

T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇANAKKALE BOĞAZI (KEPEZ) MİDYE [*Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)] ÖRNEKLERİNDE AĞIR METAL (Cd, Pb, Cu, Zn, Fe) VE TEMEL ANTİOKSİDANT ENZİM DÜZEYLERİNİN MEVSİMSEL DEĞİŞİMİ

Gülsüm AKKUŞ

Biyoloji Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇANAKKALE BOĞAZI (KEPEZ) MİDYE [*Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)] ÖRNEKLERİNDE AĞIR METAL (Cd, Pb, Cu, Zn, Fe) VE TEMEL ANTİOKSİDANT ENZİM DÜZEYLERİNİN MEVSİMSEL DEĞİŞİMİ

Gülsüm AKKUŞ

Biyoloji Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: **01/04/2016**

Tez Danışmanı:

Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR

ÇANAKKALE

Gülsüm AKKUŞ tarafından Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR yönetiminde hazırlanan ve **01/04/2016** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan "**Çanakkale Boğazı (Kepez) Midye [*Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)] Örneklerinde Ağır Metal (Cd, Pb, Cu, Zn, Fe) ve Temel Antioksidant Enzim Düzeylerinin Mevsimsel Değişimi**" başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR ……

Başkan

Prof. Dr. Sema İŞİSAĞ ÜÇÜNCÜ ……

Üye

Prof. Dr. Sezginer TUNÇER ……

Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:……

Bu tez çalışması Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından FYL-2015-413 numaralı projeden desteklenmiştir.

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Gülsüm AKKUŞ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini ve bilgilerini esirgemeyen, deneyimlerinden yararlandığım, çalışmalarımın planlanmasında ve yürütülmesinde her türlü desteğini benden esirgemeyen saygı değer danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR'e en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarının her aşamasında yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen Araştırma Görevlisi Dr. Berrak Damla YAĞAN'a, Uzman Nuray YILDIRIM'a, yüksek lisans öğrencileri Feyza Rabia AKKAN'a, Hayati ÖZCAN'a, Mehmet Ali YILDIRIM'a, Bahar GÖK'e, Pınar GÖK'e, doktora öğrencisi Merve BALLI'ya, tez aşamam boyunca beni asla yalnız bırakmayan ve çalışmanın farklı aşamalarında vermiş oldukları desteklerinden dolayı sevgili arkadaşlarım Kübra ATAMAN'a Burak SERVİLİ'ye, Alim ALTUNAY'a, Melik GÜNAY'a, Mustafa Eray BOZYEL'e ve Elif MERDAMERT'e teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca; hayatımın her evresinde bana destek olan annem Seyhan AKKUŞ, rahmetli babam Aslan AKKUŞ'a ve maddi manevi her zaman desteğini hissettiren Ali KARAOĞLAN'a ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Gülsüm AKKUŞ

Çanakkale, Nisan 2016

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde oranı
‰	Binde oranı
$(NH_4)_2SO_4$	Amonyum sülfat
$^{\cdot}OH$	Hidroksil iyonu
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µmol	Mikromol
$^1O_2$	Tekli oksijen
A	Adenin bazı
AChE	Asetil kolin esteraz
Ag	Gümüş
AKM	Askıda katı madde
B[a]P	Benzo [a] prien
BPH	Benzo(a)piren hidroksilaz
BSA	Sığır serum albumin
C	Sitozin bazı
^oC	Santigrat derece
CAT	Katalaz
Cd	Kadmiyum
cm	Santimetre
Cr	Krom
Cu	Bakır
$CuCl_2$	Bakır(II) klorür
$CuSO_4$	Bakır sülfat
DDT	Diklorodifenil trikloroetan
DNA	Deoksiribonükleik asit
DO	Çözünmüş oksijen
e^-	Elektron
g	Gram
G	Guanin bazı

GPx	Glutatyon peroksidaz
GR	Glutatyon redüktaz
GST	Glutatyon S transferaz
H	Hidrojen
H_2O_2	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
HNO_3	Nitrik asit
ICP-OES	İndüklenmiş Birleştirici Plazma Orbital Emisyon Spektroskopisi
kg	Kilogram
L	Litre
LPO	Lipid peroksidaz
M	Molarite
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimol
MT	Metallotionein
Na_2CO_3	Disodyum karbonat
Na_2HPO_4	Disodyum hidrojen fosfat
NaH_2PO_4	Sodyum dihidrojen fosfat
NaOH	Sodyum hidroksit
NBT	Nitro blue tetrazolium
Ni	Nikel
non Se-GST	Selenyuma bağımlı olmayan glutatyon
OCP	Organoklorlu pestisit
PAH	Poliaromatik hidrokarbon
Pb	Kurşun
PCB	Polisiklik bifeniller
PHC	Petrohidrokimyasallar
ppb	Parts per billion (Milyonda bir)
R	Regrasyon eşitliği
RNA	Ribonükleik asit
$RO^{\cdot}$	Alkolsi

$ROO^{\cdot}$	Peroksi
ROT	Reaktif oksijen türleri
rpm	Revolution per minute (Dakikada devir sayısı)
sn	Saniye
SOD	Süperoksit dismutaz
SOR	Serbet oksijen radikalleri
Spkond	Spesifik iletkenlik
T	Timin bazı
TA	Tannik asit
TBA	2-tiyobarbütirik asit
TCA	Trikloroasetik asit
TP	Total protein
XOD	Ksantin oksidaz
Zn	Çinko
$Zn(CN)_2$	Çinko siyanür
$Zn_2[Fe(CN)_6]$	Çinko ferrosiyanür

ÖZET

ÇANAKKALE BOĞAZI (KEPEZ) MİDYE [*Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)] ÖRNEKLERİNDE AĞIR METAL (Cd, Pb, Cu, Zn, Fe) VE TEMEL ANTİOKSİDAN ENZİM DÜZEYLERİNİN MEVSİMSEL DEĞİŞİMİ

Gülsüm AKKUŞ
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR
01/04/2016, 71

Bu çalışmada, yoğun bir deniz trafiğine sahip olan Çanakkale Boğazının Kepez kıylarındaki ağır metal kirliliğinin midyeler üzerindeki etkileri araştırıldı. Bu amaçla, Kepez kıylarındaki ağır metal kirliliğine doğal ortamlarında maruz kalan Akdeniz Midyesi (*Mytilus galloprovincialis*) türünün solungaç, hepatopankreas ve kas dokularında Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Lipit peroksidaz (LPO) ve Total protein (TP) düzeylerindeki değişimler incelendi. Mevsimsel farklılıkları değerlendirebilmek için fiziko-kimyasal parametrelerin yanısıra dokulardaki kadmiyum (Cd), bakır (Cu), demir (Fe), kurşun (Pb) ve çinko (Zn) ağır metallerinin birikim düzeyleri de tayin edildi. *M. galloprovincialis* örneklerinin solungaç, hepatopankreas ve kas dokularındaki ağır metal miktarlarının (sonbaharda hepatopankreasta ölçülen Pb değeri hariç) kabul edilebilir değerlerin altında olduğu belirlendi. TP miktarı, en yüksek hepatopankreas dokusunda görülmekle birlikte ilkbaharda sonbahara oranla daha düşük görüldü. SOD aktivitesi, ilkbahar mevsiminde daha yüksek görülmekle birlikte solungaç ve kas dokularında mevsimsel olarak anlamlı farklılık gözlendi. CAT aktivitesinde solungaç ve hepatopankreas dokularında sonbaharda ilkbahara oranla belirgin ve anlamlı bir düşüş görüldü. LPO düzeyi ise, hepatopankreas dokusunda sonbahar aylarında yüksek bulunurken, solungaç dokusunda mevsimler arasında istatistiksel bir fark görülmedi. Belirlenen farklılıklar, antioksidatif savunma mekanizmalarının ağır metal konsantrasyonlarıyla güçlü bir korelasyon gösterdiğini ve sucul kirliliğin belirlenmesi ve engellenmesinde enzimatik aktivitenin en genel belirteç olduğunu ortaya koydu.

Anahtar sözcükler: *Mytilus galloprovincialis*, Antioksidan, LPO, SOD, CAT, Ağır Metal.

ABSTRACT

SEASONAL VARIATIONS OF SOME ANTIOXIDANT ENZYME AND HEAVY METAL (Cd, Pb, Cu, Zn, Fe) LEVELS IN MUSSELS [*MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* (LAMARCK, 1819)] FROM DARDENELLES BOSPHORUS (KEPEZ)

Gülsüm AKKUŞ

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master of Science Thesis in Biological Science

Advisor : Assist. Prof. Dr. Neslihan DEMİR

01/04/2016, 71

In this study, the effects of heavy metal pollution on mussel have been investigated in Kepez, Çanakkale Bosphorus, where has busy sea traffic. The effects of some heavy metal [cadmium (Cd), copper (Cu), lead (Pb), iron (Fe) and zinc (Zn)] on total protein (TP), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and lipid peroxidase (LPO) levels of the gills, digestive glands and muscles of Mediterranean Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) samples collected where detected. The results exhibited that Cd, Pb, Cu, Fe and Zn concentrations of gills, digestive glands and muscles of *M. galloprovincialis* samples, were under allowable values (except from Pb level in digestive gland in autumn). TP concentrations were higher in autumn and highest levels were measured in digestive glands. SOD activities were also higher in spring and levels of muscles, and the activities of gills were significantly different in the spring and autumn. Higher CAT activity was measured also in spring although CAT levels of the digestive glands and gills were significantly different in the specimens collected spring and autumn. While no differences were measured for levels of LPO in gills, the highest activity was collected in digestive glands of autumn samples. The differences indicate that antioxidative defence mechanisms were strongly correlated with heavy metal concentrations, and enzymatic activities are the most common bioindicators for determination and prevention of aquatic pollution.

Keywords: *Mytilus galloprovincialis*, Antioxidant, LPO, SOD, CAT, Heavy Metal.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI iii
TEŞEKKÜR iv
SİMGELER VE KISALTMALAR v
ÖZET viii
ABSTRACT x
İÇİNDEKİLER xi
ŞEKİLLER DİZİNİ xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ xiv
BÖLÜM 1
GİRİŞ 1
1.1. Ağır Metaller 2
1.1.1. Önemli Bazı Ağır Metaller ve Kaynakları 4
1.1.2 Ağır Metallerin Sucul Yaşama Etkileri 7
1.2. *Mytilus* sp. Genel Özellikleri 9
1.2.1. Kirlilik Araştırmalarında Midyelerin Biyoindikatör Canlı Olarak Kullanımı 10
1.3. Serbest Radikaller 11
1.3.1. Reaktif Oksijen Türleri 13
1.3.2. Reaktif Nitrojen Türleri 15
1.4. Antioksidan Savunma Sistemleri 16
1.4.1. Enzimatik Antioksidanlar 17
1.4.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar 19
1.5. Oksidatif Stres 20
1.5.1. Serbest Radikallerin Biyomoleküller Üzerindeki Etkileri 20
BÖLÜM 2
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 23
BÖLÜM 3
MATERYAL VE METOT 32
3.1. Kimyasal Maddeler 32
3.2. Örnekleme Aşaması 32
3.3. Ağır Metal Analizi 34
3.4. Antioksidan Enzim Düzeylerinin Ölçümü 34
3.4.1. Total Protein (TP) Tayini 34
3.4.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi Tayini 35

3.4.3. Katalaz Aktivitesi (CAT) Tayini 37
3.4.4. Lipid Peroksidaz (LPO) Düzeyi 37
3.5. İstatistiksel Analiz 38
BÖLÜM 4
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 39
4.1. Bulgular 39
4.1.1. Çevresel Faktörler 39
4.1.2. Ağır Metal Analizi 39
4.1.3. Total Protein (TP) Düzeyindeki Değişimler 41
4.1.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) Düzeylerindeki Değişimler 42
4.1.5. Katalaz (CAT) Düzeylerindeki Değişimler 44
4.1.6. Lipit Peroksidaz (LPO) Düzeylerindeki Değişimler 45
4.2. Tartışma 48
4.2.1. Fiziko-kimyasal Parametrelerdeki Değişim 48
4.2.2.Ağır Metal Miktarlarındaki Değişim 48
4.2.3 Antioksidan Enzim Aktivitesi ve Total Protein Miktarlarındaki Değişim 49
BÖLÜM 5
SONUÇ VE ÖNERİLER 55
KAYNAKLAR 56
ÖZGEÇMİŞ I

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 3.1. Örneklerin temin edildiği Kepez (Çanakkale) bölgesi 32
Şekil 3.2. *Mytilus galloprovincialis* a. dış görünüşü b. iç görünüşü 33
Şekil 3.3. *Mytilus galloprovincialis*'in genel iç görünümü 33
Şekil 4.1. BSA ile hazırlanan protein standart grafiği 41
Şekil 4.2. Total protein miktarlarının mevsimlere bağlı olarak değişimi 42
Şekil 4.3. SOD enzim aktivitesinin mevsimlere bağlı olarak değişimi 44
Şekil 4.4. CAT miktarının mevsimlere bağlı olarak değişimi 45
Şekil 4.5. LPO düzeyinin mevsimlere bağlı olarak değişimi 47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1.1. Sucul organizmalarda kabul edilebilir ağır metal oranları 8
Çizelge 3.1. Protein tayini standart stok çözeltilerinin hazırlanması 35
Çizelge 3.2. SOD enziminin tayini için gerekli çözeltiler 36
Çizelge 3.3. CAT enzimi tayini için gerekli çözeltiler 37
Çizelge 3.4. MDA miktarı tayini için gerekli çözeltiler 38
Çizelge 4.1. Kepez deniz suyunun iki farklı mevsimdeki fiziko-kimyasal parametreleri için ortalama değerler 39
Çizelge 4.2. *Mytilus galloprovincialis* örneklerinin solungaç, hepatopankreas ve kas dokularında mevsimlere bağlı olarak ağır metal analiz sonuçları 40
Çizelge 4.3. *Mytilus galloprovincialis* türünün farklı dokularındaki protein miktarının mevsimlere göre değişimi 41
Çizelge 4.4. Mevsimlere bağlı olarak *Mytilus galloprovincialis* türünün farklı dokularında SOD enzimi miktarı 43
Çizelge 4.5. *Mytilus galloprovincialis* türünün farklı dokularında CAT miktarlarının mevsimlere bağlı olarak değişimi 44
Çizelge 4.6. *Mytilus galloprovincialis* türünün farklı dokularında mevsimlere bağlı olarak LPO düzeylerinin değişimi 46

BÖLÜM 1
GİRİŞ

Üç tarafı denizlerle çevrili olan ülkemizde, deniz kirliliğinin önlenmesi büyük bir önem taşımaktadır. Şehirleşme, deniz taşımacılığı, deniz kazaları, gelişen sanayinin yanı sıra turizm ve atıkların boşaltılmasıyla kirlilik hızla artmaktadır. Deniz kirliliği farklı kaynaklardan oluşan çok ciddi bir çevre sorunudur.

Denizlerde meydana gelen kirlenmenin kaynaklarını şu şekilde sıralamak mümkündür (Kamalı, 1999):

- Sanayi atıkları,
- Akaryakıt atıkları (Deniz araçlarının bıraktığı petrol ve yağlar),
- Şehir çöplerinin ve fabrika katı atıklarının boşaltılması,
- Akarsuların taşıdığı atıklar,
- Kullanılmış atık sular ve kanalizasyon suları,
- Tarım alanlarında kullanılan pestisit ve gübrelerin yağmur ve kar sularıyla sürüklenerek denizlere ulaşması,
- Gemilerin limanlarda doldurma-boşaltma işlemleri ve temizlikleri sırasında meydana getirdiği kirlilik,
- Deniz dibi kaynaklarından çıkarılan ve rafine edilen petrolün oluşturduğu kirlilik
- Deniz dibi araştırmaları sonucu oluşan kirlilik,
- Su ürünlerinin elde edilmesinde oluşan kirlilik,
- Ağır metaller.

Denizel ortama giren kirletici maddelerin büyük bir kısmı karasal orjinlidir. Bu tür kirleticiler karadan denizlere dört yolla taşınır:

- Atmosfer,
- Akarsular,
- Yağışlar,
- Kıyı bölgelerindeki atıklar (Kamalı, 1999).

Kepez, Çanakkale Boğazı'nda kirlilik açısından önemli bir konuma sahiptir. Kuzeyde İstanbul Boğazı aracılığıyla Karadeniz bağlantılı, güneyde ise Çanakkale Boğazı aracılığıyla Ege Denizi ile bağlantılıdır. Dolayısıyla hem Ege Denizi hem de Karadeniz akıntıları bu bölgeden geçer ve Çanakkale Boğazının kirlenmesinde önemli etki oluştururlar. Bu bölge uzun yıllardır; evsel, tarımsal ve endüstriyel atıklar ve Çanakkale Boğazını kullanan gemilerin slop, sintine atıkları, slaç ve atık yağları ile de kirlenmektedir. Boğaza bırakılan

atık suların içeriğindeki toksik bileşikler, ağır metaller ile azotlu ve karbonlu organik ve inorganik bileşikler, sucul organizmaların dokularında biriktirilerek ya da organik, inorganik partiküllere tutunarak, uzun yıllar bozunmadan ortamda kalabilmekte ve biyota için potansiyel risk oluşturmaktadırlar (Woodhead ve ark., 1999; Miniero ve ark., 2003; Özden, 2005; Özden, 2013).

Ağır metaller, ciddi sorun oluşturan kirleticiler arasındadır. Akarsular; ağır metallerle birlikte, toprakta bulunan diğer kirleticileri de beraberinde getirip, alıcı olarak kabul edilen kıyı sularını oluştururlar. Başta tarım faaliyetleri olmak üzere birçok alanda çeşitli amaçlar için kullanılan kıyı sularının iyileştirilmesi için bazı işlemlerin ve çalışmaların yapılması gerekmektedir (Brzozowska ve ark., 2011).

Birçok ülke, kıyılarının kirliliğe karşı korunmasına özen göstermekte ve bu konu ile ilgili çalışmaları önemli ölçüde desteklemektedirler (Sáenz ve ark., 2010; Duarte ve ark., 2011; Fraser ve ark., 2011). Denizel ortamlar için tehlikeli ve insan sağlığına zarar verebilen kirletici unsurlardan biri olan ağır metaller, çeşitli süreç ve döngüler sonucunda deniz dibine çökmektedirler. Denizel ortama giren ya da bu ortamda bulunan ağır metallerin kaynakları doğal veya yapay olabilir.

1.1. Ağır Metaller

Ağır metaller; periyodik tablodaki atom numaraları 92 ile 222 arasında olan, yoğunluğu 5 g/cm^3 den yüksek metaller olarak bilinirler (Förstner ve Wittmann, 1981; Kahvecioğlu ve ark., 2006). Bu gruba krom, demir, nikel, kurşun, kobalt, kadmiyum, bakır, çinko ve civa gibi 60'dan fazla metal dahildir (ATSDR, 2006; Fırat, 2007). Bu elementler doğaları gereği yer kabuğunda genellikle sülfür, silikat, oksit ve karbonat bileşikleri halinde bulunurlar.

Metallerin ekosistemdeki etkilerinin sadece yoğunluk değerine göre tanımlanması bu bileşiklerin biyolojik etkilerini kesin olarak ortaya koymaya yeterli değildir. Düşük dozlarda bile zararlı olabilen bazı metallerin canlılardaki birikim durumları sürekli olarak izlenmeli ve bu konuda çeşitli araştırmalar yapılmalıdır (Bryan, 1976). İz elementler veya eser elementler diye de adlandırılan bu metaller; Cd, Cr, Zn, Cu, Mn, Pb, Hg, Ni, Ag, Sb, As, Be, Se, T, U, V ve Al olarak belirlenmiştir. Metaller doğal sularda inorganik ve organik bileşikler, serbest iyonlar ve partiküler maddelerle birleşmiş vaziyette bulunurlar. Sedimentte çökmüş veya adsorbe edilmiş durumda olsalar bile, bazı kimyasal ve fiziksel olaylar ile yeniden iyonik forma dönüşerek toksik etki yapabilirler (Batkı, 1995).

Endüstriyel atıkların akarsulara, yeraltı sularına ve su kaynaklarına karışmasıyla taşınan ağır metaller yüksek oranda seyrelip; kısmen karbonat, sülfat ve sülfür halinde katı madde oluştururlar. Su tabanına çöken ağır metaller de bu bölgede zenginleşirler. Sediment tabakasının adsorpsiyon kapasitesinin sınırlı olması nedeniyle sudaki ağır metal miktarı gittikçe yükselir (Kahvecioğlu ve ark., 1999).

Ağır metaller, akuatik ortamlara doğal kaynaklarla ve insan faaliyetleri sonucunda karışmaktadır. Denizel ortama rüzgar yoluyla taşınan tozlarla, erozyonla taşınan kaya parçalarıyla, nehirlerle ve volkanik aktivitelerle ulaşabilirler. Hatta, akarsuların kentsel veya endüstriyel bölgelerden geçmesi sırasında insan atıklarının da suya karışması, bu birikimin artmasına sebep olmaktadır. Sudaki metalin organizma üzerindeki etkisi, besin, metabolizma, suyun bulaşma ölçüsü, ekolojik ihtiyaçlar, sediment ve diğer fiziko-kimyasal etmenlerle değişmektedir (Canlı ve Furness, 1995).

Sularda çözünür haldeki metaller çökerek sediment parçaları tarafından adsorbe olurlar. Özellikle nehirlerin denize döküldüğü geniş alanlarda ağır metaller birikimi daha yoğundur, dolayısıyla göl ve deniz sedimentlerinde yüksek oranda ağır metal biriktiği söylenebilinir (Karadere, 1997).

Ağır metaller, besin zincirinin ilk halkasında yer alan fitoplankton türleri ya da sudaki diğer tüketici organizmalar yolu ile önce balıklara daha sonra da insanlara ulaşmaktadır (Özden, 2005). Balıklarda ağır metal konsantrasyonları, türün beslenme alışkanlığı ve vücuda giren metal miktarına bağlı olup, canlının doku ve organları arasında da değişim göstermektedir. Bazı çalışmalarda besin zincirinde daha üst basamaklardaki karnivor balıklardaki metal konsantrasyonlarının, herbivor balıklardakine göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Balıklardaki ağır metal birikimleri üzerinde ayrıca beslenme zamanlarının da etkili olduğu, buna bağlı olarak da vücuttaki ağır metal konsantrasyonlarında önemli değişmeler gözlendiği belirtilmektedir (Karadere, 1997).

Tüm sucul omurgasızlar, metabolizmaları için gerekli olsun ya da olmasın, metalleri dokularında, organlarında biriktirirler (Bryan, 1976). Farklı omurgasızlar, ağır metalleri bünyelerinde farklı konsantrasyonlarda biriktirirler. Aynı sucul habitatta yasayan ve hatta aynı cinsten olan yakın türler bile eser metalleri bünyelerinde çok farklı konsantrasyonlarda biriktirebilirler. Belli bir türde anormal derecede yüksek olan ağır metal konsantrasyonu, başka bir türde düşük olabilir. Örneğin istiridyede düşük olan çinko konsantrasyonu bir midye türünde yüksek olabilir. Rainbow'un 2002 yılında yaptığı araştırmada, temiz ve ağır metal ile kontamine olmuş bölgelerden toplanan kabuklu türlerinde; birim kuru ağırlık başına çinko, bakır ve kadmiyumun miktarları incelenmiştir. Çalışmaya göre; birikim

miktarları organizmaya, metallerin çeşidine ve hatta bölgelere göre farklıdır. Her organizma, metalleri metabolik faaliyetlerinde farklı amaçlarla kullandığından, metallerin biriken, atılan ve kullanılan miktarları farklı çıkmıştır. Ayrıca esas metal olan çinko ve bakırın biriken miktarları, esas metal olmayan kadmiyum miktarından daha fazladır (Luoma, 1983; Rainbow ve Phillips, 1993; Rainbow, 1995; Muse ve ark., 1999; Özkoç ve Tosun, 1999).

1.1.1. Önemli Bazı Ağır Metaller ve Kaynakları

1.1.1.1. Kadmiyum (Cd)

Atom numarası 48 olan ve periyodik tabloda IIB grubu elementlerinden kadmiyumun ana kullanım yerleri; boya, mürekkep ve plastiklerde kullanılan pigmentlerin bileşimi, elektrolitik kaplama, plastik stabilizatörler, maden alaşımları ve nikel kadmiyum alaşımlı pillerdir. Lastik sertleştirilmesi, fotoğrafçılık, özel aynalar, televizyon tüpleri, nükleer santrallerde merkezsel çubuk üretimi ve katı hal sistemlerinde de yaklaşık % 8,5 oranında kullanım alanı bulur (Gökdemir, 2006; Egemen, 2006).

Kadmiyum doğada serbest halde bulunmaz, sülfür ve karbon bileşikleri halindedir (Rankama ve Shama, 1964). Kadmiyuma neredeyse bütün çinko filizlerinde rastlandığı için çinkonun yanında yan ürün olarak kadmiyum da elde edilir. Çevrede çinko ve kurşun varsa, kadmiyumun da bulunması beklenen bir sonuçtur. Kadmiyum, gübre ve pestisitlerde de bulunduğundan doğaya başlıca toprak yoluyla girdiği düşünülmektedir. Çevreye çeşitli yollarla yayılan kadmiyum sudaki organizmalara, buradan besin zinciri vasıtasıyla balıklara ve insanlara geçmektedir.

Fosil yakıtlar ve atık ürünlerinin yanması kadmiyumun diğer önemli kaynakları arasındadır. Kadmiyum, atık suların atıldığı nehirler ve kirletilmiş yeraltı sularının karışması ile denizel ortamda kirliliğe neden olmaktadır. Denizel ortamdaki dağılımı oldukça homojendir, civada olduğu gibi bazı deniz canlılarında birikebilir ve toksik etki meydana getirebilir. Diğer pek çok ağır metal gibi denizel ortamda farklı konsantrasyonlarda bulunabilir. Bazen suda çözünmüş haldeyken bazen de süspansiyon parçacık şeklinde olabilir ve organizmalar tarafından tutulabilir (Egemen, 2006).

1.1.1.2. Kurşun (Pb)

Atom numarası 82 olan kurşun, periyodik tablonun IVA grubu elementlerindendir. Çevre kirliliği açısından sorun oluşturan ağır metallerden biridir, Örneğin Grönland buzullarındaki Pb miktarının, doğal düzeyin 400 katı olduğu kaydedilmiştir (Gökdemir, 2006). Kurşun, genellikle metal ve metal kaplama sanayi ile madencilik atık sularında

bulunur. Metal sanayi atık sularındaki konsantrasyonu az olmakla birlikte, toksik özelliktedir, dolayısıyla bu suların alıcı ortama aktarılmadan önce arıtılmaları gerekmektedir. Otomobil aküleri, cephaneler, seramik endüstrisi, kurşunlu boyalar, kaplama, bilimsel ve optik aletler, tıbbi araç ve gereçler, kurşunlu benzin kullanımı ve katı atık yapımı da, diğer kurşun kaynakları olarak sayılabilir (Mc Neely, 1979).

Kurşun, genellikle endüstriyel ve madencilik faaliyetleriyle ortama atılmakta olup, kireç taşı ve kurşun yataklarından da yağmurlarla doğal sulara karışabilir (Goldscimitd, 1958). Kurşun alkali bileşikleri yüksek oranda toksik olmalarının yanında biyolojik birikime uğrama eğilimindedirler, balıkların besin zincirine katılarak vücutta birikebilirler (Radjaei, 2006). Kurşun, suda $+^2$ oksidasyon durumunda çözünürken kurşun sülfat çözünmez. Kurşunun suda çözünen bileşiklerinin akuatik organizmalar için zehirli olduğu düşünülmektedir. Denizel ortamda kurşunun biyolojik kullanımında özellikle balıklar önemli rol oynarlar (Hem, 1985). Denizel organizmalarda kurşunun bir kısmı tutulurken bir kısmı dışarıya atılır, fakat balıklarda dokularda birikir ve besin zinciriyle avdan avcıya geçer. Suda çözünmeyen kurşun sülfürün de, balıklarda iki aylık bir maruziyet sonucu öldürücü olduğu bulunmuştur. Kurşun için balıklarda kabul edilebilir maksimum miktar 0,2 mg kg^{-1} olarak belirtilmiştir (Radjaei, 2006; Egemen, 2006).

Kurşun, deniz suyundaki tuzluluk miktarının artmasıyla sedimentte çözünmeye uğrayabilir. Ayrıca organik maddelerle kararlı bileşikler oluşrurabilir, bu bileşikler kurşun aktarımında etkili olabilir. Ortamın artan pH'ı genellikle bileşen halindeki kurşun miktarını arttırır.

1.1.1.3. Bakır (Cu)

Atom numarası 29 olan bakır, periyodik tabloda IB grubunda yer alan elementtir. Uzayabilir ve genleşebilir özellikte, aynı zamanda ısı ve elektrik iletkenliğine sahip bir metaldir. Organizma için temel bir element olan bakırın; denizel ortamlardaki konsantrasyonu, şehirleşme ve endüstriyel gelişme, maden işletmelerinin sayı ve kapasite olarak artması, bu elementi içeren tarımsal gübre ve pestisitlerin aşırı ve yanlış kullanımı sonucu çok yüksek düzeylere ulaşabilmektedir (Merlini, 1971; Santovito ve ark., 2005; Richir ve Gobert, 2014).

Kağıt, boya ve petrol endüstrileri atık suları, bakır madenleri ile bakır ve pirinç kaplama endüstrisi, bakır kirliliğine neden olan ana kaynaklardır (Güven ve Öztürk, 2005). Pestisit çeşitlerinden olan fungusit ve mollusitler de genellikle bakır (bakır sülfat) içermektedir. Tarımsal mücadelede herbisit, fungusit ve algisit olarak ülkemizde geniş bir

kullanım alanına sahip olan bakır sülfat, zirai ilaç tüketiminin % 11,6'sını oluşturur (Bora ve Delen, 1981).

İç sularda mavi-yeşil algler gibi istenmeyen yeşillenmenin aşırı artışını engellemek amacıyla algisid olarak doğrudan bakır sülfat verilmektedir. Balıklarda bakır konsantrasyonlarının dağılımına bakıldığında, özellikle solungaçlarıda hasara yol açtığı belirtilmiştir (Cartwright, 1977). İlk önce solungaç epitelinde şişmeler görülmüş, daha kuvvetli dozlarda ise dokunun büzüştüğü ve çözülerek parçalandığı gözlenmiştir. Yüksek bakır konsantrasyonlarının insanlarda ise merkezi sinir sistemi bozuklukları, hemoglobin miktarında azalmalar ve kemik bozuklukları gibi sağlığa zararlı etkileri olduğu belirtilmiştir (Akgün, 2006).

1.1.1.4. Çinko (Zn)

Atom numarası 30 olan çinko, kadmiyum ve civaya benzer özellikleriyle birlikte periyodik tabloda geçiş elementleri grubunda yer almaktadır. Genleşebilme ve uzayabilme özelliğine sahip ve gri renkli bir metaldir (Okumuş, 2007). Oldukça yaygın bulunan bir element olan çinko, doğada en çok çinkospat, çinkoblend ve çinkosilikat mineralleri şeklinde bulunur (Ergül, 1999). Metabolik faaliyetlerde önemli bir rolü bulunan çinko, deniz suyunda iz element olarak gözlenir.

Denizel ortamlardaki yoğun çinko miktarı, antropolojik aktiviteler ve kentleşmeye paralel olarak artar ve sentetik fiber üretimi, madencilik ve boya sanayinden kaynaklanır. Cu gibi canlı organizmalar için gerekli bir element olan çinko, organizmada yalnızca +2 değerlikli olarak bulunmaktadır (Vallae, 1959; Akgün, 2006).

Çinko, petrokimya, klor-alkali üretimi, termik santraller, demir çelik sanayi, kuru hücre aküleri, beyaz boya imalatında, gübrelerde, alaşım imalatında ve bazı kozmetiklerin üretiminde kullanılmaktadır (Metelew ve Kanaev, 1971). Çinko atıkların başlıca kaynağı elektrolitik kaplama banyolarıdır. Bu banyoların çoğu, çinko siyanür içeren bazik çözeltilerden oluşmaktadır. Bu tür banyolar ile kirlenen atık suda çinko, genellikle çinko siyanür $Zn(CN)_2$ ve çinko ferro siyanür $Zn_2[Fe(CN)_6]$ halinde bulunmaktadır ve suların pH değeri genellikle 9'un üzerindedir.

Yüzey sularındaki çinko konsantrasyonları insan aktivitelerine ve şehirleşmelere paralel şekilde artmaktadır. Sularda tuzluluk oranının artması çökelmeye yol açarak sudaki çinko düzeyinin azalmasına neden olmaktadır. 18-23 °C'de ve pH'ı 7,7-8,2 arasında olan deniz suyunda, çinkonun % 99'u kil üzerinde 3 günde adsorbe edilmekte kalan % 1'lik (0,02 mg L^{-1}) kısım ise çözeltide kalmaktadır (Gökdemir, 2006). Çinko tuzlarının çoğu suda

çözündüğünden birçok endüstriyel ve evsel atık sulardan akuatik ortamlara ulaşan çinkonun da çözünmüş halde olması beklenebilir, bunun yanında çözünmeyen çinko tuzları çökelecek ve doğal sulara taşınacaktır. Denizel ortamlarda, çinko iyonlarının sediment tarafından güçlü şekilde adsorbe edilebilme özelliğinden ötürü çinko miktarı beklenen seviyeden düşük olabilir (Batkı, 1995). Denizlerdeki çinko miktarı da insan aktiviteleri ve şehirleşmeye bağlı olarak artar, ancak çinkonun deniz ürünlerini tüketiminden kaynaklanan ve çinkoya bağlı oluşan bir etkisi bilinmemektedir.

1.1.1.5. Demir (Fe)

Atom numarası 26 ve periyodik tabloda VIII. grup elementi olan demir, gümüşümsü beyaz renkli, parlak, değişen sıcaklık koşullarıyla genleşebilen ve uzayabilen bir metaldir. Doğada magnetit (Fe_3O_4), pirit (FeS_2), hematit (Fe_2O_3), limonit ($Fe(OH)_2$), gibi bileşikler halinde bulunur. Oldukça aktif bir element olan demirin en önemli formları Demir (II) ve Demir (III) formlarıdır (Okumuş, 2007). Toprak ve kayalarda bol miktarda bulunan demir, bitkiler, hayvanlar ve insanlar tarafından ihtiyaç duyulan bir elementtir ve alüminyumdan sonra % 4,2 ile yerkabuğunda en sık rastlanan metaldir. Asıl formunda çözülemeyen demir, doğada gerçekleşen pek çok tepkime ile çözülebilir formlara dönüşür ve bunlar da girdikleri suyu kirletirler. Ucuz oluşu ve yüksek direnç özelliği, demiri, demir çelik sanayi, gemi gövde yapımı, otomotiv ve binaların konstrüktif bileşeni olarak kullanımında vazgeçilmez yapar.

1.1.2 Ağır Metallerin Sucul Yaşama Etkileri

Denizel ortama giren kirleticiler, yalnız fiziksel ve kimyasal su parametreleri ile değil, aynı zamanda girdiği ortamdaki canlı sisteme etkilerinin araştırılması ile de belirlenebileceği ortaya çıkmıştır. Günümüzde kirleticilerin girdiği ortamda su, sediment ve burada bulunan alg, balık gibi indikatör türler incelenerek sonuca ulaşılmaya çalışılmaktadır. Tek bir ortam parametresiyle sonuca gitmenin yanlış olacağı saptanmıştır (Vasseur ve ark., 2000; Ivankovic ve ark., 2005; Nahrgang ve ark., 2013; Faria ve ark., 2014).

Ağır metaller, plankton türleri ya da sudaki diğer tüketici organizmalar filtrasyonu yolu ile midye ve balıklara geçer. Midyeler suda bulunan bu metalleri bünyelerine alıp biriktirirler (Faria ve ark., 2010). Diğer yandan su ürünleri insan beslenmesinde önemli protein kaynaklarındandır. Bu nedenle sucul ortamlarda artan ağır metal kirliliğinin midyelerdeki birikim düzeylerinin araştırılması hem midye biyolojisi hem de insan sağlığı açısından önemli bir konudur.

Ağır metaller sucul canlılara solunum ve sindirim sistemi yolu ile ya da deriden ve mukozadan geçebilir (Kayhan ve ark., 2009). En önemli geçiş yolu solungaçlardan absorbsiyonudur. Solungaçların ortamla doğrudan temas halinde olması, yani kirlilik kaynağına direkt olarak temas etmesi en büyük etkendir. Akuatik organizmalar, geniş ve ince bir yüzeye sahip olan solungaçlarıyla partikül şeklindeki metalleri, suda hazır çözünmüş metalleri ve askıda bulunan maddelerin alımını gerçekleştirmektedirler (Rainbow, 1985). Bakır, kurşun, civa ve çinko gibi metaller sularda eser miktarlarda bulunur ve 1 ppm sınırında öldürücü etkilere neden olurlar. Çünkü solungaçlar üzerine çökerler ve mukus salgısını etkileyerek oksijen alımını zorlaştırırlar (Güner, 2008).

Su ve besin yolu ile doğrudan ya da dolaylı olarak vücuda alınan, inorganik kirletici olan ağır metaller taşıyıcı proteinlere bağlı bir şekilde dokulara taşınmaktadır (Olsson ve ark., 1998). Metaller karaciğer, böbrek gibi metal metabolizması ve metal detoksifikasyonu ile ilgili organlarda daha çok birikmektedir (Kayhan ve ark., 2009; Özkurnaz, 2012).

Canlı bünyesine alınan metaller çeşitli metabolik yollardan geçerek vücut dışına atılır. Toksik metaller direkt veya indirekt olarak iyon geçirgenliğini, eritrosit membran yapılarını, enzim etkilerini ve hücre metabolizmasını etkiler, hücre zarının yapısını ve fizyolojik özelliklerini bozarak, hücre, doku ve organlara zarar verirler. Böylece sucul ekosistemlerde yapısal ve fonksiyonel değişimler oluşur, üreme bozuklukları ve ölüm oranları artar (Pavlica ve ark., 2008; Kayhan ve ark., 2009). Bu nedenlerle, ağır metallerin su ve gıdalarda ancak belli limitlerde bulunması gerekir.

Çizelge 1.1. Sucul organizmalarda kabul edilebilir ağır metal oranları (mg kg^{-1} yaş ağırlık) (EFSA, 2015)

Su ürünleri	Cd	Pb	Cu	Fe	Zn
Yumuşakça	1,00	0,50	10,00	50,00	20,00
Kabuklu	1,00	0,50	10,00	48,00	20,00
Balık	1,00	1,30	20,00	50,00	50,00

Besin olarak kullanılan önemli bir su ürünü olan Akdeniz midyesi *(Mytilus galloprovincialis*) temiz ve yarı temiz sularda olduğu kadar yoğun kirliliğin olduğu alanlarda da rahatça gelişebilmektedir. Diğer midyeler gibi besinlerini sudan süzerek alan bu tür, deniz kirliliği incelemelerinde çok iyi bir biyolojik indikatördür (Uysal, 1970; Regoli ve Orlando, 1994; Rainbow, 1995; Damianidis ve Chintiroglou, 1998; Rayment ve Barry, 2000).

1.2. *Mytilus* sp. Genel Özellikleri

Superregnum: Eucaryota

Regnum: Animalia

Subregnum: Eumetazoa

Divisio: Bilateria

Phylum: Mollusca

Classis: Bivalvia

Ordo: Mytiloida

Familia: Mytilidae

Genus: Mytilus

Species: *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)

En önemli türleri *Mytilus galloprovincialis* (Akdeniz midyesi ya da kara midye), *Mytilus perna* (Afrika midyesi), *Mytilus edulis* (mavi midye veya Avrupa midyesi) ve *Modiolus barbatus* (at midyesi) olan Mytilidae familyası geniş bir yayılım alanına sahiptir. Ülkemiz sularında *Mytilus galloprovincialis* ve *Modiolus barbatus* olmak üzere iki türü bulunmaktadır. *Modiolus barbatus* avcılığı en fazla Ayvalık ve civarında, *Mytilus galloprovincialis* avcılığı ise İzmir'den Karadeniz sularına kadar tüm kıyılarda yapılmaktadır (Alpbaz, 1993).

Midyeler bilateral simetrili canlılardır. Kabuk, ön kenar, arka kenar ventral kenar ve dorsal kenardan oluşur. Kabuğun dışı mor-siyah ve kahverenginin çeşitli tonlarında, içi ise sedef parlaklığındadır. Bu türün yaygın boy uzunluğu 7-8 cm, maksimum 10-11 cm kadar olabilir. Ülkemizde 7-8 cm boyuna gelenler bolca tüketilir. *M.galloprovincialis, M. edulis*'e göre kabuk yapısı yönünden daha yumuşak kıvrım gösterir ve kabukları ön yüzde daha yassıdır. Manto rengi ise tipik olarak menekşe moru rengindedir (Seed, 1974).

Ayağın uç ve arka tarafı vantuz şeklindedir ve ayak uzadığı zaman zemine tutunmasını sağlar. Canlının boyuna göre ayağın uzunluğu değişir. Boyu 5-6 cm civarında olan bir midyenin ayağının boyu 1-1,5 cm dir. Ayrıca midye ayağını kendi boyu kadar uzatabilir. Ayağın hareket ve kasılma özelliği çok fazladır. Canlının yer değiştirmesinde ve zemine tutunmasında ayağın çok büyük rolü vardır (Uysal, 1970). Canlının iskele direklerine, rıhtım duvarlarına, kayalara ve her türlü sert zeminler üzerine sağlam bir şekilde tutunmasını sağlayan bissuslar, ayağın arkasındaki şişkin bölgeden çıkar. Orta boy bir midyede 150 adet civarında bissus lifleri vardır (Lubet, 1963).

Midyelerin yumuşak vücutları manto denilen bir zar ile kaplıdır. Solunum organları olarak manto boşluğunun her iki yanında düşey konumda asılı olarak bulunan bir çift

ktenidium vardır. Ktenidiumlar eksen boyunca iki sıra halinde dizili solungaç flamentlerinden oluşur. Bunların üzerinde bulunan sillerle birbirlerine bağlanmışlardır. Ayrıca manto epiteli de solunumda rol oynar (Uysal, 1970). Ligament ekseni üzerinde ve anterior adduktor kasın arkasında ince yarık şeklinde yer alan ağız, altta ve üstte birer çift olarak bulunan ve ağız kolu (labial palp) adı verilen iki çift dudakla çevrilidir. Ağız boşluğunda çene ve tükrük bezi yoktur. Mide torba şeklindedir. Anterior kasların hemen altında ve mide etrafında koyu kahve renkli hepatopankreas yer alır. Son bağırsak ise perikard boşluğundan ve çoğunlukla kalbin ventrikülü (karıncık) içinden geçerek posterior adduktor kasın üzerinden kloak boşluğuna açılır.

Fitoplankton ve asılı haldeki organik maddelerle beslenirler. Besinlerini süzerek aldıklarından sudaki maddeleri dokularında biriktirmekte, bu nedenle de kirlilik araştırmalarında Türkiye'de ve diğer ülkelerde öncelikli olarak seçilen bir tür olmaktadırlar. Midyeler 2-100 µ arasındaki boyutlardaki organik ve inorganik partikülleri süzerek beslenirler. Ortalama 7-8 cm boyundaki bir midye saatte 10 – 15 L suyu süzme yeteneğine sahiptir (Uysal, 1970). Ortamdaki su akıntısı, suyun sıcaklığı, midyenin büyüklüğü, ortamdaki partikül yoğunluğu ve partikülün büyüklüğü midyelerin filtrasyon hızını etkilemektedir (Bayne ve ark., 1976).

Midyeler ortalama olarak yılda 3-5 cm ayda ise 4 mm kadar büyümektedirler. Optimum büyüme için uygun pH değeri 7 – 9'dur. ‰ 2 tuzluluk ve 14 ºC su sıcaklığı da en uygun değerleri ifade etmektedir. Midyelerin hayati faaliyetleri 28 ºC sıcaklık ve ‰4 tuzluluğun üzerine çıktığında durur (Çağlar, 1974). Kabuklu su canlılarında büyümeyi ayrıca sıcaklık ve besin azlığı veya yokluğu etkilemektedir (Seed, 1974; Langdon ve Newell, 1990; Esen, 2006).

1.2.1. Kirlilik Araştırmalarında Midyelerin Biyoindikatör Canlı Olarak Kullanımı

Midyeleri, aşağıda belirtilen özelliklere sahip olmaları nedeniyle biyomonitör çalışmalarında yaygın olarak kullanırlar:

- Öldürücü etkinin dışında çevredeki kirliliği bünyelerinde biriktirmeleri,
- Midyelerin çalışma alanında yerleşik bir düzen içinde olmaları,
- Bir yıldan daha uzun süreyi izleyen yeterince uzun yaşam sürmeleri,
- Tuzlu suları tolere edebilmeleri,
- Geniş bir coğrafik dağılıma sahip olmaları,
- Sahil ve körfez topluluklarının baskın türleri olmaları,

- Doğadan toplanmalarının ve laboratuvar şartlarında kirlilik analizlerinin kolay olmaları,
- Geniş sıcaklık ve tuzluluk şartlarında yaşayabilmeleri,
- Hareketsiz olmaları nedeniyle belli bir alan için kimyasal kirlilik durumunun belirteçleri olarak hareketli türlere nazaran avantaj sağlamaları,
- Yaşam bölgelerindeki deniz suyunun sahip olduğu değerlerle karşılaştırıldığında pek çok kimyasal maddeyi 10^2-10^5 kat daha fazla biriktirebilmeleri,
- Diğer türleri yok eden veya oldukça azaltan kirlilik şartlarında hayatta kalabilmeleri,
- Pestisitler ve Polisiklik bifenniler (PCB) gibi kimyasalların metabolizasyonunda düşük veya belirlenemeyen enzimaktivasyonları sergileyerek bu kirleticilerin daha doğru değerlendirilmelerini sağlıyor olabilmeleridir (Farrington ve ark., 1983; Phillips ve Rainbow, 1994).

Bunlara ek olarak *Mytilus* spp. türleri dünyada oldukça geniş oranda dağılmışlardır. Pek çok türü ticari olarak kullanılmakta ve örnekleme işlemi el ile kolayca yapılabilmektedir. Kimyasal analizler açısından uygun büyüklük ve ağırlığa kolayca ulaşırlar ve yıllarca yaşayabilirler. Dayanıklı ve koruyucu kabukları sayesinde taşıma ve depolama esnasında yumuşak kısımların zarar görmesi ve kirlenmesi minimum düzeydedir.

1.3. Serbest Radikaller

Oksijen, birçok canlının yaşamı için gereklidir, ancak metabolik faaliyetler esnasında üretilen bazı serbest oksijen radikalleri de canlıya zarar verir (Diplock, 1998). Reaktif oksijen türlerinin (ROT) büyük bir çoğunluğu serbest radikallerden oluşur ve normal oksijen molekülüyle karşılaştırıldığında, kimyasal reaktiviteleri daha yüksektir (Nawar, 1996).

Serbest radikaller, son yörüngelerinde bir ya da daha fazla ortaklanmamış e^- taşıyan kararsız, kısa ömürlü, düşük molekül ağırlıklı ve reaktif atom veya moleküller olarak tanımlanır. Serbest oksijen reaktifleri (SOR) veya ROT olarak da adlandırılmaktadır (McCord, 1993). Serbest radikaller, dış yörüngedeki elektronun ortaklanmasını sağlamak için diğer moleküllerle reaksiyona girebilecek şekilde reaktif ve kararsız bir yapı gösterirler (Cheeseman ve Stater, 1993).

ROT, tüm hücreler tarafından endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak aerobik metabolizmada normal veya patolojik süreçlerde sürekli olarak üretilmektedirler. Aerobik metabolizması olan memelilerde radikaller genellikle oksijenden üretilmekle birlikte, kükürt ve karbon merkezli radikaller de oluşmaktadır (Nakazawa ve ark., 1996).

Serbest radikaller daha çok biyolojik sistemlerde e^- transferi sırasında ortaya çıkar ve pek çoğu da oksijenin indirgenmesi ile oluşur. Negatif yüklü, pozitif yüklü veya elektriksel

olarak nötral, inorganik ya da organik moleküller şeklinde olabilirler. Mn^{+2}, Cu^{+2}, Fe^{+3} ve Mo^{+3} gibi bazı geçiş metalleri de serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar (Halliwell ve Gutteridge, 1990).

Aerobik canlıların hücrelerinde tüm metabolizma süreçleri, ayrıca kontamine sular, çevre kirleticileri, pestisitler ve radyasyon gibi birçok faktör serbest radikallerin oluşumuna yol açar. Süperoksit anyonu ($\cdot O_2^-$), tekli oksijen ($^1O_2$), peroksi ($ROO\cdot$), hidroksi ($\cdot OH$) ve alkoksi ($RO\cdot$) radikalleri, reaktif oksijen türlerinin en önemlilerindendir (Kaur ve Kapoor, 2001).

Serbest radikalleri yakalama ve kontrol altında tutma yeteneğine sahip ve serbest radikallerin sebep olduğu oksidasyonları önleyen maddelere "antioksidan" adı verilir (Elliot, 1999). Antioksidan savunma sistemleri, reaktif oksijen türlerinin zararlarını ve vücuttaki serbest radikalleri kontrol altına almaktadırlar. Bu sistemler farklı serbest radikaller üzerinde ve farklı hücrelerde rol aldıkları için birbirlerini tamamlar niteliktedirler (Diplock, 1998).

Hücreler normal fizyolojik koşullarda, antioksidan savunma sistemleri vasıtasıyla serbest radikal ve peroksitlerin meydana getirdiği oksidatif strese karşı korunmaktadır.

Bu sistemleri;

- Enzimatik Antioksidanlar: Glutatyon-S-transferaz (GST), süperoksit dismutaz (SOD), selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR);
- Enzimatik Olmayan (Non-enzimatik) Antioksidanlar: C vitamini, A vitamini, E vitamini, flavinoidler, melatonin, ubikinon (koenzim Q10), haptoglobulin, ürik asit, albumin, sistein, ferritin, bilirubin, seruloplazmin, transferin, laktoferrin, oksipurinol, mannitol, lipoik asit ve hemopeksin şeklinde ayırabiliriz.

Genel olarak enzimatik olmayan antioksidanlar hücre dışında, enzimatik antioksidanlar ise hücre içinde daha aktif olarak gözlemlenir (Halliwell ve Gutteridge, 2000).

Süperoksit dismutaz (SOD) enzimiyle gerçekleştirilen işlemler, ökaryotik hücrelerin reaktif oksijen türlerine karşı geliştirdikleri savunma mekanizmalarının başında gelmektedir (Armstrong 1998; Ekici ve Sağdıç, 2008; Yining ve ark., 2011). Süperoksit anyonunu hidrojen perokside dönüştüren SOD metalloenzimi, antioksidan koruma sisteminin ilk basamağını oluşturmaktadır. Oksijenli solunum yapan canlılarda moleküler oksijenin bir e^- alarak indirgenmesi sonucu oluşan süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$) oksijene e^- eklenmesiyle meydana gelir. Bir eşleşmemiş e^- içeren $O_2^{\bullet -}$ radikali güçlü bir oksidan ya da yüksek reaktif

bir bileşik olmamasına rağmen, toksik metabolitlerin birikmesi ve hücresel enerji depolarının boşalması sonucunda hücre ölümüne sebep olur (Günaydın ve Çelebi, 2003; Lee ve ark., 2004). $O_2^{\bullet-}$ radikali hidrojen peroksit kaynağı olarak önemli bir yere sahiptir, ayrıca Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonuna girerek aktif hidroksil radikallerini de oluşturur. Bu aktif radikaller katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri vasıtasıyla kontrol altına alınmaktadır (Velioğlu 2000; Lee ve ark., 2004).

Katalaz (CAT), hemoprotein özelliğinde olan, neredeyse tüm bitkisel ve hayvansal dokularda bulunan bir enzimdir. Hücreleri, oksitlerin redüklenmesi sonucu oluşan ve ileri düzeyde toksik olan hidrojen peroksitten koruyan CAT; hem-bağlı demir içerir. CAT aktivitesi sonucu H_2O_2 parçalanarak serbest oksijen açığa çıkar (Speranza ve ark. 1993; Mates ve ark., 1999). Katalaz normal koşullarda bazı hücre tipleri için gerekli olmasa bile, oksidatif stres halinde önemli bir role sahiptir. Ayrıca CAT'ın, SOD'un antioksidant aktivitesindeki hata oranını azaltmak için gerekli olduğu rapor edilmiştir (Fox ve ark., 1998; Yüzügüllü ve Özgel, 2013).

Serbest radikallerden başta lipid olmak üzere, protein, nukleik asitler gibi makromoleküllerin hepsi etkilenir. Membranda bulunan yağ asitleri serbest radikaller ile tepkimeye girip peroksidasyona sebep olmaktadırlar. Öncelikle yağ asidi bir hidrojen kaybeder ve lipid radikallerini oluşturur. Lipid radikali de oksijen ile tepkimeye girerek lipid peroksil (LP) radikalini oluşturmaktadır. LP radikalleri diğer doymamış yağ asitleriyle tepkimeye girerek zincirleme bir tepkime başlatırlar. Bununla birlikte yine ortamda bulunan H atomları ile tepkimeye girerek lipid hidroperoksidleri de oluşturabilirler. Kalıtsal materyalle ya da proteinlerle tepkimeye girebilen, toksik lipid peroksiller malondialdehid ve 4-hidroksi-nonenal gibi yıkım ürünlerine dönüşürler (Şekeroğlu ve ark., 2000; Young ve Woodside, 2001; Masella ve ark., 2005; Niki ve ark., 2005). Kirletici unsurların etkisiyle tetiklenen antioksidan enzimler ve lipid peroksidasyon, oksidatif stres biyoişaretleyicisi olarak kullanılmaktadır (Vasseur ve ark., 2003).

1.3.1. Reaktif Oksijen Türleri

1.3.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet-}$)

Süperoksit radikal anyonu tüm oksijenli solunum yapan organizmalarda oksijenin bir e^- alarak indirgenmesi sonucu oluşmaktadır:

$$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$$

Genellikle hücre mitokondriyumunda, elektron taşıma sisteminde NADH'in NAD^+'e yükseltgenmesi ile üretilirler. Birçok oksidaz tarafından da üretilmektedirler (Uchida, 2003).

Süperoksit molekülü kendi başına ve doğrudan fazla zarar vermez, ancak hidrojen peroksit (H_2O_2) kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olması nedeni ile dolaylı zararlı etkilere yol açabilir (Vincent ve ark., 2004).

1.3.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Moleküler süperoksitin bir e^- alması ya da oksijenin iki e^- alması sonucu peroksit molekülü oluşur. Iki hidrojen atomu ile birleşen peroksit molekülü hidrojen peroksiti meydana getirir:

$$O_2 + 2e^- + 2H+ \rightarrow H_2O_2$$

$$O_2^{\bullet -} + 2e^- + 2H+ \rightarrow H_2O_2$$

Organizmalarda asıl H_2O_2 üretimi süperoksitin dismutasyonu reaksiyonuyla gerçekleşir. Bu reaksiyon aerobik organizmalarda süperoksit dismutaz (SOD) tarafından katalize edilir (Fang ve ark., 2002):

$$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

H_2O_2 bir serbest radikal olmamasına rağmen serbest radikal biyokimyasında önemli rol oynar. Süperoksit anyonu ile tepkimeye girerek en reaktif ve zararlı hidroksil radikalini oluşturma potansiyeline sahiptir. Katalaz ve peroksidaz enzimleri bu olaylarda görev alırlar (Kılınc ve Kılınc, 2002).

Süperoksitler, üretildiği yerde kaldığı halde, H_2O_2 üretildiği yerde kalmaz ve membranı geçerek sitozole girer. H_2O_2 çok kuvvetli bir oksitleyici molekül olup hücrede, CAT, GSH ve tiyoredoksin (Trx) aracılığı ile oksijen ve H_2O'ya dönüştürülür. H_2O_2, serbest halde bulunan Fe^{+2} ile tepkimeye girerse demir oksitlenir ve bu esnada oluşan hidroksil radikali hücrede hasara yol açar (Vincent ve ark., 2004).

1.3.1.3. Hidroksil Radikali ($OH^{\bullet}$)

Organizmalarda üretilen en güçlü reaktiviteye sahip serbest radikaldir. Aminoasitler, şekerler, organik asitler, fosfolipidler ve nükleik asitler gibi hemen hemen bütün moleküller ile reaksiyona girebilmektedir (Frei, 1994). Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları $OH^{\bullet}$ radikalini oluşturan reaksiyonlardandır (Lee ve ark., 2004).

H_2O_2 yüksüz bir molekül olduğundan hücre içine kolaylıkla girebilir ve serbest radikallerden en reaktif ve en hasar verici etkili olan $OH^{\bullet}$ radikalini oluşturmak için kolaylıkla parçalanabilir (Haber-Weiss reaksiyonu).

$$H_2O_2 + O_2^{\bullet -} \rightarrow OH^{\bullet} + OH^- + O_2$$

Haber-Weiss Reaksiyonunda Fe ve Cu gibi metal iyonları da rol oynayabilir. Bu reaksiyon için önce Fe^{+3} iyonu süperoksit radikali aracılığıyla Fe^{+2} iyonuna indirgenir. Fe^{+2} iyonu ise H_2O_2 ile reaksiyona girerek $OH^{\bullet}$ radikalini meydana getirir (Fenton Reaksiyonu):

$$Fe^{+3} + O_2^{\bullet -} \rightarrow O_2 + Fe^{+2}$$

$$Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + OH^- + OH^{\bullet} \text{ (Fenton Reaksiyonu)}$$

1.3.1.4. Singlet Oksijen ($^1O_2$)

Yapısında ortaklanmamış elektron bulunmadığı için gerçek bir serbest radikal değildir. Serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olması nedeniyle önem kazanmaktadır. Yörüngesindeki elektronlardan birisinin dışarıdan enerji alması sonucunda bulunduğu yörüngenin tersine olacak şekilde yer değiştirmesi ile veya süperoksit radikalinin dismutasyonu ve H_2O_2'nin hipoklorit ile tepkimeye girmesi sonucunda meydana gelebilir (Ryter ve Tyrrell, 1998).

1.3.1.5. Perhidroksil Radikali ($HO_2^{\bullet}$)

Süperoksit radikali düşük pH değerlerinde bir proton alarak perhidroksil radikalini oluşturur. Ancak bu radikalin oluşma olasılığı fizyolojik pH değerinde %1'den azdır. Perhidroksil radikali yağ asidi, aminoasit ve α-tokoferolle reaksiyona girer (Cheeseman ve Stater, 1993):

$$2\ O_2^{\bullet -} + H_2^+ \rightarrow 2\ HO_2^{\bullet}$$

1.3.1.6. Peroksil Radikali ($ROO^{\bullet}$)

Hidroksil radikali ile yağ asitleri, proteinler, karbohidratlar ve nükleik asitler gibi birçok moleküllerden bir proton çıkmasıyla karbon merkezli 6 alkil radikali; $R^{\bullet}$ oluşur ve hızlıca O_2 ile tepkimeye girerek peroksil radikalini ($ROO^{\bullet}$) meydana getirirler. ROO, lipid peroksidasyonunda zincir devam ettirici radikaldir (Merel ve ark., 2000):

$$RH + OH^{\bullet} \rightarrow R^{\bullet} + H_2O$$

$$R^{\bullet} + O_2 \rightarrow ROO^{\bullet}$$

1.3.2. Reaktif Nitrojen Türleri

1.3.2.1. Nitrik Oksit ($NO^{\bullet}$) ve diğer nitrojen oksitleri

Sitozolik bir enzim olan nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından oluşturulur. Guanilat siklazı aktive ederek damar tonusunda önemli değişikliklere neden olur (Moncada ve ark., 1989). Hem nitrik oksit radikali hem de diğer nitrojen oksitleri (NO_2, NO, N_2O_3, N_2O_4 gibi)

güçlü nitröze edici ajanlardır. Primer ve sekonder aminleri nitrözleyerek nitrozaminleri oluştururlar. Nitrozamin bileşikleri olası karsinojenik maddelerdir. Çünkü bu bileşikler alkil nükleofillerin oluşumuna neden olabilirler ve DNA'da nitrozilasyon, deaminasyon yapabilirler. Böylece ortaya çıkan mutasyonlar onkojenleri aktifleyerek malign transformasyonlara neden olabilirler (Kwon ve ark., 1991). Yine NO•'in lipidler üzerine olan etkisiyle lipid peroksidasyonu başlatılır ve çeşitli peroksitler üretilebilir (Yallampalli ve ark., 1994).

1.4. Antioksidan Savunma Sistemleri

Organizmada ROT oluşumuyla eş zamanlı olarak serbest radikallerin zararlı etkilerini önlemek için antioksidan savunma mekanizmaları gelişmektedir. Antioksidanlar, okside olabilen substratların oksidasyonunu önleyen veya oksidasyon derecesini azaltan moleküllerdir ve normal hücreleri uzun ve kısa dönemde serbest radikallere bağlı hasarlanmadan korudukları ileri sürülmektedir (Borek ve ark., 1989).

Antioksidanları, endojen ve ekzojen kaynaklı olmak üzere başlıca iki ana gruba ayırabileceğimiz gibi serbest radikallerin oluşumunu engelleyenler ve var olanları inhibe edenler şeklinde de sınıflandırabiliriz. Antioksidanlar, oksidan maddelerin etkilerini dört mekanizma ile ortadan kaldırırlar (Memişoğulları, 2005):

1. **Temizleme (Scavenging) etkisi**: Antioksidan enzimlerin, serbest radikalleri zayıf bir moleküle çevirme şeklinde etki etmesidir.
2. **Baskılama (Quencher) etkisi**: Vitaminler ve flavonoidlerin, reaktif oksijenlere bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme şeklidir.
3. **Onarma etkisi**: Nukleik asitler gibi ROT ile yıkılmış biyomolekülleri onarırlar. DNA onarım enzimleri ve metiyonin sülfoksit redüktaz bu gruba dâhil edilir.
4. **Zincir koparma etkisi**: Hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamin, serbest radikalleri bağlayarak fonksiyonlarını engellemektedir.

Antioksidan maddeler endojen, ekzojen ve gıda kaynaklı antioksidanlar olarak üç grupta toplanırlar (Akkuş, 1995).

I-Endojen Antioksidanlar

A-Enzim Yapısında Olanlar

- Mitokondrial Sitokrom Oksidaz Sistemi
- Süperoksid Dismutaz
- Katalaz

- Glutatyon peroksidaz, Glutatyon-S-Transferaz
- Hidroperoksidaz

B-Enzim Yapıda Olmayanlar

- Lipid Fazda Bulunanlar -Tokoferol (E vitamini), - Karoten
- Sıvı Fazda (Sitozol veya kan plazmasında) bulunanlar -Askorbik asit, Seruloplazmin, Ürat, Bilirübin, Melatonin, Sistein, Laktoferrin, Metionin, Myoglobin, Hemoglobin, Ferritin, Transferrin, Albumin, Glutatyon, Selenyum

II-Ekzojen Antioksidanlar

- Ksantin-oksidaz İnhibitörleri: Allopurinol, Oksipurinol, Folik Asit 8
- NADPH Oksidaz inhibitörleri: Adenozin, Lokal anestetikler
- Rekombinant Süperoksid Dismutaz
- Endojen Antioksidan Aktiviteyi Arttıranlar: Asetilsistein, Ebselen
- Diğer Nonenzimatik Serbest Radikal Toplayıcıları: Albumin, Mannitol
- Demir Redoks Döngüsünün inhibitörleri: Seruloplazmin, Desferroksamin
- Sitokinler: Tümör Nekroz Faktör (TNF) ve IL-1
- Demir şelatörleri

III-Gıda Antioksidanları

- Butil Hidroksitoluen
- Butil Hidroksianizon
- Sodyum Benzoat
- Fe-Süperoksid Dismutaz

1.4.1. Enzimatik Antioksidanlar

1.4.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksitin hidrojen peroksite dismutasyonunu katalize eden metallo enzimdir.

$$2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$$

SOD tarafından oluşturulan H_2O_2 toksik bir ajandır. Ancak bu reaksiyon reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonunda ilk basamağı oluşturur. Üç tip süperoksit dismutaz bulunmaktadır. Birincisi mitokondriyumda bulunan Mn-SOD, ikincisi sitozolde bulunan CuZn-SOD ve üçüncüsü de Cu içeren ve plazmadaki süperoksit radikallerini inhibe eden vasküler endotele bağlı Cu-SOD'dır (Young ve Woodside, 2001).

1.4.1.2. Katalaz (CAT)

Peroksizomlarda lokalize, yapısında Fe^{+3} bulunduran, her biri prostetik grup olan 4 hem grubundan oluşmuş bir hemoproteindir (Guemori ve ark., 1991). Katalaz, SOD'ın oluşturduğu H_2O_2'yi peroksidazlarla beraber oksijen ve suya parçalar.

$$2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$

Katalazın H_2O_2'e karşı Michaelis sabiti (Km) değeri glutatyon peroksidaza göre daha yüksek olduğundan düşük miktarlarda H_2O_2'i glutatyon peroksidaz parçalarken, yüksek miktarlarda katalaz devreye girer.

1.4.1.3. Glutatyon S-transferaz (GST)

GST, glutatyon ile toksik metabolitlerin oluşmasını katalizleyerek detoksifikasyonlarını sağlar (Van Haaften ve ark., 2001).

$$ROOH + 2\ GSH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$$

GST'lar öncelikle lineloat hidroperoksitleri ve araşidonik asit olmak üzere lipid peroksitlerine karsı glutatyon peroksidaz aktivitesi gösteren bir savunma mekanizması oluştururlar. Detoksifikasyon görevlerinin yanında hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı görevleri de vardır. Metabolize edilmeyen lipofilik veya hidrofilik pek çok bileşiği bağlayarak bu bileşikler için depo ve taşıma görevi üstlenirler. GST'lerin kanserojenler, mutajenler ve diğer zararlı kimyasalların detoksifikasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir (Onat ve Emerk, 1996).

1.4.1.4. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)

Her birinde selenosistein bulunan dört alt birimden oluşur. Eritrositlerdeki en güçlü antioksidandır ve eritrositleri E vitamini eksikliğinde membran hasarına karşı korur (Young ve Woodside, 2001).

$$H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O$$

Reaksiyon sayesinde redükte glutatyon yükseltgenirken H_2O_2 suya çevrilir. Böylece membran lipidleri ve hemoglobin oksidan strese karşı korunur.

1.4.1.5. Glutatyon Redüktaz (GR)

İki alt birimden oluşan dimer yapısındaki bu enzimin her bir alt birimi NADPH bağlayan alan, FAD bağlayan alan ve ara yüz alan olmak üzere üç tane yapısal alan içerir. GR, glutatyonun indirgenme reaksiyonunda rol oynar. Bu reaksiyon sırasında elektronlar sıklıkla NADPH'dan FAD'ye transfer edilir. Daha sonra alt birimlerdeki iki sistein arasında

bulunan disülfit köprüsüne transfer edilerek okside glutatyona aktarılır (Young ve Woodside, 2001).

$$GSSG\text{-}NADPH+H^{+} \rightarrow 2GSH+NADP^{+}$$

1.4.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

1.4.2.1. E Vitamini (Alfa-Tokoferol)

Yağda çözünme özelliği dolayısıyla hem subsellüler hem de sellüler membranlarda ve lipoproteinlerde bulunur. Zincir kırıcı bir antioksidan olan E vitamini, membranlarda oksijen radikallerinin ana temizleyicisidir. Kolayca membran fosfolipidlerine diffüze olur ve doymamış yağ asitlerini indirgeyerek serbest radikallerin membranlarda oluşturabileceği lipid peroksidasyonunu önler (Seven ve Candan, 1996).

$$\alpha\text{-tokoferol-OH} + COO^{\bullet} \rightarrow \alpha\text{-tokoferol-}O^{\bullet} + COOH$$

Oluşan tokoferoksil radikali membran üzerinde askorbik asit (C vitamini) ile tepkimeye girerek tekrar tokoferole dönüşebilir (Chao ve ark., 2002). A vitamininin metabolik ön maddesi olan β-karoten, radikal yakalayıcı olarak görev yapan bir antioksidandır. Singlet oksijeni baskılayarak, süperoksit radikalini temizler ve düşük oksijen basıncında peroksi serbest radikallerinin dokulara hapsedilmesi yoluyla antioksidan etki gösterir, α-tokoferol ile karşılaştırıldığında oldukça zayıf bir antioksidandır ve α -tokoferol bittikten sonra kullanılır (Cherubini ve ark., 2005).

1.4.2.2. C Vitamini (Askorbik Asit)

Moleküler oksijen, sitokrom a, sitokrom c ve nitrat gibi bileşiklerin indirgenmesine sebep olan ve suda çözünerek serbest radikallerle tepkimeye girebilen bir üründür. Plazmada oksidan ajanlara karşı savunma yapan ilk antioksidandır. Birçok reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerini toplayıcı etkiye sahiptir (Carr ve Frei, 1999).

1.4.2.3. Glutatyon (GSH)

Glutamik asit, glisin ve sisteinden oluşan tripeptittir. Antioksidan ve hücre içi indirgeyici ajandır. Glutatyon redüktazın katalizlediği reaksiyon sayesinde hücre içinde indirgenmiş formda bulunur. Kendisi de okside olarak endojen peroksitlerin indirgenmelerini ve oksidasyona karşı korunmalarını sağlar. Bu işlevini yaparken glutatyon peroksidazı katalizör olarak kullanır (Sözmen, 2002).

$$2GSH + H_2O_2\ (ROOH) \rightarrow GSSG + 2H_2O\ (2ROH)$$

$$GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow NADP^+ + GSH$$

1.5. Oksidatif Stres

ROT üretimi ile antioksidan savunma sistemleri arasındaki dengenin ROT üretiminin artması yönünde bozulması ile meydana gelir (Brenneisen ve ark., 2005). Normal hücre metabolizması sürecinde veya patolojik birtakım durumlara bağlı olarak aşırı ROT üretildiğinde ya da antioksidan savunmada belirgin bir azalma olduğunda oksidatif stres oluşur. Oksidatif stres birçok doku ve organda harabiyete, ayrıca DNA hasarına, kromozomal sapmalara, tümör süpresör genlerde mutasyonlara, kontrol edilemeyen hücre bölünmelerine ve genomik istikrarsızlıklara neden olmaktadır. Bu durum tümör oluşumu ve büyümesine yol açmaktadır (Schuyer ve ark., 1999). Organizmadaki oksidan-antioksidan denge endojen ve ekzojen birçok faktöre bağlıdır.

1.5.1. Serbest Radikallerin Biyomoleküller Üzerindeki Etkileri

ROT, hücrelerin lipid, DNA, protein, karbonhidrat, enzim gibi bütün esas bileşiklerine etki eder. Hücre duvarı hasarı, DNA hasarı, kollojen yıkımı, lipidlerin depolimerizasyonu ve lipid peroksidasyonuna neden oldukları bilinmektedir (Basaga, 1990). Sonuçta membran bütünlüğü kaybolur, zar geçişinde iyonik derecelendirmede olumsuz etkilenir ve kalıcı hasar meydana gelir.

1.5.1.1. Proteinler Üzerindeki Etkileri

Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikaller ile reaksiyona girme potansiyelleri çok yüksek olduğundan; fenilalanin, tirozin, triptofan, histidin, metionin, arjinin, lizin, prolin gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikal hasarına karşı daha duyarlıdırlar. Serbest radikallerin proteinler üzerinde meydana getirdiği hasar sonucu sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller meydana gelir. Sonuçta immunojen aktivitede artış, enzim aktivitesinde azalma, protein fonksiyonlarının ve proteaz inhibitör aktivitenin kaybı, proteolize artmış ya da azalmış yatkınlık, protein agregasyonu, reseptör aracılı endositozun bozulması, gen transkripsiyonunda değişimler oluşur (Davies ve ark., 1999).

1.5.1.2. Karbonhidratlar Üzerindeki Etkileri

Serbest radikaller, monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu oksoaldehitler, hidrojen peroksit ve çeşitli peroksitlerin oluşumuna yol açar. Süperoksit ve hidrojen peroksitin laboratuvar ortamında hyaluronik asidi parçaladığı rapor edilmiştir (Maxwell, 1995).

1.5.1.3. Lipidler Üzerindeki Etkileri (Lipid Peroksidasyonu)

Serbest radikallere en çok maruz kalan ve zararlı etkilerine karşı en duyarlı olan moleküller lipidlerdir. Serbest radikallerin lipidler üzerine en önemli etkisi uzun zincirli doymamış yağ asitlerinin oksidasyonudur. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı "lipid peroksidasyonu" (LP) olarak bilinir (Esterbauer ve ark., 1993). ROT, lipid peroksidasyonunu indükleyerek fonksiyonel ve yapısal hücre hasarına neden olur. Lipid peroksidasyonu hücre membranlarının bütünlüğünü tehlikeye sokar ve hücre membranının akışkanlığını artırır. Membrana bağlı reseptör ve enzimlerin inaktive olmasına neden olur (Kang, 2002). Lipid peroksidasyonu, lipid moleküllerinin arasındaki iki doymamış yağ asidi bağının arasına yerleşen metilenin bir H atomunun çıkması sonucunda oluşur. Sonuçta yeni bir karbon merkezli serbest lipid radikali meydana gelir. Ortamda oksijen varsa bu yeni lipid serbest radikalinden LP ya da lipid hidroperoksitleri oluşur. Bu ürünler diğerlerine oranla daha kararlı bir son ürün olan ve lipid peroksidasyonunun belirteci olarak kullanılan malondialdehite (MDA) dönüşür (McCord, 1985).

Membran komponentlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmalarına neden olan MDA; deformabilite, enzim aktivitesi, iyon transportu ve hücre yüzeyindeki determinantların bir araya gelmesi gibi etkiler ile iç membranın bazı özelliklerini degiştirmektedir. Ayrıca, nukleusa diffüze olabildiğinden DNA'nın nitrojen bazlarıyla da reaksiyona girmektedir. MDA, bu özelliklerinden dolayı mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir bileşiktir (Freeman ve Crapo, 1982).

1.5.1.4. Nukleik Asitler Üzerindeki Etkileri

Serbest radikallerin en önemli etkilerinden birisi de DNA hasarına yol açmalarıdır (Halliwell ve Aruoma, 1991). Serbest radikaller DNA'nın nukleik asitleri ile reaksiyona girip DNA dizinlerinde çatlaklar oluşturarak bu hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesine neden olmaktadır (Halliwell, 1996). Nukleik asitlerde baz modifikasyonları, tek veya çift dal kırıkları, çapraz bağlanmalar yaparak mutasyonlara neden olabilirler (Evans ve Cooke, 2004). Serbest radikallerin meydana getirdiği endojen DNA hasarı, DNA bazları veya deoksiriboz kalıntıları üzerinde olmakta ve sonuçta DNA zincirlerinde kırılmalar ve bazlarda hasar meydana gelmektedir. Örneğin singlet oksijen, guanini kolayca oksitleyebilmektedir. Okside DNA bazlarının oluşumu için OH radikalinin önemi büyüktür. $OH^{\cdot}$ radikali deoksiriboz iskeletine ve pürin, pirimidin bazlarına hasar verir. $NO^{\bullet}$ ve Peroksinitrit de DNA hasarına sebep olabilirler. Nitrik oksit ve süperoksitin bağlanması sonucu oluşan bu oksidan oldukça güçlü olup hücrelerin içine doğru yayılma kapasitesine sahiptir. DNA'yı okside

edebilme yeteneği oksidasyon ve mutasyon arasındaki ilişkiyle açıklanmaktadır (Marnett, 2000). Peroksinitrit: guanin bazı ile tepkimeye girerek 8-nitroguanin oluşturur ve sonuçta G:C ile T:A yer değiştirmesine neden olabilir. DNA'daki bu lezyonun kararlılığı RNA'dakine göre daha kısa sürelidir. Buna rağmen 8-nitroguanin ile karsinogenez süreci arasındaki ilişki net olarak bilinmemektedir.

Reaktif klorin türleri DNA'da değişikliklere neden olabilmektedir (Nalçacı, 1991). Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ara ürünler de DNA ile reaksiyona girebilmekte ve meydana gelen endojen DNA lezyonları genotoksik etki göstermektedir (Dreher ve Junod, 1996).

Çevresel metal kirliliğini değerlendirme işlemleri, tüm organizma ya da ilgili organlarda seçilen metallerin seviyesinin ölçülmesini içerir (Goldberg ve ark., 1978). Özellikle solungaç ve sindirim bezi dokuları, çevresel kirleticilerin enzim düzeyinde etkisini gözlemlemek için özellikle kullanışlıdır. Antioksidan savunma enzimleri, protein hasarı ve akuatik canlılardaki diğer parametrelerin mevsimsel ve mekânsal değişimi ile deniz kirliliğini inceleme çalışmalarında kullanılmaktadır (Orbea ve ark., 2002; Manduzio ve ark., 2003).

Bu araştırmada çalışma grubu olarak, beslenme şekilleri, uzun süreli ya da letal dozun altındaki konsantrasyonlara maruz kalmaları sonucu savunma mekanizması oluşturmaları ve oksidatif strese duyarlılık gösterdikleri için *Mytilus galloprovincialis* türü tercih edilmiştir. Bu canlılar; reaktif oksijenlerin hücrede nasıl bir hasara yol açtığı, hücrelerin bu hasara nasıl yanıt verdiği, onarım mekanizmalarının bu hasarı nasıl düzelttiği ve oksidatif stresin nelere yol açtığını anlamada model sistem olarak tanımlanabilmektedirler (Di Giulio ve ark., 1989; Livingstone ve ark., 1994).

Bu amaçla, Çanakkale Kepez kıyılarından toplanan *Mytilus galloprovincialis* örneklerinde ağır metal düzeylerinin belirlenerek, potansiyel kirliliğin bu türde temel antioksidan enzim düzeylerinin mevsimsel değişiminin araştırılması planlanmıştır.

BÖLÜM 2
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Viarengo ve ark. (1991), enzimatik antioksidanlar olan superoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitelerindeki mevsimsel değişimleri midyelerin (*Mytilus* sp.) hepatopankreas dokusunda incelemişlerdir. Yapılan çalışmaya göre SOD, sonbahar ve kış aylarında düşük düzeydeyken, ilkbahar aylarında yükselmeye başlamış ve Haziran ayında düzeyi maksimuma ulaşmıştır. CAT ve GPx, sonbahardan kışa kadar düşerken, ilkbaharda aniden yükselmiş ve Mayıs'ta maksimum düzeye erişmiştir. Çalışma sonunda, kış boyunca antioksidan savunma sisteminin düşmesi artan oksidatif stres ile doğrudan ilgili olduğu bulunmuştur.

Power ve Sheehan (1996), mevsimsel değişimin *Mytilus edulis* türünde antioksidan aktivitesini nasıl etkilediğini belirlemeye çalışmışlardır. Cork Limanı'nda (İrlanda) örneklenen midyelerin solungaç ve heptopankreas dokularında glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon GSH, GPx ve CAT düzeylerine bakılmıştır. GSH aktivitesi Şubat- Nisan periodunda oldukça düşük bulunmuştur. CAT aktivitesinin yıl içinde çok büyük değişim göstermediği belirlenirken Eylül-Nisan periodunda Mayıs-Temmuz periodundan daha düşük olduğu rapor edilmiştir. GST aktivitesinin Ekim-Mart periodunda solungaçta artarken hepatopankreasta azaldığı kaydedilmiştir. Bu durumun, enzimlerin dokuya özgü oksidatif stresten koruma rolünden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Vasseur ve ark. (1997) çalışmalarında, tatlı su midyesi (*Unio tumidus*) türünde kirliliğin GPx, glutatyon redüktaz (GR), SOD ve CAT enzim aktivitelerini ve lipid peroksidaz (LPO) düzeyini ne derece etkilediğini ölçebilmeyi amaçlamışlardır. Örnekler bir hafta süreyle kirlilik kaynağı olduğu düşünülen bölgelerin alt ve üst çevrelerine yerleştirilip takip edilmiştir. Kirlilikten en çok etkilenen parametrelerin GST ve GPx olduğunu ve miktarlarında artış görüldüğünü, ayrıca GR değerlerinin düştüğünü belirtmişlerdir. SOD ve CAT aktivitesi ile negatif kontrol karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmezken, LPO düzeyi kirliliğin yoğun olduğu bölgelerde artış göstermiştir. Veriler, solungaçlardaki parametrelerin, hepatopankreastaki parametrelerden yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Çalışma sonunda ayrıca GPx, GSH ve GR düzeylerinin çevresel kirliliğin belirlenmesinde etkili birer biyoişaretleyici olabileceği önerisinde bulunulmuştur.

Orbea ve arkadaşları (1999), *Mytilus galloprovincialis* türünde CAT aktivitesinin bölgesel değişiklikler gösterdiğini öne sürmüşlerdir. Bu amaçla Galea ve Plentzia (İspanya, Basque) bölgelerinden temin edilen midyeleri karşılaştırmışlardır. Galea'dan toplanan

örneklerde en yüksek CAT aktivitesi ilkbahar aylarındayken, Plentzia'dan toplanan örneklerde sonbahar aylarındadır. Bu iki bölge arasında CAT aktivitesinin en düşük olduğu aylar da farklıdır. Galea bölgesinde en düşük aktivite sonbaharda iken, Plentzia bölgesinde ilkbahar aylarındadır.

Cancio ve ark. (1999) *M. galloprovincialis* türünde bir yıllık periyotta CAT, asil-CoA oksidaz ve D-aminoasit oksidaz enzimlerinin aktivitelerini ve peroksizomların yapısını incelemişlerdir. CAT aktivitesi, ilkbahar ayları boyunca Nisan'dan Haziran'a kadar oldukça yüksek görülürken, Temmuz'dan itibaren Şubat ayına kadar düşüktür. Asil-CoA aktivitesi Şubat'tan Mayıs'a kadar oldukça yüksek iken diğer aylarda çok düşüktür. En yüksek D-aminoasit oksidaz aktivitesinin ise Kasım, Şubat ve Mayıs aylarında görüldüğü belirtilmiştir. Çalışma sonunda bu durumun midyelerin beslenmesiyle doğru orantılı olduğu, beslendikleri maddeler değiştiği için enzimatik parametrelerin de değiştiği bildirilmiştir.

Vasseur ve ark. (2000), kirlilik düzeyleri ile antioksidan parametreleri arasındaki ilişkiyi belirleyebilmek amacıyla tatlı su midyesi olan *U. tumidus* ile çalışmışlardır. GSH, selenyum bağımlı glutatyon-S-taransferaz (Se-GST) ile selenyum bağımlı olmayan glutatyon-S-taransferaz (nonSe-GST), LPO ve GR değerleri incelenmiştir. Ağır metal, poliklorid bifenil (PCB), poliaromatik hidrokarbon (PAH) ve organoklorlu pestisit (OCP) miktarı da değerlendirilmiştir. Çalışmada, antioksidan değerlerinin solungaç ve hepatopankreasta paralel olmadığı vurgulanmış ve bunun sebebi olarak da dokuların kirliliğe eşit miktarda maruz kalmadıkları gösterilmiştir.

Lam ve ark. (2001) çalışmalarında, temiz bölgelerden temin edilen Asya yeşil midyelerini (*Perna viridis*) 30 gün boyunca Hong Kong'un kirli olduğunu düşündükleri çeşitli bölgelerine yerleştirmişler ve SOD, CAT, DT diaforaz (DT-d), GPx, GR, GST, GSH, NADPH ve LPO düzeylerini incelemişlerdir. Bunun yanı sıra dokulardaki polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) ve benzo[a]piren (B[a]P) değerleri tesbit edilmiştir. Farklı bölgelere yerleştirilen midyelerdeki PAH ve B[a]P miktarlarının oldukça farklı olduğu; SOD, DT-d ve LPO ile dokulardaki kirlilik arasında bir korelasyon bulunduğu gözlenmiştir. Antioksidan parametreleri kirliliğe paralel biçimde değişmektedir ve kirlilikle en yüksek korelasyon gösteren parametre GSH'dır.

Bebianno ve ark. (2002), 4 ve 21 gün süreyle Ag, Cd, Cu, Hg ve Zn olmak üzere beş farklı ağır metal etkisine bırakılan Pasifik istiridyesi (*Crassostrea gigas*) ve mavi midyede (*M. edulis*) mettallotionein (MT) sentezi ve LPO miktarlarını belirlemeye çalışmışlardır. Araştırma sonunda; 4 günlük Cd ve Hg, 21 günlük Cd, Hg ve Ag maruziyetinin türlerin solungaç dokularında LPO konsantrasyonunu ve metal birikimlerini arttırdığı belirlenmiştir.

Geracitano ve ark. (2002), *Laeonereis acuta* türünde bakırın akut ve kronik etkilerini araştırmışlardır. SOD, CAT, GST ve LPO düzeyleri belirlenen akut (48 saat), kronik (14 gün) uygulama gruplarına ikişer farklı dozda bakır uygulanarak, GST aktivitesinin hem zaman hem de Cu miktarına bağlı olarak azaldığı gözlenmiştir. LPO aktivitesi akut ve yüksek dozda daha fazla çıkmıştır. SOD ve CAT aktivitesi ise kronik uygulamalarda daha yüksek bulunmuştur.

Lionetto ve ark. (2003) tarafından yapılan araştırmada; Salento Yarımadası (İtalya) kıyısında barbun (*Mullus barbatus*) ve Akdeniz midyesinde (*M. galloprovincialis*) asetilkolinesteraz (AChE), CAT ve GPx seviyelerinde kirleticilerin etkisi tesbit edilmiştir. Çalışma sonunda *M. galloprovincialis* türünde AChE düzeyinin endüstriyel aktivite ve liman bölgelerinde azaldığı ve CAT aktivitesi ile belirgin bir ters korelasyon gösterdiği; ancak GPx ile böyle bir ilişkinin olmadığı rapor edilmiştir.

Bebianno ve ark. (2003) çalışmalarında; Portekiz'in güney kıyılarından toplanan kum midyesi (*Ruditapes decussatus*) örneklerinin solungaç ve hepatopankreas dokularında SOD, CAT, GPx, LPO ve MT miktarlarına kirliliğin etkilerini incelenmiştir. Çalışma sonunda; CAT, LPO ve MT seviyelerinde artış gözlenirken, GPx sentezi inhibe olmuştur. Buna göre CAT, GPx aktiviteleri ile LPO ve MT seviyelerinin, çevresel kirliliğin belirlenmesinde kullanılabilir biyoişaretleyiciler olduğu kaydedilmiştir.

Manduzio ve ark. (2004); çalışmalarında, mavi midye (*M. edulis*) örneklerinde SOD, GST, GPx ve GR aktivitelerinin mevsimsel değişimlerini gözlemlemeyi amaçlamıştır. Solungaç ve hepatopankreas dokularındaki aktivite değişimleri karşılaştırıldığında; solungaçlarında SOD aktivitesi hepatopankreasa oranla daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca GST aktivitesinin de solungaçlarda daha yüksek gözlendiği rapor edilmiştir. Oksidatif stresin yüksek olduğu kış aylarında antioksidanların düşük oranda görülmesi dikkat çekmiştir. Bu durum kış aylarında metabolik faaliyetlerin düşük olmasına bağlanmıştır.

Aarab ve ark. (2004); çeşitli hidrokarbonlar, sıvılaştırılmış doğalgaz ve petrol içeren North Sea Oil ve alkilfenol ile karıştırılmış North Sea Oil çözeltilerine maruz bırakılan *M. edulis* türü ile çalışmışlardır. Toksik etkisi olan maddeler midye dokularında vitellogenin benzeri proteinlerin ve fosfoproteinlerin miktarını etkilemiştir. Uygulanan çözeltilerin dozları arttıkça protein sentezinin giderek azaldığı gözlenmiştir.

Bebianno ve ark. (2005); Kuzey Atlantik Midyesi (*Bathymodiolus azoricus)* örneklerinin manto ve solungaç dokularında kirliliğin SOD, CAT, GPx ve LPO düzeylerinde oluşturduğu değişimleri tesbit etmeyi amaçlamışlardır. Sonuçlara göre SOD ve LPO

düzeyleri solungaçlarda daha yüksek iken, GPx ve CAT miktarları manto dokusunda daha yüksek orandadır.

Ivankovic ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışmada; 1999-2001 yılları arasında Doğu Adriyatik Kıyıları ve birkaç nehir ağzından toplanan *M. galloprovincialis* örneklerinde hepatopankreas dokusundaki SOD, CAT, GPx ve LPO konsantrasyonu mevsimsel ve lokaliteye bağlı olarak karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda; LPO ve metal konsantrasyonları üzerinde mevsimsel etkinin bölgesel etkiden daha belirgin olduğu; özellikle kış-ilkbahar döneminde en yüksek seviyeye ulaştığı rapor edilmiştir.

Richardson ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları çalışmada, Asya yeşil midyesi (*Perna viridis*) ve Manila kum midyesi (*Ruditapes philippinarum)* örnekleri Hong Kong'un temiz bir bölgesinden toplanmış ve ardından yine Hong Kong'da kimyasallarca kirletilmiş bir bölgeye taşınmışlardır. 14-28 günlük maruziyet sonrasında midyelerde GST, CAT, GPx ve GSH seviyeleri en yüksek hepatopankreasda ve en az de solungaç dokularında ölçülmüştür. Asya yeşil midyelerinde ise CAT seviyesinin, en yüksek solungaç ve en az hepatopankreas dokularında bulunduğu tesbit edilmiştir.

Saicic ve ark. (2005) çalışmalarında, *M. galloprovincialis* türünün tüm dokularında SOD, CAT, GPx, GR ve GST değerlerine bakılmıştır. SOD, GST ve GPx değerlerinin kış aylarında daha yüksek olduğunu, GR aktivitesinin bahar aylarında daha yüksek gözlendiği rapor edilmiştir. CAT aktivitesinin mevsime bağlı olmadığı, fakat kirlilikle arttığı kaydedilmektedir.

Santovito ve ark. (2005), *M. galloprovincialis* türünde çözünmüş oksijenin (DO) dokularda nasıl bir hasara yol açtığını belirlemek için SOD, CAT ve Se-GPx değerlerine bakmışlardır. Venedik Lagününün (İtalya) farklı miktarlarda çözünmüş oksijen içeren iki bölgesinde yapılan çalışmada, SOD ve GPx aktivitesinin solungaçlarda daha yüksek bulunduğu bildirilmiştir. CAT ise hepatopankreas dokusunda daha aktif olarak gözlenmektedir. Antioksidan enzim aktivitesi, özellikle solungaçlarda, sudaki çözünmüş oksijen ile pozitif korelasyon göstermektedir. Bunun sebebi olarak da; dokunun lokalizasyonu ve fizyolojik rolü göz önünde bulundurulduğunda, ROT varlığında daha gelişmiş bir korunma mekanizması geliştirmiş olacağı öne sürülmektedir.

Lima ve ark. (2007) Portekiz'in kuzeybatı kıyılarındaki petrokimyasal kirliliğin *M. galloprovincialis* türünde biyokimyasal etkisine bakmışlardır. Beş farklı bölgeden toplanan örnekleri solungaç ve hepatopankreas dokularında CAT, SOD, GPx, GR, GST, LPO düzeylerine bakılmıştır. Kirliliğin yoğun olduğu üç bölgede tüm antioksidanlar için anlamlı

farklılıklar bulunmuştur. Ayrıca solungaç dokusunun hepatopankreastan daha çok etkilendiği vurgulanmıştır.

Box ve ark. (2007) çalışmalarında, *M. galloprovincialis* türünün solungaç ve hepatopankreas dokularında farklı kirlilik düzeylerinin CAT, SOD, GPx ve MDA değerlerini nasıl etkilediğini bulabilmeyi amaçlamışlardır. Temiz olduğu bilinen yerlerden toplanan midye örnekleri farklı kirlilik derecesine sahip sekiz ayrı bölgeye yerleştirilmiştir. Antioksidan enzimleri, antropojenik kirliliğin yoğun olduğu bölgelerde bir artış göstermiştir. Solungaçlarda CAT, SOD ve GR değerleri, hepatopankreasta ise GR ve CAT değerleri kirlilik miktarı ile anlamlı olarak artmıştır. Lipid peroksidasyon düzeyini belirlemek için kullanılan MDA değeri anlamlı bir fark göstermemiştir. Çalışmanın sonunda, GR ve CAT antioksidanlarının *M. galloprovincialis* türünün kirlilik düzeyini belirlemede kullanılabileceği bir kez daha öne sürülmüştür.

Valavanidis ve arkadaşlarının (2007) çalışmalarında; Saronikos Körfezinden (Yunanistan) üç kirli ve bir temiz bölgeden *M. galloprovincialis* örnekleri toplanarak SOD, CAT, LPO gibi antioksidan enzim aktivitelerinin mevsimsel değişimi, manto ve solungaç dokularındaki iz metal konsantrasyonuna bağlı olarak üç yıl boyunca izlenmiştir. Kontrol bölgesi ile karşılaştırıldığında SOD aktivitesi kirli bölgelerde en az iki kat artarken, CAT aktivitesi ise iki-üç kat artmıştır. LPO aktivitesi yine kış ve bahar mevsimleri en yüksek olmak koşuluyla iki kat artmış ve kirli alan midyelerinin metal seviyelerinin üç-dört kat fazla olduğu rapor edilmiştir.

Richardson ve ark. (2008), çalışmalarında Asya yeşil midyesinde (*P. viridis*) PAH ve OCP kirliliğinin GSH, GST, SOD, CAT, GPx, GR ve LPO düzeylerine etkisini araştırmayı amaçlamışlardır. Laboratuvar ortamında hazırlanan PAH ve OCP içeren çözeltisine bir, iki, üç ve dört hafta maruz bırakılan midyelerin hepatopankreas dokularında inceleme yapılmıştır. CAT ve GSH miktarının maruziyete bağlı olarak arttığı görülmüştür. SOD ve GPx miktarının ise ikinci haftadan sonra büyük bir değişikliğe uğramadığı görülmüştür.

Bochetti ve ark. (2008), *Tapes philippinarum* ve *M. galloprovincialis* türlerinde mevsimsel değişimin antioksidanlar üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Çalışma kapsamında MT, CAT, GST, GR, GPx ve AChE değerlerine bakılmıştır. Enzimatik antioksidan olan SOD, CAT ve GST düzeylerinde ilkbahar ve yaz aylarında düşük aktivite gözlenmiştir. Çalışmada, mevsimsel değişimin sıcaklıktan ziyade sudaki kirlilik düzeyindeki değişiklikten kaynaklanabileceği öne sürülmüştür.

Solé ve ark. (2009) tarafından yapılan çalışmada Güneybatı İspanya'da kontaminasyondan etkilenen poliket (*Nereis diversicolor)* ve deniz tarağında (*Scrobicularia*

plana), CAT, GST LPO ve AChE miktarları tayin edilmiştir. Çalışma sonunda AChE en hassas enzim olarak, *N. Diversicolor* da bu ekosistemde en güçlü organizma olarak bulunmuştur.

Banni ve ark. (2010) çalışmalarında, *M. galloprovincialis* türünün hepatopankreasında oksidatif stres biyomarkırlarının nikel (Ni) maruziyetinde değişimlerini gözlemeyi amaçlamışlardır. 135 µg/L ve 770 µg/L konsantrasyonlarına 24, 48, 72 ve 96 saat maruz bırakılan örneklerde GST, CAT, LPO ve MT değerlerine bakılmıştır. Ayrıca nörotoksisite biyomarkırı olan AChE değerlerine de bakılmıştır. Biyomarkır değerlerinde zamana ve doza bağlı bir artış görüldüğü rapor edilmiştir.

Campillo ve ark. (2010), İspanya'nın Akdeniz kıyılarında doğal ortamda kirliliğe maruz kalan *M. galloprovincialis* türünde SOD, CAT, GPx, GST antioksidan enzimlerinin yanı sıra LPO ve MT seviyelerindeki değişimlerini gözlemeyi amaçlamışlardır. Çalışmada sıcaklık parametresinin antioksidan düzeyleri üzerinde etkili olduğu vurgulanmıştır. Çalışmanın sonunda, kirliliğin en yoğun olduğu bölgelerde bile zararlı bir etkinin görülmediği belirtilmiştir.

Vidal-Linan ve ark. (2010); *M. galloprovincialis* türünün solungaç ve hepatopankreas dokularında GST, GPx ve CAT aktivitelerini ölçmüşlerdir. Buna göre mevsimsel değişimler sonucunda CAT seviyesinde artış gözlenirken GST ve GPx değerlerinde kontrole oranla anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Kirliliğin yoğun olduğu bölgede GST miktarı artmışken, GPx ve CAT için böyle bir durum söz konusu olmamıştır. Bu çalışmanın sonunda, GST nin uzun süreli kirliliğe maruziyette önemli bir biyoişaretleyici olabileceği vurgulanmıştır.

Fernandez ve ark. (2010), *M. galloprovincialis* türünde ağır metal kirliliğinin SOD, CAT, GPx, LPO ve MT miktarına etkisini araştırmışlardır. 16 istasyondan toplanan örneklerde kirliliğin yoğun olduğu bölgelerde CAT ve GPx miktarlarının arttığı, LPO ve SOD miktarlarının ise azaldığı rapor edilmiştir.

Hannam ve ark. (2010) tarak midyesi (*Pecten maximus*) ile yaptıkları çalışmada, PAH'ların hemolenfteki antioksidan miktarına etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonunda GSH ve LPO miktarının uygulanan PAH dozuna bağlı olarak arttığı, total hemosit sayısının ise dozla orantılı bir şekilde azaldığı belirtilmiştir.

Tsangaris ve ark. (2011) Yunanistan kıyılarındaki kirliliğin *M. galloprovincialis* türünde antioksidan düzeyinde oluşturduğu değişimleri belirlemeyi amaçlamışlardır. 14 istasyondan alınan örneklerde MT, GST, CAT ve AChE düzeylerinin yanısıra PCB, PAH, DDT, Cu, Ni, Fe ve Zn konsantrasyonlarına da bakılmıştır. Enzim aktivitesi artışlarının

kirlilikle doğru orantılı olduğunu rapor eden ekip, antioksidan düzeyi tayininin kirlilik çalışmalarında önemli bir belirteç olduğunu vurgulamışlardır.

Fernández ve ark. (2012) çalışmalarında, İspanya'nın Akdeniz kıyılarından toplanan *M. galloprovincialis* örnekleri üzerinde ağır metallerin, PAH, PCB ve DDT gibi akuatik kirleticilerin etkisini incelemişlerdir. Bu amaçla hepatopankreasta benzo(a)piren hidroksilaz (BPH), DT-diaforaz (DTD), GST, SOD, CAT, GSH-Px, GR, MT ve LPO miktarları ölçülmüştür. Sonuçlar, artan LPO miktarının dokularda organik bileşik ve arsenik miktarı artışına paralel olarak LPO düzeylerinin, Cd toksisitesi arttıkça da MT ve CAT düzeylerinin arttığını göstermektedir.

Cravo ve ark. (2013); Güney Portekiz'in Akdeniz kıyılarından örneklenen *R. decussatus* türünde AChE, GST, MT ve LPO değerlerinin de aralarında bulunduğu birçok parametreyi değerlendirilmişlerdir. Sonuçlara göre; hepatopankreasta MT ve AChE miktarlarında mevsime ve örnekleme yapılan yere göre belirgin bir artış olmadığı, solungaç dokularında ise GST ve MT seviyelerinin mevsimsel ya da bölgesel bir değişim göstermediği ortaya konmuştur.

Nahrgang ve ark. (2013) tarafından, Barents Denizindeki (İzlanda) kirliliği belirlemek üzere İzlanda tarağı (*Chlamys islandica*), Atlantik morinası (*Gadus morhua*) ve mavi midye (*M. edulis*) örneklerinde yıllık CAT, GSH-Px ve GST ve LPO miktarlarındaki, ayrıca toplam oksiradikal yok etme kapasitesi (TOSC), etoksiresorufin-O-deetilaz (EROD) aktivitesi ve lizozomal membran stabilitesindeki değişimler ölçülmüştür. Çalışma sonunda özellikle *M. edulis* ve *C. islandica* türlerinin biyolojik döngü, biyomarkır ifadeleri ve mevsimsel değişimler açısıdan oldukça benzer eğilimler gösterdikleri rapor edilmiştir.

Schmidt ve ark. (2013) çalışmalarında, Galway (İrlanda) bölgesindeki midye türlerinde (*Mytilus* spp.) farklı mevsimlerdeki GST ve LPO düzeyleri ile DNA hasarını ortaya koymayı amaçlamışlardır. Düşük GST seviyesi, yüksek LPO ve DNA hasarı oranlarıyla oksidatif stresin kış mevsiminde en yüksek düzeye ulaştığı gözlenmiştir.

Vidal-Linan ve Bellas (2013), kirli olduğu düşünülen Rio Vigo (İspanya) bölgesinden toplanan *M. galloprovincialis* örneklerinde GST, GPx ve AChE aktivitelerinin solungaç dokusunda, CAT aktivitesinin ise hepatopankreasta yüksek olduğunu göstermişlerdir.

Maisano ve ark. (2013), *M. galloprovincialis* hepatopankreasında GST, sitokrom P450Y1 ve CAT miktarlarındai değişimleri antropojenik kirliliğe maruz kalan Priolo (İtalya) ve referans bölge olarak da Vendicari (İtalya) bölgelerinde araştırmışlar; yüksek konsantrasyonda PAH'a maruz kalan midyelerde GST miktarı ve CAT aktivitesinin arttığını gözlemişlerdir.

Richir ve Gobert (2014) çalışmalarında, 19 farklı ağır metalin *M. gallaprovincialis* türünde boyut, ağırlık ve cinsiyete bağlı biçimde değişebilen dağılımına bakmışlardır. Buna göre Belçika' da bulunan Diane Göletinde yetiştirilen 6-7 cm boyutlarındaki midyelerde Zn, Se, Cd ve Mo hepatopankreasta diğer dokulara göre daha fazla birikmektedir.

Faria ve ark. (2014), Zebra midyesi (*Dreissena polymorpha*) türünde antropojenik kaynaklı kirliliğin SOD, CAD, GSH, GST ve LPO düzeylerine etkisini araştırmışlar ve populasyonun yoğun olduğu bölgelerde enzimatik aktivitelerin yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca SOD, GST ve LPO düzeylerinin kış aylarında daha düşük olduğu kaydedilmiştir.

Machado ve ark. (2014) çalışmalarında, bir tatlı su midyesi türü olan *Lasmigona costata*'ya Ca, Cd, Cu, K, Mg, Na, Ni, Zn ve Pb içeren karışımın uygulanmasıyla solungaç dokusunda hepatopankreasa göre daha yüksek derecede oksidatif hasar oluştuğunu ve en fazla SOD ve CAT aktivitesinin etkilendiğini kaydetmişlerdir.

Jarque ve ark. (2014), *M. galloprovincialis* türünde mevsimsel değişikliğin gen ekspresyon biyomarkırları üzerindeki etkilerinin mevsimlere bağlı olarak değiştiğini rapor etmişlerdir.

Kasiotis ve ark. (2015), PAH ve organoklorlu pestisit (OCP) kirliliğinin *M. galloprovincialis*'de LPO, GST ve EROD aktivasyon düzeylerini artırdığını bildirmişlerdir.

Brooks ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada bakıra maruz bırakılan *M. edulis, M. trossolus* ve *M. galloprovincialis* türlerinde $CuCl_2$ maruziyeti sonucunda GSH aktivitesinin ve mikronukleus frekanslarının türler arasında farklılık gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Cuevas ve ark. (2015) Basque bölgesi (İspanya) kıyılarından topladıkları *M. galloprovincialis* örneklerinde, kirliliğin hepatopankreas hücrelerini gonad hücrelerine oranla daha fazla etkilediğini kaydetmişlerdir. Ayrıca sonbahar ve kış aylarında örneklenen midyelerde daha az doku hasarı gözlendiğini bildiren araştırmacılar, bu durumu güz ve kış dönemlerinde düşen metabolik işlevlere bağlamışlardır.

Görülüğü üzere *M. galloprovincialis*, çeşitli ağır metallerin etkilerinin farklı biçimlerde araştırıldığı pek çok çalışmanın materyali olarak kullanılmıştır. Diğer bazı midye türleri üzerinde yapılan araştırmalarla birlikte değerlendirildiğinde, çeşitli ağır metallerin farklı dokulardaki etkilerinin de farklı olduğu anlaşılmaktadır. Bu etkiler sadece dokulara göre değil, mevsimlere, örnekleme yapılan yere, kirliliğin kaynağına, vb. göre de değişmektedir. Özellikle bazı antioksidan enzim düzeylerinde bu değişimler paralelinde

belirlenen farklılıklar, sucul ortamların besin zinciri ile insana kadar ulaşabilen kirliliğin değerlendirilmesinde çok önemli biyolojik işaretlerdir.

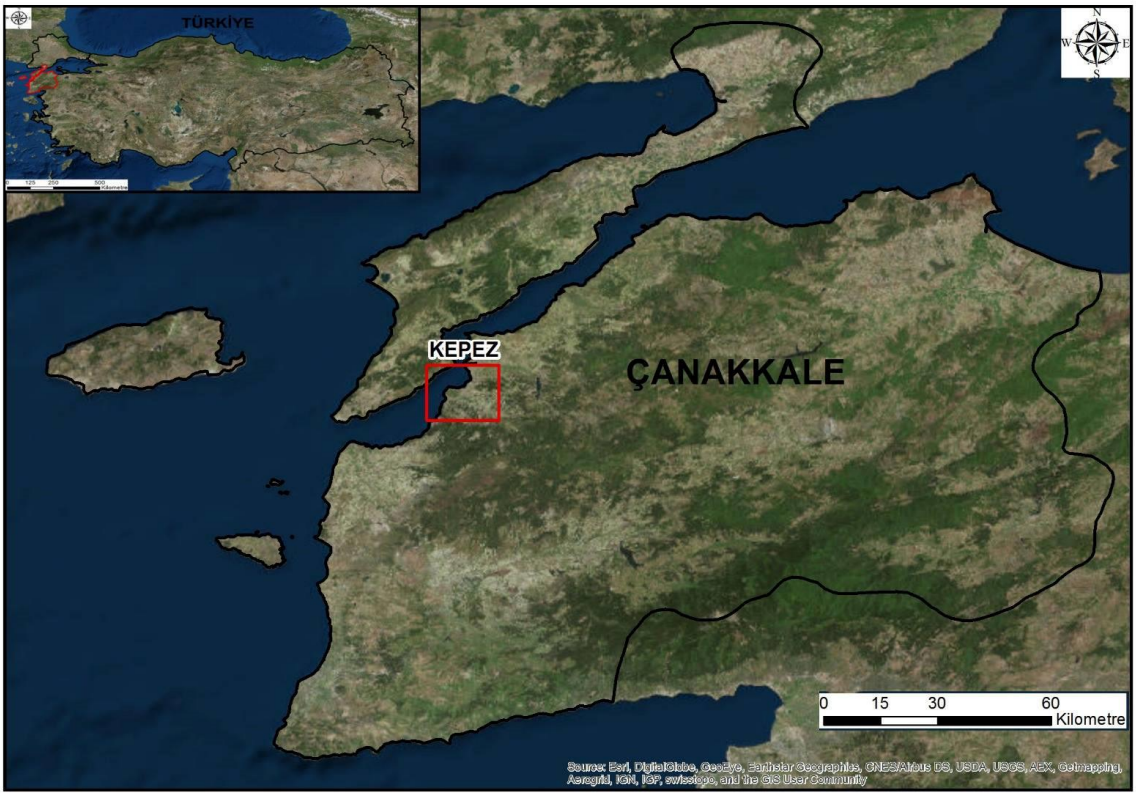
Sunulan tezde, tek istasyonda ölçülen bazı ağır metallerin *M. galloprovincialis* solungaç, hepatopankreas ve kas dokularındaki bazı parametrelere mevsimsel etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Solungaçlar kimyasallara ilk maruziyet yüzeyi olarak öncelikle araştırılması gereken organlardır. Hepatopankreas, zehirsizleştirme işlemlerindeki rolü ve enzim-hormon sentezleme işlevleriyle ekotoksikolojik anlamda büyük ilgi toplayan, karmaşık bir organdır. Karaciğer ve pankreas bileşeni olarak farklı araştırmalarda geniş biçimde değerlendirilmiştir. Kas dokusunun da midyelerin besin olarak kullanımı anlamında mutlaka dikkate alınması gerekmektedir.

BÖLÜM 3
MATERYAL VE METOT

3.1. Kimyasal Maddeler

Nitrik asit (HNO_3), disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), sodyum dihidrojen fosfat ($NaH_2PO_4.2H_2O$), Comassie Briliant Blue G-250, sodyum hidroksit (NaOH), disodyum karbonat (Na_2CO_3), dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4), amonyum sülfat [$(NH_4)_2SO_4$], bakır klorür ($CuCl_2$), potasyum klorür (KCl) ve hidrojen klorür (HCl) Merck & Co. Inc. firmasından; albumin ksantin, ksantin oksidaz, Bovin serum albumin (BSA), Nitro Blue Tetrazolium (NBT), hidrojen peroksit (H_2O_2), 2-tiyobarbitürik (TBA) ve Trikloroasetikasit (TCA) Sigma-Aldrich Co. firmasından temin edildi.

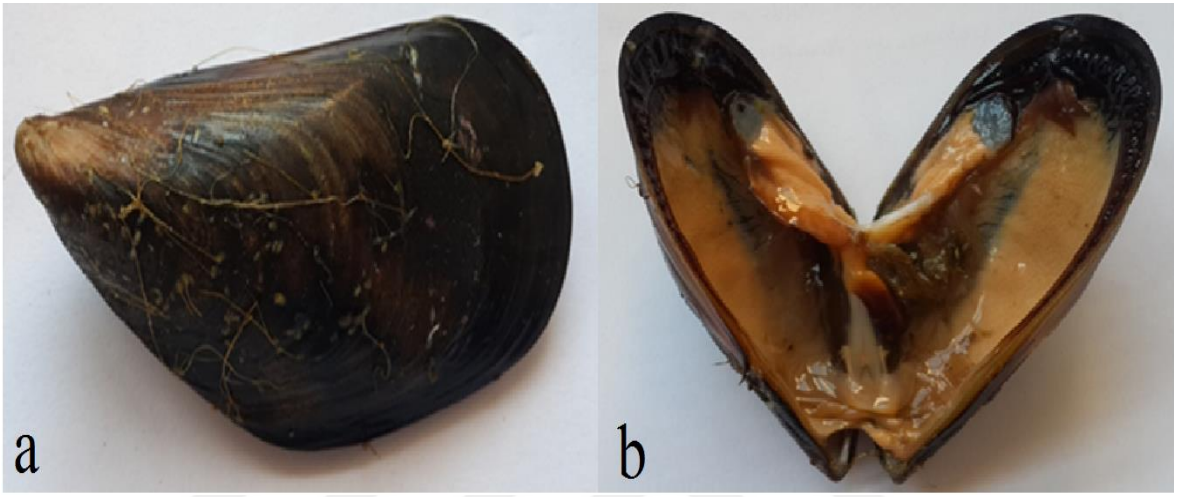
3.2. Örnekleme Aşaması



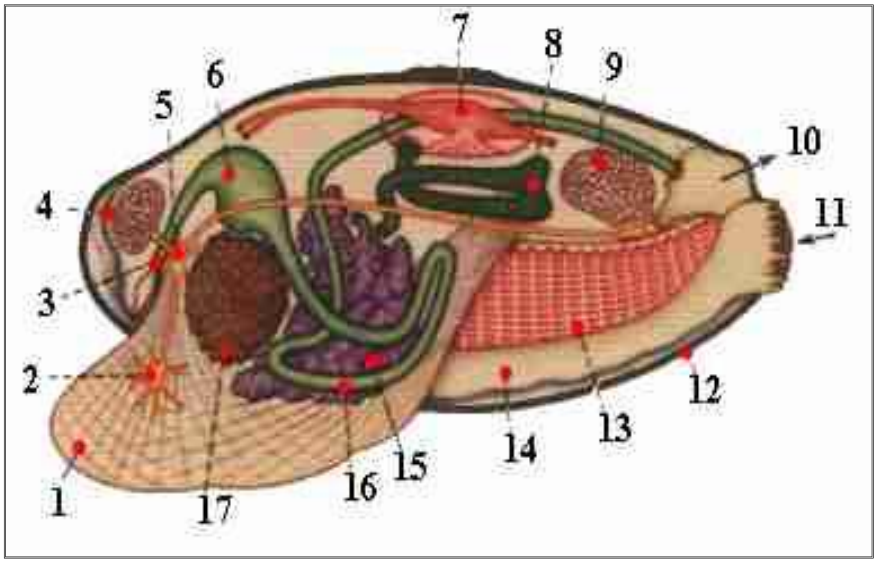
Şekil 3.1. Örneklerin temin edildiği Kepez (Çanakkale) bölgesi

Çalışma ilkbahar ve sonbahar olarak iki mevsimde yapıldı. Belirlenen istasyona ait fiziko-kimyasal parametreler (sıcaklık, pH, spesifik iletkenlik, tuzluluk, çözünmüş oksijen) örnekleme sırasında YSI Multiparameter Prob ile ölçüldü. Her mevsim için toplam 50 adet

Mytilus galloprovicialis toplandı. Laboratuvara getirilen midye örneklerinin ölçümleri yapıldıktan sonra bir pens yardımı ile kabuklar açılıp diseksiyon işlemi gerçekleştirildi. İlkbaharda örneklenen midyelerin boyutları boy 6.3±0.3, en 3.15±0.05, yükseklik 2.53±0.16 ve ağırlıkları 35.41±0.27 olarak belirlendi. Sonbaharda örneklenen midyelerin boy, en, yükseklik ve ağırlık ortalamaları ise; 6,5±0,3, 3,03±0,20, 2,30±0,20 ve 34,78±0,03 şeklindedir.



Şekil 3.2. *Mytilus galloprovincialis* a. dış görünüşü b. iç görünüşü



Şekil 3.3. *Mytilus galloprovincialis*'in genel iç görünümü. 1-Ayak, 2-Sinir sistemi, 3-Ağız, 4-Kaslar, 5-Sinir sistemi, 6-Mide, 7-Kalp, 8-Böbrekler, 9-Kaslar, 10-Su (besin) çıkışı, 11-Su (besin) girişi, 12-Dış kabuk, 13-Solungaç, 14-Yumuşak doku, 15-Yumurtalık, 16-Barsak, 17-Karaciğer (http://www.bluemirrow.com/showthread.php?t=1042).

3.3. Ağır Metal Analizi

İstasyondan iki farklı mevsimde alınan midye örneklerinden çıkartılan solungaç, hepatopankreas ve kas dokularında ağır metal analizleri Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Merkez Laboratuvarında, hizmet alımı yoluyla ve Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) (Perkin Elmer, Optima 8000) cihazı ile yapıldı (Siemer ve ark., 1976). Kalibrasyon eğrisi standart argon (Ar) ana stok çözeltisinden kadmiyum (Cd), bakır (Cu) ve kurşun (Pb) ağır metalleri için 10-1000 ppb konsantrasyonları, çinko (Zn) için 100-10000 ppb ve demir (Fe) ağır metali için de 1000-10000 ppb konsantrasyonları hazırlanarak çizildi.

3.4. Antioksidan Enzim Düzeylerinin Ölçümü

Temel antioksidan enzim düzeylerinin ölçülebilmesi için, solungaç ve hepatopankreas dokularının yanısıra kontrol grubu olarak kas dokusundan homojenat hazırlandı ve sitozolik fraksiyonları elde edildi. Alınan dokular, tartılıp 1:5 oranında homojenizasyon tamponu (0,05 M fosfat tamponu pH 7,4) ile homojenize edildi. Homojenat iki defa 20 dakika boyunca 4°C'de 10000xg'de santrifüjlenerek (Hettich Zentrifugen Micro 22R D-78532), elde edilen süpernatantlar 1:5 oranında fosfat tamponu ile seyreltilip -20°C'de saklandı.

3.4.1. Total Protein (TP) Tayini

Proteinlerin Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasına bağlanması sonucunda meydana gelen renkli çözeltilerin 595 nm'de absorbansının ölçülmesi ilkesine dayanır. Çalışmada TP tayini Bradford (1976) yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi.

3.4.1.1. Gerekli Çözeltilerin Hazırlanışı

Albumin Stok Çözeltisi (%10): 10 mg albumin 80 mL distile suda tamamen çözüldükten sonra hacim 100 mL'ye tamamlandı.

Protein Çalışma Standart Çözeltileri**:** Stok çözeltiden uygun hacimler alınarak %20, %40, %60, %80 ve %100 µg albumin olacak şekilde distile su ile seyreltilerek hazırlandı.

Bradford Reaktifi: Stok çözeltiden kullanıldı.

3.4.1.2. Deneyin Yapılışı

Yedi deney tüpü alınarak örnek, standart 1 (St1), standart 2 (St2), standart 3 (St3), standart 4 (St4), standart 5 (St5) ve kör (K) olmak üzere işaretlendi. Standartlar % 20, %40, %60, %80 ve %100 µg albumin olacak şekilde distile su ile seyreltildi. Çözelti vorteks

yardımıyla karıştırıldıktan sonra üzerine Bradford reaktifi eklendi. Reaktifin proteinlere bağlanabilmesi için oda sıcaklığında 15 dk inkübasyon işlemi yapıldı (Çizelge 3.1.). 15 dk. sonunda spektrofotometrede (T80^{+} UV/VIS Double Beam Spectrometer PG Instruments L.T.D.) 595 nm'de köre karşı absorbanslar kaydedildi.

Çizelge 3.1. Protein tayini standart stok çözeltilerinin hazırlanması

	Kör	St1	St2	St3	St4	St5	Örnek
Albumin (%10mg)	_	40µl	80 µl	120 µl	160 µl	200 µl	_
Distile su	1600 µl	1560 µl	1520 µl	1480 µl	1440 µl	1400 µl	1550 µl
Doku Homojenatı	_	_	_	_	_	_	50µl
Bradford Reaktifi	400 µl	400 µl	400 µl	400 µl	400 µl	400 µl	400 µl

Protein miktarı standart grafiği yardımı ile hesaplandı.

3.4.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi Tayini

Temel prensip olarak SOD aktivitesi; ksantin oksidaz/hipoksantin sistem tarafından üretilen süperoksit radikalinin Nitro Blue tetrazolium'u (NBT) indirgeyerek renk oluşturması ile belirlenir. Üretilen $O_2^{\bullet-}$'nin NBT'yi indirgemesi sonucu 550 nm'de maksimum absorbans veren mavi renkli formazon oluşur. Eğer ortamda enzim bulunmuyorsa bu indirgenme en üst seviyede olacağından, koyu mavi bir renk oluşur. Ortamda SOD bulunuyorsa; enzim süperoksit anyonunu hidrojen peroksite çevirir, NBT indirgenir ve renk değişikliği meydana gelir (Çiğrenmiş, 1997). Çalışma Flöhe ve Ötting (1984) metoduna göre yapıldı.

3.4.2.1. Gerekli Çözeltilerin Hazırlanması:

Sodyum Hidroksit Çözeltisi (0,1 N): 0,4 g NaOH saf suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

Stok Ksantin Çözeltisi (3 mM): 4,6 mg ksantin tartılıp, 1 mL 0,1 N NaOH çözeltisinde hafif ısı uygulaması ile çözülerek saf su ile 10 mL'ye tamamlandı (Çözelti +4 °C'de bir hafta saklanabilir.).

Ksantin Çözeltisi (0,3 mM): Stok ksantin çözeltisinden 1 mL alınarak saf su ile 10 mL'ye tamamlandı (Her deney günü taze olarak hazırlanmalıdır.).

Etilendiamintetraasetik Asit Çözeltisi (0,6 mM): 22,32 mg $Na_2EDTA.2H_2O$ saf suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

Sodyum Karbonat Çözeltisi (400 mM): 4,24 g Na_2CO_3 saf suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

BSA Çözeltisi (1 mg/mL): 10 mg BSA saf su ile çözülerek 10 mL'ye tamamlandı.

Nitroblue Tetrazolium Klorür (NBT) Çözeltisi (0,15 mM): 1,226 mg NBT saf su ile çözülerek 10 mL ye tamamlandı (Her deney günü taze olarak hazırlandı.).

SOD Çalışma Reaktifi: 10 mL 0,3 mM ksantin, 5 mL 0,6 mM Na_2EDTA, 3 mL 400 mM Na_2CO_3, 1,5 mL 1 g/L BSA, 5 mL 0,15 mM NBT karıştırılarak her çalışmada taze olarak hazırlandı.

Amonyum Sülfat Çözeltisi (2 M): 26,428 g $(NH_4)_2SO_4$ saf suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

Ksantin Oksidaz Çözeltisi (167 U/L): 2 mg ksantin oksidaz soğutulmuş $(NH_4)_2SO_4$ çözeltisinde çözülerek 1 mL'ye tamamladı.

Bakır Klorür Çözeltisi (0,8 mM): 13,64 mg $CuCl_2.2H_2O$ saf su ile çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

3.4.2.2. Deneyin Yapılışı

2,85 ml SOD reaktifi örnek ve kör tüpüne aktarıldı. Örnek tüpüne 100 µl süpernatant ilave edildi ve her iki tüpe de 50 µl ksantin oksidaz eklendi. Tüpler 25 ^oC'de 20 dakika ışıkta inkübe edildikten sonra tüplere 100 µl $CuCl_2$ çözeltisi eklendi (Çizelge 3.2.). En son aşama olarak da kör tüpüne 100 µl süpernatant eklenerek örneklerin spektrofotometre cihazında 560 nm'de absorbansı ölçüldü.

Çizelge 3.2. SOD enziminin tayini için gerekli çözeltiler

Çözeltiler	Kör	Örnek
SOD Reaktifi	2,85 ml	2,85 ml
Süpernatant	_	100µl
Ksantin Oksidaz Çöz.(167 U/L)	50 µl	50 µl
$CuCl_2$ Çözeltisi (0,8 mM)	100 µl	100 µl

Kör ve örnek tüplerinin 560 nm'de absorbansları ayrı ayrı ölçülüp SOD aktivitesi tesbit edildi. Spesifik aktivite U/mg protein cinsinden ifade edilecek şekilde hesaplandı.

3.4.3. Katalaz Aktivitesi (CAT) Tayini

Katalaz enzimi; H_2O_2'nin, H_2O'ya dönüşüm tepkimesini katalizler. Bu dönüşüm 240 nm'de absorbansın azalması ile izlenebilir. 1 dk.'da absorbanstaki azalma katalaz aktivitesi ile ilgilidir. Çalışma; Aebi (1984) metodu kullanılarak gerçekleştirildi.

3.4.3.1. Gerekli Çözeltilerin Hazırlanması

Fosfat Tamponu (50 mM) (pH=7,2): 0,762 g KH_2PO_4 ve 2,506 g K_2HPO_4 tartılıp bir miktar saf su ile çözdürülerek pH 7.2ye ayarlandı. Daha sonra hacim 100 mL'ye tamamlandı (Çözelti 2ºC de saklanabilir.).

H_2O_2 Çözeltisi (30 mM)**:** Yoğunluğu d=1,4 g/mL olan % 30 g'lık H_2O_2 çözeltisinden 240 µL alındı ve saf su ile 100 mL'ye seyreltilerek taze olarak hazırlandı.

3.4.3.2. Deneyin Yapılışı

Doku homojenatı fosfat tamponu ile 5 kat seyreltildikten sonra +4 ºC'de 4000xg'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant alındı ve 2:1 oranında fosfat tamponu ile seyreltilip +4 ºC'de 4000xg'de 10 dk santrifüj edildi. Numune ve kör olarak işaretlenmiş 2 ayrı deney tüpü alınarak aşağıdaki gibi çalışıldı (Çizelge 3.3.). 1 dk sonra spektrofotometrede 240 nm'de absorbansları okutularak kaydedildi.

Çizelge 3.3. CAT enzimi tayini için gerekli çözeltiler

Çözeltiler	Örnek	Kör
Fosfat Tamponu	0.9 mL	1.0 mL
H_2O_2 Çözeltisi	2.0 mL	2.0 mL
Süpernatant	0.1 mL	_

Elde edilen absorbans değerleri yapılan seyreltmeler göz önüne alınıp bu deney için belirlenmiş adsorbsiyon katsayısı 0,004 (0,00394) mM/mm kullanılarak U/mg protein dk cinsinden hesaplandı.

3.4.4. Lipid Peroksidaz (LPO) Düzeyi

Temel prensip olarak lipid peroksidasyon analizi; iki mol tiyobarbütirik asit (TBA), asidik ortamda ve 95-100 ºC sıcaklıkta bir mol malondialdehit (MDA) ile birleşerek pembe renkli TBA-MDA kompleksini oluşturduğu takdirde kompleksin verdiği absorbansın 532

nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanır (Camejo ve ark., 1998). Çalışma, Buege ve Aust (1978) yöntemine göre gerçekleştirildi.

3.4.4.1. Gerekli Çözeltilerin Hazırlanması

KCl Çözeltisi (150 mM): 11,1827 g KCl tartılıp saf su ile 1000 mL' ye tamamlandı.

HCl Çözeltisi (0,25 N): % 37' lik HCl' den 20,75 ml alınarak saf su ile 1000 mL' ye tamamlandı.

TBA Çözeltisi: 0,375 g TBA tartılarak 100 ml' lik balon joje içerisine konuldu. Üzerine 15 ml %100' lük TCA ilave edilir, kalan hacim 0,25 N HCl ile tamamlandı. Her tayin öncesi çözelti taze olarak hazırlandı.

3.4.4.2. Deneyin Yapılışı

İki tane deney tüpü alınarak örnek ve kör olmak üzere işaretlendi. Tüplere 1000 µL TBA çözeltisi koyulduktan sonra kör için ayırılan tüpe 500 µL 150 mM KCl çözeltisi ilave edildi. Örnek için işaretlenen tüplere ise 500 µL doku homojenatlarından elde edilen süpernatantlar ilave edildi. Sonra bütün tüpler 20 dk 95 ºC'de su banyosuna bırakıldı. Su banyosundan çıkartılan örnekler oda sıcaklığında soğutuldu. 10 dk 10000xg de santrifüj edildi (Çizelge 3.4.). Üst faz alınarak oluşan rengin absorbansı fotometrik olarak spektrofotometrede 532 nm'de köre karşı okutuldu ve değerler kaydedildi

Çizelge 3.4. MDA miktarı tayini için gerekli çözeltiler

Çözeltiler	Kör	Örnek
KCl Çözeltisi (150 mM)	500 µL	_
TBA Çözeltisi	1000 µL	1000 µL
Süpernatant	_	500 µL

Doku homojenatındaki LPO düzeyleri MDA için belirlenmiş adsorbsiyon kat sayısı ($1,56x10^5$ M^{-1} cm^{-1}) kullanılarak nmol MDA/mg protein cinsinden hesaplandı.

3.5. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS 22 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Dokular arasında karşılaştıma yapabilmek için OneWay ANOVA-Tukey testi, mevsimsel karşılaştırmada ise Paired-t Testi kullanıldı. Deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi, sonuçlar değerlendirilirken $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

BÖLÜM 4
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Çevresel Faktörler

İlkbahar ve sonbahar (2015) dönemlerinde Çanakkale ilinin Kepez kıyılarından alınan deniz suyu örneklerinin fiziko-kimyasal parametreleri ortalama sıcaklık, pH, spesifik iletkenlik (spkond), askıda katı madde miktarı (AKM), tuzluluk ve çözünmüş oksijen (DO) değerleri her iki mevsimde ölçüm yapılarak belirlenmiş ve ortalama değerler Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Kepez deniz suyunun iki farklı mevsimdeki fiziko-kimyasal parametreleri için ortalama değerler

Mevsimler (2015)	Sıcaklık (^oC)	Spesifik İletkenlik (mS/ cm)	AKM (mg L^{-1})	Tuzluluk (‰)	DO (mg L^{-1})	pH
İlkbahar	21,35	35,39	22,93	23,89	9,60	8,05
Sonbahar	18,54	34,73	23,84	22,42	8,09	7,87

Tabloya göre sonbahar mevsiminde düşen su sıcaklığı paralelinde çözünmüş oksijen miktarı da azalmaktadır.

4.1.2. Ağır Metal Analizi

Örneklerin farklı dokularında ölçülen ağır metal değerleri çizelge 4.2.'de izlenmektedir.

Çizelge 4.2. *Mytilus galloprovincialis* örneklerinin solungaç, hepatopankreas ve kas dokularında mevsimlere bağlı olarak ağır metal analiz sonuçları

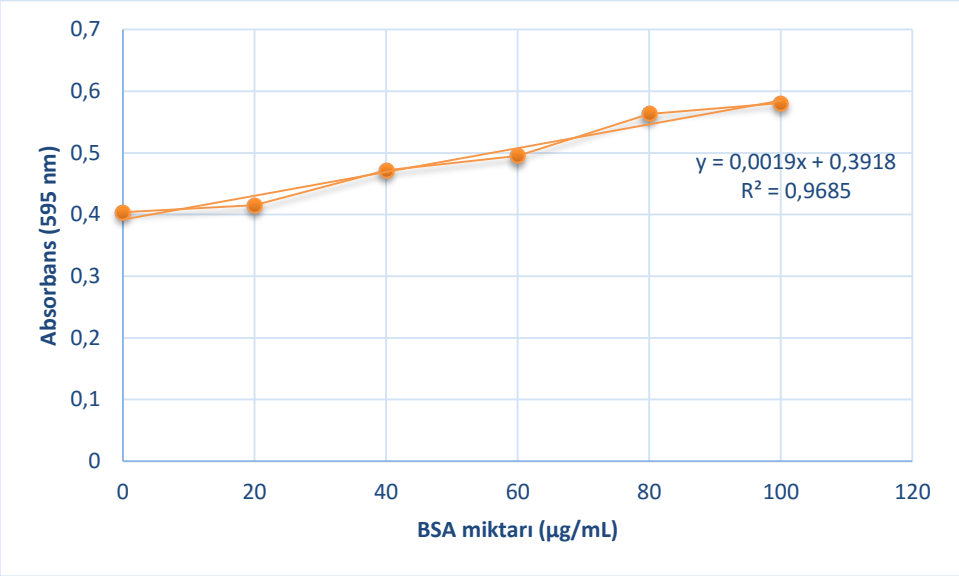
Mevsimler	Dokular (n=10)	Ağır Metaller (mg kg^{-1}yaş ağırlık)				
		Kadmiyum (Cd)	Kurşun (Pb)	Bakır (Cu)	Demir (Fe)	Çinko (Zn)
Kabul Edilebilir Değerler (EFSA, 2015)		1,00	0,50	10,00	48,00	20,00
İlkbahar	Solungaç	0,515	0,226	0,745	43,201	14,513
	Hepatopankreas	0,179	0,135	0,128	18,632	10,497
	Kas	0,114	0,038	0,341	24,039	1,449
Sonbahar	Solungaç	0,451	0,250	0,834	37,887	7,870
	Hepatopankreas	0,170	0,525	0,498	15,375	2,257
	Kas	0,125	0,060	0,411	22,121	1,094

lkbaharda örneklenen midyelerde, kadmiyum en yüksek miktarda solungaç dokusunda saptanırken, en düşük miktarda kas dokusunda bulunmuştur. Kurşun miktarının en yüksek ve en düşük konsantrasyonları ise sırasıyla, solungaç ve kas dokularında tesbit edilmiştir. Bakır, solungaç dokusunda en yüksek, hepatopankreas dokusunda ise en düşük konsantrasyondadır. Demir için en yüksek ve en düşük konsantrasyonların görüldüğü dokular sırasıyla solungaç ve hepatopankreas dokularıdır. Çinko için ise en yüksek değer solungaç dokusunda, en düşük değer kas dokusunda kaydedilmiştir.

Sonbaharda örneklenen midyelerde ise, kadmiyum miktarının en yüksek ve en düşük konsantrasyonları sırasıyla solungaç ve kas dokularında; kurşun için en yüksek konsantrasyon hepatopankreas dokusunda en düşük konsantrasyon da kas dokusunda ölçülmüştür. Bakır, solungaç dokusunda en yüksek miktarda iken kasta en düşük miktardadır. Demir için en yüksek ve en düşük konsantrasyonların görüldüğü dokular sırasıyla solungaç ve hepatopankreas olarak bulunmuştur. Çinko için ise en yüksek konsantrasyon solungaç dokusunda, en düşük konsantrasyon kas dokusunda saptanmıştır. Sonbaharda hepatopankreas dokusunda ölçülen kurşun konsantrasyonu hariç, tüm değerler EFSA (2015) tarafından verilen kabul edilebilir değerlerden düşüktür.

4.1.3. Total Protein (TP) Düzeyindeki Değişimler

Mytilus galloprovincialis dokularında toplam protein miktarını belirleyebilmek için öncelikle BSA çözeltisinden uygun seyreltmeler yapılarak standart grafik hazırlandı. Derişimi bilinen çözeltilere karşılık gelen absorbans değerleri aracılığıyla çizilen standart eğride regresyon eşitliği y = 0,0019x+0,3918 olarak bulunmuştur (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. BSA ile hazırlanan protein standart grafiği

Standart grafiği oluşturulduktan sonra tüm dokulara ait protein miktarları hesaplanmış ve her iki mevsimde örneklenen midye dokularının protein miktarları mg protein/L cinsinden Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. *Mytilus galloprovincialis* türünün farklı dokularındaki protein miktarının mevsimlere göre değişimi (mg protein/L)

Dokular (n=10)	Mevsimler	
	İlkbahar	Sonbahar
Solungaç	20,03±1,80 #	22,92±2,39*#
Hepatopankreas	22,06±3,21*	23,24±3,22*
Kas	20,97±1,62*	19,13±3,26*

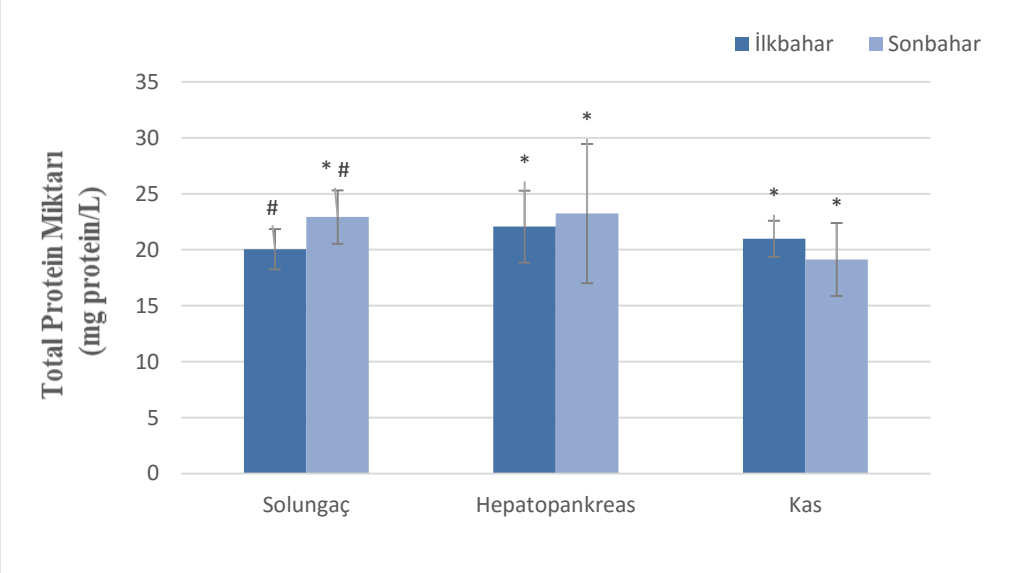
Not 1: Dokular arasındaki anlamlı farklılıklar * işareti ile gösterilmiştir ($p < 0.05$).

Not 2: Mevsimlere göre anlamlı farklılıklar # işareti ile gösterilmiştir ($p < 0.05$).

Görüldüğü üzere ilkbaharda örneklenen dokularda total protein miktarı hepatopankreas > kas > solungaç şeklindedir. Sonbahar örneklerinde ise sıralama hepatopankreas > solungaç > kas olarak belirlenmiştir.

İlkbaharda toplanan midye örneklerinde, hepatopankreas ve kas dokularının protein içerikleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$). Sonbahar örneklerinde ise solungaç ve heptopankreas dokularının protein içerikleri arasındaki fark, kas dokusu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Çizelgede izlendiği üzere protein miktarı solungaç dokusunda sonbahar mevsiminde ilkbahara göre çok belirgin biçimde ve anlamlı olarak artmaktadır. Hepatopankreas dokusunda ise sonbaharda hafif bir artış görülmesine rağmen, aralarındaki fark anlamlı değildir. Kas dokusunda sonbahar mevsiminde ilkbahara oranla bir düşüş görülmüştür, ancak aradaki fark yine anlamlı bulunmamıştır ($p<0.05$). Bu değişim Şekil 4.2.'de ayrıca gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Total protein miktarlarının mevsimlere bağlı olarak değişimi

Not 1: Dokular arasındaki anlamlı farklılıklar * işareti ile gösterilmiştir ($p< 0.05$).

Not 2: Mevsimlere göre anlamlı farklılıklar # işareti ile gösterilmiştir ($p< 0.05$).

4.1.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) Düzeylerindeki Değişimler

Araştırma bölgesinden temin edilen midyelerde kirliliğin solungaç, hepatopankreas ve kas dokularında SOD enzimi aktivitesine olan etkileri SOD spesifik aktivite U/mg protein

cinsinden ifade edilecek şekilde hesaplanmış, elde edilen değerler Çizelge 4.4.'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Mevsimlere bağlı olarak *Mytilus galloprovincialis* türünün farklı dokularında SOD enzimi miktarı (U/mg protein)

Dokular (n=10)	Mevsimler	
	İlkbahar	Sonbahar
Solungaç	11,85±2,01 *#	4,36±0,66*#
Hepatopankreas	6,60±0,58	6,25±1,24*
Kas	14,72±1,64 *#	19,56±2,35 *#

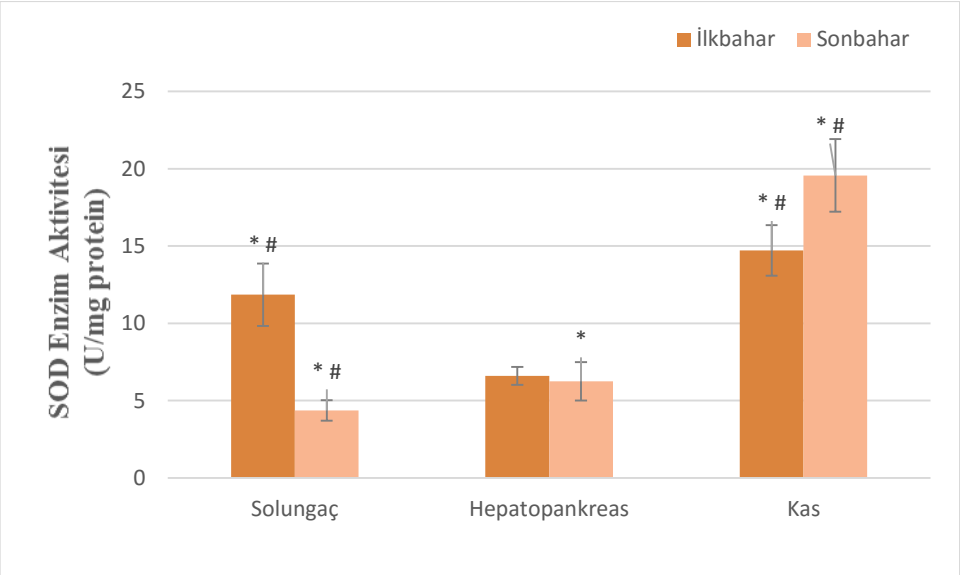
Not 1: Dokular arasındaki anlamlı farklılıklar * işareti ile gösterilmiştir ($p< 0.05$).

Not 2: Mevsimlere göre anlamlı farklılıklar # işareti ile gösterilmiştir ($p< 0.05$).

İlkbaharda örneklenen dokularda SOD miktarı kas > solungaç > hepatopankreas şeklinde sıralanmıştır. Sonbahar örneklerinde ise sıralama kas > hepatopankreas > solungaç olarak belirlenmiştir.

İlkbahar mevsiminde toplanan midye örneklerinin solungaç ve kas dokularında tesbit edilen SOD enzim aktivitesi arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$). Sonbahar örneklerinde ise solungaç ve hepatopankreas dokularındaki aktivite oranı kas dokusundaki ile karşılaştırıldığında anlamlı olduğu görülmektedir ($p<0.05$) (Çizelge 4.4., Şekil 4.3.).

Çizelgede izlendiği üzere protein miktarı solungaç dokusunda sonbahar mevsiminde ilkbahara göre çok belirgin biçimde ve anlamlı olarak düşmektedir. Hepatopankreas dokusunda ise sonbaharda hafif bir düşme görülmesine rağmen, aralarındaki fark anlamlı olarak bulunmamıştır. Kas dokusunda ise belirgin biçimde ve anlamlı olarak artış görülmektedir ($p<0.05$). Bu değişim Şekil 4.2.'de ayrıca gösterilmiştir.



Şekil 4.3. SOD enzim aktivitesinin mevsimlere bağlı olarak değişimi

Not 1: Dokular arasındaki anlamlı farklılıklar * işareti ile gösterilmiştir ($p< 0.05$).

Not 2: Mevsimlere göre anlamlı farklılıklar # işareti ile gösterilmiştir ($p< 0.05$).

4.1.5. Katalaz (CAT) Düzeylerindeki Değişimler

Solungaç, hepatopankreas ve kas dokularında tayin edilen CAT miktarları bu deney için belirlenmiş adsorbsiyon katsayısı 0,004 (0,00394) mM/mm kullanılarak U/mg protein dk cinsinden hesaplanmış ve elde edilen değerler Çizelge 4.5.'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. *Mytilus galloprovincialis* türünün farklı dokularında CAT miktarlarının mevsimlere bağlı olarak değişimi (U/mg protein dk)

Dokular (n=10)	Mevsimler	
	İlkbahar	Sonbahar
Solungaç	53,28±7,57*#	20,18±2,51#
Hepatopankreas	53,13±5,98*#	29,64±4,16 *#
Kas	72,14±9,56 *#	91,78±5,28 *#

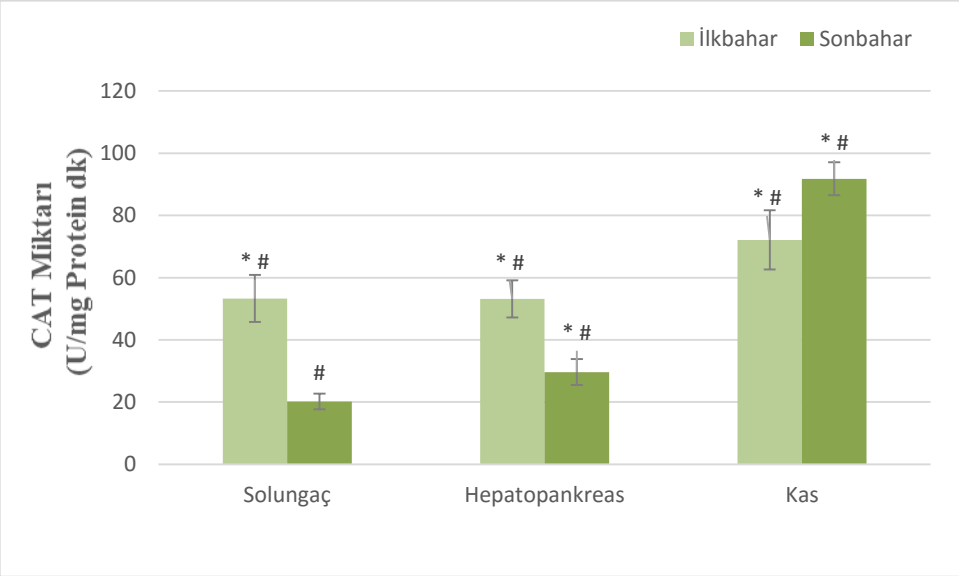
Not 1: Dokular arasındaki anlamlı farklılıklar * işareti ile gösterilmiştir ($p< 0.05$).

Not 2: Mevsimlere göre anlamlı farklılıklar # işareti ile gösterilmiştir ($p< 0.05$).

İlkbaharda örneklenen dokularda CAT miktarı kas > solungaç > hepatopankreas şeklinde sıralanmaktadır. Sonbahar örneklerinde ise sıralama kas > hepatopankreas > solungaç olarak belirlenmiştir.

Dokular arasında istatistiksel olarak karşılaştırma yapıldığında, ilkbahar örneklerinin solungaç ve hepatopankreas dokuları CAT miktarı kas dokusundaki miktardan anlamlı biçimde farklıdır ($p<0.05$). Sonbahar örneklerinin hepatopankreas ve kas dokularına tesbit edilen CAT enzim aktivitesi miktarı arasında da anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$)(Çizelge 4.5., Şekil 4.4.).

Mevsimlere bağlı olarak istatistiksel olarak karşılaştırma yapıldığında ise, ilkbaharda örneklenen midyelerin solungaç ve hepatopankreas dokularında tesbit edilen CAT miktarı belirgin şekilde ve anlamlı olarak düşüş göstermiştir, kas dokusunda ise anlamlı bir artış görülmüştür ($p<0.05$)(Çizelge 4.5., Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. CAT miktarının mevsimlere bağlı olarak değişimi

Not 1: Dokular arasındaki anlamlı farklılıklar * işareti ile gösterilmiştir ($p< 0.05$).

Not 2: Mevsimlere göre anlamlı farklılıklar # işareti ile gösterilmiştir ($p< 0.05$).

4.1.6. Lipit Peroksidaz (LPO) Düzeylerindeki Değişimler

Midyelerin solungaç, hepatopankreas ve kas dokularındaki LPO miktarları malondialdehit (MDA) için belirlenen adsorbsiyon kat sayısı ($1.56.10^5$ M^{-1} cm^{-1}) kullanılarak nmol MDA/ mg protein cinsinden hesaplanmış ve elde edilen değerler Çizelge 4.6.'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. *Mytilus galloprovincialis* türünün farklı dokularında mevsimlere bağlı olarak LPO düzeylerinin değişimi (nmol MDA/ mg protein)

Dokular (n=10)	Mevsimler	
	İlkbahar	Sonbahar
Solungaç	1,55±0,21	1,37±0,17 *
Hepatopankreas	3,42±0,79 *	4,08±0,20 *
Kas	4,34±0,16 *#	3,10±0,29 *#

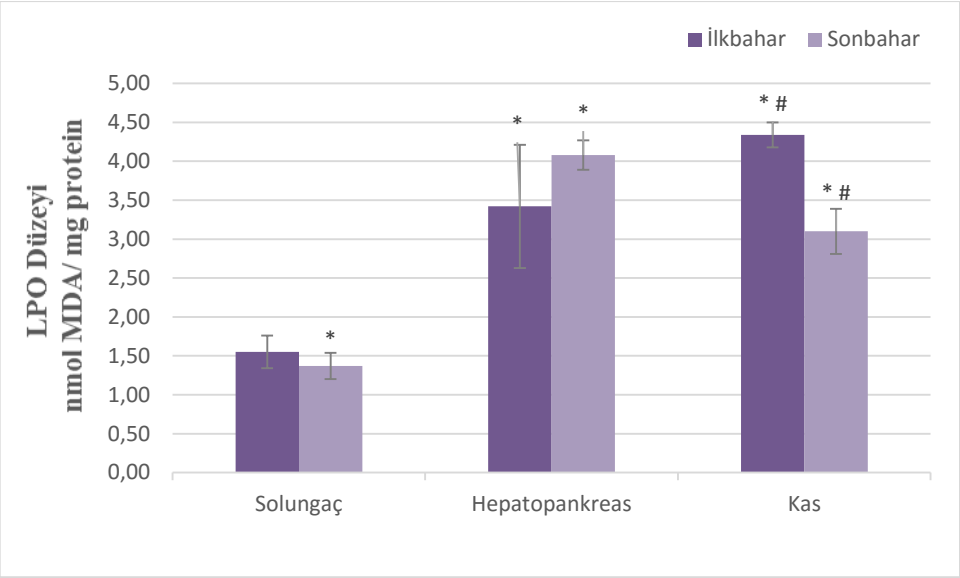
Not 1: Dokular arasındaki anlamlı farklılıklar * işareti ile gösterilmiştir ($p< 0.05$).

Not 2: Mevsimlere göre anlamlı farklılıklar # işareti ile gösterilmiştir ($p< 0.05$).

Çizelgeye göre ilkbaharda örneklenen dokularda LPO düzeyi kas > hepatopankreas > solungaç şeklinde sıralanmıştır. Sonbahar örneklerinde ise sıralaması hepatopankreas > kas > solungaç olarak belirlenmiştir.

Dokular arasında istatistiksel olarak karşılaştırma yapıldığında, ilkbaharda örneklenen midyelerin hepatopankreas dokusu ile kas dokusu arasında anlamlı bir farklılık olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Sonbahar örneklerinde ise solungaç ve hepatopankreas dokularındaki LPO düzeyi kas dokusundaki ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark olduğu görülmektedir ($p<0.05$) (Çizelge 4.6., Şekil 4.5.).

Mevsimlere bağlı olarak istatistiksel olarak karşılaştırma yapıldığında ise, sonbahar mevsiminde örneklenen kas dokularında LPO miktarının ilkbahara oranla anlamlı bir düşüş gösterdiği tesbit edilmiştir ($p<0.05$) (Çizelge 4.6., Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. LPO düzeyinin mevsimlere bağlı olarak değişimi

Not 1: Dokular arasındaki anlamlı farklılıklar * işareti ile gösterilmiştir ($p < 0.05$).

Not 2: Mevsimlere göre anlamlı farklılıklar # işareti ile gösterilmiştir ($p < 0.05$).

4.2. Tartışma

4.2.1. Fiziko-kimyasal Parametrelerdeki Değişim

İlkbahar ve sonbahar mevsimleri arasındaki fiziko-kimyasal parametreler karşılaştırıldığında, spesifik iletkenlik (spkond), AKM, tuzluluk ve pH oranlarında kayda değer bir fark görülmemiştir. Çözünmüş oksijen miktarı ise ilkbahar mevsiminde oldukça yüksek iken, sıcaklığın düştüğü sonbahar mevsiminde düşüş göstermiştir (Çizelge 4.1.).

4.2.2. Ağır Metal Miktarlarındaki Değişim

Dokularda biriken ağır metaller mevsimsel olarak karşılaştırıldığında, ilkbaharda örneklenen midyelerin solungaç ve hepatopankreas dokularında Cd, Fe ve Zn miktarlarının sonbahar örneklerinden yüksek olduğu anlaşılmıştır. Buna karşın Pb ve Cu değerleri ise sonbahar mevsiminde daha yüksek oranda tesbit edilmiştir. Kas dokusunda ise Cd, Pb ve Cu konsantrasyonları sonbahar örneklerinde daha yüksek görülürken, Fe ve Zn miktarlarında azalma görülmüştür (Çizelge 4.2.).

Bu veriler uzantısında ve Çizelge 1.1.'deki değerlere göre, Kepez kıyılarından toplanan *Mytilus galloprovincialis* örneklerinin solungaç ve kas dokularındaki ağır metal miktarlarının kabul edilebilir değerlerin altında olduğu sonucuna varılmıştır. Hepatopankreas dokusunda ise, sonbaharda örneklenen midyelerdeki Pb konsantrasyonu kabul edilebilir değerlerin üzerinde bulunmuştur.

Mevcut raporlarda ağır metal konsantrasyonlarının mevsime ve lokaliteye bağlı olarak değişim gösterdiği ifade edilmektedir (Richir ve Gobert 2014; Bongiorno ve ark., 2014). Sucul omurgasızlar metalleri yaşadıkları ortamdan ya da besinlerden alırlar. Yapılan biyoakümülasyon çalışmalarında metallerin denizlerde daha çok sedimente gözlemlendiği, bu sebeple dipte yaşayan organizmalarda, özellikle deniz çayırı ve midyelerde birikim miktarlarının fazla olduğu görülmüştür (Regoli ve Principato, 1995; Lionetto ve ark., 2003; Box ve ark., 2007).

Canlı bünyesine giriş yapan ağır metal iyonları her doku ve organda farklı miktarlarda birikmektedir (Moore ve Rainbow, 1987; Rainbow ve ark., 1993; Rainbow, 1998). Küçüksezgin ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada, Çanakkale ilini de içine alan Ege Denizi kıyılarından toplanan midyelerde ağır metal ve organik bileşik miktarlarını belirlemişlerdir. Buna göre dokuz bölgede alınan örneklerde Hg, Cd, Pb, Cu, Zn, Mn, Cl ağır metallerinden Zn, tüm bölgeler için kabul edilebilir değerlerin üzerinde bulunmuştur. Sunulan çalışmada ise ele alınn metaller, Zn dahil olmak üzere kabul edilebilir değerlerde (EFSA, 2015) bulunmuştur. Ayrıca Özden (2013), yaptığı tez çalışmasında Gelibolu Yarımadası ve Saroz

Körfezi kıyılarındaki dokuz istasyondan toplanan *M. galloprovincialis* örneklerinde Pb, Cu, Zn ve Fe değerlerini araştırmış ve kirliliğin bu bölgelerde tehlikeli boyutta olmadığı sonucuna varmıştır. Sunulan tez çalışmasında da bu sonuca uygun değerler belirlenmiştir.

Richir ve Gobert (2014), ondokuz ağır metalin *M. gallaprovincialis* türünde boyut, ağırlık ve cinsiyet üzerindeki etkilerinin yanısıra bu metallerin dokulardaki dağılımı incelenmiştir. Buna göre Belçika' da bulunan Diane göletinde halat sisteminde yetiştirilen midyelerde Zn, Se, Cd ve Mo elementlerinin solungaçta diğer dokulara göre daha fazla biriktiği belirtilmiştir. Bu çalışma sunulan araştırmanın solungaç dokusuna ilişkin sonuçlarıyla uyum göstermektedir. Bongiorno ve ark. (2014) ise Trieste Körfezi (İtalya) kıyılarında yetişen *M. galloprovincialis* türü ile yaptıkları çalışmada; Cr, Mn, Cu, Fe ve Zn içeriklerini ilkbaharda alınan örneklerde daha yoğun olduğunu belirterek bu durumu ilkbahardaki üreme dönemi ile açıklamışlardır. Bongiorno ve arkadaşlarının elde ettikleri sonuçlar bizim verilerimizle uyum sağlamaktadır.

Özden (2005), Çanakkale Boğazı'nın farklı (Kumkale, Yapıldak altı, Çardak Dalyanı, Hamzakoy, Kilya Koyu, Abide, Seyit Onbaşı, Dardanos ve Yeni Kordon) istasyonlarında yaptığı çalışmada *Mytilus galloprovincialis*'in yumuşak dokusunda ağır metal içeriklerinin mevsimsel değişimlerini incelemiştir. Ağır metal düzeyleri arasında gerek mevsimsel, gerekse istasyonlara göre faklılıklar saptanmıştır. Yapıldak altı istasyonundaki ortalama metal değerleri Zn 16,5 µg/g, Fe 10,2 µg/g, Cu 0,4 µg/g, Cd 0,036 µg/g, Pb 0,397 µg/g (yaş ağırlık) olarak belirlenmiştir.

4.2.3 Antioksidan Enzim Aktivitesi ve Total Protein Miktarlarındaki Değişim

Canlı bünyesinde birçok metabolik olaya katılan ağır metallerden fizyolojik öneme sahip olanlar depolanmakta, kalanları ise atılmaktadır. Bu metallerden toksik olanları bazı enzimleri inhibe edebilirler (Yazkan ve ark., 2004). Antioksidan enzim aktiviteleri ve LPO düzeylerinin ölçülmesi akuatik toksikoloji çalışmalarında sıklıkla tercih edilen yöntemlerdendir. Antioksidan enzim ve LPO miktarlarının artışı oksidatif stres artışının hassas bir göstergesidir (Oruç ve ark., 2004).

Kepez kıyılarından örneklenen midye dokularında total protein (TP) miktarı ilkbaharda sonbahara oranla düşük bulunmuştur. İstatistiksel olarak dokular arasında karşılaştırma yapıldığında, en yüksek TP miktarı hepatopankreas dokusunda bulunmuştur ($p<0,05$). Mevsimsel olarak karşılaştırma yapıldığında ise solungaç dokusunda iki mevsim arasında anlamlı bir fark bulunurken ($p<0.05$), kas ve hepatopankreas dokularındaki TP miktarında mevsimlere göre anlamlı bir fark görülmemiştir (Çizelge 4.3., Şekil 4.2.).

Oksijenli solunum yapan her canlı sürekli olarak süperoksit radikali, hidroksil radikalleri ve H_2O_2 gibi reaktif oksijen türlerini (ROT) üretir. Toksik kirleticilere maruz kalan organizmalarda eksojen ve endojen kaynaklı ROT'lar arasında bir dengesizlik oluşarak, oksidatif hasara ya da antioksidan savunma sistemlerinde zayıflamaya sebep olabilir (Valavanidis ve ark., 2007). SOD, CAT gibi enzimatik antioksidanları içeren savunma sistemleri de, oluşabilecek ROT hasarlarını azaltacak yönde çalışır (Van der Oost ve ark., 2003). Oksijenli solunum yapan diğer tüm canlılar gibi midyeler de, yüksek ROT seviyelerini indirgeyebilmek için antioksidan savunma sistemlerini kullanırlar (Craig ve ark., 2007).

Çalışma sonunda elde ettiğimiz verilere göre SOD aktivitesi solungaç dokusunda ilkbaharda sonbahara oranla belirgin biçimde ve anlamlı olarak yüksek bulunmuştur, hepatopankreas dokusunda önemli bir değişiklik yoktur. Kas dokusunda ise sonbaharda ilkbahara oranla anlamlı bir artış gözlenmektedir ($p<0.05$)(Çizelge 4.4., Şekil 4.3.).

Antioksidan enzimlerin aktivitesi, toksik bileşiklere maruz kalma süresi ve bu maddelerin derişiminin yanı sıra, türlerin hassasiyetine bağlı olarak da artış veya azalma gösterebilir (Aslan, 2010). Ortamda bulunan ağır metallerin hepatopankreas dokusunda tesbit edilen SOD aktivitesinde değişikliğe yol açmaması, maruz kalınan derişimin enzim aktivitesini etkileyebilecek düzeyde olmamasına bağlanabilir (Aslan, 2010). Toksik maddelerin antioksidan aktivitede artışa yol açması genel bir kural değildir (Oruç ve Usta, 2007). Çalışmada elde edilen veriler doğrultusunda solungaç dokusunda gözlenen anlamlı düşüş, artan Pb ve Cu ağır metalleri ile tetiklenmiş veya organizma için gerekli olan Fe ve Zn metallerinin düşmesi de oksidatif strese yol açmış olabilir (Çizelge 4.2.).

Hem ağır metal konsantrasyonları, hem de fiziko-kimyasal parametrelerdeki değişimler, enzimlerin aktivitelerini mevsimlere göre etkilemektedir. Örneğin; Santovito ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları çalışmada, *M. galloprovincialis* türünde çözünmüş oksijenin dokularda nasıl bir hasara yol açtığını belirlemek için SOD enzim aktivitesine bakmışlardır. Buna göre Venedik Lagününün (İtalya) farklı çözünmüş oksijene sahip olduğu bilinen iki bölgesinde SOD aktivitesininin solungaçlarda daha yüksek bulunduğu bildirilmiştir. Antioksidan enzim aktivitesi özellikle solungaçlarda, sudaki çözünmüş oksijen ile korelasyon göstermektedir. Buna göre dokunun lokalizasyonu ve fizyolojik rolü uzantısında, ROT oluşumuna karşı daha gelişmiş bir korunma mekanizması geliştirmiş olacağı öne sürülmektedir.

Mevcut çalışmada, en yüksek SOD aktivitesi kas dokusunda gözlenmiştir, aynı zamanda sonbahar mevsiminde anlamlı bir artış da görülmüştür (Çizelge 4.4.). Diğer

dokuların aksine Cd konsantrasyonunun bu dokudaki artışı enzim aktivitesinin artmasını etkilemiş olabilir. Ayrıca Pb ve Cu miktarlarındaki düşüş, Fe ve Zn miktarlarındaki artış da SOD enzim aktivitesini etkileyebilir.

M. galloprovincialis hepatopankreas dokusunda bakıroksit (CuO) nanopartiküllerinin toksik etkilerini araştıran Gomes ve ark. (2012); 0, 3, 7 ve 15 gün CuO nanopartikülleriyle muamele edilen midyelerde SOD enzim aktivitesini ölçmüşlerdir. Sonuçlar, SOD aktivitesinin ilk 7 gün artarken daha sonra sabitlendiğini ortaya koymaktadır. Enzim aktivitesinin maruziyet süresi boyunca değiştiğini gösteren bu çalışmada, uzun müddet aynı toksik maddeye maruz kalan örneklerin savunma sistemlerinin bir noktadan sonra inhibe olduğu ya da kontrol gruplarıyla aynı davranışlar sergilediği vurgulanmıştır.

Farklı bir tür olan Kuzey Atlantik midyesi (*Bathymodiolus azoricus)* ile çalışan Bebianno ve ark. (2005), manto ve solungaç dokularındaki kirliliğin SOD miktarındaki değişimleri nasıl etkilediğini araştırmışlardır. Buna göre SOD, solungaçlarda daha yüksek oranda bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda kullanılan Akdeniz midyesi ile Kuzey Atlantik midyesi arasındaki benzerlik, organizmaların toksik maddeye gösterdikleri savunma mekanizmasının aynı olabileceğinin bir göstergesidir.

Solungaç, hepatopankreas ve kas dokularındaki CAT miktarı hakkındaki verilerimiz değerlendirildiğinde, hepatopankreas ve solungaç dokularında sonbahar mevsiminde ilkbahara oranla anlamlı bir düşüş görülürken, kas dokusunda ise artış söz konusudur. Dokulara bağlı olarak yapılan istatistiksel karşılaştırmada ise, ilkbaharda örneklenen midyelerin solungaç ve hepatopankreas dokuları ile kas dokusu arasında; sonbaharda toplanan örneklerin ise hepatopankreas ve kas dokuları arasında anlamlı farklılıklar tesbit edilmiştir ($p<0.05$)(Çizelge 4.5., Şekil 4.4.). Solungaç ve hepatopankreasta CAT aktivitesinin ilkbaharda daha yüksek çıktığı, başka çalışmalarda da ortaya konmuştur (Viarengo ve ark., 1991; Cancio ve ark., 1999; Santovito ve ark., 2005; Valavanidis ve ark., 2007).

Sunulan çalışmada solungaç ve hepatopankreasta anlamlı olarak izlenen değişimler mevcut raporlara uygundur. Cancio ve ark. (1999), *M. galloprovincialis* türünde bir yıllık periyotta CAT enzimi aktivitelerini ve peroksizomların yapısını incelemişlerdir. Buna göre CAT aktivitesi ilkbahar ayları boyunca Nisandan Hazirana kadar oldukça yüksek görülürken, Temmuzdan itibaren Şubat ayına kadar düşüktür. Çalışma sonunda bu durumun midyelerin beslenmesiyle doğru orantılı olduğu, besin maddelerinin mevsime göre değişmesiyle kimyasal parametrelerin değiştiği kaydedilmiştir. Viarengo ve ark. (1991)da SOD, CAT ve glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitelerindeki mevsimsel değişimleri,

midyelerin (*Mytilus* sp.) hepatopankreas dokusunda incelemişlerdir. Bu çalışmaya göre CAT sonbahardan kışa kadar düşerken, ilkbaharda aniden yükselmiş ve Mayıs ayında maksimum düzeye erişmiştir. Çalışma sonunda, antioksidan savunma sisteminin kış boyunca azalmasının artan oksidatif stres ile doğrudan ilgili olduğu bulunmuştur. Valavanidis ve arkadaşlarının (2007) çalışmalarında; Saronikos Körfezinde (Yunanistan) üç kirli ve bir temiz bölgeden örneklenen Akdeniz midyelerinde SOD, CAT, LPO gibi antioksidan enzim aktivitelerinin mevsimsel değişimi, manto ve solungaç dokularındaki iz metal konsantrasyonuna bağlı olarak üç yıl boyunca izlenmiştir. Kontrol bölgesinden toplanan örneklerle karşılaştırıldığında CAT aktivitesi kirli bölgelerden toplanan örneklerde en az iki-üç kat artmıştır.

Gümüş nanopartiküllerinin *M. galloprovincialis* türünde SOD, CAT, GPx, LPO ve MT miktarlarına etkisi hakkındaki bir çalışmada (Gomes ve ark., 2014) nanopartiküllerin solungaç ve hepatopankreasta farklı etkiler gösterdiği kaydedilmiştir. SOD, CAT ve GPx'in hepatopankreas dokusunda daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Vidal-Linan ve Bellas (2013) yaptıkları çalışmada, kirli olduğu düşünülen Rio Vigo (İspanya) bölgesinden alınan *M. galloprovincialis* türünü kullanmışlardır. Çalışmanın amacı CAT, GPx, GST ve asetilkolinesteraz (AChE) değerlerinin hangi dokularda aktivite gösterdiğini ve en az hangi miktarda enzim aktivitesinin belirlenebildiğini tesbit etmektir. Çalışma sonunda, CAT enziminin hepatopankreasta yüksek aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Santovito ve ark. (2005), *M. galloprovincialis* türünde çözünmüş oksijenin dokularda nasıl bir hasara yol açtığını belirlemek için SOD, CAT ve Se-GPx değerlerine baktıkları çalışmada, Venedik Lagününün (İtalya) farklı çözünmüş oksijene sahip olduğu bilinen iki bölgesinde yapılan örneklemelerde CAT miktarını, hepatopankreas dokusunda daha yüksek olarak gözlemişlerdir. Bunun sebebi olarak aynen SOD için vurgulandığı üzere, dokunun lokalizasyonu ve fizyolojik rolü ile bağlantılı, daha gelişmiş bir korunma mekanizması bulunabileceği öne sürülmektedir (Çizelge 4.5.). Sunulan çalışmada ise CAT enzim aktivitesinin kas dokusunda çok daha yüksek değerlerde olduğu görülmektedir. Bu durumda artan Cd, Pb ve Cu konsantrasyonunun yanısıra organizma için gerekli olan Fe ve Zn metallerinin konsantrasyonlarının azaldığı düşünülebilinir (Çizelge 4.2.).

Ağır metaller, organizmalardaki biyotransformasyonları sırasında O_2^- gruplarını oluşturarak hücre membranındaki fosfolipidlere ve hücreye zarar verirler (Altuntaş ve ark., 2003; Mercan, 2004). Oluşan LPO bileşenleri hücre membranlarındaki iyon alışverişini

etkileyerek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına, ayrıca iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimine yol açar (Hagihara ve ark., 1984).

Lipid peroksidasyonunu başlatan serbest radikallerin meydana gelişinde bazı metallerin önemli rolü olduğu düşünülmekte; bu nedenle deneysel sistemlerde genellikle demir veya bakır tuzları kullanılmaktadır. Çeşitli vücut sıvılarından elde edilen, proteine bağlı olmayan demirin lipid peroksidasyonu başlatabileceği öne sürülmektedir (Aslan, 2010).

Sunulan çalışmadan sağlanan veriler değerlendirildiğinde, ilkbaharda örneklenen midyelerin kas dokusunda sonbahara oranla LPO miktarlarında anlamlı bir düşüş görülmüştür. Bu durumun düşen Fe konsantrasyonu ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Hepatopankreas dokusundaki artış ve solungaç dokusundaki düşüş ise istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmemiştir. Dokular arasında karşılaştırma yapıldığında, ilkbahar örneklerinin hepatopankreas ve kas dokularında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilirken ($p<0.05$), solungaç dokusunda anlamlı bir fark görülmemiştir. Sonbahar örneklerinde ise solungaç ve hepatopankreas dokuları ile kas dokusu karşılaştırıldığında anlamlı farklılık tesbit edilmiştir ($p<0.05$) (Çizelge 4.6., Şekil 4.5.).

Dokularda biriken ağır metal miktarları göz önünde bulundurulduğunda hepatopankreas dokusunda sonbahar aylarında artan ağır metal miktarı LPO düzeyi ile doğru orantılı bir ilişki göstermiştir. Saronikos Körfezinden (Yunanistan) örneklenen Akdeniz midyelerini farklı kirlilik seviyelerine sahip bölgelerden toplayarak yapılan çalışmada, LPO aktivitesinin kirlilik seviyesine bağlı olarak sonbahar kış mevsimlerinde en yüksek düzeyde olduğu belirtilmiştir (Valavanidis ve ark., 2007). Bu sonuçlar sunulan tez çalışmasının sonuçlarıyla uyuşmamaktadır. Mevcut çalışmada elde edilen verilerde solungaç ve kas dokusunda tesbit edilen LPO düzeyi azalırken, hepatopankreas dokusunda artmaktadır. Bu durumun hepatopankreas dokusunun fizyolojik öneminden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bebianno ve ark. (2005) ise, Kuzey Atlantik midyesi (*B. azoricus*) türünün hepatopankreas, manto ve solungaç dokularında kirliliğin LPO düzeyinde oluşturduğu değişimleri tesbit etmişlerdir. Buna göre LPO düzeyinin hepatopankreasta daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Faria ve ark. (2014) tarafından onbir istasyondan toplanan Zebra midyesi (*D. polimorpha*) örneklerinde antropojenik kaynaklı kirliliğin etkileri araştırılmış, LPO düzeyinin kış aylarında daha düşük olduğu kaydedilmiştir. Sunulan tezin sonuçları bu verilere de uygundur. Kış döneminde stres belirteci olan moleküllerin daha az düzeyde olması detoksifikasyon mekanizmalarının bu dönemde daha pasif çalıştığının bir göstergesidir (Aslan, 2010).

Bochetti ve ark. (2008), *T. philippinarum* ve *M. galloprovincialis* türlerinde mevsimsel değişimin antioksidanlar üzerindeki etkisini incelemişler ve SOD, CAT ve GST aktivitelerinin ilkbahar ve yaz aylarında düştüğünü belirlemişlerdir. Çalışmada, mevsimsel değişimin sıcaklıktan ziyade sudaki kirlilik düzeyindeki değişiklikten kaynaklanabileceği öne sürülmüştür. Diğer çalışmada (Vasseur ve ark., 2000) tatlı su midyesi olan *U. tumidus* türünde GSH, selenyum bağımlı glutatyon-S-transferaz (Se-GST), selenyum bağımlı olmayan glutatyon-S-transferaz (nonSe-GST) ile LPO ve GR değerlerine bakılmıştır. Bu araştırmaya göre, solungaç ve hepatopankreasta antioksidan düzeyleri farklıdır ve bu farklılık, söz konusu organların kirliliğe eşit miktarda maruz kalmamalarından kaynaklanmaktadır.

Basque koyu kıyılarından toplanan *M. galloprovincialis* örneklerinde hepatopankreas hücrelerinin gonad hücrelerine oranla daha fazla etkilendiği histopatolojik olarak da rapor edilmiştir (Cuevas ve ark., 2015). Bu çalışmada sonbahar ve kış aylarında örneklenen midyelerde daha az hasar güz ve kış dönemlerinde canlının metabolik faaliyetlerinin düşük olmasından kaynaklandığı ileri sürülmüştür

Sonuç olarak, sunulan tez çalışmasının bulguları geçmiş yıllarda farklı bölgelerde ve farklı türlerle denenen birçok çalışma ile genel anlamda korelasyon göstermiştir. Besin olarak kullanılan *M. galloprovincialis* örneklerinde ağır metal düzeylerinin kabul edilebilir değerlerden düşük çıkması olumlu bir durumdur.

Enzim aktivasyonları ile sucul kirlilik arasındaki bağlantıların gerçekten kullanışlı biyobelirteçler olduğu, bu tez çalışmasıyla bir kez daha ortaya konmuştur. Ancak aktivasyonlrı etkileyen değişkenlerin farklı kombinasyonlarda ve çok daha detaylı olarak araştırılması da önemlidir.

BÖLÜM 5
SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, Kepez (Çanakkale) bölgesindeki ağır metal kirliliğinin *M. galloprovincialis* türü midyelerin solungaç, hepatopankreas ve kas dokularındaki SOD, CAT, LPO ve TP düzeylerini mevsimlere ve dokulara göre nasıl değiştirdiği araştırılmıştır. Farklı dokulardaki antioksidan enzim aktiviteleri kirlilik düzeyiyle ve mevsimlerle değişmektedir.

Antioksidanların biyoizleme çalışmalarda yaygın olarak kullanıldıkları bilinmektedir. Bu maddelerin kirliliğin yoğun olduğu bölgelerde yüksek miktarda ölçülmesi, oksidatif strese neden olan bileşiklerin detoksifikasyonunda oynadıkları kilit rol ile bağlantılıdır. Ağır metallerin çift kabuklular üzerindeki toksik etkilerini belirlemek, kirletici düzeylerinin insanlarda neden olacağı toksik etkileri öngörmeye yardımcı olacaktır. Çalışmanın diğer ağır metaller, organik kirleticilerin ve metallotionein proteinlerinin de dikkate alınmasıyla genişletilmesi planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

Aarab N., Minier C., Lemaire S., Unruh E., Hansen P.D., Larsen B.K., Andersen O.K., Narbonne J.F., 2004. Biochemical and Histological Responses in Mussel (*Mytilus edulis*) Exposed to North Sea Oil and to a Mixture of North Sea Oil and Alkylphenols. Marine Environmental Research, 58: 437–441.

Aebi H., 1984. Catalase in vitro. Methods of Enzymology. 105: 121-126 p.

Akgün M., 2006. Sakarya Nehri Çeltikçi Çayındaki Tatlı Su Kefallerinin (*Leuciscus cephalus* L., 1758) Dokularındaki Ağır Metal Birikiminin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Türkiye.

Akkuş İ., 1995. Serbest Oksijen Radikalleri ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Basım Yayın ve Dağıtım. Konya. 1-20 p.

Alpbaz A. G., 1993. Kabuklu ve Eklembacaklılar Yetiştiriciliği. E.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Yayınları No: 26, E.Ü. Basımevi, Bornova, İzmir. 317 p.

Altuntaş A., 2003. Gemi Kaynaklı Deniz Kirliliğini Önlemeye Yönelik Ulusal ve Uluslar Arası Düzenlemeler ile AB Müktesebatının İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Türkiye

Armstrong D.A., 1998. Methods in Molecular Biology. Humana. Toronto. 108 p.

Aslan E., 2010. İzmir Körfezindeki Kara Midyelerinin (*Mytilus galloprovincialis*) ve Bazı Balık Türlerinin Farklı Organ ve Dokularındaki $_{210}$Po Konsantrasyonu ile Lipid Peroksidasyonu (LPO), H_2O_2 ve Prolin Arasındaki Korelasyonun İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Türkiye.

ATSDR, 2006. Agency for Toxic Subtances and Disease Registry, Cercla Priority List of Hazardous Substances. Online: 05 October 2011 from http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/05list.html.

Banni M., Attig H., Dagnino A., Negri A ., Jebali J., Boussetta H., Viarengo A., Dondero F., 2010. Uptake and Biochemical Responses of Mussels *Mytilus galloprovincialis* Exposed to Sublethal Nickel Concentrations. Ecotoxicology and Enviromental Safety, 73: 1712-1719.

Basaga H.S., 1990. Biochemical Aspect of Free Radicals. Biochemistry of Cell Biology, 68: 989-998.

Batkı H., 1995. Ege Denizi Kıyılarındaki Sediment ve Organizmada (M*ullus barbatus*) Ağır Metal Dağılımı. Yüksek Lisans Tezi. Dokuz Eylül Üniversitesi, Türkiye.

Bayne B.L., Widdows J., Thompson R.J., 1976. Marine Mussels: Their Ecology and Physiology. Cambridge University Press.10: 122-159 p.

Bebianno M.J., Geret F., Jouan A., Turpin V., Cosson R.P., 2002. Influence of Metal Exposure on Metallothionein Synthesis and Lipid Peroxidation in Two Bivalve Mollusks: The Oyster (*Crassostrea gigas*) and the Mussel (*Mytilus edulis*). Aquatic Living Sources, 15: 61-66.

Bebianno M.J., Geret F., Serafim A., 2003. Antioxidant Enzyme Activities, Metalothioneins and Lipid Peroxidation as Biomarkers in *Ruditapes decussatus*. Ecotoxicology, 12: 417-426.

Bebiannoa M.J., Companya R., Serafima A., Camusb L., Cossond R.P., Fiala-M´edonie A., 2005. Antioxidant Systems and Lipid Peroxidation in *Bathymodiolus azoricus* from Mid-Atlantic Ridge Hydrothermal Vent Felds. Aquatic Toxicology, 75: 354–373

Bocchetti R., Lamberti C.V., Pisanelli B., Razzetti E.M., Maggi C., Catalano B., Sesta G., Martuccio G., Gabellini M., Regoli F., 2008. Seasonal Variations of Exposure Biomarkers, Oxidative Stress Responses and Cell Damage in the Clams, *Tapes philippinarum*, and Mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Adriatic Sea. Marine Environmental Research, 66: 24–26.

Bongiorno T., Lacumin L., Tubaro F., Marcuzzo E., Sensidoni A., Tulli F., 2015. Seasonal Changes in Technological and Nutritional Quality of *Mytilus galloprovincialis* from Suspended Culture in the Gulf of Trieste (North Adriatic Sea). Food Chemistry, 173: 355–362.

Bora, T., Delen, N., 1981. Türkiye'de Bitkisel Üretimde Tarımsal İlaç Sorunu ve Öneriler, Tarım Bakanlığı Komisyon TebIiği. İzmir, 809-824.

Borek C., Ong A., Mason H., Donahue L., Biaglow J.E., 1986. Selenium and Vitamin E Inhibit Radiogenic and Chemically Induced Transformation *in vitro* via Different Mechanisms. Proceedings of the National Academy of Science of the USA. 83:1490-1494.

Box A., Sureda A., Galgani F., Pons A., Deudero S., 2007. Assessment of Environmental Pollution at Balearic Islands Applying Oxidative Stress Biomarkers in the Mussel *Mytilus galloprovincialis*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 146: 531–539.

Bradford M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantitites of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.

Brenneisen P., Steinbrenner H., Sies H., 2005. Selenium, Oxidative Stress, and Health Aspects. Molecular Aspects Medicine, 26: 256-267.

Brooks S.J., Farmen E., Heier L.S., Esther Blanco-Rayónd A., Izagirre U., 2015. Differences in Copper Bioaccumulation and Biological Responses in Three *Mytilus* Species. Aquatic Toxicology, 160: 1-12.

Bryan G., 1976. Heavy metal contamination in the sea, R. Johnston Marine Pollution Academic Press mc. London, 185-302.

Brzozowska R., Sui Z., Kang K.H., 2011. Testing the Usability of Sea Mussel (*Mytilus* sp.) for the Improvement of Seawater Quality-An Experimental Study. Ecological Engineering, 39: 133-137.

Buege J.A., Aust S.D., 1978. Microsomal Lipid Peroxidation, Methods in Enzymology, 52: 302-310

Camejo G., Wallin B., Enojarvi M., 1998. Analysis of Oxidation and Antioxidants Using Microtiter Plates. In: Armstrong D., Eds. Free Radical and Antioxidant Protocols: Methods in Molecular Biology. Totawa, NJ: Humana Press Inc, 108: 377-386.

Campillo J.A., Fernández B., Martínez-Gómez C., Benedicto J., 2010. Antioxidant Responses in Gills of Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) as Biomarkers of Environmental Stress Along the Spanish Mediterranean Coast. Aquatic Toxicology, 99: 186–197.

Cancio I., Cajaraville M.P., 1999. Seasonal Variation of Xanthine Oxidoreductase Activity in the Digestive Gland Cells of the Mussel *Mytilus galloprovincialis*: A Biochemical, Histochemical and Immunochemical Study. Biology of the Cell, 91: 605-615.

Canlı M., Furness R., 1995. Mercury and Cadmium Uptake from Seawate and from Food by the Norway Lobster *Nephrops notvegicus*. Environmental Toxicology and Chemistry, 14: 819-828.

Carr A., Frei B., 1999. Does Vitamin C Act as A Pro-Oxidant Under Physiological Conditions?, FASEB Journal, 13(9):1007-1024.

Cartwrıght, C.E., 1977. Harrison's Principles of International Medicine, Mc Graw Hill Kogakuska Publishers, Tokyo, 65.

Chao J.C., Huang C.H., Wu S.J., Yang C., Chang N.C., Shieh M.J., Lo P.N., 2002. Effects of Beta-carotene, Vitamin C and E on Antioxidant Status in Hyperlipidemic Smokers. Journal of Nutritional Biochemistry, 13: 427-434.

Cheeseman K.H., Stater T.F., 1993. An Introduction to Free Radical Biochemistry. British Medical. 149:481-493.

Cherubini A., Ruggiero C., Polidori M.C., Mecocci C., 2005. Potential Markers of Oxidative Stress in Stroke. Free Radical Biolology & Medicine, 39: 841–852.

Craig P.M., Wood C.M., McClelland G.B., 2007. Oxidative Stress Response and Gene Expression With Acute Copper Exposure in Zebrafish (*Danio rerio*), Regulatory Integrative and Comperative Physiology, 295 (5): 1882-1892

Cravo A., Lopes B., Serafim A., Company R., Barreira L., Gomes T., Bebianno M.J., 2013. Spatial and Seasonal Biomarker Responses in the Clam *Ruditapes decussatus*. Biomarkers, 18 (1): 30-43.

Cuevas N., Zorita I., Costa P.M., Franco J., Larreta J., 2015. Development of Histopathological Indices in the Digestive Gland and Gonad of Mussels: Integration with Contamination Levels and Effects of Confounding Factors. Aquatic Toxicology, 162: 152–164.

Çağlar M. 1973. Omurgasız Hayvanlar. İstanbul Üniversitesi Yayınları. Fen Fak Basımevi. 1- 419.

Çiğrenmiş Y., 1997. Sigara Tiryakilerinde Eritrosit İçi Süperoksit Dismutaz, Katalaz ve Glutatyon Peroksidaz Aktivite Düzeyleri. Yüksek Lisans Tezi. İnönü Üniversitesi, Türkiye.

Damianidis P., Chintiroglou C.C., 1998. Feding Guilds of Polychaetes Associated with *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) Assemblage in the North Aegean Sea. 35th Ciesm Congress Proceedings (Commission Internationale Pour L'Exploration Scientifique De La Mer Méditerrranée), 35 (2): 416-417.

Davies M.J., Fu S., Wang H., Dean R.T., 1999. Stable Markers of Oxidant Damage to Proteins and Their Application in the Study of Human Disease. Free Radikal Biyology & Medicine 27(11-12): 1151-1163.

Di Giulio R.T., Washburn P.C., Wenning R.J., Winston G.W., Jewell C.S., 1989. Biochemical Responses in Aquatic Animal: A Review of Determinants of Oxidative Stress. Environmental Toxicology and Chemistry, 8: 1103-1123.

Diplock A., 1998. Healty Lifestyles Nutrition and Physical Activity: Antioxidant Nutrients. ILSI Europe Concise Monograph Series, p:59, Belgium.

Dreher D., Junod A.F., 1996. Role of Oxygen Free Radicals in Cancer Development. European Journal of Cancer. 32A: 30-38.

Duarte C.A., Giarratano E., Amin O.A., Comoglio L.I., 2011. Heavy Metal Concentrations and Biomarkers of Oxidative Stress in Native Mussels (*Mytilus edulis chilensis*) from Beagle Channel Coast (Tierra del Fuego, Argentina). Marine Pollution Bulletin 62: 1895–1904.

EFSA, 2015. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Call for Continuous Collection of Chemical Contaminants Occurrence Data in Food and Feed. 〈http://www.efsa.europa.eu/en/data/call/datex101217.htm〉

Egemen Ö., 2006. Su Kalitesi, Ege Üniversitesi Yayınları, Su Ürünleri Fakültesi, Yayın No:14 p.

Ekici L., Sağdıç O., 2008. Serbest Radikaller ve Antioksidan Gıdalarla İnhibisyonu. Gıda Dergisi, 33 (5): 251-260.

Elliot J.G., 1999. Application of Antioxidant Vitamins in Foods and Beverages. Food Technology, 53(2): 46-48.

Ergül H.A., 1999. Pazar (Rize) Yöresi Litoral Zonundaki Radyoaktivite ve Ağır Metal Düzeylerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Karadeniz Tenik Üniversitesi, Türkiye.

Esen Ö., 2006. İzmir Körfezindeki Kara Midye *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 'de Bulunan Toksik Maddelerin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi, Türkiye.

Esterbauer H, Wag G, Phul H. 1993. Lipid Peroxidation and Its Role in Atherosclerosis. British Medical Bulletin. 493:566-576.

Evans M.D., Cooke M.S., 2004. Factors Contributing to The Outcome of Oxidative Damage to Nucleic Acids. Bioassays. 26(5):533-542.

Fang Y.Z., Yang S., Wu G., 2002. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. Nutrition. 18: 872-879.

Faria M., Huertas D., Soto DX., Grimalt JO., Catalan J., Riva M.R., Barata C., 2010. Contaminant Accumulation and Multi-Biomarker Responses in Field Collected Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*) and Crayfish (*Procambarus clarkii*) to Evaluate Toxicological Effects of Industrial Hazardous Dumps in the Ebro River (NE Spain). Chemosphere, 78: 232-240.

Faria M., Ochoa V., Blázquez M., San Juan M.F., Lazzara R., Lacorte S., Soares A.M.V.M., Barata C., 2014. Separating Natural from Anthropogenic Causes of Impairment in Zebra Mussel *(Dreissena polymorpha*) Populations Living Across a Pollution Gradient. Aquatic Toxicology, 152- 82–95.

Farrington J.W., Goldberg E.D., Risebrough R.W., Martin J.H., Bowen W.T., 1983. US Mussel Watch, 1976-1978: An Overview of the Trace Metal, DDE, PCB, Hydrocarbon and Artificial Radionuclide Data. Environmental Science and Technology, 17: 490-496.

Fernandez B., Campillo J.A., Martinez-Gomez C., Benedicto J., 2012. Assessment of the Mechanisms of Detoxification of Chemical Compounds and Antioxidant Enzymes in the Digestive Gland of Mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Mediterranean Coastal Sites. Chemosphere, 87: 1235-1245.

Fernández B., Campillo J.A., Martínez-Gómez C., Benedicto J., 2010. Antioxidant Responses in Gills of Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) as Biomarkers of Environmental Stress Along the Spanish Mediterranean Coast. Aquatic Toxicology, 99: 186–197.

Fırat Ö., 2007. *Oreochromis niloticus*'ta Metal (Zn, Cd) ve Metal Karışımının (Zn+Cd) Kan Dokusunda Fizyolojik ve Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkisi. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi, Türkiye.

Flöhe L., Ötting F., 1984. Superoxide Dismutase Assays. Methods of Enzymology, 105: 93-104.

Fox P.F., McSweeney P.L.H., Lynch C.M., 1998. Significance of Non-Starter Lactic Acid Bacteria in Cheddar Cheese. Australian Journal of Dairy Technology, 53: 83-89.

Förstner G., Wittmann T., 1981. Metal Pollution in the Aquatic Environment, Newyork Springer Verlag , U.S.A., 3(21): 271-318.

Fraser M., Surette C., Vaillancourt C., 2011. Spatial and Temporal Distribution of Heavy Metal Concentrations in Mussels (*Mytilus edulis*) from the Baie Des Chaleurs, New Brunswick, Canada. Marine Pollution Bulletin, 62: 1345–1351.

Freeman B.A., Crapo J.D., 1982. Biology of Disease: Free Radicals and Tissue Injury. Lab Investments, 47: 412-426.

Frei B., 1994. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Vitamins: Mechanisms of Action. Am Journal of Medicine. 97(3A): 5-13.

Geracitano L., Monserrat J.M., Bianchini A., 2002. Physiological and Antioxidant Enzyme Responses to Acute and Chronic Exposure of *Laeonereis Acuta* (Polychaeta, Nereididae) to Copper. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 277:145– 156

Goldberg E.D., Bowen V.T., Farrington J.W., Harvey- Martin J.H., Parker P.L., Risebrough R.W., Robertson W., Schneider E., Gamble E., 1978. The Mussel Watch. Environmental Conservation, 5: 101-125.

Goldscmidt V. M., 1958. Geochemistry. Oxford University Pres, London, 730 p.

Gomes T., Pereira C.G., Cardoso C., Pinheiro J.P., Cancio I., Bebianno M.J., 2012. Accumulation and Toxicity of Copper Oxide Nanoparticles in the Digestive Gland of *Mytilus galloprovincialis*. Aquatic Toxicology, 118– 119: 72– 79.

Gomes T., Pereira C.G., Cardoso C., Sousa V.S., Teixeira M.R., Pinheiro J.P., Bebianno M.J., 2014. Effects of Silver Nanoparticles Exposure in the Mussel *Mytilus galloprovincialis*. Marine Environmental Research, 101: 208-214.

Gökdemir Y., 2006. Ergene Nehrindeki Ağır Metallerin Ekstraksiyon Metodu ile Tayini. Yüksek Lisans Tezi. Trakya Üniversitesi, Türkiye.

Guemori L., Artur Y., Herbeth B., Jeandel C., Cunny G., Siest G., 1991. Biological Variability of Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase and Catalase in Blood. Clinical Chemistry, 37: 1932-1937.

Günaydın B., Çelebi H., 2003. Genel Anesteziklerin Serbest Radikaller ve Antioksidanlarla İlişkisi. Anestezi Dergisi, 11(2): 87-98.

Güner H., 2008. İzmir Körfezi Kirliliğinin Midye (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck)'de Mikronukleus Frekansının Saptanması Yoluyla İzlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi, Türkiye.

Güven K. C., Öztürk B., 2005. Deniz Kirliliği, Tüdav Yayınları, No: 21, İstanbul 19 p.

Hagihara M., Nishigaki I Maseki M., Yagi K., 1984. Age Dependent Changes in Lipid Peroxide Levels in the Lipoprotein Fractions of Human Serum, The Journal of Gerontology. 39: 269-272.

Halliwell B, Gutteridge J.M.C., 2000. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press. New York, USA. 107-208.

Halliwell B., 1996. Oxidative Stress, Nutrition and Health. Experimental Strategies for Optimization of Nutritional Antioxidant Intake in Humans. Free Radicals Researches, 25: 57-74.

Halliwell B., Aruoma O.I., 1991. DNA Damage by Oxygen-Derived Species. Its Mechanism and Measurement in Mammalian Systems. FEBS Letters. 281: 9- 19.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 1990. Role of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease: An overview. Methods of Enzymology. 186: 1-85.

Hannam M.L., Bamber S.D., Galloway T.S., Moody A.J., Jones M.B., 2010. Effects of the Model PAH Phenanthrene on Immune Function and Oxidative Stress in the Haemolymph of the Temperate Scallop *Pecten maximus*. Chemosphere, 78: 779–784.

Hem J. D., 1985. Study and Interpretation of the Chemical Characteristic of Naturel Water, U. S. Geological Survey Water-Supply, USA, 263.

Ivankovic D., Pavicic J., Erk M., Filipovic´-Marijic V., Raspor B., 2005. Evaluation of the *Mytilus galloprovincialis* Lam. Digestive Gland Metallothionein as a Biomarker in a Long-Term Field Study: Seasonal and Spatial Variability. Marine Pollution Bulletin, 50: 1303-1313.

Jarque S., Prats E., Olivares A., Casado M., Ramón M., Piña B., 2014. Seasonal Variations of Gene Expression Biomarkers in *Mytilus* Reproductive Cycle as Major Modulators. Science of the Total Environment, 499: 363-372.

Kahvecioğlu Ö., Kartal G., Güven A. ve Timur S., 2006. Metallerin Çevresel Etkileri. İTÜ Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü, Türkiye.12 p.

Kahvecioğlu Ö., Kartal G., Güven A., Timur, S., 1999, Metallerin Çevresel Etkileri –I, Metalurji dergisi, Cilt 23, Sayı 121, 47-53.

Kamalı Uğur A., 1999. Samsun-Ordu Kıyı Şeridinde Deniz Kirliliğinin İncelenmesi ve Kirlilik Birikiminin Midye Örneğinde Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Türkiye.

Kang D.H., 2002. Oxidative stress, DNA Damage, and Breast Cancer. AACN Clinical Issues. 13: 540-549.

Karadere H., 1997. Atatürk Baraj Gölünde Su, Sediment ve Balık Türlerinde Ağır Metal Biriminin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Dicle Üniversitesi, Türkiye.

Kasiotis K.M., Emmanouil C., Anastasiadou P., Papadi-Psyllou A., Papadopoulos A., Okay O., Machera K., 2015. Organic Pollution and Its Effects in the Marine Mussel *Mytilus galloprovincialis* in Eastern Mediterranean Coasts. Chemosphere, 119: S145–S152.

Kaur C., Kapoor H.C., 2001. Antioxidants in Fruits and Vegetables-the Millennium's Health. International Journal of Food Science and Technology, 36: 703-725.

Kayhan F. E., Muşlu M. N. Koç N. D., 2009. Bazı Ağır Metallerin Sucul Organizmalar Üzerinde Yarattığı Stres ve Biyolojik Yanıtlar. Journal of Fisheries Sciences.com, 3 (2): 153-162.

Kılınc K., Kılınc A., 2002. Oksijen Toksisitesinin Aracı Molekülleri Olarak Oksijen Radikalleri. Hacettepe Tıp Dergisi. 33(2): 110-118.

Küçüksezgin, F., Pazı I., Yücel-Gier G., Akçalı B., Galgani F., 2013. Monitoring of Heavy Metal and Organic Compounds Levels Along the Estern Aegean Coast with Transplanted Mussels, Chemosphere, 93: 1511-1518.

Kwon N.S., Stuehr D.S., Nathan C.F., 1991. Inhibition of Tumor Cells Ribonucleotide Reductase by Nitric Oxide. J Exp Med. 1794(4): 442-448.

Lam P.K.S., Cheung C.C.C., Zheng G.J., Li A.M.Y., Richardson B.J., 2001. Relationships Between Tissue Concentrations of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Antioxidative Responses of Marine Mussels, *Perna viridis*. Aquatic Toxicology, 52: 189-203.

Langdon C.J., Newell R.I.E., 1990. Utilization of Detritus and Bacteria as Food Sources by 2 Bivalve Suspension-Feeders. Marine Ecology Programe Series, 58: 299–310.

Lee J., Koo N., Min D.B., 2004. Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. Compherensive Reviews in Food Sience and Technology, 3: 21-33.

Lima I., Moreira S.M., Osten Jaime Rendo´n V., Soares A.M.V.M., Guilhermino L., 2007. Biochemical Responses of the Marine Mussel *Mytilus galloprovincialis* to Petrochemical Environmental Contamination Along the North-Western Portugal, Chemosphere, 66: 1230-1242.

Lionetto M.G., Caricato R., Giordano M.E., Pascariello M.F., Marinosci L., Schettino T., 2003. Integrated Use of Biomarkers (Acetylcholinesterase and Antioxidant Enzyme Activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian Coastal Marine Area. Marine Pollution Bulletin, 46: 324-330.

Livingstone D.R., Forlin L., George S., 1994. Molecular Biomarkers and Toxic Consequences of Impact by Organic Pollution in Aquatic Organisms. In: Sutcliffe D.W., Eds. Water Quality and Stress Indicators in Marine and Freshwater Systems: Linking Levels of Organization. Freshwater Biological Association, Ambleside, UK, 1171-1254.

Lubet P. E. 1963. Physiologie des Moules. Imprımerie Emmanuel Vitte, 177, Avenue, Felix-faure, Lyon 33 p.

Luoma S.N., 1983. Bioavailibility of Trace Metals to Aquatic Organizms-A Rewiew. The Science of the Total Environment, 28: 1-22.

Machado A.A., Wood C.M., Bianchini A., Gillis P.L., 2014. Responses of Biomarkers in Wild Freshwater Mussels Chronically Exposed to Complex Contaminant Mixtures. Ecotoxicology, 23: 1345-1358.

Maisano M., CappelloT., D'Agata A., Natalotto A., Mauceri A., Fasulo S., 2013. Effects of Environmental Pollution in Caged Mussels (*Mytilus galloprovincialis*). Marine Environmental Research, 91: 52-60.

Manduzio H., Monsinjon T., Rocher B., Leboulenger F., Galap C., 2003. Characterization of an Inducible Isoform of the Cu/Zn Superoxide Dismutase in the Blue Mussel *Mytilus edulis*. Aquatic Toxicology, 64: 73-83.

Manduzio H., Monsinjon T., Galap C., Leboulenger F., Rocher B., 2004. Seasonal Variations in Antioxidant Defences in Blue Mussels *Mytilus edulis* Collected from a Polluted Area: Major Contributions in Gills of an Inducible Isoform of Cu/Zn-Superoxide Dismutase and of Glutathione S-Transferase. Aquatic Toxicology, 70: 83-93.

Marnett L.J., 2000. Oxyradicals and DNA Damage. Carcinogenesis, 21: 361-370.

Masella R., Benedetto R.D., Varı R., Filesi C., Giovannini C., 2005. Novel Mechanisms of Natural Antioxidant Compounds in Biological Systems: 30 Involvement of Glutathione and Glutathione-Related Enzymes. Journal of Nutritional Biochemistry, 16: 577-586.

Matés JM., Pérez-Gómez C., de Castro N.I., 1999. Antioxidant Ezymes and Human Diseases. Clinical Biochemistry, 32 (8): 595-603.

Maxwell S.R.J., 1995. Prospect for Use of Antioxidant Therapies. Drugs, 49(3): 345-61.

McNeely, R. N., Neimanis V. P., Dwyer L., 1979. Water Quality Sorcebook- A Guide to Water Quality Parameters : Inland Waters Directorate, Water Quality Branch, Ottawa Canada 89p.

McCord J.M., 1985. Oxygen-Derived Free Radicals in Postischemic Tissue Injury. National English Journal of Medicine. 312:159-163.

McCord J.M., 1993. Human Disease, Free Radicals, and the Oxidant/Antioxidant Balance. Clinical Biochemistry, 26: 351-357.

Memişoğulları R., 2005. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. Düzce Tıp Fakültesi Dergisi. 3: 30-39.

Mercan U., 2004. Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 15(1-2): 91-96.

Merel A., Tuncel P., Surmen-gur E., Ozbek R., Ozturk E., Gunay U.C., 2000. Lipid Peroxidation and Antioxidant Status in Beta-Thalassemia, Pediatry Hematology & Oncology, 17:687-693.

Merlini, M., 1971. Heavy Metal Contamination, in Impengement of Man on the Oceans, London and NewYork, 461 -468.

Metelew, V., Kanaev, E., 1971. Water Toxicology, Amerind Publishing, Newyork, 1-216.

Miniero R., Ceretti G., Cherin E., Dellatte E., De Luca S., Ferri F., Fulgenzi A., Grim F., Lacovella N., di Domenico A., 2003. Correlation Between PCDD and PCDF Levels in Sediments and Clams (*Tapes* sp.) in the Venice Lagoon. Organohalogen Compounds, 62: 144-147.

Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A., 1989. Biosynthesis of Nitric Oxide from L-Arginine: A Pathway for the Regulation of Cell Function and Communication. Biochemical Pharmacology, 38 (11): 1709-1715.

Moore P.G., Rainbow P.S., 1987. Copper and Zinc in an Ecological Series of Talitroidean Amphipoda (Crustacea) Oecologia, 73:120–126.

Muse J.O., Stripeikis J.D., Fernandez F.M., d'Huicque L., Tudino M.B., Carducci C.N., Troccoli O.E., 1999. Seaweeds in the Assessment of Heavy Metal Pollution in the Gulf San Jorge, Argentina. Environmental Pollution, 104: 315-322.

Nahrgang J., Brooks S.J., Evenset A., Camus L., Jonsson M., Smith T.J., Lukina J., Frantzen M., Giarratano E., Renaud P.E., 2013. Seasonal Variation in Biomarkers in Blue Mussel (*Mytilus edulis*), Icelandic Scallop (*Chlamys islandica*) and Atlantic Cod (*Gadus morhua*)-Implications for Environmental Monitoring in the Barents Sea. Aquatic Toxicology, 127: 21-35.

Nakazawa H., Genka C., Fujishima M., 1996. Pathological Aspects of Active Oxygens/Free Radicals. Japan Journal of Physiology. 46: 15-32.

Nalçacı E., 1991. Kan-Beyin Bariyerinin Yıkılışında Serbest Oksijen Radikallerinin Rolü. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Uzmanlık Tezi. Türkiye.

Nawar W.W., 1996. Lipids. In Food Chemistry, Fennema-Ed O.R., Dekker M., New York, 225-319.

Niki E., Yoshida Y., Saito Y., Noguchi N., 2005. Lipid Peroxidation: Mechanisms, Inhibition, and Biological Effects. Biochemical and Biophysical Research Communications, 338: 668–676.

Okumuş E., 2007. Küçükçekmece Gölü Sedimentinde Ağır Metal (Zn^{2+}, Fe^{2+}, Cu^{2+}) Adsorpsiyonu. Yüksek Lisans Tezi. Yıldız Teknik Üniversitesi, Türkiye.

Olsson P. E., Kling P. ve Hogstrand C., 1998. Mechanisms of Heavy Metal Accumulation and Toxicity in Fish. In: Langston W. J., Bebianno B. J., Eds. Metal Metabolism in Aquatic Environments. London, UK. 321- 337.

Onat T., Emerk K., 1996. Karbohidratlar: Temel Biyokimya. Birinci baskı. 289- 409, İzmir.

Orbea A., Ortiz-Zarragoitia M., Sole M., Porte C., Cajaraville M.P., 2002. Antioxidant Enzymes and Peroxisome Proliferation in Relation to Contaminant Body Burdens of PAHs and PCBs in Bivalve Mollucs, Crabs and Fish form the Urdaibai and Plentzia Estuaries (Bay of Biscay). Aquatic Toxicology, 58: 75-98.

Orbea A., Marigómez I., Fernández C., Tarazona J.V., Cancio I., Cajaraville M.P., 1999. Structure of Peroxisomes and Activity of the Marker Enzyme Catalase in the Digestive Epithelial Cells in Relation to PAH Content of Mussels from Two Basque Estuaries (Bay of Biscay): Seasonal and Site-Spesific Variations. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 36: 158-166.

Oruç E.Ö., Usta D., 2007. Evaluation of Oxidative Stress Responses and Neurotoxicity Potential of Diazinon in Different Tissues of *Cyprinus carpio*, Environmental Toxicology and Pharmacology, 23: 48-55.

Oruç E.Ö., Sevgiler Y., Üner N., 2004. Tissue-Specific Oxidative Stres Responses in Fish Exposed to 2,4-D and Azinphosmethyl, Comparative Biochemistry and Physiology, 137C: 43-51.

Özden S., 2005. Çanakkale Boğazı ve Çevresindeki Bazı Midye ve Alg Türlerinin Ağır Metal Düzeylerinin Belirlenmesi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Türkiye.

Özden S., 2013. Gelibolu Yarımadası ve Saroz Körfezi Kıyılarında Askıda Katı Madde, Sediment, *Mytilus galloprovincialis* ve *Ulva rigida*'da Ağır Metal Düzeylerinin Araştırılması, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Türkiye.

Özkoç H.B., Tosun N., 1999. Deniz Kirliliğinde Midyelerin Biomonitör Olarak Kullanımı, 3. Ulusal Çevre Mühendisliği Kongresi, 25-26 Kasım, İzmir.

Özkurnaz G., 2012. Çanakkale Boğazı Umurbey Kıyılarında Bazı Çift Kabuklu Yumuşakçaların (Bivalvia) Solungaçlarındaki Ağır Metal Birikimleri ve Genotoksisite Üzerine Etkileri, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Türkiye.

Pavlica M., Podrug M., Štambuk A., Cvjetko P. ve Klobučar G. I. V., 2008. Seasonal Variability in Micronuclei Induction in Haemocytes of Mussels Along the Eastern Adriatic Coast. Polish J. of Environ. Stud., 17: 765-771.

Phillips D., Rainbow P., 1994. Biomonitoring of Trace Aquatic Contaminants. Scoll of Biological Sciences, Qeen Mary and Westfield Collage, Mile and Road, London, UK.

Power A., Sheehan D., 1996. Seasonal Variation in the Antioxidant North-Western Coast of Portugal. Chemosphere, 66: 1230–1242.

Radjaei A., 2006. Kuzey Marmara Denizi'ndeki Karagöz İstavrit Balığında (*Trachurus trachurus* L., 1758) Bazı Ağır Metal Birikimleri, Marmara Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Türkiye.

Rainbow P.S., 1993. The Significance of Trace Metal Concentrations in Marine Invertebrate Dallinger R., Rainbow P.S. (Eds.), Ecotoxicology of Metals in Invertebrates, Lewis Publishers, Chelsea, USA, 3-23.

Rainbow P.S., 1995. Biomonitoring of Heavy Metal Availability in the Marine Environment. Marine Pollution Bultein, 4 (12):183-192.

Rainbow P.S., 2002. Trace Metal Concentrations in Aquatic Invertebrates: Why and So What?. Environmental Pollution, 120: 497-507.

Rainbow P.S., Huang Z.G., Yan S.-K., Smith B., 1993. Barnacles as Biomonitors of Trace Metals in the Coastal Waters Near Xiamen, P.R. China Asian Marine Biology, 10: 109–121

Rainbow P.S., Phillips D.J.H., 1993. Cosmopolitan Biomonitors of Trace Metals. Marine Pollution Bulletin, 26 (11): 593-601.

Rankama, K., Sahama, T.H.G., 1964. Geochemistry: The University of Chicago Pres, Chicago and London, 912 p.

Rayment G.E., Barry G., 2000. Indicator Tissues for Heavy Metal Monitoring - Additional Attributes. Marine Pollution Bulletin, 41: 353-358.

Regoli F., Orlando E., 1994. Accumulation and Subcellular Distribution of Metals (Cu, Fe, Mn, Pb and Zn) in the Mediterranean Mussel *Mytilus galloprovincialis* During a Field Transplant Experiment. Marine Pollution Bulletin, 28 (10): 592-600.

Richardson B.J., De Luca-Abbott S.B., McClellan K.E., Zheng G.J., Martin M., Lam P.K.S., 2005. Field Validation of Antioxidant Enzyme Biomarkers in Mussels (*Perna viridis*) and Clams (*Ruditapes philippinarum*) Transplanted in Hong Kong Coastal Waters. Marine Pollution Bulletin, 51: 694-707.

Richardson B.J., Mak E., De Luca-Abbott S.B., Martin M., McClellan K., Lam P.K.S., 2008. Antioxidant Responses to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Organochlorine Pesticides in Green-Lipped Mussels (*Perna viridis*): Do Mussels ‘‘Integrate” Biomarker Responses? Marine Pollution Bulletin, 57: 503–514.

Richir J., Gobert S., 2014. A Reassessment of the Use of *Posidonia oceanica* and *Mytilus galloprovincialis* to Biomonitor the Coastal Pollution of Trace Elements: New Tools and Tips. Marine Pollution Bulletin, 89 (1-2): 390-406.

Ryter S.W., Tyrrell R.M., 1998. Singlet Molecular Oxygen ($^1O_2$): A Possible Effector of Eukaryotic Gene Expression. Free Radicals of Biology and Medicine. 24(9):1520-1534.

Sáenz L.A., Seibert E.L., Zanette J., Fiedler H.D., Curtius A.J., Ferreira J.F., Almeida E.A., Marques M.R.F., Bain A.C.D., 2010. Biochemical Biomarkers and Metal in *Perna perna* Mussels from Mariculture Zones of Santa Catarina, Brazil. Ecotoxicology and Environmental Safety, 73(5): 796-804.

Saicic Z.S., Borkovic S.S., Saponjic J.S., Pavlovic S.Z., Blagojevic D.P., Milosevic S.M., Kovacevic T.B., Radojicic R.M., Spasic M.B., Zikic R.V., 2005. The Activity of Antioxidant Defence Enzymes in the Mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea. Comparative Biochemistry and Physiology, 141: 366-374.

Santovito G., Piccinni E., Cassini A., Irato P., Albergoni V., 2005. Antioxidant Responses of the Mediterranean Mussel, *Mytilus galloprovincialis*, to Environmental Variability of Dissolved Oxygen. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 140: 321-329.

Schmidt W., Power E., Quinn B., 2013. Seasonal Variations of Biomarker Responses in the Blue Mussel (*Mytilus* spp.). Marine Pollution Bulletin, 74: 50-55.

Schuyer M., Berns E.M., 1999. Is TP53 Dysfunction Required for BRCA1-Associated Carcinogenesis? Molecular Cell Endocrinology, 155:143-152.

Seed R., 1974. Morphological Variations in *Mytilus* from the Irish Coasts in Relation to the Occurrence and Distribution of *M. galloprovincialis*. Cahiers de Biologie Marine, 15:1-25.

Seven A., Candan G., 1996. Antioksidan Savunma Sistemleri. Cerrahpasa Journal of Medicine. 27: 41-50.

Siemer D.D., Koteel P., Jaiwala V., 1976. Optimization of Arsine Generation in Atomic Aabsorption Arsenic Determinations. Analytical Chemistry, 48 (6): 21-24.

Sole M., Kopecka-Pilarczyk J., Blasco J., 2009. Pollution Biomarkers in Two Estuarine Invertebrates, *Nereis diversicolor* and *Scrobicularia plana*, from a Marsh Ecosystem in SW Spain. Environmental International, 35: 523-531.

Sözmen E.Y., 2002. Yaşlanma Biyokimyası. In Onat T, Emerk K, Sözmen EY (Eds) İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, pp: 665-674, Ankara.

Speranza M.J., Bagley A.C., Lynch B.E., 1993. Cells Enriched for Catalase are Sensitized to the Toxicities of Bloomycin, Adriamycin and Paraquat. Journal of Biyology and Chemistry, 268: 39-43.

Şekeroğlu M.R., Şahin H., Dülger H., Algün E., 2000. The Effect of Dietary Treatment on Erythrocyte Lipid Peroxidation, Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase, and Serum Lipid Peroxidation in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. Clinical Biochemistry. 33: 669-674.

Tsangaris C., Hatzianestis I., Catsiki V.A., Kormas K.A., Strogyloudi E., Neofitou C., Andral B., Galgani F., 2011. Active Biomonitoring in Greek Coastal Waters: Application of the Integrated Biomarker Response Index in Relation to Contaminant Levels in Caged Mussels. Science of the Total Environment, 412-413: 359–365.

Uchida K., 2003. 4-Hydroxy-2-Nonenal: AProduct and Mediator of Oxidative Stress. Prog Lipid Researches. 569:1-26.

Uluturhan E., Küçüksezgin F., 2007. Heavy Metal Contaminants in Red Pandora (*Pagellus erythrinus*) Tissues from the Eastern Aegean Sea, Turkey. Water Research, 41: 1185-1192.

Uysal M., 1998. Serbest Radikaller, Lipit Peroksitleri ve Organizmada Prooksidan Antioksidan Dengeyi Etkileyen Koşullar. Klinik Gelişim. 2: 336-341.

Uysal, H. 1970. Türkiye Sahillerinde Bulunan Midyeler '*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck' Üzerinde Biyolojik ve Ekolojik araştırmalar. Ege Üniversitesi. Fen Fakültesi, İlmi Raporlar Serisi, 79.

Valavanidis A., Vlahogianni T., Dassenakis M., Scoullos M.J., 2007. Integrated Use of Biomarkers (Superoxide Dismutase, Catalase and Lipid Peroxidation) in Mussels *Mytilus galloprovincialis* for Assessing Heavy Metals Pollution in Coastal Areas from the Saronikos Gulf of Greece. Marine Pollution Bulletin, 54: 1361-1371.

Vallae B.L., 1959. Zinc Metabolism in Hepatik Dysfunction. Annal of lnternal Medicine, 50: 1077-1091.

Van Der Oost R., Beyer J., Vermeulen N. P. E., 2003. Fish Bioaccumulation and Biomarkers in Environmental Risk Assessment: A Review. Environmental Toxicology and Pharmacology, 13:57-149

Van Haaften R.I., Evelo C.T., Penders J., Eijnwachter M.P., Haenen G.R., Bast A., 2001. Inhibition of Human Glutathione S-transferase P1-1 by Tocopherols and Alphatocopherol Derivatives. Biochemica et Biophysica Acta. 1548(1): 23-28.

Vaseur P., Doyotte A., Cossu C., Jacquin M.C., Babutb M., 1997. Antioxidant Enzymes, Glutathione and Lipid Peroxidation as Relevant Biomarkers of Experimental or Field Exposure in the Gills and the Digestive Gland of the Freshwater Bivalve *Unio tumidus.* Aquatic Toxicology, 39: 93-110

Vasseur P., Cossu C., Doyotte A., Babut M., Exinger A., 2000. Antioxidant Biomarkers in Freshwater Bivalves, *Unio tumidus*, in Response to Different Contamination Profiles of Aquatic Sediments. Ecotoxicology and Environmental Safety, 45: 106-121.

Velioğlu S., 2000. Doğal Antioksidanların İnsan Sağlığına Etkileri. Gıda, 25 (3): 167-176.

Viarengo A., Canesi L., Pertica M., Livingstone D.R., 1991. Seasonal Variations in the Antioxidant Defence Systems and Lipid Peroxidation of the Digestive Gland of Mussels. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 100 (1/2): 187-190.

Vidal-Linan L., Bellas J., 2013. Practical Procedures for Selected Biomarkers in Mussels, *Mytilus galloprovincialis*-Implications for Marine Pollution Monitoring. Science of the Total Environment, 461-462: 56-64.

Vidal-Liñán L., BellasJ., Campillo J.A., Beiras R., 2010. Integrated Use of Antioxidant Enzymes in Mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for Monitoring Pollution in Highly Productive Coastal Areas of Galicia (NW Spain). Chemosphere 78: 265-272.

Vincent A.M., Russell J.W., Low P., Feldman E.L., 2004. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. Endocinology Review, 4: 612-628.

Woodhead R.J., Law R.J., Matthiessen P., 1999. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Surface Sediments Around England and Wales, and Their Possible Biological Significance. Marine Pollution Bulletin, 38 (9): 773–790.

Yallampalli D.V.M., Smith M.B., Sharon M.S., 1994. Steroid Hormones Modulate the Production of NO and Cgmp in the Rat Uterus. Endocrinology. 134(4):1971-1974.

Yazkan M., Özdemir F. Gölükçü M., 2003. Antalya Körfezinde Avlanan Bazı Yumuşakçalar ve Karideste Cu, Zn, Pb ve Cd İçeriği. Gıda, 28(6): 637-642.

Yining B., Wenbo Z., Zheng Z., Zhengshan and Wang Z., 2011. Antioxidant Property *in vivo* of Cheese Whey Enzymatic Hydrolysates. The 5 th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, May 2011, Wuhan, China 1-4 p.

Young I.S., Woodside J.V., 2001. Antioxidants in Health and Disease. Journal of Clinical Pathology. 54:176-186.

Yüzügüllü Y., Ögel B.Z., 2013. Çift Aktiviteli Katalaz-Fenol Oksidazın ve Diğer Katalazların Gıda Sanayisindeki Önemi. Gıda, 38 (2): 111-118.

http://www.bluemirrow.com/showthread.php?t=1042

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Gülsüm AKKUŞ

Doğum Yeri : Zonguldak

Doğum Tarihi : 04/02/1989

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen EdebiyatFakültesi, Biyoloji Bölümü (2009-2013)

Yüksek Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı (2013-2016)

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce (C2 Advanced)

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

1. Akkuş G. ve Yağan B.D., 2014. Kazdağı'nda (Çanakkkale) Doğal Yayılış Gösteren *Hypericum perforatum* L., *Hypericum perfoliatum* L. ve *Hypericum tetrapterum* Fries. Taksonlarının Ekolojik İsteklerinin Karşılaştırmalı Olarak İrdelenmesi. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran, Eskişehir, 945 p.
2. Akkuş G., Dinç A.G. ve Demir N., 2014. Geçmişten Günümüze En Büyük Mollusca Üyeleri. 21. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, 1-4 Eylül, Trabzon, 62 p.
3. Akkuş G., Bozyel M.E., Dinç A.G. ve Gönüz A., 2014., Japon Eriği (*Prunus salicina* Lindl.) Bahçesinden Alınan Toprak Örneklerinde Pestisit Uygulamalarının Genotoksisitesinin Belirlenmesi. 21. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, 1-4 Eylül, Trabzon, 97 p.
4. Akkuş, G. ve Demir N., 2015. Umurbey Baraj Gölü'nde (Çanakkale) Kirliliğin *Vicia faba* L. Kök Ucu Kromozom Aberasyon Testi ile Belirlenmesi. II. Ulusal Botanik/Bitki Bilimi Kongresi, 25-28 Ağustos, Afyon, 115 p.
5. Akkuş, G. ve Demir N., 2015. *Rhamnus catharticus* L. Bitkisinin *Allium cepa* L. Testi ile Genotoksik Etkisinin Araştırılması. II. Ulusal Botanik/Bitki Bilimi Kongresi, 25-28 Ağustos, Afyon, 84 p.

KATILDIĞI PROJELER

Çanakkale Boğazı (Kepez) Midye [*Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)] Örneklerinde Ağır Metal (Cd, Pb, Cu, Zn, Fe) ve Temel Antioksidant Enzim Düzeylerinin Mevsimsel Değişimi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) 2015-413.

İŞ DENEYİMİ

Stajyer Acıbadem Sağlık Grubu, Patoloji Bölümü, Altunizade-İstanbul

(20/06/2012-08/09/2012).

İLETİŞİM

E-posta Adresi: gulsummakkus@gmail.com