Metal Kontaminasyonu. In: Güven, K. C., Öztürk, B. (Ed), *Deniz Kirliliği Temel Kirleticiler ve Analiz Yöntemleri*, TÜDAV Yayınları, İstanbul, 205-223 s.
- Tsangaris, C., Kormas, K., Stroglyoudi, E., Hatzianestis, I., Neofitou, C., Andral, B. and Galgani, F.,** 2010, Multiple Biomarkers of Pollution Effects in Caged Mussels On The Greek Coastline, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, Vol. 151, 3, 369-378 pp.
- Türkiye Çevre Sorunları Vakfı,** 1989, *Türkiye Çevre Sorunları Envanteri*, Ankara.
- UNEP/RAMOGÉ,** 1999, *Manual on The Biomarkers Recommended for The MED POL Biomonitoring Programme*. UNEP, Athens, 94 p.
- U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry,** 2012, *Toxicological Profile For Cadmium*, Atlanta, Georgia.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- UYSAL, H.**, 1974, Çeşitli Bölgelerdeki *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck)' de Bazı Eser Elementlerin Distribüsyonu. E. Ü. Fen Fakültesi İlimi Raporlar Serisi No: 165 s.
- Uzunoğlu, O.**, 1999, Gediz Nehrinden Alınan Su ve Sediment Örneklerinde Bazı Ağır Metal Konsantrasyonlarının Belirlenmesi, Celal Bayar Üniversitesi, , Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Manisa, 12-73 s.
- Van der Oost, R., Beyer, J. and Vermeulen, N.P.E.**, 2003, Fish Bioaccumulation and Biomarkers in Environmental Risk Assessment: A Review, Environ. Toxicol. Pharmacol., 13, 57–149 pp.
- Venier, P., Maron, S. and Canova, S.**, 1997, Detection of Micronuclei in Gill Cells and Haemocytes of Mussels Exposed to Benzo[a]pyrene. Mutation Research, 390, 33–44 pp.
- Vergani, L.**, 2009, Metallothioneins in Aquatic Organisms: Fish, Crustaceans, Molluscs, and Echinoderms, Met. Ions Life Sci., 5, 199–237 pp.
- Viarengo, A., Burlando, B., Dondero, F., Marro, A. and Fabbri, R.**, 1999. Metallothionein as a Tool in Biomonitoring Programmes, Biomarkers 4, 455-467 pp.
- Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N. and Panfoli, I.**, 2000, Antioxidant Role of Metallothioneins: A Comparative Overview, Cell. Mol. Biol., 46: 407–417 pp.
- Vioque-Fernández A., Alves de Almeida E., Ballesteros J., García- Barrera T., Gómez-Ariza J.L. and López-Barea, J.**, 2007, Dónana National Park Survey Using Crayfish (*Procambarus clarkii*) As Bioindicator: Esterase Inhibition and Pollutant Levels. Toxicol Lett, 168, 260-8 pp.
- Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullas, M.J. and Valavanidis, A.**, 2007, Integrated Use of Biomarkers (Superoxide Dismutase, Catalase And Lipid Peroxidation) in Mussels *Mytilus Galloprovincialis* For Assessing Heavy Metals' Pollution in Coastal Areas From The Saronikos Gulf of Greece, Marine Pollution Bulletin, 54, 1361–1371 pp.
- Vural, N.**, 2005, Toksikoloji, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No;73.
- Wang, J.S., Chou, H.N. Fan, J.J., and Chen, C.M.**, 1998, Uptake and Transfer of High PCB Concentrations from Phytoplankton to Aquatic Biota, Chemosphere, 36 ,6, 1201-1210 pp.
- Webb, D. and Gagnon, M.M.**, 2002, Biomarkers of Exposure in Fish Inhabiting the Swan- Canning Estuary Western Australia-a Preliminary Study, Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery, 259-269 pp.
- Wenzl, T., Simon, R., Anklam, E. and Kleiner, J.**, 2006, Analytical Methods for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Food and The Environment Needed for New Food Legislation in The European Union, Trends in Analytical Chemistry, 25, 716-725 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- WHO**, 1976, Environmental Health Criteria 1, Mercury, Feb.1975 WHO Meeting, GenevaFood and Drug Administration (FDA).
- Yiğit, S. and Altındağ, A.**, 2002, Accumulation of Heavy Metals in The Food Web Components of Burdur Lake, Turkey, Fresenius Environmental Bulletin, 11, 12 pp.
- Yoo, B.S., Jung K.H., Hana S.B. and Kim H.M.**, 1997, Apoptosis-Mediated Immunotoxicity of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) in Murine Splenocytes. Toxicol Lett, 91, 83-89 pp.
- Zorita, I., Apraiz, I., Ortiz-Zarragoitia, M., Orbea, A. and Cancio, I.**, 2007, Assessment of Biological Effects of Environmental Pollution Along The NW Mediterranean Sea Using Mussels as Sentinel Organisms, Environ Pollut., 148: 236–250 pp.

ÖZGEÇMİŞ

21.05.1988 yılında Kocaeli’de doğan Dilara ÖZKAN 2006 yılında Kocaeli 16 Mart Anadolu Öğretmen Lisesi’nden mezun olmuştur. Aynı yıl girdiği Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde eğitimine devam ettiği sırada Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ve TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Çevre Ve Temiz Üretim Enstitüsü, Deniz ve İçsular Laboratuvarı’nda staj eğitimlerini tamamlamış 2011 yılında üniversiteden mezun olmuştur.

EKLER

Ek 1 Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Balıkçılık ve Su Ürünleri Genel Müdürlüğü
İzni

Ek 2 Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü
İzni

Ek 2 Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü İzni



T.C.
ORMAN VE SU İŞLERİ BAKANLIĞI
Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü



Sayı : 72784983-488.04-15754
Konu: Araştırma İzinleri

23.01.2013

EGE ÜNİVERSİTESİNE
Fen Fakültesi Dekanlığı
35100 Bornova/İZMİR

İlgi : 11.01.2013 tarihli ve 112 sayılı yazı

Üniversiteniz, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU'nun liderliğinde yürütülecek olan 'Biyomonitorizasyon İle Aliğa Körfezi Toksikitesinin Değerlendirilmesi' konulu proje kapsamında araştırmacı personel tarafından yapılması planlanan arazi çalışmaları ile ilgili Bilimsel Araştırma İzin Başvurusu Genel Müdürlüğümüz yetki ve sorumlulukları çerçevesinde incelenmiş olup, buna göre;

- Çalışmaların sahada bulunan flora, fauna, doğal ve kültürel değerlere zarar vermeyecek şekilde yapılması,
 - Arazi çalışmalarının yapılacağı İlin Valiliğine İlçenin ise Kaymakamlığına bilgi verilmesi,
 - Çalışmalar kapsamında toplanacak örneklerde temsil edici yeterlilikte miktarın aşılması ve bu örneklerin Genel Müdürlüğümüz onayı alınmadan yurtdışına çıkarılmaması,
 - Araştırma ara ve sonuç raporlarının basılı ve dijital ortamda birer kopyasının Genel Müdürlüğümüze gönderilmesi,
- koşuluyla bahse konu çalışmaların yapılması Genel Müdürlüğümüzce uygun görülmüş olup, izin belgeleri ekte gönderilmektedir.

Gereğini rica ederim.

Güvenli Elektronik İmzalı
Aslı ile aynıdır
Selim YILMAZ
Büro Personeli

EĞ. FEN FAKÜLTESİ	
Tarih:	28 Ocak 2013
İlçe:	SİĞ
Dosya No:	
Çelik İşleri	
Öğrenci İşleri	
Arazi İşleri	04
Masaç Servisi	
Muhasebe	
Yeni Yat.	
Yayın- Projeler	
Kütüphane	
Evrak Kayıt	
İdari Hizmetler	
Özel Kalem 1	
Özel Kalem 2	
Halkla İlişkiler	
Döner Sermaye	
İ. S. Şişirina-Malbao	

Mustafa AKINCIOĞLU
Bakan a.
Genel Müdür Yardımcısı

EKLER :
1- 1 takım izin doyası.

Bu evrak 5070 sayılı Elektronik İmza Kanunu'na göre elektronik olarak imzalanmıştır.
Evrak doğrulama adresi: <http://ebys.ormansu.gov.tr/Dogrulama.aspx?p=581772>

Adres : Soğutözü Cad. No:14/E Beştepe 06560 Yenimahalle -
ANKARA
Telefon :
e-posta : nbahce@cevreorman.gov.tr

Ayrıntılı Bilgi : N. BAHÇE Çevre Mühendisi
Fax :
Elektronik Ağ: www.ormansu.gov.tr

