

T. C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
DENİZ BİLİMLERİ VE İŞLETMECİLİĞİ ENSTİTÜSÜ

GENOTOKSİK TESİRİN, *Mytilus galloprovincialis*'DE
GELİŞTİRİLMİŞ RAPD-PCR,
YÖNTEMİ İLE TAKİBİ

DOKTORA TEZİ

M. Sc. İ. İrem UZONUR

Fiziksel Oşinografi ve Deniz Biyolojisi Anabilim Dalı

169000

Danışman

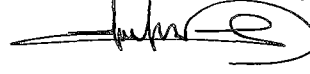
Doç. Dr. Erdoğan OKUŞ

ŞUBAT, 2005

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
DENİZ BİLİMLERİ VE İŞLETMECİLİĞİ ENSTİTÜSÜ

İ. İREM UZONUR tarafından hazırlanmış ve sunulmuş bu tez **FİZİKSEL OŞİNOGRAFI VE DENİZ BİYOLOJİSİ** Anabilim Dalında **DOKTORA** Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı
Doç. Dr. ERDOĞAN OKUŞ



Jüri Üyesi
Prof. Dr. MERAL BİRBİR



Jüri Üyesi
Prof. Dr. SABRİ SÜMER



Jüri Üyesi
Prof. Dr. HALİL İBRAHİM SUR



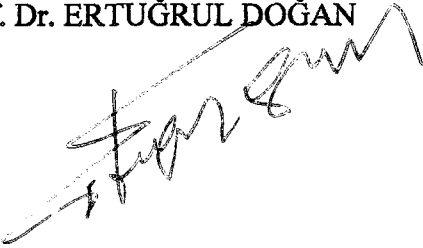
Jüri Üyesi
Yard. Doç. Dr. AHSEN YÜKSEK



Ana Bilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. HALİL İBRAHİM SUR



Enstitü Vekil Müdürü
Prof. Dr. ERTUĞRUL DOĞAN



İÇİNDEKİLER	Sayfa
ÖNSÖZ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TABLO LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ	v
KISALTMA LİSTESİ	vi
I. GİRİŞ	1
1.1. Çalışmanın Amaç ve Kapsamı	1
II. SU ORTAMLARINDA KİRLİLİK	4
2.1. Su Ortamlarında Kirlilik Takibi Metodları ve Biyomarkörler	4
2.1.1. Kanserojenite, mutajenisite, genotoksisite değerlendirme testleri	6
2.2. Moleküler Biyomarkörler	7
2.2.1. Kirlilik değerlendirmelerinde “hedef organ toksisitesi”	8
2.2.2. İstenmeyen DNA bileşikleri (DNA-Adduct)	10
2.2.3. DNA Değişiklikleri	14
2.2.4. DNA Hasarı	14
2.2.5. Mutasyonlar	15
2.3. Marmara Denizi’nde Kirlilik	16
2.4. Marmara Denizi’nde Kirlilik Konulu Çalışmalar	20
III. GENOTOKSİSİTE DEĞERLENDİRMELERİ	24
3.1. Genotoksisite Nedir?	24
3.2. Genotoksik Kimyasalların Metabolizması	24
3.3. Çok Aşamalı Bir Süreç Olarak Kanserojenizasyon	25
3.4. Mutajenez ve Kanserojenizasyon	26
3.4. Kirlilik ve Mutasyon Hızı Bağlantısı	29
3.5. Mozaiklik ve Anlamı	29
3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Rastgele Amplifiye Polimorfik DNA-PCR (RAPD-PCR)	30
3.6.1. RAPD-PCR ve genotoksisite değerlendirmede uygulamaları	36
IV. <i>Mytilus galloprovincialis</i>	37
4.1. Midyelerin Morfolojisi ve Biyolojisi	37
4.2. Anatomisi	39
4.2.1. Midyelerde yaş tayini	42
4.3. Dağılımı	44
4.4. Beslenmesi	45
4.5. Hareket	46
4.6. Üremesi	46
4.7. <i>Mytilus</i> Türleri ile Yapılan Kirlilik Takip Çalışmaları	51
4.7.1. “Midye gözlem” çalışmaları	52
4.7.1.1. Dünyada “Midye-gözlem” çalışmaları	53
4.7.1.2. Türkiye’de “Midye-gözlem” çalışmaları	54

4.7.2. <i>Mytilus galloprovincialis</i> 'in genotoksik tesiri takip için bir model olarak	55
değerlendirilmesi	55
V.MATERYAL ve METOD	56
5.1.Materyal	56
5.1.1. <i>Mytilus galloprovincialis</i> örnekleri.....	56
5.1.2. Cihazlar.....	59
5.1.3. DNA izolasyon kimyasalları.....	61
5.1.4. RAPD-PCR kimyasalları	61
5.1.4.1.Oligonükleotid primerler	61
5.1.5. Jel elektroforez kimyasalları.....	62
5.1.5.1. Denature edici poliakrilamit jel	62
5.1.5.2. Agaroz jel.....	62
5.1.6. DNA Görüntüleme kimyasalları.....	63
5.2. Metod.....	63
5.2.1. Midye örneklerinin toplanması.....	63
5.2.2. DNA izolasyonu	64
5.2.3. RAPD-PCR.....	65
5.2.3.1. RAMD-PCR.....	67
5.2.4. Jel elektroforezi.....	69
5.2.4.1. Denature edici poliakrilamit jel elektroforezi.....	69
5.2.4.2. Agaroz jel elektroforezi	70
5.2.5. DNA Boyama ve görüntüleme	71
5.2.6. Veri analizi.....	72
VI. BULGULAR	73
6.1. <i>Mytilus galloprovincialis</i> 'in genetik çeşitliliği (diversity) ve heterojenliği	73
6.2. <i>Mytilus galloprovincialis</i> 'in farklı kirlilik stresleri etkisinde birey içi DNA değişimlerinin RAMD-PCR ile tespiti.....	74
6.3. <i>Mytilus galloprovincialis</i> 'in boy'a bağlı DNA değişiminin RAMD-PCR tespiti .	76
6.4. DNA değişimi indeksi (DDI) tayini.....	77
6.5. Farklı doku DNA değişimleri	80
6.6. DNA değişim sürecinin başka deniz ve kara türlerinde de gösterilmesi	82
6.7. Bulguların istatistiksel ve kantitatif değerlendirmesi	83
VII. TARTIŞMA ve SONUÇ	90
KAYNAKLAR	98
İNTERNET ADRESLERİ.....	111
ÖZGEÇMİŞ	112

ÖNSÖZ

Bu çalışma deniz kirliliğinin genotoksik tesirlerinin moleküler düzeyde incelenmesi konusunda Türkiye ve dünyada henüz kullanılmamış yeni yaklaşımlar içermektedir. Çalışmanın geliştirilmesi ve sonuçlandırılmasında danışmanım Sayın Doç. Dr. Erdoğan Okuş ve tez izleme jürimde bulunan hocalarım Sayın Prof. Dr. Meral Birbir ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Ahsen Yüksek çok değerli fikri ve ilmi katkılarda bulunmuşlardır. Branş dışı bir gözle yaptığı değerli eleştirileri ile Bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Halil İbrahim Sur; deniz canlıları biyokimyası ve toksikoloji derslerindeki ve yeterliliğindeki yönlendirmeleri ile istikamet ve destek aldığım Sayın Prof. Dr. Kasım Cemal Güven çalışmanın ilmi ve fikri altyapısının oluşturulmasında katkıda bulunmuşlardır. Adı geçen hocalarıma ve ilkokuldan itibaren bütün öğretmenlerime ilmi, fikri ve manevi tüm katkıları için teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmanın moleküler biyoloji ve genetik tekniklerinin uygulanması aşamalarında 1999-2002 Haziran'a kadar Fatih Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü araştırma laboratuvarları ve imkanları, bu tarihten tezimin bitimine kadar da Fatih Koleji Araştırma Laboratuvarı imkanları kullanılmıştır. Bu imkanları kullanmamda yardımcı olan Fatih Üniversitesi Öğretim Üyelerinden başta Prof. Dr. Münir Öztürk, Prof. Dr. Fahrettin Gücin ile özellikle verilerin analizi aşamasında çok büyük yardımlarını gördüğüm Araştırma Görevlisi Sayın Fatih Abasıyanık'a, Fatih Koleji yöneticileri Sayın Talip Büyük, Mustafa Kara ve bu çalışmaların en başından beri, kurdukları laboratuvarlarının imkanlarını bana kullandıran ve çok büyük yardımlarını gördüğüm Sayın Dr. Mustafa Petek Bey'e teşekkürü bir borç bilirim.

Annem, Tülay Müftüoğlu, Babam, Prof. Dr. Ferruh Müftüoğlu, Eşim Dr. Onur Uzonur ve Oğlum Kerem'e tezimin her aşamasındaki maddi, manevi desteklerinden dolayı; Kardeşlerim Ali Ekrem ve Edip Müftüoğlu'na da tezi formata uydurmadaki katkılarından dolayı teşekkür ediyorum.

ÖZET

Deniz kirliliğinin DNA üzerindeki etkilerini tespit edebilen, rutin bir yöntem mevcut değildir. Kirliliğin uzun dönemdeki genotoksik etkinin tespiti amaçlanan çalışmamızda, dünya ve Türkiye denizlerinde yaygın bir tür olan ve midye izleme çalışmalarının da vazgeçilmez model organizması *Mytilus galloprovincialis* kullanılmıştır.

Bu çalışmada, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) PCR tekniğinin yeni bir uygulaması yapılarak midye modelinde ve çeşitli organizmalarda DNA hasarının belirlenmesi için rutin analizlerde de kullanılabilir bir yöntem olan, Rastgele Çoğaltılmış Mozaik DNA-PCR (RAMD-PCR) oluşturulmuştur. Marmara Denizi'nde muhtelif tipteki zenobiyotiklerin genotoksik etkilerinin tespiti için midye RAPD profillerinde meydana gelen nitel ve nicel modifikasyonlar genotoksik tesir indikatörü olarak kullanılmıştır.

Sonuç olarak, çeşitli zaman ve miktarlarda *in vivo* kirliliğe maruz kalan midyelerin RAPD profillerinde kirlilik maruziyeti ve midye boyutu ile paralellik gösteren nitel ve nicel modifikasyonlar gözlemlenmiştir. Yaklaşımın ve *Mytilus galloprovincialis*'in, toplam *in vivo* kirliliğin, deniz sistemlerindeki genotoksik etkilerinin incelenmesi için verimli olarak kullanılabilirliği gösterilmiştir.

ABSTRACT

There is not a routine application that can assess the direct adverse effects of marine pollution on DNA. *Mytilus galloprovincialis* which is a widespread mussel species in world and Turkish Seas and the sentinel organism of “Mussel Watch” studies have been employed to evaluate the chronic genotoxic effects of marine pollution.

In this work, a novel Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) approach which can be routinely applied in biomonitoring the DNA damage in *Mytilus galloprovincialis* and other aquatic and terrestrial organisms has been evaluated. The Random Amplified Mosaic DNA-Polymerase Chain Reaction RAMD-PCR technique which is proposed in this theses has been used to assess the genotoxic effects of the pollution in the Sea of Marmara as qualitatively and quantitatively detectable variations in the RAPD-PCR profiles of exposed and non-exposed *Mytilus galloprovincialis*.

In conclusion, exposure periods and the amounts of *Mytilus galloprovincialis* to *in vivo* sea pollution was assessed as qualitative and quantitative RAPD profile modifications which can be evaluated by RAMD-PCR as proposed in this theses. Our proposed method together with *Mytilus galloprovincialis* as a model organism has proved to be cheap, easy, useful and could be routinely applicable in genotoxicity biomonitoring studies in aquatic systems.

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.	Zararlı maruziyeti ve tesiri değerlendirmede rutin analiz biyomarkörler.....	5
Tablo 2.	Genotoksisite, mutajenisite, kanserojenite değerlendirme testleri	7
Tablo 3.	Odessa banklarındaki midyelerde büyüme.....	44
Tablo 4.	“Midye gözlem” çalışmaları.....	53
Tablo 5.	<i>Mytilus galloprovincialis</i> örneklemelerinin yapıldığı lokasyonlar, midyelerin büyüklükleri, ve örnekleme dönemleri.....	56
Tablo 6.	Kullanılan primerlerin ticari isim ve dizileri	61

Şekil 1.	<i>In vivo</i> sistemlerde Benzo[a]pyrene aktivasyonu ve DNA hasarı oluşturmada adı geçen muhtemel rotalar	11
Şekil 2.	Benzo[a]pyrene diol epoxide <i>BPDE</i> DNA- <i>adduct</i> oluşumları.....	12
Şekil 3.	DNA hasar mekanizmaları.....	12
Şekil 4.	Kanserojen DNA- <i>adduct</i> 'lerinin kimyası.....	13
Şekil 5.	Çevresel etkilerle oluşan DNA hasarına hücre sel cevap.....	15
Şekil 6.	Toksik maddelerin canlıdaki etkileşimleri.....	27
Şekil 7.	Kanser oluşumunda mutagenез hipotezi.....	28
Şekil 8.	PCR'ın şematize gösterimi.....	32
Şekil 9.	RAPD-PCR şematize gösterimi.....	33
Şekil 10.	RAPD-PCR metoduna ait şekil.....	35
Şekil 11.	Midye'nin iç görüntüsü.....	39
Şekil 12.	Midye kabuklarının üstten görünüşü	40
Şekil 13.	Midye kapama kası.....	40
Şekil 14.	Midye ayak.....	41
Şekil 15.	Midye manto.....	41
Şekil 16.	Midye solungaçlar.....	41
Şekil 17.	Midye mide.....	41
Şekil 18.	Bisal beze ve bisus iplikçiği	42
Şekil 19.	RAMD-PCR yaklaşımının şematik gösterimi.....	68
Şekil 20.	Midye'nin, heterojen genetik yapısı	74
Şekil 21.	Farklı kirlilikte istasyonlardan toplanan küçük boy midyelerin OPB18 primeri ile 3xRAMD-PCR profilleri.....	75
Şekil 22.	Aynı ve farklı bir istasyondan küçük boy midyelerin ve büyük boy bir midyenin OPB18 primeri ile 3xRAMD-PCR profil karşılaştırılması	75
Şekil 23.	Aynı ve farklı istasyonlardan büyük ve küçük boy midyelerin OPB18 primeri ile 3xRAMD-PCR profil karşılaştırılması.....	76
Şekil 24.	Denature edici jel elektroforezi ve gümüş boyama 3xRAMD-PCR profili..	78
Şekil 25.	5xRAMD-PCR yaklaşımı ile birey içi DNA mozaikliğinin tespiti.....	79
Şekil 26.	M80 no'lu 0.5 cm boyundaki Saros midye DNA'sının OPB18 primeri ile 20xRAMD-PCR profili.....	79
Şekil 27.	M73 no'lu 6.55 cm boyundaki Saros midye DNA'sının OPB18 primeri ile 20x RAMD-PCR profili.....	80
Şekil 28.	Midye farklı organlarının 4xRAMD-PCR profilleri	81
Şekil 29.	Farklı doku ve canlıların RAMD-PCR profilleri.....	82
Şekil 30.	Elektroforez profil bantlarının belirlenmesi.....	85
Şekil 31.	Dice benzerlik matrisi.....	86
Şekil 32.	Benzerlik ve farklılaşma dendrogramı.....	86
Şekil 33.	Dendrogramlar.....	87
Şekil 34.	Benzerlik dendrogramı.....	88
Şekil 35.	Farklılaşma dendrogramı.....	89

KISALTMA LİSTESİ

ACME	: Advisory Committee on the Marine Environment
ASSK	: Adalar Su Sporları Kulübü Derneği
BaP	: Benzo[a]pyrene
BOD	: Biological oxygen demand
CIESM	: International Commission For The Scientific Exploration Of The Mediterranean Sea
CYP1A	: Cytochrome P450, family 1, subfamily a, polipeptid 1
ÇNAEM	: Çekmece Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoxyribonucleotide
EDTA	: Ethilendiamin tetraasetik asit
EGP	: The Environmental Genome Project
ELİZA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EtBr	: Ethidium Bromide
G6PDH	: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
GST-A	: Glutasyon S-transferaz-A
IARC	: International Agency for Research on Cancer
ICES	: International Council for the Exploration of the Sea
İBB	: İstanbul Büyük Şehir Belediyesi
LC50	: Öldürücü konsantrasyon 50 (Lethal Concentration 50)
MDR/MXR	: Multidrug resistant /multixenobiotic resistance
MT	: Metallothionein proteini
NIEHS	: National Institute of Environmental Health Sciences
NOAA	: National Oceanographic and Atmospheric Administration
PAH	: Polisiklik aromatik hidrokarbonlar
PCB	: Polychlorinated Biphenyls
PCR	: Polymerase Chain Reaction
RAMD	: Random Amplified Mosaic DNA
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA
RIA	: Radio immune assay
RNA	: Ribonükleik asit
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	: Tris Borik Asit EDTA
UV	: Ultra viyole
TSCA	: Toxic Substances Control Act
TSS	: Total suspended solid
UPGMA	: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
VTG	: Vitellogenin proteini

I. GİRİŞ

1.1. Çalışmanın Amaç ve Kapsamı

Bu tez toplam deniz kirliliğinin değerlendirilmesi için yeni bir izleme tekniği geliştirmeyi amaçlamaktadır. Temel yaklaşımı, kirliliğin deniz canlıları üzerindeki mutasyon yapıcı etkisini tesbit ederek ve bu etkiyi derecelendirerek, canlının yaşadığı deniz ortamındaki toplam genotoksik kirlilik hakkında fikir sahibi olunabilecek, pahalı olmayan, hızlı bir metodun geliştirilebilmesidir. Metod, hedef deniz canlılarındaki mutasyonların tespiti vasıtası ile doğrudan doğruya içerisinde yaşanan ortamın kirlilik derecesi hakkında bilgi sahibi olmayı mümkün kıldığından, kirlilik değerlendirilmesinde kullanılan dolaylı diğer metodlardan farklılık göstermektedir *(Atienzar, v.d., 1998; Atienzar, v.d., 2000; Atienzar, v.d., 2002a; Atienzar, v.d., 2002c; Albertini, v.d., 2000; Sponza, 2003; Dong, v.d., 2000; Monis, v.d., 1998; Gollapudi, v.d., 2000; Canesi, v.d., 2002; Micic, v.d., 2001; Canova, v.d., 1998; Peters, v.d., 2002; Ulupınar, v.d., 2002; Karekar, v.d., 2000; Eder, v.d., 2000; Gichner, v.d., 2000; Hemminki v.d., 1996; Stoelting, v.d., 2000; Karakoc, v.d., 1998; Akcha, v.d., 2000; Beneden, v.d., 1997).

Amerikan zehirli madde kontrol yasası'nın (TSCA-Toxic Substances Control Act) ihtiva ettiği 72000 kimyasal madde mevcuttur. Bu maddeler, öncelikle insan sağlığına yaptığı etkiler ve daha sonra da ekolojik sisteme yönelik etkileri açısından incelenmektedir. Açıkça görülüyor ki bu kadar çok sayıdaki kimyasalın ancak öncelik sırasına konmak suretiyle incelenmesi mümkün olabilir. Üstünde durulan bir çözüm senede 4.5 tondan daha fazla miktarda üretilen, TSCA tarafından listelenmiş 14000 polimer olmayan kimyasalın incelenmesidir **. Ne var ki 14000 kimyasalın sağlığa etkileri açısından taranması da yeni bir sıralamayı gerektirir. Bunun bir yolu, insan üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde anahtar rol oynayan "kimyasala maruz kalma etkileri"nin belirlenmesidir. Bu belirleme de, en doğru şekilde, maruz kalan kişilerde biyomarkörlerin değerlendirilmesi yoluyla yapılabilir. Biyomarkör kavramı çok geneldir. Asıl olan bu kavramı canlı bir sistemi kullanarak çeşitli

* www.CIIT

** <http://www.epa.gov/region5/defs/html/tsca.htm>

parametreleri takip edebilmek için kullandığımızdır. Takip edilebilecek parametreler, bu parametrelerin kirlilik tesirinde olanları ve dolayısıyla da biyomarkörlerin ulaşabileceği sayı hayal gücümüzle sınırlıdır.

Deniz ortamlarında kirlilik tespitiyle ilgili çalışmalar genelde suyla ilgili fiziksel ve kimyasal parametrelerin ölçülmesine dayanmakta, canlılar üzerindeki etkilerinin tespiti ise, model olarak seçilen deniz canlılarının üzerinde kinetik deneyleri ile ve bir takım kabuller altında temelde toksisiteye dayalı olarak yapılmaktadır. Böylelikle, kirlilik çoğunlukla laboratuvar koşullarında (*in vitro*) gerçekleştirilen ölçümlerle, sadece toksik etkinin rahatlıkla tesbit edildiği ekstrem düzeyde, model canlıya dışarıdan uygulanmış belirli toksinler için tesbit edilebilmektedir (Atienzar, v.d., 2000; Atienzar, v.d., 2001; Atienzar, v.d., 2002b; Atienzar, v.d., 2002c; Jaksic, v.d., 2003; Bahy, 2003; Luceri, v.d., 2000; Gold, v.d., 2001; Festa, v.d., 2003; Iliopoulou-Georgudaki, v.d., 2003; Theodorakis, v.d., 1999; Khessiba, v.d., 2001; Kaaya, v.d., 1999; Camacho, v.d., 2000; Nadig, v.d., 1998; Akcha, v.d., 1999; Akcha, v.d., 2000; Piccardo, v.d., 2001; Baumard, v.d., 1998; Adamo, v.d., 1997; Regoli, 2000; Anderson, v.d., 1999; Binark, v.d., 2000; Jeng, v.d., 2000; Goldberg, v.d., 2000; Chase, v.d., 2001; Güngör, v.d., 2001; Ulupınar, v.d. 2002; Lafontaine, v.d., 2000; Pollet, v.d., 1999; Karakoç, 1997; Vidal, v.d., 2000; Karakoç, v.d., 1997).

Bir diğer yaklaşım da, yine dolaylı yoldan bir kısım özel test organizmalarıyla toplam kirliliğin mutajen etkilerinin ölçülmesidir. Dr. B. Ames tarafından geliştirilmiş ve Ames Testi olarak da adlandırılan *Salmonella* mikrozom test sistemi, kimyasal maddelerin mutajenik etkilerinin araştırılmasında en yaygın olarak kullanılan, test parametreleri açısından en iyi standardize edilmiş ve mutajen kanserojen etkisi en iyi bilinen kimyasallar ile geçerliliği en fazla kabul edilmiş, kısa zamanlı bakteriyel test sistemlerinden bir tanesini oluşturmaktadır (Maron ve Ames, 1983; Hofnung ve Quillardet, 1986; Venitt, v.d., 1986; Quillardet ve Hofnung, 1985). Bu test sisteminde *S. typhimurium*'un LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlarla elde edilmiş bir seri *S. typhimurium* mutant suşları kullanılmaktadır (Maron ve Ames, 1983).

Kimyasal olarak indüklenmiş mutasyonların, hücre düzeyinde belirlenmesinde kullanılan kısa zamanlı *in vitro* mutajenite test sistemlerinden en önemlisi Ames-*Salmonella*/mikrozom

test sistemidir (Kier, 1985). Test bakterileri histidin operonlarında, farklı yerlerde ve farklı tipte mutasyon taşımaktadırlar. Bu nedenle histidin amino asiti olmayan ortamlarda çoğalmamaktadırlar (Maron ve Ames, 1983). Kimyasal maddelerin mutajenik potansiyelleri ve özelliklerine bağlı olarak test suşlarının histidin operonlarında meydana getirdikleri mutasyonlar ile test suşları tekrar his+ hale geri dönüştürülmektedir (Back reversion) (Levin, v.d., 1982).

Salmonella/mikrozom test sistemi kimyasal maddelerin mutajenitesinin saptanmasında oldukça geniş bir uygulama alanı bulmuştur (Maron ve Ames, 1983; Quillardet ve Hofnung, 1993; Petek, 1999). Bu yöntemin bir modifikasyonu ile 2-asetil aminoflorenin mutajenik metabolitleri idrarda saptanabilmiştir (Durston ve Ames, 1974; Commoner, v.d., 1974; Karekar, v.d., 2000).

Disiplinler arası konularda, teoride bilinenleri pratiğe geçirmek, pratikte olanların teoriye uygunluğunu test edebilmek, ve deniz kirliliği, kirlilik takibi, DNA'da değişim, tür çeşitliliği, model organizma, biyomonitöring gibi objektif kriterler kullanılarak tanımlanmaları zor kavramlar girince içinden çıkılmaz hale gelebilmektedir. Bu çalışmada öncelikli olarak pratik, kalitatif ve görsel bir metod oluşturmak hedeflenmiştir.

Çalışmanın amacı, model canlı olarak midye (*Mytilus galloprovincialis*) DNA'sını kullanarak kirlilik etkisiyle DNA'da oluşan hasarı ve değişikliklerini doğrudan tespit edebilmektir. DNA değişimini farklı canlılar ve kirlilik tipleri için gösterebildiği düşünülen çeşitli avantaj ve dezavantajları olan RAPD-PCR yöntemi esas alınarak çalışma planlanmıştır. Çalışma sırasında ihtiyaçlar doğrultusunda düşünülerek daha önce hiç yapılmamış pratik bir yaklaşımla metod yenilenmiş ve yeni haliyle özellikle DNA'daki kirlilikten kaynaklanan değişimi, mozaik yapıyı tespit ettiğimiz RAMD-PCR yaklaşımı oluşturulmuştur. Deniz kirliliğinin genotoksik etkisini izlemek için midyenin model olarak kullanıldığı çalışmamızda "Midye-izleme" çalışmaları kapsamında rutin olarak genotoksik etki taraması için uygulanabilir bir metod ortaya konulmuştur.

II. SU ORTAMLARINDA KİRLİLİK

Bu çalışmanın amaç ve kapsamı doğrultusunda kirliliğin hem tespiti, hem de takibi ayrı ayrı önem taşımaktadır. Aşağıdaki başlıklar su ortamlarında kirliliğin tespit edilmesi ile ilgili yapılmakta olan çalışmaları ve örnekleme bölgemiz olan Marmara Denizi ve bağlantılı sistemlerde genel kirlilik durumu ve değerlendirme çalışmalarına yer verirken, çalışmamızın teorik altyapısını oluşturan istenmeyen DNA-bileşikleri (DNA-adduct) oluşumu, mutasyon, hedef organ toksisitesi gibi kavramları da içermektedir.

2.1. Su Ortamlarında Kirlilik Takibi Metodları ve Biyomarkörler

Biyokimyasal, fizyolojik, moleküler veya diğer tiplerde biyolojik değişimler zenobiyotik maddelerin varlıklarını veya tesirlerini çeşitli canlılarda tespit ve takip etmemizi sağlarlar. Bu amaçla kullanılan biyolojik göstergelere biyomarkör denmektedir.

Biyomarkörler su türlerinde de farklı tipte stresleri tespit için kullanılmaktadır. Stres kaynakları: kimyasalları, metalleri, çevresel kirleticileri, ısı değişimlerini ve çevredeki diğer değişimleri kapsamaktadır. Biyomarkörler ise bu sıkıntıları ve etkilerini değerlendirmek için kullanılan göstergelerdir. Kullanılmakta olan bir çok farklı biyomarkör vardır. Bunlar biyokimyasal ve hücrel biyomarkörlerden, fizyolojik indikatörlere ve ekosistem takibine kadar çok çeşitlilik göstermektedirler.

Biyomarkör seçimi uygulanacak alanın kendine özgü şartlarına bağlıdır. Biyomarkörleri sınıflandıracak olursak (Iliopoulou-Georgudaki, v.d., 2003; Karakoç, v.d., 1997; Khessiba, v.d., 2001; Kaaya, v.d., 1999; Camacho, v.d., 2000; Akcha, v.d., 2000; Regoli, 2000; Anderson, v.d., 1999; Guieysse, v.d., 2001; Canesi, v.d., 1999; Canesi, v.d., 2002; Canova, 1998; Peters, 2002; Ulupınar, v.d., 2002; Lafontaine, v.d., 2000; Hodgson, v.d., 1998; Hahn, v.d., 1999; Karekar, v.d., 2000; Eder, v.d., 2000; Chen, v.d., 1999; Karakoç, 1997; Hemminki, v.d., 1996; Petek, 1999, Akcha, v.d., 2000; Karakoç, v.d., 1998; Karakoç, v.d., 1997):

1. Proteinler ve enzimler

- a. Sitokrom P-450 monooksijenazlar
 - b. Stres proteinleri
 - c. Faz 2 enzimleri
 - d. Antioksidanlar
 - e. Diğer potansiyel protein ve enzim biyomarkörleri
2. Biyokimyasal biyomarkörler
 - a. Zenobiyotik kimyasalların metabolitleri
 - b. Endojen metabolitler
 3. Moleküler Biyomarkörler
 - a. DNA değişiklikleri
 - b. Hormonların moleküler etkileri
 4. İmmünolojik Biyomarkörler
 5. Histopatolojik İndikatörler

Yukarıdaki genel kategorizasyona bir başka açıdan bakıldığında Tablo 1 kirlilik takibinde kullanılmakta olan biyomarkörlerle ilgili verileri toplamaktadır.

Tablo 1. Zenobiyotiklere maruziyeti ve zenobiyotiklerin tesirini değerlendirmede rutin analiz biyomarkörleri

Biomarkör/Test, Assay	Takibi
Lizozomal dayanıklık ^{a#} (örnek: mollusk kan hücreleri ve tek hücreli algler)	Genel sağlık bozulması, patoloji ve su kalitesi için prognostic takip
Beta karoten, vitamin A, E ve C (antioksidanlar)	Oksiradikallerin yolaçtığı hasar takibi
Metallothionein	Cu, Cd, Zn ve Hg maruziyeti takibi
Asetilkolinesteraz enzim aktivitesinin düşmesi ^a	Organofosfat ve karbamat maruziyeti takibi
Balık karaciğeri histopatolojisi#	Hem maruziyet hem de patolojik değişimleri takip için
Mikroçekirdek Testi	Genotoksik tesir
Comet Testi ^a	Genotoksik tesir
Özel gen testleri	Genotoksik tesir
Ames mutajenisite testi ^a	Genotoksik tesir
Transgenik balık testleri	Genotoksik tesir
³² P postlabeling assay	Genotoksik tesir, DNA-adduct oluşumu
İmmünoassay (RIA, ELİZA, Western blot)/ CYP1A, MT, VTG	Protein tespiti ve miktar tayini
Northern Blot/ CYP1A, MT, VTG, MDR/MXR <i>ras</i> , <i>myc</i> onkogenleri	mRNA miktar tayini

Tablo 1’de adı geçen biyomarkörlerin # ile işaretli olanı halen Karadeniz’de kirlilik değerlendirme için kullanılmaktadır. ^a ile belirtilen biyomarkörler ve testler göreceli olarak uygulaması daha kolay, hızlı ve ucuz maliyetlidirler * (Mee ve Topping, 1999; Atienzar, v.d., 2002b; Albertini, v.d., 2000; Gold, v.d., 2001)

2.1.1. Kanserojenite, mutajenisite, genotoksisite değerlendirme testleri

Biyomarkörlerden bahsettiğimiz bölüm 2.1’de yer almayan ancak çalışmamızda ortaya konulan yaklaşımın sınırlarını çizmemizde gerekli olan kronik kirliliğin değerlendirilmesinde önemli ve öncelikli olan kavramlardan genotoksisite, mutajenisite ve kanserojenisite ile bu durumların birlikte veya ayrı olarak değerlendirilebildikleri günümüzde uygulanmakta olan testler ve yaklaşımlar Tablo 2’de özetlenmiştir.

Genotoksisite, mutajenisite ve kanserojenisite kavramlarını kapsayan, genetik materyalde oluşan her türlü toksik tesirdir. Mutajenisite veya mutagenез, mutasyon oluşturma etkisi veya mutasyon oluşmasıdır; mutasyonlar ise DNA’da meydana gelen kalıtsal nitelikte yapısal değişiklikler olarak tanımlanabilir. Mutasyonlar, oluş biçimleri ve koşulları, meydana geldikleri hücre tipi ya da yol açtıkları durumlara bağlı olarak değişik şekillerde sınıflandırılabilirler. Kanserojenisite ve kanserogenez ise kanser oluşturma etkisi ve kanser oluşması olarak tanımlanabilir. Mutasyonlar, meydana geldikleri hücre tipine göre somatik ve genetik mutasyonlar olarak sınıflanmaktadır. Normal vücut hücrelerini etkileyen somatik mutasyonların birikerek bazı tip kanserlerin oluşmasına sebep oldukları bugün için kabul görmekte olan bir teoridir. Tablo 2’de kronik toksisitenin değerlendirilmesine yönelik testler sürelerine göre uzun ve kısa dönemli olarak sınıflandırılmıştır. Çalışmamızda ortaya koyduğumuz genotoksisite değerlendirmesi yaklaşımı, bu tabloda kısa dönemlik testlerden DNA’ya zararın tespit edildiği testler grubu altına yerleştirilebilir (Uzonur, v.d., 2004a, b, c).

* <http://www.ices.dk/>

Tablo 2. Genotoksisite, mutajenisite, kanserojenite değerlendirme testleri

Uzun Dönemlik Testler
• Klinik gözlem ve epidemiyoloji
• Özellikle kemirgenlerle yapılan biyo-testler
Kısa Dönemlik Testler
DNA'ya zararın tespit edildiği testler:
• Metabolik aktiflenme sonrasında test bileşiğinin, DNA-adduct oluşturmasının tespiti
Kromozoma verilen zararın tespit edildiği testler:
• Sitogenetik yöntemlerle kromozom bozukluklarının tespiti
• Kardeş kromatid değiş tokuşu
• Mikroçekirdek oluşma frekansının tespiti
• Sperm anormalliklerinin değerlendirilmesi
Mutasyonların tespit edildiği testler:
• Bakteriyel mutagenез testleri (<i>Ames Salmonella</i> testi, vd.)
• <i>Drosophila</i> 'da seks kromozomundaki mutasyonların tespiti
Kültür hücrelerinde program dışı DNA sentezinin tespiti
Kültürü yapılan memeli hücrelerinin neoplastik dönüşümünün tespiti

2.2. Moleküler Biyomarkörler

Bu çalışmada, kirliliğin genotoksik tesirini tespit ve takip edebilmeye yarayan, DNA'daki değişiklikleri, RAPD-PCR profillerindeki farklılaşma takibi ile değerlendirebilen moleküler bir biyomarkör ortaya konulmuştur. Bu bağlamda moleküler biyomarkörlerin genel bir değerlendirilmesi yapılmıştır.

DNA'daki değişiklikleri biyomarkör olarak kullanmak fikri oldukça yeni olmakla birlikte, bu teknolojinin zenobiyotik kimyasallara maruziyet ve etkilerini değerlendirme noktasındaki potansiyeli fazladır. Özellikle DNA-adduct oluşumu ve tespit edilebilir DNA değişikliklerinin tespiti, moleküler biyomarkör olarak değerlendirilmektedir. Bağlantılı olarak, hedef organ toksisitesi veya histopatolojik göstergelerden bahsetmek faydalı olacaktır. Bu gösterge veya biyomarkörler genotoksik olan kirleticilerin de bir takım hedef organlarında birikmekte oldukları ve muhtemel genotoksik, mutajenik, kanserojenik tesirleri olduğunu göstermektedirler. DNA'ya çeşitli tipte hücumların ve hasar oluşturan etkenlerin varlığı

bilinmektedir. Hedef organ toksisitesini oluşturan zenobiyotiklerin bir kısmının da DNA'ya hücum ettiği ve hatta DNA ile istenmeyen bileşikler oluşturduğu (DNA-adduct) bilinmektedir. Bu DNA-adductlar daha sonra DNA'nın özellikle kendini eşleme ve tamir mekanizmalarında çeşitli bozulmalara ve nihayetinde kalıcı tipte geri dönüşsüz mutasyon, yani DNA dizi değişikliklerine sebep olabilmektedir. Hücre bölünmesi ile de artarak biriken bu olumsuzluklar, zamanla organizmada tespit edilebilir morfolojik, histopatolojik, genetik ve moleküler sonuçlara dönüşmektedir.

Çeşitli kimyasalların etkileri canlının metabolizmasında ya detoksifiye olmakta ya da biyotransformasyona uğrayıp, daha da aktif metabolitlere dönüşmektedir. Bütün bu metabolik faaliyetlerden sorumlu canlılarda genel olarak metabolizma enzimleri de diyebileceğimiz enzimler mevcuttur. Bu enzimler alınan kimyasala göre bazen seçici, bazen de daha az seçici olarak aktiflenmektedirler. Dolayısı ile bu enzimlerin takibi de, bazı kirliliklerin izlenmesinde biyomarkör olmaktadır.

2.2.1. Kirlilik değerlendirmelerinde “hedef organ toksisitesi”

Hedef organ toksisitesi, bir takım kirleticilerin, belli bir organda veya organa ait özel kısımlarda yeterince yüksek, toksik tesir gösterecek miktara ulaşması ile gerçekleşir. Hücrelerde, dokularda çoğu zaman ışık ve elektron mikroskopu ile de gözlemlenebilen değişimler oluşur. Hedef organ toksisite değerlendirmelerinde balık ve deniz kabuklularında histopatolojik indikatör olarak kullanılmakta olan sistemler aşağıdaki gibidir:

1. Karaciğer: Karaciğer, bir çok toksini en çok biriktiren organdır. Bir çok karaciğer biyomarkörü vardır (Peters, v.d., 2002; Camacho, v.d., 2000):
 - ⇒ Hepatoselüler nekroz
 - ⇒ Hepatositik rejenerasyon (hiperplazi)
 - ⇒ Safra kanal rejenerasyonu
 - ⇒ Hücresel değişikliklerin boyanarak ortaya konulması
 - ⇒ Hepatik adenomlar
 - ⇒ Hepatik karsinomlar

⇒ Hepato-kolanjiyoselüler karsinomlar

2. Rahim: Bu organ çevresel toksikantlara en duyarlılarından. Takip edilen bir çok biyomarkörü vardır.
3. İskelet sistemi: Balıklarda iskelet ve yüzgeç sistemi çalışması solungaçlardan Ca alınımını engelleyen ve C vitamini eksikliğine sebep olan kimyasallara maruziyeti ortaya koyabilmektedir.
4. Deri: Dış etkenlere ve her türlü çevresel strese en duyarlı organlardandır. Çevre ile organizmayı ayıran en dış tabakadır, bazı deniz canlılarında özellikle balıklarda strese verilen deri cevabı mukoza salgılanması şeklindedir ve kolaylıkla tespit edilebilir.
5. Kabuklu deniz canlıları: Kabuklu deniz canlılarında da özellikle sindirim, boşaltım ve solunum epitel hücreleri ile üreme kanalları ve kardiyovasküler sistemler, kimyasal toksikant etkisi ile değişim gösterdiklerinden dolayı biyomarkör dokular olarak kullanılmaktadırlar (Peters, v.d., 2002; Adamo, v.d., 1997; Akcha, v.d., 1999; Akcha, v.d., 2000).
6. Solungaç: Solungaçlar devamlı olarak kirleticilere maruz kalan organlardır. Ama daha çok öldürücü dozlara hassasiyet gösterirler (Domouhtsidou, v.d., 2000). Solungaçlardaki değişiklikler organizma açısından bir telafi mekanizmasının işlemekte olduğunun göstergesidir.
7. İleri göstergeler: Üreme sistemi, merkezi sinir sistemi, sinir sistemi ve kabuklulardaki neoplazmlardır (Gold, v.d., 2001; Jotwani, v.d., 2001; Ong, v.d., 1998; Garnis, v.d., 2004; Luceri, v.d., 2000; Canesi, v.d., 1999).

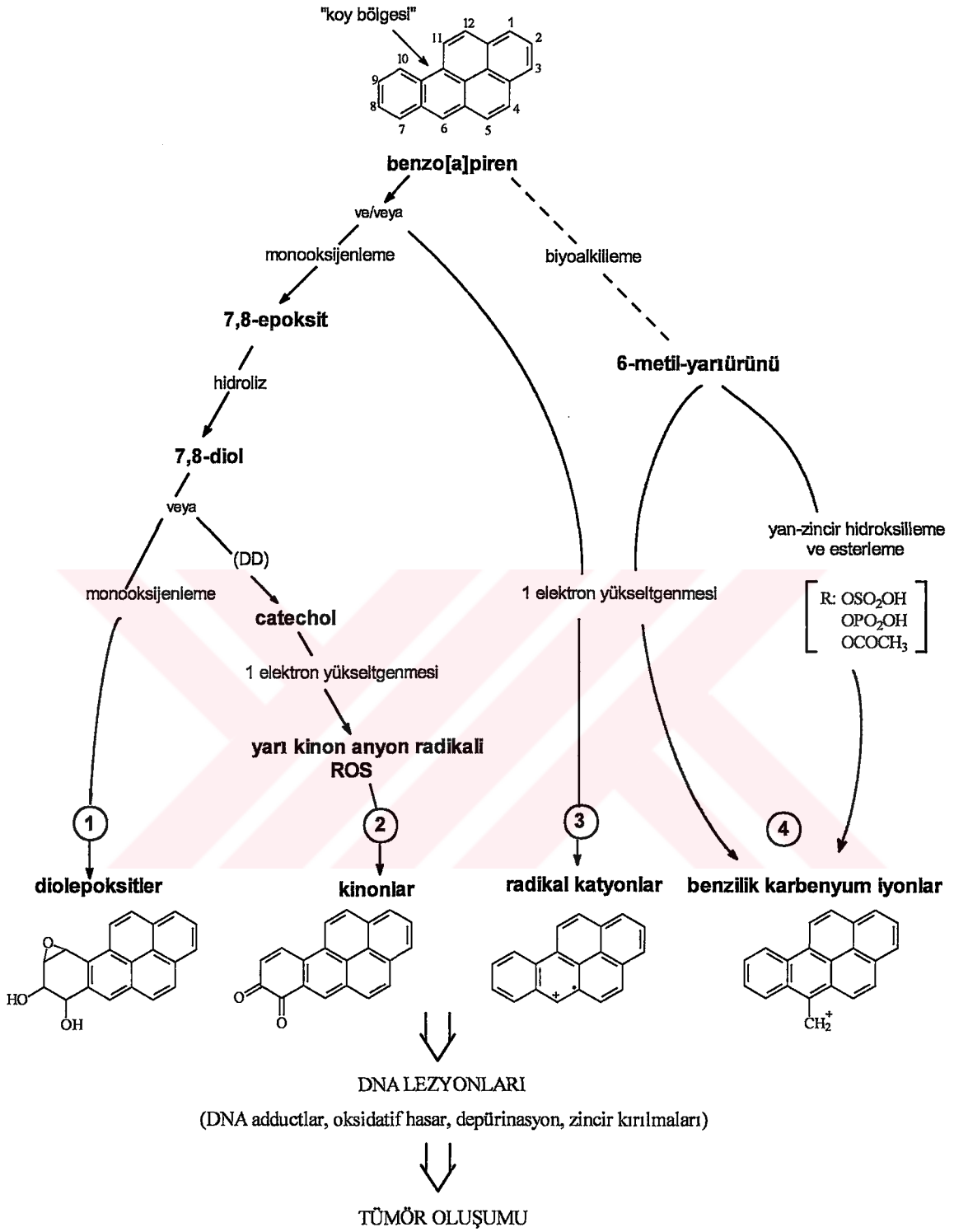
Hedef organlar ve histopatolojik indikatörler toksikolojide biyomarkör olarak kullanılmaktadır (Kamaleshwar, v.d., 2001; Karakoç, v.d., 1998; Anderson, v.d., 1999; Canova, v.d., 1998; Klaassen, 2001). Bu biyomarkörlerin kullanımında da birtakım avantaj ve zorluklar vardır. Kirleticilere maruz kalan canlılar için biyokimyasal ve moleküler değişimlerin net sonuçlarını gözlemlemek açısından faydalıdır. Kirleticilerin doku, organ ve hücre tiplerine etkileri, miktar çok küçük boyutlarda iken de tespit edilebildiği için özellikle kirliliğin takip edildiği durumlarda ön bir uyarı teşkil ederek ekosistem açısından ciddi ekolojik tahribatlar olmadan önlemler alınabilecektir. Aynı organizmaya ait farklı organların analizi yapılabilir, organizmaların başka türlü değerlendirmeler için çok küçük

olduğu durumlarda da iç görür (yumurta, larva gibi) (Atienzar, v.d., 2002c), akut ve kronik maruziyeti değerlendirebilir; zorlukları ise: doku ve organların normal durumlarının çok iyi bilinmesi gereği (Bahy, 2003), organizmanın yaşam döngüsü boyunca doku gelişim evrelerinin ve yıl içinde meydana gelebilecek fizyolojik farklılaşmaların iyi tanımlanması ihtiyaıdır. Yapılan çalışmanın kalitesi yapan araştırmacının içinin ehli oluşuyla doğrudan alakalıdır.

2.2.2. İstenmeyen DNA bileşikleri (DNA-Adduct)

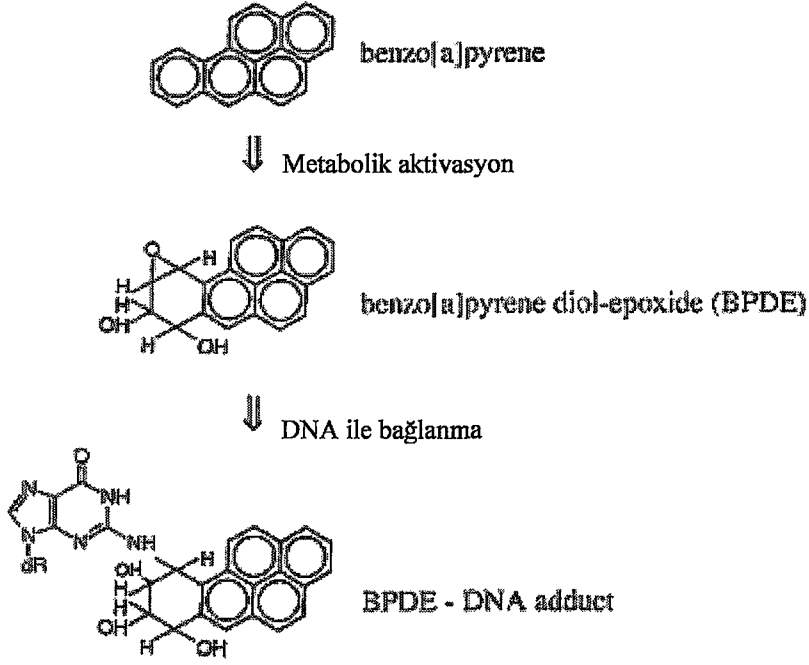
İstenmeyen DNA bileşikleri (DNA-adduct) tespiti özel bir genotoksik materyalin varlığına dair erken bir uyarı olabilirler (Piccardo, v.d., 2001; Peters, v.d., 2002; Karakoç, v.d., 1998). Organizma toksik bir kimyasala maruz kaldıktan kısa bir süre sonra eksogen (organizma dışı madde) veya onun bir yan ürünü DNA ile kovalent bağ oluşturan bir bileşen, DNA-adduct olarak tespit edilebilir (Klaassen, 2001). Günümüzde farklı hassasiyetlerde metodlar bu DNA-adduct ölçümlerinde kullanılmaktadır. Bunlardan birkaçı ³²P-postlabeling, HPLC/florasan spektrofotometri ve çeşitli immunoassaylerdir (Karakoç, 1997; Vincent, v.d., 1997; Vineis, 2003; Sonnenschein, v.d., 2000)

şekil 1’de çok çalışılan DNA-adduct’larından Benzo[a]pyrene’nin metabolizması sonucu ortaya çıkan aktiflenmiş metabolitler, oluşma ve etki mekanizmaları verilmektedir. şekil 2’de ise Benzo[a]pyrene’nin aktiflenmiş metabolitlerinden olan Benzo[a]pyrene diol epoksitin (BPDE), DNA ile ne şekilde adduct oluşturduğu gösterilmektedir. şekil 3’te genotoksik tesir gösteren ajanlar ve DNA’ya etki mekanizmaları gösterilirken şekil 4’te ise, kanserojen DNA-adduct’ların DNA’ya bağlanma mekanizmaları şematize edilmektedir.



DD: dihidrodiol dehidrojenaz; ROS: reaktif oksijen türleri

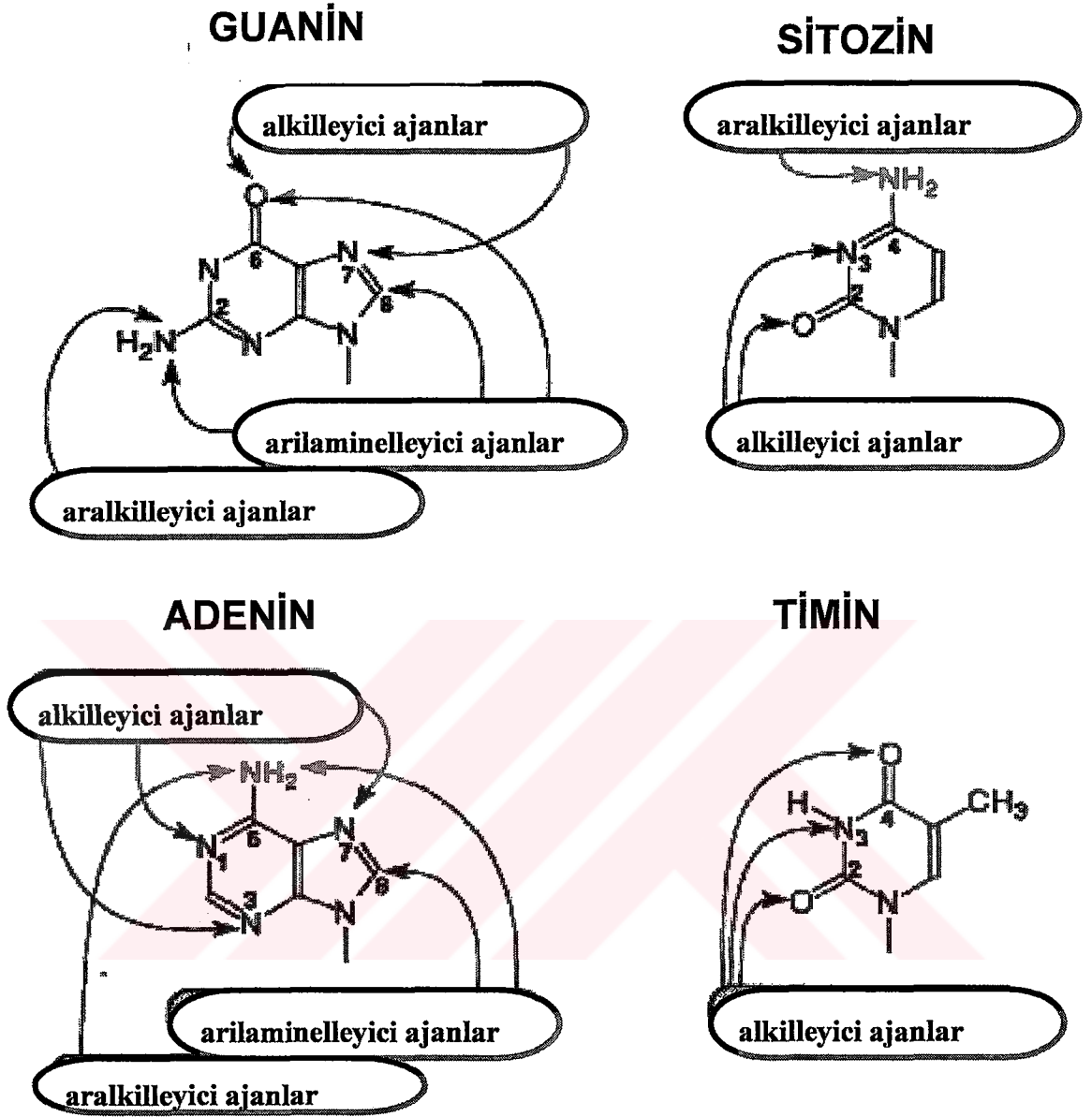
Şekil 1. *In vivo* sistemlerde Benzo[a]pyrene aktivasyonu ve DNA hasarı oluşturmada adı geçen muhtemel yollar (Canova, v.d., 1998).



Şekil 2. Benzo[a]pyrene diol epoxide *BPDE DNA-adduct* oluşumları.



Şekil 3. DNA hasar mekanizmaları. DNA hasarı oluşturan kimyasal ve fiziksel ajanlar ve DNA üzerinde gösterdikleri etkileri özetlemektedir.



Şekil 4. Kanserojen DNA-adduct'larının kimyası.

DNA-adduct oluşumunun biyomarkör olarak kullanımına dair bazı sınırlamalar vardır (Klaassen, 2001; Hodgson, v.d., 1998; Vincent, v.d., 1997; Sarasin, 2003). Bu sınırlamalar 3 başlık altında toplanabilir.

1. Bu çalışmalar için DNA ile bağlanan adduct'ların bir şekilde zararlı olduğu varsayımı vardır, bu ise tam olarak doğru olmayabilir. Mesela, tek zincirde olan kopmaların uzun dönemli patolojik sonuçları halen bilinmemektedir.

2. Hücresel bir cevap başlatan DNA değişmelerinin (değişikliklerinin) seviyesi kimyasallara göre farklılaşma gösterir.

3. Arkaplan (Background) DNA-adduct oluşumları, mutasyonlar ve zincir kopmaları, beslenme ve radyasyonun etkisiyle farklı canlılarda ve hatta farklı canlıların da farklı dokularında doğal olarak gerçekleşmektedir. Burada önemli olan DNA'ya olan tahribat ile maruziyeti ilişkilendirebilmektir (Uzonur, v.d., 2004a, b, c; Vincent, v.d., 1997; Vineis, 2003; Hemminki, v.d., 1996; Karakoç, 1997; Hahn, v.d., 1999; Gollapudi, v.d., 2000; Baumard, v.d., 1998; Lloyd-Jones, v.d., 1997; Gold, v.d., 2001; Wang, 2001; Luceri, v.d., 2000; Albertini, v.d., 2000).

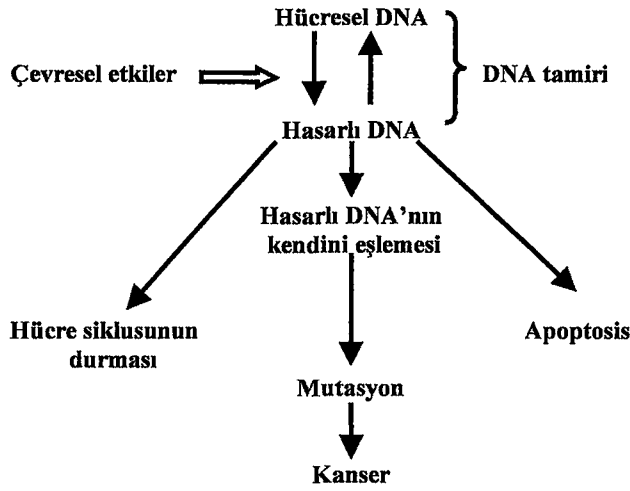
2.2.3. DNA Değişiklikleri

Çalışmamızda, DNA'da kirlilik tesirli değişiklikleri tespit etmek amaçlanmaktadır. Bu sebeple DNA değişiklerinin moleküler biyomarkör olarak nasıl değerlendirilmekte olduğu önemlidir.

Bir organizmanın genotoksik bir ajan tesirine maruz kalması sonucu bir seri genetik olay başlayabilir: DNA'da yapısal bazı değişiklikler gerçekleşir, tahribat ve yapısal değişimler mutant genleri ve çeşitli hastalıkları ve fenotipik, morfolojik değişiklikleri oluşturur. Bütün bu olayların tespiti ise çevresel kirliliğe maruz kalan organizmalarda maruziyeti ve etkiyi değerlendirmek için biyomarkör olarak kullanılmaktadır (Klaassen, 2001).

2.2.4. DNA Hasarı

Çevresel etkilerle hasar oluşan DNA'nın kendini eşlemesinin olumsuz sonuçları olan ve geri dönüşü olmayan mutasyon oluşumu ve bu mutasyonların neticesinde kanser oluşumu Şekil 5'de gösterilmektedir. Ancak hücre bu en olumsuz aşamaya sürüklenmemek için bir takım savunma mekanizmalarına sahiptir, DNA tamir mekanizmaları, daha olmazsa hücre siklusunun durması veya çok hasar görmüş DNA'ya sahip bir hücrenin programlı intiharı yani apoptosis oluşmaktadır (Strachan ve Read, 1996).



Şekil 5. Çevresel etkilerle oluşan DNA hasarına hücresel cevap.

2.2.5. Mutasyonlar

DNA değişiklikleri genel bir kavramdır, mutasyon ise yine bu genel kavramın bir alt başlığıdır. Çoğunlukla organizma açısından olumsuz bir gelişmedir, patolojik tesir olarak sınıflandırılabilir. Aşağıda DNA'da oluşacak bu kalıtsal değişikliklerin veya belli tip mutasyonların tespitine yönelik bazı analiz yöntemlerinden bahsedilmiştir.

1. Onkogen aktivasyonu: Onkogenler, kanserojenlerin aktif hale getirdiği potansiyel hedeflerdir. PCR ile çoğaltılan DNA'nın analizini takiben aşağıda adı geçen her bir nükleotid değişikliği tespit metodunu uygulamak mümkündür:

- restriksiyon analizi;
- oligonükleotid melezlemesi;
- doğrudan DNA dizi analizi;
- RNaz haritalandırması;
- jel koşma hızı değişim tespiti gibi;

2. Mutasyon hızı – Bu durumu tespite çalışan bütün teknikler oldukça pahalıdır. Bu yeni teknolojinin biyomarkör olarak değerlendirilebilmesi çevresel mutajenlerin kalıtsal etkilerinin popülasyonlar bazında değerlendirilebilmesi ile olacaktır. Günümüzde kullanılan

metodlar, kalıcı mutasyonların hızını ölçmeye yönelik değil, daha çok somatik mutasyon hızını ölçmeye yöneliktir.

3. DNA değişikliklerinin tespitini çevresel genotoksisite değerlendirmelerinde *in situ* bir markör olarak değerlendirme fikri yakın zamanda genel bir yaklaşım olma yolundadır (Atienzar, v.d., 1998). Önceleri tümör oluşumunun ve kromozomal değişikliklerin doğrudan takibi şeklindeki uygulamalar, yakın zamanda hücre içi kimyasal karsinogenez mekanizmalarının da aydınlanması ile yerini DNA ile interaksiyona giren toksik kimyasalların analitik ölçümlerle tespitine bırakmıştır (Wang, 2001).

2.3. Marmara Denizi'nde Kirlilik

Marmara Denizi, İstanbul ve Çanakkale Boğazları ile Karadeniz ve Ege Denizi arasında geçiş sağlayan yaklaşık olarak 11500 km² alana sahip bir iç denizdir. Marmara Denizi'nin Karadeniz kaynaklı düşük tuzlulukta yüzey suları Ege'ye, Ege Denizi kaynaklı yüksek tuzlulukta dip suları ise Karadeniz'e taşınmaktadır. Farklı yoğunluktaki su kütleleri nedeniyle 20-40m derinliklerinde bir haloklin tabakası vardır.

Marmara Denizi'nin oşinografik özellikleri 1910 yılında "Thor-Expedisyonu" araştırma sonuçlarının yayınlanmasından beri bilinmektedir. Bu araştırmalardan, Marmara'da henüz hiçbir kirlenme veya çevre sorunu ortaya çıkmadan önceki sıcaklık, klorinite, oksijen miktarı, bulanıklık, pH gibi önemli parametrelerin saptanmış olması, bu dönemden sonra oluşan değişiklikleri takip açısından bir baz oluşturmaktadır (Artüz ve Baykut, 1986).

Denizlerdeki kirlenme, denizin kirleticilerle kendi arıtma kapasitesi üzerinde yüklenmesi sonucu oluşur. Kirlenme açısından Marmara Denizi, Türkiye'nin en yoğun nüfus ve endüstri yerleşimlerini kıyılarında barındırmaktadır. Ülke nüfusunun 1/4'ünden fazlası (2000 yılı itibarıyla 12,5 milyon civarı) Marmara Bölgesinde barınmaktadır. Bu nüfus bölgede yer alan 8 ilde toplanmış olup, bölge nüfusunun %58'i İstanbul'da yaşamaktadır*. Bu yerleşim merkezlerinde oluşan evsel atıklar kanalizasyon sistemi ile doğrudan Marmara Deniz'ine

* <http://www.die.gov.tr/>

akıtılmaktadır. Bu atıkların sadece bir kısmı ön arıtmadan geçtikten sonra denize bırakılmaktadır.

Bölge nüfusu arttıkça evsel atıksu deşarjı da artmaktadır. Nüfus, 1980-1985 yıllarında %18, 1985-1990 yıllarında, %21 civarında artmıştır. Günümüzde Marmara'ya; İstanbul'dan günde 1.2 milyon m³, Bursa'dan günde 0.3 milyon m³, İzmit'ten 0.2 milyon m³, diğer 5 şehirden 0.4 milyon m³ olmak üzere bölge genelinde 2.1 milyon m³ evsel atıksu deşarj edilmektedir. Altyapının yetersiz olması, kanalizasyon toplama şebekesi mevcut olan bölgelerde ise arıtma tesislerinin bulunmaması veya işletme maliyeti nedeni ile arıtma tesislerinin çalıştırılmaması evsel kaynaklı kirlilik problemlerinin temelini teşkil etmektedir* (Uslu ve Benli, 1998).

Marmara Deniz'ine ulaşan kirlilik, özellikle ülke nüfusunun % 20'ini ve ülke sanayinin yarısından fazlasını barındıran, sanayileşmenin ve yerleşmenin en yoğun olduğu havzalardan biri olan, Marmara Havzasından kaynaklanmaktadır. Evsel atıklar; direkt deşarj, derin deşarj ve nehirlerden deşarj yoluyla olmaktadır. İstanbul'un kanalizasyon problemine çare aranmış, derin deşarj yöntemi ile İstanbul Boğazı'nın alt akıntısına ve bir kısmı da daha yoğun olan Marmara Denizi alt suyuna deşarj edilmek üzere programlanmıştır. İstanbul'un yanısıra, Gemlik Körfezi, Erdek Körfezi, İstanbul-Tekirdağ arasında yapılan yazlık evlerin; artan nüfusun, yetersiz altyapının, Marmara Denizi'nde önemli ölçüde evsel atıklardan kaynaklanan kirliliğe neden olduğu saptanmıştır. Bu bölgelerde yapılan ölçümlerde çözünmüş oksijen değerinde önemli miktarda azalma, fosfat ve nitrat değerlerinde artış görülmüştür. Marmara Denizi alttabaka sularında mevcut oksijen miktarı, üst tabakadan çöken, gerek atıksular gerekse kendi iç üretiminden kaynaklanan organik maddelerin oksijen tüketimini karşılamakta zorluk çekmekte, hatta özümleme kapasitesinin sınırında bulunmaktadır (Artüz ve Baykut, 1986).

İstanbul atıksu sisteminin Marmara Denizi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla İSKİ tarafından geniş kapsamlı bir araştırma yaptırılmıştır (Uslu, 1990). Marmara Denizi'nde evsel, endüstriyel atıksularla, tarımsal arazilerden gelen drenaj suları, gemi trafiği, akarsuların getirdiği kirlilik yükleri gibi çok çeşitli nedenleri olan kirlenmenin önüne geçilebilmesi için

gerek kirlilik yükleri ve bileşimlerinin tutarlı bir biçimde saptanması, gerekse de alıcı ortam olan Marmara'nın bu yüklere gösterdiği reaksiyonların çok iyi anlaşılması gereklidir.

İstanbul civarında bulunan 4500-5000 endüstri kuruluşundan 0.3 milyon m³ civarında atıksu deşarj edilmektedir. Bu miktarın %50'si arıtılmadan denize deşarj edilmektedir. İzmit Körfezinden 0.2 milyon m³ kadar endüstri kaynaklı atıksu deşarjı söz konusudur. Körfeze deşarj yapan 120 civarında endüstri kuruluşu olup, arıtma tesisine sahip olanlar ancak %30 kadardır. Gemlik Körfezi civarında bulunan zeytincilik, sabunculuk, gübrecilik kuruluşlarının atıksuları ile, Bandırma Körfezi etrafında kurulu madencilik sektörüne ait kuruluşların atıksuları doğrudan denize verilmektedir. Bursa Organize Sanayi Bölgesi'nde ve çevresinde faaliyet gösteren çeşitli işletmelerden yılda 6 milyon m³ endüstriyel atıksu Nilüfer Çayı ve yan kolları ile Gemlik ve Bandırma Körfez'lerine verilmektedir. Gönen çevresindeki 50 kadar tabakhanenin atıksuyu da Kocabaş ve Gönen Çayları yolu ile Erdek Körfez'ine gelmektedir.

Yoğun sanayileşme, İzmit Körfezi kuzey kıyılarını en kirli bölgelerden biri haline getirmiştir. Doğuda SEKA (selüloz, kağıt), Sülfirik Asit Fabrikası, Pakmaya (maya), Kartonsan (karton), Pirelli (oto lastiği), Ansa (ilaç), Rabak (metal), Çelik Halat (çelik tel), Lassa (lastik), Lifli Rulo (kağıt), Petrol Ofisi (yağ, gres), Petkim (petrol ürünleri, alkali), Tüpraş (petrol rafinerisi), Igsaş (amonyak), Yarımca Gübre (kimyasal gübre), Yarımca Porselen (porselen), kirliliğe neden olan sanayilerden bazılarıdır. Dikkat çeken noktalardan birisi de Dilderesi vadisidir. Nasaş (Aliminyum), Basf (kimya kompleksi), Omo (deterjan kimya), Polisan (boya, tiner, polivinil, üre, formaldehit v.b.), çeşitli demir-çelik ve metal sanayi tesisleri ile bir çok kimyasal madde sanayinin geliştiği bir vadide bulunan Dilderesi bugün ülkenin en yoğun kimyasal madde içeren akarsularından biridir*, ** (Uslu ve Benli, 1998).

Yapılan son araştırmalara göre; İzmit Körfezine günde, 6.6 kg kurşun, 43.2 kg çinko, 11.9 kg bakır, 209 kg krom, 5.1kg civa gibi ağır metallerin yanısıra 10.9 ton azot, 30.8 ton yağ karışmaktadır. Daha güneyde Gemlik Körfezi, bir yandan geçtiği yerlerdeki tüm kirliliği deniz ortamına taşıyan Karsak Deresi, bir yandan da körfez etrafında gelişen sanayinin

* <http://www.die.gov.tr/>

** <http://www.turmepa.org.tr/>

atıklarından dolayı giderek kirlenmektedir. Güney Marmara'da önemli bir kirlilik merkezi ise Bandırma Körfezi'dir. Körfez, kimya ve metal sanayi ile gelişen maden sanayinin neden olduğu kirlilik ile etkilenmektedir. Bandırma Gübre Sanayi Bagfaş'ın atıksuları, içerdiği yüksek fosfor ve azot ile çevrede ötrifikasyona yol açmaktadır*.

Kara kökenli kirleticilerin deniz ortamına ulaştırılmasında en önemli mekanizma nehirlerle taşınmadır. Marmara Bölgesi'nde uzun nehirler olmamasına karşın, pek çok sayıda küçük çay ve nehir bulunmaktadır. Bölgedeki en önemli nehirler arasında Kocabaş, Gönen nehirleri, Simav Deresi ve kolları, Nilüfer, Mustafa Kemal Paşa, Orhaneli, Emet dereleri sayılabilir. Nilüfer Deresi özellikle Bursa Organize Sanayi Bölgesi'nden gelen endüstriyel, Bursa'dan gelen evsel atıksularla kirlenmektedir. Bigadiç Boraks Metal işletmeleri atıksuları ile Sınav Deresini kirletmektedir. Balıkesir bölgesindeki endüstriyel kuruluşlar ve evsel atıksular önce Üzümcü Deresi'ni kirletmekte ve bu kirlilik Simav Deresi'ne taşınmaktadır. Gemlik yöresindeki Karsak Deresi, Orhangazi Organize Sanayi Bölgesi'nin atıklarını taşımaktadır. İstanbul için en kompleks sanayi ve evsel atıkları taşıyan açık birer kanal halindeki Kağıthane ve Alibeyköy dereleri, Haliç kirliliğine katkıda bulunmaktadır.

Marmara Denizi, Karadeniz ve Ege Denizi'ne açık olmakla birlikte; diğer tüm özellikleri ile kapalı bir deniz görünümündedir. Marmara Denizi kıyılarında yerleşim birimleri ve sanayi merkezlerinin yanısıra, yoğun gemi trafiği olan limanlar da yer alır. Ayrıca, her biri yerleşim birimi olan ve özellikle yaz aylarında yoğun yolcu taşımacılığının yapıldığı 12 ada bulunur.

Deniz araçlarının sintine, balast ve tank yıkama suları kaynaklı kirlenmenin yanısıra ham petrol taşıyan tankerlerden sızan petrol denizde çok geniş alanlara yayılmaktadır. İstatiksel veriler olmamasına rağmen, İstanbul Boğazı'nda deniz trafiğinden kaynaklanan kirliliğin toplam kirliliğe katkısı yaklaşık % 10 kadardır. Karadeniz ve Marmara'yı birleştiren İstanbul Boğazı 32 km uzunluğunda olup, seyir güçlükleri ile dolu yılda 50000 (1997 yılı itibarı ile) geminin geçtiği uluslararası dar bir su yoludur. Fiziki yapısı nedeni ile 90000 GRT ve daha büyük gemilerin ek önlemler almadan geçişi mümkün değildir (Uslu ve Benli, 1998).

* <http://www.turmepa.org.tr/>

Marmara Denizi'nde, İzmit, İstanbul, Bandırma, Gemlik, Tekirdağ ve Gelibolu limanlarına yaklaşık 6000 gemi kayıtlıdır. Limanların çoğu tahliye, onarım, barınma, petrol yükleme, boşaltma gibi çok amaçlıdır. Gemi ve deniz araçlarının sintine atıkları ile, bunları yükleme ve boşaltma sırasında kazalar neticesinde deniz kirliliği meydana gelmektedir.

Geçmişteki üç deniz kazasında 64000 ton ham petrol, 2000 ton sıvılaştırılmış amonyak, 2000 ton motorin Marmara Denizi sularına karışmıştır* , ** .

2.4. Marmara Denizi'nde Kirlilik Konulu Çalışmalar

Marmara Denizi'nde kirlilik çalışmalarını üç aşamada toplayabiliriz; birincisi kirliliğin ve kirlilik kaynaklarının tespitine, ikincisi Marmara Denizi'nin doğal yapısının ve bağlantılı sistemlerin oşinografik, meteorolojik, coğrafik, biyolojik özelliklerinin incelenerek su özellik ve hareketleri ile kendi kendini temizleme kapasitesinin belirlenmesine, üçüncü aşaması ise kirlenmeyi engellemek ve kirliliği gidermek ve ekolojik durumun devamlılığını sağlamaya yönelik çalışmalardır.

Birinci grupta yer alan çalışmaların bir kısmı 2.1.'de verilmiştir. Bu grupta yer alan çalışmalardan İstanbul Üniversitesi, Deniz Bilimleri ve İşletmeciliği Enstitüsü tarafından yürütülen projeler kapsamında Marmara Denizi'nde, İstanbul Boğazı boyunca ve Haliç'te, Karadeniz'de su özelliklerini etkileyen ve model çalışmalarında gerekli meteorolojik, tabakalaşmayı tanımlayan, birincil üretkenliği etkileyen besin elementleri, canlı yaşamını etkileyen ve karakterize eden, su kalitesini, sediment kompozisyonunu, mikrobiyolojik ve organik kirlenmeyi tanımlayan parametreler ile birincil üretici ve tüketiciler araştırılmaktadır. Civa (Hg) askıda katı madde (AKM), deniz suyunda Fe, Mn, Pb, Cu, Cd analizleri, askıda maddelerden Al, Fe, Mn, Pb, Cu, Zn ile, deterjan ve PAH analizleri, toplam organik karbon ve partikül organik karbon, klorofil ölçümleri rutin olarak yapılmaktadır.

İTÜ Çevre Mühendisliği, İSKİ ve TÜBİTAK-MAM ile de kirlilik tespitine yönelik ortak ve bağımsız çalışmalar yürütülmektedir.

* <http://www.denizcilik.gov.tr>

** <http://www.cevreorman.gov.tr/>

TÜBİTAK-Marmara Araştırma Merkezinde, Deniz Kirliliği ve Ekotoksikoloji Grubu tarafından, alıcı su ortamlarındaki su kalitesinin belirlenmesi, kirliliğin farklı matrislerde (su, sediman, biyota) ölçülerek izlenmesi, kıyı ve iç sularda ötrofikasyon problemlerinin tespiti ve ekotoksikoloji alanlarında çalışılmaktadır. Saha çalışmalarından elde edilen, kimyasal, fiziksel, biyolojik ve spektral veriler, su ortamlarının su kalite modelini oluşturmada ve alıcı su ortamlarına deşarjlarla giren kirleticilerin simulasyonunda temel oluşturmaktadır. Bir çok öncelikli kirleticinin, toksik/kanserojen maddelerin çevresel matrislerde, kantitatif ölçümü ve karakterizasyonu yapılabilmektedir. Biyomarkör denilen erken uyarı sistemleri, kimyasalların su ekosistemi üzerinde yarattığı olumsuz etkileri belirleme ve risk değerlendirmesi çalışmalarında çevre sağlığını izleme amacıyla kullanılmaktadır. Atık suların alıcı su ortamındaki toksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla, uzun ve kısa süreli toksisite testleri (alg veya bakteri kullanarak) yapılmaktadır. Bu testlerle, son yıllarda endüstriyel atıksular için önemli bir deşarj parametresi haline gelen EC_{50} değerinin belirlenmesi mümkün olmaktadır. Su, sediman, su organizmaları (balık, midye vb) ve yaş-kuru atmosferik çökelimde Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH) ve Poliklorlu bifeniller (PCB) gibi öncelikli kirleticiler kantitatif olarak analiz edilmektedir. Öncelikli kirleticilerin besin zincirindeki transferi ve biyotaya doğrudan veya dolaylı etkileri biyoindikatör organizmalar kullanılarak çalışılmaktadır (Peters, v.d., 2002).

İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi tarafından Ekim 1992'de Türk ve Rus bilim adamlarının katılımı ile Marmara Denizi ve Karadenizde bir dizi yeni ekolojik çalışmalar yapılmıştır. Özelliği ise ARGUS denizaltısı ile ülkemizde ilk kez yapılan doğrudan deniz dibi gözlemleri olmasıdır. 50m ile 528m'ye kadar olan derinliklerde yapılan gözlemler sırasında Marmara Denizi'nin dip yapısına ilişkin bir çok veri toplanmıştır. Film ve fotoğraflar çekilmiş ve kum, çamur ve hayvan türlerine ait örnekler alınarak biyolojik çeşitlilikteki değişim gözlenmiştir. Ayrıca son yıllarda çağın vebası denilen *Mnemiopsis leiydi* türünün dağılımı incelenmiştir. Araştırmalar sonunda, Marmara Denizi'nde çözünmüş oksijen değerleri eskiye oranla düşük çıkmıştır. Yine canlı türlerinin ve ekosistemin hızla tahrip edildiği, bir çok canlı türünün azlığı da dikkat çekmiştir (Uslu ve Benli, 1998).

İstanbul Üniversitesi Çevre Sorunları Araştırma Merkezi tarafından 1983 yılından beri 3 yıl süre ile tüm mevsimler boyunca yapılan hidrografik ve su kirlenmesi araştırmalarında,

İstanbul Boğazı-Çanakkale Boğazı arasında 36 istasyondan alınan verilere göre, Marmara Denizi'ne sürekli olarak yüklenen endüstriyel ve evsel atıkların seyrelme ve başka bir yere göç etme suretiyle asimilasyonuna imkan olmadığı ve Akdeniz kökenli %38 tuzluluk içeren dip suyunun genelde bir kirlilik uzaklaştırma aracı olmayacağı düşünülürken, 1986-1992 yılları arasında ODTÜ-Deniz Bilimleri Enstitüsünce yapılan araştırmada Marmara Denizi'nin üst tabaka sularının 4-5 ayda bir, alt tabaka sularının ise 6-7 yılda bir yenilendiği ortaya çıkmıştır; Karadeniz suları Marmara Denizi'ne İstanbul Boğazı üst akıntısı olarak katılır ve havzayı Çanakkale Boğazı üst akıntısı olarak terkederken, Ege Denizi suları Çanakkale Boğazı alt akıntısı olarak Marmara Denizi'ne katılır ve havzayı İstanbul Boğazı alt akıntısı olarak terk eder (Beşiktepe, v.d., 1994).

Mevcut durumun tespiti ve kirliliğin önlenmesi veya giderilmesine yönelik altyapı çalışmalarına örnek olabilecek çalışmalardan bahsederek; Osmanlılar zamanında İstanbul'da yerleşim bölgelerinde denize ulaşacak sahile dik yağmur suyu mecraları ile lağım mecraları yapılmıştır. O tarihlerde nüfusun az olması ve alıcı ortamın tasfiye kapasitesi sebebiyle bir kirlenme meselesi ortaya çıkmamaktaydı. Nüfusun artmasına paralel olarak "Yağmur suyu ve Atıksu Kanalizasyon Projeleri"nin hazırlanması mecburiyeti ortaya çıkmıştır. İstanbul'un atıksu toplama-uzaklaştırma çalışmaları uzun zamandan beri devam etmektedir. Bu çalışmalardan 1950'li yıllardan itibaren gündeme gelen İstanbul kanalizasyon projeleri kapsamında, Birleşmiş Milletler Kalkınma Programı (UNDP) destek kredisi ile, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) öncülüğünde, kısaca DAMOC diye adlandırılan bir konsorsiyum tarafından "İstanbul Bölgesi İçmesuyu ve Kanalizasyon Master Plan ve Fizibilite Raporu" hazırlanmıştır. Proje, İstanbul'un hemen her yerinde düzensiz akan lağım sularının düzenli kanalizasyonlar, kuşaklamalar ve kollektörler ile pompa istasyonlarına toplamak, ön arıtmadan geçirerek su tabakasına enjekte etmek olarak tanımlanabilir. Ön koşul olarak suların en az 5 mg/l oksijen içermesi gerekmektedir. DAMOC ve IMC master planları en kapsamlı olanlarıdır (Damoc., 1971). DAMOC projesi esas alınarak hazırlanan Camp-Tekser Master Planı'na göre İstanbul'da Yenikapı Ön Arıtma Tesisi ve Ahırkapı Deniz Deşarjı" inşa edilmiştir. Ayrıca, Üsküdar Ön Arıtma ve Deniz Deşarjı Tesisi tamamlanarak devreye sokulmuştur. Netice olarak 1994 yılında İstanbul'da sadece Yenikapı ve Üsküdar'da ön tasfiye tabir edilen ızgara ve kum tutucudan sonra atıksular deniz deşarjı ile Boğaz'ın alt

akıntısına verilmekte, diğer atıksulardan toplanabilenler kıyılarından Marmara'ya boşaltılmakta idi. O tarihte yağmursuyu şebekesi ile ilgili herhangi bir çalışma yapılmamakta olup, mevcut sistem de alışmamaktaydı. 1995 yılından itibaren evre koruma için büyük yatırımlar yapılmıştır. Ataköy Atıksu Biyolojik Arıtma Tesisi tamamen yenilenerek, ilave teknolojilerle devreye alınmış, Kuzey Haliç Projesi çerçevesinde kollektör, tüneller, Baltalimanı Arıtma Tesisi inşa edilmiş, Baltalimanı Deniz Deşarjı devreye alınmıştır. Güney Haliç Projesi tamamlanmış, dev Tuzla sistemi hizmete sokulmuştur*.

İstanbul Su ve Kanalizasyon İdaresi, İstanbul Üniversitesi Deniz Bilimleri İşletmeciliği Enstitüsü ile müştereken Haliç, İstanbul Boğazı, Marmara Denizi ve Karadeniz'de 49 istasyonda periyodik olarak "Su Kalitesi İzleme alışmaları" gerçekleştirmektedir (Sur, v.d., 2003).

* www.iski.gov.tr

III. GENOTOKSİSİTE DEĞERLENDİRMELERİ

3.1. Genotoksisite Nedir?

Genotoksisite, genetik materyale toksik tesir demektir. Genotoksik maddeler ile DNA arasında reaksiyonlar sonucu oluşur. Biyokimyasal olarak veya DNA'daki hasarı yansıtan kısa dönemli testlerle ölçülebilir (Hodgson, v.d., 1998).

Genotoksisite, zenobiyotiklerin DNA ile yaptığı kovalent bağlarla ilgilidir. Organ spesifik toksikantlar, hedefledikleri dokularda diğer dokulara nazaran daha yüksek derecede olmak üzere, *in vivo* ortamda makromoleküllerle kovalent olarak bağlanırlar. Karaciğerde acetaminofen ve karbon-tetraklorid, böbrekte p-aminofenol, akciğerde ise ipomeanol bunlara örnek olarak verilebilir. Benzer şekilde, pek çok kanserojenin, "DNA adduct" olarak bilinen ve DNA'ya kovalent bağlarla bağlanarak yapısını bozan oluşumları artırdığı bilinmektedir. Reaktif metabolitler denilen bu ara/son ürünler, çoğu zaman kimyasalların, her zaman değilse de, cytochrome P450 tarafından metabolizması sonucu oluşurlar. Bu metabolitler, oldukça reaktif elektrophilik tabiatla olduklarından, sadece toksik eylem sahasına değil, DNA, RNA veya protein molekülleri üzerindeki pek çok nükleofilik sahaya bağlanırlar. Bu yüzden, kovalent bağlanmanın ölçülmesi, toksik potansiyel için bir ölçüt olarak alınmaktadır (Hodgson, v.d., 1998; Klaassen, 2001; Devita, v.d., 1997).

3.2. Genotoksik Kimyasalların Metabolizması

Genotoksik maddelerin geniş bir yelpazede çeşitlilik gösteren kimyasal yapıları vardır, fakat hepsinin paylaştığı tek özellik kimyasal açıdan reaktif oluşlarıdır (reaksiyona girebilme özellikleri vardır). Bunlar ya doğrudan ya da enzimlerin dönüştürme etkisiyle elektrophiliktirler (yani elektron sever, elektron cezbeder). Pozitif yüklüdürler yani elektronları noksan kimyasallardır. Reaktif elektrophiller, biyolojik moleküllerde-proteinler ve nükleik asitler (RNA, DNA) bulunan negatif yüklü, elektronca zengin gruplarla kovalent bileşikler (adduct)

oluşturarak etkileşirler. DNA bazları ile oluşan kovalent bileşikler (adductlar) eğer bir sonraki DNA eşlemesinden önce enzimatik olarak tamir edilmezlerse, DNA eşlemesi sırasında hatalar oluşmasına sebep olurlar. Eğer bu mutasyonlar hücre büyümesi ve farklılaşmasından sorumlu genlerin protein kodlayan bölgelerinde oluşursa, bu tip gen ürünlerinin fonksiyonlarını tam olarak yerine getirememesi sebebiyle habis fenotipler ortaya çıkmaktadır (Sarasin, 2003).

3.3. Çok Aşamalı Bir Süreç Olarak Kanserojeniz

Kanserojenizde çok aşamalı model hayvan deneyleri ile ortaya konmuştur. Bu modele göre kanserojenizin ilk basamağı olan başlangıç (initiation) aşaması geriye dönüşüzdür. Bir çok kanser çalışmasının sonucu bir diğer teori ise kanserin klonal oluşudur, yani kanser tek bir başlatılmış (initiated) hücreden gelmektedir. Kanserin ikinci basamağı promosyon (promotion); başlatılmış bir kök hücresinin klonal genişlemesidir, bu aşamada hücre bölünmesi hızlanmıştır. Son basamak olarak ilerleme-progression yani kanserin yeni kalıtsal değişimler kazanarak kötü huylu yayılan, metastatik potansiyel kazanmasıdır (Hodgson, v.d., 1998; Klaassen, 2001).

Tümör oluşumu ile ilgili bir çok teori öne sürülmüştür (Jotwani, v.d., 2001; Beneden, v.d., 1997; Vincent, v.d., 1997):

Tahriş Teorisi (iritasyon teorisi): Kronik iritasyonların; termal, mekanik, kimyasal veya iltihabi, dokuların dengesini bozarak, hücre bölünmesini başlattığını söylemektedir (Kamaleshwar, v.d., 2001; Ong, v.d., 1998).

Hiperrejenerasyon Teorisi: Tahriş teorisinin devamı gibidir. Kanserlerin özellikle hücre yıkım ve rejenerasyon, yeniden yapım faaliyetlerinin sık olduğu dokularda ortaya çıktığı hipotezini ortaya koyar (Garnis, v.d., 2004; Luceri, v.d., 2000).

Kimyasal Teorisi: Karsinojenik bir kimyasal madde ile uzun süreli temas, enzim sistemleri üzerindeki bozucu etkilere, hücre proteinlerinin denatürasyonu ve kromozomlar üzerindeki kimyasal etkiler ile tümör gelişimine yol açar hipotezine dayanır (Gold, v.d., 2001; Watanabe, 2000).

Mutasyon (Hücresel) Teorisi: Kanserojeniz konusu, tümör baskılayıcı genler üzerindeki son çalışmalar sonucu büyük bir bilimsel destek kazanmıştır. Somatik mutasyonların birikimi tümör gelişmesine sebep olmaktadır. Ancak, her mutajen kanserojen değildir ve mutasyonların eksik ya da yanlış onarımlardan da kaynaklanabilmelerine rağmen, çoğu lezyon onarılır. Onarılamayanlar özellikle onkogen ve tümör baskılayıcı genlerde iseler kansere uzanan yolu başlatırlar (Caetano-Anolles, 2001; Vineis, 2003; Wang, 2001).

3.4. Mutajenez ve Kanserojeniz

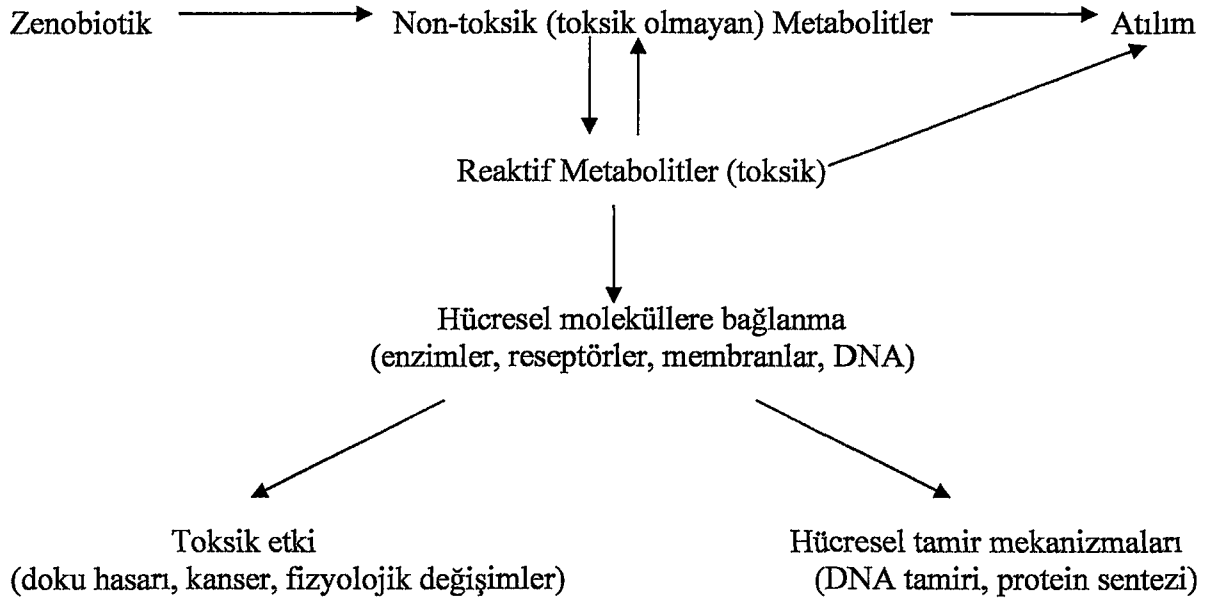
Kanser, çok karmaşık bir çok hastalığa verilen genel bir addır. Gelişimi çok aşamalı, bir çok genetik değişikliğin sonucu olarak gözlenmektedir. Kanser hücreleri çoğunlukla hücre bölünmesi, çoğalması ve farklılaşmasında ve genomik kararlılıkta anormal davranışlar göstermektedir.

Kimyasal kanserojenizle ilgili çalışmalar, bir maddenin kanserojenik potansiyelinin, mutajenik kabiliyeti ile doğrudan ilişkilendirilebileceğini ortaya koymuştur. Yani, DNA kanserojenizinin başlangıcındaki nihai hedefidir. Son yıllarda kanserojenik olduğu bilinen bir çok kimyasalın mutajenik de olduğu bulunmuş, aynı şekilde bir çok bilinen mutajenin de kanserojenik olduğu gösterilmiştir.

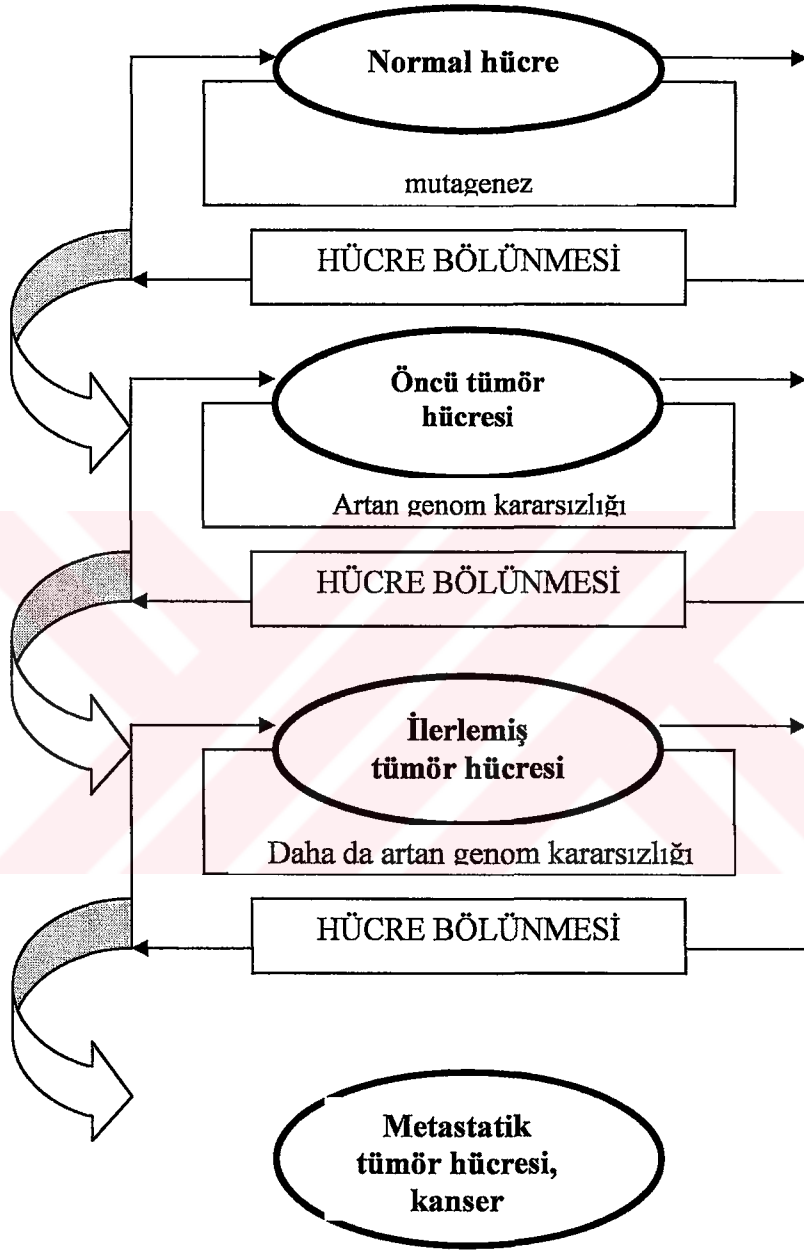
Hücre çoğalması ve DNA'ya zarar, mutajenez açısından çok büyük önem taşıyan kavramlardır. Hücre çoğalması olmaksızın DNA'ya verilen zarar mutasyonlar şeklinde sabitlenemez (Sarasin, 2003; Wang, 2001; Atienzar, v.d., 2001).

DNA'nın, elektrofiller tarafından kovalent modifikasyonu kimyasal kanserojenizinin ilk aşamasıdır. Eğer bu modifikasyonlar düzeltilmezse DNA replikasyonunun kusursuzluğunu ortadan kaldırarak kansere kadar gidecek kalıcı mutasyonlara sebep olurlar.

Kanserojenizde bir çok basamak ve mekanizma vardır; bunların herbirinin de başka kimyasal ve fiziksel kirleticiler, tıbbi tedaviler, ilaçlar, mutajenik ve epigenetik ajanlar ile etkileşmeleri olduğu gibi genetik altyapı, cinsiyet, gelişim evresi, DNA tamir sistemleri, hormonlar, büyüme faktörleri, onkogenler, tümör baskılayıcı genler, anti metastas genleri gibi bir çok endojen faktörle de etkileşmeleri vardır.



Şekil 6. Toksik maddelerin canlıdaki etkileşimleri. Zenobiyotikler, organizmaya girdikten sonra: canlı metabolizması tarafından toksik olmayan metabolitlere dönüştürülerek vücuttan atılabilmektedirler. Veya toksik reaktif metabolitlere dönüştürülerek kansere kadar uzanan ve DNA'ya bağlanma sonucu da oluşabilecek toksik etkiler yapabilmektedirler. Ya da, hücresel moleküllerele bağlanma neticesinde hücresel tamir mekanizmalarını harekete geçirmektedirler.



Şekil 7. Kanser oluşumunda mutagenez hipotezi. Somatik mutasyonlar hücre bölünmesi ile sabitlenmektedir. Her bölünme ve yeni mutasyonun genomda artan bir kararsızlığa sebep olduğunu göstermektedir. Normal bir hücre, öncü tümör hücresine ve biriken somatik mutasyonlarla ilerlemiş tümör hücresi ve sonunda metastatik tümör hücresine dönüşmektedir.

3.4. Kirlilik ve Mutasyon Hızı Bağlantısı

Mutasyon hızı belli bir zaman aralığında bir canlının DNA'sında, genetik materyalinde mutasyon-değişiklik oluşma sıklığıdır. Bu durum arkaplan radyasyon ve diğer etkenlere bağlı olarak doğal bir süreç olarak az miktarda gerçekleşmektedir. Ancak çeşitli kirliliğe maruziyetin bu arkaplan mutasyon oluşma hızını artırdığını çeşitli değerlendirme yöntemleri ile ölçüyoruz. Bunlardan bir tanesi AMES testi, ya da *Salmonella* Mutagenicity Test dediğimiz genetik olarak değiştirilmiş *Salmonella typhimurium* suşları kullanılarak çeşitli maddelerin mutasyon yapma özelliklerinin değerlendirildiği testtir. Bu test bizlere mutasyon yapabilen kirlilik miktarı ve mutasyon hızı arasında birebir ilişkilerin varlığını göstermiştir (Borowsky, 2001; Nevo, 2001; Wolf, v.d., 2004a, b; Sarasin, 2003; Krawetz, v.d., 2003).

3.5. Mozaiklik ve Anlamı

Mozaiklik alışlagelmiş bir kalıtım şekli değildir. Mozaikliği, farklı genotiplere sahip bir mozaik hücreler grubunun organizmayı oluşturması ve farklı fenotiplere sebep olması olarak ifade edebiliriz. En basit şekli ile kadınların fonksiyonel olarak mozaik yapan anlatımı yapılan X kromozom genlerinin durumudur. Mozaiklik, mutasyonlar sonucu da oluşan karışık genotipler için de kullanılmaktadır. Üreme hücrelerinde olan mutasyonlar, doğacak çocukta, organizmanın tüm hücrelerinde gözlenecektir. Ancak somatik hücrelerde oluşacak mutasyonlar, hem daha az belirgin hem de daha az sayıda hücreyi etkiler mahiyette olacaktır. Klinik olarak somatik mutasyonların daha çok sayıda tıbbi probleme sebep olduğu düşünülmektedir. Kabaca 10 trilyon hücresi olduğu varsayılan bir insanın bir geninde mutasyon olma frekansı bir milyon hücre bölünmesinde bir kere sıklıkta olacaktır. Rastgele bir bölgede bir mutasyon olma olasılığı ise 50000 hücre bölünmesinde bir keredir. Bu bağlamda bütün insanların birer mozaik olduğunu söylersek yanlış söylemiş olmayız. Mozaikliğin mertebesi ise mutasyona uğrayan hücre sayısına, hangi genlerde olduğuna ve mutant hücrelerin nerede ve gelişimin hangi evresinde olduğu gibi faktörlere bağlı olarak değişir. Hayatın bazı evrelerinde öldürücü mutasyonlar da gerçekleşebilir. Yine bazı mutasyonlar hücre ölümünde etkili olabileceği gibi yaşlanma sürecinde de rol oynayabilir.

Bazı somatik mutasyonların ise pozitif etkileri olabileceği düşünülebilir. Mesela büyüme açısından bazı avantajlar sağlayabilirler. Bu tip mutasyonlar kanser başlatıcı ve oluşumunu teşvik edici de olmaktadır. Tabii ki bu çok düşük frekansdaki mutasyonların tespiti ve ayırılması özellikle arkaplan bir mutasyon oluşma durumu düşünüldüğünde çok zordur. Bu tip somatik mutasyonlar fenotip üzerine etkisi, mutasyonun ne zaman oluştuğuna bağlıdır. Gelişimin erken bir döneminde gerçekleşen bir mutasyon daha fazla yayılım gösterecektir (Strachan ve Read, 1996).

Benzer durum bütün canlılar için olduğu gibi tabii ki midyeler için de geçerlidir. Yani bütün canlılar arkaplan bir mutasyon hızı ve kirlilik ve diğer faktörlere maruziyetten mütevellî bir mutasyona uğrama durumundadırlar. Sürekli kirliliğin içinde yaşayan canlılar için bu durumun daha kaydadeğer olması beklenir. Yani temiz bir ortamda yetiştirilen ve kirli bir ortamda yaşayan canlılar mozaiklik açısından karşılaştırıldığında durumu net olarak görebilmek gerekir (Krawetz, v.d., 2003; Ross, v.d., 2002; Gottlieb, v.d., 2001; Sonnenschein, v.d., 2000; Sarasin, 2003; Damjanovich, v.d., 2002; Nevo, 2001).

3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Rastgele Amplifiye Polimorfik DNA-PCR (RAPD-PCR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction) moleküler biyolojide kullanılan çok önemli ve yeni bir tekniktir. PCR, spesifik bir DNA parçasının kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan *in vitro* bir yöntemdir (Strachan ve Read, 1996).

1980'li yılların ortalarında, Cetus firması araştırmacıları tarafından geliştirilmesinin ardından temel moleküler biyolojik araştırmalarda (klonlama, dizi analizi ve DNA haritalaması gibi) ve bir çok hastalığın (Orak Hücre Anemisi, Kistik Fibrozis, Fragile X-Sendromu, AIDS, Lösemi vb.) DNA temeline dayalı tanısı için de klinik tıpta hızla kullanılmaya başlanmıştır. PCR ile insan genomik DNA'sı gibi kompleks DNA kalıplarından spesifik DNA parçalarının sentezinin birkaç saat içinde gerçekleştirilebilir hale gelmesi, bu teknolojinin yaygınlaşmasında başlıca neden olmuştur (Strachan ve Read, 1996).

Günümüzde PCR, allelik dizi varyasyonlarının gösterilebilmesi ile doku transplantasyonu için doku tipinin belirlenmesi, adli tıp örneklerinin genetik tiplendirilmesi (analık-babalık tayinin) gibi tıbbın diğer kollarında, tarımda (tohum saflığının belirlenmesi), sistematik ve evrim çalışmaları gibi bir çok alanda (doğadaki çeşitli canlı türlerinin tanısı, türler arasındaki polimorfizmin belirlenmesi için) kullanılmaktadır (Strachan ve Read, 1996; Arı, v.d., 1999).

In vitro koşullarda DNA çoğaltılmasının çeşitli nedenleri arasında; özgün bir DNA parçasının bol miktarda elde edilmesi, moleküler analizinin yapılması ve rekombinant organizmalar elde etmek üzere gen aktarımı için kullanılması sayılabilir.

Hücrelerde DNA doğal olarak replikasyon ile çoğalır. DNA çift sarmalında birbirinden ayrılan ipliklerin tamamlayıcıları sentezlenerek bir DNA molekülünden onunla aynı olan iki yavru molekül meydana gelir. Buna göre de hücre bölünmesi ile yeni oluşan hücrelere tüm genler aynen geçerler. Her yeni hücre jenerasyonunda genlerin kopya sayılarının iki katına çıkması nedeniyle, jenerasyonlar boyunca DNA miktarı başlangıca göre üstel olarak artar. Örneğin 30 jenerasyon sonra hücre ve gen sayısı teorik olarak 2^{30} katına çıkar. *In vitro* koşullarda istenilen bir genin ya da özgün bir DNA dizisinin çok sayıda kopyasının elde edilmesi için kullanılmaktadır. PCR ile istenilen genlerin ya da DNA dizilerinin jenerasyonlara bağlı replikasyonu, hızlandırılmış bir şekilde gerçekleştirilir. Aynen doğal hücre bölünmesinde olduğu gibi, PCR replikasyon sürecini taklit ederek yaklaşık 30 jenerasyon sonra seçilmiş bir DNA dizisinin aşağı yukarı milyar katımı kopyalar.

PCR, laboratuvar şartlarında özel DNA bölgelerinin enzimatik sentezi için kullanılır. İki sentetik oligonükleotid primer istenilen DNA bölgesinin karşılıklı ipliklerine bağlanarak hedef bölgeyi belirler. Tekrarlanan bir seri döngü şu üç alt programdan oluşmaktadır:

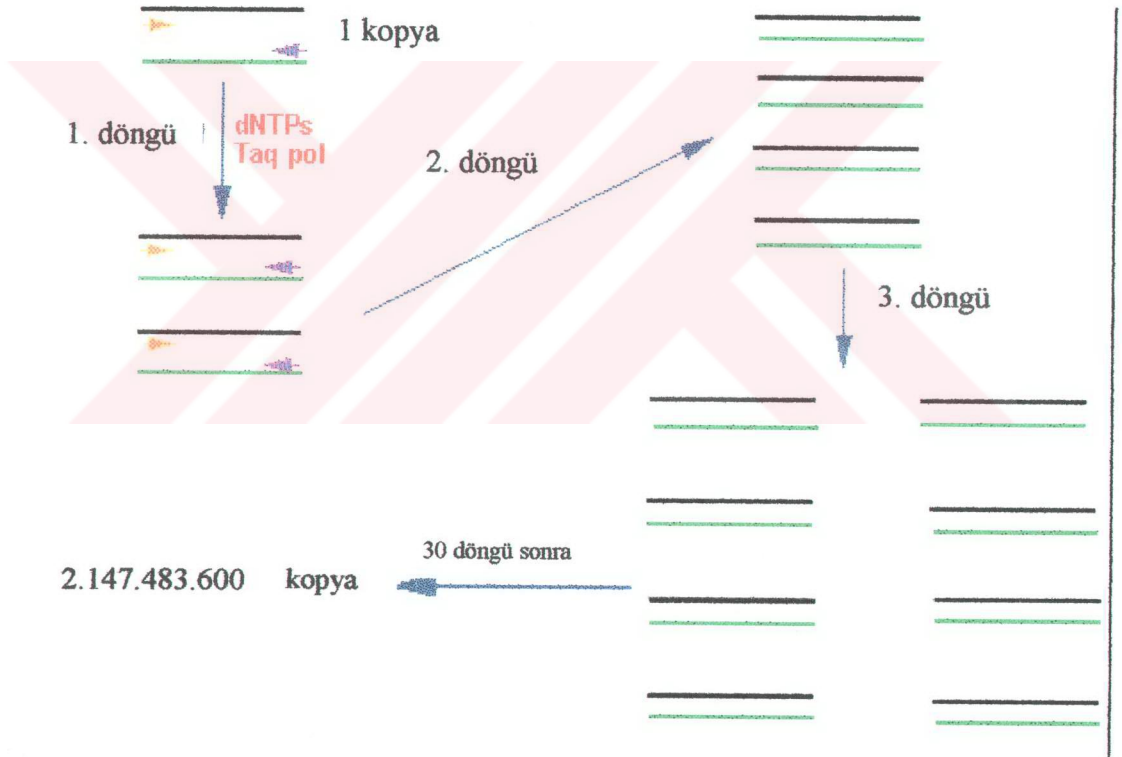
-DNA'nın Denatürasyonu

-Primerlerin Bağlanması

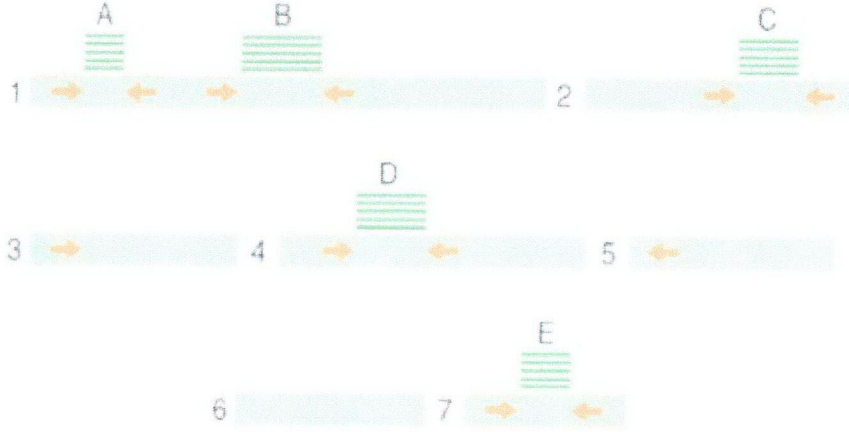
-Bağlanan primerlerin Taq DNA polimeraz enzimi yardımıyla DNA'nın istenilen bölgesini çoğaltması

Amplifiye edilen DNA bölgesi sonuçta üstel bir çoğalma gösterir. Ortalama 30 döngülük PCR birkaç milyon kez çoğalma ürünü vermektedir. Bütün bu reaksiyonun gerçekleştiği karışım aşağıda adı geçen temel maddeler kullanılarak hazırlanmaktadır:

- 10xPCR tamponu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içermektedir.
- dNTP (deoksiribonükleotidler, dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Oligonükleotid primerleri
- Taq DNA polimeraz enzimi
- MgCl_2
- DNA
- Steril deiyonize su



Şekil 8. PCR'ın şematize gösterimi. Primerler (birbirine bakan küçük oklar) tarafından belirlenen hedef DNA bölgesi, *in vitro* olarak PCR tüpüne eklenen dNTPler, Taq DNA polimeraz enzimi ve şekilde belirtilmeyen MgCl_2 , PCR tamponu ile karıştırılıp PCR cihazında kendi kendini eşlemesi sağlanarak çoğaltılır (amplifikasyon). Her döngü, sırasıyla: denatürasyon (94°C 'de), primerlerin bağlanması (annealing) (35°C - 65°C 'de) ve zincir oluşma, polimerizasyon (elongation) (72°C 'de) aşamalarından geçer ve her döngü ile hedef bölge 2^n kadar artar ve ortalama 30 döngü sonunda 2^{30} kopya hedeflenen bölge çoğaltılmıştır.



Amplifikasyon ürünlerinin elektroforez paterni

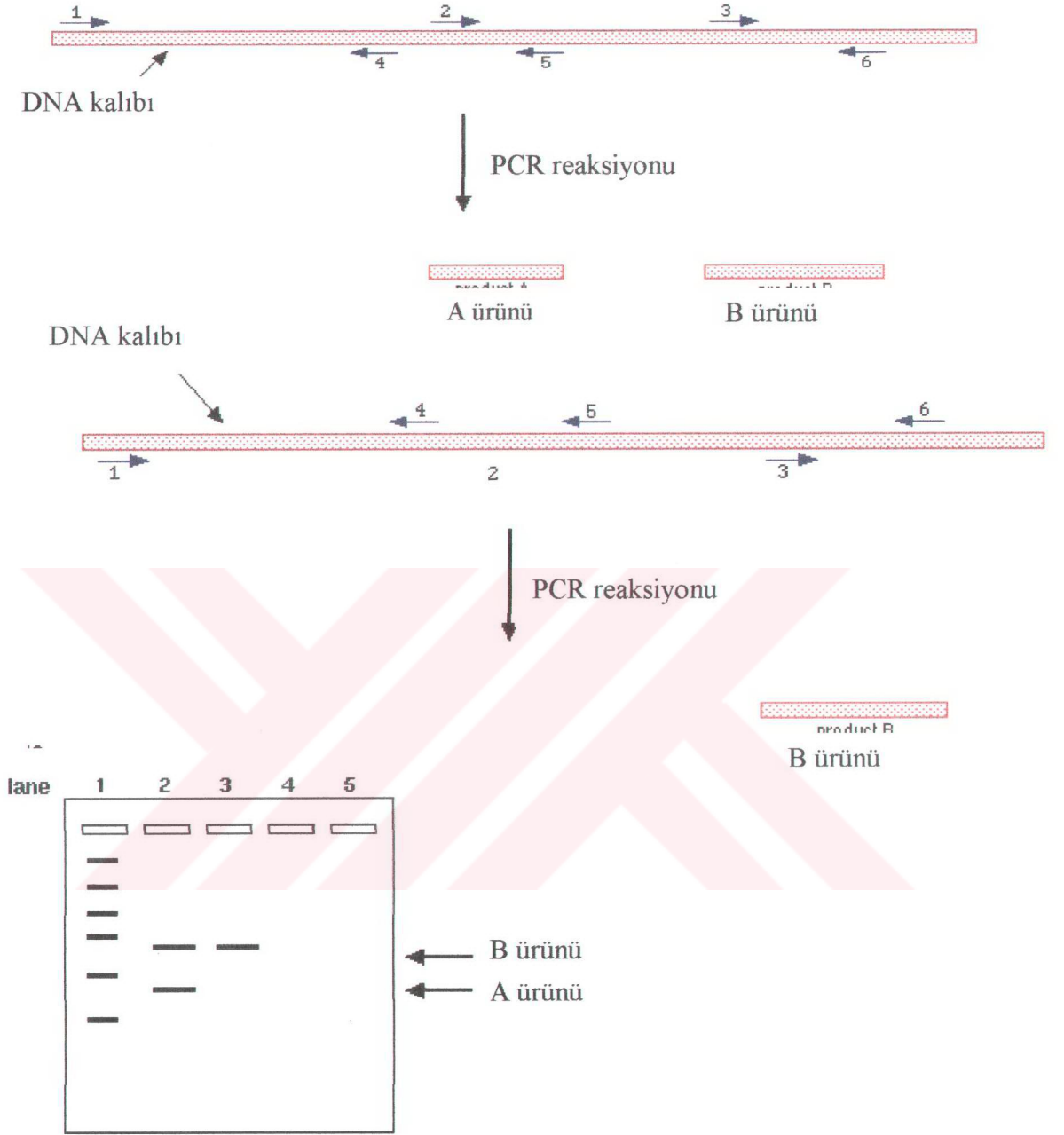


Şekil 9. RAPD-PCR şematize gösterimi. Standart PCR'daki esasına dayanmaktadır. Standart PCR primerlerine göre daha kısa (ortalama 10 bp) tek bir primer (küçük oklar) ile genomik DNA üzerinde (1-7 kromozomlar) primerlerin uygun bağlanması (okların yönü ve aradaki mesafe önemli) sonucu bir takım amplifikasyon ürünleri (A-E bantları) oluşması esasına dayanır. Daha sonra bu ürünler jel elektroforez yöntemiyle boylarına göre elektrik alanında ayrılarak RAPD profilleri oluşturulmaktadır.

RAPD-PCR ise bir çeşit PCR uygulamasıdır. Genomik DNA'yı amplifiye etmek için standart PCR'dan farklı olarak tek bir 10 baz uzunluğunda oligonükleotid primer kullanılır. Uygun oriyantasyonlarda ve birbirlerine en fazla 5000 baz çifti uzak iseler aynı primerin karşılıklı her bağlanmada bir DNA amplifikasyon ürünü oluşturması mümkün olmaktadır. Amplifikasyon ürünlerinin elektroforez metoduyla analizleri yapılmaktadır (Welsh, v.d., 1990; Williams, v.d., 1990). Genellikle iki farklı bireyin genomik DNA amplifikasyonu farklı amplifikasyon ürünleri vermektedir. Bir birey için çoğalan ve bir diğeri için çoğalmayan bir DNA parçacığı bir DNA polimorfizmi ortaya koymakta, böylelikle genetik bir işaret, markör

olarak kullanılabilir. Bu markör bölgeler Mendel tipi kalıtım göstermektedir. Gen bölgesi haritalamalarında bu markörlerin kalıtımının incelenmesi sonucu genetik haritalar oluşturulmakta, Parmakizi çalışmalarında ise canlıya ait oluşan profiller doğrudan karşılaştırılarak tür tayin edilmektedir. Bu durumlarda bantlara ait özelliklerin bilinmesine gerek olmaması metodu çok kullanışlı hale getirmektedir (Arı, 1999; Zwartjes, v.d., 2000).





- 1.kulvar: moleküler uzunluk markörü
 2.kulvar: 1. RAPD reaksiyonu
 3.kulvar: 2. RAPD reaksiyonu

Şekil 10. RAPD-PCR metoduna ait şekil, düzenlenerek alınmıştır¹. 2 no'lu bağlanma bölgesinde oluşan bir DNA değişikliği ürün A'nın amplifikasyonunu engellenmektedir ve elektroforez profilinde 3.kulvarda eksik bir bant olarak gözlenmektedir.

¹ <http://avery.rutgers.edu/WSSP/StudentScholars/project/archives/onions/rapd.html>

3.6.1. RAPD-PCR ve genotoksisite değerlendirmede uygulamaları

RAPD-PCR yöntemi 14 senelik mazisi olan bir metod olmasına ve pekçok sahada özellikle, moleküler taksonomi, moleküler sistematik, evrim ve kriminal araştırmalarda çok aranan ve kendini ispat etmiş bir yöntem olmasına karşın, özellikle çevre kirliliği değerlendirmesi ve genotoksik etkinin ölçülmesi ile ilgili literatürde çok az sayıda yayın bulunmaktadır (Welsh, v.d., 1990; Williams, v.d., 1990; Benecke, 1998). Bunlar da kirliliğin doğrudan *in vivo* değerlendirilmesi değil de, *in vitro* ya da dolaylı olarak türün RAPD parmakizindeki monotonlaşmanın kirlilikle paralelliğinin takibi ve bu şekilde kirlilikten dolayı nesli tükenebilecek türlerin belirlenmesi şeklinde olmuştur. Çok az sayıdaki yayın RAPD yöntemini kirliliğin canlı DNA'sında yapmış olduğu değişiklikliği ortaya koyma yönünde kullanmıştır.

Kimyasal maddelerin ve fiziksel ajanların DNA üzerindeki etkisini RAPD yöntemi kullanarak çeşitli canlıların, dokuların maruziyet sonrasında RAPD profillerindeki değişimlerin gösterildiği çalışmaların bazıları şöyledir; Bakırın (Atienzar, v.d., 2001), mitomisin C'nin, Benzo[a]pyrene'nin, estradiollerin (Atienzar, v.d., 2002c), asbestosun (Luceri, v.d., 2000), morötesi ışınların (Atienzar, v.d., 2000), X-ışınlarının, radyoizotopların (Theodorakis, v.d., 1999), ultrasound'un (Atienzar, v.d., 2002b), ağır metallerin (Ross, v.d., 2002; Conte, v.d., 1998) genomik DNA üstündeki tesirini değerlendiren çalışmalar ile tümörlü doku ile aynı canlının sağlam bir dokusundan ayrı izole edilen DNA'larının RAPD profil karşılaştırmaları çalışmaları da vardır (Jotwani, v.d., 2001; Bahy, 2003; Ong, v.d., 1998; Garnis, v.d., 2004; Kamaleshwar, v.d., 2001; Ma, v.d., 2000; Nadig, v.d., 1998; Yang, v.d., 2000; Wolf, v.d., 2004a; Wolf, v.d., 2004b; Nevo, 2001). Doktora çalışmasından bağımsız yapmış olduğumuz ve yayına kabul edilmiş iki çalışmamızdan birinde rejenerasyon öncesi ve sonrasında olan DNA değişimi aynı canlı için gösterilirken, bir diğerinde de deniz kirliliğine maruz kalan çeşitli balıkların farklı dokularından çıkarılan DNA'nın RAPD profil farklılaşması gösterilmiştir (Uzonur, v.d., 2004a, c).

IV. *Mytilus galloprovincialis*

4.1. Midyelerin Morfolojisi ve Biyolojisi

Mollusca filumunun Bivalvia klasisi içinde yer alan Mytilidae familyası geniş bir yayılım alanına sahiptir. Bu familyanın en önemli türleri ise *Mytilus galloprovincialis* (kara midye veya Akdeniz midyesi) ve *Mytilus edulis* (mavi midye veya Avrupa midyesi), *Modiolus barbatus* (at midyesi) ve *Perna* sp., (Afrika midyesi)'dir. Ülkemiz sularında ise Mytilidae familyasının ekonomik olarak değerlendirilen yukarıdaki türlerden *Mytilus galloprovincialis* ve *Modiolus barbatus* olmak üzere 2 türü bulunmaktadır. *Mytilus galloprovincialis* İzmir'den Karadeniz sularına kadar toplanırken, *Modiolus barbatus* avcılığı en fazla Ayvalık ve civarından yapılmaktadır* (Uysal, 1970).

Mytilid kabukları mikro yapıya sahiptirler. Ilıman bölgelerde kabuk 2 veya 3 tabakalı argonit ve kalsitten oluşurken diğer bölgelerdeki kabuklar 2 tabaka argonit ve sedef tabakasına sahiptirler. Genel olarak *M. galloprovincialis*'in kabukları ön (anteriör), arka (posteriör), ventral ve dorsal kenar olmak üzere dört kısma ayrılabilir. Ön kenar çok kısa olup kabuklar burada birbirlerine bağlıdır. Ventral kenar bysus ipliklerinin çıktığı kenardır. Önden arkaya kadar düz bir yapıdadır. Ventralin tam tersi kenar ise dorsal kenarı oluşturur. Kavisli olması dikkat çekicidir. Posterior kenar ise midye kabuklarının açıldığı uç kısma denilmektedir. Anteriör-dorsal kenarda kabukların birbirine bağlı durmasını sağlayan boynuza benzeyen ligament yer alır. Ligament iki kabuk arasında düz bir oluk içersindedir. Ligament kabukların kapama kaslarının kapama kuvvetlerinin tersi yönde bir kuvvete sahiptir. Ölen midyede kaslar kapama kuvvetini kaybettiklerinden ligamentin aksi yöndeki elastikiyetinden dolayı kabuklar açık kalır. Kabukların üzerinde umbodan itibaren küçük eliptik daireler şeklinde başlayan ve kenara paralel olarak devam eden büyüme çizgileri vardır. Midye uygun olmayan ekolojik şartlara maruz kaldığında büyüme çizgilerinde anormal bir sıklaşma, yukarı doğru kabarma veya aşağıya doğru çökme görülür. Midyelerin sağ kabukları sol kabuklarından 1mm kadar daha yüksektir. Kabuğun ventralinde bysus yarığı vardır. Bu yarık

*http://www.tarim.gov.tr/arayuz/9/icerik.asp?efl=uretim/su_urunleri/su_urunleri.htm&curdir=uretim\su_urunleri&fl=midye/midye.htm

periostrakum kıvrımlarıyla örtülüdür. Hayvanın ventralinde bulunan periostrakum kıvrımları, kabuklar kapandığında yastık görevi görürler. Kabuklar kapandığında bysus ipliklerinin çıktığı bu alandan içeri su veya istenmeyen maddenin girmesini engellerler (Lök, 2001; Uysal, 1970).

Kabuklara içten bakıldığında kolayca fark edilebilen iki renk görülür. Orta kısım beyazımsı sedef parlaklığındadır. Kenarlara doğru renk koyu mavi olur. Bu iki kısım birbirinden manto çizgisi ile ayrılırlar. Manto kabuk üzerinde belirgin bir iz bırakır.

Kabuklar kapama kası kesilerek açıldığında manto boşluğunda şu kısımlar göze çarpar: Kabuk içersine yerleşmiş ve buraya sıkıca bağlanmış manto lobları; anteriörde kabukların kenetlendiği gaga şeklindeki dişli kısmın hemen alt tarafında ligament ekseni üzerinde, ince yarık şeklinde bir ağız; ağız etrafında altta ve üstte birer çift olmak üzere 4 adet ağız kolu (palial palp) bulunur. Bunların birbirine bakan kısımları oluklu olup, üzerleri kirpikli epitel hücreleri ile örtülüdür. Ağızdan sonra özafagus ve ortaya yakın yerde ligament ekseni üzerinde, dil şeklinde koyu kahverengi kızılımsı renkte bir ayak ve ayağı öne, arkaya bağlayan kaslar görülür. Ayağın hemen arka tarafında bysus iplikleri, bunların çıktıkları ve bissogen bezlerinin bulunduğu bir şişkinlik yer almaktadır. Bu şişkinliği takiben, genital kanalların bol olarak bulunduğu mesosoma, ayağın önüne ve arkasına doğru uzanan “V” şeklinde kaslar, özafagusun iki tarafında ve kasların üzerinde, serebral ganglionlar, anterior kasların altında ve mide etrafında koyu kahverengi karaciğer bezleri bulunur. Bunların üzerinde vücudun iki tarafında labial palplerden posteriyör kapama kasına kadar, bir çift bojanus organı uzanmaktadır. Bojanus organlarının dış kenarları boyunca, kenar bantları ile vücut duvarına tesbit edilmiş, uçları serbest bir çok filamentten oluşan kitap yaprağı şeklinde iki çift solungaç, longitudinal olarak ağızın dış kenarından posterior kapama kasına kadar uzanır. Solungaç bantları ile posterior kapama kası arasında üreme, boşaltım ve anüs açıklıkları, dorsalde ligamentin bittiği yerden posteriyöre doğru uzanan perikard boşluğu ve bu boşlukta kalp bulunur (Uysal, 1970). Midyeler 2-100 µm boyutlarında olan organik ve inorganik her türlü partikülü süzerek beslenirler. Ortalama 7-8 cm boyundaki bir midye saatte 10-15 lt suyu süzme özelliğine sahiptir. Midyelerin filtrasyon hızı üzerine; midye büyüklüğü, partikül büyüklüğü, partikül yoğunluğu, partikül türü, su sıcaklığı, su akıntısı etkilidir. Midyelerde beslenme az olduğunda büyüme yavaşlar veya durur. Et verimi düşer ve

gonadlarda olgunlaşma tam olmaz, alınan döller dayanıksız ve küçük olur. Sıcaklığın 8-10°C civarında olduğu kış aylarında ise midyeler, partikül organik madde içerisinde yer alan ve canlı organizma olmayan kısmı ek besin olarak kullanılmaktadırlar. Kabuklu su canlılarında büyümeyi sıcaklık ve besin durumu etkilemektedir*.

4.2. Anatomisi

Midyenin vücudu 6 temel bölümden oluşur: kabuk, baş, yumuşak vücut, manto, ayak ve solungaçlar. Kabuk, kalsiyum karbonat ve proteinden oluşur, koruyucu bir dış iskelet oluşturur. Baş kısmı kabuğun içinde bulunur ve duyu organı vazifesi yapar. Yumuşak vücut, kalın bir merkezi küttedir, her iki kabuğa da yapışık durumdadır. Kalp ve sindirim, boşaltım ve üreme için gerekli diğer hayati organları içerir. Manto, kabuğun iç kısmında yer alan ince bir dokudur. Görevi kabuğun salgılanması ve kabuk ile manto dokusu arasında partikül maddelerin girişini engellemektir. İnci, kabukla bu doku arasında yabancı bir madde girdiğinde nacre salgılanması sonucu oluşur. Solungaçlar, vücudun her iki tarafında bulunur. Solunum, süzme, besinleri ayırma ve üreme için önemlidirler. Solungaçları saran siller suyun dolaşımına yardımcı olur ve dışının üremesi için gereklidir. Ayak vücudun alt kısmını oluşturur ve kabuktan dışarı doğru uzanabilir. Ayağın elastik bir kas dokusu olması dolayısıyla uzayabilme gevşeyip kasılabilmek ve bu sayede hayvanın yakın çevrede hareket ederek kendisini gömebilme veya bir zemine (substrat) tutturabilmesine yarar (Bilecik, 1989).



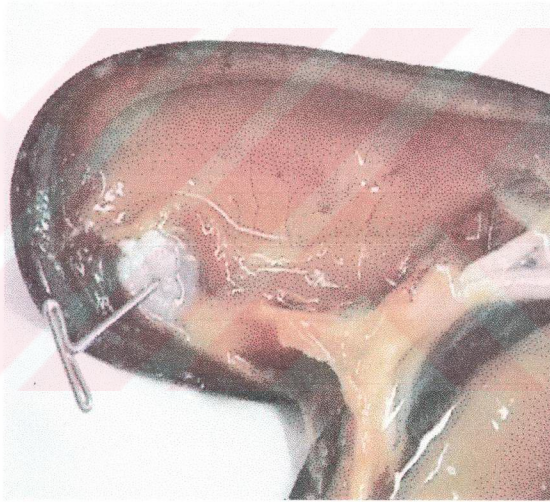
Şekil 11. Midye'nin iç görüntüsü**

*http://www.tarim.gov.tr/arayuz/9/icerik.asp?efl=uretim/su_urunleri/su_urunleri.htm&curdir=\\uretim\\su_urunleri&fl=midye/midye.htm

** <http://www.k12.nf.ca/kingacademy/musseldissection.htm>



Şekil 12. Midye kabuklarının üstten görünüşü*



Şekil 13. İğne 'Adductor kas'ı, kapama kasını göstermektedir*

* <http://www.k12.nf.ca/kingacademy/musseldissection.htm>

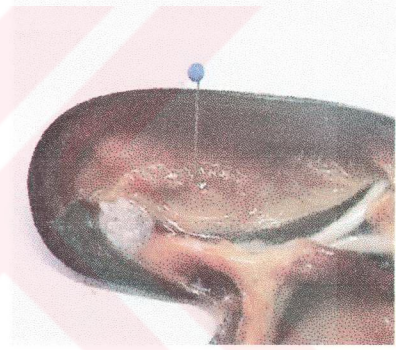


Şekil 14. a, b Mavi iğne ayağı göstermektedir

Ayağa yakından bakış*



Şekil 15. Yeşil iğne 'manto'yu göstermektedir*

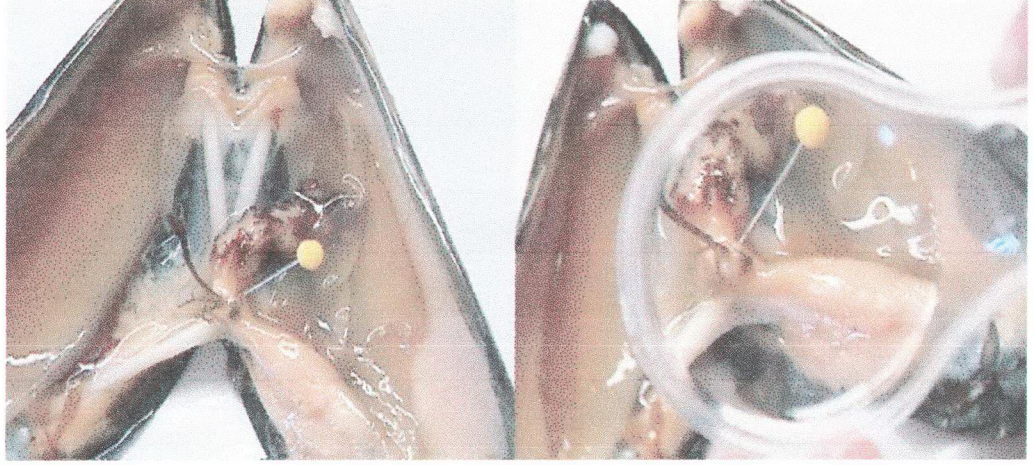


Şekil 16. Mavi iğne 'solungaçları' göstermektedir*



Şekil 17. İğne "mideyi" göstermektedir*

* <http://www.k12.nf.ca/kingacademy/musseldissection.htm>



Şekil 18. Sarı iğne 'bisal beze ve bisus iplikçığı' göstermektedir*

4.2.1 Midyelerde yaş tayini

Midyelerin büyümesi bazı faktörlere bağlıdır. Bunlar; beslenme ve bölgenin ekolojisidir.

Midyelerin büyümesi, esas olarak beslenme ile alakalıdır ki, besinlerini fitoplanktonlar ile erimiş organik maddeler oluşturmaktadır.

Midyelerin su içerisinde kalma süresi, midyelerin beslenmeleri ve dolayısıyla büyüme hızları üzerinde etki yapar. Bulanıklık, tuzluluk ve ısı değişikliği de, her gün alınan besin miktarını değiştirerek büyüme hızını etkiler.

Az orandaki tuzluluk her zaman büyüme hızını yavaşlatır. Buna örnek olarak Baltık Denizi popülasyonları gösterilebilir. Tuzluluğu az olan bölgelerde yaşamakta olan midyelerin boyları normal deniz tuzluluğunda yaşamakta olan midyelere göre daha kısadır. Baltık Denizi'nde özellikle Botnik Körfezi'ndeki midyelerdeki uzunluklar çok kısadır (30-40 mm). Buna karşılık tuzluluğu daha yüksek olan İngiltere sahillerinde midyelerin uzunluğu 150 mm'ye ulaşmaktadır.

* <http://www.k12.nf.ca/kingacademy/musseldissection.htm>

Midyelerin büyümesi, bütün yıl aynı olmayan bir hızla gelişir. Büyümenin en aktif dönemi planktonun çok olduğu ve su sıcaklığının yükseldiği döneme rastlar. Suyun çok soğuk olduğu devrede ise büyümede bir duraklama olur. Ergin midyelerde büyüme yavaş olurken, genç midyelerde bu oran çok daha hızlıdır.

Midyelerin gelişmesinde üzerine kendilerini yapıştırdıkları zeminin yapısı rol oynar. Beton kazıklarında ve taşlık zeminlerde yaşayan midyeler, ağaç ve demir kazıklarda, çamurlu zeminlerde yaşayan midyelere göre daha hızlı büyümektedirler. Bunun başlıca nedeni, midyelerin fizyolojik faaliyetleri sonucunda suya bıraktıkları karbonik asit aracılığı ile bissuslarını yapıştırdıkları taşlardan, kabuğun büyümesi için gerekli kalsiyumkarbonat'ı kolayca sağlayabilmelerindedir (Lök, 2001; Bilecik, 1989; Hosanoğlu, 1975). Bu nedenle taş zemin midyelerinin kabukları diğer zeminde gelişenlere oranla daha kalın ve yaşlarına göre boyları daha iridir. Midyelerin büyüme hızını saptayan diğer bir faktör de derinliktir. Yüzeye yakın bölgelerde yaşayan midyeler, derinlerdekilere oranla daha yavaş büyürler. Özellikle Atlantik okyanusundaki midye yatakları, gel-git olayının etkisi altındaki sığ sularda bulduklarından, suyun çekilmesi ile midyeler günün belirli saatlerinde, su dışında kalır ve beslenemezler. Aynı bölgede daha derin popülasyonlar bunlara oranla daha besili ve daha iridirler.

Çok dalgalı yerlerde yaşamakta olan midyeler, kapalı ve korunmalı yerlerde yaşamakta olan midyelere göre daha küçük oluşları ile dikkati çekerler. Kirlenmeye maruz kalan sahalarda ve buna paralel olarak oksijen azlığı söz konusu olan yerlerde yaşayan midyeler temiz bölgelerde yaşayan midyelere oranla daha küçük olmaktadır (Lök, 2001; Bilecik, 1989; Hosanoğlu, 1975).

Midyelerde büyüme, bölgelere göre de değişiklik göstermesine rağmen, fikir vermek amacıyla, literatürde verilmiş olan Odessa bankındaki midyelerin büyümelerine ait değerler Tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3. Odessa banklarındaki midyelerde büyüme (Ivanov, 1967).

Yaş Grubu	Uzunluk (mm)	Ağırlık (g)
1+	25.6	1.7
2+	44.7	10.1
3+	58.4	20.1
4+	66.2	29.9
5+	71.7	38.4
6+	76.5	45.4
7+	81.3	50.5
8+	85.8	54.0

Farklı boy ve ağırlığa sahip midye gruplarında tespit edilen gelişme farklılıkları küçük bireylerin daha büyük bireylere göre, hızlı büyüme aktivitesine sahip olmaları ile doğrudan ilişkilidir. Midye boyu arttıkça, büyüme hızı yavaşlamaktadır.

Aynı populasyon içinde görülebilecek farklı büyüme oranları ise çevresel faktörlerdeki dalgalanmalardan kaynaklanabilmektedir. Kabuklu su canlılarında büyümeyi sıcaklık ve besin durumu etkilemektedir. Midyelerde büyüme ile ortamın besin konsantrasyonu arasında önemli bir ilişki vardır. Genel olarak midyelerde hızlı bir doku artışı (büyüme) ilkbaharda su sıcaklığının ve buna paralel olarak ortamdaki fitoplankton ve zooplankton varlığının artması ile başlar. Su sıcaklığının artması ile iyi bir beslenme dönemine giren midyelerde, yaz ve sonbahar aylarında protein ve karbonhidrat değerleri yüksek olup, iyi bir kondüsyona sahip olurlar. Kış boyunca gözlenen ağırlık azalmaları karbonhidrat (Glikojen v.b.) rezervlerinin kullanımından kaynaklanır. Bu dönemde midyelerde gametogenez ve yetersiz beslenmenin sonucu olarak hem protein hem de yağ içeriklerinin azaldığı gözlenir (Lök, 2001). Midyelerin büyüme hızı, ortam sıcaklığının azalıp çoğalmasından da etkilenmektedir. Zira, midyelerin gelişmesi 6°C nin altında ve 28°C nin üzerinde durur (Lök, 2001).

4.3. Dağılımı

M. edulis ve *M. galloprovincialis* aslında bir tek türün coğrafi varyeteleridirler. Zira, *M. galloprovincialis* populasyonları içerisinde her iki türe ait kabuk şekillerinin tüm ara

safhalarına rastlamak mümkündür. Kuzey Avrupa kıyılarında gelişen *M. edulis*'lerde etin kabağa oranı genellikle daha yüksektir. Bu ise, beslenme şartlarının bir sonucudur. *M. galloprovincialis*'lerin Ege Denizi, Ayvalık'da yetişen popülasyonlarında da böyle yüksek et randımanı elde edilebilmektedir.

Midyeler tuzluluğu nisbeten az olan suları tercih ederlerse de, her türlü tuzluluktaki sulara yaşayabilmektedirler. Başka bir deyimle midyeler euryhalin türlerdir. En uygun (optimal) tuzluluk o/oo 15-22 S dir. Karadeniz midyeleri oksijensiz (anaerobik) şartlarda ortalama 5 gün yaşayabilirler. Bu nedenle kapalı kutularda canlı olarak taşınmaları mümkündür. Su dışında kalan midyeler 10-23°C arasında değişen nemli ortamlarda 6 gün süre ile yaşamlarını sürdürebilmektedirler (Daguin, v.d., 1999; Beynon, v.d., 1996; Bilecik, 1989; Hosanoğlu, 1975; Uysal, 1970; Suchanek, v.d., 1997).

4.4. Beslenmesi

Midyelerin solungaçlarını kullanarak gerçekleştirdikleri kompleks bir beslenme mekanizmaları vardır. Solungaçlar geniş ve sillerle kaplıdır. Çevrelerindeki su küçük gıda parçacıkları taşır, bu küçük parçacıklar tek hücreli algler, küçük hayvanlar ve ölü organik madde şeklindedir. Su inhalant siphondan girerek, solungaçlardan geçer ve yiyecek parçacıkları filtre edilerek mukus içine gömülürler. Mukus ve yiyecek karışımı sillerin yardımıyla bir çeşit akıntı oluşturarak ağıza doğru hareket eder. Ağızı geçen yiyeceklerin hazmı daha sonra midede başlar.

Midyeler 2-100 µm boyutlarında olan organik ve inorganik her türlü partikülü süzerek beslenirler. Ortalama 7-8 cm boyundaki bir midye saatte 10-15 lt suyu süzme özelliğine sahiptir. Midyelerin filtrasyon hızı üzerine; midye büyüklüğü, partikül büyüklüğü, partikül yoğunluğu, partikül türü, su sıcaklığı, su akıntısı etkilidir. Midyelerde beslenme az olduğunda büyüme yavaşlar veya durur. Et verimi düşer ve gonadlarda olgunlaşma tam olmaz, alınan döller dayanıksız ve küçük olur. Sıcaklığın 8-10°C civarında olduğu kış aylarında ise midyeler, partikül organik madde içerisinde yer alan ve canlı organizma olmayan kısmı ek

besin olarak kullanılmaktadırlar. Kabuklu su canlılarında büyüme sıcaklık ve besin durumu etkilemektedir (Uysal, 1970; Bilecik, 1989).

4.5. Hareket

Midyelerin hareketi kas yapısında esnek ayakları yardımıyla olur. Bu organ aynı zamanda kendini gömmek ve bir zemine tutunmak için kullanılmaktadır. Bir çok midye emekleme hareketini, bu esnek organı önce uç kısmındaki kas uzantı ile bir zemine tutunarak, sonra da ayak kaslarını kasarak vücudunu öne çekerek yapabilmektedir. Yine benzer bir seri ayak içi veya çevre kasların kasılma ve gevşeme hareketi ile midyeler kendilerini gömebilmektedirler*.

4.6. Üremesi**

Midyelerde çoğalma sistemi bütün vücuda yayılmış kanallar ve kanalcıklardan meydana gelir. Kanalcıkların uçları bağ dokuda ve genital organlarda son bulur. Bu kanal ve kanalcıklardan meydana gelen sistem, manto loblarının her tarafındaki bağ dokusu içerisine yayılmış durumdadır. Üreme zamanlarında, genital organların bulunduğu manto dokusu tamamen cinsiyet hücreleri ile doludur. Bunlar mesosomada, perikardial boşluğun hemen altında, vücudun yan duvarlarında, karaciğerin hemen üzerindeki dokularda yayılırlar. Genel olarak üreme sistemi solungaçlar, kaslar ve ayak hariç vücudun her tarafına yayılmıştır. Mantonun anteriöründe yani karaciğerin üstünde, lateralde ve mesosomada mevcut kanallardan gelen kanalların birleşmesi ile oluşan genital kanal, mantonun iç yüzeyine, buradan arkaya döner; vücudun diğer tarafından gelen diğer kanal ile birlikte bir kanal halinde ventral kanalda solungaçların kenarına paralel olarak uzanır ve posteriyör kapama kasının hemen yanından dışarı açılır. Burası canlının çoğalma organı açıklığıdır ve kontrolü altında açılıp kapanır. Bütün mantoya yayılan genital organlarda ve bağ dokusunda üreme mevsimlerinde, yoğun olarak cinsiyet hücreleri görülebilmektedir.

* <http://www.upei.ca/~cai/>

**http://www.tarim.gov.tr/arayuz/9/icerik.asp?efl=uretim/su_urunleri/su_urunleri.htm&curdir=\uretim\su_urunleri&fl=midye/midye.htm

İzmir Körfezi'nde midyeler Eylül'den Mayıs-Hazirana kadar döl verebilmektedirler. Fakat en yoğun döl verimi Eylül-Ekim ve Mart-Nisan aylarında olmaktadır. Midyeler döllerini bıraktıktan sonra 1 ay içinde kendini tekrar toplayarak yeni döl üretmektedir * (Lök, 2001). Bu durum midyeler için birçok faktöre bağlı değişim gösterse de, genelde Mart-Haziran aylarındadır.

Midye larvaları bir sübstrata tutunduktan 6-8 ay içinde seksüel olgunluğa ulaşırlar.

Midyeler ayrı eşeyli olup, olgun erkeklerde gonadlar krem-beyaz, dişilerde ise portakal sarısı tonlarındadır. Kabuklar kapalı iken cinsiyet ayrımı yapılamaz. Ancak midye kabuğunu su içinde hafif açtığına renklenme fark edilebilirse cinsiyetleri hakkında konuşulabilir.

Yumurta bırakma süresi ve miktarı buldukları ortamdaki besin türlerine ve bolluğuna, tuzluluk ve su sıcaklığına bağlı olarak değişmektedir.

Midyelerde Gonad Gelişim Evreleri**

Midyelerde gonad olgunlaşma süreci 4 aşamada tamamlanır:

Dinlenme Evresi: Canlı bu safhada, seksüel dinlenme safhasındadır. Bağ dokusu iyi gelişmiştir. Manto fildişi rengindedir. Manto dokularında foliküller yoktur.

Evre 1- Bu safhada, genital kanalların epitelial tabakalarından cinsiyet hücreleri meydana gelmeye ve foliküllerde gametogenez görülmeye başlar. Foliküller hızla artarak manto dokusunu kaplar. Erkeklerde çoğalma kanalcıklarında spermatidler, dişide germinal epitelyumdan tomurcuklanma ile meydana gelen oositler bulunur. Bu safhada, foliküllerin gelişme derecesine ve bağ dokusundaki glikojen miktarına göre, biraz değişiklik göstermesine rağmen manto rengi dişilerde kırmızı kahverengi veya portakal renginde, erkeklerin ise açık portakal sarısıdır.

*<http://www.upei.ca/~cai/>

**http://www.tarim.gov.tr/arayuz/9/icerik.asp?efl=uretim/su_urunleri/su_urunleri.htm&curdir=\uretim\su_urunleri&fl=midye/midye.htm

Evre 2- İyi gelişmiş foliküllerde olgun olmayan sperm ve yumurtalar bulunur. Foliküllerde yağ hücreleri görülür ve glikojen miktarı artar. Erkeğin mantosu kahverengi toprak renginde ve çok fazla foliküllerle kaplıdır. Dişinin mantosu portakal kırmızı tonlarında olup, bunun üzerinde kayısı renginde ovaryumlar tesbit edilir. Erkeğin mantosu dişininkinden daha düzgünce bir görünüştedir.

Evre 3- Bu safhada midye olgundur. Mantonun bağ dokusu hemen hemen foliküllerle kaplıdır. Manto şişkindir. Manto dişilerde portakal veya kırmızımsı, erkeklerde ise süt beyaz veya kirli beyazdır.

Evre 4- Midyeler bütün cinsiyet hücrelerini dökmeye başlarlar. Bu esnada manto incelik ve şeffaflaşır. Üreme hücrelerini dökme aralıklı bir şekilde devam ederse, bu esnada erkeklerin mantosu beyazımsı, dişilerinki ise kırmızımsı olur.

Üreme mevsiminde boşalan genital organlar, tekrar cinsiyet hücreleri ile doldurulur. Üreme hücrelerinin tekrar olgunlaşması ekolojik şartlara bağlı olarak, bir ayı geçmemek üzere değişir. Yaz aylarında folikül teşekkülü durur. Canlı bu dönemde eşeyli üremenin, dinlenme aşamasındadır (Seed ve Suchanek, 1992).

Midyeler ayrı eşeyli olmakla beraber çok nadir olarak hermafroditlik gösterirler. Manto içerisindeki dokularda gelişen sperm ve yumurtalar olgunlaşınca genital kanallardaki siller vasıtası ile dışarı atılırlar. Bu hücrelerin dışarı atılmasında bazı uyarılar etkili olmaktadır. Erkekler spermlerini ince uzun ip şeklinde su içine fişkırtarak 3-5 cm mesafeye yayarlar. Sperm salımından sonra midye etrafındaki suyun rengi sütümsü bir renk alır. Dişiler de yumurtalarını üreme organı açıklığından ince uzun paketler halinde 2-3 cm mesafeye yayarlar. Paketler halinde suya bırakılan yumurtalar kürevi bir şekil aldıktan sonra, birbirlerinden ayrılarak pembe veya kırmızı bir renkte zeminde birikirler. Üreme hücrelerinin bırakılması bazen devamlı olarak 2-3 saat ve bazen de aralıklı olarak 2-3 gün devam edebilir. Eğer cinsiyet hücrelerinin hepsi bırakılmaz içeride kalırsa, hücreler dejenere olur ve vücut tarafından absorbe edilir. Dalgalar ve su hareketleri suya bırakılan yumurta ve spermlerin yayılıp birbirine karışmasına ve döllenmenin olmasına neden olur. Ortalama bir dişi 5-12 milyon arası yumurta üretebilir.

Olgun yumurtalar alesital tipte, soluk kahverengi, küre şeklinde ve 60-70µm çapındadır. Yumurtaların ortasında çekirdek, çekirdek etrafında da yumurta granülleri yer alır. Spermiler toplu iğne şeklinde olup, baş, boyun ve kuyruk bölgelerinden oluşur. Sperm 3.5-5µm'dir. Spermilere hareket sağlayan kuyrukları ise 40-60µm arasında değişen uzunluklara sahiptir (Lubet, 1959; Sugiura, 1962).

Yumurtaların İnkübasyonu ve Larva Özellikleri

20°C'de ilk bölünme döllenmeden yaklaşık 45 dak. sonra olur. Döllenmeden 24 saat sonra silli trakofora safhasına ulaşılır. Bu safhada büyüme ve hareket çok hızlı olup, larva sillerini kullanarak hareket eder.

30 saat sonra, trakofora larvasında sindirim sistemi ve dorsal bölgenin posterior tarafında, kabuk bezinin faaliyeti sonucunda kalınlaşan bir kabuk görülür. Bu kabuk hızlı bir şekilde gelişerek önce tek, daha sonra sağ ve sol tarafta olmak üzere iki kabuk haline gelir. Önceleri küçük olan kabuklar döllenmeden 40 saat sonra tüm vücudu kaplar. 48 saat sonra kabuklar tamamen vücudu örterek, boyu 95 µm, eni 70 µm ve kalınlığı 70 µm "veliger" larva safhasına ulaşılır. Bu safhada bir velum üzerinde uzun bir kamçı ve bunun etrafında siller görülmektedir. Bir tehlike anında velum kabuk içine çekilerek kabuklar kapama kasları ile sıkıca kapatılır.

Midye larvaları yaklaşık olarak 2-4 hafta planktonik bir yaşam sürerek su sütununda aktif olarak yüzer ve beslenirler. Larva 140-150 µm boya ulaştığında kabukların bağlandıkları noktada yuvarlanmış umbo görülür. Bu değişim ile larva, düz menteşeli durumdan umbo safhasına geçer. Larva 210-230 µm boya ulaştığında umbo yavaş yavaş menteşeden yayılır ve küçük bir tomurcuk halini alır. Kabuk boyu 220-230 µm'ye ulaştığında larvada bazı yapılar gelişmeye başlar. Göz noktası gelişir ve larva 245 µm'ye ulaştığında kaybolur. Larva 195-210 µm iken ayak oluşur ve 215-240 µm boya ulaşan larvalarda ise ayak aktif hale gelir.

Yaklaşık 260 µm'ye ulaşarak pediveliger adını alan larvalar, bu aşamada metamorfoz geçirmeye hazırdırlar. Bununla beraber uygun bir substrat olmadığı takdirde metamorfoz 10°C'de 40 günün üzerinde 20°C'de 2 gün ertelenebilir. Metamorfozun gecikmesi durumunda

büyüme çok azalır ve velum kısmen dejenere olur. Larva beslenemez, yüzme bozulur ve ölüm oranı artar (Dare, 1976).

Larval Gelişim

Midye larvaları 15–30 gün içinde metamorfoz aşamasına ulaşır ve yerleşmeye başlarlar. Larval yaşam süresi yeterli ve uygun besine, sıcaklığa, tuzluluğa ve diğer değişkenlere bağlıdır. 3 haftalık bir larval dönem sonunda larva ağırlığı 0.1 µg'dan 1.0 µg'a ulaşır. Larva günlük olarak ağırlığının %30-60'ı kadar besine gereksinim duyar.

Larva ölümleri su ortamında var olabilecek predatör organizmalardan kaynaklanabileceği gibi su kalitesindeki ekstrem değişikliklerden de kaynaklanmaktadır. Bir çok omurgalı ve omurgasız bu hareketli larvaları besin olarak tüketebilmektedir. Bivalve larvalarının bulunduğu bir stoğun %3'nün poliket (*Neptys ciliata*) larvaları tarafından günlük besin olarak kullanılabilir. Diğer ölümler ise aynı türün veya diğer suyu süzerek beslenen türlerin ergin bireyleri tarafından larvalar filtre edilerek olmaktadır (Dare, 1976).

Midye larvalarında kabuk boyuna göre büyüme eğrisi bazı verilerde lineer olmasına rağmen, genelde sigmoidal şekildedir. Midye larvalarının 5°C'de büyümesi durur. Sıcaklık 10-16°C arasında büyüme oranı artar ve yüksek sıcaklıklarda ise büyüme yavaşlar veya bazı popülasyonlarda durur. Bu sıcaklık aralıkları popülasyonların buldukları bölgeye göre az değişiklikler gösterir.

Bazı midye popülasyonlarında büyüme %19'da durur, %30-32'de ise normal büyüme gösterirken, bazı popülasyonlarda ise %14 tuzlulukta bile büyümenin olduğu tespit edilmiştir.

Midye larvalarının büyümesi üzerinde tuzluluk ve sıcaklık etkili parametrelerdendir. Optimum larval büyüme 20°C'de ve %25-30 tuzlulukta olur. Büyüme sıcaklık 25°C'ye çıktığında ve 10°C'nin altına düştüğünde, tuzluluk ise %40 gibi yüksek veya çok düşük olduğunda azalmaya başlar. Midye larvalarının büyümesi, dar bir tuzluluk ve sıcaklık aralığında gerçekleşmektedir. Bu, hayatta kalmaları için gereken aralıktan daha dardır.

Midye larvaları süzebilecekleri büyüklükte olan her partikülü filtre edebilmektedirler. Kültür şartlarında bu süzülen maddelerin değerlendirilmesi ve değerlendirilenlerin de besinsel kalitelerinin iyi olması istenir. Larva besini olarak kullanılabilir birçok alg hücresi üzerinde araştırmalar yapılarak bunlardan hangilerinin uygun besin olduğu tespit edilmiştir.

Chlorella sp. hücre duvarının kalın olması ve metabolik artıklarının bivalve larvaları için toksik olması nedeni ile kabuklu larvalarının beslenmesinde tercih edilen bir fitoplankton türü değildir. Daha çok hücre duvarı olmayan flagellalı hücre türleri besin olarak tercih edilmektedir. Verilecek besin miktarı kültür sıcaklığına, larva sayısına ve alg kültür yaşına bağlı olarak değişir. Tek tür ile besleme yapmaktan ziyade karışık türler ile yapılacak beslenme ile larvalar daha hızlı bir büyüme gösterirler. *Isochrysis galbana*, *Monochrysis lutheri*, *Phaedactylum tricornutum*, *Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros calcitrans* larva beslemede kullanılan başlıca fitoplankton türlerindedir (Bayne v.d, 1976).

Pediveliger larvalar zemine iner ve ayağı ile sürünerek uygun yer arar. Midye kültür halatları gibi uygun bir substrat bulduğunda, pediveliger larvalarda yerleşme işlemi başlar. Bunun için bysal bez salgılarıyla kendini substrata yapıştırır. Bu işleme yerleşme adı verilir. Bu onun sessiz hayata geçişinin başlangıcıdır. Midye kendini bysus iplikleri ile yapıştırdığında velum tamamen kaybolur ve suda yüzme aktivitesi sona erer. Midye larvaları filamentli yapıları yapışmak için tercih ederler. Düz, pürüzsüz bir zeminden çok pütürlü ve üzerinde fouling organizmaların tutunduğu yüzeyleri tercih ederler. Bu tercihlerinde kimyasal cezbedilicilikten çok, morfolojik cezbedici özelliği söz konusudur (Dare, 1976).

4.7. *Mytilus* Türleri ile Yapılan Kirlilik Takip Çalışmaları

Mytilus galloprovincialis bir çok denize ve bizim denizlerimize de özgü bir tür midyedir. Yaygın bir tür oluşu, bulunduğu ortamı temsil edebilen sabit bir canlı oluşu ve özellikle de çeşitli kirliliğe çok dayanıklı olması açısından bir çok kirlilik takibi çalışmasının anahtar organizması niteliğindedir. Dünyada ve bizim denizlerimizde de midye ve *Mytilus galloprovincialis* "Midye gözlem" çalışmaları adıyla uzun senelerdir rutin kimyasal kirlilik tayin çalışmalarında kullanılmaktadır.

Midyeler kullanılarak çeşitli kirlilik parametrelerinin ölçüldüğü bir çok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalardan özellikle denizlerimizden toplanmış örneklerle ilgili olanlar aşağıda verilmiştir: Marmara Denizi'nin değişik bölgelerinden toplanan midyelerde yapılan civa analizleri sonuçlarının derlenmesi (Carden, v.d., 1976), çeşitli radyonüklidlerin ve ağır metallerin denizlerimizdeki midye etinde tayinine yönelik çalışmalar vardır (Güngör, v.d., 2001; Öztürk, 1994).

Midyede yapılan kirlilik çalışmalarında genotoksisite tayini için enzimatik biyomarkör takibi ve DNA-adduct oluşturma potansiyeli takibi yapılmıştır (Ma, v.d., 2000; Minton, v.d., 1994; Martel, v.d., 2000; Khessiba, v.d., 2001; Kaaya, v.d., 1999; Akcha, v.d., 1999; Akcha, v.d., 2000; Piccardo, v.d., 2001; Okay, v.d., 2001; Regoli, 2000; Anderson, v.d., 1999; Inoue, v.d., 1997; Domouhtsidou, v.d., 2000; Pollet, v.d., 1999; Canesi, v.d., 1999; Canesi, v.d., 2002; Baumard, v.d., 1999; Jeng, v.d., 2000; Karayücel, v.d., 1998; Micic, v.d., 2001; Goldberg, v.d., 2000; Daguin, v.d., 1999; Beynon, v.d., 1996; Chase, v.d., 2001; Güngör, v.d., 2001; Canova, 1998; Bilecik, 1989; Hosanoğlu, 1975; Peters, 2002; Uysal, v.d., 2002; Lafontaine, v.d., 2000; Pollet, v.d., 1999; Salazar, 1997). RAPD metodunun uygulandığı tek bir kirlilik çalışması mevcuttur (Ma, v.d., 2000), bu çalışma da, kirliliğin türün genetik çeşitliliğindeki azalmaya sebebiyeti ile ilgili bir çalışmadır.

4.7.1. “Midye gözlem” çalışmaları

“Midye gözlem” adıyla anılan, deniz yumuşakçalarından midyelerin çeşitli açılardan takibini hedefleyen ve bu sayede denizdeki ve ekosistemdeki kalite, genel ve özel kirlilik durumunu takibe alan bir grup çalışma bütün dünyada hem bilim camiasından artan ilgi, hem de halk tarafından teşvik ile yürütülmektedir. “Midye gözlem” programları özellikle bazı grup kirliliği değerlendirmede kullanılmış ve kullanılmaktadır: Yapay radyonüklidler, petrol hidrokarbonları (PAH'lar), klorlu hidrokarbonlar (PCB'ler), pestisitler ve ağır metaller, eser elementlerden özellikle: As, Ni, Cd, Hg, Cu, Se, Pb ve Zn (Jeng, v.d., 2000; Goldberg, v.d., 2000; Chase, v.d., 2001; Lafontaine, v.d., 2000; Salazar, v.d., 1997; Briand, 2002; Moore, v.d., 1999; Jernelov, 2003; Harvey, v.d., 1998).

4.7.1.1. Dünyada “Midye-gözlem” çalışmaları

Dünya’da artan çevre bilinci ve çevresel kirliliklerin olumsuz tesirleri yüzünden hemen hemen bütün su ile teması olan ülkelerde “Midye gözlem” programları mevcuttur. Bu programlarda ülkeler ortak çalışmalar içine girdikleri gibi büyük üniversitelerin, yine devlet bazında ya da belediyeler bazında oluşturulan yerel takip programları da mevcuttur. “Midye gözlem” çalışması yapan başlıca merkezler ve internet adresleri Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4. “Midye gözlem” çalışmaları ve çalışmayı yapan başlıca merkezler, internet adresleri

“Midye gözlem” program adı	Ülke/şehir/üniversite/enstitü/diğ.	İnternet Adresi
(NOAA)’nın “Midye-gözlem” programı	A.B.D hükümeti	http://www.gsf.de/UNEP/mussel.html
Malezya “Midye gözlem”	Malezya ve Japon Hükümetleri ortak ve Malezya Putra Üniversitesi.	http://www.fsas.upm.edu.my/~aismail/musselwatch.html
Kaliforniya Eyalet “Midye gözlem”	Kaliforniya çevre koruma ajansı	http://www.swrcb.ca.gov/programs/smw/
Gulfwatch	Uluslararası-Maine Körfezi Takibi	http://www.gulfmaine.org/gulfwatch/
Asia/Pasific “Midye gözlem”	Çin Halk Cumhuriyeti Ulusal Bilim Heyeti	
Sidney Limanı “Midye gözlem” programı	Avustralya Hükümeti	
Akdeniz “Midye gözlem”	Akdeniz Ülkeleri ortaklığı	www.ciesm.org
Karadeniz’de, Uluslar arası “Midye-gözlem”	Karadeniz Ülkeleri	UNESCO/IOC
Uluslar arası “Midye gözlem” IMW	IOC, UNEP, NOAA	http://vertigo.hsrl.rutgers.edu/NST.html

“Midye gözlem” konulu çok sayıda yayına ulaşmak mümkündür. Ancak bu çalışmalar enteresan ve kaydedeğer sonuçlar taşıyorlarsa da tam olarak rutine geçirilememişler ve özellikle de genotoksik tesiri rutine taşıyacak nitelikte değildirler (Briand, 2002; Moore, v.d., 1999; Jernelov, 2003).

4.7.1.2. Türkiye’de “Midye-gözlem” çalışmaları

Sadece Türkiye’nin kendi başına gerçekleştirdiği bir “Midye-gözlem” programı yoktur. Ancak Türkiye, içinde Romanya, Bulgaristan ve Ukrayna’nın da olduğu ülkeler ile ortak bir çaba içinde (Global Ocean Observing System, the “Mussel watch” programme) “Midye gözlem” çalışmaları yapmaktadır.

Bir pilot çalışma olarak UNESCO/IOC işbirliği ile başlatılan “Karadeniz midye gözlem pilot çalışması” ilk etapta, biyolojik durumun ve çeşitli eser kirlilik değerlendirilmesini yapmak için düşünülmüştür. Midyelerin biyoizleme için kullanılarak çevrenin genel durumunun değerlendirilmesi, basit, hasar vermeyen kan hücreleri kullanılarak uygulanan bir yöntem olan lizozomal bütünlük/nötral kırmızı retension, tutulum testi ile çeşitli kirlilik etkileri değerlendirilmektedir. Testin temeli kirliliğe fazlaca maruz kalan canlılarda nötral kırmızı boyasının lizozomlarda kalış süresinin temiz canlılara göre çok azaldığıdır. Bu durum tespit edilerek toksik madde maruziyeti biyolojik olarak ölçülmektedir. Bu testin sonuçları, çeşitli kimyasalların konsantrasyon verileri, Biyolojik Oksiyen İhtiyacı (BOD) ve Toplam Askıda Madde (TSS) değerleri ile de doğrudan korelasyon göstermektedir.

Rutin bir analiz yöntemi olarak uygulanmasa da çeşitli radyoaktif izotopların biyokinetiklerinin incelendiği çalışmalar Çekmece Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezinde *Mytilus galloprovincialis* kullanılarak sürdürülmektedir *(Güngör, v.d., 2001).

CIESM destekli, Akdeniz ve Karadeniz Midye İzleme projesi kapsamında Çekmece Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi'nin (ÇNAEM) yer almaktadır. ÇNAEM'in Karadeniz, Marmara ve Ege Denizlerinde (İzmir'e kadar) 17 adet midye izleme istasyonları bulunmaktadır. Bu istasyonlardan radyoaktivite ve ağır metal kirliliği ile ilgili veri toplanmaktadır. ÇNAEM, midyenin yaşamadığı İzmir-Hatay arasında 6 istasyona da midye transplantasyonu yapmıştır*.

* <http://www.taek.gov.tr/>

4.7.2. *Mytilus galloprovincialis*'in genotoksik tesiri takip için bir model olarak değerlendirilmesi

Midyeler buldukları ortamı temsil eden canlılardır. Süzerek beslenirler, dış döllenme ile ürerler, kirli bölgelerde dağılım gösterebilirler. Çeşitli organik ve inorganik kirlilik için dirençli tür oldukları bir çok çalışma ile gösterilmiştir. *Mytilus galloprovincialis* (Lmk.) şu ana kadar yayılım gösterdiği denizlerde tek tür olarak belirtilmiştir. Çok değişken sıcaklıklarda, tuzlulukta, pH'da yaşamlarını sürdürebilirler. Yine çok değişik kirliliklere ağır metal, mikrobiyal, pestisit, PAH, radyonüklid dirençlidirler, bu tip kirlilikleri vücutlarında çeşitli organlarında deniz suyunun bazen binlerce misli olacak konsantrasyonlarda barındırdıkları gözlenmiştir. Başka canlılar için barınma mekanı oluştururlar. Kendilerini sabitleyecekleri yerleri rastgele seçmezler ancak tam olarak neye göre seçtikleri net değildir. Besin piramitinde çok önemli yerleri vardır, hem diğer deniz canlıları için hem de insanlar için değerli bir gıdadır. Çeşitli kirliliği bünyesinde barındırması ve bu kirliliği besin zincirinin diğer halkalarına geçişi ile ilgili bir çalışma bilgimiz dahilinde değildir. Hem insan, hem diğer canlıların gıdası olması açısından, denizlerin akciğer ve karaciğerleri vazifesi görmesi sebebiyle çok önemli rolleri olan bu canlıların hem genetik açıdan değerlendirildiği, hem de genotoksik tesir açısından model olarak değerlendirildiği çalışma sayısı yok denecek kadar azdır (Harvey, v.d., 1998).

V.MATERYAL ve METOD

5.1.Materyal

5.1.1. *Mytilus galloprovincialis* örnekleri

Tablo 5. *Mytilus galloprovincialis* örneklemelerinin yapıldığı lokasyonlar, midyelerin büyüklükleri ve örnekleme dönemleri

Örnek No/büyüküğü	Örnekleme Yapılan Yer ve Varsa Tutunma Yüzey Özellikleri	Örnekleme Tarihi veya Mevsimi
M1/ 4.47 cm	Florya –Volga Neft Sahası Dipten	Kasım 2001
M2/ 5.07 cm	Florya –Volga Neft Sahası Dipten	Kasım 2001
M3/ 6.38 cm	Florya –Volga Neft Sahası Dipten	Kasım 2001
M10/ 5.7 cm	Beykoz Belediye Tesisleri yanı	Şubat 2002
M11/ 3.5 cm	Beykoz Belediye Tesisleri yanı	Şubat 2002
M12/ 4.0 cm	Galata Köprü Demir Ayakları	Şubat 2002
M13/ 3.0 cm	Galata Köprü Demir Ayakları	Şubat 2002
M14/ 5.5 cm	Florya Sahil	Şubat 2002
M15/ 3.5 cm	Florya Sahil	Şubat 2002
M16/ 2.5 cm	Florya Sahil	Şubat 2002
M17/ 3.3 cm	Florya Sahil	Şubat 2002
M18/ 4.6 cm	Florya Sahil	Şubat 2002
M19/ 3.5 cm	Anadolu Kavağı Giriş/kaya	Şubat 2002
M20/ 5.3 cm	Anadolu Kavağı Giriş/kaya	Şubat 2002
M21/ 3.8 cm	Anadolu Kavağı Giriş/beton	Şubat 2002
M22/ 5.6 cm	Fenerbahçe	Şubat .2002
M23/ 3.0 cm	Fenerbahçe	Şubat .2002
M24/ 3.2 cm	Fenerbahçe	Şubat 2002
M25/ 2.1 cm	Fenerbahçe	Şubat 2002

Tablo 5'in devamı

M26/ 4.7 cm	Sarıyer-Merbalık önü beton	Mayıs 2002
M27/ 2.2 cm	Sarıyer-Merbalık önü beton	Mayıs 2002
M28/ 5.1 cm	A. kavağı giriş	Mayıs 2002
M29/ 2.5 cm	A. Kavağı giriş	Mayıs 2002
M30/ 5.6 cm	Beykoz	Mayıs 2002
M31/ 1.3 cm	Beykoz	Mayıs 2002
M32/ 6.5 cm	Florya belediyeden sonraki koy	Mayıs 2002
M33/ 2.2 cm	Florya belediyeden sonraki koy	Mayıs 2002
M34/ 3.1 cm	Florya belediye tesisine en yakın koydan,-deniz çok pis ve yosunlu	Mayıs 2002
M35/ 1.9 cm	Florya belediye tesisine en yakın koydan	Mayıs 2002
M36/ 5.2 cm	Florya belediye tesisine en uzak koydan	Mayıs 2002
M37/ 2.8 cm	Florya 3 belediyeye en uzak koydan	Mayıs 2002
M38/?büyük	İzmir-M44, 45, 46, 47, 48 nolu örneklere ayrıldı	Haziran 2002
M39/ ?orta	İzmir	Haziran 2002
M40/? büyük	İzmir	Haziran 2002
M41/5.3cm	Burgaz Adası-ASSK önü, demir duba, kabuk yosunlu ve fosilli	Ağustos 2002
M42/1.3cm	Burgaz Adası-ASSK önü, demir duba, kabuk koyu renk	Ağustos 2002
M43/0.9cm	Burgaz Adası-ASSK önü, demir duba, kabuk açık renk iki midye M41'e yapışık	Ağustos 2002
M44	M38 nolu örnek-Sil	Haziran 2002
M45	M38 nolu örnek-Manto	Haziran 2002
M46	M38 nolu örnek-Solungaç	Haziran 2002
M47	M38 nolu örnek-Ayak	Haziran 2002
M48	M38 nolu örnek-Mide	Haziran 2002
M49/6.2cm	Unkapanı köprüsü, kıyıdan, belediyenin yeri,	Eylül 2002
M50/5.2cm	Unkapanı köprüsü, kıyıdan, belediyenin yeri,	Eylül 2002
M51/4.2cm	Unkapanı köprüsü, kıyıdan, belediyenin yeri,	Eylül 2002

Tablo 5'in devamı

M52/3.7cm	Unkapanı köprüsü, kıyıdan, belediyenin yeri,	Eylül 2002
M53/2.9cm	Unkapanı köprüsü, kıyıdan, belediyenin yeri,	Eylül 2002
M54/2.3cm	Unkapanı köprüsü, kıyıdan, belediyenin yeri,	Eylül 2002
M55/1.8cm	Unkapanı köprüsü, kıyıdan, belediyenin yeri,	Eylül 2002
M56/1.1cm	Unkapanı köprüsü, kıyıdan, belediyenin yeri,	Eylül 2002
M57/4.9cm	Unkapanı köprüsünden (orta şamandıra demir) grab ile kazıyarak	Eylül 2002
M58/4.0cm	Unkapanı köprüsünden (orta şamandıra demir) grab ile kazıyarak	Eylül 2002
M59/2.6cm	Unkapanı köprüsünden (orta şamandıra demir) grab ile kazıyarak	Eylül 2002
M60/1.6cm	Unkapanı köprüsünden (orta şamandıra demir) grab ile kazıyarak	Eylül 2002
M61/5.0cm	Şile	Nisan 2002
M62/4.2cm	Şile daha köşeli ve enli kabukları var	Nisan 2002
M63/3.7cm	Şile	Nisan 2002
M64/3.3cm	Şile daha köşeli ve enli kabukları var	Nisan 2002
M65/2.9cm	Şile	Nisan 2002
M66/0.8cm	Şile daha köşeli ve enli kabukları var	Nisan 2002
M67/5cm	(Çanakkale) Carrefour midye iç	Ocak 2003
M68/4.7cm	(Çanakkale) Carrefour midye iç	Ocak 2003
M69/3 cm	(Çanakkale) Carrefour midye iç	Ocak 2003
M70/2.5cm	(Çanakkale) Carrefour midye iç	Ocak 2003
M71/3 cm	(Çanakkale) Carrefour midye iç	Ocak 2003
M72/3.0 cm	(Çanakkale) Carrefour midye iç	Ocak 2003
M73/6.85cm	Saros körfezi, Erikli'den dalgıçlarca çıkartıldı	Eylül 2003
M74/1.28cm	Saros körfezi, Erikli'den dalgıçlarca çıkartıldı	Eylül 2003
M75/1.26cm	Saros körfezi, Erikli'den dalgıçlarca çıkartıldı	Eylül 2003
M76/1.10cm	Saros körfezi, Erikli'den dalgıçlarca çıkartıldı	Eylül 2003
M77/1.41cm	Saros körfezi, Erikli'den dalgıçlarca çıkartıldı	Eylül 2003

Tablo 5'in devamı

M78/0.86cm	Saros körfezi, Erikli'den dalgıçlarca çıkartıldı	Eylül 2003
M79/0.57cm	Saros körfezi, Erikli'den dalgıçlarca çıkartıldı	Eylül 2003
M80/0.57cm	Saros körfezi, Erikli'den dalgıçlarca çıkartıldı	Eylül 2003
M81/0.92cm	Saros körfezi, Erikli'den dalgıçlarca çıkartıldı	Eylül 2003
M82/5.0cm	Saros körfezi, Erikli'den dalgıçlarca çıkartıldı	Eylül 2003
M83/0.9cm	Saros körfezi, Erikli'den dalgıçlarca çıkartıldı	Eylül 2003
M84/1.04cm	Saros körfezi, Erikli'den dalgıçlarca çıkartıldı	Eylül 2003
M85/1.63cm+0.56 cm+1.11cm+1.03cm +0.91cm	Saros körfezi, Erikli'den dalgıçlarca çıkartılan birkaç örnek birarada	Eylül 2003
M86/6.13cm	Saros körfezi, Erikli'den dalgıçlarca çıkartıldı	Eylül 2003

5.1.2. Cihazlar

- Sıvı azot tankı (-196°C), Statebourne cryogenics
- PCR cihazı, Techne-Progene
- Dijital kamera, elektroforez fitreleri, Sanyo VPC-AZ1
- Santrifujlar, Techne-Genofuge,
- Elektroforez cihazları, E-C Apparatus Cooperation-EC175, EC350, EC370M
- Güç kaynağı, E-C Apparatus Cooperation-EC570
- Jel dokümantasyon sistemi, BIORAD-Geldoc 2000
- UV-İllüminatör, Vilber Laurmat
- Soğutucular -20°C, +4°C, Arçelik, Uğur derin dondurucu
- Mikropipetler, Jencons-Sealpette, Thermal Lab systems-Finpipette, Isolab-Biohit
- Vortex-Electro mag-M16
- Çalkalamalı su banyosu, Techne-Tempotte TE8D, Nuve-ST402
- İnkübatör, Nuve, Heraeus
- Otoklav, ERNA
- Distile ve deiyonize su cihazları, SCHOTT

- Hassas teraziler, LIBROR-AEG-120, LIBROR-EB-2200H
- Manyetik karıştırıcı ve ısıtıcılar, Electro mag, Thermal lab aletleri
- Isıtıcı, Techne-dri-block DB-2A
- Diseksiyon Mikroskobu, Olympus-SZ-PT
- Spektrofotometre, UV-1208
- Dijital fotoğraf makinası, SANYO model VPC-AZ1EX, Japonya
- Elektroforez filtreleri



5.1.3. DNA izolasyon kimyasalları

DNA izolasyonu için MN Nucleospin Tissue Kit kullanılmıştır. Kimyasallar ve metod kitapçığında tarif edildiği gibi hazırlanmış ve uygulanmıştır.

5.1.4. RAPD-PCR kimyasalları

RAPD-PCR kimyasalları Fermentas'tan, primerler ise Operon teknolojilerinden alınmıştır. Kullanılan kimyasallar: 10xPCR tamponu (NH₄)₂SO₄ içermektedir, dNTP, (2 mM deoksiribonükleotidler, dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Primer, Taq DNA polimeraz enzimi, MgCl₂ mM, DNA, Steril deiyonize su.

5.1.4.1. Oligonükleotid primerler

Tablo 6. Kullanılan primerlerin ticari isim ve dizileri

Primer Adı	Dizisi	Primer Adı	Dizisi
Tube A-01	5'-CAGGCCCTTC-3'	Tube B-01	5'-GTTTCGCTCC-3'
Tube A-02	5'-TGCCGAGCTG-3'	Tube B-02	5'-TGATCCCTGG-3'
Tube A-03	5'-AGTCAGCCAC-3'	Tube B-03	5'-CATCCCCCTG-3'
Tube A-04	5'-AATCGGGCTG-3'	Tube B-04	5'-GGACTGGAGT-3'
Tube A-05	5'-AGGGGTCTTG-3'	Tube B-05	5'-TGCGCCCTTC-3'
Tube A-06	5'-GGTCCCTGAC-3'	Tube B-06	5'-TGCTCTGCCC-3'
Tube A-07	5'-GAAACGGGTG-3'	Tube B-07	5'-GGTGACGCAG-3'
Tube A-08	5'-GTGACGTAGG-3'	Tube B-08	5'-GTCCACACGG-3'
Tube A-09	5'-GGGTAACGCC-3'	Tube B-09	5'-TGGGGGACTC-3'
Tube A-10	5'-GTGATCGCAG-3'	Tube B-10	5'-CTGCTGGGAC-3'

Tablo 6'nın devamı

Tube A-11	5'-CAATCGCCGT-3'	Tube B-11	5'-GTAGACCCGT-3'
Tube A-12	5'-TCGGCGATAG-3'	Tube B-12	5'-CCTTGACGCA-3'
Tube A-13	5'-CAGCACCCAC-3'	Tube B-13	5'-TTCCCCGCT-3'
Tube A-14	5'-TCTGTGCTGG-3'	Tube B-14	5'-TCCGCTCTGG-3'
Tube A-15	5'-TTCCGAACCC-3'	Tube B-15	5'-GGAGGGTGTT-3'
Tube A-16	5'-AGCCAGCGAA-3'	Tube B-16	5'-TTTGCCCGGA-3'
Tube A-17	5'-GACCGCTTGT-3'	Tube B-17	5'-AGGGAACGAG-3'
Tube A-18	5'-AGGTGACCGT-3'	Tube B-18	5'-CCACAGCAGT-3'
Tube A-19	5'-CAAACGTCGG-3'	Tube B-19	5'-ACCCCCGAAG-3'
Tube A-20	5'-GTTGCGATCC-3'	Tube B-20	5'-GGACCCTTAC-3'

5.1.5. Jel elektroforez kimyasalları

5.1.5.1. Denature edici poliakrilamit jel

- 10XTBE : 890 mM Borik Asit, 20 mM Na₂EDTA,
890 mM Trisma Base (pH 8.3),
Instajel Solüsyonu : 8% Acrylamide/Bisacrylamide (19:1),
8 M Üre, 1X TBE Tampon Çözeltisi,
Stop Solüsyonu (2X) : 95 % Formamid, 20 mM EDTA,
0.05 % Bromofenol Mavisi, 0.05 % Xylen Cyanol

5.1.5.2. Agaroz jel

Agaroz, Tris Borik Asit EDTA TBE tamponu (10x), Distile su, EtBr, Bromofenol mavisi BPB: yükleme tamponu, boy markörü: generuler 100 bp DNA merdiveni (ladder).

0.5XTBE Tampon çözeltisi	:	2 mM Na ₂ EDTA, 89 mM Borik asit, 89 mM Trisma Base (pH 8.3)
10 x Yükleme Tampon Çözeltisi :		2.5mg/ml Bromofenol mavisi, %1'likSDS, 2 ml gliserolde çözülür.
Ethidium bromid	:	10 mg/ml
% 1'lik Agaroz	:	1% Agarose (SeaKem, USA), 0.5 x TBE Tampon çözeltisi ile karıştırılarak hazırlanır.

5.1.6. DNA Görüntüleme kimyasalları

a. EtBr Boyaması

Ethidium bromid : 10 mg/ml

b. Gümüş Boyaması

Tampon çözeltisi A : 10% Etanol, 0.5% Glacial Acetic Asit

Tampon çözeltisi B : 0.1% AgNO₂

Tampon çözeltisi C : 15g NaOH, 0.1g NaBH₄, 4 ml Formaldehyde
(37%), 1 lt'ye dH₂O ile tamamlanır

Tampon çözeltisi D : 7.2g Na₂CO₃ 1 lt. dH₂O'de çözülerek

Tampon çözeltisi E : 5 % Gliserol

5.2. Metod

5.2.1. Midye örneklerinin toplanması

Çalışmada kullanılan örnekler Tablo 5'te belirtilen zamanlarda, şekillerde ve yerlerden, çoğu zaman kendi imkanlarımızla, kıyıdan ve kısmen de dalgıçlardan yardım alınarak dipten toplanmıştır.

Midyelerin boyları kabuklu halleriyle kumpas ile ölçülmüş, bu değerler Tablo 5'te belirtilmiştir. İç midyelerde belirtilen boy çok anlamlı değildir ancak fikir verici olması maksadıyla donmuş şekilde iken cetvel yardımıyla ölçülmüştür.

Örnekler, Haliç, Unkapanı Köprüsü'nün ayağından ve aynı köprünün bulunduğu kıyıda, kaya zemine tutunmuş olanlardan, Florya-Volga Neft Sahası dipten, Beykoz Belediye Tesisleri yanı, Galata Köprü demir ayakları, Florya Sahili'nden, Anadolu Kavağı girişinden, Fenerbahçe, Sarıyer, Şile, İzmir, Burgaz Adası-ASSK önü ve temiz bölgeyi temsilen de Saros körfezi, Erikli'den, 2001 Kış-2003 Sonbahar dönemlerinde toplanmıştır. Gıda olarak kültürü yapılan Çanakkale midyesi dondurulmuş olarak (-20°C) marketten (Carrefour) temin edilmiştir.

5.2.2. DNA İzolasyonu

Midyenin toplam DNA'sı yanı sıra, bir örnek (M38) için ayrı ayrı doku DNA'sı çıkartılmıştır (M44-M48). Bir örnek (M85) için ise birkaç boy midyenin dokuları aynı anda bir karışım olarak homojenize edilmiş ve DNA bu homojenattan aşağıda belirtildiği şekilde çıkartılmıştır.

DNA izolasyonunun ilk aşaması olarak bütün örnekler homojenize edilmiştir. DNA izolasyonu için MN Nucleospin dokudan DNA izolasyon kitinin doku örneklerinden DNA çıkartma protokolü takip edilmiştir. Homojenizasyon için örneklerin üstüne, örneği kapatacak şekilde T1 solüsyonu eklenmiştir ve örnekler önce sıvı nitrojen tankında dondurulmuş, sonra 56°C'de su banyosunda çözülmüş, bu işlem 2-3 defa tekrarlanarak hücrelerin parçalanması sağlanmıştır. Bir diğer örnek homojenizasyonu metodu olarak Ultraturrax marka homojenizatör ile yüksek devirde homojenizasyon yapılmıştır. Devamında örneklerin üstüne 25µl proteinaz K solüsyonu eklenmiş ve örnekler 1-3 saat arası 56°C'de çalkalamalı su banyosunda inkübasyona bırakılmışlardır. Inkübasyon sırasında ve sonrasında vortekslenen örneklere B3 nolu solüsyon eklenmiş, 70°C'de bekletilen örnekler santrifüj edilerek istenmeyen hücre kalıntıları çöktürülmüştür. DNA'yı tam olarak saflaştırmak için örnekler Nucleospin kolonlarına geçirilmiştir. Bir seri DNA temizleme solüsyonu ile santrifüj edilip, en son kolona bağlı temiz DNA, 70°C'de ön ısıtılmış BE solüsyonu ile kolondan çözülüp, 1.5ml'lik steril bir plastik tüpte toplanarak -20°C'de saklanmıştır (Minton, v.d., 1994).

5.2.3. RAPD-PCR

RAPD-rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA'dır. RAPD reaksiyonları PCR reaksiyonlarıdır ancak bilinmeyen bölgelerin çoğaltılmasını sağlarlar ve bu sebeple rastgele bir çoğaltmadan bahsedilmektedir. PCR reaksiyonunda daha önceden dizisi belirli bir DNA bölgesine gidip, DNA'nın her iki zincirine de 5'→3' yönünde bağlanacak özel primer diziler tasarlanır ve üretilir ve bu sayede sadece primerlerce belirlenmiş olan özel bir bölgenin çoğaltılması sağlanır.

Yöntemi uygulamak için rastgele dizilerden oluşan çoğu zaman 10baz çiftlik oligonükleotidlere ulaşmak ön şarttır. Bu malzeme çalışmamızda Qiagen firmasından temin edilmiştir. Her bir tüp primer yaklaşık 1000 amplifikasyon için malzeme içermektedir. Gelen materyal liyofilize haldedir ve steril su ya da pH'ı 7 olan TE (Tris EDTA) tamponu içinde çözülerek uzun süreli dayanıklılığını ve saflığını muhafaza edebilmesi için birkaç kullanımlık tüplere ayrılarak -20°C'de muhafaza edilir. Bu transfer işlemleri sırasında her türlü kullanılan malzemenin temiz ve steril olmasına (önceden otoklavlanmış) dikkat edilmelidir. DNA amplifikasyonu için tavsiye edilen reaksiyon karışımı: 10 mM Tris-Cl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, % 0.001 jelatin, 100 µM herbir dATP, dCTP, dGTP, ve dTTP, 5 picomole tek bir 10-bazlık primer, 25 ng genomik DNA ve 0.5 ünite Taq DNA polimeraz enzimi kullanılarak steril su ile 25 µl'ye tamamlanacak kompozisyonda olmalıdır. Amplifikasyon ise, iyi kalite bir termal cyeler, PCR cihazı kullanılarak 45 döngü olacak şekilde, önce 94°C'de 1 dakika, sonra 36°C'de 1 dakika ve en son 72°C'de 2 dakika olarak programlanmalıdır. Bu aşamalar DNA'nın önce denatüre olması, sonra primerlerin eşleşebildikleri bölgelere bağlanmaları, en son da Taq polimeraz enziminin bu primer bağlanan bölgeleri sentezleyebilmesi için gereklidir. Amplifikasyon sonucu oluşan ürünler çoğu zaman %1-2'lik agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılarak ve florasan EtBr ile boyanarak (DNA'nın bazıları arasına nüfuz ederek etki gösterir) bant profilleri şeklinde UV ışığı altında gözlemlenebilir. Elde edilen amplifikasyon ürün sayısı her reaksiyon için primere, kullanılan genomun dizisine, genom büyüklüğüne bağlı olarak değişiklik gösterir. Kullanılan primerlerin genom üzerinde rastgele eşleştiği varsayılırsa, olasılık teorisine göre amplifikasyon ürün sayısı $2.5 \times 10^{-9} \times G$ kadar olacaktır. Bu formülde G, baz çifti olarak haploid genomu temsil etmektedir.

PCR reaksiyonunun gerçekleşmesi için primerlerin karşılıklı bağlanması (Şekil 9'da doğru bağlanma gösterilmiştir) şarttır. İkinci bir şart ise primerlerin birbirlerine olan uzaklıklarının belli sınırlar içinde olmasıdır.

Şekil 9 ve 10'da RAPD reaksiyonu net olarak şematize edilmektedir. Şekil 10'da uzun kalın çizgi hedef DNA'yı, küçük oklar rastgele seçilmiş bir primer dizisinin bir çok kopyasını ifade etmektedir. Okların yönü DNA sentez yönünü de göstermektedir. 1, 2, 3 no'lu oklar DNA'nın 5'→3' yönünde bağlanan primerleri, 4, 5, 6 no'lu primerler DNA'ya 3'→5' yönünde bağlanmayı göstermektedirler. Gerçekleşen PCR reaksiyonu sonucunda böyle bir reaksiyon bu primer bağlanmalarından sadece A ve B ürünlerini oluşturur. İkinci şekilde görüldüğü gibi 2 numaralı primerin bağlanacağı bölgede bir değişiklik sebebiyle bağlanma gerçekleşmemektedir ve reaksiyon sonucu sadece B ürünü oluşmaktadır. 1 ve 4 numaralı primerlerin birbirlerine olan mesafeleri reaksiyonun gerçekleşmesi için çok uzun olmasa aslında bir reaksiyonun o bölge için de gerçekleşmesi beklenmektedir.

Yapılan optimizasyonlar sonucu 25µl PCR karışımı hazırlamak için primerden 30 pmol, 200µl her bir dNTP'den, 1 µl Taq DNA polimeraz enzimi, 1x PCR tamponu, 4µl MgCl₂ ve 10 pg DNA distile su ile 25 µl'ye tamamlandıktan sonra reaksiyona hazır hale getirilmiştir.

Program şartları;

1. Program	94 °C _____ 3 dakika	} 45 döngü
	94 °C _____ 30 saniye	
2. Program	36 °C _____ 30 saniye	
	72 °C _____ 45 saniye	
3. Program	72 °C _____ 5 dakika	

Primerler canlının genomuna bakılan pencerelerdir. Bu primerlerin sayısı ne kadar arttırılırsa genom hakkında o kadar net bir görüş elde edilir. Çalışmamızda bazı primerler homojen bir bant paterni vermiştir. Bazı primerler de her denemede sonuç vermemiştir. Bunun için herbir primer ile en az iki örnek, iki ayrı kez denenmiştir, aynı denemede sürekli

sonuç veren midye örneği DNA'sı (M3) ve primerler (OPB18 ve OPA8) de kontrol olarak kullanılmıştır.

5.2.3.1. Geliştirilmiş RAPD-PCR

Rastgele amplifiye mozaik DNA-PCR'ı, RAMD-PCR adını verdiğimiz RAPD'in, bu çalışma ile ortaya koyduğumuz yeni bir yaklaşımı diyebileceğimiz yöntem ile DNA'nın çeşitli etkiler sonucu oluşan mozaik yapısı değerlendirilebilmektedir. Mozaik yapı doğasında bir miktar olabilmektedir, büyük bir kısmı ise sonradan oluşmaktadır. Sonradan oluşanların bir kısmı fizyolojisinden kaynaklanmakta ve özellikle gelişim evrelerinde geri dönüşümlü gerçekleşirken diğer bir kısmı patolojik diyebileceğimiz çoğu zaman sabit değişimlerdir. Yöntemle mozaik yapının toplam değerlendirmesi yapılabilirken, oluşturulacak karşılaştırmalı deney ve kontrol grupları yardımıyla değişik tip mozaik yapının değerlendirilmesi de yapılabilir (Uzunur, v.d., 2004a, b, c).

RAMD-PCR yaklaşımı için oluşturulan terminoloji:

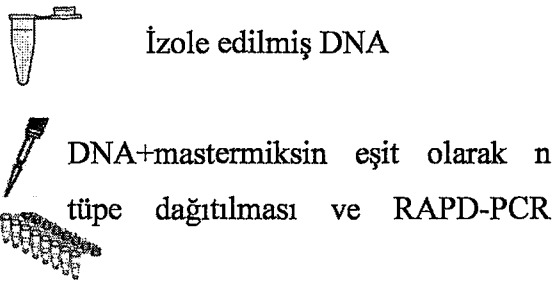
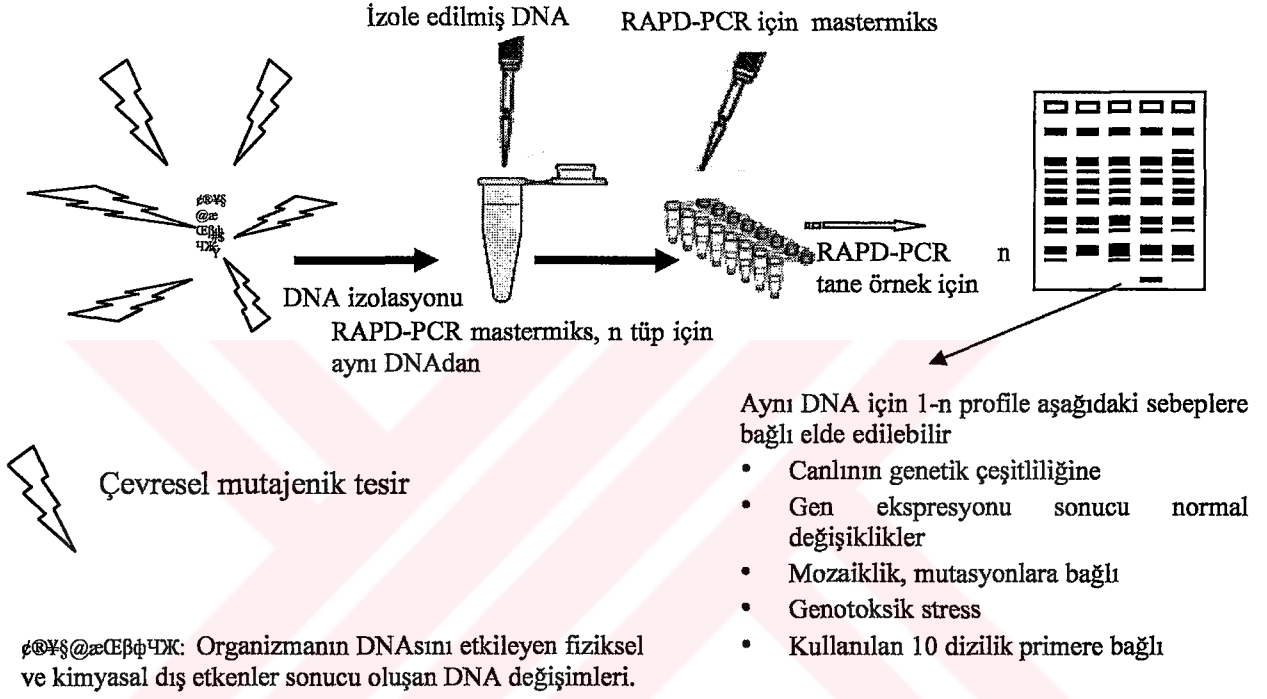
nXRAMD-PCR=PCR mastermiksini hazırlanma katsayısı.

5X: PCR mastermiksine her malzemeden 5 misli konulması, aynı örnek DNA'sından da 5 misli konulmasını ifade etmektedir.

RAMD-PCR yaklaşımının şekilde de gösterilen prosedürü aşağıdaki gibidir:

1. nX'lik bir mastermiks hazırla, bunun için
 - a. 2.5 µlxn PCR tamponu (10X)
 - b. 2.5 µlxn magnezyum klorür (25 mM) çözeltisi
 - c. 1 µlxn (10 mM) dNTP karışımı
 - d. 3 µlxn (25 µM) 10 dizilik primerlerden bir tanesi
 - e. 0.1 µlxn (500 U) *Taq* DNA polimeraz enzimi
 - f. 1 µlxn örnek DNA'sı (10 pg)
 - g. 25 µlxn'e tamamlanuncaya kadar deiyonize su ilave edilerek homojen bir karışım oluşturulur.
2. Daha sonra karışım n sayıda eşit PCR tüpüne bölüştürülür ve aynı şartlarda PCR uygulanır.
3. Sonuçlar aynı anda ortak bir jelde yürütülerek karşılaştırılır.

Tamamiyle aynı şartların sağlanmaya çalışıldığı bu tüplerde gerçekleşen çoğalma ve jel elektroforez ayırımı sonrasında beklenen aynı bant profillerinin elde edilmesidir. Çünkü aynı DNA kullanılmaktadır. Ancak çoğu zaman teoride beklenen bu durum pratikte gerçekleşmemektedir. Bunun sebebi ise homojen karakterinin yukarıda belirttiğimiz sebeplerden kaybeden DNA'nın mozaik bir yapı edinmesidir.



Şekil 19. RAMD-PCR yönteminin şematik gösterimi. Canlı DNA'sı bir mozaiktir, bu mozaik karakterin boyutunu gösterebilmek için n sayıda hazırlanan RAPD-PCR mastermiksine DNA da eklenerek, n tüpe bölünür, aynı şartlarda aynı DNA'nın nxPCR'ı yapılarak RAMD profilleri agaroz jel elektroforezi sonrası incelenir ve aynı canlının DNA'sı için, teoride tamamen aynı olması gereken DNA profillerindeki farklılaşma tespit edilebilir. Bu farklılaşmanın gerçek mahiyeti n arttıkça netlik kazanmaktadır (Uzonur, v.d., 2004a).

5.2.4. Jel elektroforezi

Elektroforez, moleküllerin elektrik yüklerindeki farklılara göre geliştirilmiş bir tekniktir. Bir elektriksel alanda çözünmüş durumdaki moleküllerin elektrik yüklerinin kütlelerine oranıyla belirlenen hızda hareket etmeleri prensibine dayanır. Elektroforezin bir homojenattaki farklı molekülleri ayırma kapasitesi genellikle sınırlıdır. Buna karşılık, az miktardaki protein ya da nükleik asitleri saflaştırmakta ve analizini yapmakta geniş çapta kullanılır.

Jel elektroforezi saflaştırılmış nükleik asit ve proteinleri molekül ağırlığı, miktarı ve alt tiplerinin saptanmasında geniş ölçüde kullanılmaktadır.

Nükleik asitler genellikle agarozdan hazırlanmış jellere uygulanır; boylarına göre ayrılan farklı DNA parçalarına ait bantları saptamakta çoğu zaman florasan bir boya kullanılır ve UV ışıkta gözlem yapılır (Topal, 1999).

5.2.4.1. Denature edici poliakrilamit jel elektroforezi

Sonuçların gözlenmesinde agaroz jel elektroforezine ek olarak yeni bir boyut kazandırabilecek denature edici poliakrilamit jel elektroforez metodu uygulanmıştır. Bu çalışma sonuçları hem agarozu destekleyici mahiyette hem de agarozun yetersiz kalabileceği noktalarda ışık tutucu olmuştur.

Denatüre edici poliakrilamit jeller akrilamit ve bisakrilamitin belirli oranlarda karıştırılması sonucu oluşturulur, DNA'yı denatüre edici özellik kazanması için yüksek konsantrasyonda üre veya formamid eklenir. Polimerizasyonun oluşabilmesi yani hazırlanan karışımın jel halini alabilmesi için bir dizi işlemin başlaması ve bir de katalizöre ihtiyaç vardır. İşlemleri başlatan ammonium persülfat (APS) ve katalizör de TEMED'dir. Bu iki malzeme sırayla ve hızlı bir şekilde eklendikten sonra sıvı fazdaki jel ortam sıcaklığıyla da doğru orantılı olarak hızla katı faza dönüşür. Jelleşme ilk 5 dakika içinde tamamlanmalıdır.

Poliakrilamit jellerin polimerizasyonu ortamdaki oksijenle ters orantılı olarak gerçekleştiği için bu tip jeller iki cam arasına jelin kalınlığını belirleyen bir çift ayırıcı konulduktan sonra hava kabarcıklarının oluşmaması sağlanarak dökülür. Çalışmamızda, DNA örneklerinin yüklenebilmesi için oluşturulacak kuyular köpekbalığı dişi (shark tooth) taraklar ile sağlanmıştır, bu sayede örnekler tam olarak yanyana yürütülmüş ve değişikliklerin gözlenmesi daha kolay olmuştur.

Çalışmamızda %6'lık instagel hazırlanmış, akrilamit, bisakrilamit oranı ise 19:1 ayarlanmıştır. Bu tip jellerde örnekler dikey olarak yürütülmektedir. Bu jeller DNA dizi analizi yapılacak jeller olup sadece bir baz farklılığı bile değerlendirmeyi sağlayacak hassasiyettedirler. DNA bu tip jellerde denatüre edilerek yani tek iplik olarak yürütülmekte, jelin içindeki yüksek konsantrasyondaki denatürant (üre) ve yürütülürken 45 watt'ta yüksek voltajda (1400 volt-1650 volt) yürütmekten ortaya çıkan ısının (45°C-50°C) da etkisiyle yürüme süresince (3-4 saat) örnekler renatüre olmamaktadırlar. Yürütme tamponu olarak jelin hazırlanmasında kullanılan konsantrasyon olan 1x'lik TBE tampon solüsyonu kullanılmaktadır. Çalışmamızda jelin kalınlığı 0.35 mm olup yürütme sonrasında iki camın arasındaki bu incelikteki jele, gümüş boyama yöntemi tatbik edilerek yürütülen DNA'lar görüntülenmiştir.

5.2.4.2. Agaroz jel elektroforezi

RAPD-PCR ürünlerini boylarına göre ayırmak için bu yöntem daha çok kullanılmıştır. %2'lik jelin hazırlanması için, 2 gr Agaroz 100 ml 0.5xTBE tampon çözeltisinde manyetik karıştırıcı ile hem karıştırılır, hem de ısıtılır. Solüsyon kaynama kıvamına geldiğinde agaroz homojen biçimde çözülür. Jel biraz soğuduğunda içine 5 µl/100 ml konsantrasyonunda EtBr florasan boyası karıştırılır. DNA bazları arasına girebilen ve bu sayede DNA'yı UV ışığı altında değerlendirebilmemizi sağlayan kanserojenik ve mutajenik bir boyadır. Bu boyanın solunması sağlığa zararlı olacağı için bütün bu işlemler çekerocağın altında yapılmıştır. Zararlı olabileceği düşünülen atıklar ayrı olarak toplanmış ve özellikle EtBr için uygun olan dekontaminasyon prosedürleri uygulanarak jeller çöpe bekletilerek atılmıştır. Isısı 65°C-70°C'ye düşürülen jel hazırlanan jel kalıbına dökülür. Kalıp, dikdörtgen şeklinde

hazırlanmıştır. Hemen hemen 0.7 cm kalınlığında dökülen jelin, üstünde bir tarak yardımıyla 22 tane kuyu açılması sağlanmıştır. Örnekler yürütülme sırasında bu kuyucuklara BPB yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklenir. Bu tampon örneklerin yüklenebilmesini, örneklerin yürümesinin takibini yapabilmemizi, hem de yerine göre bir çeşit standart boy markörü gibi kullanmamızı sağlamaktadır.

5.2.5. DNA Boyama ve görüntüleme

Çalışmada iki ayrı DNA boyama yönteminden faydalanılmıştır. Bunlar, özellikle denatüre edici jeller için kullanılabilen bir boyama yöntemi olan gümüş boyama yöntemi ve EtBr ile boyama yöntemleridir. Gümüş boyama yöntemi EtBr boyamasına göre 4-10 kat daha hassas sonuçlar vermektedir. Daha az miktarda DNA'yı çok daha net görmek mümkün olabilmektedir. Ancak agaroz jellerin boyanmasında kullanılamamaktadır.

Denatüre edici jellerin boyanması için gümüş boyama yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde iki cam arasından bir filtre kağıdına yapıştırılarak jeller çeşitli solüsyonlara tabi tutulur. İlk aşamada jeldeki DNA fikse edilerek (tampon çözeltisi A) ile 10 dakika, sonra tampon çözeltisi B'de jeller 10 dakika inkübe edilir. İnkübasyon sırasında jelin solüsyonun içine iyice batması ve karıştırılarak homojen bir boyama olması sağlanır. Kesinlikle jelle dokunulmamalı ve herhangi birşeyin temasından kaçınılmalıdır. Boyama çok hassas olduğu için çok çabuk bozulmaktadır. C tamponundan önce jel kısa bir süre için distile su ile yıkanmalıdır. C tamponu taze olarak B tamponu inkübasyonu sırasında hazırlanır. Hazırlanan tampon jelin üzerine yavaş yavaş ve jel sürekli çalkalanarak dökülür. Bantlar net olarak gözlenene kadar boyama aşaması devam ettirilir. Bantlar netleşince bu solüsyon dökülüp jel distile su ile durulanır ve boyamayı durdurmak üzere D tamponu jelin üstüne dökülür. 10 dakikalık inkübasyondan sonra D tamponu dökülür ve durulanıp ardından E tamponu jelle eklenir, 10 dakika inkübasyon yapılır. Bu tampon ile jellerin daha uzun süreli saklanması sağlanır. Jeller daha sonra şeffaf plastik poşetlerin arasına aktarılır ve bu poşetler kenarlarından ısı uygulayarak bir çeşit vakum yapılarak paketlenir. Tercihen bir süre üstlerine homojen bir ağırlık konularak jellerin daha uzun süre özelliklerini kaybetmeden korunması sağlanır.

Agaroz jel elektroforezi sonucu elde edilen PCR bantlarının boyanmasında ise 5µl/100µl miktarında eklenen EtBr boyası ile DNA boyanmaktadır. Görüntülemek için ise bir UV kaynağı kullanılmaktadır. Görüntü fotoğrafları Sanyo VPC-AZ1 marka dijital kamera ve sarı ile turuncu elektroforez filtreleri kullanılarak çekilmiştir. Fotoğrafların değerlendirilmesi için Ulead Photo Explorer 7.0 SE programından faydalanılmıştır. Farklı filtrelerle elde edilen görüntüler, farklı detayların gözlemlenmesine olanak sağladığı için jeller her iki filtre de kullanılarak görüntülenmiştir.

5.2.6. Veri analizi

Veri analizi için Fatih Üniversitesi Biyoloji Bölümü Laboratuvarında bulunan GelDoc 2000 sistemi ve Quantity One yazılımı kullanılmıştır. Laboratuvarda dijital kamera (SANYO AZ1) ile çektiğimiz fotoğraflar JPG ya da TIFF formatında kaydedilerek ilgili cihazda ve yazılım yardımıyla analize tabi tutulmuştur. Dice benzerlik katsayıları genetik varyasyonu kontrol ve denekler bazında farklı doku DNA'ları için ortaya koyarken, UPGMA-Aritmetik averajla unweighed pair-group analiz metodu kullanılarak bu gruplar için benzerlik ağaçları (dendrogram) çizilmiştir (Bartfai, v.d., 2003; Ross, v.d., 2002).

VI. BULGULAR

Çalışmamızın bulguları 7 ana başlık halinde sunulmuştur. *Mytilus galloprovincialis* yüksek oranda genetik çeşitlilik gösteren bir türdür. Bu tür ile yapılan popülasyon genetiği çalışmaları (Silva ve Russo, 2000, Ma, v.d., 2000) ve bu çalışmada da edinilen bulgular bu durumu ilk başlık ile ortaya koymuştur. Sırasıyla *Mytilus galloprovincialis*'in genel genetik karakteristiklerinin değerlendirildiği bulgular, DNA'sında oluşan değişimi, farklılaşmayı değerlendiren bulgular ile midye boyuna bağlı tespit edilebilir değişimin bulguları ile değişimin, özellikle hedef organ toksisitesi denilen bir süreç olarak ortaya çıktığını ve dolayısıyla DNA'daki değişikliklerin kirlilik bağlantılı olduğunu ortaya koyan bulgular yer almaktadır.

6.1. *Mytilus galloprovincialis*'in genetik çeşitliliği (diversity) ve heterojenliği

Genetik çeşitlilik ya da DNA'da farklılaşma (polimorfizm) diyebileceğimiz durum, popülasyonların sürekli değişiklik gösteren çevrelerine adapte olabilmeleri için bir mekanizmadır. Daha çok değişiklik göstermek popülasyon açısından yeni çevreye uyum gösterebilecek alelik varyantlara sahip en azından birkaç bireyin bulunmasını sağlayacağı için, popülasyonun devamı açısından çok önemlidir (Beardmore, v.d., 1997; Silva ve Russo, 2000).

Genetik heterojenlik türlerin evrimsel adaptasyonları açısından çok olumlu bir özellik olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu durum polimorfik özelliklerden veya mutasyonlardan da kaynaklanıyor olabilir. Çok çeşitli kirliliğe rağmen yaşayarak neslini devam ettirebilen bir tür olan *Mytilus galloprovincialis* için genetik heterojenlik ve genetik çeşitlilik çok yüksektir. Bu durum ile ilgili bulgular Şekil 20 a ve b'de verilmiştir. Şekil 20 a'daki örnekler Saros körfezinden toplanan çeşitli boylardaki 9 midye örneğine ait RAPD profilleridir. Şekil 20 b'deki örnekler ise Marmara Denizi'nin çeşitli yerlerinden toplanmış 19 midyenin RAPD profilleridir. Her iki jeldeki 9+19=28 midye örneği için en az 17 farklı RAPD bant profili gözlemlenmektedir. Bu durum heterojen genetik yapıyı göstermektedir. Ayrıca çeşitli midye

örnekleri ile denenen, bütün primerler ile de yüksek düzeyde genetik çeşitlilik ve heterojenlik gözlemlenmiştir.

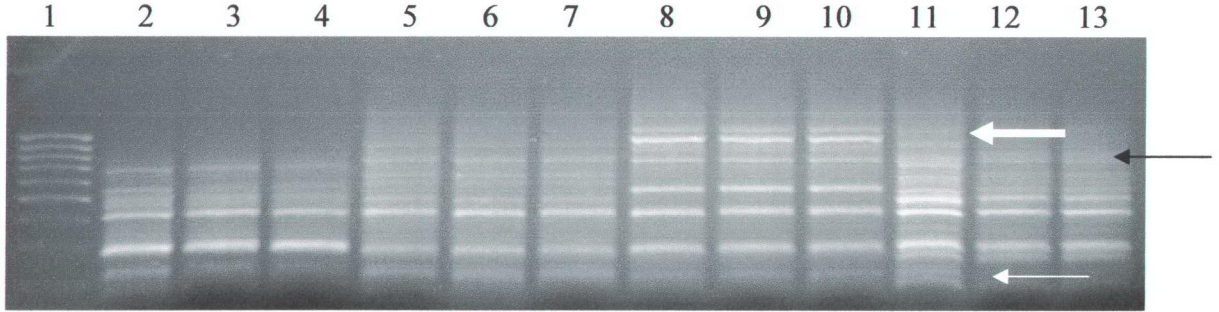


Şekil 20 a., b. Midye'nin, heterojen genetik yapısı. Aynı(a) ve farklı(b) istasyonlardan alınan midyelerin DNA'larına OPB18 primeri ile RAPD PCR uygulaması.

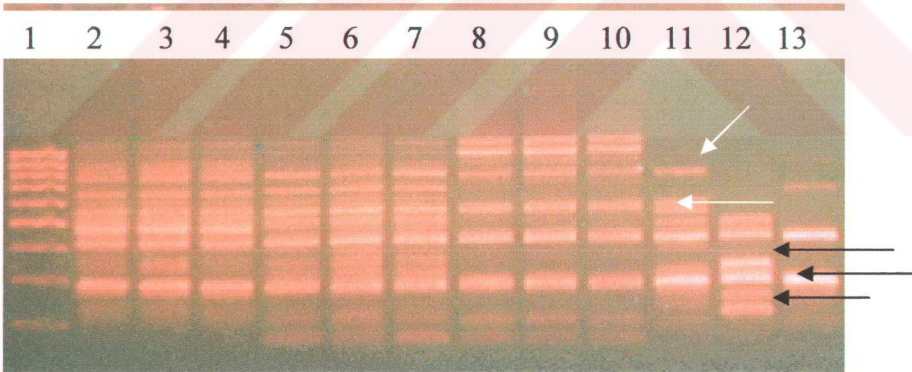
6.2. *Mytilus galloprovincialis*'in farklı kirlilik stresleri etkisinde birey içi DNA değişimlerinin RAMD-PCR ile tespiti

DNA'nın çeşitli tipteki kirliliğin tesiriyle değişim gösterdiği bilinmektedir. DNA canlıının normal fizyolojik fonksiyonları sırasında da birtakım değişiklikler gösterebilmektedir. Bu değişiklikler çoğu zaman geri dönüşlü (tersinir) olmaktadır. Özellikle hızlı gelişimin görüldüğü safhalarda bu tip DNA değişikliklerinden bahsedilmektedir. Bu fizyolojik değişimi tespit edebilmek için, hem de kirliliğin etkisini görebilmek için temiz ve kirli olduğu bilinen farklı bölgelerden topladığımız en küçük boy midye (0.5 cm-1.5 cm) DNA'sı ile 3xRAMD-PCR uygulaması yapılmıştır. Küçük midyelerle ilgili sonuçlar Şekil 21'de verilmiştir. Midye örnekleri farklı kirlilikteki istasyonlardan toplanmıştır. Üçerli gruplar halinde, Beykoz, Burgazada, Unkapanı midye örneklerinin 3xRAMD profilleridir. Kirliliğin en yoğun olduğu Unkapanı kıyı örneğindeki değişiklikler oklarla gösterilmiştir. Diğer küçük örneklerde (2-10. kulvarlar) DNA değişimi tespit edilememiştir. DNA değişimi varolan bantların yok olması, olmayan bantların belirmesi, bantların yoğunluklarında artma ve azalma şeklinde tespit edilmektedir. Şekil 22'de ise midye boyutuna bağlı olarak aynı kirlilik düzeyindeki istasyondan çıkartılan (Saros) farklı boy midyelerin DNA'ları ve farklı kirlilikte iki ayrı istasyondan (Saros ve Burgazada) çıkartılan küçük boy midye DNA'larının (sırasıyla 0.57 cm, 0.57 cm, 0.9 cm) 3xRAMD-PCR bulguları verilmiştir. Küçük boy midyelerin DNA'sında bir değişim gözlenmezken, yine aynı denizden (Saros) çıkartılan büyük boy bir midyenin

(6.85 cm) DNA'sındaki mozaikleşme 3xRAMD-PCR bulgularında yeni bantların oluşması, varolanların kaybolması ve bant yoğunluklarında değişimler olarak kendini göstermiştir. Değişiklikler oklarla da kısmen gösterilmiştir.



Şekil 21. Farklı kirlilikte istasyonlardan toplanan küçük boy midyelerin OPB18 primeri ile 3xRAMD-PCR profilleri. 1. kulvar DNA boy markörü, 2-4. kulvarlar M31 nolu 1.3 cm Beykoz midyesi, 5-7. kulvarlar M42 nolu 1.3 cm Burgazada midyesi, 8-10. kulvarlar M43 nolu 0.9 cm Burgazada midyesi, 11-13. kulvarlar M56 nolu 1.1cm Unkapanı kıyısından toplanan midye örnekleri için 3xRAMD-PCR profilleridir. Kirliliğin en yoğun olduğu Unkapanı kıyı örneğindeki değişiklikler oklarla gösterilmiştir. Diğer küçük örneklerde (2-10. kulvarlar) DNA değişimi tespit edilememiştir. DNA değişimi varolan bantların yokolması, olmayan bantların belirmesi, bantların yoğunluklarında artma ve azalma şeklinde tespit edilmektedir.

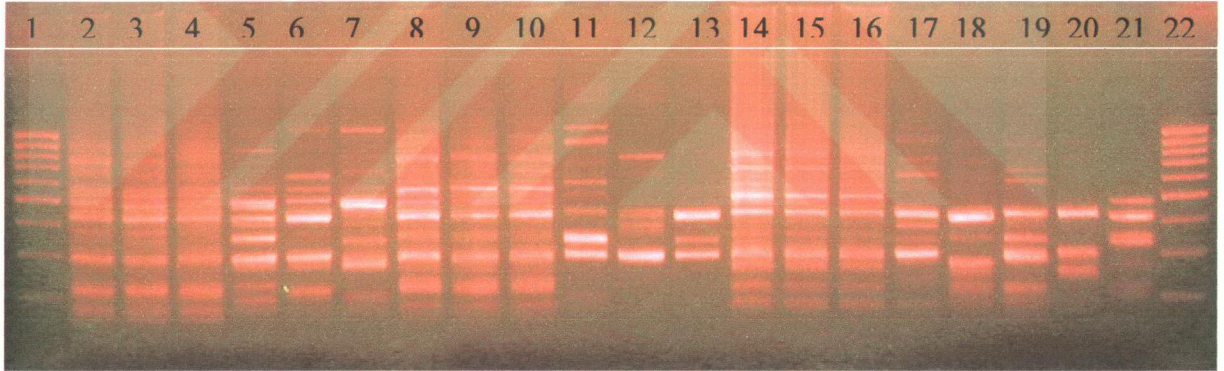


Şekil 22. Aynı ve farklı bir istasyondan küçük boy midyelerin ve büyük boy bir midyenin OPB18 primeri ile 3xRAMD-PCR profil karşılaştırılması. 1. kulvar DNA boy markörü, 2-4. kulvarlar M79 nolu 0.57 cm Saros midyesi, 5-7. kulvarlar M80 nolu 0.57 cm bir diğer Saros midyesi, 8-10. kulvarlar M43 nolu 0.9 cm Burgazada midyesi ve 11-13. kulvarlar 6.85 cm Saros midyesi için 3xRAMD-PCR profilleridir. Küçük boy midyelerin DNA'sında bir değişim gözlenmezken, yine aynı denizden çıkartılan büyük boy bir midyenin DNA'sındaki mozaikleşme 3xRAMD-PCR ile net bir şekilde ortaya konulmuştur. Değişiklikler oklarla gösterilmiştir.

6.3. *Mytilus galloprovincialis*'in boy'a bağlı DNA değişiminin RAMD-PCR tespiti

Midyede yaşı ve boy aynı paralellikte değildir, çünkü boyu etkileyen çok çeşitli parametreler vardır. Ancak DNA değişiminde de maruziyet birinci planda olmakla birlikte, midyenin yaşı yani genotoksik tesire ne kadar süreyle maruz kaldığı da çok önemlidir. Ancak doğal ortamda, yani takibi yapılmayan midyelerin gerçekten ne kadar süreyle bir kirliliğe maruz kaldıklarını bilmek ve yaşlarını da doğrudan boylarına bakarak tahmin etmek mümkün değildir. Kabaca da olsa boydaki artış ile paralel olarak DNA'daki değişimin de artmakta olduğu Şekil 22 ve 23'de 3xRAMD-PCR profillerinde tespit edilmiştir.

Şekil 22'de küçük boy midyelerde (0.57 cm, 0.57 cm, 0.9 cm) hiçbir değişim gözlenmezken, büyük boy (6.85 cm) Saros midyesinde oklarla gösterilen değişiklik gözlenmiştir. Şekil 23'de ise küçük boy midyelerde değişim göstermeyen 3xRAMD-PCR profilleri, büyük boy midyeler için büyük ölçüde değişime bağlı mozaik yapı göstermektedir (5-7. kulvarlar, 11-13. kulvarlar, 17-19. kulvarlar ve 20-21. kulvarlar).



Şekil 23. Aynı ve farklı istasyonlardan büyük ve küçük boy midyelerin OPB18 primeri ile 3xRAMD-PCR profil karşılaştırılması. 1. ve 22. kulvarlar DNA boy markörü, 2-4. kulvarlar M3 nolu 6.38 cm Florya tek doku DNA izolasyonu, 5-7. kulvarlar M32 nolu 6.5 cm Florya, 8-10. kulvarlar M40 nolu büyük İzmir, 11-13. kulvarlar M49 nolu 6.2 cm Unkapanı, 14-16. kulvarlar M56 nolu 1.1 cm Unkapanı, 17-19. kulvarlar M67 nolu 5.0 cm (iç midye) Carrefour, 20-21. kulvarlar M61 nolu 5 cm Şile midyesi için 3xRAMD-PCR profilleridir. Büyük boy midyelerdeki DNA değişiklikleri ve mozaik yapısı 5-7., 11-13., 17-19. ve 20-21. kulvarlardaki örnekler için barizdir. 2-4. kulvar örneği büyük olmasına rağmen DNA tek dokudan izole edilmiştir.

DNA'daki canlı boyuna bağlı değişiklikler tespit edilirken midyelerin toplandığı farklı istasyonlarda DNA'daki değişimin tespit edilebildiği boyun farklılık gösterdiği görülmüştür. Bu da “Kirlilik takibi” çalışmaları için örnekleme yapılacak bölge midyelerinde hangi boydan itibaren DNA'da RAMD-PCR yaklaşımı ile tespit edilebilir değişim gözleniyor?” sorusunun cevabının verilmesini mecburi kılmaktadır. Carrefour'dan ve Saros Körfezi'nden temin edilen 5.0 cm'lik midye DNA'sında değişim gözlenirken, Şile örnekleri için bu boy 2.9 cm'ye, Haliç örnekleri için 2.6 cm'ye, Florya sahilinden örneklerde 2.5 cm'ye, Fenerbahçe midyeleri için 2.1 cm'ye ve Unkapanı midyeleri için 1.1 cm'ye kadar düşmektedir.

6.4. DNA değişimi indeksi (DDI) tayini

Çalışmada uygulanan yöntem, kalitatif değerlendirmeler için elverişlidir. Bu değerlendirmeler doğrultusunda bir de DNA değişimi indeksi çıkartılmıştır.

DNA değişimi indeksi tayini için öncelikle en az kirli olduğu belirlenen referans bölgeden alınan en küçük boy midye örneğinin DNA'sındaki değişiklik belirlenmeye çalışılmıştır. Bu değişiklik mozaik yapının spontane olan kısmını ortaya koyacaktır. Bu çalışma kapsamında, bu denemede hiçbir değişim yakalanamamıştır. Yani, arkaplan kendiliğinden bir değişim yoktur.

Mytilus galloprovincialis DNA'sında kirlilik stresine bağlı DNA değişim index tayini

Kirlilik stresine bağlı DNA değişim indeksi (DDI) ise,

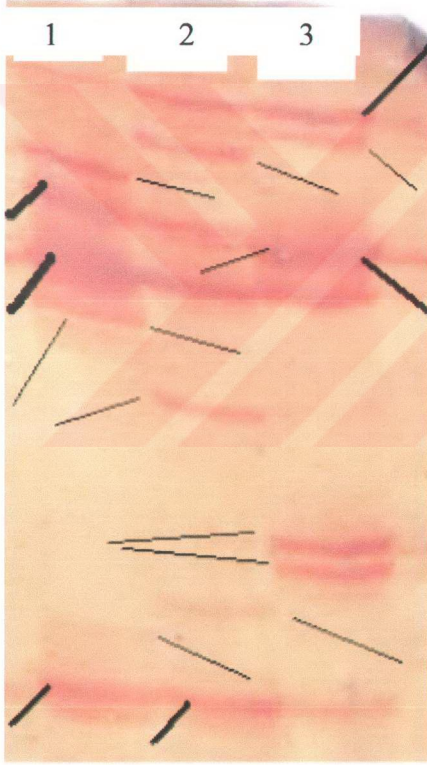
$$(DDI) = \sum_{i=1}^N \left[\frac{\text{RAMD-PCR Değişik profil sayısı}(X)}{\text{RAMD-PCR'in uygulama sayısı}(n)} \right]_i$$

i=uygulanan primer sayısı

nx hazırlanan RAMD-PCR karışımında n ne kadar büyük olursa gerçeğe o kadar yakın ve karşılaştırılması kolay sonuçlar elde edilecektir. Hem primer sayısı (i) hem de n artırılırsa daha da net sonuçlar elde edilecektir.

Şekil 26 ve Şekil 27 için DDİ 3/19 ve 19/19'dur. DDİ'nin büyük olması DNA'daki değişimin fazla olduğunu göstergesidir.

DNA'daki değişimi daha net gösterebilmek için farklı jel ve boyama sistemleri de kullanılmıştır. Bu sayede, elde edilen profillerin çözünürlüğü artırılarak değişikliklerin daha net gözlenmesi sağlanmıştır (Şekil 24). M12 nolu 4.0 cm boyundaki Galata Köprüsü demir ayaklarından toplanan midye örneği için ayrı zamanlarda yapılan 3x ve 4xRAMD-PCR profillerinin agaroz jeldeki sonuçları ve Şekil 24'de elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında denatüre edici akrilamit jel elektroforezi ile birlikte gümüş boyama yönteminin çok daha hassas ve net olarak (daha fazla sayıda yeni bant ve eksilen bant, bantlarda yoğunluk farkı) değişiklikleri tespit edebildiği gözlenmiştir.



Şekil 24. Denature edici jel elektroforezi ve gümüş boyama 3xRAMD-PCR profili. M12 nolu, 4.0 cm boyunda Galata midye DNA'sının kendi içindeki farklılaşmasını ortaya koyan denature edici jel elektroforez ve gümüş boyama 3xRAMD-PCR profili. Çizgiler, farklılıkları hem bant hem de yoğunluk bazında göstermektedir.

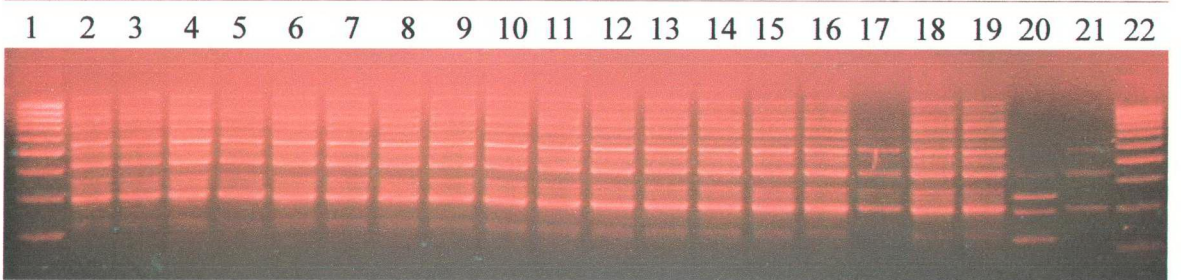
Kullanılan primerlerin sayısı artırılarak da değişimin boyutu netleştirilebilir. Genomun tamamına bakılabilse değişim hakkında en doğru sonuç olacağından yola çıkarak genoma

bakılan pencere sayısı ne kadar artırılırsa ve bunlarda oluşan toplam değişim değerlendirmesi yapılırsa kirliliğin DNA'yı değiştirmesi ile ilgili en doğru sonuca yaklaşılabilecektir. Şekil 25'de M16 nolu, 2.5 cm Florya midye DNA'sındaki değişim iki primer kullanılarak gösterilmektedir. İlk 5'li OPA8 primeri ile ikinci 5'li OPB18 primeri ile elde edilen 5xRAMD-PCR profilleridir. Değişim ilk primerle daha az gözlenirken, ikinci primer ile daha fazla değişim yakalanmıştır.

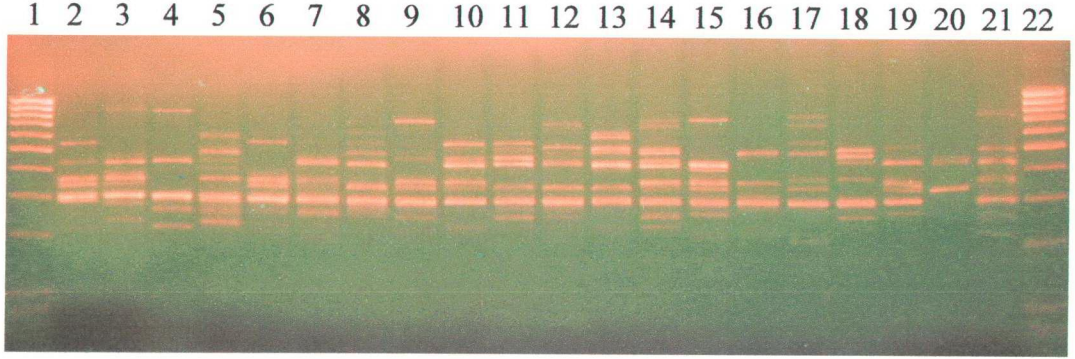


Şekil 25. 5xRAMD-PCR yaklaşımı ile birey içi DNA mozaikliğinin tespiti. M16 nolu, 2.5 cm Florya midye örneği ile, OPA8 (1.-5. kulvar) ve OPB18 (6.-10. kulvar) primerleri kullanılarak elde edilmiştir.

Birey içi DNA değişiminin, mozaikliğin netleştirilmesi için bir diğer yaklaşım, RAMD-PCR için hazırlanacak mastermix'in kaç x'lik hazırlanacağıdır. n ne kadar büyük olursa değişimin boyutu o kadar netleşecektir. Şekil 26 ve 27'de bu durumun tespiti yapılmıştır. M80 nolu 0.5 cm'lik Saros midyesi ile yapılan 20xRAMD-PCR uygulaması sonucu elde edilen profil DNA değişim oranını 3/19 olarak gösterirken, aynı örnek için mesela 5xRAMD-PCR yapıldığında çıkan DNA değişim oranı 0/5, yani 0'dır. Bu da aslında varolan bir değişimi tespit edemediğimizi gösteren bir sonuçtur. Şekil 27'de elde edilen profil için ise DNA değişim oranı 19/19 bulunmuştur.



Şekil 26. M80 no'lu 0.5 cm boyundaki Saros midye DNA'sının OPB18 primeri ile 20xRAMD-PCR profili. 1. ve 22. kulvarlarda boy markörü, 20. kulvarda negatif, başka bir canlı DNA'sı kontrol olarak gözüküyor. Farklı profiller sadece 2 kulvarda 17. ve 21. mevcuttur. DNA değişim oranı 3/19'dur.

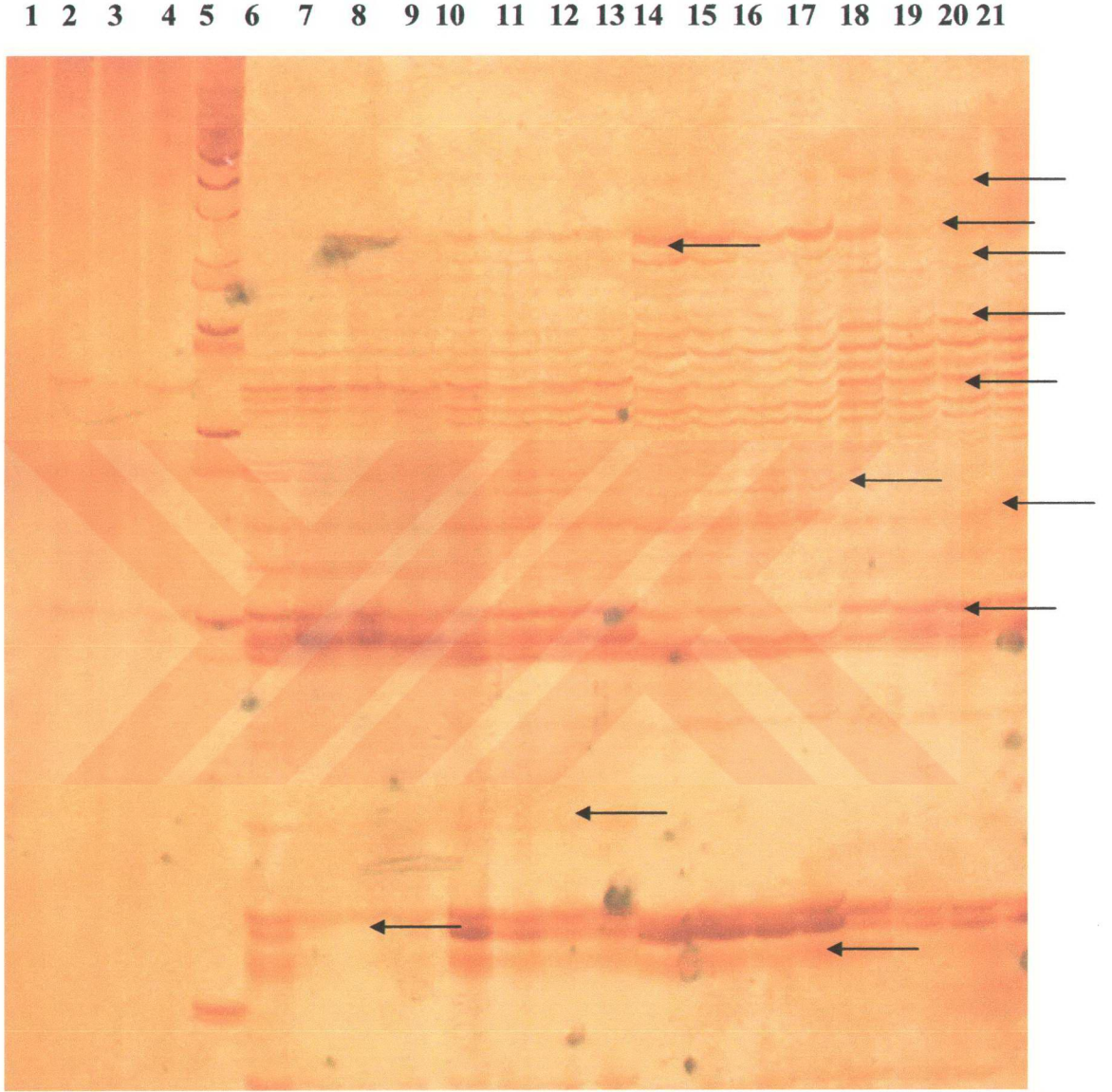


Şekil 27. M73 nolu 6.55 cm boyundaki Saros midye DNA'sının OPB18 primeri ile 20x RAMD-PCR profili. 1. ve 22. kulvarlarda boy markörü, 20. kulvarda negatif, başka bir canlı DNA'sı kontrol olarak gözüküyor. DNA değişim oranı 19/19'dur.

6.5. Farklı doku DNA değişimleri

Şekil 23'deki sonuçlar değerlendirilirken 2-4. kulvardaki örneklerin büyük boy (6.38 cm) midye olmasına rağmen sanki kirliliğe diğer büyük boy midyeler kadar maruz kalmamış gibi DNA'sındaki değişikliklerin gözle ve kıyasla hemen hemen yok denecek kadar az olduğu gözlemlenmiştir. Bu midye örneği Florya açıklarından dalgıçlar tarafından dipten, Volga-Neft tanker kazası sahasından, yoğun bir PAH kirliliğinden çıkartılmıştır. Diğer örneklerden farklı olarak bu örnek için DNA izolasyonu tek bir dokudan yapılmıştır, yani diğer örneklerde olduğu gibi midyenin içinin tamamı homojenize edilip bir kısmı alınarak yapılmamıştır. Bu sebeple tek dokunun maruz kaldığı değişim tabii ki bütün dokulardaki DNA'nınkine göre hem daha az sayıda, hem de daha homojen olacaktır, yani mozaiklik tespiti yapılamamış olması bunun göstergesidir. Bu durumu netleştirmek için İzmir Körfezi'nden temin edilen M38 nolu en büyük boy midye farklı organ ve dokularına dikkatlice diseksiyon mikroskobu altında ayrılarak her bir farklı organ ve dokudan DNA izolasyonu ayrı ayrı yapılmıştır. Daha sonra bu dokuların tamamının birarada homojenize edilmesi sonucu aynı midye için toplam DNA izolasyonu da yapılmıştır. Bu şekilde farklı dokulardaki DNA değişiklikleri ortaya konulurken, bütün dokulardan çıkartılan DNA'nın da bütün bu farklılıkların toplamı sonucu bir mozaik olduğu OPB18 primeri kullanılarak 4xRAMD-PCR yaklaşımı ile Şekil 28'de gösterilmiştir. Oklarla gösterilen bölgelerde doku içi ve dokular arası farklılaşmalar

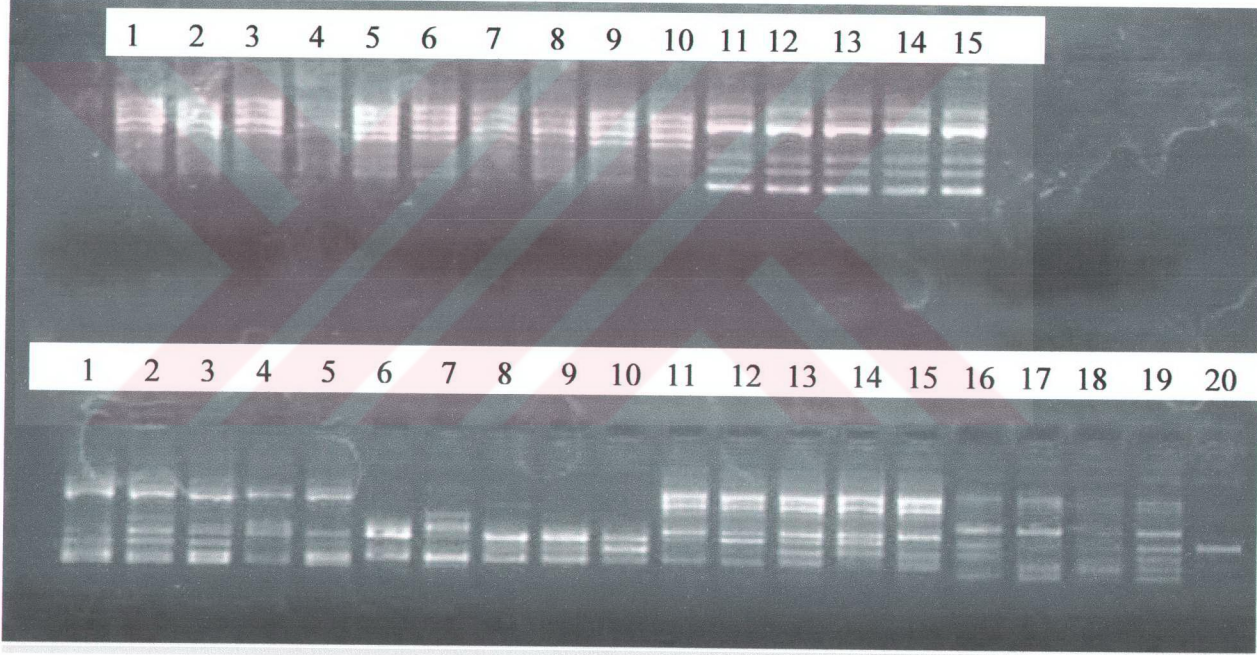
görülmektedir. Dokularda birbirinden farklı tipte ve yoğunlukta bantlar, bu dokularda farklı tip mutasyonların oluştuğunu işaret etmektedir.



Şekil 28. Midye farklı organlarının 4xRAMD-PCR profillerinin gümüş boyama ile boyanmış, 6% denature edici poliakrilamid jel elektroforez sonucu. boyama ile gösterilen bantlar dokular arası farklılaşmayı ortaya koymaktadır. 5. kulvar markör DNA'sı, 6-9. kulvarlar ayak DNA'sı, 10-13. kulvarlar solungaç DNAsı, 14-17. kulvarlar manto DNA'sı, 18-21. slotlar aynı midyenin toplam DNAsı ile 4xRAMD-PCR profillerini göstermektedir.

6.6. DNA değişim sürecinin başka deniz ve kara türlerinde de gösterilmesi

RAMD-PCR yaklaşımını rutin kirlilik genotoksisite tayini için midye dışında canlılara da uygulanabilir bir metod olduğunu göstermek gerekmektedir. Bu amaçla bir çok deney yapılmıştır. Şekil 29’de uygulaması yapılan farklı canlılar için de yaklaşımın sonuç verdiğini gösteren bir profil bulunmaktadır. RAMD-PCR çeşitli canlı grupları ile yaptığımız diğer çalışmalarda da son derece verimli sonuçlar vermiştir. Bu canlılar: *Dugesia dorotocephala* (planaria), *Lumbriculus variegatus* (Kaliforniya karakurtçuğu), hamsi, mezgit, çinekop, *Ulva lactuca* (yosun), *Urtica dioica* (ısırgan otu), insan kan dokusu, beyin tümör ve ağızıçi epitel dokusu, *Diplo-taxis* cinsi yol kenarı bitkileri, *Agaricus* ve *Morchella* cinsi mantarlardır.



Şekil 29. Farklı doku ve canlıların RAMD-PCR profilleri. İlk beş kulvar normal insan DNA’sı (kandan), ikinci beşli insan beyin tümör dokusu DNA’sı (mozaikleşme tespit edilmiyor), üçüncü beşli *Diplo-taxis* tarladan, alt sıranın ilk beşlisi *Diplo-taxis* yol kenarı (yüksek oranda PAH kirliliğine maruz kalmış, mozaiklik tespit ediliyor), ikinci beşli M25 nolu midye DNA’sı ile, üçüncü ve dördüncü beşli gruplar *Morchella* cinsi mantar DNA’sı (mozaikleşme tespit ediliyor) ile yapılan 5xRAMD-PCR profilleridir.

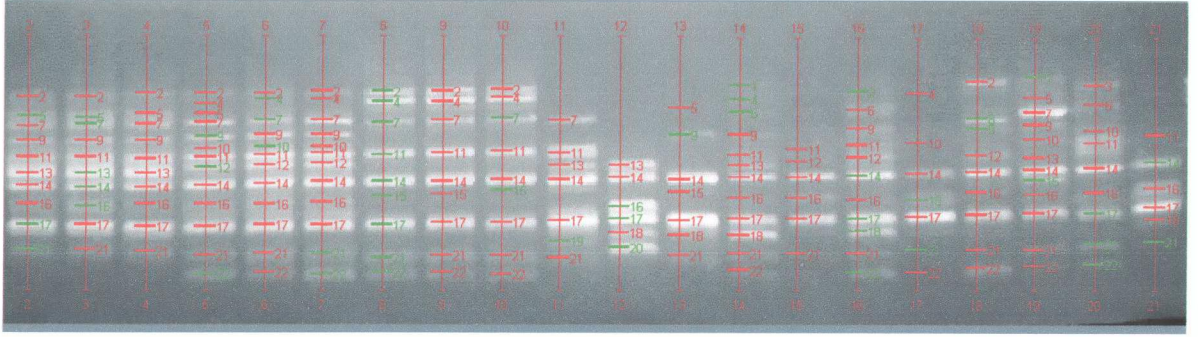
6.7 Bulguların istatistiksel ve kantitatif değerlendirmesi

Elde edilen sonuçlar ilk olarak kalitatif değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler, RAPD-PCR band profillerindeki benzerlik veya farklılıkların görsel karşılaştırması şeklinde dir. Çalışma bu şekliyle dahi kendi içinde objektif sonuçlar vermiştir.

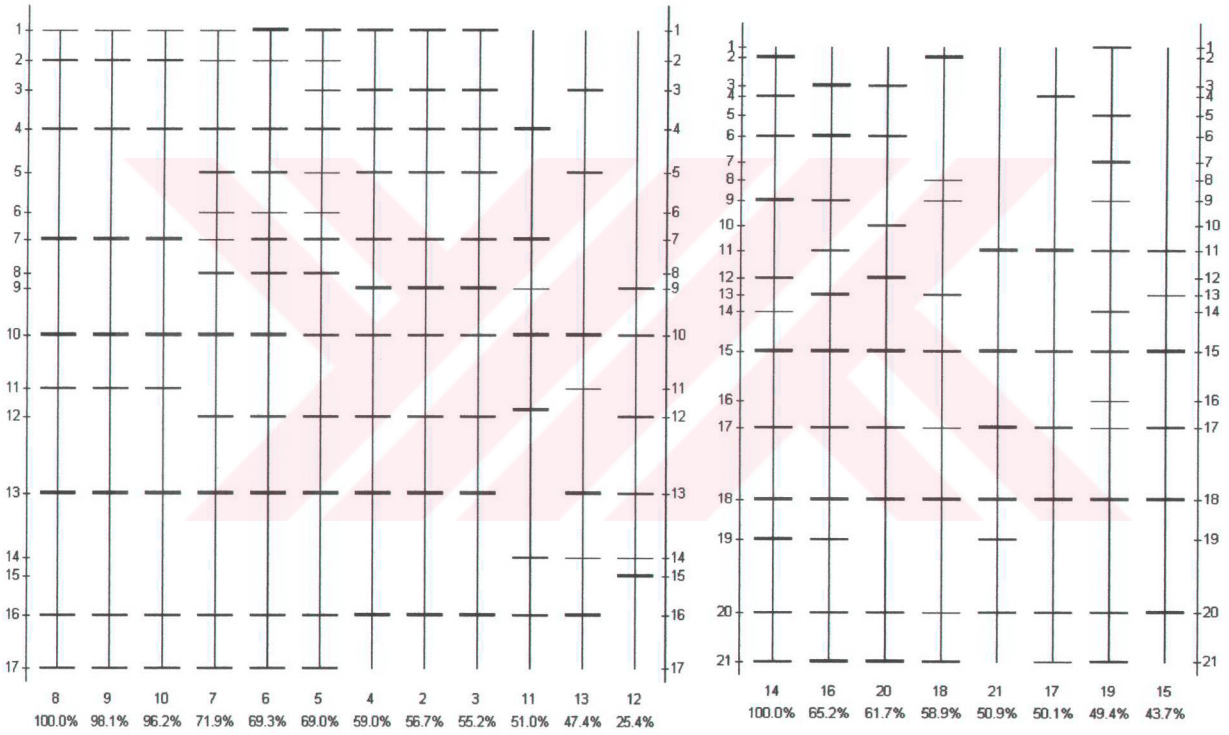
Sonuçlarımızın değerlendirilmesindeki bir ileri aşamada ise herbir elde edilen RAPD profili dijital fotoğrafları tiff formatına sokulmuş, bantların yer ve göreceli durumlarının bilgisayarda Quantity One programı kullanılarak tespiti yapılmış, iki araştırmacı beraber çalışılarak analiz ve istatistiki sonuçlar oluşturulmuştur. şekil 30 profillerdeki bantların yerini tespit aşamasını göstermektedir.

Her kulvar için benzer ve farklı bantlar tespit edilmiştir. Bantların yoğunluk farklılıkları da değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın yapılabilmesi için, herbir yürütülen jelde baş ve son kulvarlara boyları ve herbir banttaki DNA yoğunluğu bilinen birer markör yüklenmiştir. Elde edilen bütün bantlar için uzunluk ve amplifikasyon miktarları bu şekilde belirlenmiştir. şekil 30 a, b ve c'de bant yerlerini netleştirmek için yapılan aşamalar gösterilmiştir. şekil 30 a'da karşılaştırması yapılmak istenen net, asli bantlar bir kulvar için belirlenmiş ve bu bantlar yeşil renk ile seçilmiştir, daha sonra bilgisayar programı bu asli bantlara göre aynı olan diğer kulvarlardaki bantları, bu defa kırmızı renk ile atamaktadır. Jelllerde elektroforez esnasında bazı yürüyüş bozuklukları olabilmekte, ve bazı kulvarlar daha hızlı veya yavaş ilerleyebilmektedir. Bu duruma "smiling etkisi" denilmektedir. Yani jelde boyadan takip edildiği şekliyle glmse yen bir ağız görüntüsü olabilmektedir. Bu durumdan kaynaklanabilecek yanlışlıkları gidermek için bilgisayarca aynı olmadığı bildirilen ancak smiling etkisinden dolayı tespit edilen yürüyüş bozuklukları, bu tip kesin aynı olduğu bilinen bantlara da asli bant rengi olan yeşil atanarak bilgisayarın karşılaştırmaları bu bantları doğru kabul ederek yapması sağlanır. Bant numaraları aynı olan bantlar benzer bantlardır. Çalışmada esas olan iki örnek kulvardaki paylaşılan ve paylaşılmayan bantların belirlendikten sonra bir benzerlik veya farklılaşma matrisi (Dice similarity matrix) oluşturma ktır (şekil 31) ve bu matristen yola çıkarak UPGMA temelli benzerlik ve farklılaşma dendrogram, ağaçları oluşturma ktır (şekil 32-36). Bu aşamayla çalışmanın sonuçları kantitatif olarak

yorumlanmaktadır. Benzerlik ve farklılık aslında iki farklı canlı DNA'sı için kullanılmış kavramlardır. Ancak, bu çalışmada ortaya koyduğumuz aynı canlının DNA'sındaki benzerlik veya farklılıktır. Yani muhtelif maruziyet ve endojen sebepler etkisiyle canlının DNA'sı öyle değişebilmektedir ki, adeta farklı iki canlı DNA'sı karşılaştırılıyorsa değişim tespit edilebilmektedir, Şekil 27 ve Şekil 35. Herbir kulvarda aynı midye örneğine ait DNA ile yapılan 20xRAMD-PCR sonucu oluşan profilin benzerliği %27 ile %70 arası değişmektedir. RAMD-PCR sonucu tespit edilebilen bu durum maruziyetin düşük olduğu ve henüz değişikliklerin tespit edilebildiği miktara ulaşmamış boy midyeler için ise aynı canlı DNA'sı için %85 ve üstü benzerliği göstermektedir (Şekil 26 ve Şekil 34'de). Şekil 26 ve Şekil 27'deki bulgular bu durumu tespit için seçilmiş 2 örnek için 20xRAMD-PCR uygulanarak elde edilmiştir. Şekil 34 benzerliği temsil için Şekil 35 ise farklılaşmanın boyutunu göstermek için Saros körfezi midyelerinden en küçük boy ve en büyük boy midyelerin DNA'ları ile yapılmış birer örnektir. Şekil 33'de ise ilk 12 kulvar için her bir üçlünün (3xRAMD-PCR sonuçları) benzerliği kendi içinde karşılaştırılarak dendrogramları (b) çizilmiştir. 2-4. kulvardaki örnek için benzerlik %94'ün, 5-7. kulvardaki örnek için %88'in, 8-10. kulvardaki midye için benzerlik %97'nin üstündedir. 11-13. kulvardaki örnek için ise farklılık söz konusudur, farklılaşma %64'den fazladır. Şekil 32'nin son 8 kulvarında (c) ise benzerliği %52 ile %75 arası değişen 8 farklı midye örneğine ait dendrogram bulunmaktadır. Benzerlik ve farklılık durumlarının tespiti oldukça hassas (hem ortak bantlara hem de bantların yoğunluklarına göre) yapılabilmektedir.



(a)



(b)

(c)

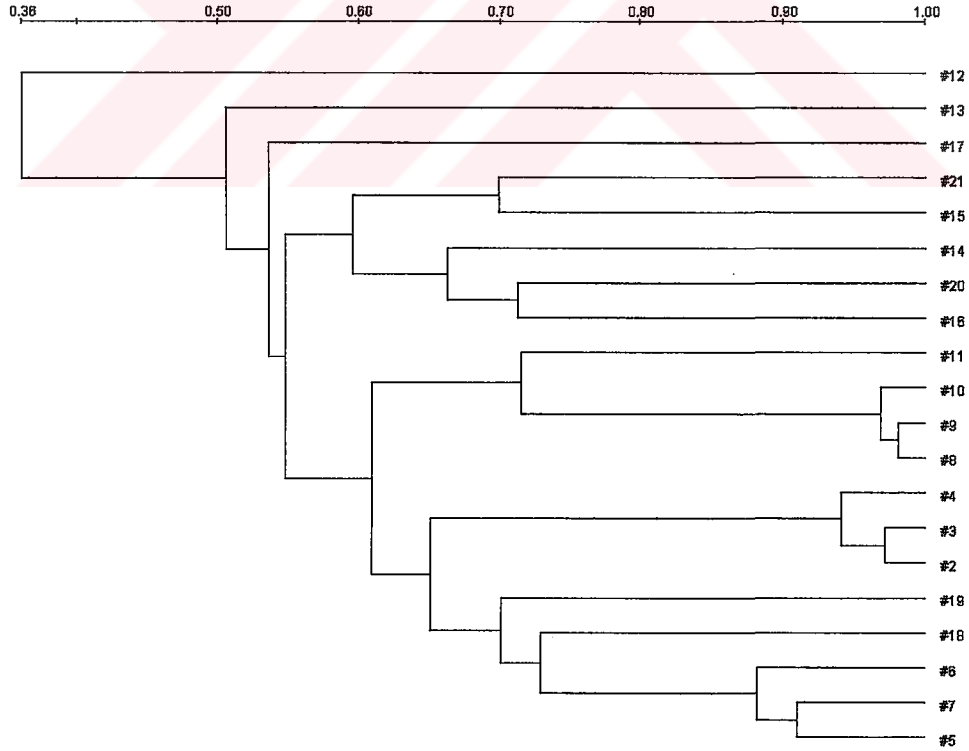
Şekil 30. Elektforez profil bantlarının belirlenmesi (a). Şeklin ilk 12 kulvarı 3xRAMD-PCR bantlarının Quantity one programınca belirlenmiş yerleri (b), son 7 kulvarı tek tek koşturulan farklı midye örneklerine ait PCR bantlarının programca tespit edilmiş yerlerini (c) göstermektedir.

Calculation Method: Dice Coefficient

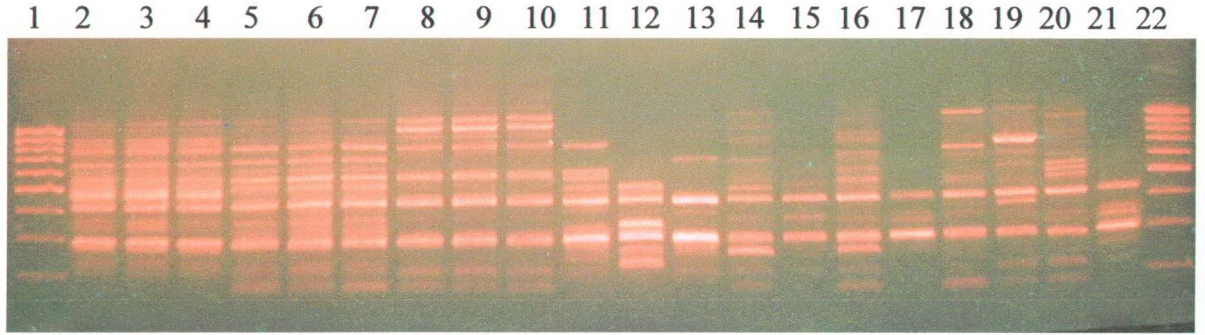
July 30, 2004

Lane	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
2	100.0	97.2	94.5	71.9	69.1	64.3	56.7	56.5	57.5	61.1	41.3	56.4	53.7	66.1
3	97.2	100.0	93.7	69.9	67.2	63.2	55.2	55.0	56.0	59.5	42.1	56.6	53.7	65.5
4	94.5	93.7	100.0	73.7	69.9	65.3	59.0	58.8	59.7	63.6	41.8	57.4	55.0	64.8
5	71.9	69.9	73.7	100.0	88.9	91.0	69.0	66.5	68.7	56.1	31.3	51.5	55.2	65.1
6	69.1	67.2	69.9	88.9	100.0	87.4	69.3	69.6	70.2	57.9	31.9	47.4	57.0	65.9
7	64.3	63.2	65.3	91.0	87.4	100.0	71.9	71.5	71.2	58.5	33.1	49.6	60.0	67.7
8	56.7	55.2	59.0	69.0	69.3	71.9	100.0	98.1	96.2	71.4	25.4	47.4	52.8	55.5
9	56.5	55.0	58.8	68.5	69.6	71.5	98.1	100.0	97.5	72.4	24.9	47.6	52.8	55.4
10	57.5	56.0	59.7	68.7	70.2	71.2	96.2	97.5	100.0	70.6	24.2	48.7	53.5	56.3
11	61.1	59.5	63.6	56.1	57.9	58.5	71.4	72.4	70.6	100.0	35.9	48.8	47.5	60.7
12	41.3	42.1	41.8	31.3	31.9	33.1	25.4	24.9	24.2	35.9	100.0	36.8	41.2	44.4
13	56.4	56.6	57.4	51.5	47.4	49.6	47.4	47.6	48.7	48.8	36.8	100.0	49.8	54.8
14	53.7	53.7	55.0	55.2	57.0	60.0	52.8	52.8	53.5	47.5	41.2	49.8	100.0	51.4
15	66.1	65.5	64.8	65.1	65.9	67.7	55.5	55.4	56.3	60.7	44.4	54.8	51.4	100.0
16	48.7	48.0	49.3	60.2	60.6	64.2	45.1	45.2	46.1	44.0	33.5	53.5	70.8	57.8
17	45.5	44.5	46.3	59.7	58.8	64.0	56.0	54.9	53.6	44.6	41.8	42.1	50.1	60.6
18	52.1	48.5	53.9	74.4	71.2	73.0	52.8	51.7	52.0	41.0	33.8	44.1	46.8	58.3
19	68.7	68.0	69.3	75.5	68.5	72.7	64.7	64.8	64.6	57.1	38.2	54.6	49.4	46.6
20	48.7	47.6	51.8	58.9	58.6	62.6	59.6	59.5	59.7	58.7	34.0	42.6	61.7	62.7
21	52.1	53.9	56.3	50.3	52.4	52.4	57.0	57.2	57.1	64.0	49.6	57.2	59.8	69.9

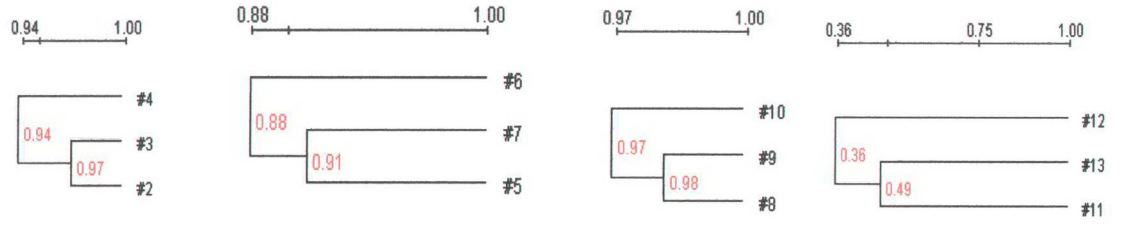
Şekil 31. Dice Benzerlik matrisi. Şekil 30 a'daki örnek için oluşturulmuştur.



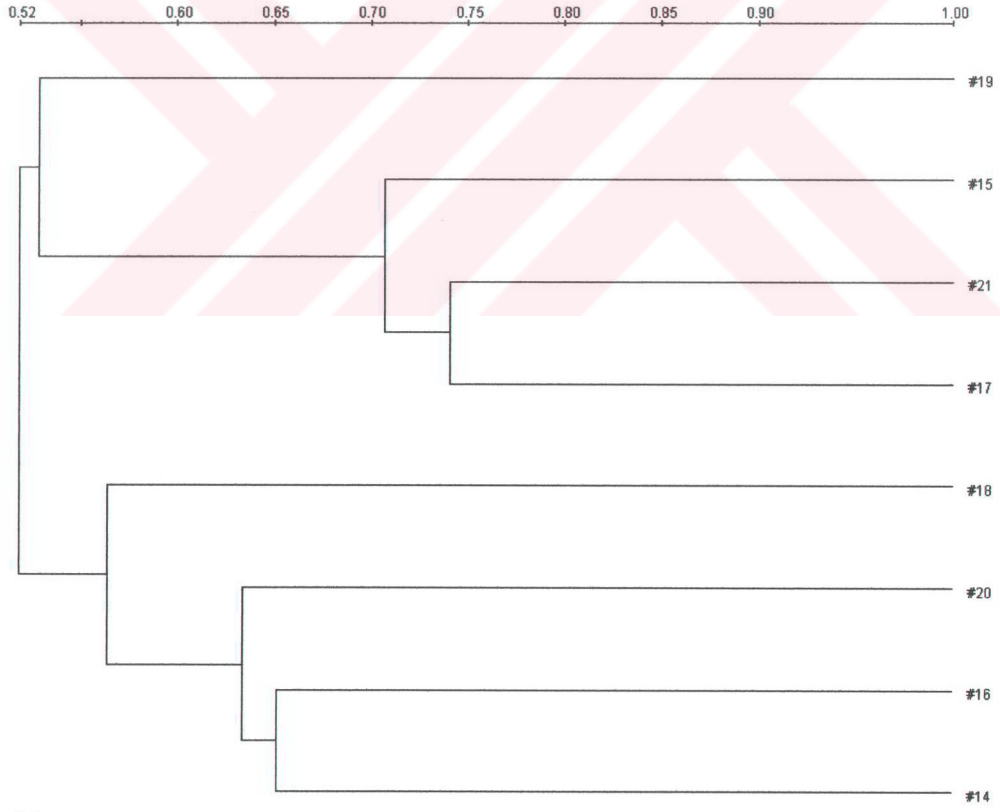
Şekil 32. Benzerlik ve farklılaşma dendrogramı. Şekil 30 (a) için çizilmiştir.



(a)

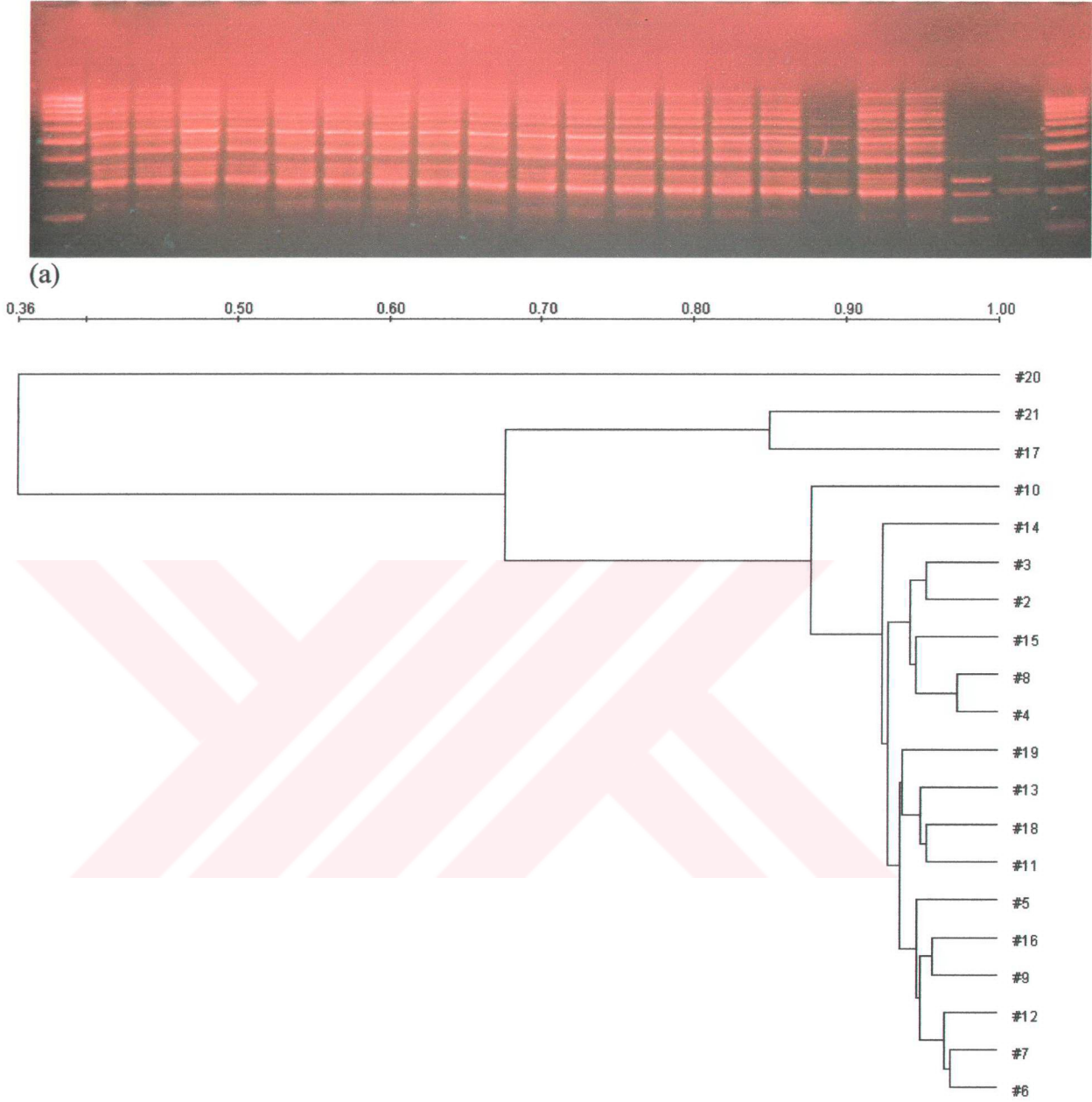


(b)

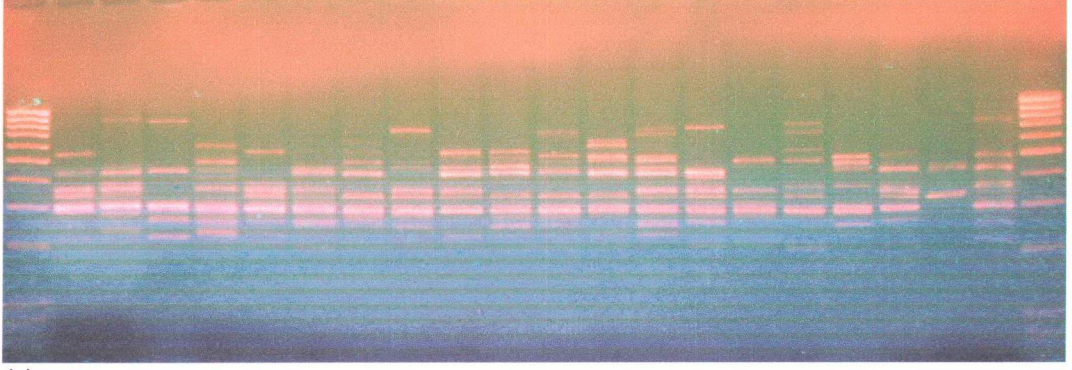


(c)

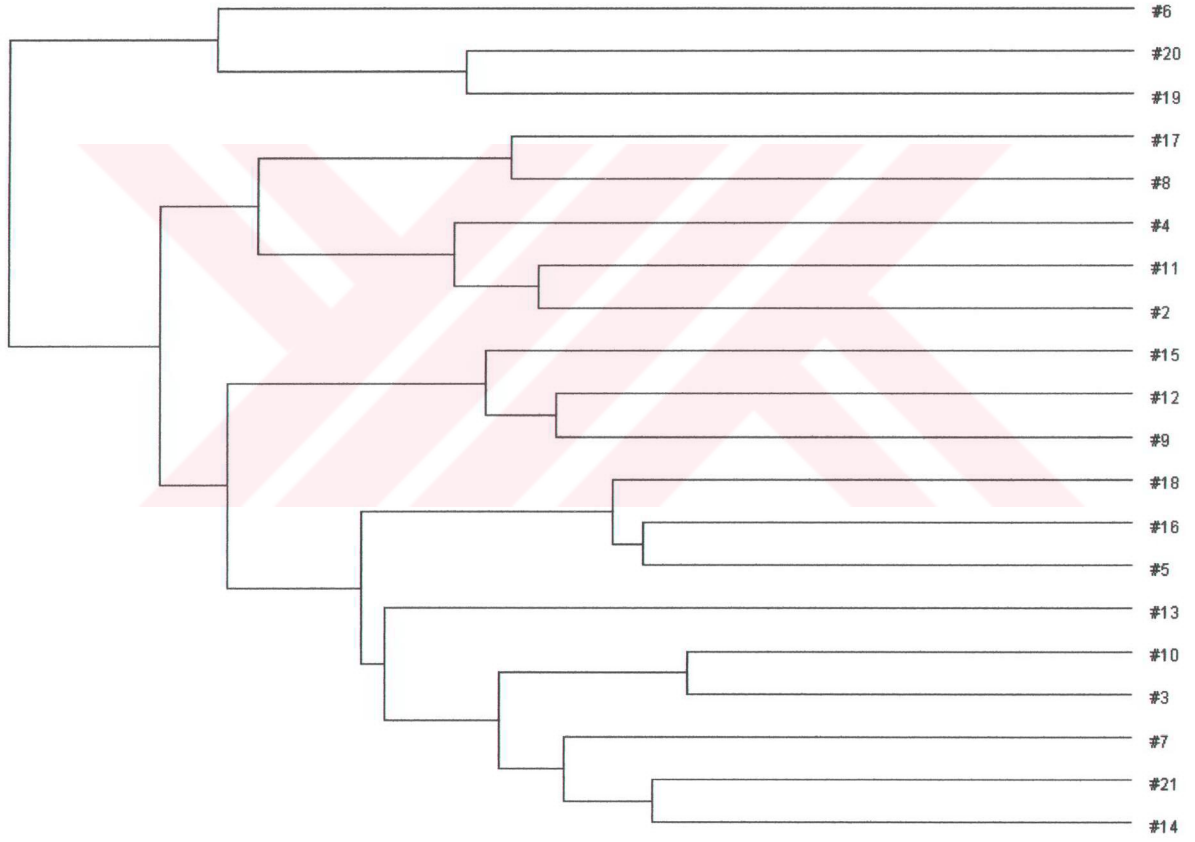
Şekil 33. Dendrogramlar. (b)'de üçerli gruplar halinde (a)'daki RAPD profilinin, 2-13. kulvarlarındaki örneklerin benzerlikleri gösterilmiştir. (c)'de tek tek olmak üzere (a)'daki profilin 14-21. kulvarlarındaki örneklerin farklılaşmaları gösterilmektedir. Birbirine %75 oranla en çok 17 ve 21. kulvar örnekleri benzemektedir.



(b)
Şekil 34. Benzerlik dendrogramı (b). (a)'daki elektroforez profili bantlardaki yoğunluk farkları da dikkate alınarak çizilmiştir. Benzerliği göstermektedir. 20. örnek hariç, bütün örnekler için benzerlik % 68'in üstündedir.



(a)



(b)

Şekil 35. Farklılaşma dendrogramı (b). (a)'daki elektroforez profili için çizilmiştir. Kulvarlar arasında %30- %70 arası değişen farklılaşmayı göstermektedir.

VII. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışma ile moleküler toksikoloji, moleküler ekotoksikoloji, deniz toksikolojisi gibi sahalarda kabul göreceği düşünülen yeni bir genotoksisite biyomarkörü (RAMD-rastgele amplifiye edilmiş mozaik DNA profilleri) ortaya konulmuştur. Kalıtım materyali, DNA üzerinde kirliliğin tesirini takip edebilmek için kullanılacak bu yaklaşımın uygulamasında bir model canlı olan *Mytilus galloprovincialis* kullanılmıştır. Ancak, başka canlılar da benzer bir değerlendirme için kullanılabilir; yaklaşımın avantajlarından biri budur. *In vivo* şartların genotoksik tesirini, RAPD parmakizinde aynı canlı içi DNA mozaikliğini göstererek ölçebilmektedir. Bu metod kullanılarak özellikle “Midye gözlem” çalışmaları kapsamında rutine geçirilebilecek genotoksisite değerlendirmeleri yapılabilecektir.

Midyelerin bu çalışmada özellikle tercih edilmelerinin sebepleri buldukları deniz ortamında genotoksik tesirlere sürekli maruz kalmaları ve çeşitli kirliliğe dayanıklı olmalarıdır. Midyeler, denizlerin akciğerleri ve karaciğerleri vazifesi yapmaktadır. Çok çeşitli kirliliğe dirençli ve kirlilikle bir yere kadar mücadele eden, bu kirliliği tutabilen ve yeri geldiğinde bir kısmını bırakabilen, kendini ihtiyacına göre farklı zeminlere sabitleyebilen ve bütün bu özelliklerini de genetik materyaline, DNA’sına borçlu olduğumuz bir canlıdır. Çok az sayıda canlı midyenin yaşayabildiği ortamlarda canlı kalmayı başarabilmektedir. Bu çalışmada, hem bu canlının genetik açıdan bu derece adaptif oluşunun değerlendirilmesi, yani genetik çeşitliliği, hem de kirlilik etkisiyle meydana geldiği düşünülen genetik değişikliklerin tespiti yapılmaya çalışılmıştır.

Yaklaşımın uygulamaları iki aşamalı olmuştur. İlk aşamada RAPD-PCR yöntemi kullanılarak *Mytilus galloprovincialis*’in genetik açıdan gösterdiği çeşitlilik ortaya konulmuştur. Morfolojik kriterler açısından alt tür tanımı yapılamamış bu canlının, genetik olarak çok heterojen bir yapıda olduğunu netleştirmek için 40 farklı RAPD primeri ile denemeler yapılmıştır. Bunlardan özellikle 3 tanesi, OPB18, OPA8 ve OPB7 tekrarlı şekilde her denememizde bütün örnekler için yorumlanabilir sonuç vermiştir. Diğerleri ancak bazı örneklerle sonuç verdiği için ispatlı ve tekrarlı deneyler için kullanışlı olmamışlardır. Bu üç primer sadece midye için değil, insan beyin tümör dokusu, insan mide kanser biyopsisi, insan kan dokusu, çeşitli deniz balıklarının DNA’sı, *Drosophila melanogaster*, *Dugesia*

dorotocephala türü *planaria* ve *Lumbriculus variegatus* ile *Agaricus* ve *Morchella* cinsi mantar ve *Diplotaxis* cinsi canlıların DNA'ları ile de tekrarlı sonuçlar vermiştir. Bu üç primerin eldeki tüm istasyonlardan toplanan midyelerden çıkartılan DNA ile denenmesi sonucu ortaya çıkan, her üç primer kullanıldığında da bireylerarası genetik farklılaşmayı somut değerlendirmemizi sağlayacak görüntülerdir. Deneyin ikinci aşamasında yapılan bu derece farklı çizgilerdeki herbir bireydeki genetik değişmeyi ortaya koyabileceğimiz bir strateji bulmak olmuştur. Bu strateji, herbir DNA örneğinde çeşitli sebeplere bağlanabilecek mutasyon hızını ve mozaiklik tabir ettiğimiz farklı dokularda DNA'nın farklılaşmasını tespit etmek yönündedir.

Kirliliğe son derece dirençli canlıların beklenildiği gibi genetik yapıları da çok büyük çeşitlilik göstermektedir. Çalışmamızda bu durum kalitatif olarak ortaya konulmuştur. Bu yüksek çeşitlilik sebebiyle, midye, kirliliğin genotoksik tesirini tespit için bireylerarası değişiklikleri moleküler düzeyde takip edebileceğimiz bir canlı değildir. Literatürde, genotoksik tesir tayini için, midye ve RAPD-PCR yöntemi kullanılan az sayıda uygulama mevcuttur (Ma, v.d., 2000; Borowsky, 2001; Conte, v.d., 1998). Bu çalışmalarda, kirli ve temiz referans bölgelerde yaşayan türlerin genetik çeşitliliğindeki artış ve azalışları takip yoluna gidilmiş, daha verimli olacağını düşündüğümüz birey içi genotoksik tesirin RAPD-PCR yöntemi kullanılarak tespit edildiği bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

Midye ve başka deniz ve kara canlılarıyla yapılan toksikoloji çalışmalarında ortaya konulan önemli bir tespit hedef organ toksisitesidir. Ortamda bulunan kirleticilerin her birinin alınış şekli, birbirinden farklı etki mekanizmaları, metabolizmaları, atımlarının yanısıra etkili oldukları ve öncelikli etkilerini gösterdikleri bir ya da birden çok hedef organlarının oluşu ve özellikle de bu organlarda asıl toksik tesirlerini göstermeleridir. Çalışmamızı gerçek anlamda şekillendiren bu tespit bir çok çalışma ile ortaya konulmuştur. Midyenin *in vivo* ortamda ne gibi kirleticilere maruz kaldığı, ne zaman ve ne kadar süreyle maruz kaldığı, bu kirleticilerin midyedeki etki mekanizmaları, genotoksik olup olmadıkları, kanserojen ya da mutajen olup olmadıkları, midyede hangi hedef organlarda birikerek ne tip toksik tesir gösterecekleri, hangi tip kimyasal, biyokimyasal, biyolojik yöntemlerle ne tip özelliklerinin tespit edilebileceği gibi akla gelecek bir çok soru vardır. Ancak TSCA tarafından listelenmiş 14000 kimyasal baz alınarak düşünüldüğünde gereken bu soruların cevabını verebilecek

testlerin sayısı da, sadece midye için bile en az bir o kadar olmalıdır. Bu soruların hemen akla getirdiği, *in vivo* sistemlerin gerçek anlamda her yönüyle toksikolojik bir takiplerinin sözkonusu olamayacağı gerçeğidir. Bu durum deniz ortamında daha da kontrolsüzdür. Genotoksisite; DNA ve genlerde oluşan değişiklikler, olumsuz etkiler, mekanizmalar da düşünüldüğünde, henüz çok bilinmeyen olan bu problem hakkında oluşturulacak ve rutine uygulanabilecek bir deniz genotoksisitesi biyoizleme metodunun düşünülmesi, imkanların belirlenmesi, uygulamaya konulmasının zorlukları ve metodun eksikliklerinin giderilmesi her çalışmada olduğu gibi zamanla, imkanla ve çalışmanın uygulamaları sırasında karşılaşılabilecek sorunların çözümlenmeye çalışılmasıyla olacaktır. İlk anda tüm bileşenleriyle mükemmel çalışan hiçbir sistem ve metod yoktur. Bununla birlikte, yaklaşımın *in vivo* sistemlerin genotoksik değerlendirilebilmeleri için son derece verimli ve mükemmelleştirilmeye çok müsait, ucuz, çabuk cevap veren, uygulanabilirliği ve yorumlanabilirliği kolay bir yaklaşım olduğu da diğer uygulanmakta olan metodlarla karşılaştırıldığında ortaya çıkmaktadır.

Bütün RAPD-PCR uygulamaları ve DNA değişiklik takiplerinde, test ve kontrol gruplarında bulunan bireylerin DNA'larındaki farklılaşmalar ortaya konulmaya çalışılırken, RAPD'in, bu tip çalışmalarda dezavantaj olabilecek tekrarlanabilirliğinin düşük oluşunun altı çizilmelidir. Gerçekten de RAPD-PCR yönteminin değişikliklere aşırı duyarlılığı, tekrarlanabilir oluşunu neredeyse tamamen ortadan kaldırmaktadır. Yaklaşımımızda, her deney kendi başına değerlendirilmekte, deneylerarası karşılaştırmalara gerek olmadığı için aynı şartlarda tekrarlanabilirlik mecburiyeti ortadan kalkmaktadır. Bu da çalışmamızın getirmiş olduğu, RAPD-PCR'ın güvenilirliğini artıran önemli bir faydadır. "Canlının DNA'sında değişim var mı?", "Bu değişim ne boyuttadır?" sorularını, tek bir deneyde cevaplandırarak şekildedir. Her mukayeseli deney kendi başına anlamlıdır ve deney aynı şartlarda tekrarlandığı takdirde varılan yorumların aynı doğrultuda olduğu düşünülmektedir.

Deniz kirliliği ile ilgili parametrelerin ölçülmesine dayanan çalışmalar, meteorolojik olaylara, mevsime ve genel anlamda zamana son derece bağımlıdır. Çoğu kirlilik izleme metodunda kirleticilerin mevsimsel yoğunlukları arasında önemli farklılıklar olduğundan kirlilik takibinin her mevsim ayrı yapılması gerekmektedir. Çalışmamızda ise model olarak kullanılan midyenin (*Mytilus galloprovincialis*), kirliliği bünyesinde biriktirme yeteneği ve lokal tabiatlı oluşu ve bunun yanısıra genotoksik etkinin kronik ve kümülatif bir etki olması,

mutasyonların organizmada sabitlenmesi, ölçümlerin zamana bağımlılığını önemsiz kılmaktadır.

Çalışmamızda deniz kirliliğinin *in vitro* genotoksik değerlendirilmesine yönelik rutin uygulanabilecek, hızlı bir yöntem geliştirilmiştir. Model canlı olarak seçilen midyenin biyolojik özelliklerinden kaynaklanan bir takım özel durumların tartışılması yararlı olacaktır. Örneklem sırasında üzerinde çalışılan canlının kalıtımla ilgili bilgiler içeren üreme hücreleri DNA'sının kullanılması genetik etkilerin derinlemesine anlaşılmasını sağlayabileceğinden dolayı tercih edilebilmektedir. Ancak, çalışmamızda midyede birey bazında gelişen somatik tipte mutasyonlar önemlidir. Bu mutasyonların kirliliğin genotoksik tesirini diğer canlılar için de bir model teşkil edecek şekilde gösterdiği düşünülmektedir. Çalışmamızın asıl amacı rutin uygulanabilecek bir yöntem ortaya koymak olduğu için diğer nesillere kalıtılan mutasyonlar çalışmamızın ilgisi dışındadır. Bunun nedenlerinden birisi, midyede üreme hücrelerinde oluşacak mutasyonların özellikle bu hücrelerin sayısının büyük ölçüde arttığı dönemde (yılda, aralıklı olarak, ortalama dört ay) önem kazanması ve dolayısıyla her zaman ve her örneğe uygulanabilecek, kümülatif ve kronik etkiyi değerlendirebileceğimiz rutin bir yöntem için uygun olmamasıdır. Kaldı ki, RAPD-PCR metodu çalışılan hücrelerin en azından %2-5'inde gerçekleşen aynı tipte değişiklikleri tespit edebilmektedir (Zwartjes, v.d., 2000) ve dolayısıyla üreme hücrelerinde oluşacak birbirinden farklı tipte ve yeteri sayıya ulaşmamış mutasyonların tespiti için uygun olmamaktadır. Bunun yanısıra, çok kısa bir zaman aralığında ortama bırakılan üreme hücrelerinden *in vivo* ortamda, ya da somatik hücrelerle karıştırmadan örnek alınabilmesi rutin analizler için başlıbaşına ciddi bir dezavantajdır.

Yöntemin, rutin genotoksisite takibinde kullanılabilmesi için midyenin kirliliğe maruz kaldığı sürenin bir ölçüsü olan yaşı ile ilgili bazı durumların tartışılması gerekmektedir. Çalışmamızda midye boyu olarak adlandırılan, kabuklar kapalı iken kumpas ile alınan en büyük uzunluk yaşın bir göstergesi olarak baz alınmıştır. Midyelerde yaş, giriş bölümünde bahsedilen çok sayıda parametreye bağlı olması nedeniyle, rutin analizlerde güvenli olarak kullanılacak bir büyüklük değildir.

Midyelerde gelişim evrelerinin takibi de, kendiliğinden gelişen (spontane) mutasyonların değerlendirilerek, sonradan oluşan kirlilik tesirli mutasyonların netleştirilmesi için önemlidir.

Gelişimin en hızlı olduğu ve bu açıdan en çok dikkate alınması gerektiği düşünülen küçük boy midyelerde yapılan analizlerde, DNA'da kendiliğinden (spontane) bir değişim gözlenmemiştir. Bundan sonraki aşamada, genotoksitenin değerlendirilmesini istediğimiz bölgeden alınan örnekler için hangi boydan itibaren bir değişim gözlenmeye başladığının tespiti yapılmış ve bireylerin birey içi DNA'sında kirlilik tesirli mozaikleşme miktarı, DDI hesaplanarak tespit edilmiştir. Bireylerin hangi boydan itibaren değişim göstermeye başladıkları kirliliğin karşılaştırılması açısından önemli bir kriter olabilmektedir. Bu kriterler çalışma geliştikçe artırılmış ve DNA'sında mozaiklik tespit edilebilen eşik midye boyu tespiti ve bu midye için DDI hesaplanmasının yanında, bir de aynı midyenin RAMD-PCR profilleriyle, canlı içi DNA farklılaşmalarının dendrogramlara dönüştürülmesinde kullanılan % benzerlik verilerinin en küçük değeri, ya da başka bir deyişle en büyük % farklılaşma miktarının tespitinin anlamlı olduğu ortaya konmuştur.

Örnekleme yapılan bölgelerin kimyasal kirlilik analizi, çalışmamız kapsamında yapılmamıştır. *In vivo* kirliliğin DNA'da yaptığı kümülatif mutajenik tesir değerlendirilmeye ve rutin bir yöntem haline getirilmeye çalışılmıştır. Bunun için çalışmanın böyle bir değerlendirmeye bu aşamada ihtiyacı yoktur. Çünkü anlık, ya da belli dönemleri kapsayan böyle bir analizin sonuçları ile bizim genotoksik tesir sonuçlarımızı örtüştürmeye çalışmak verimli değerlendirmeler yapmamızı engelleyebilir. Sadece belli bazı kimyasal kirliliğin değerlendirmelerinin rutin olarak yapılabildiği günümüzde, DNA'daki olumsuz tesiri bu şekilde kontrollü gibi gözükken bir sınırlandırmaya tabi tutmak gerçek genotoksik etkiyi görebilmemizi engelleyecektir. Bu durum özellikle temiz bölge olarak değerlendirdiğimiz Saros Körfezi, Erikli örnekleri ile yaptığımız değerlendirmeler sonucu karşımıza çıkmaktadır. Büyük boy midyelerde deniz ne kadar temiz de olsa mutlaka ciddi bir DNA değişimi, mozaikleşmesi gözlemlenmektedir. Ancak temizliğin bir göstergesi DNA değişimi gözlemlenmeye başlayan midye boyunun kirli bölgelere göre daha büyük olmasıdır. Elimizdeki örnek grubu ve örnekleme yapılan istasyonlarla ilgili midye DNA'sında değişim tespit edilebilme boyutları şöyledir: Florya sahilinde 2.5 cm'lik midye DNA'sında değişim gözlenirken, Carrefour'dan ve Saros körfezinden temin edilen midyeler için bu boy 5.0 cm'ye çıkarken, Şile örnekleri için 2.9'a, Haliç örnekleri için 2.6 cm'ye, Fenerbahçe midyeleri için 2.1 cm'ye ve Unkapanı midyeleri için 1.1 cm'ye kadar düşmektedir. Marmara Denizi'nde

yapılmakta olan kirlilik takip çalışmaları ve (Petek, 1999)'un çalışmasında varılan mutajenisite sonuçlarıyla paralellik göstermektedir.

Somatik hücrelerde gerçekleşen DNA hasarı, genotoksik tesirlerin bir birikimi sonucu oluşmaktadır. Bunlardan bir kısmı DNA tamir mekanizmaları tarafından düzeltilbilirken büyük bir kısmı somatik mutasyonlar şeklinde sabitlenmektedirler. Ancak bu tip mutasyonlar bir takım önemli genlere mesela onkogenler, tümör baskılayıcı genler gibi kanser oluşturan veya çalışmadığında kanser oluşturan tip genlerde olduğunda, ya da yine hücre bölünmesinde rol oynayan sinyal iletimi sağlayan sistem genleri gibi canlının gelişim sürecinde etkili genlerde meydana geldiklerinde tespit edilebilmeleri canlının normal fizyolojisindeki farklılık tespit edilebildiği için mümkün iken, doğrudan etkisini göremediğimiz bir çok mutasyon da DNA'da sabitlenmektedir. Tespit edilmesi daha zor ve etkileri hakkında daha spekülatif konuşabileceğimiz türden mutasyon ve DNA hasarını ise bu çalışmada ortaya koyduğumuz RAMD-PCR yaklaşımı kullanarak gösterebilmekteyiz. Yaklaşımımız, RAPD-PCR metodunun bazı durumlarda bir dezavantaj sayılan; en azından çalışılan hücrelerin %2-5'inde gerçekleşen değişiklikleri tespit edebilmesi özelliğini kullanmaktadır (Zwartjes, v.d., 2000). Mutasyonların zamanla ve hücre bölünmesinin süregelmesi ile yani canlının büyümesi ile sabitlenerek ve sayıca katlanarak tespit edilebilir hale gelmesi esasını değerlendirmektedir. DNA'nın hasara ve fizyolojik değişime bağlı mozaikleşmesini gösterebilmektedir. Bu özelliğini kullanarak bir bölgede yaşamakta olan çeşitli boydaki midyelerle (en küçük boy ve en büyük boy arasında çeşitli aralıklarla) örnekleme yapıldığında, midyelerde DNA mozaikliğinin tespiti başlanıldığı bir eşik boy olduğu, bu boyun da örneklemenin yapıldığı bölgenin genotoksinler tarafından ne kadar kirletildiğine bağlı olduğu ortaya çıkmaktadır. Yani, temiz bölge diye düşündüğümüz denizlerde yaşayan midyelerin de DNA'sı mozaikleşiyor, kirli olduğundan emin olduğumuz bölgelerdeki midyelerin DNA'sı da mozaikleşiyor, ancak mozaikleşmeyi tespit etmeye başlanan boyun büyük ya da daha küçük oluşuna göre bölgenin genotoksik kirlilik birikimini değerlendirebiliyor ve değişim daha büyük boylarda tespit edilebiliyorsa bölge daha temiz diyebiliyoruz. Yani çok kısa süreli, sadece 1 gün içerisinde yapıp bitirebilecek bir yöntem kullanarak uzun bir dönemde gerçekleşen genotoksik tesiri değerlendirebilmek mümkün olmaktadır. Bu şekilde rutin midye izlemelerde genotoksisite takibi için rahatlıkla uygulanabilecek ve su kalitesindeki değişimleri

takip edebilmeyi sağlayacak bir metod olabilecektir. Yine bir bölgede gerçekleşen akut bir kirlilik sonucunda bu yöntem çok küçük boy midyelerin DNA'sında da bir mozaikleşmeyi tespit edebilecek hassasiyettir. Midye yetiştiricilerinin rutin olarak çiftliklerinde kullanmaları gereken bir yöntem olarak değerlendirilebilir. Kirlilik takibinde ortama katılan kirleticilerin tespitinin tek tek yapılamadığı günümüzde, toplam genotoksik tesiri değerlendirebilmek için ucuz, kısa, kolay, güvenilir ve midye dışında başka canlılara da rahatlıkla uygulanabilecek bir yöntemdir.

Bu yaklaşım kullanılarak, deniz kirliliği, kirliliğin genotoksik tesiri, denizlerimizde midye biyoçeşitliliği, denizlerimizde midyenin genetik heterojenliği, çeşitli bilinen (özellikle midyelerde çalışılan) organ toksinlerinin genotoksik etkilerinin takibi, midye yetiştirme çiftliklerinin genotoksisite açısından biyotakibi gibi, değerlendirmeler yapılabilir.

Çıkan sonuçların istasyonlar bazında karşılaştırılması, midyelerde özellikle toplam kirlilik parametreleri açısından daha yoğun kirli bölgelerdeki örneklerdeki mutasyon hızının çok daha yüksek olduğu yani mozaikliğin çok daha yoğun gözlemlendiği daha temiz bölgelerde ise daha homojen, değişikliğe uğramamış bir DNA varlığıdır. Çalışma kapsamında çeşitli istasyonlardan farklı zamanlarda, farklı boyda midye örnekleri toplandığı için aynı anda bütün istasyonlar arası bir değerlendirme yapılmamış, istasyonlar kendi içlerinde değerlendirilmiştir.

In vivo toplam kirlilik, midyenin çeşitli dokularında birikmektedir. Bu birikim, midyeleri gıda olarak tüketen bir çok canlıyı başta insan olmak üzere olumsuz etkilemektedir. Aynı şekilde genotoksik kirlilik de midye DNA'sında mutasyonlar şeklinde birikmektedir. Bu birikim de midye, midye popülasyonu, yeni nesil midyeler, insan başta midye tüketen diğer canlılar açısından olumlu olmayacaktır. DNA'daki kirlilik tesirli değişimin diğer canlıları olumsuz etkileyeceği teorik olarak beklenmektedir. Ancak pratikte deneysel olarak bu tip olumsuz tesirlerin henüz ortaya konulamamış olması, biraz spekülatif yorumlar yapmayı beraberinde getirmektedir. DNA'daki değişimin neticeleri hakkında daha çok az şey bilinmektedir. Olumsuz olması muhtemel olan sonuçları zamanla netleşecektir. Bu çalışma ile tespitini yapabildiğimiz değişimin olumsuz sonuçlarını yaşamamak için, bu tip değişime sebep olan kirlilikleri tespit edip ortadan kaldırmak, ya da bu tip genotoksik kirliliğin yoğun olduğu ortamlardan uzak durmak gerekmektedir.

Çalışmamızla ortaya koyduğumuz, rutin kirlilik çalışmalarında canlıların DNA'sı üzerindeki genotoksik tesir, RAMD-PCR profil değişiklikleri vasıtası ile gösterilebilmektedir. Çalışmamızın en net şekilde ortaya koyduğu gerçek ise, kontrolsüz, *in vivo* deniz ortamının midye DNA'sını tespit edilebilir şekilde değiştirmesidir. Kirliliğin miktarına ve canlıların bu kirliliğe maruz kalma süresine bağlı olarak DNA'sındaki değişim az ya da çok olabilmektedir. Modelimizin DNA'sı değişiyorsa, bu kirliliğe maruz kalan insan da dahil diğer bütün canlıların DNA'sı değişecektir. Bu değişimin miktarı ve sonuçları her canlı için farklı olsa da, DNA'nın değiştiği gerçeği değişmeyecektir.



KAYNAKLAR

- ARTÜZ, M.İ. ve BAYKUT, F.(1986): Marmara Denizi'nin Hidrografisi ve Su Kirlenmesi Açısından Bilimsel Etüdü. Gür-Ay Matbaası, İstanbul. İstanbul Üniversitesi Çevre Sorunları Araştırma Merkezi Yayınları No:3.
- ADAMO, R.D., PELOSI, S., TROTTA, P. ve SANSONE, G. (1997): Bioaccumulation and Biomagnification of PAHs in Aquatic Organisms. *Marine Chemistry*, 56, 45-49.
- AKCHA, F., BURGEOT, T., VENIER, P. ve NARBONNE, J.F. (1999): Relationship Between Kinetics of Benzo[a]pyrene Bioaccumulation and DNA Binding in the Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 62, 455-462.
- AKCHA, F., IZUEL, C., VENIER, P., BUDZINSKI, H., BURGEOT, T. ve NARBONNE, J. (2000): Enzymatic Biomarker Measurement and Study of DNA Adduct Formation in Benzo[a]pyrene-Contaminated Mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 49, 269-287.
- ALBERTINI, R.J., ANDERSON, D., DOUGLAS, G.R., HAGMAR L., HEMMINKI, K., MERLO, F., NATARAJAN, A.T., NORPPA, H., SHUKER, D.E.G., TICE, R., WATERS, M.D. ve AITIO A. (2000): IPCS Guidelines for the Monitoring of Genotoxic Effects of Carcinogens in Humans. *Mutation Research*, 463, 111-172.
- ANDERSON, J.W., JONES, J.M., STEINERT, S., SANDERS, B., MEANS, J., MC MILLIN, D., VU, T. ve TUKEY, R. (1999): Correlation of CYP1A1 Induction, as Measured by the P450 RGS Biomarker Assay, with High Molecular Weight PAHs in Mussels Deployed at Various Sites in San Diego Bay in 1993 and 1995. *Marine Environmental Research*, 48, 389-405.
- ARI, Ş. (1999): DNA'nın PCR ile Çoğaltılması. In: TEMİZKAN, G. ve ARDA, N. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitapevleri, İ.Ü. Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi, Yayın no:1.
- ATIENZAR, F., CHILD, P., EVENDEN, A., JHA, A., SAVVA, D., WALKER, C. ve DEPLEDGE, M. (1998) Application of the arbitrarily primed polymerase chain reaction for the detection of DNA damage. *Marine Environ. Res.* 46, 331-335.
- ATIENZAR, F.A., CORDI, B., DONKIN, M.E., EVENDEN, A.J., JHA, A.N. ve DEPLEDGE, M.H. (2000): Comparison Of UV-Induced Genotoxicity Detected by Random Amplified Polymorphic DNA with Chlorophyll Fluorescence and Growth in a Marine Macroalgae, *Palmaria palmata*, *Aquatic Toxicology*, 50, 1-12.

ATIENZAR, F.A., CHEUNG, V.V., JHA, A.N. ve DEPLEDGE, M.H. (2001): Fitness Parameters and DNA Effects are Sensitive Indicators of Copper-induced Toxicity in *Daphnia magna*. *Toxicological Sciences*, 59, 241-250.

ATIENZAR, F.A., VENIER, P., JHA, A.N. ve DEPLEDGE, M.H. (2002a): Evaluation of the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Assay for the Detection of DNA Damage and Mutations. *Mutat. Res.*, 521, 151-163.

ATIENZAR, F.A., EVENDEN, A.J., JHA, A.N. ve DEPLEDGE, M.H. (2002b): Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Assay for the Detection of DNA Damage and Mutations: Possible Implications of Confounding Factors. *Biomarkers*, 7, 94-101.

ATIENZAR, F.A., BILLINGHURST, Z. ve DEPLEDGE, M.H. (2002c): 4-n-nonylphenol and 17-beta-estradiol may Induce Common DNA Effects in Developing Barnacle Larvae. *Environmental Pollution*, 120(3), 735-738.

BAHY, A.A. (2003): Detection of DNA Alteration in Abnormal Phenotype of Broiler Chicken Male by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *African Journal of Biotechnology*, 2, 153-156.

BARTFAI, R., EGEDI, S., YUE, G.H., KOVACS, B., URBANYI, B., TAMAS, G., HORVATH, L. ve ORBANA, L. (2003): Genetic Analysis of Two Common Carp Broodstocks by RAPD and Microsatellite Markers. *Aquaculture*, 219, 157-167.

BAUMARD, P., BUDZINSKY, H., GARRIGUES, P., SORBE, J.C., BURGEOT, T. ve BELLOCQ, J. (1998): Concentrations of PAHs in Various Marine Organisms in Relation to Those in Sediments and to Trophic Level. *Marine Pollution Bulletin*, 36, 951-960.

BAUMARD, P., BUDZINSKI, H., GARRIGUES, P., NARBONNE, J.F., BURGEOT, T., MICHEL, X. ve BELLOCQ, J. (1999): PAH Burden of Mussels (*Mytilus* sp.) in Different Marine Environments in Relation with Sediment PAH Contamination, and Bioavailability. *Marine Environmental Research*, 47, 415-439.

BAYNE, B.L., WIDDOWS, J. ve THOMPSON, R.J. (1976): Physiology: I. In: Bayne, B.L.(ed.). *Marine Mussels: Their Ecology and Physiology*. Cambridge University Press. 122-159.

BEARDMORE, J.A., MAIR, G.C. ve LEWIS, R.I. (1997): Biodiversity in Aquatic Systems in Relation to Aquaculture. *Aquaculture Research*, 28, 829-839.

BENECKE, M. (1998): Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Typing of Necrophageous Insects (diptera, coleoptera) in Criminal Forensic Studies: Validation and Use in Practice. *Forensic Science International*, 98, 157-168.

BENEDEN, V. ve REBECCA, J. (1997): Environmental Effects and Aquatic Organisms: Investigations of Molecular Mechanisms of Carcinogenesis. Environmental Health Perspectives Supplements, 105, 669-675.

BEŞİKTEPE, Ş.T., SUR, H.İ., ÖZSOY, E., LATİF, M.A., OĞUZ, T. ve ÜNLÜATA, Ü. (1994): The Circulation and Hydrography of the Marmara Sea. Prog. Oceanog., 34, 335-392.

BEYNON, C.M. ve SKIBINSKI, D.O.F. (1996): The Evolutionary Relationships Between Three Species of Mussel (*Mytilus*) Based on Anonymous DNA Polymorphisms. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 203, 1-10.

BINARK, N., GUVEN, K.C., GEZGIN, T. ve UNLU, S. (2000): Oil Pollution of Marine Algae. Bull. Environmental Contamination Toxicology, 64, 866-872.

BİLECİK, N. (1989): Midye ve Yetiştiriciliği, Yayın no: 2, Seri A, T.C. Tarım Orman ve Köyşleri Bakanlığı.

BOROWSKY, R.L. (2001): Estimating Nucleotide Diversity from Random Amplified Polymorphic DNA and Amplified Fragment Length Polymorphism Data. Mol Phylogenet Evol., 18, 143-148.

BRIAND, F. (2002): CIESM, Mediterranean Mussel Watch-Designing a regional program for detecting radionuclides and trace-contaminants. CIESM workshop series, no:15, 136 s., CIESM, 16 boulevard de Suisse, MC-98000, Monaco.

CAETANO-ANOLLES, G. (2001): Novel Strategies to Study the Role of Mutation and Nucleic Acid Structure in Evolution. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 67, 115-132.

CAMACHO, L., ALVES, M. V., BASTOS, J.C., FELZENSZWALB, I. ve BASTOS, V.L.F.C. (2000): Effects of Beta-naphthoflavone on the Levels of GST from Liver of Pacu, *Piractus mesopotamicus*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 64, 191-196.

CANESI, L., SCARPATO, A., BETTI, M., CIACCI, C., PRUZZO, C. ve GALLO, G. (2002): Bacterial Killing by *Mytilus* Hemocyte Monolayers as a Model for Investigating the Signaling Pathways Involved in Mussel Immune Defence. Marine Environmental Research, 54, 547-551.

CANESI, L., VIARENGO, A., LEONZIO, C., FILIPPELLI, M ve GALLO, G. (1999): Heavy Metals and Glutathione Metabolism in Mussel Tissues. Aquatic Toxicology, 46, 67-76.

CANOVA, S., DEGAN, P., PETERS, L.D., LIVINGSTON, D.R., VOLTAN, R., ve VENIER, P. (1998): Tissue Dose, DNA Adducts, Oxidative DNA Damage and CYP1A-

Immunopositive Proteins in Mussels Exposed to Waterborne Benzo[a]pyrene. *Mutation Research*, 399, 17-30.

CARDEN, J. ve ÖZBAL, H. (1976): Marmara Denizi Besin Zincirindeki Civanın Coğrafi Dağılımı ve İstanbul Pazarlarından Temin Edilen Balıkların İçerdikleri Civa Miktarı Üzerine Ön Rapor”, Boğaziçi Üniversitesi, Araştırma Merkezi Yayınları No. 902, İstanbul.

CHASE, M.E., JONES, S.H., HENNIGAR, P., SOWLES, J., HARDING, G.C.H., FREEMAN, K., WELLS, P.G., KRAHFORST, C., COOMBS, K., CRAWFORD, R., PEDERSON, J. ve TAYLOR, D. (2001): Gulfwatch: Monitoring Spatial and Temporal Patterns of Trace Metal and Organic Contaminants in the Gulf of Maine (1991-1997) with the Blue Mussel *Mytilus Edulis* L. *Marine Pollution Bulletin*, 42, 491-505.

CHEN, Z., REN, L., SHAO, Q., SHI, D. ve RU, B. (1999): Expression of Mammalian Metallothionein-1 Gene in Cyanobacteria to Enhance Heavy Metal Resistance. *Marine Pollution Bulletin*, 39, 155-158.

COMMONER, B., VITHAYATHIL, A.J. ve HENRY, J.I. (1974): Detection of Metabolic Carcinogens Intermediates in Urine of Carcinogen Fed Rats by Means of Bacterial Mutagenesis. *Nature*, 249, 850-852.

CONTE, C., MUTTI, I., PUGLISI, P., FERRARINI, A., REGINA, G., MAESTRI, E. ve MARMIROLI, N. (1998): DNA Fingerprinting Analysis by a PCR Based Method for Monitoring the Genotoxic Effects of Heavy Metals Pollution. *Chemosphere*, 37, 2739-2749.

DAGUIN, C. ve BORSA, P. (1999): Genetic Characterisation of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in North West Africa Using Nuclear DNA Markers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 235, 55-65.

DAMJANOVICH, S., MA'TYUS, L., DAMJANOVICH, L., BENE, L., JENEL, A., MATKO', J., GA'SPA'R, R. ve SZO, J. (2002): Does Mosaicism of the Plasma Membrane at Molecular and Higher Hierarchical Levels in Human Lymphocytes Carry Information on the Immediate History of Cells? *Immunology Letters*, 82, 93-99.

DAMOC (1971): “Master Plan and Feasibility Report for Water Supply and Sewerage for the İstanbul Region”, Vol 3, Prepared by DAMOC consortium for WHO, Los Angeles.

DARE, P.J. (1976): Settlement, growth and production of the mussel, *Mytilus edulis* L., in Morecambe Bay, England. *Fishery Investigations*, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Series II, 28 (1), 25s.

DEVITA, V.T., HELLMAN, S. ve ROSENBERG, S.A. (1997): 5th edition *Principles and Practice of Oncology*, Lippincott and Raven Yayınevi.

DOMOUHTSIDOU, G.P. ve DIMITRIADIS, V.K. (2000): Ultrastructural Localization of Heavy Metals (Hg, Ag, Pb, and Cu) in Gills and Digestive Gland of Mussels, *Mytilus galloprovincialis* (L.). Arch. Environ. Contam. Toxicol., 38, 472-478.

DONG, S., HWANG, H.M., HARRISON, C., HOLLOWAY, L., SHI, X. ve YU, H. (2000): UVA Light Induced DNA Cleavage by Selected Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Bull. Environ. Contam. Toxic., 64, 467-474.

DURSTON, W. E. ve AMES, B. N. (1974): A Simple Method for the Detection of Mutagens in Urine: Studies with the carcinogen 2-acetyl-amino fluorene, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 71, 737-741.

EDER, E. ve DEININGER, C. (2000): The Role of Alcohols as Solvents in the Genotoxicity Testing of Alpha, Beta-Unsaturated Ketones in the SOS Chromotest. Mutation Research, 470, 29-37.

FESTA, F., CRISTALDI, M., IERADI, L.A., MORENO, S. ve COZZIA, R. (2003): The Comet Assay for the Detection of DNA Damage in *Mus spretus* from Donana National Park. Environmental Research, 91, 54-61.

GARNIS, C., COE, B.P., ISHKANIAN, A., ZHANG, L., ROSIN, M.P. ve LAM, W.L. (2004): Novel Regions of Amplification on 8q Distinct from the MYC Locus and Frequently Altered in Oral Dysplasia and Cancer. Genes, Chromosomes & Cancer, 39, 93-98.

GICHNER, T., PTACEK, O., STAVREVA, D.A., WAGNER, E.D. ve PLEWA, M.J. (2000): A Comparison of DNA Repair Using the Comet Assay in Tobacco Seedlings After Exposure to Alkylating Agents or Ionizing Radiation. Mutation Research, 470, 1-9.

GOLD, L.S., MANLEY, N.B., SLONE, T.H. ve WARD, J.M. (2001): Compendium of Chemical Carcinogens by Target Organ: Results of Chronic Bioassays in Rats, Mice, Hamsters, Dogs, and Monkeys. Toxicologic Pathology, 29, 639-652.

GOLDBERG, E.D. ve BERTINE, K.K. (2000): Beyond the Mussel Watch: New Directions for Monitoring Marine Pollution. The Science of the Total Environment, 247, 165-174.

GOLLAPUDI, B.B. ve CHRISHNA, G. (2000): Practical Aspects of Mutagenicity Testing Strategy: an Industrial Perspective. Mutation Research, 455, 21-28.

GOTTLIEB, B., BEITEL, L.K. ve TRIFIRO, M.A. (2001): Somatic Mosaicism and Variable Expressivity. Trends in Genetics, 17(2), 79-82.

GUIEYSSE, B., WIKSTRÖM, P., FORSMAN, M. ve MATTLASSON, B. (2001): Biomonitoring of Continuous Microbial Community Adaptation Towards More Efficient Phenol-degradation in a Fed-batch Bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56, 780-787.

GUNGOR, N., TUĞRUL, B., TOPCUOĞLU, S. ve GUNGOR, E. (2001): Experimental Studies on the Biokinetics of 134 Cs and 241 Am in Mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Environmental International*, 27, 259-264.

HAHN, M.E. ve STEGEMAN, J.J. Molecular Biology and Biotechnology in Marine Toxicology, Opportunities for Environmental Applications of Marine Biotechnology, Proceedings of the October 5-6 1999, Workshop, Boards on Biology, Oceans Studies Board National Research Council, National Academy Press, Washington DC, 112-125.

HARVEY, J.S. ve PARRY, J.M. (1998): The Analysis of DNA Adduct Formation, Removal and Persistence in the Common Mussel *Mytilus edulis* Exposed to 4-nitroquinoline1-oxide. *Mutation Research*, 399, 31-42.

HEMMINKI, K. ve KUMAR, R. (1996): Future Research Directions in the Use of Biomarkers. *Environmental Health Perspectives Supplements*, 104(3), 459-465.

HODGSON, E. ve LEVI, P.E. (1998): A Textbook of Modern Toxicology, Second edition, Appleton & Lange.

HOFNUNG, M. ve QUILLARDET, P. (1986): Recent developments in bacterial short-term for the detection of genotoxic agents., *Mutagenesis*, 1 (5), 319-330.

HOSANOĞLU, A. (1975): Boğaziçi Midyeleri (*Mytilus galloprovincialis* LAM.) Ekonomik Yönden Değerlendirme Çalışmaları. *Hidrobioloji*, Sayı 14, İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi Basımevi.

ILIOPOULOU-GEORGUDAKI, J., KANTZARIS, V., KATHARIOS, P., KASPIRIS, P., GEORGIADIS Th. ve MONTESANTOU, B. (2003): An Application of Different Bioindicators for Assessing Water Quality: a Case Study in the Rivers Alfeios and Pineios (Peloponnisos, Greece). *Ecological Indicators*, 2, 345-360.

INOUE, K., ODO, S., NODA, T., NAKAO, S., TAKEYAMA, S., YAMAHA, E., YAMAZAKI, F. ve HARAYAMA, S. (1997): A Possible Hybrid Zone in the *Mytilus edulis* Complex in Japan Revealed by PCR Markers. *Marine Biology*, 128, 91-95.

IVANOV, A.I. (1967): Karadeniz'in Kuzeybatı Kısımında Midye Stokları. *Balık Ekonomisi*, 10.

JAKŠIĆ, Ž. ve BATEL, R. (2003): DNA Integrity Determination in Marine Invertebrates by Fast Micromethod®. *Aquatic Toxicology*, 65, 361–376.

JENG, M.S., JENG, W.L., HUNG, T.C., YEH, C.Y., TSENG, R.J., MENG, P.J. ve HAN, B.C. (2000): Mussel Watch: a Review of Cu and Other Metals in Various Marine Organisms in Taiwan, 1991-98. *Environmental Pollution*, 110, 207-215.

JERNELOV, A. (2003): The International Mussel Watch: A Global Assessment of Environmental Levels of Chemical Contaminants. *The Science of the Total Environment*, 188, 37-44.

JOTWANI, G., MISRA, A., CHATTOPADHYAY, P., SARKAR, C., MAHAPATRA, A. K. ve SINHA, S. (2001): Genetic Heterogeneity and Alterations in Chromosome 9 Loci in a Localized Region of a Functional Pituitary Adenoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 125, 41–45.

KAAYA, A., NAJIMI, S., RIBERA, D., NARBONNE, J.F. ve MOUKRIM, A. (1999): Characterization of GST Activities in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* Used as a Biomarker of Pollution in the Agadir Marine Bay (South of Morocco). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 62, 623-629.

KAMALESHWAR, P.S. ve DEODUTTA, R. (2001): Identification of Novel Breast Tumor-specific Mutation(s) in the q11.2 Region of Chromosome 17 by RAPD/AP-PCR Fingerprinting. *Gene*, 269, 33-43.

KARAKOÇ, F.T. (1997): The Carcinogenic Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Fish DNA and Relation With Some Antioxidant Enzymes, PhD Thesis, METU.

KARAKOÇ, F.T., HEWER, A., PHILLIPS, D.H., GAINES, A.F. ve YUREGIR, G. (1997): Biomarkers of Marine Pollution Observed in Species of Mullet Living in Two Eastern Mediterranean Harbours. *Biomarkers*, 2, 303-309.

KARAKOÇ, F. T., TULI, A., HEWER, A., GAINES, A.F., PHILLIPS, D.H. ve UNSAL, M. (1998): Adduct distributions in Piscine DNA: South-eastern Black Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 36(9), 696-704.

KARAYÜCEL, S. ve KARAYÜCEL, I. (1998): Genetic and Morphologic Variations in Cultivated Blue Mussels in Two Scottish Sea Lochs. *Turkish Journal of Marine Sciences*, 4, 131-144.

KAREKAR, V., JOSHI, S. ve SHINDE, S.L. (2000): Antimutagenic Profile of Three Antioxidants in the AMES Assay and the Drosophila Wing Spot Test. *Mutation Resesarch*, 468, 183-194.

KHESSIBA, A., HOARAU, P., GNASSIA-BARELLI, M., AISSA, P. ve ROMEO, M. (2001): Biochemical Response of the Mussel *Mytilus galloprovincialis* from Bizerta (Tunisia) to Chemical Pollutant Exposure. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 40, 222-229.

KIER, L. D. (1985): Use of the AMES Test in Toxicology. Regul. Toxicol. Pharmacol., 5, 59-64.

KLAASSEN, C.D. (2001): Casarett & Doull's Toxicology-The Basic Science of Poisons, 6th Edition, McGraw-Hill.

KRAWETZ, S.A. ve WOMBLE, D.D. (2003): Introduction to Bioinformatics.: A Theoretical and Practical Approach, Humana Press, New Jersey, ISBN: 1-58829-064-6, 216-218.

LACK, G. (2002): Clinical Risk Assessment of GM Foods. Toxicol Lett., 127(1-3), 337-340.

LAFONTAINE, Y. de, GAGNE, F., BLAISE, C., COSTAN, G., GAGNON, P. ve CHAN, H.M. (2000): Biomarkers in Zebra Mussels (*Dreissena Polymorpha*) for the Assessment and Monitoring of Water Quality of the St Lawrence River (Canada). Aquatic Toxicology, 50, 51-71.

LEVIN, D.E., YAMASAKI, E. ve AMES, B. N. (1982): A New *Salmonella* Tester Strain for the Detection of Frame Shift Mutagens: A Run of Cytosines as a Mutational Hotspot. Mutation Research, 94, 315-330.

LLOYD-JONES, G. ve LAU, P.C.K. (1997): GST-Encoding Gene as a Potential Probe for Environmental Bacterial Isolates Capable of Degrading PAHs. Applied and Environmental Microbiology, 63, 3286-3290.

LÖK, A. (2001): İskele-Urla'da (İzmir Körfezi) Kültüre Alınan Farklı Boy Gruplarındaki Midyelerin (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) Büyüme Oranları. E.Ü. Su Ürünleri Dergisi E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences, 18(1-2), 141-147.

LUBET, P. E. (1959): Reserches sur le Cycle Sexuel et L'emission des Gametes Chez les Pectinides et les Mytilides. Rev. Trav. Ist. Pm, 23(4), 396-545.

LUCERI, C., DE FILIPPO, C., CADERNI, G., GAMBACCIANI, L., SALVADORI, M., GIANNINI, A. ve DOLARA, P. (2000): Detection of Somatic DNA Alterations in Azoxymethane-induced F344 Rat Colon Tumors by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. Carcinogenesis, 21, 1753-1756.

MA, X.L., COWLES, D.L. ve CARTER, R.L. (2000): Effect of Pollution on Genetic Diversity in the Bay Mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Acorn Barnacle *Balanus glandula*. Marine Environmental Research, 50, 559-563.

MARON, D. ve AMES, B. N. (1983): Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.*, 113, 173-215.

MARTEL, A.L., AUFFREY, L.M., ROBLES, C.D. ve HONDA, B.M. (2000): Identification of Settling and Early Postlarval Stages of Mussels (*Mytilus* spp.) from the Pacific Coast of North America, Using Prodissoconch Morphology and Genomic DNA. *Marine Biology*, 137, 811-818.

MEE, D.L. ve TOPPING, G. (1999): Black Sea pollution assessment, ISBN: 92-1-129506-8, United Nations Development Program, United Nations Publications, New York.

MICIC, M., BIHARI, N., LABURA, Z., MULLER, W.E.G. ve BATEL, R. (2001): Induction of Apoptosis in the Blue Mussel *Mytilus galloprovincialis* by tri-n-butyltin Chloride. *Aquatic Toxicology*, 55, 61-73.

MINTON, R.L ve MAYER, G.C. A Method for the Isolation of Total Genomic DNA from the Zebra Mussel, *Dreissena polymorpha*, Proceedings of the Fourth International Zebra Mussel Conference, Mart 1994, Madison, Wisconsin, 543-551.

MONIS, P.T.ve ANDREWS, R.H. (1998): Molecular Epidemiology: Assumptions and Limitations of Commonly Applied Methods. *International Journal of Parasitology*, 28, 981-987.

MOORE, M.N., LOWE, D.M., WEDDERBURN, R.J., WADE, T.L., BALASHOV, G., BUYUKGUNGOR, H., DAUROVA, Y., DENG, Y., KOSTYLEV, E., MIHNEA, P., MONCHEVA, S., TABAGARI, S., CIOCAN, C., OZHOC, H. ve DEPLEDGE, M.H. (1999): International Mussel Watch (UNESCO/IOC) in the Black Sea: a pilot study for biological effects and contaminant residues, *in*: Besiktepe, S. *et al.* (Ed.) (1999), Environmental degradation of the Black Sea: challenges and remedies. NATO ASI Series: Series B, Environmental security, 56, 273-289.

NADIG, S.G., LEE, K.L. ve ADAMS, S.M. (1998): Evaluating Alterations of Genetic Diversity in Sunfish Populations Exposed to Contaminants Using RAPD Assay. *Aquatic Toxicology*, 43, 163-178.

NEVO, E. (2001): Evolution of Genome-phenome Diversity under Environmental Stress. *PNAS*, 98(11), 6233-6240.

OKAY, O.S., TOLUN, L., TELLİ-KARAKOÇ, F., TÜFEKÇİ, V., TÜFEKÇİ, H. ve MORKOÇ, E. (2001): İzmit Bay (Turkey) Ecosystem After Marmara Earthquake and Subsequent Refinery Fire: the Long-term Data. *Marine Pollution Bulletin*, 42, 361-369.

ONG, T.M., SONG, B., QIAN, H.W., WU, Z.L. ve WHONG, W.Z. (1998): Detection of Genomic Instability in Lung Cancer Tissues by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Carcinogenesis*, 19, 233–235.

ÖZTÜRK, İ. (1994): Midyelerde (*Mytilus Galloprovincialis*, LAMARCK, 1819) Bakteriyel Kontaminasyon ve Bazı Ağır Metal (Cu, Pb, Zn) Biyoakümülyasyonu. Yüksek Lisans Tez, FBE-KTU.

PETEK, M., (1999): İstanbul Boğazı'ndaki Toplam Kirliliğin Canlılardaki Mutajenik Etkilerinin *Salmonella*/Mikrozom Test Sistemiyle Araştırılması, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Deniz Bilimleri ve İşletmeciliği Enstitüsü, Deniz Biyolojisi Anabilim Dalı.

PETERS, L.D., TELLİ-KARAKOC, F., HEWER, A ve PHILLIPS, DH. (2002): *In vitro* Mechanistic Differences in Benzo[a]pyrene-DNA Adduct Formation Using Fish Liver and Mussel Digestive Gland Microsomal Activating Systems. *Mar Environ Res.*, 54(3-5),499-503.

PICCARDO, M.T., CORADEGHINI, R. ve VALERIO, F. (2001): PAH Pollution in Native and Caged Mussels. *Marine Pollution Bulletin*, 42, 951-956.

POLLET, I. ve BENDELL-YOUNG, L.I. (1999): Uptake of ¹⁰⁹Cd from Natural Sediments by the Blue Mussel *Mytilus trossulus* in Relation to Sediment Nutritional and Geographical Composition. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 36, 288-294.

QUILLARDET, P. ve HOFNUNG, M. (1985): The SOS Chromotest, a Colorimetric Bacterial Assay for Genotoxins; Procedures. *Mutation Research*, 147, 65-78.

QUILLARDET, P. ve HOFNUNG, M. (1993):The SOS Choromotest: a Reiew. *Mutation Research*, 00, 1-45.

REGOLI, F. (2000): Total Oxyradical Scavenging Capacity (TOSC) in Polluted and Translocated Mussels: a Predictive Biomarker of Oxidative Stress. *Aquatic Toxicology*, 50, 351-361.

ROSS, K., COOPER, N., BIDWELL, J.R. ve ELDER, J. (2002): Genetic Diversity and Metal Tolerance of Two Marine Species: A Comparison Between Populations from Contaminated and Reference Sites. *Mar Pollut Bull.*, 44(7), 671-679.

SALAZAR, M.H. (1997): Applied Biomonitoring Critical Evaluation of Bivalve Molluscs As A Biomonitoring Tool for the Mining Industry in Canada in: Stewart & Malley, 1997. Technical Evaluation of Molluscs as a Biomonitoring Tool for the Canadian Mining Industry. CANMET - Aquatic Effects Technology Evaluation (AETE) Program, Project 2.3.1, Part II, 164-248.

SARASIN, A. (2003): An Overview of the Mechanisms of Mutagenesis and Carcinogenesis. *Mutation Research*, 544, 99–106.

SEED, R. ve SUCHANEK, T.H. (1992): Population and Community Ecology of *Mytilus*. In: *The Mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and Culture*. Gosling, E.(ed.). Elsevier, New York, pp. 87-157.

SILVA, E.P. ve RUSSO, C.A.M. (2000): Techniques and Statistical Data Analysis in Molecular Population Genetics. *Hydrobiologia*, 420, 119–135.

SONNENSCHNEIN, C. ve SOTO, A.M. (2000): Somatic Mutation Theory of Carcinogenesis: Why It Should Be Dropped and Replaced. *Molecular Carcinogenesis*, 29, 205-211.

SPONZA, D.T. (2003): Application of Toxicity Tests into Discharges of the Pulp-paper Industry in Turkey. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54 74–86.

STOELTING, M.S. ve TJEERDEMA, R.S. (2000): Glutathione-Dependent Biotransformation of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in Arterial and Venous Blood of the Striped Bass (*Morone saxatilis*). *Aquatic Toxicology*, 50, 177-187.

STRACHAN, T. ve READ, A.P. (1996): *Human molecular genetics*, ISBN: 1 872748 69 4, Bios Scientific Publishers, Oxford, U.K., 597s.

SUCHANEK, T.H., GELLER, J. B., KREISER, B.R. ve MITTON, J.B. (1997): Zoogeographic Distributions of the Sibling Species *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* (Bivalvia: Mytilidae) and Their Hybrids in the North Pacific. *Biol. Bull.*, 193, 187- 194.

SUGIURA, Y. (1962): Electrical Induction of Spawning in Two Marine Invertebrates (*Urechis unucintus* and hermaphroditic *Mytilus edulis*). *Biol. Bull. Woods Hole*, 123, 203-206.

SUR, H.İ., OKUŞ, E., GÜVEN, K.C., YÜKSEK, A., ALTIOK, H., KIRATLI, N., ÜNLÜ, S., TAŞ, S., YILMAZ, A.A., YILMAZ, N., ÖVEZ, S., MÜFTÜOĞLU, A.E., ÇETİNTÜRK, K., KARHAN, Ü., ÖZ, İ. ve DEMİREL, N. (2003): İ.B.B., İSKİ Genel Müdürlüğü, Su kalitesi İzleme Çalışması. İ.Ü. Deniz Bilimleri ve İşletmeciliği Enstitüsü, İstanbul.

THEODORAKIS, C.W., ELBL, T. ve SHUGAT, L.R. (1999): Genetic Ecotoxicology IV: Survival and DNA Strand Breakage is Dependent on Genotype in Radionuclide-Exposed Mosquitofish. *Aquatic Toxicology*, 45, 279-291.

TOPAL, A. (1999): Elektroforetik Yöntemler. In: TEMİZKAN, G. ve ARDA, N. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. Nobel Tıp Kitapevleri, İ.Ü. Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi, Yayın no:1.

ULUPINAR, M. ve OKUMUŞ, İ. (2002): Detection of Mutagenic Carcinogenic Pollutants in Aquatic Using Cytogenetic Methods in Fish. Turk J Zool, 26, 141-148.

USLU, O. (1990): Su Kirliliği ve Kontrolü Yönetmeliği. (Water Pollution Control Regulations). Su Kirliliği ve Kontrolü Dergisi, 1, 1, 7-14.

USLU, O. ve BENLİ, H.A. (1998): Ulusal Çevre Eylem Planı, Deniz Kaynaklarının Yönetimi ve Kirlilik Kontrolü. T.C. Başbakanlık Devlet Planlama Teşkilatı, Yayın ve Temsil Dairesi Başkanlığı, Yayın ve Basım Şube Müdürlüğü Ankara. ISBN 975-19-1946-0.

UYSAL, A., YUKSEK, A., OKUS, E. ve YILMAZ, N. (2002): Benthic Community Structure of the Bosphorus and Surrounding Area. Water Sci Technol, 46(8), 37-44.

UYSAL, H. (1970): Türkiye Sahillerinde Bulunan Midyeler "*Mytilus galloprovincialis* Lamarck" Üzerinde Biyolojik ve Ekolojik Araştırmalar. E.Ü. Fen Fak., İlimi Raporlar Serisi , No.79, 79p.

UZONUR, I., ABASIYANIK, M.F., BOSTANCI, B., EYIDEMİR, M., ÖÇBA, N., YANIK, C. ve PETEK, M. (2004a): Re-exploring Planaria as a Model Organism for Genotoxicity Monitoring by an "Improved Random Amplified Polymorphic DNA" Approach, FEB, (baskıda).

UZONUR, I., KILINC, D., ERIMEZ, H., MEMİK, S., OZSOY, F., ABASIYANIK, F. ve PETEK, M. (2004b): Hot Diet Caused DNA Damage in Buccal Mucosa as Detected by An Improved RAPD Assay, Poster 394, HGM 2004, 4-7 Nisan, Berlin, Almanya.

UZONUR, I., ABASIYANIK, M.F., ÇAM, S., ÇOBANLI, K., ELMAS, A., ERDOĞAN, H., HIZAL, Ş., KARABULUT, D.S., ÖZDEMİR, M., YEŞİL, F.A. ve PETEK, M. (2004c): A Preliminary Report on Target Organ Genotoxicity Biomonitoring by an "Improved Random Amplified Polymorphic DNA Assay", FEB, (baskıda).

VENITT, S., BORTSCH, I.T. ve BACKING, G. (1986): Short-term assays using bacteria. Iarch Scientific Publication, No:83. *International Agency for Research on Cancer.*, Lyon., 143-161.

VIDAL, M.L. ve NARBONNE, J.F. (2000): Characterization of Glutathione S-transferase activity in the Asiatic Clam *Corbicula fluminea*. Bull. Environ. Contam. Toxic., 64, 455-462.

VINCENT T. DEVITA, SAMUEL HELLMAN ve STEVEN A. ROSENBERG (1997): 5th edition Principles and Practice of Oncology, Lippincott and Raven Yayınevi.

VINEIS, P. (2003): Cancer as an Evolutionary Process at the Cell Level: an Epidemiological Perspective. Carcinogenesis, 24(1), 1-6.

WANG, Z. (2001): DNA-Damage Induced Mutagenesis: A Novel Target for Cancer Prevention. *Molecular Interventions*, 1(5), 269-281.

WATANABE, M.E. (2000): Is Pollution Causing Cancer in Beluga Whales? *The Scientist*, 14(19), 1-5.

WELSH, J. ve MCCLELLAND, M. (1990): Fingerprinting Genomes Using PCR with Arbitrary Primers. *Nucl. Acids Res.*, 18, 7213-7218.

WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. ve TINGEY, S.V. (1990): DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nucl. Acids Res.*, 18, 6531- 6535.

WOLF, H.D., BLUST, R. ve BACKELJAU, T. (2004a): The Use of RAPD in Ecotoxicology. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 566(3), 249-262.

WOLF, H.D., BLUST, R. ve BACKELJAU, T. (2004b): The Population Genetic Structure of *Littorina littorea* (Mollusca:4 Gastropoda) Along a Pollution Gradient in the Scheldt Estuary (The Netherlands) Using RAPD Analysis. *The Science of the Total Environment*, 325(1-3), 59-69.

YANG, Y.H, YAO, J., HU, S. ve QI, Y. (2000): Effects of Agricultural Chemicals on DNA Sequence Diversity of Soil Microbial Community: A Study with RAPD Marker. *Microbial Ecology*, 39, 72-79.

ZWARTJES, P.W. ve HNIDA, J.A. (2000): RAPD-PCR Amplification of DNA Extracted from Avian Blood Infected with *Haemoproteus* Fails to Produce False Positive Markers. *The Condor*, 102, 691-695.

İNTERNET ADRESLERİ

<http://www.turmepa.org.tr/>: Turkish Marine Environment Protection Association

<http://www.ices.dk/>: International Council for the Exploration of the Sea

<http://www.die.gov.tr/>: Devlet İstatistik Enstitüsü

<http://www.cevreorman.gov.tr/>: T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı

<http://www.taek.gov.tr/>: Türkiye Atom Enerjisi Kurumu

www.CIIT: What is Toxicogenomics

<http://www.epa.gov/region5/defs/html/tsca.htm>: U.S. Environmental Protection Agency, Toxic Substances Control Act

<http://www.iski.gov.tr/>: İstanbul Büyükşehir Belediyesi İstanbul Su ve Kanalizasyon İdaresi

<http://www.denizcilik.gov.tr/>: T.C. Başbakanlık Denizcilik Müsteşarlığı

<http://avery.rutgers.edu/WSSP/StudentScholars/project/archives/onions/rapd.html>: RAPD-PCR, Rutgers Üniversitesi ve Walksman Enstitüsü, Genes, Genomes and Human Genetics on-line ders

http://www.tarim.gov.tr/arayuz/9/icerik.asp?efl=uretim/su_urunleri/su_urunleri.htm&curdir=\uretim\su_urunleri&fl=midye/midye.htm: Midye biyolojisi ve yetiştirme Teknikleri, Aynur Lök

<http://www.upei.ca/~cai/>: Canadian Aquaculture Institute

<http://www.k12.nf.ca/kingacademy/musseldissection.htm>: Midye diseksiyonu

ÖZGEÇMİŞ

- Doğum tarihi : (06/08/1972)
- Doğum yeri : Londra
- Lise : (1983-1990), T.E.D. Ankara Koleji
- Lisans : (1990-1994), Boğaziçi Üniversitesi
- Yüksek Lisans : (1994-1998), Boğaziçi Üniversitesi
- Doktora : (1999-2005), İstanbul Üniversitesi
- Çalıştığı kurum (lar) : (1995-1998), Boğaziçi Üniversitesi
(1998-1999), Özel Fatih Fen Lisesi
(1999-2002), Fatih Üniversitesi
(2002-devam ediyor), Özel Fatih Fen Lisesi