

**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ZOOOTEKNİ ANABİLİM DALI**

**FARKLI İKİ AĞIR METALE (BAKIR VE ÇİNKO)  
MARUZ KALAN TIBBİ SÜLÜKLERDE (*HİRUDO  
VERBANA*) SALYA ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan  
Ebubekir ATICI**

**Danışman  
Prof. Dr. Erdal YILMAZ**

**Yüksek Lisans Tezi**

**EYLÜL 2022  
KAYSERİ**



**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ZOOOTEKNİ ANABİLİM DALI**

**FARKLI İKİ AĞIR METALE (BAKIR VE ÇİNKO)  
MARUZ KALAN TIBBİ SÜLÜKLERDE (*HİRUDO  
VERBANA*) SALYA ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİN  
ARAŞTIRILMASI  
(Yüksek Lisans Tezi )**

**Hazırlayan  
Ebubekir ATICI**

**Danışman  
Prof. Dr. Erdal YILMAZ**

**Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FYL-2020-10072 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**EYLÜL 2022  
KAYSERİ**

## **BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK**

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Ebubekir ATICI

“Farklı İki Ağır Metale (Bakır ve Çinko) Maruz Kalan Tıbbi Sülüklerde (*Hirudo Verbana*) Salya Antimikrobiyal Özelliklerin Araştırılması” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.

**Hazırlayan**

Ebubekir ATICI

**Danışman**

Prof. Dr. Erdal YILMAZ

**Zootekni ABD Başkanı**

Prof. Dr. Mehmet Ulaş ÇINAR

İmza



## TEŞEKKÜR

Bana çalıŐmalarım sűresince her tűrlű yardımı ve fedakârlığı saėlayan, tez çalıŐmasının seçiminde, yűrűtűlmesinde, sonuçlandırılmasında ve sonuçların deėerlendirilmesinde destek ve yardımlarını esirgemeyen deėerli hocam Prof. Dr. Erdal YILMAZ'a, çalıŐma sűrecinde destek saėlayan Dr. Őėr. Ŭyesi Fatih Doėan KOCA'ya, istatistik hesaplamaları aŐamasında destek olan Dr. Őėr. Ŭyesi Gencay EKİNCİ'ye teŐekkűr ederim.

ÇalıŐma sűrecinde gerekli kolaylıkları gűsteren Kayseri İl Tarım ve Orman Műdűrlűėű, Balıkçılık ve Su Ŭrűnleri Őube Műdűrű Bűlent CANATAN'a, yazma ve dűzenleme konusunda yardımcı olan Dr. Bekir DOėAN'a, sűrekli motivasyon kaynaėım Su Ŭrűnleri Yűksek Műhendisi Ufuk TARIM'a çalıŐmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen birim arkadaŐlarım Seda CENGİZ ve AyŐenur APAYDIN'a, tez çalıŐmasında kullanılan sűlűklerin temini ve sűlűk salyalarının alınmasında yardımlarını esirgemeyen Ahmet EKREN'e teŐekkűr ederim.

Tez çalıŐmam sűresince yanımda olan sevgili annem Birsel ATICI ve babam Saim ATICI'ya, abim Mus'ab ATICI ve eŐi Gűlseda ATICI'ya sonsuz teŐekkűr ederim.

Ebubekir ATICI

Eylűl 2022, KAYSERİ

**FARKLI İKİ AĞIR METALE (BAKIR VE ÇİNKO) MARUZ KALAN TIBBİ  
SÜLÜKLERDE (*HIRUDO VERBANA*) SALYA ANTİMİKROBİYAL  
ÖZELLİKLERİN ARAŞTIRILMASI**

**Ebubekir ATICI**

**Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü  
Yüksek Lisans Tezi, EYLÜL 2022  
Danışman: Prof. Dr. ERDAL YILMAZ**

**ÖZET**

Araştırmada çinko ve bakır metallerinin farklı konsantrasyonlarının tıbbi sülüklerde salya antimikrobiyal özellikleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu amaçla 300 adet *Hirudo verbana* türü sülük kullanıldı. 10 Litre suya 15 adet olacak şekilde stoklanan tıbbi sülükler bakır ve çinko metallerinin letal dozların altında belirlenen farklı iki doza maruz bırakılmıştır. Bu dozlar çinko için 96 saat boyunca 3,0 mg/L ile 12 mg/L ve 30 gün boyunca 0,5 mg/L ile 2,0mg/L olarak uygulanmıştır. Bakır için ise 96 saat boyunca 0,15 mg/L ile 0,6 mg/L ve 30 gün boyunca 0,02 mg/L ile 0,08 mg/L konsantrasyonda bakır içeren çözeltilere maruz bırakıldı. Bu uygulamalardan sonra sülüklerden alınan salya örneklerinin antimikrobiyal karakteristiği antibiyogram çalışmaları ile belirlenmeye çalışılmıştır. Salyaları alınan sülük dokularında bakır ve çinko için biriken ağır metal miktarları ICP-MS cihazı ile analiz edilerek belirlenmiştir. Ayrıca salyada lipid peroksidasyon düzeyleri malondialdehide (MDA) miktarları analiz edilerek ortaya konuldu. Çalışmada balık patojenlerinden *Lactococcus garviae* ve *Yersinia ruckeri*' ye karşı sülük salyasının herhangi bir antimikrobiyal etki göstermediği belirlenmiştir. Tıbbi sülüklerin çinko ve bakır metallerine maruz kaldıklarında dokularında depolanan ağır metal miktarlarının arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca çinko ve bakırın farklı konsantrasyon ve sürelerde maruziyetinde sülük salyasında malondialdehit değerlerinin de artış gösterdiği bulunmuştur. Elde edilen verilerden *Hirudo verbana* türü tıbbi sülüğün çinko ve bakır ağır metalleri için iyi bir biyo-monitör organizma olduğu ortaya konmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Tıbbi sülük, *Hirudo verbana*, antimikrobiyal, salya, ağır metal, antibiyogram, malondialdehide



**INVESTIGATION OF SALIVA ANTIMICROBIAL PROPERTIES IN  
MEDICAL LEECHES (*HIRUDO VERBANA*) EXPOSED TO TWO DIFFERENT  
HEAVY METALS (COPPER AND ZINC)**

**Ebubekir ATICI**

**Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Master Thesis, SEPTEMBER 2022  
Supervisor: Prof. Dr. Erdal YILMAZ**

**ABSTRACT**

In the study, the effects of different concentrations of zinc and copper metals on the antimicrobial properties of saliva in medicinal leeches were investigated. For this purpose, 300 *Hirudo verbana* leeches were used. Medical leeches, which were stocked as 15 pieces in 10 liters of water, were exposed to two different doses of copper and zinc metals, which were determined below the lethal doses. These doses were 3,0 mg/L to 12 mg/L for 96 hours and 0,5 mg/L to 2,0 mg/L for 30 days for zinc. For copper, it was exposed to copper-containing solutions at a concentration of 0,15 mg/L to 0,6 mg/L for 96 hours, and at a concentration of 0,02 mg/L to 0,08 mg/L for 30 days. After these applications, antimicrobial characteristics of saliva samples taken from leeches were tried to be determined by antibiogram studies. Heavy metal amounts accumulated in leech tissues from which saliva was taken were analyzed by ICP-MS device and accumulation amounts for copper and zinc were determined. In addition, lipid peroxidation levels in the saliva were determined by analyzing the amount of malondialdehyde (MDA). In the study, it was determined that the leech saliva did not show any antimicrobial effect against the fish pathogens *Lactococcus garviae* and *Yersinia ruckeri*. It has been determined that when medical leeches are exposed to zinc and copper metals, the amount of heavy metals stored in their tissues increases. In addition, it was found that malondialdehyde values in leech saliva increased when zinc and copper were exposed at different concentrations and durations. From the data obtained, it was revealed that medicinal leech of the *Hirudo verbana* species is a good biomonitor organism for zinc and copper heavy metals.

**Keywords:** Medicinal leech, *Hirudo verbana*, antimicrobial, saliva, heavy metal, antibiogram, malondialdehyde

## İÇİNDEKİLER

### FARKLI İKİ AĞIR METALE (BAKIR VE ÇİNKO) MARUZ KALAN TIBBİ SÜLÜKLERDE (*HİRUDO VERBANA*) SALYA ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİN ARAŞTIRILMASI

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	iii
KABUL VE ONAY .....	iv
TEŞEKKÜR .....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT .....	vii
İÇİNDEKİLER .....	viii
KISALTMALAR .....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiii
GİRİŞ .....	1

## 1. BÖLÜM

### GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Problem Durumu .....	18
1.2. Araştırmanın Amacı .....	21
1.3. Araştırmanın Önemi.....	22

## 2. BÖLÜM

### YÖNTEM VE MATERYAL

2.1. Yöntem .....	24
2.2. Materyal.....	25
2.2.1. Sülük Bakım Koşulları ve Yaşam Ortamı .....	25
2.2.2. Ağır Metal Analizleri .....	27
2.2.3. Antimikrobiyal Analizler.....	28
2.2.5. Malondialdehit (MDA) Analizleri.....	29
2.2.4. İstatistiksel Analizler.....	30

### 3. BÖLÜM

#### BULGULAR

3.1 Tıbbi Sülüklerin Canlı Ağırlık ve Yaşama Oranları .....	31
3.2. Ağır Metal Analiz Sonuçları .....	31
3.3. MDA Sonuçları.....	37
3.4. Antimikrobiyal Analiz Sonuçları.....	40

### 4.BÖLÜM

#### TARTIŞMA-SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1. Tartışma .....	43
4.2. Sonuçlar ve Öneriler .....	47
KAYNAKÇA .....	49
ÖZGEÇMİŞ.....	59

## KISALTMALAR

<sup>0</sup>C: Santigrat Derece

µg: Mikrogram

µm: Mikrometre

AMC: Amoksisilin - Klavulanik Asit

AML: Amoksisilin

As: Arsenik

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü)

CN: Gentamisin

CU: Bakır

CuSO<sub>4</sub>: Bakırsülfat

DD: Düşük Doz

DO: Doksisiklin

E: Eritromisin

ENR: Enroflaksasin

ERÜ: Erciyes Üniversitesi

Fe: Demir

g: Gram

H: Hidrojen

H<sub>2</sub>O: Dihidrojen Monoksit

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Dihidrojen Peroksit

Hgb: Hemoglobin

HNO<sub>3</sub>: Nitrik Asit

IBM- SPSS: International Business Machines Statistical Package for the Social Sciences

ICP-MS: Inductively coupled plasma mass spectrometry (İndüksiyonla birleşmiş plazma kütle spektrometrisi)

IUCN: International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (Dünya Doğayı ve Doğal Kaynakları Koruma Birliği)

L: Litre

M.Ö.: Milattan Önce

M.S.: Milattan Sonra

MDA: Malondialdehit

mg: Miligram

MHA: Mueller - Hinton Agar

mL: Miligramlitre

N: Azot

nm: Nanometre

O: Oksijen

OA: Okzolinik Asit

OT: Oksitetrasiklin

Pb: Kurşun

ppm: Parts Per Million (milyonda bir)

rpm: Revolutions per minute (Bir dakika da dönme sayısı)

S: Kükürt

SD: Standart Sapma

SXT: Trimetoprim-Sülfametoksazol

TBA: Tiyobarbitürik Asit

TCA: Trikloroasetik Asit

TSA: Triptikaz Soya Agar

vd.: Ve Diğerleri

YD: Yüksek Doz

ZN: Çinko

Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>: Çinko Nitrat

ZNSO<sub>4</sub>: Çinko Sülfat

**TABLULAR LİSTESİ**

Tablo 1.Sülük Taksonomi Tablosu .....	5
Tablo 2.Sülük salgısında bulunan bazı biyoaktif maddeler ve etkileri .....	13
Tablo 3. Sülük tedavisinde endikasyon ve kontrendikasyonlar .....	17
Tablo 4. Tıbbi sülüklerde uygulanacak çinko ve bakır metallerinin sürelerle bağlı doz grupları .....	25
Tablo 5. Düşük ve yüksek doz çinko nitrat uygulamalarında 96. Saat sonunda çinko, demir, bakır, arsenik ve kurşun (ppm) değişkenlerin karşılaştırılması .....	32
Tablo 6. Düşük ve yüksek doz bakır sülfat uygulamalarında 96. Saat çinko, demir, bakır, arsenik ve kurşun (ppm) değişkenlerin karşılaştırılması .....	34
Tablo 7. Düşük ve yüksek doz çinko nitrat uygulamalarında 30 gün sonunda çinko, demir, bakır, arsenik ve kurşun (ppm) değişkenlerin karşılaştırılması .....	35
Tablo 8. Düşük ve yüksek doz bakır sülfat uygulamalarında 30 gün sonunda çinko, demir, bakır, arsenik ve kurşun (ppm) değişkenlerin karşılaştırılması .....	37
Tablo 9. Gruplar arası 96. saat salya MDA değişkenlerin karşılaştırılması.....	38
Tablo 10. Gruplar arası 30. gün MDA değişkenlerin karşılaştırılması.....	40

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. <i>Hirudo verbana</i> ve <i>Hirudo medicinalis</i> genel görünüşleri.....	6
Şekil 2. Sülük anatomisinin genel görünümü .....	7
Şekil 3. (a) <i>Hirudo verbana</i> kitellum bölgesi ve gonoporlar, (b) Süngerimsi <i>Hirudo verbana</i> kokonu.....	12
Şekil 4. Gruplandırılmış sülüklerin plastik kaplarda oluşturulan yaşam ortamı.....	25
Şekil 5. Sülüklere kusturma işlemi öncesi soğuk duş uygulaması.....	26
Şekil 6. Sülüklere kusturma işlemi yapılması .....	27
Şekil 7. Kusturma sonrası elde edilen salyalar ve gruplandırılması .....	27
Şekil 8. Sülük salyasının steril boş disklerle emdirilmesi.....	28
Şekil 10. MDA analizleri için salya örneklerine solüsyon eklenmesi .....	29
Şekil 11. Sülük salyası ilave edilen besi yerinde (TSA) herhangi bir koloninin oluşmadığını gösterir fotoğraf.....	40
Şekil 12. Çalışmanın antimikrobiyal bölümünde kullanılan <i>Lactococcus garviae</i> kolonileri .....	41
Şekil 13. Çalışmanın antimikrobiyal bölümünde kullanılan <i>Yersinia ruckeri</i> kolonileri	41
Şekil 14. Mik yöntemine göre sülük salyalarının <i>Lactococcus garviae</i> suşları üzerine etkileri .....	42
Şekil 15. Mik yöntemine göre sülük salyalarının <i>Yersinia ruckeri</i> suşları üzerine etkileri .....	42

## GİRİŞ

Günümüzde çevre kirliliği her geçen gün artmakta ve biyolojik varlıkları tehdit etmektedir. Çevre kirliliği, en yıkıcı hasarı sucul ekosistemlere vermektedir. Sucul ekosistemlere zarar veren kirleticilerin başında evsel ve endüstriyel atıklar gelmektedir. Su ekosisteminde bulunan en önemli çevresel kirleticilerden biri de ağır metallerdir. Ağır metaller; iyon vererek (+) değerlikli hale geçebilen, ametallerle bileşik oluşturabilen fakat kendi aralarında böyle bir karaktere sahip olmayan, normal şartlarda katı formda olan maddeler olarak tanımlanabilir. Ağır metallerin tamamı canlı organizmalar için birer tehlikedir. Ağır metaller deniz, göl ve akarsularda fazla miktarlarda bulduklarında suda yaşayan organizmalar tarafından bünyelerine alınırlar (Akçalı ve Küçüksezgin, 2009; Richetti vd., 2011; Oliva vd., 2012). Toksik olarak nitelendirilen bu ağır metaller sucul canlıların özellikle metabolik olarak aktif organlarında birikme eğilimi gösterirler. Söz konusu kirletici etkenler hedef organ ve dokularda birikerek yapısal ve fonksiyonel mekanizmalara hasar vermektedirler (Hsu vd., 2013; Pereira vd., 2013). Sabit ve devamlı bir şekilde çevre kirleticileri olarak tanımlanan ağır metallerin miktarlarının azaltılması oldukça güç olduğundan her geçen gün birikimleri de artmaktadır. Su ekosistemlerinde iz miktarlarda bulunan bu elementlerin canlı organizmalardaki birikimleri ve doğal seviyeleri birbirinden oldukça farklılıklar gösterir. Ağır metaller doğrudan çevre kirliliği etkenidir ve bunların çok az miktarları bile suda yaşayan canlılarda birikim eğilimindedir. Bu durumun bir sonucu olarak besin zincirinin tepesinde olan insanlar tarafından tüketildiklerinde de birikim yaparlar. Kritik sınırları aşan bu birikimler insanlarda da toksik etkilere neden olurlar.

Söz konusu toksik etkiler, endüstrileşmenin önlenemez hızı ile birlikte ağır metallerin kullanımı sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu ağır metallerin çok düşük konsantrasyonları bile toksik olabilmektedir (Rainbow, 1988). Bu toksikasyonun derecesi canlılar arasında oldukça farklılık göstermektedir. Su ekosistemi ağır metallerin en çok birikim yaptığı sistemler olduğundan, bu kirleticilerin etkileri daha çok balıklar



üzerinden belirlenmeye çalışılmıştır (Madhavan ve Elumalai, 2016; Ubani-Rex vd., 2017; Arafa vd., 2015). Balıkların yanı sıra denizel veya tatlı su ekosistemlerinde yaşayan midye, istiridye ve deniztarakları gibi çift kabuklu canlıların da ağır metallerin etkilerinin belirlenmesi amacı ile kullanıldığı bilinmektedir (Türkmen, 2003).

Ortamdaki metal konsantrasyonları ile suda yaşayan balık, midye, istiridye, plankton gibi organizmaların dokularındaki miktarları arasında bir ilişki olduğu kabul edilmektedir. Bu ağır metallerin suda yaşayan ve besin zincirinin farklı kademelerinde bulunan organizmalar tarafından alınması çoğunlukla beslenme yolu ile olmaktadır. Bu geçişlerin solunum, osmoz ve difüzyon olayları ile de devam ettiği, vücudun suyla temas eden yüzeyleri olan deri ve solungaçlar vasıtasıyla da bünyeye alındığı bilinmektedir. Ancak vücuda alınan miktarlar türden türe oldukça farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklar alınan metalin toksisite derecesini de belirleyen önemli bir unsur olmaktadır. Örneğin suyu süzerek beslenen kabuklu canlılar ve alglerin birim zamanda aldıkları metallerle balıkların bünyelerine aldıkları miktarlar oldukça farklı olmaktadır. Bu canlılar sudaki kirlenmeyi çok daha iyi ve doğru tahmin etmeyi kolaylaştıran canlılar olduklarından aynı zamanda biyo-indikatör organizmalar olarak da adlandırılırlar.

Su ekosistemlerindeki kirleticileri araştırmak ve izlemek maksadı ile bu biyo-indikatör organizmaların kullanıldığı birçok metot geliştirilmiştir (Phillips ve Rainbow, 1993). Geliştirilen bu metotların suda yaşayan canlıların dokularındaki birikimlerin tespiti üzerinden yapıldığı ve bu birikimlerden bir sonuca ulaşılmaya çalışıldığı anlaşılmaktadır. Elde edilen verilerden canlının etkilenme derecesi veya toksisite durumu ile sudaki miktarlar arasındaki ilişkilerden kirlenmenin modellenmesi mümkün olmaktadır. Kaldı ki endüstrileşmiş birçok ülkede cıva ve demir dışındaki çoğu metalin ekosistemdeki miktarları yer kabuğundaki miktarlarına kıyasla 100 ila 1000 kat artmış durumdadır (Wedepohl, 1991). Bu durum canlıları önemli derecede etkilemiş ve söz konusu metallerin izlenmesi zorunluluğu ortaya çıkmıştır. Geçtiğimiz yüz yılda ağır metallerden kaynaklı seri hastalıklar ve hatta ölümlere neden olan trajik sonuçlar vuku bulmuştur (Dallinger ve Rainbow, 1993). Bu yüzden ağır metallerin genel özellikleri, kaynakları, toksisite etkileri ve artış modelleri takip edilmelidir. Örneğin endüstri alanında çok uzun bir süre kullanım alanı bulan bakırın yüksek dozları hem bitkiler hem de hayvanlar için tehlikeli olabilmektedir. Benzer şekilde çinkonun da yüksek miktarları

toksik etki gösteren metallerin başında gelmektedir (Özdilek ve Mathisen, 2002). Balıklar başta olmak üzere kabuklu ve sucul omurgasızlarla beslenen insanlara da söz konusu metaller geçebilmekte, toplum sağlığını etkiler düzeye ulaşabilmektedir. Bu bağlamda söz konusu biyo-indikatör canlıların ağır metaller bakımından izlenmesi çevre kirliliği bakımından olduğu kadar halk sağlığı bakımından da önem arz etmektedir. Doğru seçilmiş bir biyo-monitör canlıının kullanımı farklı metal kaynaklarının varlığını ve miktarının belirlenmesinde önemli rol oynar. Bu durumla ilgili olarak sadece çözünmüş metal kaynaklarını absorbe eden makro algler, suyu filtre ederek beslenen çözünmüş ve askıdaki maddeleri bünyelerine toplayan midye ve istiridye benzeri canlılar ve zeminde yaşayan diğer canlılar ise sedimentteki kirleticilerin belirlenmesinde kullanılabilir. Bir organizmanın doğru ve iyi seçilmiş bir indikatör canlı olabilmesi için; geniş coğrafik dağılıma sahip olması, çevresel değişimlere ve kirliliğe dayanıklı olması, iyi bir biyoakümülyasyon kapasitesine sahip olması, teşhis, örnekleme ve muhafazasının kolay olması, ekonomik ve ekolojik yönlerden önem taşıması gibi özelliklere sahip olmalıdır. Denizel ortamlarda en çok kullanılan biyo- monitör organizmalar; mikro algler, çiçekli bitkiler, suyu filtre eden canlılar ve detritusla beslenen canlılardır (Carballeria vd., 2000). Sedimentle temasta olmayan deniz yosunları ağır metalleri yalnızca çözünmüş kaynaklardan, suyu filtre ederek beslenme faaliyetine sahip organizmalar ise deniz suyundan ve askıdaki maddelerden alırlar. Bu canlılar arasından en önemlileri midye, istiridye ve balanuslar örnek verilebilir. Midyeler ve istiridyeler epibentik bölgelerde filtratif beslenen organizmalar olduklarından askıdaki, çözünmüş, sudaki ve sedimentteki metaller için iyi birer biyo-monitör canlıdır (Ettajani vd., 1992). Bu tür canlıların, çevresel kirleticilerin en iyi şekilde canlılar üzerinde görülebildiği hassas organizmalar olduğundan uzun yıllardır kullanıldığı bilinmektedir (Salazar, 1992). Çevre kirliliğinde biyo-monitör veya indikatör olarak kullanılan çift kabuklu canlılar arasında; *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*, *Mytilus trossulus*, *Septifer virgatus*, *Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas*, *Crassostrea virginica*, *Crassostrea brasiliiana* ve *Spondylus spinosis* türleri sayılabilir (Türkmen, 2003; Rainbow, 1995). Biyo-monitör olarak seçilen organizma ne kadar hassas olursa çevresel kirlenme o denli doğru bir şekilde modellenebilir. Sularda uzun süreler kalabilme ve organizma dokularında birikme eğilimi gösteren ağır metaller konsantrasyonlarına bağlı olarak önemli zararlar verebilmektedir. Çok düşük dozlarda etkileri de minimal olurken, daha

yüksek konsantrasyonları canlılarda ciddi hasarlar oluşturarak ölümlere neden olabilmektedir.

Bu bağlamda, iyi bir indikatör organizmadan beklenen birçok özelliğe sahip olan tıbbi sülüklerin çevresel kirleticilerden ağır metallere karşı gösterdikleri tepkilerin ortaya konması hedeflenmiştir. Tıbbi sülükler ekolojik ve ekonomik önemleri bakımından oldukça değerli canlılardır. Son yıllarda tamamlayıcı veya alternatif tıbbi uygulamalarda kullanımları artmakta olan tıbbi sülüklerin biyo-monitör olarak kullanıldığı çalışma sayısı nerdeyse yok denecek kadar azdır. Bu bağlamda, tıbbi sülüklerde farklı ağır metallerin dokulardaki birikimlerinin ve tıbbi sülüklerden elde edilecek salyada, Malondialdehit (MDA) ve antimikrobiyal özelliklerinin araştırılması planlanmıştır.

### **Tıbbi Sülüklerin Tarihçesi**

Birçok medeniyetin kullandığı, sülüklerin tedavi amaçlı kullanımı üzerine ilk yazılı kaynaklara M.Ö. 1500'lü yıllarda Mısır'da rastlanmaktadır (Singh, 2010). Bu kayıtlardan yaklaşık iki yüzyıl sonra M.Ö. 1300'lü yıllarda Sanskritçe kaynaklar sülük tedavisinden bahsetmektedir. Sülüklerle yapılan tedavi yöntemi eski Mısırlılar, Mezopotamyalılar, Aztekler ve Mayalarca; Hipokrat'ın Yunanistan'da sülük tedavisinden bahsetmesinden önce bilinmekteydi (Ayhan ve Mollahaliloğlu, 2018). Muhtemelen terapötik amaçla sülük kullanan ilk hekim Kolofonlu (Nikandros) Nicander'di (M.Ö. 200-130) (Abdullah vd., 2012). Ayrıca başka kaynaklarda Roma'lı filozof Galen'inde sülük tedavisi uyguladığı yer almaktadır. Ünlü Türk hekim İbn-i Sina M.S. 1020'de El Kanun Fi't-Tıbb adlı kitabında bu tedavi yönteminden söz etmiştir (Singh, 2010). Bunun yanı sıra Hint mitlerinde sağlık tanrısı Dhavantari'nin sülüklerle birçok hastalığı tedavi ettiğinden bahsedilmiştir. Ünlü Hint hekim Sushruta yazdığı yayınlarda sülük tedavisinin, Çin tıbbına yerleşmesini sağlamıştır.

Sülükle tedavisi Osmanlı'da aynı şekilde, hastalık tedavisinde uygulanan alternatif tıp yöntemlerinden biri olmuştur. Avrupa'da ise sülük tedavisi Orta Çağ'da başlamıştır. Tıbbi sülükler, 1758 yılında Linnaeus tarafından *Hirudo medicinalis* olarak isimlendirilmiş ve bilim literatürüne kazandırılmıştır. 19. yüzyılın başlarında özellikle Fransa ve Rusya'da çok fazla sülük tedavisi uygulanmış ve her sene 130 milyon adet sülükten fazlasının kullanıldığı ifade edilmiştir (Whitaker vd., 2004). Bu yayımda

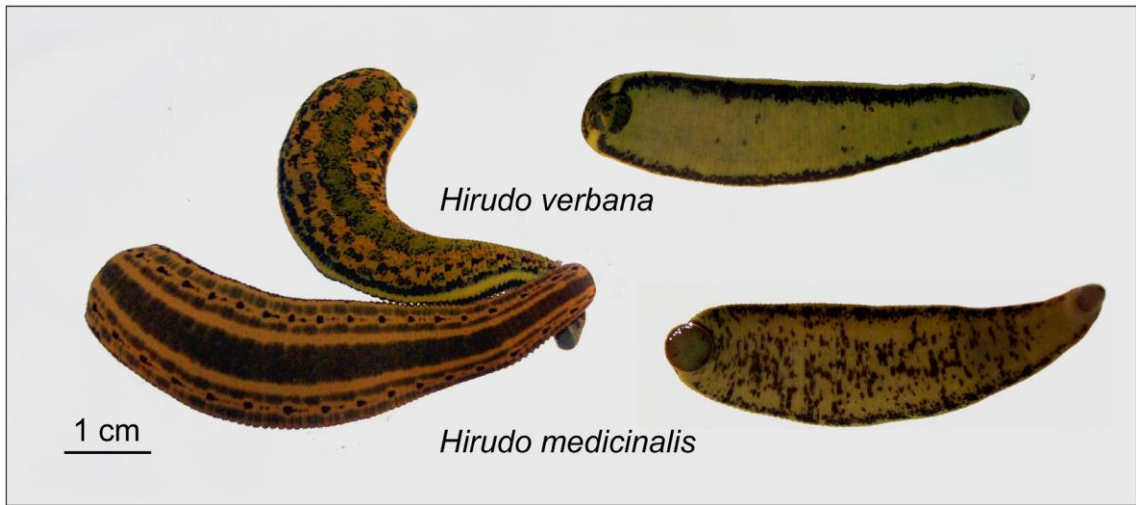
Fransız Hekim F.J.V. Broussais tarafından (1772-1838) uygulanan sülük tedavi yöntemleri etkili olmuştur. 1820-1830'larda anestezi, antibiyotik ve antisepsi uygulamaları gelişmemişken, Johan F. Diffenbech plastik cerrahi uygulamalarında sülükleri başarılı bir şekilde alternatif olarak kullanmıştır. Bunun yanı sıra 1884 yılında Highgraft sülüklerin tükürüğünde kanın pıhtılaşmasını önleyen bir madde keşfetmiş ve bu maddeye *Hirudo Medicinalis*'e atfen hirudin ismini vermiştir. Hirudin ismi verilen bu biyoaktif maddenin antikoagulant özellik gösteren yapıda olduğu tespit edilmiştir (Abdullah vd., 2012). Fakat 19. yüzyılın sonlarına gelirken modern tıptaki gelişmeler sonrasında, sülük tedavisi modern tıp kavramları ile ters düşmeye başlamıştır. 20. yüzyılın başlarında önemini kaybeden sülük tedavisi 20. yüzyılın ortasında ve sonlarında rekonstrüktif cerrahide kullanılmaya başlanmıştır. 2004 yılında ise Amerika Birleşik Devletleri İlaç ve Gıda Dairesi sülüklerin Amerika'da satış, plastik cerrahi uygulamaları, mikro cerrahi ve genel amaçlar için kullanımına izin vermiştir (Parker ve Shaw, 2011). Sülükle tedavide alınan başarılı sonuçlar sonrası doğal (alternatif) tıp olarak kabul görmüş ve birçok üniversite tarafından enstitüler aracılığıyla araştırmalar yapılmıştır.

### Sülük Sistematığı

15.000'den fazla üyesi olan halkalı solucan grubundan, 800'ü aşkın üyesi bulunan Hirudinea alt sınıfının sadece 15 üyesi tıbbi amaçla kullanılabilir sülüklerdir. En çok bilinen türler *H. medicinalis*, *H. verbana* ve *H. orientalis*'tir (Wollina vd., 2016). Sülükler hayvanlar âlemi (Animalia), halkalı solucanlar (Annelida) filumu, kan sülükleri (Hirudinia) sınıfına aittir. Aşağıdaki tabloda tıbbi sülüklere ait taksonomi yer almaktadır.

Tablo 1.Sülük Taksonomi Tablosu (Sawyer, 1986) (Apakupakul, 1999)

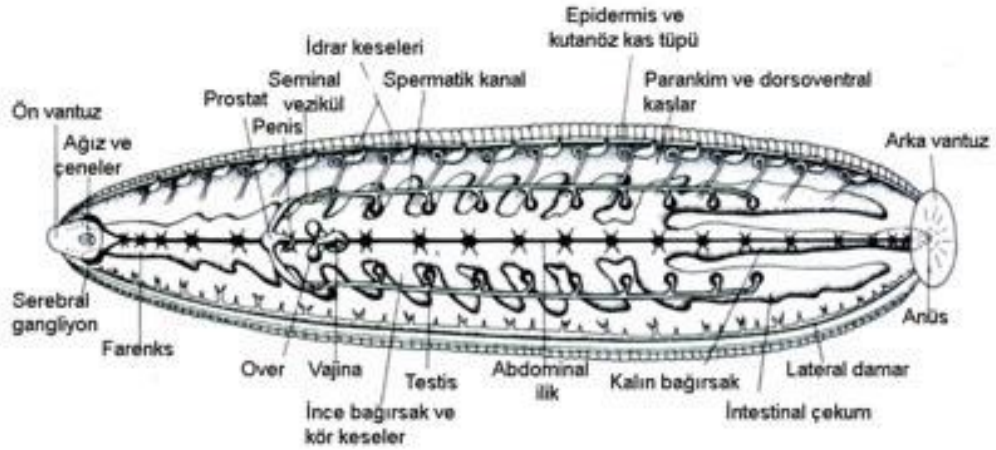
Sınıf	Hirudinia		
Altsınıf	Euhirudinea		
Takım	Rhyncobdellida	Arhyncobdellida	
Alt Takım		Erpobdelliformes	Hirudiniformes
Aile	Glossiphoniidae	Erpobdellidae	Haemadipsidae
	Piscicolidae	Salifidae	Haemopidae
	Ozobanchidae		Cylicobdellidae
			Hirudinidae*



Şekil 1. *Hirudo verbana* ve *Hirudo medicinalis* genel görünüşleri (Elliott ve Kutschera 2011)

### Sülüklerin Anatomisi

Bütün sülükler 34 segmentli halkalı yapıdadır. Anatomik olarak sülükler tek tip olarak özelleşmişlerdir ve dorso-ventral şekilde yassıdırlar. Anterior ve posterior segmentler çekmen (vantuz) görevindedir. Ön vantuz yani ağız bölgesi arka vantuz yani anüsten daha ufak yapıdadır. Ağız etrafı özelleşmiş şekilde vantuzludur. Anüs vantuzu ise sekiz segmentin erime ve birleşmesi ile oluşmuş çember biçiminde ve ventral uzantılıdır. Vücut yüzeyindeki ikincil halkalar boğumlar arasında kalarak gizlenmiştir. Ayrıca vücutlarında kıl bulunmamaktadır. 9, 10 ve 11. Boğumlar klitellar olarak isimlendirilir bunun sebebi ise klitellumun bu bölgede yerleşmiş olmasıdır. Bir erkek ve bir dişi olmak üzere üreme delikleri burada yer almaktadır. Gövdenin en büyük kısmı 12-26 boğumlar arası kalan 15 segmentten oluşan orta kısımdır. (Kaestner, 1967; Barnes, 1974; Sawyer, 1986; Davies, 1991). Sülükler 0 °C ile 30 °C arasındaki sıcaklık aralığında yaşayabilir ve poikilotermlerdir. Ani sıcaklık değişiklikleri mortaliteye sebep olabilmektedir. Sülükler, suda çözülmüş veya atmosferik oksijeni genel vücut yüzeyinden alarak kullanmaktadırlar. Sularda çok düşük dozlarda bile olsa klor, sülük ölümlerine sebep olmaktadır (Abdullah vd., 2012).



Şekil 2. Sülük anatomisinin genel görünümü (Küçük ve Yaman 2019)

### Sülüklerde Dolaşım ve Solunum

Sülüklerde vücut boşlukları dolaşıma yardımcı olabilirler. Dolaşım sistemleri daha gelişmiş sülüklerde vücut boşlukları ve sıvısı gelişerek damar ve kan formuna dönüşmüştür. Düzenli olarak yerleşmiş kanal sisteminde kan bütün vücuda taşınır ve oksijen bütün hücrelere ulaştırılır. Kan yanal boyuna kanalların kasılması ve gevşemesi ile iletilir (Kaestner, 1967; Çağlar, 1973; Barnes, 1974; Demirsoy, 1982; Sawyer, 1986; Davies, 1991; Geldiay ve Geldiay, 1991).

Piscicolidae ailesinin bazı türleri hariç sülüklerde solungaç bulunmaz. Diğer bütün türlerde ise solunum vücut yüzeyinden yapılmakta, oksijen ihtiyacı bu şekilde karşılanmaktadır. Solungaçlı olan Piscicolidae ailesinin bazı türlerinde solungaç; yanıl yüzeyde yaprak şeklinde uzantıdır. Bu solungaçlar vücut sıvısı ve damar ile doludur. Solunum yapmak için titreme ve sallanma hareketi yaparlar. Ayrıca arka vantuz ile bir yüzeye yapışıp vücudunu sallayarak da solunum gerçekleştirebilirler. Pharyngobdellida ve Gnathobdellida ailesine mensup sülüklerin vücut sıvılarında hemoglobin bulunmaktadır. Bu sıvı vücuda oksijen taşınmasını sağlar (Kaestner, 1967; Barnes, 1974; Demirsoy, 1982; Sawyer, 1986; Davies, 1991).

### **Sülüklerin Hareketleri**

Sülükler üç farklı tip harekete gösterirler bunlar: sürünme, dalgalanma ve yüzmedir. Sürünme hareketi için sülükler arka vantuz ile bir yüzeye tutunur, ön vantuz tamamen serbest duruma gelir ve sülük uzanabileceği en uç noktaya kadar uzar ve bu kez ön vantuz ile yüzeye tutunur. Daha sonra arka vantuz tutunduğu zeminden serbest bırakılır ve ön vantuz doğru çekilerek yüzeye tekrar tutunur. Bu işlem her seferinde yeniden tekrar edilerek yer değiştirme sağlanır. Yüzme hareketi ise dorso-ventral dalgalanma olarak görülür. Bu yüzme hareketi longitudinal kasların gelişmesi ile mümkün olmaktadır. Son hareket tipi olan dalgalanma ise arka vantuzun bir zemine yapışması ve ön vantuzun serbest olması ile yapılır. Dalgalanma yapan sülük su içerisinde vücudunu sağa-sola ya da ileri-geri sallayarak veya titreterek yapar (Kaestner, 1967; Çağlar, 1973; Barnes, 1974; Demirsoy, 1982; Sağlam ve Sarıyüpoğlu, 1998).

### **Sindirim Sistemi ve Beslenme**

Sülüklerde ağız iki şekilde karşımıza çıkmaktadır. Bunlar; vantuz dibinde ya da üst dudağın altında kaşık biçimindedir. Ağızdan hemen sonra yutak yer almaktadır ve kaslı bir yapıdadır. Bu bölge yani farinksin (yutak) ağız boşluğu farklı türlerde farklı şekillerde görülmektedir. Bazı türlerde düz kenarlı ya da dişli mono veya poli keratinli çene olarak gözlemlenmiştir. Bazı türlerde ise uzayabilen bir hortum bulunur. Yutağın çevresinde tek hücreli tükürük bezleri yer almaktadır. Bu tükürük bezlerinin kanalları dişlerin arasına ya da hortumun uç kısımlarına uzanır. Tükürük bezleri kanın pıhtılaşmasını engelleyen hirudin salgısını içerisinde bulundurur ve bu salgı kan ile beslenen sülüklerde görülür. Çeneli sülüklerin yutaklarından hemen sonra mide gelir ve daha önce de belirtildiği gibi sindirim borusunun en uzun kısmını oluşturur. Hortumlu sülüklerin ise yutak ve mideleri arasında uzun ve ince bir yemek borusu yer alır. Hortum geri çekilirken bu yemek borusu kıvrılır. Mide geniş tüp biçiminde ince zarlı yapıdadır. Midenin iki yan kısmında mide boyunca çift halde keseler vardır. Bu keselerin sayısı türler arası farklılık gösterebilir. Örneğin *Erpobdella*'da hiç bulunmazken, *Haemopsis sanguisuga* türünde bir çift, *Hirudo medicinalis* türünde ise 11 çift bulur. Midenin bu kısımları kursak görevi üstlenir ve besinin depolanmasını sağlar. Sindirim sadece mide de değil, mide ile bağırsakta gerçekleşir. Mide de görülen keseler bağırsakta da görülebilir. Bağırsak sindirim borusunun sonunda ve kısadır. Anüs

vücudun sırt kısmında ve arka vantuzun ön kısmındadır (Kaestner, 1967; Brown, 1967; Barnes, 1974; Sawyer 1986; Davies 1991; Sağlam ve Sarıeyyüpoğlu, 1998;).

Sülük türlerinin hepsi kan emerek beslenmezler. Bazıları omurgasızları yerken; bazıları halkalı solucanları (*Annelida*), bazıları ise salyangoz ve çeşitli böceklerin larvalarını yerler. Kan emen türler ise ektoparazit olarak yaşarlar ve kurbağa, salyangoz, kaplumbağa, balık, kabuklular ve omurgalı hayvanların kanları ile beslenir (Kaestner, 1967; Barnes, 1974; Sawyer 1986; Davies 1991). Bu gruplardan en çok saldırıya uğrayanlar ise balıklardır, omurgalıların her grubunda konakçıdırlar (Sawyer, 1986; Sağlam, 1998'a). Tropikal bölgelerde yaşayan türlerden *Haemadipsidae* ailesine mensup bireyler memeli ve kuşların burun ve ağız bölgelerine yapışırlar. Bu sülükler ağaçların ve bitkilerin üzerine çıkıp kendilerini yaprakların altından geçen konakçının üzerine bırakırlar. Başka bir örnek verecek olursak *Piscicolidae* ailesinin üyeleri ise balık paraziti olarak karşımıza çıkarlar ve konakçı üzerinde sürekli kalırlar buna rağmen çeşitli aralıklarla kan emdikleri görülmüştür (Kaestner, 1967; Barnes, 1974; Demirsoy, 1982; Sawyer 1986; Davies 1991). *Hirudo medicinalis* ise vücut ağırlıklarının ortalama 5.8 (3-10) katı kadar kan emerler ve bu emdikleri kanla bir yıla kadar yaşamlarının sürdürebilirler (Kaestner, 1967; Sağlam, 1998b).

### **Sinir Sistemi**

Sülüklerde vücutlarına göre özelleşmiş bir iletici sinir sistemi vardır. Hücre gövdeleri sinir düğümleri içinde folüküler farklılık göstererek gruplaşmıştır. Altı tane folükül meydana gelmesi için bir ganglion gerekmektedir. Gangliyonik sinir, beşinci ve altıncı segmentlerde yer almaktadır ve yutak ve hortumun çevresini sarmıştır. Bu bölge beyin olarak ifade edilir. Yutak halkası ve diğer halkalı solucanların yutak önü ganglionları ile ilk üç ve dördüncü segment ganlionları arkaya doğru uzanır. İki adet ventral nöron şeridi olmasına rağmen segmental ganglia'nın her ikilisi eriyip birleşir. Ayrıca bu merkezi otonom sinir sisteminden hariç merkezden uzak ve esneme gerilmeyi sağlayan sempatik sinir sistemine de sahiptirler (Kaestner, 1967; Barnes, 1974; Sawyer 1986; Davies 1991; Sağlam ve Sarıeyyüpoğlu, 1998).



## Duyu Organları

Sülüklerde duyu organları özelleşmiş duyu organlarıdır. Bunlar gözler ve boğumlara sıralanmış duyusal çıkıntılardır. Bütün sülük türlerinde göz vardır. Gözler pigmentler tarafından etrafı sarılmış ışık reseptörü hücrelerin bir bölgede toplanmasıyla oluşur. Gözler genellikle anteriorde ve sırt kısmında yer almaktadır. Türler arası farklılık göstermekle birlikte sayıları türe uygun olacak şekilde 2 ile 10 arasında değişir. *Piscicolidae* mensuplarında posterior çekmende de gözler vardır. Göz çukurlarının konumları farklı yönlerden gelen ışıkları algılayacak şekilde özelleşmiş olup değişik istikametlerden gelen ışığı görmelerini sağlar. Bu özellikleri sülüklere aydınlık-karanlık farkından ayrı olarak ışık yönü tayini de sağlar. Sülüklerin nerdeyse bütün türleri ışıktan kaçır canlılardır. Fakat beslenme ihtiyacı duyduklarında ışıktan kaçma eğilimi görünmez ve ışıktan kaçmazlar. Duyusal boğumlar çeşitli gruplarda farklı sıralanışa sahiptirler. Her boğumda yerleşik küçük daire şeklinde yapılarıdır. Her birinin taşıdığı kıl ile zar üzerinde çıkıntılar oluşturur. Bu hücreler sülüklere av ya da konakçının yerini tayin etmede ve karanlık ortamlarda hareket etmekte yardımcı olurlar. Kan emen sülükler bu duyuları yardımı ile konakçılardan salgıladıkları doku özü, balık pulu, yağ bezi salgıları ve başka salgılar sonrası saldırıya geçer. Salgılar ile cezbedilen sülük konakçıya doğru hareket eder ve konakçıya yapışıp beslenir. Taksonomide sülüklerin ayrımı yapılırken gözlerin ve duyusal çıkıntılarının sayısı göz önüne alınan önemli kriterlerdir (Kaestner, 1967; Barnes, 1974; Sawyer, 1986).

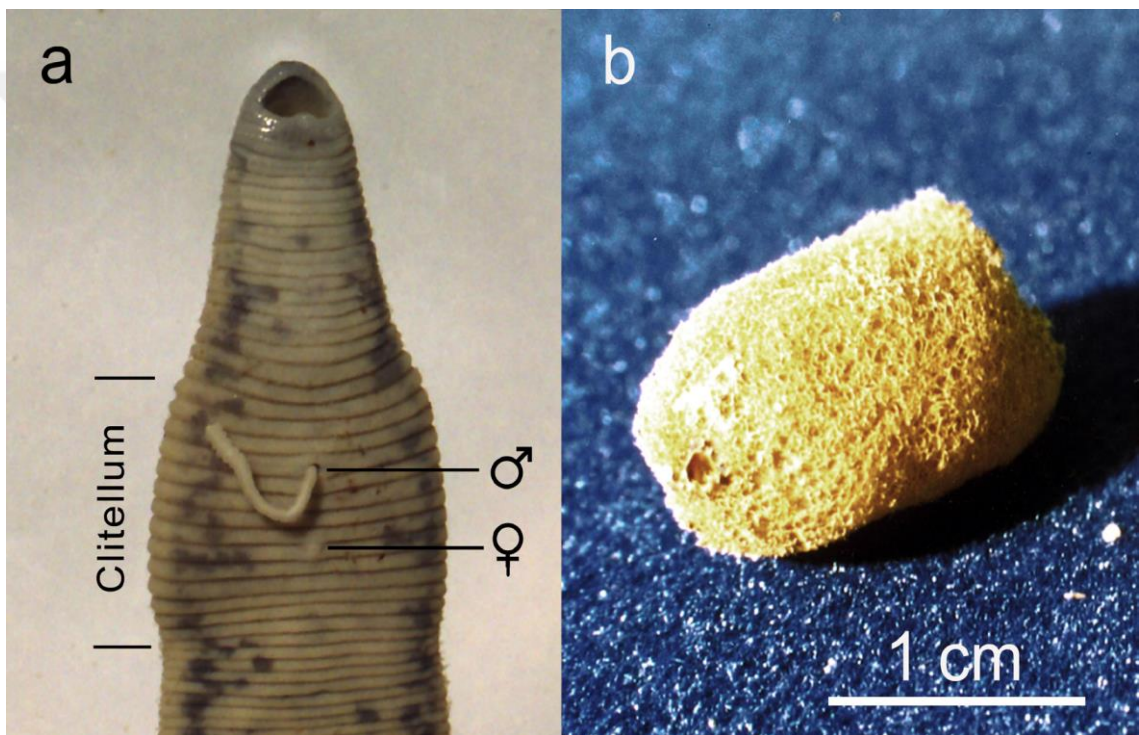
## Sülüklerde Üreme

Sülükler eşeyli üreyen canlılardır. Sülüklerin rejenerasyon yetenekleri düşüktür. Bir sülük Longitudinal olarak ikiye kesilirse anterior yeni bir anüs meydana getirebilirken posterior yeni bir baş meydana getiremez (Çağlar, 1973; Sawyer, 1986; Davies, 1991).

Bütün sülükler hermafrodittir. Üreme sistemlerinde bir erkek ve bir dişi genital organ gözeneği bulunur. Bu organlar sülük vücudunun karın bölgesinin ortasında bulunan ve peş peşe sıralı ve dışarı açık şekildedir. Erkek gonopor her zaman dişi gonoporun önünde yer almaktadır. Erkek yumurtalıklar yuvarlak sporlar şeklindedir. Türlerle göre sayıları farklılık göstermekle birlikte en az 4, en fazla 17 çiftten oluşur.

Sülük testisleri, vücudun median bölgesinde birer çift olacak şekilde lateral sıralanmıştır. Bu sıraların dışında sperma kanalı yer almaktadır. Testisler kanalcıklarla bu sperma kanalına bağlanır. İki adet olan sperma kanalı ön tarafa doğru uzanır. Daha sonra biraz genişleyerek atriyum adı verilen yerde birleşirler. *Hirudinidae* türlerinde ise bu kanallar atriyum yerine bir peniste birleşirler. Atriyumun kompleks, dış çeperleri içe dönük salgı hücrelerinden oluşmuştur ve çok kısadır. Prostat ise proksimal salgı bezidir. Sperm kabarcıkları gelişmiş değildir. Sperma oluşumu yani spermatofor testis içinde oluşur. Bununla birlikte *Rhynchobdellida* ve *Pharyngobdellida* türlerinde çiftleşme organı bulunmaz (Kaestner, 1967; Barnes, 1974; Sawyer 1986; Davies 1991). Ovaryumlar ise her zaman bir çift olarak var olmaktadır. Erkek atriyumu ile anterior testisin arasında yer alırlar. Ovaryum germinal doku topluluğu olarak karşımıza çıkmaktadır. Bazen içlerinde yumurta keselerinden birkaç tane bulundurabilirler (Kaestner, 1967; Barnes, 1974; Sawyer 1986; Davies 1991). Kısa yumurta kanalı anterior olarak uzanım yapar ve vajinada karşı organıyla birleşir. Gonopor dışı organ 11. boğumun altından açılır. Yumurtalıklara bırakılan yumurtalar gamet ve olgunlaşmamış şeklindedir. Bu yumurtalar olgunlaşmalarını kokon sıvısı içerisinde tamamlarlar (Kaestner, 1967; Barnes, 1974; Sawyer 1986; Davies, 1991; Sağlam ve Sarıyyüpoğlu, 1998;). *Gnathobdellida*'larda döllenme, penis aracılığıyla spermaların diğer bireyin vajinasına iletilmesi olarak görülür. Diğer türlerden *Rhynchobdellida* ve *Pharyngobdellida* ise sperma kanalları uç kısımda özelleşmiş bir spermatofor yer alır ve bunlar diğer bireyin derisinde genellikle sırtlarına saplanır. Deriyi eritici etki yapan spermatoforlar önce sölom boşluğunu geçer ve oradan da yumurtalığa gider. Penis ile yapılan döllenme bir taraflı iken, spermatofor ile olan döllenme ise karşılıklıdır. Bir süre sonra döllenmiş yumurtalar, klitellumlar tarafından albumin salgısı ile doldurulmuş keseye bırakılır. Bu aralıkta klitellum çok belirgindir (Kaestner, 1967; Barnes, 1974; Sawyer, 1986; Davies 1991; Sağlam ve Sarıyyüpoğlu, 1998). Dışı gonodlardan çıkan yumurta kesesi verimli yumurtaları taşımaktadır. *Piscicolidae* türlerinde bir yumurtayı sadece kokon taşıırken, diğer türlerde kokonların taşıdığı yumurta sayısı farklılık gösterir. Örneğin *Nepheleopsis obscura* üreme dönemlerinde 1-4 kokon oluşturur ve bu kokonlarda 1-8 adet yumurta bulunur (Sağlam ve Sarıyyüpoğlu, 1998). *Hirudo medicinalis* türü ise bir üreme döneminde 1-8 kokon oluştururken bu kokonların her biri 33 embriyo içerir (Sawyer, 1986). Yumurta keseleri genel olarak su içerisindeki nesnelere yüzeyine, parazit olan bazı formlarda ise konakçıların vücutlarına bırakılır.

*Hirudo medicinalis* ve bazı diğer türler kokonlarını sudan ayrılarak nemli toprağa da gmebilirler. *Hirudinidler* içinde bazı türlerde ise yavru bakımı yapan türlerde vardır. Bu türler yumurtaları taşırlar ya da yumurtaların olduğu yerin üzerinde durarak koruma sağlarlar. Metamorfoz sülüklerin olgunlaşmasında rol oynamaz (Kaestner, 1967; ağlar, 1973; Barnes, 1974; Sawyer 1986). Birçok sülük bir yıl yaşar. Bahar aylarında yumurtadan çıkan yavru sülükler ertesi yıl olgunlaşmış olurlar. Hayat döngüsü yaşam ortamı ve beslenme düzenine bağlılık gösterir. *Hirudo medicinalis* diğer sülük türlerine kıyasla daha uzun bir yaşam sürerler (Barnes, 1974).



şekil 3. (a) *Hirudo verbana* kitellum bölgesi ve gonoporlar, (b) Süngerimsi *Hirudo verbana* kokonu (Elliott ve Kutschera, 2011)

### Sülük Salyasının Bileşenleri

Sülük salgısı, sayıları 100'den fazla olan peptitler ve proteinlerden oluşan biyolojik açıdan aktif bileşikler içermektedir (Das, 2014). Biyolojik ve farmakolojik açıdan zengin olan sülük salyası; sülük kan emerken tutunduğu bölgeye sülük tarafından enjekte edilir (Alaama vd., 2011; Flecken ve Michalsen, 2007). Güçlü antikoagülanlar sülük salgısında yer almaktadır. Sülük salgısında yer alan biyoaktif maddelerden bazıları ve işlevleri aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

Tablo 2.Sülük salgısında bulunan bazı biyoaktif maddeler ve etkileri (Das, B. K., 2014).  
Alaama vd., 2011). (Flecken ve Michalsen, 2007).

<b>Biyoaktif Madde</b>	<b>İşlevleri</b>
Hirudin	Trombine bağlanarak kan koagülasyonunu inhibe eder
Calin	Von Willebrand faktörünün kolajene bağlanmasını bloke ederek kan koagülasyonunu inhibe eder, kollajen aracılı trombosit agregasyonunu inhibe eder.
Destabilaz	Monomerik aktivite ile fibrini eritir, trombolitik etki gösterir
Hirustanin	Kallikrein, triptin, kimotriptin ve nörofolik cathepsin G'yi inhibe eder
Bdellinler	Anti-inflamatuardır. Plazmin, tristin ve akrosin'i inhibe eder
Hyaluronidase	İnterstisyel viskoziteyi artırır ve antibiyotik etkisi gösterir.
Tryptase inhibitor	Mast hücrelerinin proteolitik enzimlerini inhibe eder
Eglinler	Anti-inflamatuardır. $\alpha$ -Kimotripsin, kimaz, subtilisin, elastaz ve katepsin G'nin etkinliğini inhibe eder.
Faktör Xa inhibitörü	Moleküler yoğunlukları aynı kompleksler oluşturarak pıhtılaşma faktörü Xa'nın aktivitesini inhibe eder
Karboksipeptidaz-A	Isırık bölgesinde kan akışını artırır
Asetilkolin	Vazodilatördür
Histamin Benzeri Maddeler	Vazodilatör olup, Isırık bölgesinde kan akışını artırır

### **Sülük Tedavisinin Tıpta Kullanımı**

Tıbbi sülüğün tedavi amaçlı kullanımının çok eski zamanlarda başladığına dair yukarıda bahsedilmişti. 1986 yılına gelindiğinde rekombinant hirudin üretilmiş ve modern tıpta anjioplasti uygulanan hastalara rutin olarak kullanılmaya başlanmıştır (Fields, 1991; Eldor vd., 1996). Bunlar üç farklı şekilde ticari formda kullanılır; bunlar lepirüdin, bivalürüdün ve desirüdüdür. Sülüğün tükürüğü antikoagulatif, vazodilatatör ve antigregan bileşenleri bulundurmaktadır. Daha öncede belirtildiği gibi yaygın tıbbi uygulamalarda iki farklı sülük türü kullanılır. Bunlar *Hirudo medicinalis* ve *Hirudo*

*verbana* türleridir. “Avrupa tıbbi sülüğü” olarak ta bilinen *Hirudo medicinalis* en çok kullanılan ve üzerinde en çok çalışma yapılan türdür. Bu çalışmalarda, antiromatizmal, antibakteriyel analjezik, antidepresan, antihipertansif, myorelaksan, antioksidan, nörotrofik etkileri ortaya çıkarılmıştır (Chalisova vd., 2003). Bu özellikleri göz önüne alındığında sülük tedavisi uygulanan hastalıklar şunlardır.

- Kanser ağrılarının azaltılması veya dindirilmesi (Kalender vd., 2010)
- Koagülasyon ve venözstaz hastalıkları (Mamelak vd., 2010)
- Plastik ve rekonstruktif cerrahide özellikle uç organ amputasyonu sonrası yapılan implantasyon veya rekonstrüksiyon sonucu gelişen periferik dolaşım bozuklukları (Yantis vd., 2009) ve geniş yüzeyli flep uygulamaları sonrası gelişen venözstaz (Zhao X vd., 2009)
- Diz (Andereya vd., 2008) ve diğer eklem osteoartropatileri (Michalsen vd., 2008)
- Farklı görüşler olmakla birlikte hematoma sonucu oluşan medyan sinir sıkışmaları (Heckmann vd., 2005) (Schenker vd., 2006).
- Migren tedavisi (Bunker, 1981)
- İnfektif miyokardit (Nazar ve Doroshenko, 1998)
- Varis tedavisi ve varis ameliyatları sonrası gelişen ödem tedavisi (Chepeha vd., 2002) (Weinfeld vd., 1998)
- Hipertansiyon ve iskemik kalp hastalıkları (Zarodova, 1993)

Etkinliği bilimsel araştırmalarla ispatlanmamış da olsa tıbbî sülük günümüzde Avrupa, Amerika ve Avustralya'daki birçok merkezde aşağıdaki hastalıklarda sıklıkla kullanılmaktadır:

- Göz hastalıkları: Behçet hastalığı, üveit, glokom, makulopati, sarı nokta hastalığı, diyabetik retinopati, retinitispigmentoza ve optik atrofi
- Varis, hemoroit ve venöz kan damarı yetmezlikleri

- Romatoid artrit ve diğ er romatizmal hastalıklar
- Artroz ve eklem kireçlenmeleri
- Plastik ve rekonstrüktif cerrahi sonrası oluş an komplikasyonlar (Gideroğlu vd., 2004)
- El cerrahisi ve uzuv kayıpları (Tuncali vd., 2004)
- Migren ve gerilim baş ağ rıları
- Baş dönmesi, kulak çı nlamaları ve menier hastalığı
- Her türlü kas ağ rıları, fibromyalji ve huzursuz bacak sendromu
- Boyun fitiğ i ve bel fitiğ i, tendinit ve tendosinovit
- Dejeneratif sinir sistemi hastalıkları (MS, ALS, Parkinson hastalığı ve felçler)
- Sedef, egzama, ü rtiker, kronik deri hastalıkları, mantar hastalıkları ve akne
- Kronik hepatit ve karaciğ er hastalıkları
- Bağ ışı klık sistemini güçlendirme
- Depresyon
- Kronik yorgunluk sendromu
- İ Ő itme kayıpları
- Cilt kırı Ő ıklıklarının giderilmesi gibi kozmetik sebepler

Sülükler insanların ö nyargısı sonucu tiksindirici bir varlık olarak görünmek yerine, kanın pıhtılaşması engelleyen, pıhtılaşmış kanı çözen, kolesterol ve şeker seviyelerini azaltan, inflamasyonu düşüren, ağrı kesici, tansiyon düşürücü, ödem azaltarak mikrosirkülasyonu kolaylaştıran doğal bir şifa kaynağ ı olarak görülmelidir.

Sülük tedavisi uygulanırken ana damarların bulunduğ u boyun, çene altı, koltuk altı, kasık gibi bölgelere uygulamak tehlike oluşturabilir. Vücudun yumuşak cilt

bölgeleri olan, göz kapağı ve çevresi ile keratinize özellik gösteren avuç içi, ayak tabanı gibi bölgelere de bu tedavi uygulanması uygun değildir. Çeşitli diş eti iltihaplarında, gingivitis, vajinit, servisit gibi hastalıklara sülük tedavisi yapanlar da vardır. Bu uygulama esnasında hasta gözlem altında tutulmalıdır aksi halde risk teşkil edebilir. Sülüğün tedavi bölgesinden uzaklaşmasının önlenmesi için sülük arka vantuzundan cerrahi düğümle işaretlenmektedir. Tedavide her hasta için farklı sülük kullanılmaması ya da steril şartların oluşturulmaması çok kötü sonuçlar ortaya çıkarabilir. Tedavi uygulayanların kesinlikle eğitilmiş kişiler olması gerekir ve her tedavide hasta aynı kişi bile olsa yeni sülüklerle tedavi devam edilmelidir. Tıbbi sülük tedavisi komplikasyonları içinde enfeksiyon, kanama sorunları ve anemi gelişmesi gibi sorunlar vardır. Bu tedavi aktif kanama odağı ve kanama diyatezi olan hastalara uygulanmamalıdır. Anemi rahatsızlığı ciddi seviyede olanlara (Hb<10), cerrahi operasyon ve girişim uygulanacaklara ve kan civıttıcı ilaç kullananlara sülük tedavisi uygulanmamalıdır. Hamile ve bebek emziren kadınlarda sülük tedavisi uygulanmasına dair bir veri mevcut değildir; bu nedenle bu gruba dahil olanlarda da uygulanmasından kaçınılmalıdır. Sülüklerin bağırsak ve ağızlarında *Aeromonas hydrophila* bakterisi bulunmaktadır. Kan emen sülüklerde *Aeromonas hydrophila* sülüğün konakçıdan emdiği kanın pıhtılaşmasını engelleyen salgılar üretmektedir. Tıbbi sülük tedavisi sonrası bulaşan siproflaksosine karşı dirençli aeromonas enfeksiyonlarının varlığı bilinmektedir (Wang vd., 2011). *Aeromonas hydrophila* komplikasyonlarını bilen deneyimli uygulayıcılar bunu önlemek için, bilhassa bağışıklık sistemi yetmezliği olan hastalarda, IV seftriakson profilaksisi kullanmaktadır. Ayrıca sülükler 10 dakika sodyum hipoklorit eklenen su içinde bekletip eksternal dekontaminasyon için kullananlar da vardır. Sülük tedavisi invaziv yani cerrahi bir girişimsel tedavi olduğu için konu uzmanı, tıbbi eğitim almış kişilerce uygulanmalıdır, aksi halde istenmeyen sonuçlar ortaya çıkabilir. Alternatif bir tıp uygulaması olan sülük tedavisi modern tıp dünyasında her geçen gün daha popülerleşmektedir (Bates vd., 1989). Aile hekimlerinin sorumlulukları arasında yer alan sağlık uygulamaları hakkında bilgi sahibi olma, güncel tedavi yöntemlerine hâkim olma, hastaları doğru tanı ve yönlendirme hatta bilinçlendirme olduğu gibi diğer alternatif ve tamamlayıcı tedavilerden olan hirudoterapi hakkında bilgilenmeleri uygun bir faaliyet olmuştur. Bu bilgiye sahip olunduktan sonra ise endikasyonlar ve kontendikasyonlar verilebilir.

Dünya üzerinde birçok ülkede sülük tedavisi günümüzde artarak devam etmektedir. Bu kapsamda sülük tedavisi uygulanacak kişilerde kontrendikasyonlara dikkat edilmeli ve ona göre endikasyonlara uygulanmalıdır. Dikkat edilmesi gereken endikasyonlar ve kontrendikasyon aşağıdaki tabloda yer almaktadır (Duruhan vd., 2014) (Jha vd., 2015) (Abdualkader vd., 2013)

Tablo 3. Sülük tedavisinde endikasyon ve kontrendikasyonlar (Duruhan vd., 2014) (Jha vd., 2015) (Abdualkader vd., 2013)

<p>Endikasyonlar (Uygulanan tedavi alanları)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• İnflamatuvar durumlar</li> <li>• Plastik ve rekonstrüktif cerrahi</li> <li>• Kardiyovasküler hastalıklar</li> <li>• Pasif konjesyon</li> <li>• Hipertansiyon</li> <li>• Tromboflebit, tromboz, variköz ven ve emboli</li> <li>• Hemoroid</li> <li>• Hematom</li> <li>• Omurganın ağrılı sendromları</li> <li>• Artoz, osteoartrit, periartrit ve romatoid artrit</li> <li>• Dış kulak yolu ve kronik kulak enfeksiyonları</li> <li>• Katarakt, glokom, travmatik yaralanma ve inflamasyon gibi göz hastalıkları</li> <li>• Gingivitis, paradontit ve gingival ödem gibi diş hastalıkları</li> <li>• Dermatit, psöriasis ve kronik ülser gibi cilt hastalıkları</li> <li>• Astım ve akut rinofarenjit gibi solunum yolu hastalıkları</li> <li>• Erkek ve kadın infertilitesi</li> <li>• Endometriosis ve mastit benzeri kadın hastalıkları</li> </ul>
<p>Kontrendikasyon (Dikkat edilecek hususlar)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mutlak hemofili</li> <li>• Anemi</li> <li>• Lösemi</li> <li>• Hipotoni</li> <li>• Hamilelik</li> <li>• Sülük salgısının aktif içeriğine allerjisi olanlarda</li> <li>• İmmün supresyon varlığında</li> </ul>



# 1. BÖLÜM

## GENEL BİLGİLER VE LİTERATÜR ÇALIŞMASI

### 1.1. Problem Durumu

Sucul ortamlarda yaşayan canlıların kirletici etkenlerden etkilenmesi kaçınılmazdır. Çünkü atmosferik ve karasal kirlenmelerin de nihai rezervuar alanı sucul ekosistemlerdir. Su kirleticileri içerisinde ise ağır metallerin suda yaşayan organizmalar üzerindeki etkileri çok uzun zamandır bilinen bir gerçektir. Sulardaki ağır metallerin sucul organizmalar arasındaki etkileri en çok balıklar, midye ve istiridye gibi çift kabuklular ve planktonlar üzerinde izlenmiştir. Bu canlıların ağır metalleri esansiyel olup olmamalarına göre ayırmadıkları ve bünyelerinde biriktirdikleri görülmektedir. Bütün ağır metaller belli konsantrasyonların üzerinde toksik etkilere sahiptirler. Özellikle cıva, kurşun, arsenik ve kadmiyum gibi esansiyel olmayan metallerin çok düşük miktarları bile canlılar üzerinde toksik etkilere sahiptir (Rainbow, 1988). Deniz ve tatlı su kaynaklarında yaşayan bu canlıların toksik metalleri bünyelerinde biriktirme özelliklerinden dolayı bu canlılar aynı zamanda çevresel kirlenmenin bir göstergesi olarak da kullanılırlar (Sabullah vd., 2015). Midye ve istiridye gibi çift kabuklu canlılar beslenmek maksadı ile suyu sürekli bir şekilde süzdüklerinden ve suda mevcut kirleticileri bünyelerinde topladıklarından bu durumun bir sonucu olarak hem söz konusu canlılar hem de bunlarla beslenen canlılar, kirleticilerden doğrudan etkilenmektedir. Bu tehlike sudaki diğer organizmalar için de geçerlidir (Olugbojo ve Akinyemi, 2016).

Ağır metaller suda canlı organizmaların hayati fonksiyonlarını baskı altına alarak özellikle bağışıklık sistemini zayıflatırlar ve patolojik değişimlere neden olurlar (Mohammad vd., 2015). Ağır metallerin balıklar başta olmak üzere birçok canlıda genel metabolizmayı etkilemesinin yanı sıra kan parametrelerinde anormal değişimlere, davranış bozukluklarına ve hatta reaktif oksijen türlerinin üretimi ile oksidatif strese de yol açtığı bilinmektedir (Ubani-Rex vd., 2017). Bakır ve çinko birçok hormon ve

enzimin yapısına katılarak, canlının büyümesinde önemli olduğundan insan ve hayvanların beslenme rasyonlarında mutlak bulunması tavsiye edilmektedir. Bu elementlerin olmaması veya fazla olmasında, hayvan ve insanların hormon ve enzim sistemleri üzerinde olumsuz etkilerin görüldüğü, hatta ölüme varan ciddi bulgulara rastlanıldığı bildirilmiştir (Becking, 1976). Antioksidant savunma mekanizması ağır metal kirleticilerinin bir sonucu olarak serbest radikallerin ve reaktif oksijen türlerinin üretimlerinin artışı ile birlikte zorlanmakta ve bu durumun bir sonucu olarak oksidatif stres kaçınılmaz olmaktadır. Bu durumun ortaya çıkmasında ağır metallerin çok büyük bir katkısı olmaktadır. Serbest radikaller aynı zamanda hücrenin normal ve rutin metabolizması sonucu da üretilmektedir. Mitekondriyal solunum reaktif oksijen türlerinin ortaya çıkmasında rol oynamaktadır. Reaktif oksijen türlerinin üretiminin artması protein ve lipidlerin oksidasyonunu arttırırken, gen ekspresyonlarında ve hücre redoks durumunda değişimlere de neden olmaktadır (Livingstone, 2003).

Ağır metallerin suda yaşayan organizmalar üzerindeki etkilerini ortaya koyan birçok araştırma bulunmasına karşın, sucul ekosistemin başka bir üyesi olan tıbbi sülükler üzerinde yapılmış çok az sayıda çalışma mevcuttur. Günümüze kadar sülüklerin yaklaşık 600 türü belirlenmiş olup, sadece 15 tanesi tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır. Daha dar anlamda “tıbbi sülükler” olarak sınıflandırılan türler yüzyıllardır Avrupa, Asya ve Amerika başta olmak üzere dünya üzerindeki hastaları tedavi etmek için kullanılmıştır. Geçmişte, tıbbi sülük genellikle morfolojik renk farklılıkları olan tek bir tür olarak kabul edilirdi. Bu mantıkla, en ayırt edici renge sahip iki fenotip, başlangıçta *Hirudo medicinalis* ve *Hirudo medicinalis officinalis* olarak adlandırılmıştır. "Macar Sülük" olarak da bilinen ikincisi, tür statüsü verildikten sonra *Hirudo officinalis* olarak yeniden adlandırılmıştır. Mevcut bilimsel anlayışla birlikte, vücut yüzeylerindeki farklı desenler, iki varsayım fenotipin aslında iki farklı türe ait olduğunu göstermiştir: *Hirudo medicinalis* (Linnaeus, 1758) ve *Hirudo verbana* (Carena, 1820). Ayrıca, türlerin sistematikteki yerleri DNA analizleri ile de belirlenmiştir (Kutschera, 2004).

19. Yüzyılın sonlarına doğru sülükle tedavi tıbbi uygulamalardan kaldırılmıştır. Bir zamanlar nesli tükenmekte olan sülük popülasyonu, 20. Yüzyıl boyunca toparlanabilmek için nispeten uzun bir zaman kazanmıştır. Günümüzde sülükle tedavinin prensip ve mekanizması nispeten daha iyi bilinmektedir. Son yıllarda ise sülük tedavisinin tamamlayıcı ve alternatif tıpta yer bulması ile birlikte popülasyonları

da her geçen azalmaya yüz tutmuştur. Sülüğe olan talebin artması kontrolsüz ve bilinçsiz avcılığını da teşvik etmiştir. Bu olumsuz durumlara sülüğün yaşam ortamları olan gerekli sulak alanların drenaj yoluyla kaybedilmesi eklenince yaşam ortamları oldukça daralmıştır. Doğal sülük popülasyonlarının büyük bir kısmının (örneğin, çayır alanları ve sığ göletler) yok edilmesi, geri kalan sülüklerin artık üreme için ihtiyaç duyduğu ava ulaşamamasına neden olmuştur. Dahası, sanayinin gelişmesi ile birlikte çevresel toksinler, bu hassas organizmaların Avrupa'da ve ülkemizde hayatta kalmasını daha da zorlaştırmıştır. Bugün Avrupa'da bulunan doğal sülük ortamlarının sayısı gerçekten çok azdır. Bu mevcut durum ne yazık ki ülkemizde de farklı değildir. Bu bakımlardan sülüklerin yaşam ortamlarında su kirleticilerinin başında gelen ağır metallerin etkilerinin belirlenmesi büyük önem arz etmektedir. Bu tez çalışmasında da seçilen iki ağır metalin tıbbi sülükler üzerindeki etkileri konu edilmiştir.

Sülük tedavisinin geri dönüşleri, diğer faktörlerin yanında, sülük tükürüğündeki farmakolojik olarak aktif maddelerin daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır. Sülük ısırığının en belirgin etkisi kan almadır. Bununla birlikte, farmakolojik etkileriyle karşılaştırıldığında, kan alınması yalnızca ikincil önemdedir. Beslenme aktivitesi sırasında, sülükler yara bölgesine farmakolojik açıdan farklı aktif maddelerden oluşan karmaşık bir karışım salgırlar. Sülük salyasının antikoagulan etkisi başta olmak üzere antiinflamatuar, antidepresan, antimikrobiyal, antiödemik etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Ancak yukarıda belirtildiği üzere sülüklerin hem yaşam alanları kısıtlanmakta hem de bu sınırlı alanlarda kirlenme ve olumsuz çevre koşulları ile karşı karşıya gelmektedirler. Özellikle kullanımları artan ağır metallere kaynaklı kirleticilerin sülüklerdeki etkileri konusunda çok az bilgi bulunmaktadır. Tıbbi önemlerinden dolayı ekonomik sülük türlerinden olan *Hirudo verbana* türünün bakır ve çinko gibi ağır metallere olan tepkileri bu çalışma kapsamında belirlenecek olup, çevresel kirleticilerden olan bu metallerin salya karakteristiğine etkileri araştırılmıştır. Yapılacak tez çalışması kapsamında ağır metallere maruz kalan sülüklerden elde edilen salyaların antimikrobiyal özelliklerinde bir farklılık olup olmadığı tespit edilmiştir. Elde edilen verilerin ağır metal kirliliğinin canlı organizmalara olan etkilerinin tıbbi sülük modelinde ortaya konması amaçlanmış olup, biyo-monitör olarak tıbbi sülüklerin de kullanımları ile literatüre katkıda bulunulacağı düşünülmektedir.

## 1.2. Araştırmanın Amacı

Günümüzde antibiyotik kullanımının çiftlik hayvanları, ekosistem ve hatta insan sağlığı bakımından sakıncalı sonuçlar doğurabildiği bilinen bir gerçektir. Özellikle son yıllarda kullanılan antibiyotiklere karşı patojenlerin direnç göstermesi tedaviye olan cevabı olumsuz bir şekilde etkilemektedir. Ortaya çıkan bu tablo karşısında başarılı bir tedavi için patojenlerin henüz direnç geliştirmedikleri antibiyotiklerin kullanılması veya yüksek dozlarda uygulanması gerekmektedir. Bu durum canlı ve çevre sağlığı açısından önemli sorunlara neden olmaktadır (McPhearson vd., 1991; Wise ve Johnson, 1998). Enfeksiyöz hastalıkların tedavisi veya büyütme faktörü gibi amaçlarla kullanılan antibiyotikler ile ilgili başka bir problem ise çiftlik hayvanları etinde kalıntı riskini arttırması ve gıda güvenliğini ve halk sağlığını ciddi bir şekilde tehdit etmesidir (Martinsen, vd., 1992). Örneğin en sağlıklı gıda kaynaklarından biri olan balık etindeki kalıntıların insanlar tarafından alınması sonrasında deri ve solunum sistemi semptomları gösteren aşırı hassasiyet, spesifik antibakteriyel direnç gelişimi ve bazı toksik etkilerin ortaya çıktığı önceki çalışmalardan anlaşılmaktadır (Salte ve Liestol, 1983).

Çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinde yoğun antibiyotik kullanımının insan sağlığı kadar ekosistemi de olumsuz bir biçimde etkilediği bilinmektedir. Suyun iyi bir çözücü ve iletken bir özelliğe sahip olması, balık yetiştiriciliğinde kullanılan antibiyotiklerden kaynaklı metabolitlerin tüm sucul ekosisteme, sedimente ve canlılara ulaşması karasal ekosistemlere kıyasla daha hızlı olmaktadır. Tüm bu olumsuzlukların yanı sıra sucul ortamda kullanılan antibiyotiklerin suya karışması yolu ile hedef dışındaki diğer organizmalar tarafından da alınması ve besin zincirinin üst trofik seviyelerine kadar ulaşarak insanlar için de bir tehdit kaynağı haline gelmektedir (Weston, 2000).

Bu gerekçelerden dolayı antibiyotik kullanımından kaynaklı söz konusu olumsuzluklardan korunmak maksadı ile alternatif çözümlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu noktada antimikrobiyal özelliğe sahip sülük salyasının değerlendirilmesi iyi bir strateji olabilir. Sülükler, yüzyıllardan beri birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca Mısır, Pers, Avrupa ve Çin'in en eski yazıtlarında sülükle tedaviye rastlanmış ve İbni Sina'nın tedavi uygulamaları içerisinde yer almıştır (Gödekmerdan, Arusan, Bayar ve Sağlam, 2011). Hastalıklarda tedavi edici özelliği olan birkaç sülük türü bulunup *Hirudo medicinalis* ve *H. verbana* bunların başında gelmektedir. *H. orientalis*, *H. troctina*, *Hirudinaria manillensis* (Asya tıbbi sülüğü) ve *Macrobdeella decora* (Kuzey Amerika tıbbi sülüğü) gibi diğer sülük türleri de bazen tedavi amaçlı kullanılmaktadır.

Son yıllarda tamamlayıcı ve alternatif tıbbi tedavi süreçlerine dâhil edilen sülük tedavisi kullanımı her geçen gün artmaktadır. Bu bağlamda sülük salyasının biyo-aktif maddeler yönünden oldukça zengin olduğu bilinmektedir. Hirudin sülük sıvısındaki en bilinen bileşendir. Gerçekte, hirudin yapısı saptandığı ve işlevinin büyük ölçüde anlaşıldığı sülük salyasındaki spesifik bir maddeye verilen isimdir. Sülük salgısındaki başka bir enzim olan hiyalüronidaz (orgelase), hiyalüronik asidin sindirimine katılır. Yayılma faktörü olarak, sülük salgısındaki diğer aktif maddelerin daha derindeki dokulara ulaşması için boşluklar ve yollar açtığı bilinmektedir. Fare deneylerinde, hiyalüronidazın antibiyotik özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu mekanizmanın muhtemelen streptokokların muköz kapsülüne saldırarak sağlandığı düşünülmektedir (Sawyer, 1986). Elde edilen bu verilerden yapılacak çalışma ile ağır metallerle maruz kaldıklarında tıbbi sülüklerin salyalarında antimikrobiyal etkinliğin ne yönde değiştiği ortaya konmaya çalışılmıştır. Yine benzer şekilde ağır metallerin vücut dokusunda birikim kapasitesi, bu birikimlerin ölümlere neden olup olmadığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda elde edilen verilerden tıbbi sülüklerin çevresel kirlenmenin takip edilmesinde kullanılabilecek iyi bir biyo-indikatör organizma olup olmadığı belirlenerek, benzer çalışmalara öncülük etmesi amaçlanmaktadır.

### 1.3. Araştırmanın Önemi

Artan tıbbi önemlerinden dolayı özellikle *Hirudo* cinsi sülüklerin ticareti yapılmakta ve toplanarak yurt dışına ihraç edilmektedir. Günümüzde dünyada en önemli sülük ihraç eden ülkelerin arasında Türkiye de bulunmaktadır. Ülkemizde 1960'lı yıllardan beri belirlenen üreme bölgelerinden kontrollü bir şekilde toplanarak Amerika Birleşik Devletleri, Almanya, Fransa, İngiltere ve İsveç'e sülük ihracatı yapılmaktadır (Gödekmerdan vd., 2011). Ancak, artan avcılık baskısı ile birlikte sülük popülasyonları 18. yüzyıldan itibaren ciddi bir şekilde tüm dünyada azalmaya başlamış ve ekonomik öneme sahip türler tükenme noktasına gelmiştir. Bu azalışın en büyük nedenleri ise tıbbi alanda ve olta yemi olarak yoğun bir şekilde kullanılmaları, kirlilik ve sulak alanların azalmasıdır (Kari vd., 2015). Stoklarının tehlike altında olmasından dolayı, tıbbi sülükler Doğa ve Doğal Kaynakların Korunması İçin Uluslararası Birlik (IUCN) tarafından Nesli Tükenme Tehlikesi Altında Olan Türlerin Kırmızı Listesine (Red List of Threatened Species) eklenmiştir (Trontelj vd., 2004). Sülüklerin stoklarının azalmasında rol oynayan en önemli etkenlerin başında çevresel bozulma ve su kirliliği

gelmektedir. Su kirliliğinin canlı organizmaların yaşamını etkileyen unsurlar arasında yer almasında ağır metallerin rolü çok büyüktür. Sülük salyasının antimikrobiyal bir içeriğe sahip olduğu bilinmesine karşın, çevre kirliliği sonucu salyanın bu özelliği üzerine ortaya çıkması muhtemel etkiler konusunda net bir veri bulunmamaktadır. Ayrıca her geçen gün azalan sülük popülasyonları üzerinde ağır metallerin etkilerinin de ortaya konması gerekmektedir. Bu bağlamda ağır metallere maruz kalan *Hirudo verbana* türü tıbbi sülük popülasyonlarında karşılaşılabilecek olumsuzlukların önceden belirlenmesine yönelik veriler elde edilmiştir.

Ayrıca yapılan tez çalışmaları kapsamında tıbbi sülüklerin çevresel kirlenmenin izlenmesinde kullanılabilir biyolojik bir materyal olarak kullanılması da değerlendirilmiştir. Bu bağlamda gelecekte yapılacak kirlilik çalışmalarında sülüklerin de kullanımları gündeme gelecek olup, çevresel kirlenmenin boyutları bu canlılar üzerindeki etkiler araştırılarak ortaya konabilir. Bu yaklaşımla; giderek artan çevresel kirlenmenin izlenmesi ve gerekli tedbirlerin alınması büyük önem arz etmektedir. Bu kapsamda yapılacak çalışmalar sonucunda, ağır metal kirlenmeleri neticesinde sülük popülasyonlarının nasıl etkileneceği de tespit edilmiştir. Her ne kadar diğer sucül organizmalarla bu izleme değerlendirme sörvey çalışmaları yapılsa da tıbbi sülükler gibi çevresel değişkenlere yüksek hassasiyet gösteren canlıların kullanılması daha net sonuçlar vermiştir. Sülükler, geniş coğrafik dağılıma sahip olmaları, çevresel değişimlere ve kirliliğe dayanıklı olmaları, iyi bir biyoakümülyasyon kapasitesine sahip olmaları, teşhis, örnekleme ve muhafazasının kolay olması, ekonomik ve ekolojik yönlerden önem taşıması gibi özelliklerinden dolayı iyi bir indikatör organizmadır. Bu özellikleri ile hassas biyo-monitör bir canlı olan sülüklerin çevresel kirlenmelerin takibinde kullanılmaları bu yönleri ile de önem arz etmektedir.

## 2. BÖLÜM

### YÖNTEM VE MATERYAL

#### 2.1. Yöntem

Araştırma kapsamında yapılacak denemelerde tıbbi sülük olarak bilinen türlerden biri olan *Hirudo verbana* kullanılmıştır. Çalışmalar Veteriner Fakültesi Su Ürünleri ve Hastalıkları Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Denemelerde kullanılan tıbbi sülükler 12-15 aylık olup yaklaşık ağırlıkları 5-7 gram arasında (ortalama 6 gram civarında) seçilmiştir. Tıbbi sülükler çalışma öncesinde en azından 3-4 hafta boyunca herhangi bir şekilde beslenmeden tutulmuşlardır. Bu açlık periyodu sonrasında her bir plastik kaba 15'er adet olacak şekilde stoklanmıştır. Sülüklerin stoklandığı plastik kaplar 5 litre hacminde olup, denemeler boyunca herhangi bir besleme yapılmamıştır.

Sülüklerin stoklandığı kaplara bakır ve çinko ağır metallerinin letal dozlarının altındaki farklı iki konsantrasyona sahip solüsyonları konulmuştur. Letal konsantrasyonlar çinko için 96 saat ve 30 gün sonunda sırası ile 15,83 mg/ L ve 3,00 mg/ L'dir. Bakır için ise 96 saat ve 30 günlük maruz kalma sürelerinde 0,84 mg/ L ve 0,09 mg/ L olarak belirlenmiştir (Petrauskienė, 2008). *Hirudo verbana* türü tıbbi sülüklerde bu lethal dozlardan hareketle doz altı konsantrasyonlarda belirlenen iki farklı metal konsantrasyonunun etkilerinin belirlenmesi için düşük ve yüksek dozlar belirlenmiştir. Daha önce lethal dozların altındaki bakır ve çinko metallerinin tıbbi sülüklerdeki etkileri ile ilgili herhangi bir araştırmaya ulaşılamadığından bu dozlar her bir konsantrasyon için dört kat artırılarak belirlenmiştir. Çinko metali için düşük doz 96 saatlik uygulamada 3,0 mg/L, yüksek doz düşük dozun dört kat fazlası olan 12 mg/ L dozu seçilmiştir. Yine çinkonun 30 günlük uygulanmasında düşük doz 0,5 mg/L olacak iken yüksek dozu 2,0 mg/L olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde sülüklerin yaşayacakları su ortamına ilave edilecek olan bakır metali için 96 saatlik uygulamada düşük doz 0,15 mg/ L, yüksek doz ise bu değer dördü katı olan 0,60 mg/ L olarak

belirlenmiştir. Bakır metalinin 30 günlük muamelesinde düşük doz 0,02 mg/L iken yüksek doz 0,08 mg/L olarak kullanılmıştır. Muamele gruplarının ayrıntılı açıklaması aşağıdaki tabloda özetlenmiştir. Kontrol grubunda ise herhangi bir metal kullanılmamıştır.

Tablo 4. Tıbbi sülüklerde uygulanacak çinko ve bakır metallerinin sürelerle bağlı doz grupları

Metal	Muamele Süreleri	Doz 1(Düşük Doz)	Doz 2 (Yüksek Doz)
Çinko	96 saat	3,0 mg/L	12,0 mg/L
	30 gün	0,5 mg/L	2,0 mg/L
Bakır	96 saat	0,15 mg/L	0,60 mg/L
	30 gün	0,02 mg/L	0,08 mg/L

## 2.2. Materyal

### 2.2.1. Sülük Bakım Koşulları ve Yaşam Ortamı

Ortalama 6 gram ağırlığındaki sülükler 5 litrelik plastik kaplara 15'er adet konularak her kaptaki toplam ortalama 90 gram ortalama oluşacak şekilde gruplara ayrılmıştır.



Şekil 4. Gruplandırılmış sülüklerin plastik kaplarda oluşturulan yaşam ortamı



Yukarıda verilen konsantrasyonların hazırlanmasında, çinko ve bakır metallere kimyasal olarak saf durumda olan sülfatlı formları ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  ve  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan suyun kontrol grupları dâhil temel parametreleri analiz edilerek ve yerinde ölçümler yapılarak belirlenmiştir. Analiz edilecek parametreler arasında sıcaklık, pH ve oksijen gibi parametreler yer almıştır. Saf suda eritilerek hazırlanan metal iyonları her gün tazelenerek su değişimi sağlanmıştır. Çalışmalar süresince sülükler içerisinde ölenler kaydedilerek gruplara göre ölüm oranlarının hesaplanmasında kullanılmıştır. Her iki metal için uygulanan metal dozlarının söz konusu sürelerde verilmesinden sonra, tıbbi sülükler buldukları plastik kaplardan alınıp kusturularak elde edilen salyaları analiz aşamasına kadar  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

Kusturma işlemi öncesinde ve sonrasında tıbbi sülükler tartılmıştır. Aynı şekilde salyanın bulunduğu tüplerin de daraları alınarak elde edilen salya miktarlarının ağırlıkları da hesaplanmıştır.



Şekil 5. Sülüklere kusturma işlemi öncesi soğuk duş uygulaması



Şekil 6. Sülüklere kusturma işlemi yapılması



Şekil 7. Kusturma sonrası elde edilen salyalar ve gruplandırılması

### 2.2.2. Ağır Metal Analizleri

Yukarıda belirtilen işlem ve tartımların ardından sülüklerin vücutlarında biriken metal miktarları bakır ve çinko için ayrı ayrı analiz edilmiştir. Bakır ve çinko analizleri yanı sıra, aynı örneklerden arsenik, demir ve kurşun analizleri de eş zamanlı olarak yapılmıştır. Söz konusu ağır metal analizleri ERÜ Teknoloji Araştırma Uygulama Laboratuvarlarında ICP-MS cihazında gerçekleştirilmiştir. Mikrodalga çözünürleştirme metodu olarak numunelerden 0.2 g alıp 5 ml derişik  $\text{HNO}_3$ , 2 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  ekleyerek yaş yakma uygulanmıştır. Daha sonra 25 ml ye seyreltilerek analiz gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar ppm cinsinden hesaplanmıştır.

### 2.2.3. Antimikrobiyal Analizler

Tıbbi sülüklerden elde edilen salyalarda antibakteriyel özelliklerin incelenmesi için, daha önce belirlenen gram pozitif ve gram negatif bakterilerde antibiyogram testleri yapılmıştır. Bu testlerde disk difüzyon yöntemi uygulanmıştır. Uygulanan disk difüzyon yöntemi Bauer vd. (1966) ve Biemer (1973)'den yararlanılarak yapılmıştır. Daha önceden izole edilen ve -80 °C'de muhafaza edilen patojenlerden *Yersinia ruckeri* ve *Lactococcus garviae* suşları genel besi yerlerinde çoğaltılmıştır. Bakteri suşlarının antibiyotik duyarlılıkları yukarıda değinildiği üzere standart disk difüzyon tekniği ile tespit edilmiştir. Bu yöntemde 0,5 McFarland yoğunluğunda hazırlanan bakteri süspansiyonlarından 100µl alınarak Mueller-Hinton Agar (MHA)'lı petrilerin yüzeyine yayılmıştır. Daha sonra besiyeri yüzeyine antibiyotik disklerle birlikte tıbbi sülük salyası emdirilen tüm diskler yerleştirilmiş ve  $24 \pm 2$  °C de 16- 18 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda disklerin etrafındaki zon çapları ölçülerek değerlendirilmiştir (CLSI, 2006). Çalışmada amoksisillin (AML 25µg), amoksisilin /klavulanik acid (AMC 30 µg), doksisisiklin (DO 30µg), trimetoprim-sülfametoksazol (SXT 25µg), eritromisin (E 15 µg), gentamisin (CN 10 µg), oksitetrasiklin (OT 30 µg), enroflaksasin (ENR 5 µg), okzolinik asit (OA 2 µg) ticari antibiyotik diskleri (Oxoid) ve steril disklere emdirilmiş tıbbi sülük salyaları kullanılmıştır. Antibiyogram analizleri sonucunda tıbbi sülüklerden elde edilen salya örneklerinin diğer ticari antibiyotik disklerle kıyaslanarak antimikrobiyal özellikleri belirlenmiştir.

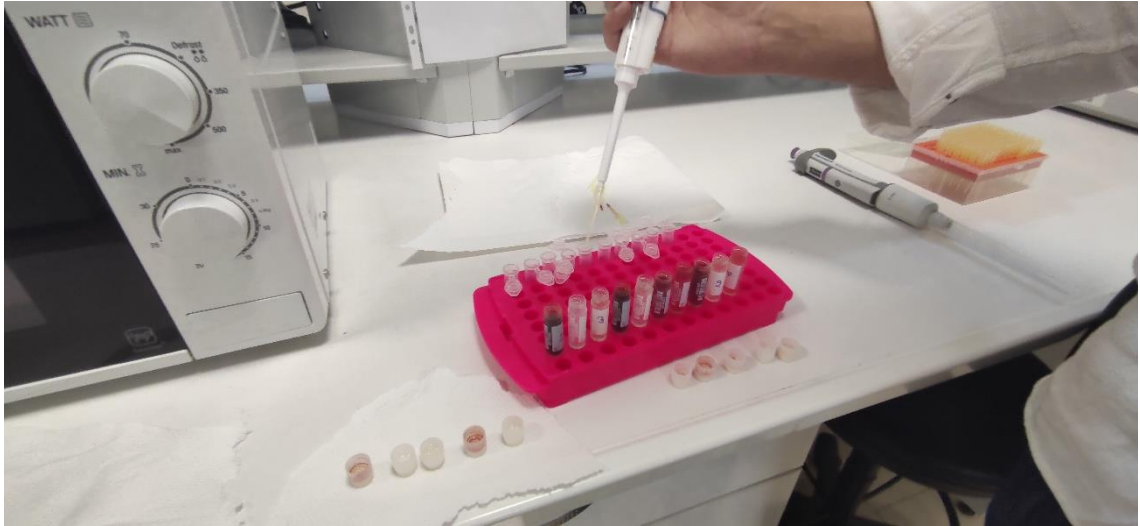


Şekil 8. Sülük salyasının steril boş disklere emdirilmesi

Ayrıca antimikrobiyal analizler minimum inhibisyon konsantrasyonlarını referans alan metot ile de yapılmıştır. Analizler Hashim vd. (2020), Ghosh vd. (2010) ve Wypij vd. (2018)'den yararlanılarak yapılmıştır.

#### 2.2.4. Malondialdehit (MDA) Analizleri

Ağır metal muamelelerinden sonra, tıbbi sülüklerde oksidatif bir stresin ortaya çıkıp çıkmadığı malondialdehyde (MDA) miktarları analiz edilerek belirlenmiştir. Bu amaçla sülüklerden elde edilen salya örneklerinin bir kısmı MDA analizlerinde kullanılmıştır. Salya örneklerine 1 ml MDA çözeltisi ilave edilerek 95°C'lik su banyosunda yaklaşık 30 dakika boyunca bekletilmiştir. Daha sonra 20 dakika buz banyosu yaptırılan numuneler, 10 dakika 10.000 rpm ile santrifüj yaptırılmıştır. Hali hazırda pembe renge dönmüş örnekler daha sonra 535-600 nm dalga boylarında spektrofotometrede okunmuştur. Örnekteki pembe rengin yoğunluğu MDA miktarı ile orantılı olduğundan, MDA miktarı standart grafiğe karşı gelen absorpsiyon değerinden hareketle belirlenmiştir. Kullanılacak seyreltme katsayısı ile çarpıldıktan sonra elde edilen sonuçlar  $\mu\text{M}/100 \text{ mL}$  olarak hesaplanmıştır. MDA analizleri için Esterbauer ve Cheeseman (1990) ve Ohkawa (1979)'dan yararlanılmıştır.



Şekil 9. MDA analizleri için salya örneklerine TBA ve TSA solüsyon eklenmesi

### 2.2.5. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler IBM-SPSS for Windows Release 25.0 Programı (SPSS Inc, Chicago, Illinois, United States of America) kullanılarak yapıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu histogram, q-q grafikleri ve Shapiro-Wilk testi kullanılarak normallik açısından test edildi. Normal dağılım gösteren veriler ortalama ve standart sapma (SD) olarak ifade edildi. Normal dağılmayan veriler ise medyan (25. ve 75. yüzdeler) olarak ifade edildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda One Way ANOVA (alternatif; Kruskal Wallis Testi) yapıldı. Post-hoc testi olarak Tukey ve Bonferroni testi kullanıldı. P değerinin  $<0.05$  olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



## 3. BÖLÜM

### BULGULAR

#### 3.1 Tıbbi Sülüklerin Canlı Ağırlık ve Yaşama Oranları

İki farklı periyotta uygulanan muamelelerde sülüklere herhangi bir besleme yapılmamıştır. Araştırma sonucunda yapılan ağırlık ölçümlerinde ise 96 saatlik uygulama sonucunda sülüklerde herhangi bir ağırlık azalması tespit edilmemiştir. 30 günlük çalışma sonucunda ise sülüklerde ortalama 0,1 ile 0,2 gram ağırlık azalmalarının olduğu belirlenmiştir. Bu ağırlık kayıplarının çalışma sonuçlarına etki etmeyeceği hesaplanmıştır. 96 saatlik uygulama sonucunda yaşama oranları %100 olarak belirlenirken, 30 günlük uygulama sonrasında sadece 3 adet sülük zayıyatı gerçekleşmiştir.

#### 3.2. Ağır Metal Analiz Sonuçları

Çalışmada çinko ve bakır metallerinin etkileri farklı süre ve dozlar için takip edilmiştir. 96 saat süreyle yüksek doz çinko nitrata maruz kalan sülüklerin kas dokusunda biriken ortalama demir düzeyleri, düşük doz çinko nitrata maruz kalan sülüklerden ve kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (sırasıyla;  $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ ). Diğer gruplar arasında, demir değişkeni açısından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir farklılık görülmemiştir ( $P > 0.05$ ) (**Tablo 5**).

96 saat süreyle yüksek doz çinko nitrata maruz kalan sülüklerin ortalama kas dokusunda tespit edilen bakır düzeyleri, düşük doz çinko nitrata maruz kalan sülüklerden ve kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (sırasıyla;  $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ ). 96 saat süreyle düşük doz çinko nitrata maruz kalan sülüklerin kas dokusundaki ortalama bakır düzeyleri kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ( $P = 0.033$ ) (**Tablo 5**).

Yine, 96 saat süreyle yüksek doz çinko nitrata maruz kalan sülüklerin ortalama çinko düzeyleri düşük doz çinko nitrata maruz kalan sülüklerden ve kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ve yüksek bulunmuştur (sırasıyla;  $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ ). 96 saat süreyle düşük doz çinko nitrata maruz kalan sülüklerin ortalama çinko düzeyleri kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ( $P = 0.033$ ) (**Tablo 5**).

96 saat süreyle yüksek doz çinko nitrata maruz kalan sülüklerin ortalama arsenik düzeyleri, düşük doz çinko nitrata maruz kalan sülüklerden ve kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (sırasıyla;  $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ ). 96 saat süreyle yüksek doz çinko nitrata maruz kalan sülüklerin ortalama arsenik düzeyleri ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir fark görülmedi ( $P > 0.05$ ) (**Tablo 5**).

96 saat süreyle düşük doz çinko nitrata maruz kalan sülüklerin ortalama kurşun düzeyleri, yüksek doz çinko nitrata maruz kalan sülüklerden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ( $P < 0.001$ ). Bu sonuçlardan kullanılan çinko nitrat miktarı ile analiz edilen kurşun düzeyleri arasında oransal bir ilişkinin olmadığı bulunmuştur. 96 saat süreyle yüksek doz çinko nitrata maruz kalan sülüklerin ortalama kurşun düzeyleri kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ( $P < 0.001$ ) (**Tablo 5**).

Tablo 5. Düşük ve yüksek doz çinko nitrat uygulamalarında 96. Saat sonunda çinko, demir, bakır, arsenik ve kurşun (ppm) değişkenlerin karşılaştırılması

	<b>Grup 1 (n=15) 96S-Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-DD</b>	<b>Grup 2 (n=15) 96S-Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-YD</b>	<b>Grup 3 (n=15) 96S-Kontrol</b>	<b>P Değeri</b>
<b>Fe</b>	22.68 ± 0.43 A	17.31 ± 0.17 C	22.33 ± 0.61 AB	<0.001
<b>Cu</b>	2.02 ± 0.01 C	2.33 ± 0.17 A	2.14 ± 0.11 B	<0.001
<b>Zn</b>	16.60 ± 1.41 B	20.41 ± 0.35 A	14.28 ± 1.58 C	<0.001
<b>As</b>	0.14 ± 0.02 B	0.18 ± 0.02 A	0.18 ± 0.03 A	<0.001
<b>Pb</b>	0.98 ± 0.07 AB	0.85 ± 0.01 C	0.98 ± 0.10 B	<0.001

96 saat süreyle düşük doz ve yüksek doz bakır sülfata maruz kalan sülüklerin ortalama demir düzeyleri kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (sırasıyla;  $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ ). Söz konusu zamanda uygulanan bakır sülfatın dokularda belirlenen demirin azalması yönünde bir etki gösterdiği kaydedilmiştir. Diğer gruplar arasında, demir değişkeni açısından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir fark görülmedi ( $P > 0.05$ ) (**Tablo 6**).

96 saat süreyle düşük doz bakır sülfata maruz kalan sülüklerin ortalama bakır düzeyleri, yüksek doz ve kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu (sırasıyla;  $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ ).

96 saat süreyle düşük doz ve yüksek doz bakır sülfata maruz kalan sülüklerin ortalama çinko düzeyleri kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (sırasıyla;  $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ ). Diğer gruplar arasında, çinko değişkeni açısından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir fark görülmedi ( $P > 0.05$ ) (**Tablo 6**). Bakır sülfatın sülük dokularında biriken çinko miktarının azalmasına neden olduğu ortaya konmuştur.

96 saat süreyle düşük doz bakır sülfata maruz kalan sülüklerin ortalama arsenik düzeyleri, yüksek doz bakır sülfat grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ( $P < 0.001$ ). Uygulanan bakır sülfat miktarı ile dokularda biriken arsenik miktarları arasında ters bir ilişkinin olduğu belirlenmiştir. 96 saat süreyle yüksek doz bakır sülfata maruz kalan sülüklerin ortalama arsenik düzeyleri kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ( $P < 0.001$ ) (**Tablo 6**).

96 saat süreyle düşük doz bakır sülfata maruz kalan sülüklerin ortalama kurşun düzeyleri yüksek doz bakır sülfat grubundan ve kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu (sırasıyla;  $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ ). 96 saat süreyle yüksek doz bakır sülfata maruz kalan sülüklerin ortalama kurşun düzeyleri kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ( $P < 0.001$ ) (**Tablo 6**). Uygulanan bakır sülfat miktarı ile dokularda depolanan kurşun miktarının ters orantılı olarak değiştiği belirlenmiştir.



Tablo 6. Düşük ve yüksek doz bakır sülfat uygulamalarında 96. Saat çinko, demir, bakır, arsenik ve kurşun (ppm) değişkenlerin karşılaştırılması

	<b>Grup 1 (n=15)</b> <b>96S- CuSO<sub>4</sub>-DD</b>	<b>Grup 2 (n=15)</b> <b>96S-CuSO<sub>4</sub>-YD</b>	<b>Grup 3 (n=15)</b> <b>96S-Kontrol</b>	<b>P Değeri</b>
<b>Fe</b>	17.83±0.47 B	18.31±1.32 B	22.33±0.61 A	<0.001
<b>Cu</b>	2.38±0.23 A	1.85±0.01 C	2.14±0.11 B	<0.001
<b>Zn</b>	12.33±1.22 C	12.45±0.19 B	14.28±1.58 A	<0.001
<b>As</b>	0.17±0.01 BC	1.03±0.08 A	0.18±0.03 B	<0.001
<b>Pb</b>	1.08±0.01 A	0.21±0.01 C	0.98±0.10 B	<0.001

30 gün süreyle düşük doz çinko nitrata maruz kalan sülüklerin ortalama demir düzeyleri yüksek doz çinko nitrat grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ( $P<0.001$ ). Benzer biçimde, 30 gün süreyle yüksek doz çinko nitrata maruz kalan sülüklerin ortalama demir düzeyleri kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ( $P<0.001$ ) (**Tablo 7**).

30 gün süreyle düşük doz çinko nitrata maruz kalan sülüklerin ortalama bakır düzeyleri kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ( $P=0.002$ ). Diğer gruplar arasında, bakır değişkeni açısından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir fark görülmedi ( $P>0.05$ ) (**Tablo 7**).

30 gün süreyle düşük doz çinko nitrata maruz kalan sülüklerin ortalama çinko düzeyleri yüksek doz çinko nitrat ve kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (sırasıyla;  $P=0.001$ ,  $P<0.001$ ). Diğer gruplar arasında, çinko değişkeni açısından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir fark görülmedi ( $P>0.05$ ) (**Tablo 7**).

30 gün süreyle yüksek doz çinko nitrata maruz kalan sülüklerin ortalama arsenik düzeyleri düşük doz çinko nitrat ve kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (sırasıyla;  $P=0.002$ ,  $P<0.001$ ). Diğer gruplar arasında, arsenik değişkeni açısından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir fark görülmedi ( $P>0.05$ ) (**Tablo 7**).

30 gün süreyle yüksek doz çinko nitrata maruz kalan sülüklerin ortalama kurşun düzeyleri düşük doz çinko nitrat ve kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu (sırasıyla;  $P<0.001$ ,  $P<0.001$ ). 30 gün süreyle düşük doz çinko nitrata maruz kalan sülüklerin ortalama kurşun düzeyleri kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ( $P=0.029$ ) (**Tablo 7**).

Tablo 7. Düşük ve yüksek doz çinko nitrat uygulamalarında 30 gün sonunda çinko, demir, bakır, arsenik ve kurşun (ppm) değişkenlerin karşılaştırılması

	<b>Grup 1 (n=15)</b> <b>30G-Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-DD</b>	<b>Grup 2 (n=15)</b> <b>30G-Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-YD</b>	<b>Grup 3 (n=15)</b> <b>30G-Kontrol</b>	<b>P</b> <b>Değeri</b>
<b>Fe</b>	20.39±1.47 BC	22.94±0.87 A	20.62±2.01 B	<0.001
<b>Cu</b>	1.80±0.23 C	2.24±0.10 AB	3.08±1.63 A	0.002
<b>Zn</b>	19.37±0.74 C	24.65±4.34 AB	26.23±4.21 A	<0.001
<b>As</b>	0.69±0.33 AB	0.37±0.01 C	0.85±0.25 A	<0.001
<b>Pb</b>	0.57±0.12 B	0.74±0.09 A	0.48±0.07 C	<0.001

30 gün süreyle düşük doz bakır sülfata maruz kalan sülüklerin ortalama demir düzeyleri yüksek doz bakır sülfat grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ( $P<0.001$ ). 30 gün süreyle yüksek doz bakır sülfata maruz kalan sülüklerin

ortalama demir düzeyleri kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ( $P<0.001$ ) (**Tablo 8**).

30 gün süreyle düşük doz ve yüksek doz bakır sülfata maruz kalan sülüklerin ortalama bakır düzeyleri kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu (sırasıyla;  $P<0.001$ ,  $P<0.001$ ). 30 gün süreyle yüksek doz bakır sülfata maruz kalan sülüklerin ortalama, bakır düzeyleri düşük doz bakır sülfat grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ( $P=0.002$ ) (**Tablo 8**).

30 gün süreyle düşük doz ve yüksek doz bakır sülfata maruz kalan sülüklerin ortalama çinko düzeyleri kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (sırasıyla;  $P=0.011$ ,  $P<0.001$ ). 30 gün süreyle düşük doz bakır sülfata maruz kalan sülüklerin ortalama çinko düzeyleri yüksek doz bakır sülfat grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ( $P=0.011$ ) (**Tablo 8**).

30 gün süreyle düşük doz ve yüksek doz bakır sülfata maruz kalan sülüklerin ortalama arsenik düzeyleri kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (sırasıyla;  $P<0.001$ ,  $P<0.001$ ). Diğer gruplar arasında, arsenik değişkeni açısından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir fark görülmedi ( $P>0.05$ ) (**Tablo 8**).

30 gün süreyle yüksek doz bakır sülfata maruz kalan sülüklerin ortalama kurşun düzeyleri düşük doz ve kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu (sırasıyla;  $P<0.001$ ,  $P<0.001$ ). 30 gün süreyle düşük doz bakır sülfata maruz kalan sülüklerin ortalama kurşun düzeyleri kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ( $P<0.001$ ) (**Tablo 8**).

Tablo 8. Düşük ve yüksek doz bakır sülfat uygulamalarında 30 gün sonunda çinko, demir, bakır, arsenik ve kurşun (ppm) değişkenlerin karşılaştırılması

	<b>Grup 1 (n=15)</b> <b>30G-CuSO<sub>4</sub>-DD</b>	<b>Grup 2 (n=15)</b> <b>30G-CuSO<sub>4</sub>-YD</b>	<b>Grup 3 (n=15)</b> <b>30G-Kontrol</b>	<b>P Değeri</b>
<b>Fe</b>	20.71±0.98 BC	24.80±0.65 A	20.62±2.01 C	<0.001
<b>Cu</b>	6.20±0.28 A	4.88±0.06 B	3.08±1.63 C	<0.001
<b>Zn</b>	20.51±1.46 B	17.52±1.23 C	26.23±4.21 A	<0.001
<b>As</b>	0.18±0.01 B	0.22±0.02 B	0.85±0.25 A	<0.001
<b>Pb</b>	0.18±0.04 C	0.70±0.07 A	0.48±0.07 B	<0.001

### 3.3. MDA Sonuçları

İki farklı sürede çinko ve bakıra maruz bırakılan sülüklerden elde edilen salyalarda MDA analizleri yapılmıştır. 96 saat süreyle düşük doz çinko nitrata (Grup 1: 96S-Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-DD) maruz kalan sülüklerin ortalama salya MDA düzeyleri, 96S-Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-YD, 30G-Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-YD, 30G-CuSO<sub>4</sub>-DD, 30G-CuSO<sub>4</sub>-YD ve 30G-Kontrol gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (sırasıyla; P<0.001, P<0.001, P<0.001, P<0.001, P<0.001) (**Tablo 9**).

96 saat süreyle yüksek doz çinko nitrata (Grup 2: 96S-Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-YD) maruz kalan sülüklerin ortalama salya MDA düzeyleri, 96S-Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-DD, 96S-CuSO<sub>4</sub>-DD, 96S-CuSO<sub>4</sub>-YD, 96S-Kontrol ve 30G-Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-DD gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu (sırasıyla; P<0.001, P<0.001, P<0.001, P<0.001, P<0.001). 96 saat süreyle yüksek doz çinko nitrata (Grup 2: 96S-Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-YD) maruz

kalan sülüklerin ortalama salya MDA düzeyleri 30G-CuSO<sub>4</sub>-DD grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (P=0.009). (**Tablo 9**).

96 saat süreyle düşük doz bakır sülfata (Grup 3: 96S-CuSO<sub>4</sub>-DD) maruz kalan sülüklerin ortalama salya MDA düzeyleri, 96S-Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-YD, 30G-Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-YD, 30G-CuSO<sub>4</sub>-DD, 30G-CuSO<sub>4</sub>-YD ve 30G-Kontrol gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (sırasıyla; P<0.001, P<0.001, P<0.001, P<0.001, P<0.001) (**Tablo 9**).

96 saat süreyle yüksek doz bakır sülfata (Grup 4: 96S-CuSO<sub>4</sub>-YD) maruz kalan sülüklerin ortalama salya MDA düzeyleri, 96S-Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-YD, 30G-Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-YD, 30G-CuSO<sub>4</sub>-DD, 30G-CuSO<sub>4</sub>-YD ve 30G-Kontrol gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (sırasıyla; P<0.001, P<0.001, P<0.001, P<0.001, P<0.001) (**Tablo 9**).

96 saat kontrol grubunda (Grup 5: 96S-Kontrol) yer alan sülüklerin ortalama salya MDA düzeyleri, 96S-Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-YD, 30G-Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-YD, 30G-CuSO<sub>4</sub>-DD, 30G-CuSO<sub>4</sub>-YD ve 30G-Kontrol gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (sırasıyla; P<0.001, P<0.001, P<0.001, P<0.001, P=0.007) (**Tablo 9**).

Tablo 9. Gruplar arası 96. saat salya MDA değişkenlerin karşılaştırılması

	Grup 1 (n=15) 96S-Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> - DD	Grup 2 (n=15) 96S-Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> - YD	Grup 3 (n=15) 96S-CuSO <sub>4</sub> - DD	Grup 4 (n=15) 96S-CuSO <sub>4</sub> - YD	Grup 5 (n=15) 96S-Kontrol	P Değeri
MDA	0.27 ± 0.01 BCD	1.34 ± 0.42 A	0.43±0.21 BC	0.23±0.06 D	0.55±0.48 B	<0.001

30 gün boyunca düşük doz çinko nitrate (Grup 6: 30G-Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-DD) maruz kalan sülüklerin ortalama salya MDA düzeyleri, 96S-Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-YD, 30G-Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-YD, 30G-CuSO<sub>4</sub>-DD, 30G-CuSO<sub>4</sub>-YD ve 30G-Kontrol gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (sırasıyla; P<0.001, P<0.001, P<0.001, P<0.001, P=0.015) (**Tablo 10**).

30 gün boyunca yüksek doz çinko nitrata (Grup 7: 30G-Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-YD) maruz kalan sülüklerin ortalama salya MDA düzeyleri, 96S-Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-DD, 96S-CuSO<sub>4</sub>-DD, 96S-CuSO<sub>4</sub>-YD, 96S-Kontrol, 30G-Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-DD gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek (sırasıyla; P<0.001, P<0.001, P<0.001, P<0.001, P=0.015), 30G-CuSO<sub>4</sub>-DD gruplarından ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (P=0.042) (**Tablo 10**).

30 gün boyunca düşük doz bakır sülfata (Grup 8: 30G-CuSO<sub>4</sub>-DD) maruz kalan sülüklerin ortalama salya MDA düzeyleri, 96S-Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-DD, 96S-Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-YD, 96S-CuSO<sub>4</sub>-DD, 96S-CuSO<sub>4</sub>-YD, 96S-Kontrol, 30G-Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-DD, 30G-Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-YD ve 30G-Kontrol gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu (sırasıyla; P<0.001, P=0.009, P<0.001, P<0.001, P<0.001, P<0.001, P=0.042, P<0.001)(**Tablo 10**).

30 gün boyunca yüksek doz bakır sülfata (Grup 9: 30G-CuSO<sub>4</sub>-YD) maruz kalan sülüklerin ortalama salya MDA düzeyleri, 96S-Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-DD, 96S-CuSO<sub>4</sub>-DD, 96S-CuSO<sub>4</sub>-YD, 96S-Kontrol, 30G-Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-DD ve 30G-Kontrol gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu (sırasıyla; P<0.001, P<0.001, P<0.001, P<0.001, P<0.001, P=0.016) (**Tablo 10**).

30 Gün kontrol grubunda (Grup 10: 30G-Kontrol) yer alan sülüklerin ortalama salya MDA düzeyleri, 96S-Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-DD, 96S-CuSO<sub>4</sub>-DD, 96S-CuSO<sub>4</sub>-YD, 96S-Kontrol, 30G-Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-DD gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek (sırasıyla; P<0.001, P<0.001, P<0.001, P<0.007, P=0.015), 30G-Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-YD ve 30G-Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-DD gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (P<0.001, P=0.016) (**Tablo 10**).

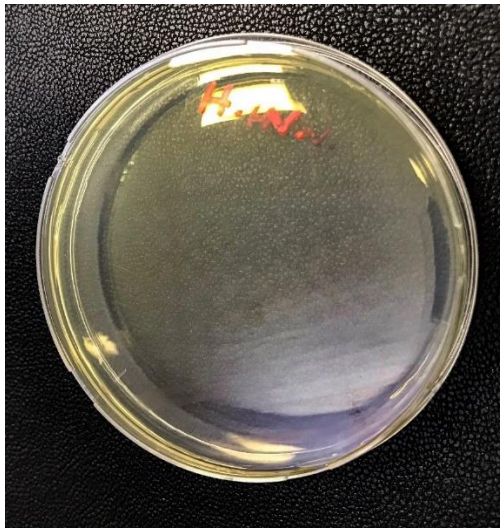
Diğer gruplar arasında, MDA değişkeni açısından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir fark görülmemiştir (P>0.05) (**Tablo 10**).

Tablo 10. Gruplar arası 30. gün MDA değışkenlerin karşılaştırılması

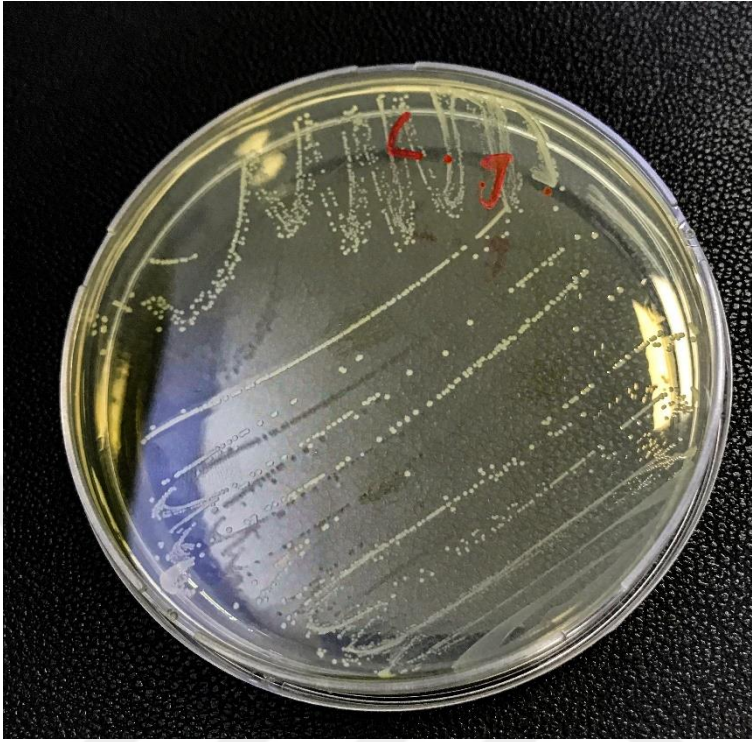
	Grup 1 (n=15) 30G-Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> - DD	Grup 2 (n=15) 30G-Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> - YD	Grup 3 (n=15) 30G-CuSO <sub>4</sub> -DD	Grup 4 (n=15) 30G-CuSO <sub>4</sub> -YD	Grup 5 (n=15) 30G-Kontrol	P Değeri
MDA	0.58±0.24 C	1.41±0.58 AB	1.95±0.02 A	1.76±0.19 A	1.17±1.02 B	<0.001

### 3.4. Antimikrobiyal Analiz Sonuçları

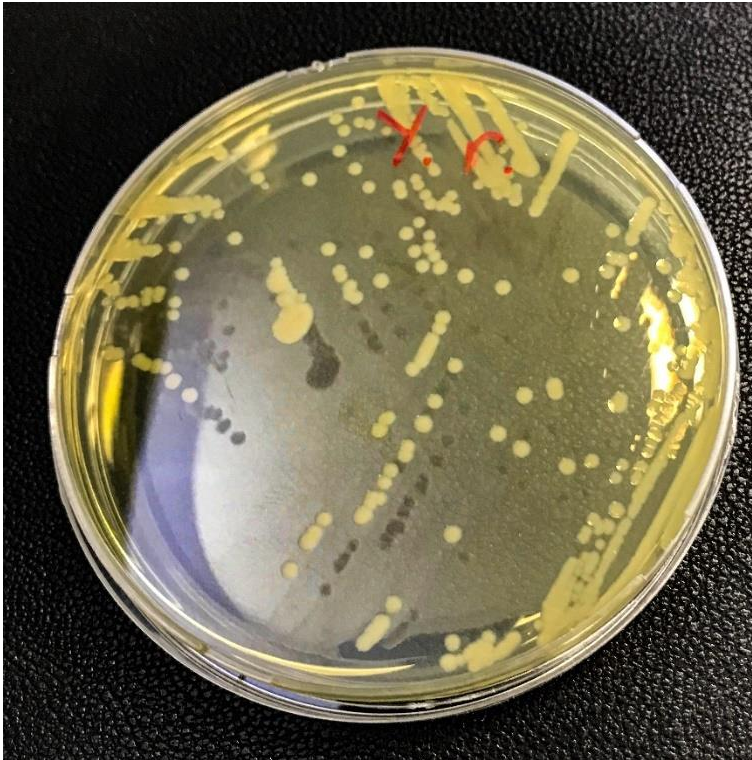
Tıbbi sülüklerden elde edilen salyaların antibakteriyel özelliklerinin belirlenmesi için, daha önce balıklardan izole edilen gram pozitif *Lactococcus garviae* ve gram negatif *Yersinia ruckeri* suşları kullanılmıştır. Bakteri suşlarının, sülük salyalarına ve antibiyotik disklere karşı duyarlılıkları yukarıda değinildiği üzere standart disk difüzyon tekniği ile tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmalarda sülük salyalarının disk difüzyon yöntemine göre herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmaların doğrulanması bakımından antimikrobiyal testler aynı zamanda minimum inhibisyon konsantrasyonlarını referans alan metot ile de gerçekleştirilmiş olup, bu analizlerde de sülük salyalarının hem *Lactococcus garviae* hem de *Yersinia ruckeri* suşları üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 10. Sülük salyası ilave edilen besi yerinde (TSA) herhangi bir koloninin oluşmadığını gösterir fotoğraf

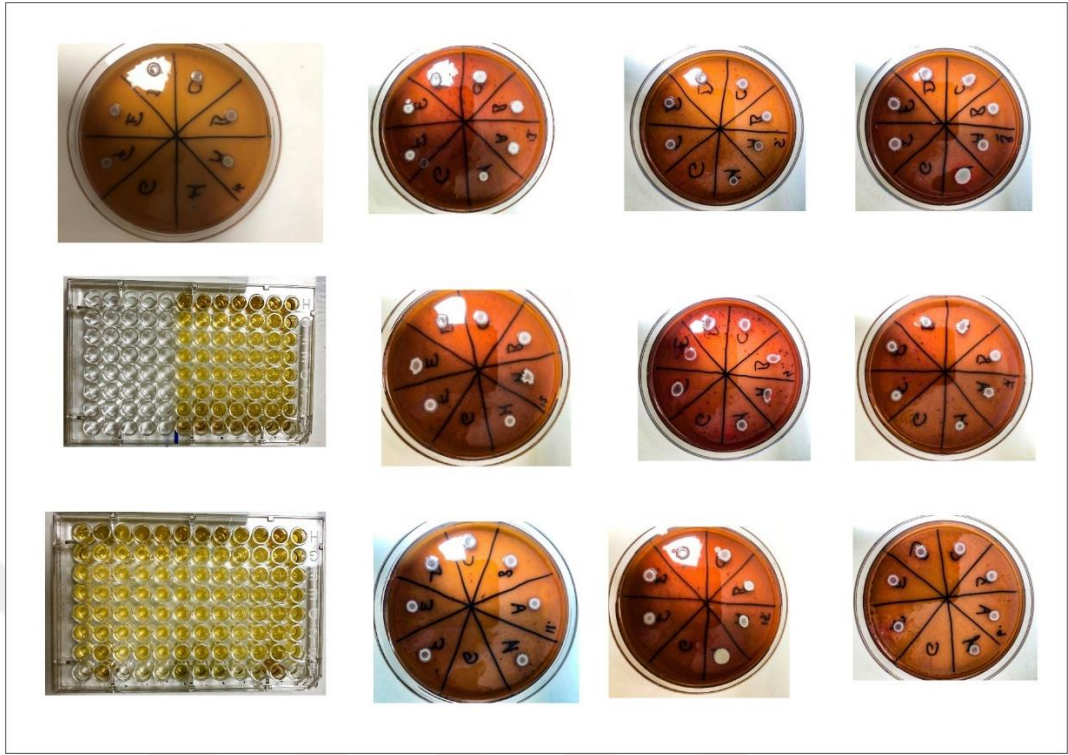


Şekil 11. Çalışmanın antimikrobiyal bölümünde kullanılan *Lactococcus garviae* kolonileri



Şekil 12. Çalışmanın antimikrobiyal bölümünde kullanılan *Yersinia ruckeri* kolonileri





Şekil 13. Mik yöntemine göre sülük salyalarının *Lactococcus garviae* suşları üzerine etkileri



Şekil 14. Mik yöntemine göre sülük salyalarının *Yersinia ruckeri* suşları üzerine etkileri

## 4.BÖLÜM

### TARTIŞMA-SONUÇ VE ÖNERİLER

#### 4.1. Tartışma

Ağır metallerin tıbbi sülükler üzerindeki etkileri ile ilgili çalışmalarda emilen kan miktarında ve canlı ağırlıkta azalmalar olduğu belirtilmiştir. Kullanılan ağır metal karışımının konsantrasyonuna bağlı olarak sülüklerin emdikleri kan miktarının 4 hafta sonunda kontrol grubunda canlı ağırlığın %174'ü oranında iken, %05 ağır metal grubunda alınan kan miktarının %55'e düştüğü tespit edilmiştir. Uygulanan ağır metal karışım konsantrasyonu %2'ye çıkarıldığında ise sülüklerin hiç kan emmedikleri rapor edilmiştir (Petrauskiene, 2001). Mevcut çalışmada ise sülüklere herhangi bir besin temini söz konusu olmamakla birlikte 0,1-0,2 g düzeyindeki ağırlık kayıpları bu çalışmaya benzer şekilde gözlenmiştir. Bu ağırlık kayıplarının 96 saat uygulama gruplarından gözlenmemiş olup, bu kayıplar 30 günlük uygulamalar için geçerlidir. Ağırlık kayıplarının sülüklerin beslenmesinde herhangi bir besinin kullanılmaması ve uygulanan ağır metallerin vücuttan atılımları için daha çok enerjiye ihtiyaç duyulmasının bir sonucu olabilir. Kısaca ağırlık kayıpları ile ilgili etkiler 30 günlük uygulama gruplarında gözle görülür bir şekilde gözlemlenmiştir ve bu durum 96 saatlik uygulamalarda söz konusu değildir. Ağır metal uygulanan gruplarda ise toplam 3 adet ölüm gerçekleşmiş olup, ölümlerin uygulama yapılan kaplarda sıkışmalara bağlı fiziksel hasardan kaynaklandığı anlaşıldığından, ölümlerin toksik olmadığı düşünülmektedir. Ölümlerin daha uzun süre uygulama periyotlarında ve yüksek metal konsantrasyonlarında ortaya çıktığı kaydedilmiştir.

Toksisite ve ağır metal birikimleri bakımından (Alaama vd., 2021) tarafından yapılan çalışmada göldeki ağır metal artışlarına bağlı olarak sülüklerin kas doku ve salyalarındaki ağır metal birikimlerinin artış gösterdiği kaydedilmiştir. Mevcut çalışmada da tıbbi sülüklerin kas dokularındaki ağır metal birikimlerinin uygulama

dozlarına bağılı olarak değiştiği belirlenmiş olup, bu sonuçlar her iki yayını doğrulamaktadır. Her iki çalışmada farklı tıbbi sülük türleri kullanılmış olsa da dokularda ağır metal birikim dinamiği, ortamdaki ağır metal miktarına bağlı olarak birbirine benzer görünmektedir. Ayrıca bakır ve çinko gibi ağır metallere maruz bırakılan sülüklerin ortamdaki uzaklaşma, beslenme faaliyetlerini azaltma, tutunma özelliklerinde ve boşaltım faaliyetlerinin etkilendiği gözlenmiştir. Söz konusu çalışmalarda bu parametrelerin ağır metal çalışmalarında davranışsal göstergeler olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Petrauskiene, 2003). Yine benzer bir çalışmada, çinko ve bakırın farklı konsantrasyonlarının bireysel veya birlikte etkilerinin araştırıldığı başka bir araştırmada uygulama süreleri 48 saat, 96 saat, 10 gün, 20 gün ve 30 gün olarak belirlenmiştir. *Hirudo verbana* türü sülüklerde yapılan bu çalışmada bakırın çinkoya göre daha çok toksik etkiler gösterdiği bulunmuştur. Toksik etkilerin kısa periyotlardan ziyade uzun periyotlarda ortaya çıktığı vurgulanmıştır. Ayrıca inko ve bakırın birlikte kullanıldığı muamele gruplarında bireysel uygulamaların aksine toksik etkilerin çoğunlukla kısa periyotlarda gözlendiği tespit edilmiştir (Petrauskiene, 2008). Elde edilen bu bulgularla mevcut çalışmadan elde edilen bulgular birbirini destekler özelliktedir. Çünkü sülük dokularında belirlenen ağır metal birikimlerinin bakır sülfat uygulamalarında ve 30 günlük periyotta net bir biçimde ortaya çıktığı bulunmuştur.

Kısa süreli uygulamalarda uygulanan çinko nitrat miktarının sülük dokularında tespit edilen demir ve kurşun metallerinin miktarını ters orantılı bir Şekilde etkilediği bulunmuştur. 96 saatlik periyotta çinkonun düşük konsantrasyonlarında bu iki metalin artmasına karşın, yüksek dozlarının dokudaki demir ve kurşun miktarlarını ters bir biçimde azalttığı gözlenmiştir. Bu durumla ilgili sülüklerde yapılan herhangi bir çalışma bulunmadığından konu üzerinde daha fazla araştırma yapılması faydalı olacaktır. Diğer taraftan sudaki çinko miktarının artışına bağlı olarak sülük dokularındaki çinko, bakır ve arsenik metallerinin de arttığı belirlenmiştir.

Kısa periyotlarda bakır sülfatın yaşama ortamlarına ilave edilmesinin sülük dokularında biriken çinko ve demir miktarlarını istatistiksel olarak etkilemediği sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte dokulardaki depolanan arsenik miktarlarının bakır artışı ile birlikte artmasına karşın, kurşun miktarlarında azalmalara yol açtığı tespit edilmiştir. Yukarıda elde edilen bulgulardan sularına çinko ilave edilen sülüklerde dokuda biriken bakırın artış göstermesine rağmen, benzer biçimde aynı etkinin bakır

tarafından gösterilmediği anlaşılmaktadır. (Petrauskiene, 2008) tarafından yapılan çalışmada da benzer sinerjistik etkilerin kısa süreli metal uygulamalarında görülebileceği belirtilmiş olup, bu çalışmayı destekler niteliktedir.

30 günlük periyotta çinko nitratin artan dozlarına bağlı olarak sülük dokularında biriken demir ve kurşun miktarlarının artış göstermesine karşılık bakır miktarının istatistiki olarak değişmediği, ancak arsenik miktarının azalma gösterdiği belirlenmiştir. Söz konusu bulgulardan uzun süreli uygulamalarda sülüklerde ağır metal birikim dinamiğinin kısa süreli uygulamalarından oldukça farklılık gösterdiği anlaşılmaktadır. Bu alanda da literatürde benzer çalışmalar oldukça sınırlı olduğundan, sülüklerde ağır metal birikim dinamiği ve sinerjistik etkiler araştırılmaya muhtaç konular arasında yer almaktadır.

Uzun periyotta bakır sülfat konsantrasyonundaki artış ile birlikte sülük dokularında demir ve kurşun miktarlarını arttırdığı, buna karşın arsenik ve çinko miktarlarını ters orantılı olacak biçimde azalttığı belirlenmiştir. Buraya kadar belirtilen ikili metal ilişkilerinden suya ilave edilen çinkonun sülük dokularında biriken bakır miktarını arttırmasına rağmen, benzer etkinin bakır tarafından gösterilmediği aksine dokulardaki çinkonun azalması yönünde etki ettiği belirlenmiştir. Bu veriler Petrauskiene (2008) tarafından gerçekleştirilen çalışmada elde edilen verilerden ortaya çıkan etkinin aslında sinerjistik olmadığını ortamdan çinkonun çekilmesi halinde toksisitenin daha düşük olacağını göstermektedir. Bu yönü ile çalışmamız farklılık arz etmektedir. Sonuç olarak bakırın sülüklerde toksik etkilerin araştırılması için çinkoya göre daha iyi bir indikatör olduğu söylenebilir. Ancak bu etkilerin kısa periyotlardan ziyade en az 30 gün ve daha fazla uygulama sürelerinde bakılmasının daha net verilere ulaştıracağı düşünülmektedir.

Yapılan çalışmada, 96 saat ve 30 günlük ağır metal uygulamaları sonrasında sülüklerden salya sağımları gerçekleştirilmiş ve MDA değerleri analiz edilmiştir. MDA analizleri 96 saatlik ve 30 günlük denemeler için ayrı ayrı değerlendirilmiştir. 96 saatlik ağır metal uygulamaları sonrasında yüksek doz çinko nitratin sülük salyalarında en yüksek MDA değerine ulaştığı belirlenmiştir. Bu durum yüksek doz çinkonun sülüklerde oksidatif stres kaynağı olduğunu göstermektedir. Ancak literatürde sülük salya MDA'ları üzerinde yapılmış herhangi bir araştırma bulunmadığından 96 saat

sonrasında elde edilen bu değerler başkaca yayınlarla kıyaslanamamıştır. Ancak elde edilen veriler kısa periyotlar için çinkonun *Hirudo verbana* türü tıbbi sülüklerde bir stres kaynağı olduğunu kanıtlar niteliktedir.

Yine 30 günlük periyotta elde edilen verilerden çinko nitratın 96 saatlik MDA sonuçlarına benzer biçimde düşük doz bakır sülfatın en etkili olduğu görülmüştür. Bununla birlikte yüksek doz bakır sülfat ve yüksek doz çinko nitratın da düşük doz bakır sülfata benzer etki göstermiş olup, istatistiksel olarak aralarında farklılık olmadığı anlaşılmıştır. Ancak, 30 gün boyunca düşük doz çinko nitratın kontrol grubu ile kıyaslandığında MDA değerini oldukça düşürdüğü belirlenmiştir. Bu sonuçtan hareketle düşük doz çinkonun sülüklerde oksidatif stresi azaltıcı bir etkisi olabilir. Bu noktadan hareketle konunun netleştirilmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. 96 saatlik uygulamalar için belirtildiği gibi bu gruplarda da literatürde benzer bir sülük araştırması bulunamadığından, araştırma sonuçları kendi içinde tartışılmıştır. Dolayısı ile 96 saatlik kısa süreli uygulamalarda çinko nitrat ağır metal toksisite verilerden MDA'nın değerlendirilmesinde kullanılabileceği düşünülmektedir. Ancak uzun 30 gün gibi süreli ağır metal etkilerinin sülüklerde değerlendirilmesinde ise bakır sülfatın ön plana çıktığı söylenebilir.

Tıbbi sülük salyasının antimikrobiyal etkilerinin ortaya konmasında farklı iki patojen *Lactococcus garviae* ve *Yersinia ruckeri* bakterileri kullanılmıştır. Tüm muamele gruplarından 96 saat ve 30 günlük ağır metal uygulanan sülüklerden salyaları sağılmış ve antimikrobiyal sonuçları ayrı değerlendirilmiştir. Ancak tüm muamele gruplarından alınan tıbbi sülük salyalarının yukarıda verilen balık patojenleri üzerinde herhangi baskılayıcı etki göstermediği belirlenmiştir. Bu bakımdan disk difüzyon yöntemi ile elde edilen antimikrobiyal sonuçlar, tekraren minimum inhibisyon konsantrasyonunu baz alan diğer metotlarla da yapılarak veriler doğrulanmıştır. Bu nedenle balık patojenleri üzerinde *Hirudo verbana* türü tıbbi sülüklerin herhangi bir antimikrobiyal etkisinin olmadığı kanıtlanmıştır. Ancak bu durum diğer balık ve/veya insan patojenleri için geçerli olmayabilir. Bu durumun açıklığa kavuşturulması için insan, su canlıları veya deney hayvanları üzerinde gerek *Hirudo verbana* gerekse diğer tıbbi sülüklerden elde edilen salyalar denenebilir. Literatür taramalarında Malezya sülüğü olarak bilinen *Hirudinaria manillensis* türü sülüklerin 14 haftalık açlık sonrası *Salmonella typhimurium* ve *E. Coli* patojenleri üzerinde etkili olduğu rapor edilmiştir.

Yine aynı çalışmada 23 hafta aç bırakılan sülüklerden elde edilen liyofilize salyanın *Staphylococcus aureus* ve *S. Typhimurium* patojenlerine karşı etkili oldukları belirlenmiştir (Abdualkader vd., 2011). Söz konusu çalışmada açlık periyodunun sülük salyasının antimikrobiyal karakteristiğine önemli düzeyde etki ettiği belirtilmiş olup, aynı zamanda bizim çalışmada kullandığımız türün de farklı olması sonuçların farklı çıkmasında birer faktör olabilir. Bu nedenlerle farklı açlık sürelerinin *Hirudo verbana* türü sülüklerde antimikrobiyal özelliklere etkilerinin araştırılması tavsiye edilebilir. (Malik vd., 2019) tarafından aynı sülük türü ile yapılan başka bir çalışmada ise 14 hafta aç bırakılan sülüklerin *E. Coli*'ye karşı etkili oldukları tespit edilmiştir. Dolayısı ile sülük salyasının antimikrobiyal etkilerin sağlıklı bir şekilde ortaya konabilmesi için; sülük türü, açlık periyodu, salya saflığı ve formu (sıvı/ liyofilize olup olmaması), sülüğün hasat mevsimi faktörlerin ayrı ayrı ele alınarak detaylı araştırmaların yapılması tavsiye edilebilir.

#### 4.2. Sonuçlar ve Öneriler

Ağır metallerin suda yaşayan ve besin zincirinin farklı kademelerinde bulunan organizmalar tarafından alınması çoğunlukla beslenme yolu ile olmaktadır. Bu geçişlerin solunum, osmoz ve difüzyon olayları ile de devam ettiği, vücudun suyla temas eden yüzeyleri olan deri ve solungaçlar vasıtasıyla da bünyeye alındığı bilinmektedir. Çalışmamızda, sülüklere herhangi bir besleme işlemi yapılmadığı daha önce belirtilmiştir. Sucul ortamda var olan ağır metallerin, yapılan analizler sonucu sülük dokularında da bulunması, ağır metallerin sadece beslenme ile vücuda alınmadığını göstermiştir.

*Hirudo verbana* türü tıbbi sülüklerde uygulanan ağır metallerin yaşama oranları üzerine etkileri düşük seviyede gerçekleşmiş olup, mevcut kayıplar kaplardaki sıkışmalardan kaynaklanmıştır. Bu bakımdan yaşama oranları üzerinde gruplar arası farklılık önemsiz bulunmuştur. Ancak 30 günlük uygulamalarda düşük seviyelerde ağırlık kayıpları gözlenmiştir.

Ağır metal birikimleri bakımından 30 günlük uygulamalar 96 saatlik uygulamalara göre belirleyici ve etkili olmuştur. Sülük gibi çevresel etkilerin ancak uzun süreler sonrasında ortaya çıktığı canlılarda bu tip çalışmaların 30 günden az olmamak kaydı ile daha uzun sürelerde yapılması tavsiye edilebilir. Çünkü bu canlıların

metabolizmaları oldukça yavaş ve hiç beslenmeden aylarca yaşayabilmektedir. Bu nedenle de kirletici maddeler başta olmak üzere çevresel etki faktörlerinin daha uzun periyotlarda takip edilmesi uygun görünmektedir. Mevcut araştırmada da 30 günlük periyodun ağır metal kirlenmelerinin takibi için daha doğru olacağı sonucuna varılmıştır.

Yine benzer biçimde MDA sonuçları bakımından da etkilerin daha net bir şekilde ortaya konabilmesi için daha uzun periyotlarda uygulamaların yapılması tavsiye edilmektedir. Uygulamaların MDA analizlerinin sülük salyasında gerçekleştirildiği ilk çalışma mahiyetindedir ve benzer alanda ileride yapılacak araştırmalara ışık tutacaktır. Bu bağlamda bakır sülfatın çinko nitrata kıyasla daha iyi bir takip kriteri olduğu gözlemlenmiştir. Antimikrobiyal açıdan ise söz konusu iki balık patojenine karşı sülük salyalarının etkili olmadığı kanıtlanmış olup, tartışma kısmında da belirtildiği gibi, antimikrobiyal karakteristiğe etki eden birçok faktör bulunduğundan bu parametrelerin titizlikle ele alınması gerekmektedir. Bu alanda diğer tıbbi sülüklerden elde edilecek salyalar, bu salyaların farklı formları, açlık süreleri gibi kriterlerde tüm alternatifler değiştirilerek daha net verilere ulaşılabilecektir.

Çalışmadan elde edilen tüm veriler göz önüne alındığında *Hirudo verbana* türü tıbbi sülüklerin, çevresel kirleticiler için iyi bir indikatör organizma olabilecekleri anlaşılmaktadır. Bu anlamda tıbbi sülüklerle yapılacak çalışmalarda ağır metal birikimlerinin ve MDA değerlerinin öncelikli olmak üzere kullanılabileceği sonucuna varılmış olup, tıbbi sülüklerle yapılacak çalışmalarda bu iki kriterin öncelikli olarak araştırılması tavsiye edilmektedir.

## KAYNAKÇA

- Alaama, M., AlNajjar, M., Abdualkader, A., Mohammad, A., & Merzouk, A. (2011). Isolation and analytical characterization of local Malaysian leech saliva. **IIUM Engineering Journal**, **12**(4).
- Alaama, M., Abdualkader, A. M., Ghawi, A. M., Merzouk, A., Khalid, R. S., & Helaluddin, A. B. M. (2021). Assessment of Trace Heavy Metals Contamination in the Tissues and Saliva of the Medicinal Leech *Hirudinaria manillensis*. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, **21**(5), 225-231.
- Abdualkader, A. M., Ghawi, A. M., Alaama, M., Awang, M., & Merzouk, A. (2013). Leech therapeutic applications. **Indian journal of pharmaceutical sciences**, **75**(2), 127.
- Abdualkader, A. M., Merzouk, A., Ghawi, A. M., & Alaama, M. (2011). Some biological activities of Malaysian leech saliva extract. **IIUM Engineering Journal**, **12**(4).
- Abdullah, S., Dar, L. M., Rashid, A., & Tewari, A. (2012). Hirudotherapy/leech therapy: applications and indications in surgery. **Arch Clin Exp Surg**, **1**(3), 172-180.
- Apakupakul, K., Siddall, M. E., Burreson, E. M. (1999). Higher level relationships of leeches (Annelida: Clitellata: Euhirudinea) based on morphology and gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, **12**, 350–359.
- Akçalı, İ. ve Küçüksezgin, F., (2009). Ege Denizi kıyılarında görülen kahverengi alg (*Cystoser-is sp.*)'de ağır metal birikimi, **Ege University Journal of Fisheries & Aquatic Science**, **26**(3), 159-163.
- Andereya, S., Stanzel, S., Maus, U., Mueller-Rath, R., Mumme, T., Siebert, C. H., ... & Schneider, U. (2008). Assessment of leech therapy for knee osteoarthritis: a randomized study. **Acta orthopaedica**, **79**(2), 235-243.



- Arafa, M. M., Al-Afifi, SH. H. & Ali, A. T., (2015). Investigating the Oxidative Stress of Heavy Metal's Pollution in (*Clarias Gariepinus*). **Egyptian Journal of Chemistry and Environmental Health**, **1**(1), 231-243.
- Ayhan, H., & Mollahaliloğlu, S. (2018). Tıbbi sülük tedavisi: Hirudoterapi. **Ankara Medical Journal**, **18**(1), 141-148.
- Barnes, R. D. (1974). Invertebrate Zoology, W.B. Saunders Company, pp. 233-316. Philadelphia, Washington.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **Am J clin pathol**, **45**, 149-158.
- Bates, M., Kneer, K., & Logan, C. (1989). Medicinal leech therapy: an overview (continuing education credit). **Orthopedic nursing**, **8**(2), 12-17.
- Becking, G. C. (1976). Trace elements and drug metabolism. *Medical Clinics of North America*, **60**(4), 813-830.
- Biemer, J. J. (1973). Antimicrobial susceptibility testing by the Kirby-Bauer disc diffusion method. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, **3**(2), 135-140.
- Brown, Jr. F. A. (1967). Selected Invertebrate Types. John Wiley and Sons Inc. pp. 271-317. New York. London-Sydney.
- Bunker, T. D. (1981). The contemporary use of the medicinal leech. **Injury**, **12**(5), 430-432.
- Carballera, A., Carral, E., Puente, X. & Villares, R. (2000). Regional-scale monitoring of coastal contamination: nutrients and heavy metals in estuarine sediments and organisms on the coast of Galicia. **International Journal of Environment and Pollution**, **13**, 534-572.
- Chalisova, N. I., Baskova, I. P., Zavalova, L. L., & Pennijainen, V. A. (2003). The neurite-stimulating influence of components of medicinal leech salivary gland

secretions in organotypic culture of spinal ganglia. **Neuroscience and behavioral physiology**, **33**(1), 85-88.

Chepeha, D. B., Nussenbaum, B., Bradford, C. R., & Teknos, T. N. (2002). Leech therapy for patients with surgically unsalvageable venous obstruction after revascularized free tissue transfer. **Archives of otolaryngology–head & neck surgery**, **128**(8), 960-965.

Çağlar, M. (1973). Omurgasız Hayvanlar. I.Ü. Yay. Sayı:1803, Fen Fak. Sayı: 115, 1. Kısım, 2. Baskı. Fen Fak. Basımevi. s. 419. İstanbul.

Dallinger, R. & Rainbow, R., (1993). *Ecotoxicology of metals in invertebrates. Setac Special Publications*, (pp. 125), Chelsea: Lewis Publishers.

Das, B. K. (2014). An overview on hirudotherapy/leech therapy. **Ind Res J Pharm Sci**, **1**(1), 34.

Davies, F. G., (1991): Lumpy skin disease of cattle: a growing problem in Africa and the Near East. **World Anim. Rev.**, **68**, 37–42.

Demirsoy, A. (1982). Yaşamın Temel Kuralları. H.Ü. Yayınları. Cilt: 158. s. 139-158. Ankara.

Duruhan, S., Biçer, B., Tuncay, M. S., Uyar, M., & Güzel, S. T. (2014). Plastik Cerrahi Operasyonları Sonrası Sülük Uygulamaları. **Integr Tıp Derg**, **2**(2), 32-7.

Eldor, A., Orevi, M., & Rigbi, M. J. B. R. (1996). The role of the leech in medical therapeutics. **Blood Reviews**, **10**(4), 201-209.

Elliott, J. M., & Kutschera, U. (2011). Medicinal leeches: historical use, ecology, genetics and conservation. **Freshwater Reviews**, **4**(1), 21-41.

Esterbauer, H., & Cheeseman, K. H. (1990). [42] Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. In *Methods in enzymology* (Vol. 186, pp. 407-421). Academic Press.

- Ettajani, H., Amiard-Triquet, C. & Amiard, J-C., (1992). Etude experimentale du transfert de deux elements traces (Ag, Cu) dans une chaine trophique marine: eau particules (sediment naturel, microalgue)- mollusques filtreurs (*Crassostrea gigas Thunberg*). [Experimental study of the transfer of two trace elements (Ag, Cu) in a marine food chain: particulate water (natural sediment, microalgae)- filter molluscs (**Crassostrea gigas Thunberg**)]. **Water, Air & Soil Pollution**, **65**, 215-236.
- Fields, W. S. (1991). The history of leeching and hirudin. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, **21**(Suppl. 1), 3-10.
- Flecken, P., & Michalsen, A. (2007). Indications for leech therapy. *Michalsen A, Roth M, Dobos G. Medicinal leech therapy*, 66-83.
- Geldiay, R., Geldiay, S. (1991). Genel Zooloji. E.Ü. Basımevi s. 453. Bornova, Izmir.
- Ghosh, S., Kaushik, R., Nagalakshmi, K., Hoti, S. L., Menezes, G. A., Harish, B. N., & Vasan, H. N. (2010). Antimicrobial activity of highly stable silver nanoparticles embedded in agar–agar matrix as a thin film. **Carbohydrate Research**, **345**(15), 2220-2227.
- Gideroğlu, K., Yıldırım, S., Akan, M., Çakır, B., & Aköz, T. (2004). Alt ekstremitte yumuşak doku defektleri için yeni bir rekonstrüksiyon materyalinin kullanımı ile başarılı sonuçlar: nörokutan flepler. **Ulusal travma ve acil cerrahi dergisi= Türk travma ve acil cerrahi dergisi: TJTES**, **10** (3), 196-204.
- Gödekmerdan, A., Arusan, S., Bayar, B. ve Sağlam, N. (2011). Tıbbi sülükler ve Hirudoterapi. **Türkiye Parazitolojisi Dergisi**, (2011), **35**, 234-239.
- Hashim, N., Paramasivam, M., Tan, J. S., Kernain, D., Hussin, M. H., Brosse, N., ... & Raja, P. B. (2020). Green mode synthesis of silver nanoparticles using *Vitis vinifera*'s tannin and screening its antimicrobial activity/apoptotic potential versus cancer cells. **Materials Today Communications**, **25**, 101511.,
- Heckmann, J. G., Dütsch, M., Neundörfer, B., Dütsch, F., & Hartung, U. (2005). Leech therapy in the treatment of median nerve compression due to forearm

haematoma. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, **76**(10), 1465-1465.

Hsu, T., Huang, K.M., Tsai, H.T., Sung, T.S. & Ho, T.N., (2013). Cadmium (Cd)-induced oxidative stress down-regulates the gene expression of DNA mismatch recognition proteins MutS homolog 2 (MSH2) and MSH6 in zebrafish (**Danio rerio**) embryos, **Aquatic Toxicology**, **126**, 9-16.

Jha, K., Garg, A., Narang, R., & Das, S. (2015). Hirudotherapy in medicine and dentistry. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, **9**(12), ZE05.

Kaestner, A. (1967). *Invertebrate Zoology*. Volume I. Interscience Publishers. A Division of John Wiley and Sons. p. 597. New York, London, Sydney.

Kalender, ME, Comez, G., Sevinç, A., Dirier, A., & Çamcı, C. (2010). Kanser ağrısının semptomatik tedavisi için sülük tedavisi. **Ağrı ilacı**, **11** (3), 443-445.

Kari, Z.A., Jamaludin, M.H., Wei, L.S., Andu, Y., Ibrahim, W.A.I.W. & Shazani, S., (2015). Effect of broodstock density on reproduction and juvenile culture of green buffalo leech, (*Hirudinea manillensis*). **Songlanakarin Journal of Science Technology**, **37**(5), 581-585.

Kutschera, U. (2004). Species concepts: Leeches versus bacteria. **52**, 1-5.

Livingstone D.R., (2003) Oxidative stress in aquatic organism in relation to pollution and agriculture. **Revue de Medecine Veterinaire**, **6**, 427-430.

Mamelak, A. J., Jackson, A., Nizamani, R., Arnon, O., Liegeois, N. J., Redett, R. J., & Byrne, P. J. (2010). Leech therapy in cutaneous surgery and disease. **Journal of drugs in dermatology: JDD**, **9**(3), 252-257.

McPhearson, R.M., DePaola, A., Zywno, S.R., Motes Jr, M.L. & Guarino, A.M., (1991). Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds. **Aquaculture**, **99**(3/4), 203-211.

- Madhavan, P., & Elumalai, K., (2016). Effects of chromium (VI) on the lipid peroxidation and antioxidant parameters in the gill and kidney tissues of catfish, (*Clarias batrachus*) (Linnaeus 1758) (**Actinopterygii: Siluriformes**). **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**, 3(4), 249-255.
- Malik, B., Astuti, D. A., Arief, D. J. F., & Rahminiwati, M. (2019, March). A study on antioxidative and antimicrobial activities of saliva extract of Indonesian local leeches. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 251, No. 1, p. 012061). IOP Publishing.
- Martinsen, B., Oppegaard, H., Wichstrom, R., & Myhr, E., (1992). Temperature dependent in vitro antibacterial activity of four 4-quinolones and oxytetracycline against bacterial pathogenic to fish. **Antimicrob Agents Chemother**, 36(8), 1738-1743.
- Michalsen, A., Lüdtkke, R., Cesur, Ö., Afra, D., Musial, F., Baecker, M., ... & Dobos, G. J. (2008). Effectiveness of leech therapy in women with symptomatic arthrosis of the first carpometacarpal joint: a randomized controlled trial. *PAIN®*, 137(2), 452-459.
- Mohammad M.N.A., Mona S.Z., Elsayed A.K., & Hossam H.A., (2015). Use of Fish as Bio-indicator of the Effects of Heavy Metals Pollution. **Journal of Aquaculture Research and Development**, 6(4), 328
- Nazar, P. S., & Doroshenko, B. H. (1998). The leech therapy of infectious myocarditis. **Likars' ka sprava**, (6), 146-148.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, 95(2), 351-358.
- Oliva, M., José Vicente, J., Gravato, C., Guil-hermino, L., & Galindo-Riaño, MD., (2012). Oxidative stress biomarkers in Senegal sole, *Solea senegalensis*, to assess the impact of heavy metal pollution in a Huelva estuary (SW Spain):

Seasonal and spatial variation, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, **75**(1), 151-162.

Olugbojo, J.A. & Akinyemi, A.A., (2016). Assessment of heavy metals in different body parts of *Sarotherodon galillaeus* from ilo-idimu River, ota ogun state, nigeria. **Journal of Aquaculture Engineering and Fisheries Research**, **2**(1), 36-41.

Küçük, M., & Yaman, O. (2019). Tıbbi Sülük Terapisi (Hirudoterapi). **Journal of Biotechnology and Strategic Health Research**, **3**, 29-46.

Özdilek H.G. & Mathisen P.P., (2002) Mixing and Transport, **Water Environment Research**, **74**, 1053-1112,

Parker, J. L., & Shaw, J. G. (2011). *Aeromonas spp.* Clinical microbiology and disease. **Journal of Infection**, **62**(2), 109-118.

Pereira, S., Cavalie, I., Camilleri, V., Gilbin, R., & Adam-Guillermin, C., (2013). Comparative genotoxicity of aluminium and cadmium in embryonic zebrafish cells, **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, **750**(1-2), 19-26.

Petrauskienė, L. (2004). The medicinal leech as a convenient tool for water toxicity assessment. *Environmental Toxicology: An International Journal*, **19**(4), 336-341.

Petrauskienė, L., (2008). Lethal effects of Zn, Cu and their mixture on the medicinal leech (*Hirudo verbana*). **Ekologija**, **54**(2), 77–80.

Phillips, D, J, H. & Rainbow, P. S., (1993). Biomonitoring of trace aquatic contaminants, (pp. 371). England: Elsevier Science Publishes Ltd.,

Rainbow, P.S., (1988). The significance of trace metal concentrations in decapods. **Symposium of Zoological Society**, **59**, (pp. 291-313). London.

- Rainbow, P.S., (1995). Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, **31** (4-12), 183-193.
- Richetti, S.K., Rosemberg, D.B., Ventura-Lima, J., Monserrat, J.M., Bogo, M.R. & Bonan, D., (2011). Acetylcholinesterase activity and an-tioxidant capacity of zebrafish brain is al-tered by heavy metal exposure, **NeuroToxicology**, **32**(1), 116-122.
- Sabullah M.K, Ahmad SA, Shukor MY, Gansau AJ, Syed MA, Sulaiman MR. & et al. (2015). Heavy metal biomarker: Fish behavior, cellular alteration, enzymatic reaction and proteomics approaches. **International Food Research Journal** **22**(2), 435-454.
- Sağlam, N. (1998'a). *Hirudo medicinalis* (L., 1758) ile Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Arasındaki İlişkinin Deneysel İncelenmesi. 111. Su Ürünleri Sempozyumu, 10-12 Haziran. s. 559-563. Erzurum.
- Sağlam, N. (1998b). Tıbbi Sülük *Hirudo medicinalis'* in (L., 1758, Hirudinidae) İncelenmesi. **Sünder Su Ürünleri Mühendisleri Derneği Dergisi**, **1**, 28-30.
- Sağlam, N., & Sarııeyyüpoğlu, M. (1998). Tatlısu Sülüğü (*Nepheleopsis obscura*)'nün Biyolojisi, Morfolojisi, Bazı Kimyasal Maddelerle Kontrolü ve Alabalığa (*Oncorhynchus mykiss*) Olan Etkisi. **FÜ Fen ve Müh. Bilimleri Dergisi**, **10**(2), 105-123.
- Salazar, M.H., (1992). Use and misuse of mussels in natural resource damage assessment. *Marine Technology Society 1992 Conference*, 1, (pp. 257-264). Washington DC: Global Ocean Resources.
- Salte, R. & Liestol, K., (1983). Drug withdrawal from farmed fish: depletion of oxytetracycline, sulfadiazine and trimethoprim from muscular tissue of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Acta Veterinaria Scandinavica**, **24**(4), 418-430.
- Sawyer, R.T., (1986) Feeding biology, ecology and systematics. In: Leech biology and behaviour, Vol. II, Clarendon Press, Oxford, pp. 419–793.

- Schenker, M., Murray, A., & Kay, S. P. J. (2006). Leech therapy in the treatment of median nerve compression due to forearm haematoma. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, **77**(6), 799-800.
- Singh, A. P. (2010). Medicinal leech therapy (hirudotherapy): a brief overview. **Complementary therapies in clinical practice**, **16**(4), 213-215.
- Trontelj, P., Sotler, M. & Verovnik, R. (2004). Genetic differentiation between two species of the medicinal leech, (*Hirudo medicinalis*) and the neglected (*Hirudo verbana*), based on random-amplified polymorphic DNA. **Parasitol Research**, **94**, 118-124.
- Tuncali, D., Terzioğlu, A., Çiğsar, B., & Aslan, G. (2004). Sınıf IIC halka avulsiyon yaralanmalarının tedavisinde tıbbi sülüklerin değeri: 2 vaka raporu. **El cerrahisi Dergisi**, **29** (5), 943-946.
- Türkmen, A., (2003). İskenderun Körfezinde deniz suyu, askıdaki katı madde, sediment ve dikenli taş istiridyesinde (*Spondylus spinosis*) (Schreibers, 1793) oluşan ağır metal birikimi üzerine araştırma. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı, Erzurum.
- Ubani-Rex, O. A., Saliu, J.K., & Bello, T. H, (2017). Biochemical Effects of the Toxic Interaction of Copper, Lead and Cadmium on (*Clarias gariepinus*). **Journal of Health & Pollution** **16**, 38–48.
- Wang, E. W., Warren, D. K., Ferris, V. M., Casabar, E., & Nussenbaum, B. (2011). Leech-transmitted ciprofloxacin-resistant *Aeromonas hydrophila*. **Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery**, **137**(2), 190-193.
- Wedepohl, K.H., (1991). The composition of the upper earth's crust and the natural cycles of selected metals: Metals in natural raw materials; **Natural Resources**. 3-18. Weinheim
- Weinfeld, A. B., Kattash, M., Grifka, R., & Friedman, J. D. (1998). Leech therapy in the management of acute venous congestion of an infant's lower limb. **Plastic and reconstructive surgery**, **102**(5), 1611-1614.



- Weston, D.P., (2000). Ecological effects of the use of chemicals in aquaculture. In: Use of chemicals in aquaculture asia. 23-30. Philippines: Tigbauan, Iloilo.
- Whitaker, I. S., Rao, J., Izadi, D., & Butler, P. E. (2004). Historical Article: *Hirudo medicinalis*: ancient origins of, and trends in the use of medicinal leeches throughout history. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, **42**(2), 133-137.
- Wise, D.J. & Johnson, M. R., (1998). Effect of feeding frequency and Romet-medicated feed on survival, antibody response, and weight gain of fingerling channel catfish (*Ictalurus punctatus*) after natural exposure to *Edwardsiella ictaluri*. **Journal of World Aquaculture Society**, **29**(2), 169-175.
- Wollina, U., Heinig, B., & Nowak, A. (2016). Medical leech therapy (Hirudotherapy). **Our Dermatology Online**, **7**(1), 91.
- Wypij, M., Czarnecka, J., Świecimska, M., Dahm, H., Rai, M., & Golinska, P. (2018). Synthesis, characterization and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of biogenic silver nanoparticles synthesized from *Streptomyces xinghaiensis* OF1 strain. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, **34**(2), 23.
- Yantis, M. A., O'Toole, K. N., & Ring, P. (2009). Leech therapy. **AJN The American Journal of Nursing**, **109**(4), 36-42.
- Zarodova, E. V. (1993). Experience with the use of leech therapy at a health resort on patients with hypertension and ischemic heart disease. **Voprosy kurortologii, fizioterapii, i lechebnoi fizicheskoi kultury**, **(4)**, 38-39.
- Zhao, X., Higgins, K. M., Enepekides, D., & Farwell, G. (2009). Medicinal leech therapy for venous congested flaps: case series and review of the literature. *Journal of otolaryngology-head & neck surgery*= **Le Journal d'oto-rhino-laryngologie et de chirurgie cervico-faciale**, **38**(2), E61-E64.

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı:** Ebubekir ATICI

**Uyruğu:** Türkiye (T.C)

### EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi, Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği	2016
Lise	Fatma Kemal Timuçin Anadolu Lisesi Talas/KAYSERİ	2007

### İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2018-Halen	Kayseri İl Tarım ve Orman Müdürlüğü	Balıkçılık Teknolojisi Müh.

### YABANCI DİL

İngilizce