



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Çinko Oksit (ZnO) Nanopartiküllerinin, Akdeniz Midyesi
(*Mytilus galloprovincialis* LAMARCK, 1819) Dokuları Üzerindeki
Histopatolojik Etkilerinin Araştırılması

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BERKAY GÜNEŞ

Tez Danışmanı

DOÇ. DR. MERT GÜRKAN

ÇANAKKALE – 2022



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Çinko Oksit (ZnO) Nanopartiküllerinin, Akdeniz Midyesi
(*Mytilus galloprovincialis* LAMARCK, 1819) Dokuları Üzerindeki
Histopatolojik Etkilerinin Araştırılması**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BERKAY GÜNEŞ

Tez Danışmanı

DOÇ. DR. MERT GÜRKAN

ÇANAKKALE – 2022

ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

Berkay GÜNEŞ

04/07/2022

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleŐtirilmesinde, çalıŐmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Doç. Dr. Mert GÜRKAN'a ve çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen hayatımın her evresinde bana destek olan değerli aileme sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

Berkay GÜNEŞ
anakkale, Temmuz 2022



ÖZET

Çinko Oksit (ZnO) Nanopartiküllerinin, Akdeniz Midyesi (*Mytilus galloprovincialis* LAMARCK, 1819) Dokuları Üzerindeki Histopatolojik Etkilerinin Araştırılması

Berkay GÜNEŞ

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Mert GÜRKAN

04/07/2022, 36

Nanopartiküller bir çok alanda kullanılmaları, özgünlükleri ve yüksek miktarda reaksiyon aktivitesi göstermeleri nedeniyle artan bir öneme sahiptir. Farklı faaliyetlerde kullanımı olan çinko oksit (ZnO) nanopartiküllerinin, özellikle sucul ekosistemler üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu bilinmektedir. *Mytilus galloprovincialis* (Kara midye veya Akdeniz midyesi) ülkemiz denizlerinde dağılışı gösteren ve insan tarafından besin olarak tüketilmesi sebebiyle ekonomik önemi olan bir türdür. Ayrıca biyoindikatör bir tür olan *M. galloprovincialis*, filtrasyonla beslenmesi nedeniyle birçok kirleticiyi bünyesinde biriktirmektedir. Bu çalışmada; midyeler ZnO nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonlarına (0; 0,01; 0,1 ve 1 mg/l) 96 saat süreyle maruz bırakılarak sonrasında oluşan toksik etkiler histopatolojik bulgular açısından değerlendirildi. ZnO nanopartiküllerine maruz bırakılan midyelerin histolojik incelemelerinde; solungaçlarda lipofuskin agregatları, genişlemiş merkezi toplardamar ve lamellar füzyon, mantoda hemosit infiltrasyonları, sindirim bezinde lipofuskin agregatları, hemosit infiltrasyonları ve hipertrofi tespit edildi. Sonuç olarak ZnO nanopartiküllerinin, Akdeniz midyeleri üzerinde olumsuz histopatolojik etkileri olduğu sonucuna ulaşıldı.

Anahtar Kelimeler: ZnO, Lipofuskin agregatları, Lamellar füzyon, Hemosit infiltrasyon, Toksik etki

ABSTRACT

Investigation of the Histopathological Effects of Zinc Oxide (ZnO) Nanoparticles on the Tissue of the Mediterranean Mussel (*Mytilus galloprovincialis* LAMARCK, 1819)

Berkay GÜNEŞ

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Master of Science Thesis in Department of Biology

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Mert GÜRKAN

04/07/2022, 36

Nanoparticles are increasing importance due to their use in many fields, their specificity and their high reaction activity. It is known that zinc oxide (ZnO) nanoparticles, which are used in different facilities, have negative effects especially on aquatic ecosystems. *Mytilus galloprovincialis* (Black mussel or Mediterranean mussel), is a species that is distributed in the seas of our country and has economic importance due to its consumption as food by humans. In addition, a bioindicator species *M. galloprovincialis* accumulates many pollutants due to its feeding by filtration. In this study, the toxic effects of mussels after exposure of ZnO nanoparticles at different concentrations (0, 0.01, 0.1, and 1 mg/L) for 96 hours were evaluated in terms of histopathological findings. Histological examinations of mussels exposed to ZnO nanoparticles revealed; lipofuscin aggregates, haemocyte infiltration, enlarged central vessel and lamellar fusion in the gills, haemocyte infiltration in the mantle, lipofuscin aggregates, haemocyte infiltration and hypertrophy in the digestive gland. As a result, it was concluded that ZnO nanoparticles had negative histopathological effects on Mediterranean mussels.

Keywords: ZnO, Lipofuscin aggregates, Lamellar fusion, Hemocyte infiltration, Toxic effect

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ETİK BEYAN	i
TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
BİRİNCİ BÖLÜM	
GİRİŞ	1
İKİNCİ BÖLÜM	
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	4
2.1. Akdeniz Midyesi	4
2.1.1. Akdeniz Midyesinin Morfolojisi	5
2.1.2. Akdeniz Midyesinin Biyolojisi	6
2.1.3. Akdeniz Midyesinde Beslenme	7
2.2. Nanopartiküller ve ZnO Nanopartikülü	7
2.3. Midyelerde, Metal Oksit Nanopartiküllerinin Toksik Etkileri Üzerine Bazı Histolojik Çalışmalar	8
ÜÇÜNCÜ BÖLÜM	
ARAŞTIRMA YÖNTEMİ/MATERYAL VE YÖNTEM	12
3.1. Materyal	12
3.1.1. Deney Hayvanı	12
3.1.2. ZnO Nanopartikülleri	12
3.2. Yöntem	12
3.2.1. Deney Düzenineğinin Kurulması	12
3.2.2. ZnO Nanopartiküllerinin Midyelere Uygulanması	13
3.2.3. Fizikokimyasal Ölçümler	14
3.2.4. Morfolojik Ölçümler	14
3.2.5. Histopatolojik İncelemeler	15
3.2.6. Histopatolojik Kondisyon İndeksi	16
3.2.7. İstatistiksel Analiz	17

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA BULGULARI	18
4.1. Histopatolojik Bulgular.....	18
4.1.1. Mantodaki Histopatolojik Bulgular	18
4.1.2. Solungaçtaki Histopatolojik Bulgular.....	20
4.1.3. Sindirim Bezindeki Histopatolojik Bulgular	22
4.2 Mortalite Değerleri ve Morfolojik Bulgular	24
4.3. Histopatolojik Kondisyon İndeks Bulguları	24
4.3. Tartışma	27

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER	29
KAYNAKÇA	31

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde oranı
‰	Binde oranı
°C	Santigrat derece
ZnO	Çinko Oksit
CuO	Bakır Oksit
Fe ₂ O ₃	Demir Oksit
TiO ₂	Titanyum Oksit
pH	Potansiyel hidrojen
l	Litre
µg	Mikrogram
ml	Mililitre
cm	Santimetre
mg	Miligram
mm	Milimetre
S	Siemens
LC ₅₀	Örneklerin yarısını öldüren maddenin konsantrasyon miktarı
H&E	Hematoksilen-Eozin
CAT	Katalaz aktivitesi
GTS	Glutatyon S-transferaz
AChE	Asetil-kolinesteraz aktivitesi
LPO	Lipid peroksidasyon

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge No	Çizelge Adı	Sayfa No
Çizelge 1.	Akdeniz midyesinin sistematikteki yeri (MolluscaBase, 2019).....	4
Çizelge 2.	Akdeniz midyelerine ZnO nanopartikülleri maruziyeti (96 saat) süresince tespit edilen mortalite sayıları	24
Çizelge 3.	Ortalama morfolojik ölçüm ve standart sapma değerleri (n=10).....	24
Çizelge 4.	96 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda ZnO nanopartiküllerine maruz kalmış <i>M. galloprovincialis</i> örneklerinin manto, solungaç ve sindirim bezindeki histopatolojik değişiklikler ve bu değişikliklerin önem ağırlıkları (w) (Costa vd., 2013; Pinto vd., 2019).....	25

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1.	<i>Mytilus galloprovincialis</i> 'in morfolojisi.....	5
Şekil 2.	Akdeniz midyesinin genel anatomisi.....	6
Şekil 3.	Akdeniz midyesinin beslenme şekli (Aquascope, 2000).....	7
Şekil 4.	a. Deney düzeneği genel görünüm. b. Deney düzeneği tek akvaryum görüntüsü.....	13
Şekil 5.	ZnO nanopartiküllerinin ultrasonik banyoda sonifikasyonu.....	13
Şekil 6.	Fizikokimyasal ölçümler.....	14
Şekil 7.	Morfolojik Ölçümler a. Midye örneklerinin en, boy ve yükseklik ölçümü b. Midyenin yaş ağırlık ölçümü.....	15
Şekil 8.	Midye disseksiyonu.....	16
Şekil 9.	96 saat boyunca ZnO nanopartiküllerine maruz kalan manto dokuları. a. Kontrol; b. 0,01 mg/l; c. 0,1 mg/l; d. 1mg/l (★: Hemosit infiltrasyonu), H&E.....	18
Şekil 10.	96 saat boyunca 0,1 mg/l ZnO nanopartiküllerine maruz kalan midyelerdeki manto dokusu (★: Hemosit infiltrasyonu), H&E.....	19
Şekil 11.	96 saat boyunca 1 mg/l ZnO nanopartiküllerine maruz kalan midyelerdeki manto dokusu (★: Hemosit infiltrasyonu), H&E.....	19
Şekil 12.	96 saat boyunca ZnO nanopartiküllerine maruz kalan solungaç dokuları. a. Kontrol; b. 0,01 mg/l; c. 0,1 mg/l; d. 1mg/l (★: Lipofuskin agregatları, →: Lamellar füzyon, ▲: Genişlemiş merkezi toplardamar), H&E.....	20
Şekil 13.	96 saat boyunca 0,1 mg/l ZnO nanopartiküllerine maruz kalan midyelerdeki solungaç dokusu (★: Lipofuskin agregatları), H&E.....	21
Şekil 14.	96 saat boyunca 1 mg/l ZnO nanopartiküllerine maruz kalan midyelerdeki solungaç dokusu (★: Lipofuskin agregatları), H&E.....	21
Şekil 15.	96 saat boyunca ZnO nanopartiküllerine maruz kalan sindirim bezi dokuları. a. Kontrol; b. 0,01 mg/l; c. 0,1 mg/l; d. 1mg/l (★: Hiperplazi, →: Hipertrofi, ▲: Lipofuskin agregatları, +: Hemosit infiltrasyonu), H&E.....	22
Şekil 16.	96 saat boyunca 0,1 mg/l ZnO nanopartiküllerine maruz kalan midyelerdeki sindirim bezi dokusu (★: Hiperplazi, →: Hipertrofi, ▲: Lipofuskin agregatları, +: Hemosit infiltrasyonu), H&E.....	23
Şekil 17.	96 saat boyunca 1 mg/l ZnO nanopartiküllerine maruz kalan midyelerdeki sindirim bezi dokusu (★: Hiperplazi, →: Hipertrofi, ▲: Lipofuskin agregatları, +: Hemosit infiltrasyonu), H&E.....	23
Şekil 18.	ZnO nanopartiküllerine 96 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (0; 0,01; 0,1; 1 mg/l) maruz kalmış <i>M. galloprovincialis</i> manto dokuları için histopatolojik kondisyon indeksi(lh). Sonuçlar ± standart sapmalıdır. uygulama grupları arasındaki önemli farklar ★ ile temsil edildi, p ≤ 0.05.....	25
Şekil 19.	ZnO nanopartiküllerine 96 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (0; 0,01; 0,1; 1 mg/l) maruz kalmış <i>M. galloprovincialis</i> solungaç dokuları için histopatolojik kondisyon indeksi(lh). Sonuçlar ± standart sapmalıdır. Uygulama grupları arasındaki önemli farklar ★ ile temsil edildi, p ≤ 0.05.....	26

Şekil 20. ZnO nanopartiküllerine 96 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (0; 0,01; 0,1; 1 mg/l) maruz kalmış *M. galloprovincialis* sindirim bezi dokuları için histopatolojik kondisyon indeksi(*lh*). Sonuçlar \pm standart sapmalıdır. Uygulama grupları arasındaki önemli farklar ★ ile temsil edildi, $p \leq 0.05$ 26



BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

Su, birçok canlının yaşam sürecinde hayatsal faaliyetlerini yerine getirmede olmazsa olmaz bir maddedir. Yaşamın oluşmasında çok büyük rol oynadığı gibi aynı zamanda kendisi bir yaşam ortamıdır.

Suyun yaşamsal faaliyetler için mutlaka olması gerekliliği suyun kalitesi ve içeriğini de önemli kılar. Su her ne kadar berrak ve temiz görünse de gözle görülemeyecek ve anlaşılamayacak birçok faktörden dolayı kalitesi ve temizliği istenen standartlarda olmayabilir. Suyun kalitesini olumsuz yönde etkileyecek bir çok kirletici vardır. Bu kirleticiler basit evsel atıklar olabileceği gibi fabrika, tarım veya yerleşim yerlerinin atıkları da suya karışarak kirletebilir. Sanayi ve teknolojik gelişmelerle hayatımıza giriş yapan bir çok yeni materyal vardır. Bunlardan birisi de nanopartiküllerdir.

Bilim felsefesiyle alakalı söyleşi esnasında konuşulan nanobilim/nanopartikül kavramı (Feyman, 1999), Nobel Fizik Ödülü sahibi Richard Feyman tarafından ilk kez 1959 yılında gündeme getirilmiştir. Bir çok teknolojinin hızla gelişmesiyle beraber nanoteknoloji de hızla gelişmiş ve bu teknolojinin ürünü olan nanopartiküllerin insan ve ekosistem için yararlı olabileceği gibi zararlı etkilerinin de olabileceği sorusu gündeme gelmiştir (Seaton vd., 2005). Üretilen ve kullanılan nanomalzemelerin; insan sağlığı, çevre ve doğa ile ilgili potansiyel olumsuz etkileri ortaya yeni konulmaya başlandığı için, nanoteknolojinin çevre ve insan sağlığı üzerindeki etkileri hakkındaki bilimiz henüz sınırlıdır (Chichiricco ve Poma, 2015; Dale, 2005; Srivastava vd., 2015).

Bugün nanoteknoloji ürünlerinin çevresel etkilerini açıklığa kavuşturmak amacıyla kapsamlı araştırmalar yapılmaktadır (Ebabe Elle vd., 2013; Garcia vd., 2011; Heydrnejad vd., 2015; Nations vd., 2011; Rinna vd., 2015; Soenen ve De Cuyper, 2009; Wang vd., 2009; Zhu vd., 2008). Farklı canlılar üzerinde yapılan araştırmaların bulguları ciddi anlamda farklılık göstermektedir. Nanoparçacıkların biyokimyasal ve toksikolojik etkilerini henüz tam olarak anlamak güçtür, çünkü gözlenen etkiler nanoparçacıkların cinsine, boyutuna, fiziko-kimyasal özelliklerine, çevreye ve organizma farklılığına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Nanoparçacıkların; fiziksel ve kimyasal özellikleri, sadece temel bileşime göre değil; aynı zamanda dış kaplamalarıyla, sentezleriyle ve çevresel koşullar (sıcaklık, pH, oksidasyon ve ışığa maruz kalma) ile de değişebilmektedir (Berg vd., 2009). Bununla beraber, organizmaların toksik maddelere toleransı ciddi

anlamda farklılık gösterdiğinden, bu durum toksikolojik etki değişikliklerinin büyük bir bölümünü açıklar vaziyettedir. Dolayısıyla, aynı nanoparçacıkların değişen organizmalar ve farklı ortamlardaki etkilerini belirlemek için doğru toksikolojik modelleri kullanmak gerekmektedir (Hoet vd., 2004).

Son yıllarda, metal oksit nanoparçacık üretiminin hızlı artışı ve bir çok alanda kullanımı bu parçacıkların çevreye kontrolsüzce salınımına neden olmaktadır. Metal oksit nanopartiküllerinden olan çinko oksit (ZnO) nanopartikülleri; bilişim, enerji, kozmetik ve sağlık endüstrisinde sıklıkla kullanılan bir malzemedir. Bu nanopartikülün olası denizel kontaminasyonu, özellikle sucul ekosistemlerde yaşayan canlılar için önemli derecede tehdit oluşturmaktadır.

Besin ağı düşünüldüğünde alt basamakta bulunan bivalv mollusklar filtrasyon ile beslenmelerinden dolayı, kirliliğe veya kirleticiye en çok maruz kalan omurgasız hayvan grubundadır. Bir çok sucul ortamda yaşayabilen bu canlılar farklı kirleticilerin etkilerinin tespit edilip değerlendirilmesinde çokça kullanılan ekolojik bir gruptur. Aktif olarak yer değiştirmeyen yani sesil olan midyeler, buldukları ortamdaki suyu filtre ederek beslenmelerinden dolayı birçok maddeyi dokularında biriktirebilmektedir. Sağlıklı ve ortalama boydaki bir akdeniz midyesi günde 20-40 litre arası suyu filtre edebilmesinden dolayı, indikatör bir canlı olarak kabul edilir ve biyolojik izleme çalışmalarında sıkça kullanılır (Örs 2008).

Filtrasyonla beslenmesi, çok fazla yer değiştirmemesi, ülkemizin denizlerinde geniş dağılım göstermesi, kolay örneklendirilebilir olması, insan tarafından besin olarak tüketilmesi nedeniyle ekonomik önemi olması ve teşhis etme sorununun nispeten daha az olması gibi özellikleri sayesinde, yaşadığı ortamdaki kirliliğin tespitinde de kullanılan *Mytilus galloprovincialis*, bilimsel çalışmalarda genellikle tercih edilen bir türdür (Aksoy vd., 1999).

Bu tezin amacı, bir çok alanda kullanımı olan nanopartiküllerden ZnO nanopartiküllerinin, *M. galloprovincialis* örneklerinin manto, solungaç ve sindirim bezi dokularında meydana getirdiği olumsuz etkileri histopatolojik açıdan tespit etmektir. Mevcut literatürde; ZnO nanopartiküllerinin midyelerde; hayatta kalma, büyümeye etki, sitotoksik ve genotoksik etkileri araştırılmış olsa da histopatolojik açıdan bir değerlendirmeye rastlanılmamıştır. Bu tezde; sucul ekosistemin önemli bir bileşeni olan, insan ve diğer denizel canlılar tarafından besin maddesi olarak tüketilen Akdeniz midyesi örneklerine, ZnO nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonlarına (0; 0,01; 0,1 ve 1 mg/l) 96

saat süreyle maruz bırakılmasının ardından oluşan toksik etkiler, histopatolojik bulgular bakımından değerlendirilmiştir. Elde edilen bulguların literatüre histolojik açıdan katkı sağlayacağı ve daha sonra yapılacak çalışmalar için ise yol gösterici olacağı düşünülmektedir.



İKİNCİ BÖLÜM

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

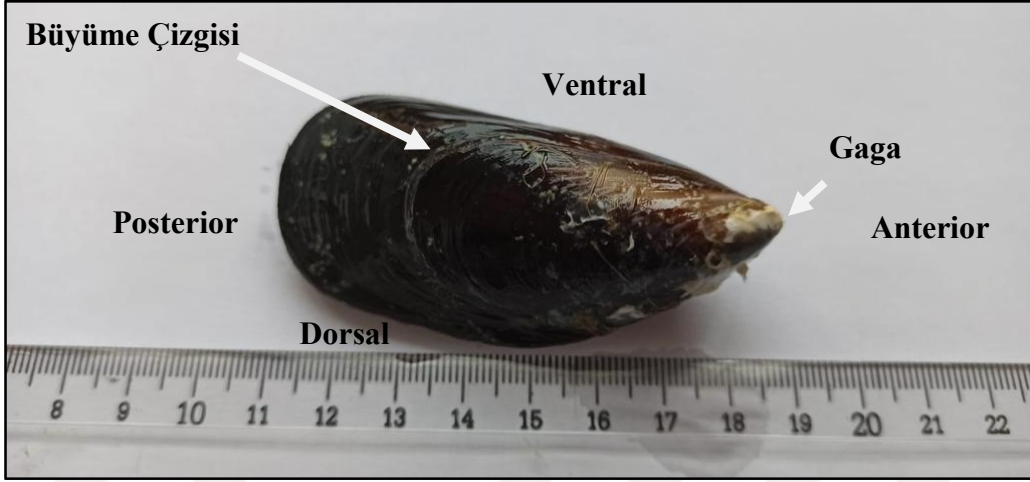
2.1. Akdeniz Midyesi

Ülkemiz denizlerinde; İzmir'den, Karadeniz'e kadar geniş bir yayılım gösteren *M. galloprovincialis*, Mytilidae familyasının önemli bir türü olmasının yanı sıra ekonomik olarak da göz ardı edilmemesi gereken bir türdür. Tuzluluk açısından ‰ 5-40 değer aralığında bir toleransa sahip olan midyeler yine aynı şekilde geniş bir sıcaklık değeri olan 2-30 °C toleransına sahiptir (Uysal, 1970). Türün bu kadar geniş bir tolerans aralığında yaşaması, araştırmacıların Akdeniz midyesini indikatör canlı olarak deneysel çalışmalarda kullanmasına imkan vermektedir (De Donno vd., 2008).

Çizelge 1. Akdeniz midyesinin sistematikteki yeri (MolluscaBase, 2019)

Alem	Animalia
Şube	Mollusca
Sınıf	Bivalvia
Alt sınıf	Pteriomorphia
Takım	Mytilida
Üst Aile	Mytiloidea
Aile	Mytilidae
Alt Aile	Mytilinae
Cins	<i>Mytilus</i>
Tür	<i>Mytilus galloprovincialis</i>

2.1.1. Akdeniz Midyesinin Morfolojisi

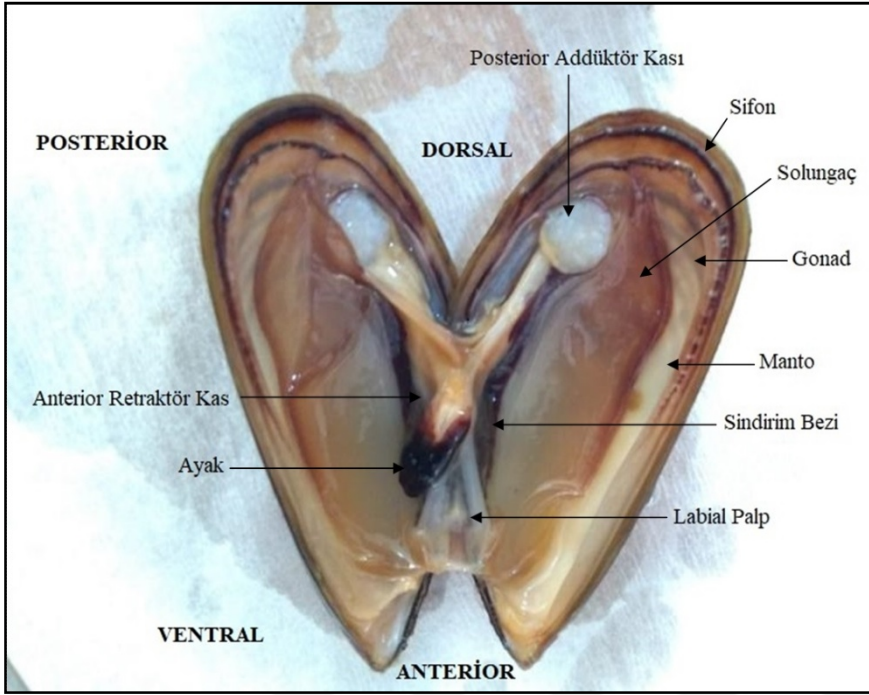


Şekil 1. *Mytilus galloprovincialis*'in morfolojisi

M. galloprovincialis'in kabukları iki eşit parça şeklindedir ve 4 anatomik bölge kolayca ayırt edilebilmektedir; ön (anterior), arka (posterior), iç (ventral) ve sırt (dorsal). Ön kenar kısadır, üçgene benzer ve kabuklar burada birbirlerine bağlanır. Kabukların üstünden, eliptik daireler şeklinde olan kenarlara doğru paralel yönlü yerleşim gösteren büyüme çizgileri bulunur (Şekil 1). Uygun olmayan ekolojik şartlar altında midyenin büyüme çizgilerinde aşağıya doğru çökme veya yukarıya doğru kabarma gözlemlenebilir (Uysal, 1970).

Kabuğun dışının rengi genel olarak siyah, siyaha çalan mavi, koyu mor ve kahverengi tonlarında olup, midyenin bulunduğu ortamın fizikokimyasal özellikleri ve derinlik koşullarına göre farklılık gösterebilir. Kabuğun içi ise genellikle çift renklidir. Ortada beyaza çalan sedef, dış kısma doğru gidildikçe lacivert renkler gözlemlenir. Midye, bissus iplikçığı sayesinde kendisini bir substrata sabitlemektedir. Bissus açıklığı, kabuğun ventralinde bulunur ve periostrakum kıvrımlarıyla örülüdür. Periostrakum kıvrımları, kabuklar kapalı olduğunda bissus iplikçikleriyle aralanan kısımdan su ve cisim girişini engellemiş olurlar (Uzunören, 1987).

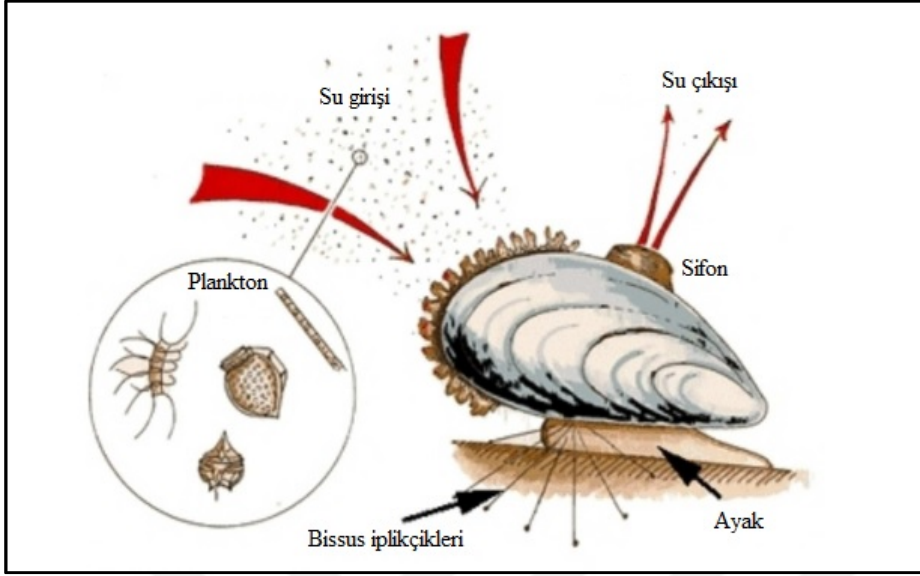
2.1.2. Akdeniz Midyesinin Biyolojisi



Şekil 2. Akdeniz midyesinin genel anatomisi

Kabukları bir arada tutan addüktör kası kesildiğinde ilk görülen kısım manto boşluğudur. Midyenin iç boşluğunda ise sıkı bir şekilde bağlanmış olan manto bulunur. Ayrıca midyenin iç boşluğunda, suyun hareketini sağlayan sifon vardır. Ligament boyunca ilerlendiğinde, ağız ve çift halde bulunan labial palpler mevcuttur. Labial palpler olukludur ve oluğun altında mide, üstünde ise koyu kahverengi olan ayak bulunur. Ayak ile bissus ipliklerinin çıktığı bissogen bezleri birbirine çok yakındır. Gonadlar kapak açıldığında solungaçların altında kalacak şekilde bulunan genelde beyaz veya benekli yapılardır (Şekil 2), (Gosling, 1992; Seed ve Suchanek, 1992 Uysal, 1970). Midyelerde bir çift bulunan solungaçlar, kitap yaprağı şeklindedir ve vücut duvarına bağlıdır. Suyun akışı hem manto hem de solungaçların iç yüzeyiyle sağlandığından dolayı manto epiteli de solunumda görevlidir. Posterior addüktör kasıyla solungaç arasında anüs, boşaltım ve üreme organları bulunur (Uysal, 1970; Gosling, 1992; Seed ve Suchanek, 1992).

2.1.3. Akdeniz Midyesinde Beslenme



Şekil 3. Akdeniz midyesinin beslenme şekli (Aquascope, 2000)

Çift kabuklularda beslenme, genelde iki şekilde gerçekleşir. İlk olarak suyla beraber vücuda giren besin parçaları (plankton vb.) su akımının yardımıyla midyenin ön tarafında çökme yapar ve depolanır. Depolama yaparak besinini sağlayan midyelerde, besin tanecikleri solungaçlar sayesinde labial palplere (ağız uzantıları) ulaşır ağıza geçer (Morse ve Zardus, 1997). Farklı bir beslenme şekli de; suda çözünmeden bulunan besin tanecikleri, solungaçların besin için kullanılan boşluklardan geçerek alınır ve solungaçlardaki mukus bezlerinden ortama salınan mukus sıvısıyla ilerleyerek ağıza ulaşır (Owen, 1966; Salman, 2004). Ağız açıklığına ulaşan besin tanecikleri, yemek borusuyla mideye ulaşır (Morse ve Zardus, 1997). Mideye ulaşan besin tanecikleri kristal çubuğun midedeki hareketiyle seçilir. Besin tanecikleri, hücre dışında enzimler kullanılarak sindirilir. Sillerin ortaya çıkardığı su akıntısıyla hücre dışı sindirimi tamamlanmış besin tanecikleri, önce primer sonra da sekonder kanallara ulaşır. Sekonder kanallar vasıtasıyla sindirim tübüllerine ulaşan besin tanecikleri, sindirimden sorumlu hücrelerce emilir ve besin taneciklerinin hücre içi sindirimi tamamlanır (Şekil 3), (Owen, 1955).

2.2. Nanopartiküller ve ZnO Nanopartikülü

Nanoteknoloji, boyutları 1-100 nm arasında farklılık gösterebilen ve birçok alanda kullanılmak üzere malzemelerin dizayn edildiği önemli endüstri faaliyetlerinden birisidir. Günümüzde nanoteknoloji alanındaki gelişmeler hızla artmaktadır. Nanoteknolojik

uygulamaların artış göstermesiyle, her geçen gün yeni keşfedilen nanomateryaller toplumun kullanımına sunulmaktadır (Hanks vd., 2015). Nanoteknoloji bilimi ne yazık ki bu malzemelerin toksikolojik özelliklerini düşünmeden veya bu konuda çok az bilgiyle nanomalzemelerin formülasyonu ve üretimi üzerine yoğunlaşmıştır (Roco, 2005).

ZnO nanopartiküllerin elektronik ve enstrümantal sanayide uygulamaları vardır. Kablosuz iletim teknolojisi, radyo, görüntü kaydı, gaz sensörleri, floresan lamba ve güneş pili elektrotlarında kullanılır. Ayrıca antibakteriyel ve sağlık koruma ürünlerinde, ayrıca kozmetikte güneşten koruyucu ajan olarak kullanılır. ZnO nanopartiküllerinin bu geniş ve yaygın kullanımından kaynaklı olası kontaminasyonlar, sucul canlıları hem büyüme parametreleri bakımından hem de sitotoksik ve genotoksik etkiler açısından tehdit etmektedir (Hanna vd., 2013; Li vd., 2018).

Nanopartiküller vücuda birçok yolla (oral, dermal, inhalasyon vb.) giriş yapabilirler. Nanopartiküllerin boyca küçük olmaları; dokuya, hücreye ve aynı zamanda biyomoleküler yapılara (DNA vb.) girmelerini kolaylaştırır. Giriş yaptıktan sonra karşılaştıkları ilk biyolojik yapı tarafından absorbe edilmeleri sonucu farklı organlara dağılımı gerçekleşebilir. Yüksek reaktivite gösteren nanopartiküller, girmiş oldukları hücre veya doku içerisinde modifiye olabilir veya sindirilebilirler. Canlı yapının nanopartiküllerden ne kadar etkileneceği nanopartiküllerin, toksisitesi ve reaksiyon aktivitesi gibi fizikokimyasal niteliklerine göre değişkenlik gösterebilmektedir (Fischer vd., 2007).

2.3. Midyelerde, Metal Oksit Nanopartiküllerinin Toksik Etkileri Üzerine Bazı Histolojik Çalışmalar

Kádár vd. (2009) yapmış oldukları çalışmada; *M. edulis* örneklerini, 1000 µg/l demir oksit (Fe₂O₃) nanopartikülleri ve 100 µg/l demir 3 klorüre (FeCl₃) 1 ve 12 saat süreyle maruz bırakmışlardır. Yaptıkları histolojik incelemelerde, yüksek dozda granül yapıları ve doku içine giren partiküller tespit etmişlerdir.

Hanna vd. (2013) yapmış oldukları çalışmada *M. galloprovincialis* örneklerini kullanmış ve 12 hafta boyunca, 0,1; 0,5; 1 ve 2 mg/l dozlarında ZnO nanopartikülleri (20-30 nm) maruziyetinin; midye büyüklüğü ve ZnO nanopartikülleri birikimi arasındaki ilişkisini incelemişlerdir. Küçük midyeler (<4,5 cm kabuk uzunluğu) 0,5 mg/l dozunda büyüklere (≥4,5 cm kabuk uzunluğu) göre 10 kat daha fazla birikim yaparken, büyük midyeler ise 2 mg/l dozunda küçüklere göre 4 kat daha fazla birikim yapmıştır. Her iki

büyüklik grubunda da 2 mg/l dozuna maruz kalan midyeler kontrol grubuna göre % 40 oranında daha az büyüme göstermiştir.

Hu vd. (2014) yapmış oldukları çalışmada; *M. edulis* örneklerine, 400; 700 ve 1000 ppb dozlarında bakır oksit (CuO) nanopartiküllerini maruz bırakmışlardır. Absorbe edilen CuO nanopartikülleri ağırlıklı olarak solungaçta ve bir kısmı ise sindirim bezinde tespit edilmiştir. Histolojik açıdan ise bu nanopartiküllerin genellikle mantoda ve solungaç kenarlarında artan dozlarda daha bariz biriktiğini belirlemişlerdir.

Gornati vd. (2016) yapmış oldukları çalışmada; *M. galloprovincialis* örneklerine, 24, 72 ve 96 saat süreyle 1; 5 ve 10 mg/l dozlarında titanyum dioksit (TiO₂) nanopartiküllerine maruz bırakmışlardır. Artan doz ve maruziyet süresinde, solungaçlarda hemosit infiltrasyonu, sil yapısında bozulma, filament incilmesi ve hiperplazi, sindirim bezinde ise hemosit infiltrasyonu ve vakuoller tespit etmişlerdir.

Jimeno-Romero vd. (2016) yapmış oldukları çalışmada; *M. galloprovincialis* örneklerini, gümüş (Ag) metali ve Ag nanopartiküllerine (0,75 µg/l) ayrı ayrı 21 gün süresince maruz bırakmışlardır. Histopatolojik açıdan incelendiğinde solungaç ve sindirim bezinde hemosit infiltrasyonları, vakuolizasyon, morfolojik anormaller (ödem, hiperplazi), nekroz, kahverengi hücre agregasyonu belirlemişlerdir.

Rosha vd. (2016) yapmış oldukları çalışmada; *M. galloprovincialis* örneklerini 14 gün boyunca hem kadmiyum (Cd) bazlı kuantum noktacıklarına hem de Cd metaline aynı konsantrasyonlarda (10 µg/l) maruz bırakmışlardır. Histolojik incelemeler sonucunda; sindirim tübülü epitelinde bazofilik hücreler, hemosit infiltrasyonları ve hücre parçalanmaları belirlemişlerdir.

Marisa vd. (2016) yapmış oldukları çalışmada; *Ruditapes philippinarum* örneklerini, 7 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda (0; 1; 10 µg/l) ZnO nanopartiküllerine ve 10 µg/l çinko klorür (ZnCl₂) metaline maruz bırakmışlardır. *R. philippinarum* istiridyesinde, oksidatif stres parametrelerini (CAT, GTS, SOD, AchE LPO vb.) incelemişlerdir. ZnO nanopartikülleri uygulanan örneklerde oksidatif stres göstergesi olarak; CAT ve SOD aktivitesinde artış, GTS aktivitesinde düşüş gözlemlenmiştir.

Bouallegui vd. (2017) yapmış oldukları çalışmada; *M. galloprovincialis* örneklerini, 3, 6 ve 12 saat süreyle Ag nanopartiküllerine (<50 nm ve <100 nm) maruz bırakmışlardır. Bu çalışmada, sindirim bezlerinde lipofuskin birikimleri, hemosit infiltrasyonları ve tubular

yapı içi hemosit infiltrasyon gözlemlemiştir. Artan maruziyet süresi ve nanopartiküllerin daha küçük boyutta olması gözlenen histopatolojik etkileri arttırmıştır.

Fahmy ve Sayed (2017) yapmış oldukları çalışmada, *Coelatura aegyptiaca* örneklerini, 6 gün süreyle farklı konsantrasyonlarda (0; 2; 10; 50 mg/l) ZnO nanopartiküllerine maruz bırakmışlardır. Maruziyetler neticesinde *C. aegyptiaca* bivalvinin; sitotoksisite, genotoksisite ve sindirim bezi ile solungaç histopatolojisini değerlendirmişlerdir. Sindirim bezinin glandüler hücrelerinde hipertrofi, hiperplazi, solungaçlarında ise sil kaybı, hiperplazi, lamellar füzyon ve nekroz gözlemlenmiştir.

Li vd. (2018) yapmış oldukları çalışmada; *M. galloprovincialis*'e ZnO nanopartiküllerini (<100 nm) ve ZnO metalini (150-200 nm) 4 hafta boyunca 0,01; 0,1; 1; 10 ve 100 mg/l dozlarında uygulamış ve 72 saatten sonra her iki grupta da ölümler gözlemlemiştir. Nanopartikül için LC₅₀ =0,78 mg/l olarak hesaplanmıştır. 28. günde nanopartiküllerin (<100 nm) ham haline göre (150-200 nm) 3 kat daha toksik olduğunu bulmuştur.

Duroudier vd. (2019) yapmış oldukları çalışmada; *M. galloprovincialis* örneklerini, 24 saat süreyle, 10 µg/l dozunda 5 nm boyutunda olan Ag nanopartiküllerine maruz bırakmışlardır. Bu çalışmada, solungaç ve sindirim bezinde Ag nanopartiküllerinin birikimi gözlemlenmiştir.

Abdel-Azeem vd. (2021) yapmış oldukları çalışmada; *Helix aspersa* örneklerini, 7 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda (0; 25; 35; 45 µg/l) ZnO nanopartiküllerine maruz bırakmışlardır. *H. aspersa* yumuşakçasının, oksidatif stres parametrelerini (CAT, GST aktivitesi vb.) ve sindirim bezi histopatolojisini incelemiştir. Sindirim bezi histopatolojisi incelendiğinde; vakuolizasyon, sindirim tübülü kaybı, lümen genişlemesi, nekroz ve hemosit infiltrasyonları gözlemlenmiştir.

Gürkan vd. (2021) yapmış olduğu çalışmada; *M. galloprovincialis* örneklerini, 96 saat boyunca 0; 5; 20 ve 40 mg/l dozlarında alüminyum oksit nanopartiküllerine kontrollü laboratuvar koşullarında maruz bırakmışlardır. Maruziyetler neticesinde; solungaçlarda lipofuskin agregasyonu, hemosit infiltrasyonu, merkezi hücrelerde genişleme, lamellar füzyonlar gibi histopatolojik bulgular tespit edilmiştir.

Wu vd. (2021) yapmış oldukları çalışmada; *M. edulis* örneklerini, 21 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda (0; 10; 100 mg/l) ZnO nanopartikülleri ve çözünmüş Zn metaline maruz bırakmışlardır. Maruziyetler, protein ve lipid seviyelerinde az fakat karbonhidratların önemli ölçüde azalmasına ve elektron taşıma sistemi (ETS) aktivitesinde

azalmaya neden olmuştur. Çalışma sonucunda ZnO nanopartiküllerinin çözünmüş çinkoya göre daha güçlü etkiler yaptığı belirlenmiştir.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA YÖNTEMİ/MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Deney Hayvanı

Çanakkale'nin Gelibolu ilçesinde faaliyet gösteren Gelibolu Su Ürünleri tesisinden temin edilen *M. galloprovincialis* örnekleri polietilen filelerle paketlenerek canlı halde Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü laboratuvarlarına getirilmiştir.

3.1.2. ZnO Nanopartikülleri

Çalışmada kullanılan ZnO (18 nm) nanopartikülleri, Nanografi (Ankara, Türkiye) firmasından temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Deney Düzenine Kurulması

Çalışmada kullanılan *M. galloprovincialis* örneklerinin (n=120), 7 gün boyunca fizikokimyasal parametreleri (çözünmüş oksijen 5,2-6,7 mg/l; pH 7,9-8,1; tuzluluk % 18,2-21,2; sıcaklık 18,2-19,2 °C; elektriksel iletkenlik 3,1-3,2 S/m) ölçülen, 12 farklı akvaryumda (50X50X40 cm) adaptasyonları sağlanmıştır. Adaptasyon sürecinde midyeler beslenmemiştir. Akvaryum başına 15 litrelik yapay deniz suyu hazırlamak için, litre başına 35 g ReeFlowers Caledonia Coral Salt marka hazır deniz tuzu ve saf su kullanılmıştır. Adaptasyon periyodu sonunda, her gruba 10'ar adet midye yerleştirilerek toplamda 120 midyeyle, 3 tekrarlı deneme düzeni oluşturulmuştur. (Şekil 4). Midyeler, adaptasyon ve maruziyetler süresince mevsimsel fotoperiyoda maruz bırakılmıştır. Akvaryum temizliği günlük olarak yapılmıştır. Temizlik sırasında dipteki dışkılar kepçeyle temizlenmiştir. Uygulamada midyeler, kontrol (0); 0,01; 0,1 ve 1 mg/l ZnO nanopartiküllerine 96 saat süreyle maruz bırakılmıştır.



Şekil 4. a. Deney düzeneği genel görünüm. b. Deney düzeneği tek akvaryum görüntüsü.

3.2.2. ZnO Nanopartiküllerinin Midyelere Uygulanması

Nanografi firmasından temin edilen 18nm ZnO nanopartikülleri maksimum nanoparçacık dağılımını sağlayabilmek için ultrasonik banyoda sonifikasyona tabi tutuldu (Wang vd., 2009) ve %10'luk (kütle/hacim) olacak şekilde deniz suyunda süspansiyon edildi (Şekil 5). Hazırlanan stok süspansiyon (1 g/l) çalışmada kullanılan 0,01; 0,1; 1 mg/l konsantrasyonlarda seyreltilerek otomatik pipet ile akvaryumlara eklendi ve midyelerin nanopartiküllere maruziyeti sağlandı.



Şekil 5. ZnO nanopartiküllerinin ultrasonik banyoda sonifikasyonu.

3.2.3. Fizikokimyasal Ölçümler

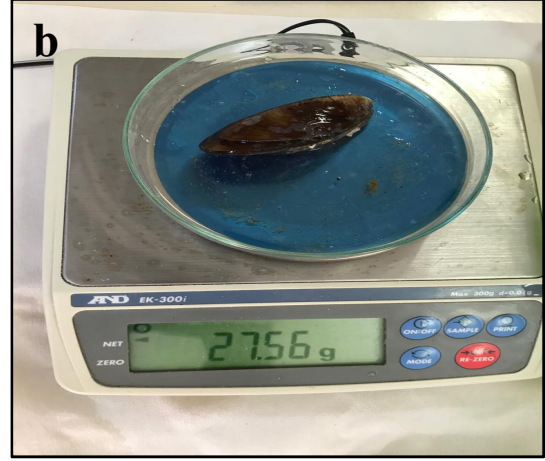
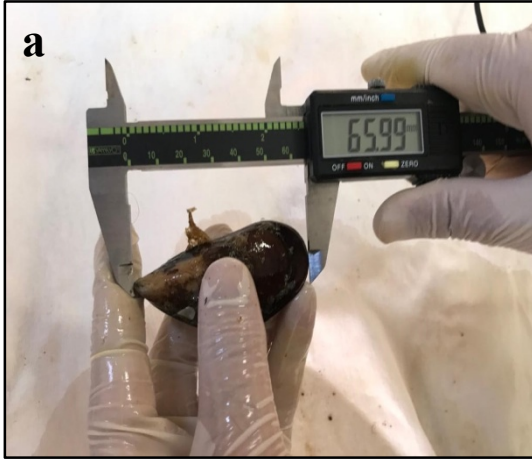
Maruziyetler boyunca su kalitesi parametreleri HANNA C200 ekolojik kit cihazı ile günlük olarak ölçüldü (Sekil 6). Bu ölçümlerde kullanılan parametreler ise: pH, çözünmüş oksijen, tuzluluk, sıcaklık ve elektriksel iletkenlik olarak seçildi.



Şekil 6. Fizikokimyasal ölçümler.

3.2.4. Morfolojik Ölçümler

ZnO nanopartikülleri uygulanan midye örneklerinin morfolojik ölçümleri dissekte edilmeden önce yapıldı. Midyelerin boy (mm), en (mm) ve yükseklik (mm) değerleri Mitutuyo marka dijital kumpasla, ıslak ağırlıkları (g) AND EK-300i marka hassas teraziyle ölçüldü (Şekil 7).



Şekil 7. Morfolojik Ölçümler a. Midye örneklerinin en, boy ve yükseklik ölçümü b. Midyenin ıslak ağırlık ölçümü.

3.2.5. Histopatolojik İncelemeler

18 nm boyutundaki ZnO nanopartiküllerine maruz kalan midyeler 96. saatin sonunda dissekte edildi (Şekil 8). Mantoları, solungaçları ve sindirim bezleri, Davidson's fiksatifine alındı. Fiksasyon 24 saat süreyle oda sıcaklığında tamamlandı ve dokular preperasyonun yapılacağı zamana kadar %70lik alkolde muhafaza edildi. Ardından, örnekler dehidre edilmek amacıyla aşamalı olarak artan konsantrasyondaki (%80-90-96-100) etanol serisinden geçirilerek dehidrasyon işlemi yapıldı. Şeffaflaştırma işleminin ardından parafin bloklara gömüldü. Bloklardan Leica marka mikrotom kullanılarak 5 µm kalınlıkta kesitler alındı ve bu kesitler Hematoksilen&Eosin ile boyandı (Wilson ve Gamble 2002). Histolojik bulgular detaylı biçimde incelendi ve DP2-BSW yazılımı kullanılarak dijital kamera ile donatılmış CX31 Olympus ışık mikroskobu kullanılarak fotoğraflandı.



Şekil 8. Midye disseksiyonu.

3.2.6. Histopatolojik Kondisyon İndeksi

Bernet vd. (1999) balık için, Costa vd. (2013) istiridye için ve Cuevas vd. (2015) midye için uyguladıkları yarı kantitatif histopatolojik durum indeksleri (l_h), modifiye edilerek; ZnO nanopartiküllerine maruz kalmış midyelerin manto, solungaç ve sindirim bezlerinde oluşan histopatolojik değişiklikler belirlendi. l_h , incelenen her değişikliğin; ağırlık ve yaygınlık derecesi kavramlarına göre tespit edildi. Ağırlık değeri 1 (minimum önem derecesi) ile 3 (maksimum önem derecesi) arasında, yaygınlık derecesi puan değeri ise 0 (yok) ile 6 (yaygın) arasında değişmektedir. Costa ve ark. (2013) yapmış oldukları çalışma referans alınarak l_h , aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$l_h = \frac{\sum_l^j w_j a_{jh}}{\sum_l^j M_j}$$

l_h , birey için histopatolojik durum indeksi değeridir. j : histopatolojik değişikliğin sayısı, w_j : j histopatolojik değişik sayısına bağlı olan h örnek sayısı, a_{jh} ve M_j , j değişkeninin maksimum alabileceği değerdir. Çizelge 3’de incelenen midyelerin dokularındaki histopatolojik değişiklikler ve önem ağırlıkları (w) sunulmuştur.

3.2.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS 21.0 programı kullanılarak yapıldı. Verilerin normalliği ve varyansların homojenliği sırasıyla Kolmogorov-Smirnov ve Levene testleri kullanılarak test edildi. Gruplar arasında, histopatolojik kondisyon indeksi değerlerinin farklılık gösterip göstermediği, Kruskal-Wallis testi kullanılarak karşılaştırıldı. Tüm istatistiksel analizler %95 güven aralığı kullanılarak yapıldı.



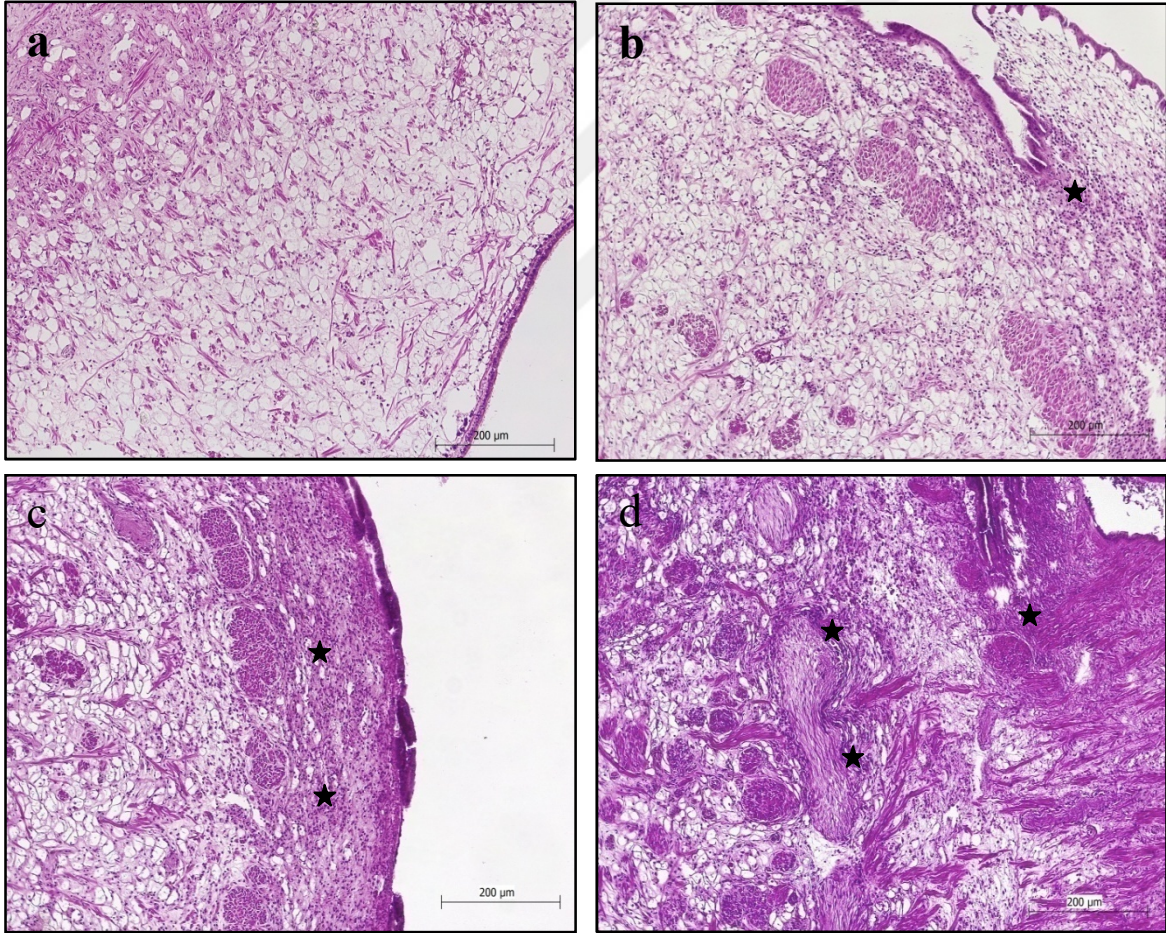
DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA BULGULARI

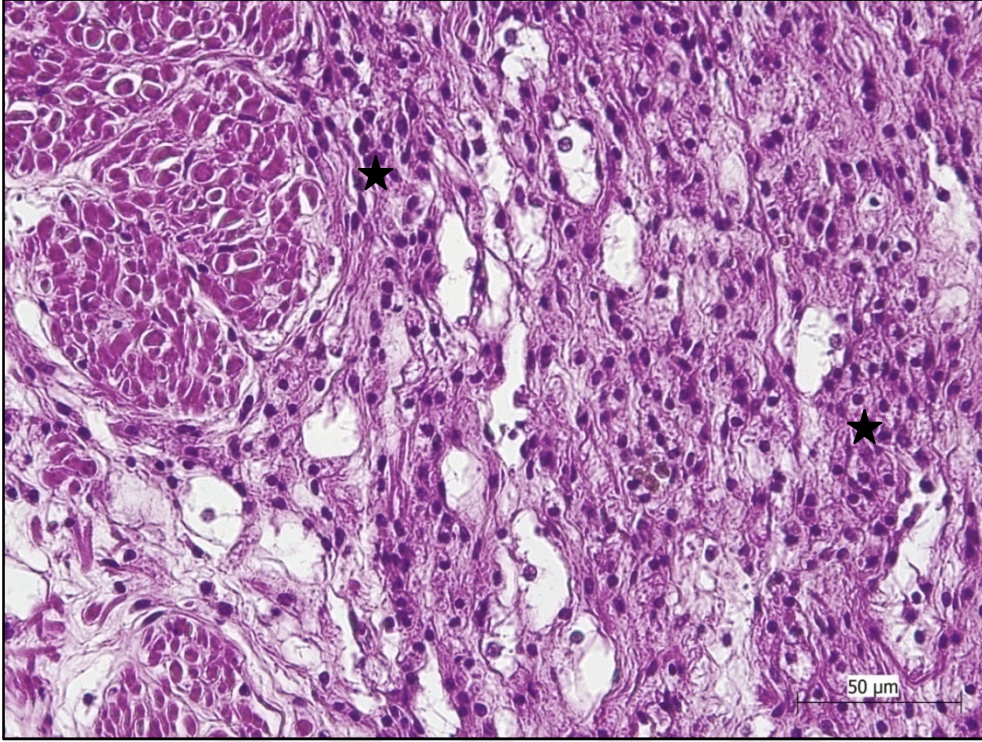
4.1. Histopatolojik Bulgular

4.1.1. Mantodaki Histopatolojik Bulgular

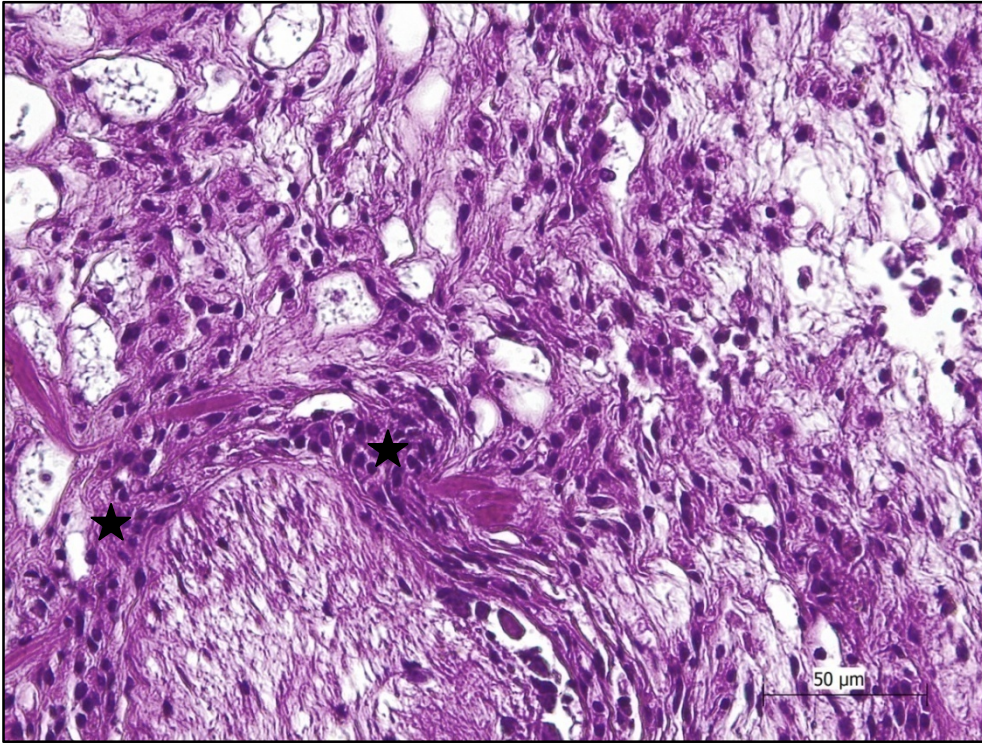
Kontrol grubu midyelerin mantolarının normal histolojik görünümde olduğu belirlendi (Şekil 9.a). ZnO nanopartiküllerinin uygulandığı grupların manto dokularında, hemosit infiltrasyonu tespit edildi (Şekil 9.b, Şekil 9.c, Şekil 9.d). ZnO nanopartiküllerinin artan dozlarında ise midye mantolarında hemosit infiltrasyonunda artışlar gözlemlendi (Şekil 10). Bu çalışmanın en yüksek dozu 1mg/l ZnO nanopartikülleri maruziyetinde tüm midyelerin manto dokularında yaygın hemosit infiltrasyonu gözlemlendi (Şekil 11).



Şekil 9. 96 saat boyunca ZnO nanopartiküllerine maruz kalan manto dokuları. a. Kontrol; b. 0,01 mg/l; c. 0,1 mg/l; d. 1mg/l (★: Hemosit infiltrasyonu), H&E.



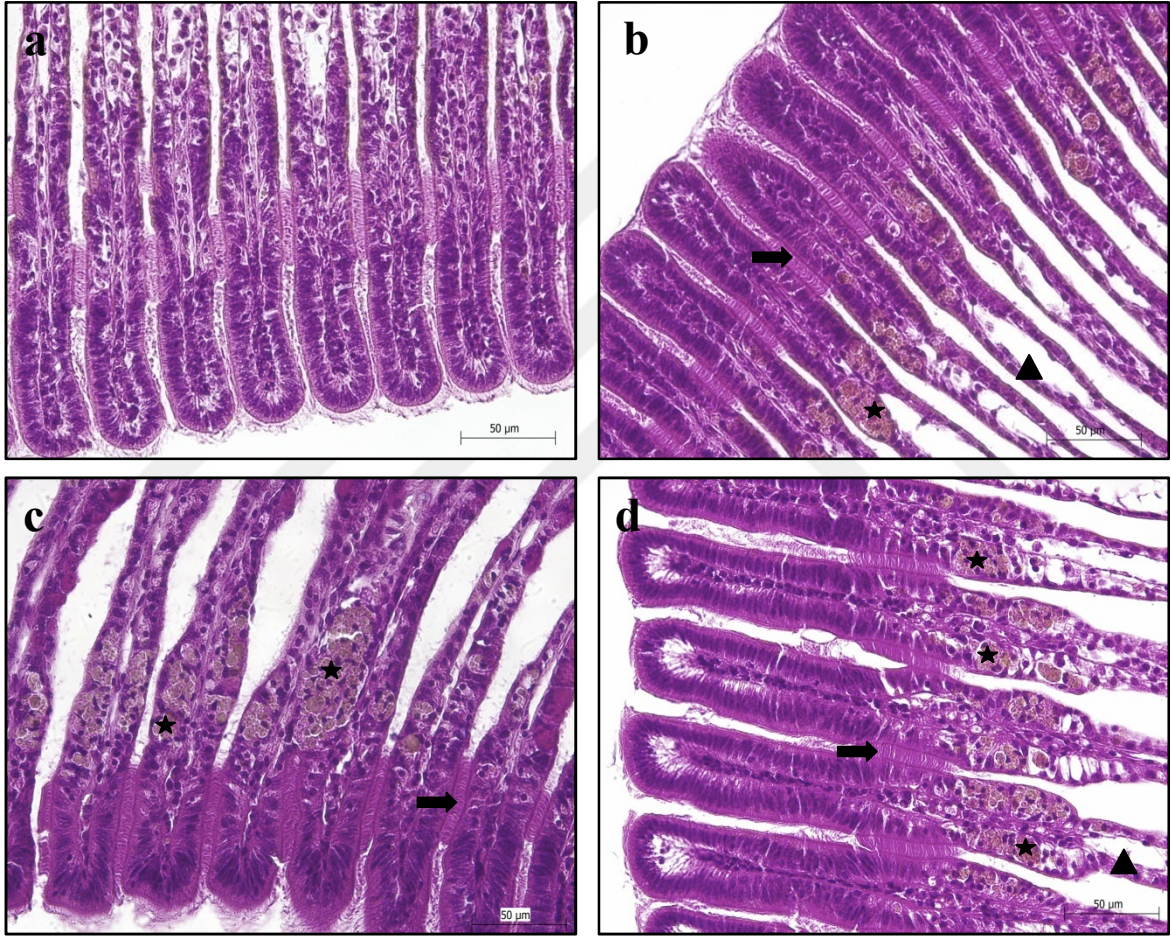
Şekil 10. 96 saat boyunca 0,1 mg/l ZnO nanopartiküllerine maruz kalan midyelerdeki manto dokusu (★: Hemosit infiltrasyonu), H&E.



Şekil 11. 96 saat boyunca 1 mg/l ZnO nanopartiküllerine maruz kalan midyelerdeki manto dokusu (★: Hemosit infiltrasyonu), H&E.

4.1.2. Solungaçtaki Histopatolojik Bulgular

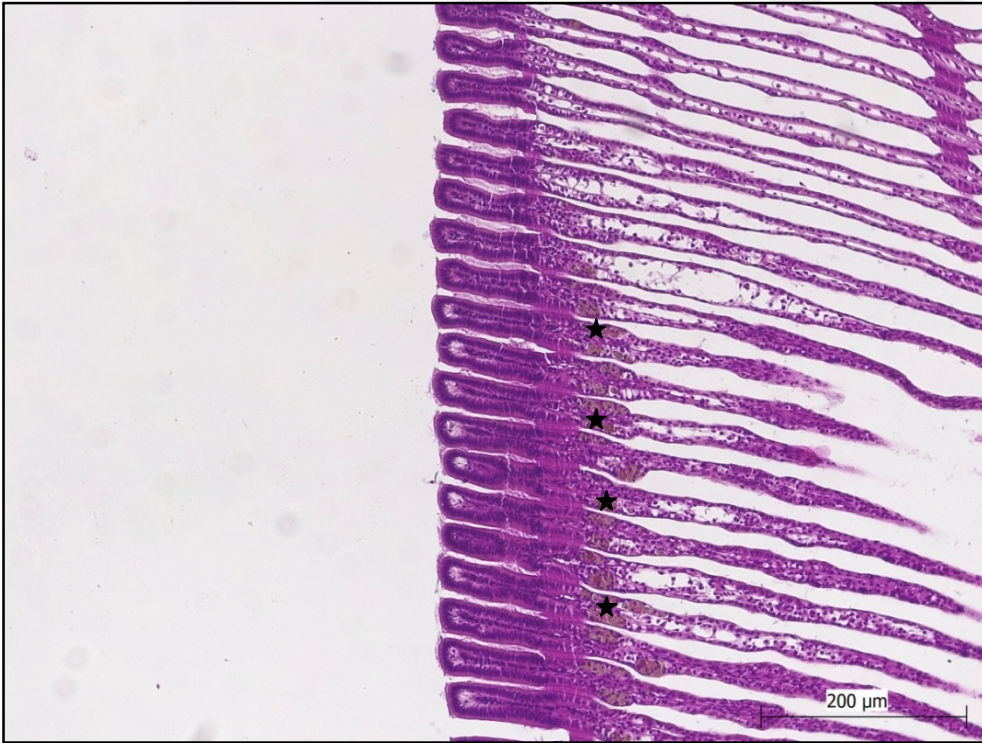
Kontrol grubu midyelerin solungaçları histolojik açıdan normal görünümündedir (Şekil 12.a). Kontrol grubu ile ZnO nanopartiküllerinin uygulandığı gruplar karşılaştırıldığında, solungaç dokusunda lipofuskin agregatları, lamellar füzyon, genişlemiş merkezi toplardamar bulguları gözlemlendi (Şekil 12.b, Şekil 12.c, Şekil 12.d). Orta doz maruziyetini takiben en yüksek doz maruziyetinde de lipofuskin agregatları oldukça yoğun ve yaygın bir biçimde gözlemlendi (Şekil 13 ve 14).



Şekil 12. 96 saat boyunca ZnO nanopartiküllerine maruz kalan solungaç dokuları. a. Kontrol; b. 0,01 mg/l; c. 0,1 mg/l; d. 1mg/l (★: Lipofuskin agregatları, →: Lamellar füzyon, ▲: Genişlemiş merkezi toplardamar), H&E.



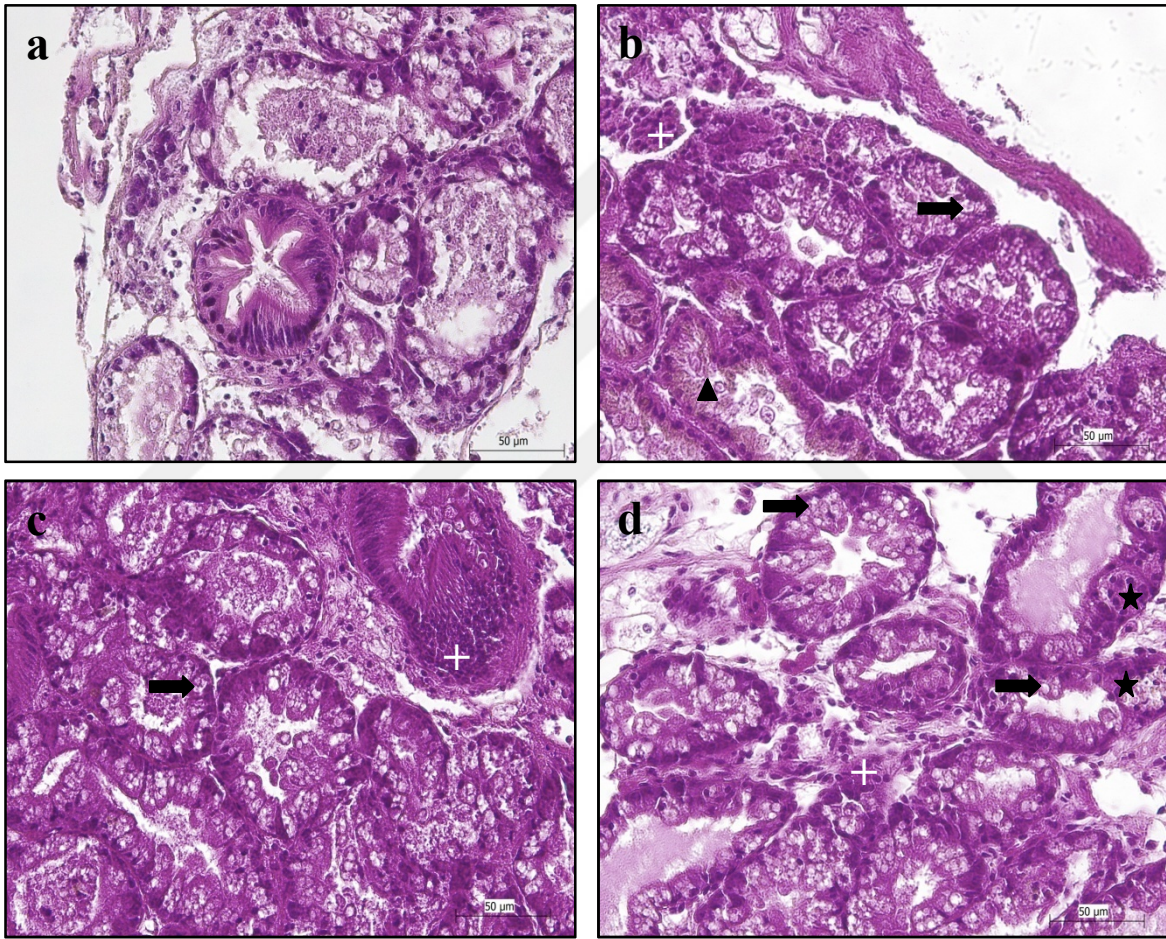
Şekil 13. 96 saat boyunca 0,1 mg/l ZnO nanopartiküllerine maruz kalan midyelerdeki solungaç dokusu (★:Lipofuskin agregatları), H&E.



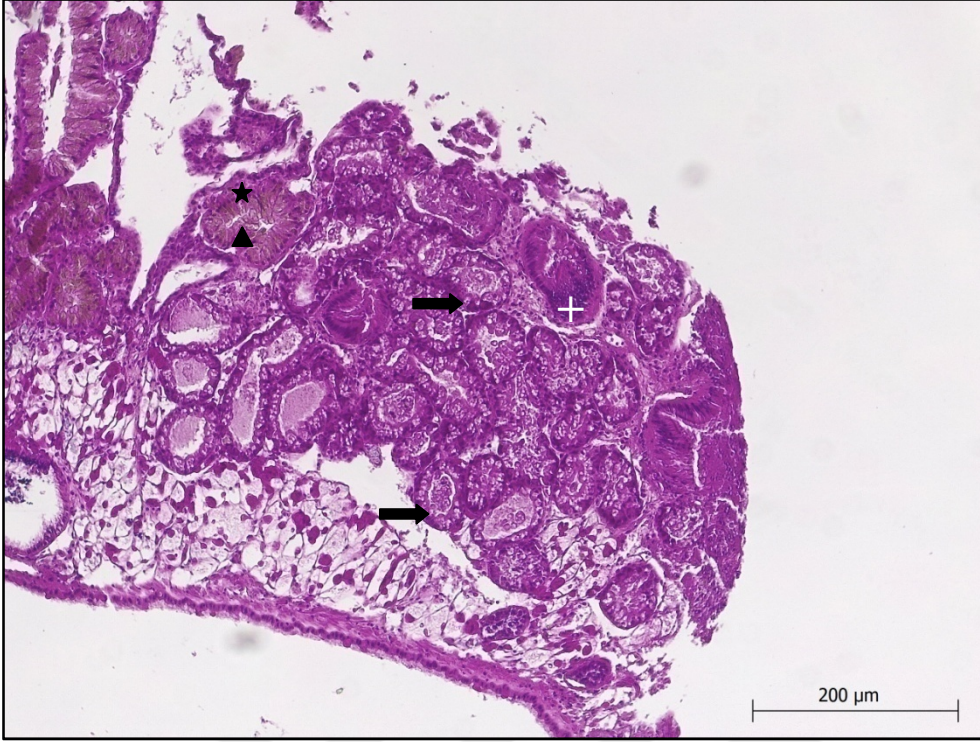
Şekil 14. 96 saat boyunca 1 mg/l ZnO nanopartiküllerine maruz kalan midyelerdeki solungaç dokusu (★:Lipofuskin agregatları), H&E.

4.1.3. Sindirim Bezindeki Histopatolojik Bulgular

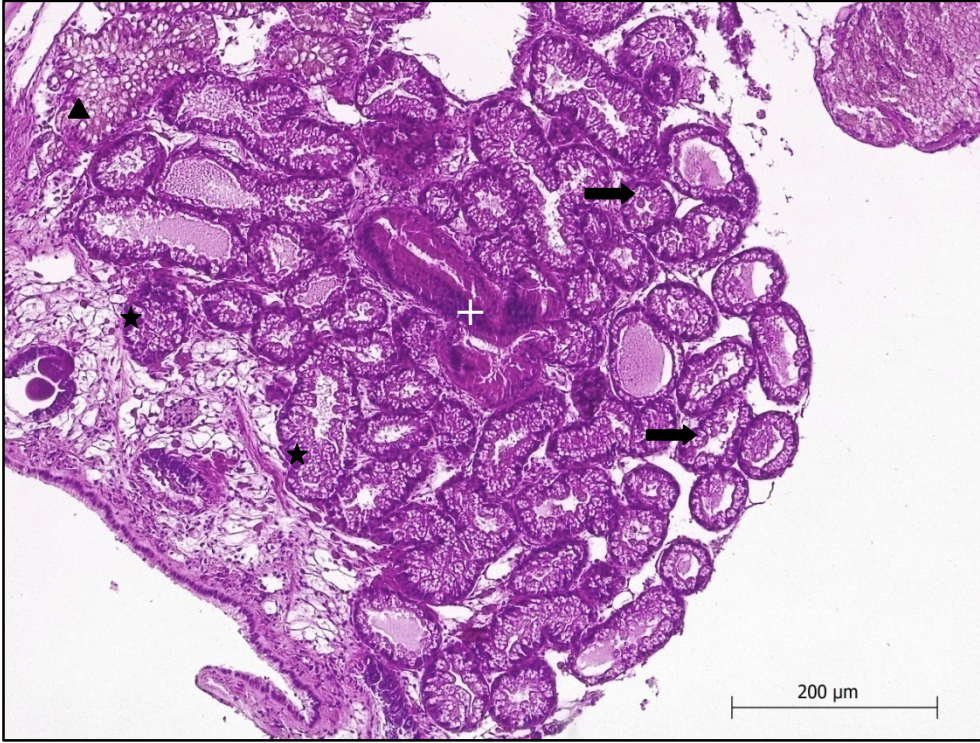
Kontrol grubu midyelerin sindirim bezleri histolojik açıdan normal görünümündedir (Şekil 15.a). Kontrol grubu ile ZnO nanopartiküllerinin uygulandığı gruplar karşılaştırıldığında, sindirim bezi dokularında hipertrofi, lipofuskin agregatları ve hemosit infiltrasyonu tespit edildi (Şekil 15.b, Şekil 15.c, Şekil 15.d). Söz konusu adaptif patolojik değişikliklerin 0,1 ve 1 mg/l ZnO uygulaması yapılan gruplarda daha yaygın olduğu gözlemlendi (Şekil 16 ve 17).



Şekil 15. 96 saat boyunca ZnO nanopartiküllerine maruz kalan sindirim bezi dokuları. a. Kontrol; b. 0,01 mg/l; c. 0,1 mg/l; d. 1mg/l (★: Hiperplazi, →: Hipertrofi, ▲: Lipofuskin agregatları, +: Hemosit infiltrasyonu), H&E.



Şekil 16. 96 saat boyunca 0,1 mg/l ZnO nanopartiküllerine maruz kalan midyelerdeki sindirim bezi dokusu (★: Hiperplazi, →: Hipertrofi, ▲: Lipofuskin agregatları, +: Hemosit infiltrasyonu), H&E.



Şekil 17. 96 saat boyunca 1 mg/l ZnO nanopartiküllerine maruz kalan midyelerdeki sindirim bezi dokusu (★: Hiperplazi, →: Hipertrofi, ▲: Lipofuskin agregatları, +: Hemosit infiltrasyonu), H&E.

4.2 Mortalite Değerleri ve Morfolojik Bulgular

ZnO nanopartikülleri maruziyeti süresince, kontrol ve uygulama gruplarında tespit edilen mortalite değerleri Çizelge 2' de sunuldu.

Çizelge 2. Akdeniz midyelerine ZnO nanopartikülleri maruziyeti (96 saat) süresince tespit edilen mortalite sayıları (n=10)

Uygulama Grubu	Süre (saat)			
	24	48	72	96
Kontrol (1)	0	0	0	0
Kontrol (2)	0	0	0	0
Kontrol (3)	0	0	0	0
0,01 mg/l ZnO Np (1)	0	0	0	0
0,01 mg/l ZnO Np (2)	0	0	0	0
0,01 mg/l ZnO Np (3)	0	0	0	0
0,1 mg/l ZnO Np (1)	0	0	0	0
0,1 mg/l ZnO Np (2)	0	1	0	0
0,1 mg/l ZnO Np (3)	0	0	0	0
1 mg/l ZnO Np (1)	1	0	1	0
1 mg/l ZnO Np (2)	0	0	1	0
1 mg/l ZnO Np (3)	0	1	0	0

ZnO nanopartikülleri maruziyetleri sonrasında midyelerin ıslak ağırlık (g), boy (mm), en (mm) ve yükseklik (mm) değerlerinin ortalamaları ve standart sapma değerleri Çizelge 3'te topluca sunuldu.

Çizelge 3. Ortalama morfolojik ölçüm ve standart sapma değerleri (n=10)

Uygulama Grupları (mg/l)	Morfolojik Özellikler			
	Islak Ağırlık (g)	Boy (mm)	En (mm)	Yükseklik (mm)
0	23,4±1,2	61,4±2,3	26,3±1,8	19,9±1,1
0,01	23,8±0,9	64,3±2,8	27,2±1,4	17,5±2,2
0,1	21,5±1,1	64,3±2,1	26,7±0,7	19,6±1,7
1	23,1±0,7	63,8±1,6	25±1,3	18,3±1,4

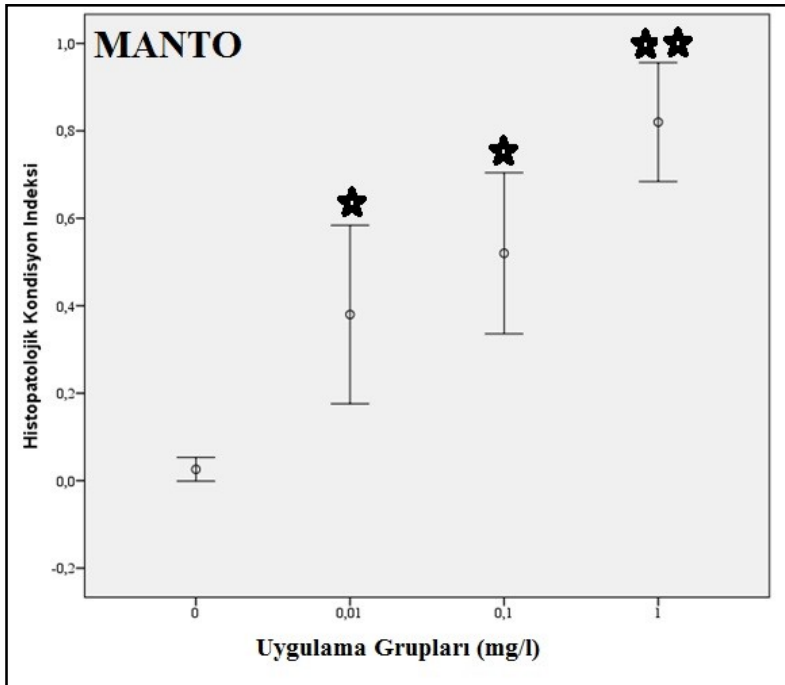
4.3. Histopatolojik Kondisyon İndeks Bulguları

Histopatolojik kondisyon indeksi hesaplanırken kullanılan histopatolojik değişimler ve önem ağırlıkları Çizelge 4'te topluca sunuldu.

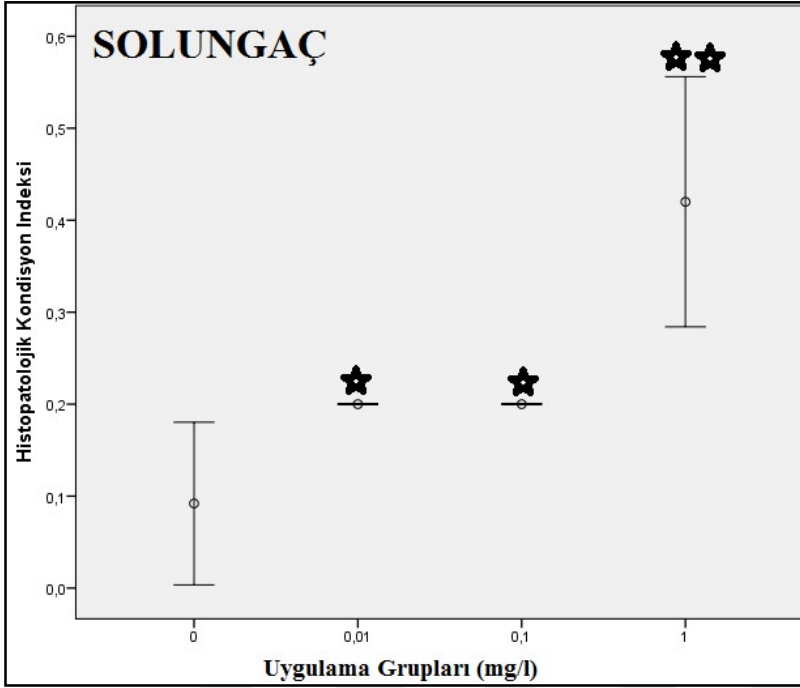
Çizelge 4. 96 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda ZnO nanopartiküllerine maruz kalmış *M. galloprovincialis* örneklerinin manto, solungaç ve sindirim bezindeki histopatolojik değişiklikler ve bu değişikliklerin önem ağırlıkları (*w*) (Costa vd., 2013; Pinto vd., 2019).

Doku	Histopatolojik değişim	<i>w</i>
Manto	Hemosit infiltrasyonu	3
Solungaçlar	Lipofuskin agregatları	3
	Genişlemiş merkezi toplardamar	2
	Lamellar füzyon	3
Sindirim bezi	Lipofuskin agregatları	3
	Hemosit infiltrasyonu	1
	Hiperplazi	3
	Hipertrofi	3

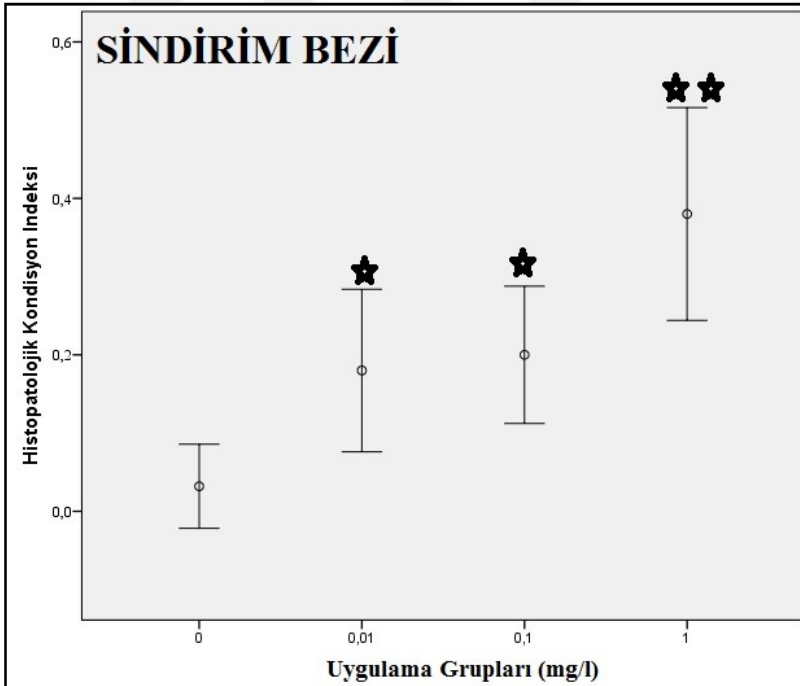
ZnO nanopartiküllerine, 96 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (0; 0,01; 0,1; 1 mg/l) maruz bırakılan *M. galloprovincialis* örneklerinin manto, solungaç ve sindirim bezi dokularında hesaplanan histopatolojik kondisyon indeks değerlerinin ortalamaları arasında farklar sırasıyla Şekil 18, Şekil 19 ve Şekil 20’de sunuldu.



Şekil 18. ZnO nanopartiküllerine 96 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (0; 0,01; 0,1; 1 mg/l) maruz kalmış *M. galloprovincialis* manto dokuları için histopatolojik kondisyon indeksi (I_h). Sonuçlar \pm standart sapmalıdır. Uygulama grupları arasındaki önemli farklar ★ ile temsil edildi, $p \leq 0.05$.



Şekil 19. ZnO nanopartiküllerine 96 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (0; 0,01; 0,1; 1 mg/l) maruz kalmış *M. galloprovincialis* solungaç dokuları için histopatolojik kondisyon indeksi (l_h). Sonuçlar \pm standart sapmalıdır. Uygulama grupları arasındaki önemli farklar ★ ile temsil edildi, $p \leq 0.05$.



Şekil 20. ZnO nanopartiküllerine 96 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (0; 0,01; 0,1; 1 mg/l) maruz kalmış *M. galloprovincialis* sindirim bezi dokuları için histopatolojik kondisyon indeksi (l_h). Sonuçlar \pm standart sapmalıdır. Uygulama grupları arasındaki önemli farklar ★ ile temsil edildi, $p \leq 0.05$.

4.3. Tartışma

Nanoteknoloji günlük hayatımıza son yıllarda dahil olmuş ve mevcut malzemenin fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirmek için sıklıkla kullanılan bir uygulama olmuştur. Bu değişiklikler, biyotıp, enerji, çevre ve elektronik gibi geniş bir yelpazede uygulanabilir olmasından dolayı fazlaca rağbet görmektedir (Tiede vd., 2009). Bu geniş uygulama alanı nedeniyle nano boyutlu malzemeler ister istemez çevresel kaynaklarla temasa geçmekte ve kontaminasyona sebep olabilmektedir. Çeşitli özelliklere sahip birçok kirlenici gibi, nanopartiküller de yer altı ve yüzey suyu sistemiyle karışabilmekte ve ekosistemi dolaylı ya da doğrudan etkileyebilmektedir. Bu kontaminasyondan dolayı nanopartiküller ortamdaki canlı organizmalara soluma, ağızdan alma, deri gibi çeşitli yollarla giriş yapabilirler. Nanopartiküllerin hücreye girme yolları incelendiğinde karşımıza dört farklı yol çıkar bunlar: fagositoz, pinositoz, endositoz ve hücre zarının yapı taşlarının bozunumuyla gerçekleşen maddenin direkt penetrasyonu yoluyla (Moore, 2006; Paur vd., 2011). Nanopartiküllerin hücrede genel olarak kullanılan protein ve bileşiklerle aynı boyutta olması ya da daha küçük olması, hücrenin sahip olduğu seçici geçirgen zar yapısından kolayca geçmesini sağlar. Hücre zarının seçici geçirgenliği birçok maddenin geçişinin kontrolü bakımından çok faydalı olsa da, nanopartiküllerin boyutları bakımından zaman zaman bu kontrol yapılamamaktadır. Bouallegui vd. (2017) yapmış oldukları çalışmada, nanopartiküllerin boyutlarının (50nm ve 100nm) histopatolojik açıdan ne gibi bir farklılık yapacağını araştırmış ve 50 nm olan Ag nanopartiküllerinin aynı maruziyet süresinde 100 nm Ag nanopartiküllerine göre daha fazla histopatolojik etkilere neden olduğunu belirlemişlerdir. Nanopartiküllerin bu boyutsal anlamdaki hücre içine girme avantajı canlı organizmada birikim yapabilmesine de neden olmaktadır. Hu vd. (2014) yapmış oldukları çalışmada, *Mytilus edulis* türüne çeşitli dozlarda CuO nanopartikülleri uygulamış ve midyedeki birikim seviyelerini belirlemişlerdir. Canlı organizma tarafından alınan CuO nanopartiküllerinin, çoğunluğu solungaçta ve bir kısmında sindirim bezinde biriktirildiği belirlenmiştir.

Çalışmamızda incelenen *M. galloprovincialis* örneklerinde manto ve sindirim bezi dokularında, mantoda; artan dozlarda yaygın gözlenen hemosit infiltrasyonları, sindirim bezinde ise yine yaygın gözlenen lipofuskin agregatları, hemosit infiltrasyon, hiperplazi ve hipertrofi gözlemlediklerini bildirmektedirler. Hemosit infiltrasyonundaki artış midyede immun sistemin tetiklendiğinin bir göstergesidir. Lipofuskin agregatları, çeşitli hücre tiplerinde bulunan “aşınma ve yıpranma” pigmentleridir. Stres faktörünün önemli bir

belirteçidir ve yaşa bağlı olarak artış gösterirler. Hiperplazi, bölge veya dokudaki hücre sayısındaki artışı ifade eder. Fiziksel veya kimyasal tahriş ya da aşırı hormonal stimülasyon sonucunda indüklenir. Hipertrofi, ek yapısal bileşenlerin sentezi nedeniyle bir hücrenin boyutundaki artıştır. Boyuttaki bu artış, doku veya organın boyutunu artırabilir. Hipertrofi genellikle artan iş yükü veya fiziksel veya kimyasal tahriş tarafından indüklenir (Mumford vd., 2007). Sindirim bezi midyenin beslenme, birikim, metabolizma, bağışıklık savunma sistemi, homeostaz ve detoksifikasyon için ana organıdır (Bouallegui vd. 2017). Sindirim tübülündeki histolojik değişiklikler, farklı maddelere maruz kalmada nekrozun başlangıç süreci olarak kabul edilir (Rocha vd. 2016). Sindirim tübülü bulguları, Hanna vd. (2013) yaptıkları çalışmayı destekler niteliktedir. Hanna vd. (2013)' e göre midyelerde özellikle 2 mg/l ZnO nanopartikülleri maruziyetinin büyümeyi olumsuz etkilediği bildirilmektedir. Çalışmamızdaki midyeler büyüme parametreleri bakımından incelenmemiş olsalar da, sindirim bezi epiteli deformasyonlarının olası kronik bir maruziyette büyüme performansını olumsuz etkileyeceğini düşündürmektedir. Marisa vd. (2016)' ya göre *R. philippinarum* örneklerine ZnO maruziyeti oksidatif stres parametrelerinde artışa neden olmaktadır. Çalışmamızdaki histopatolojik değişiklikler bu literatürü destekler niteliktedir. Diğer sonuçlar ise midyelerde farklı nanopartiküllere maruz bırakılmanın meydana getirdiği olası toksik etkilerinin ortaya koyulduğu önceki çalışmalarda histopatolojik bulgularla uyumludur (Bouallegui vd., 2017; Rocha vd., 2016; Ruiz vd., 2015).

Çalışmamızda incelenen *M. galloprovincialis* solungaç dokularında, lipofuskin agregatları, genişlemiş merkezi toplardamar ve lamellar füzyon gözlenmiştir. Gornati vd. (2016) yapmış oldukları çalışmada, *M. galloprovincialis* örneklerini farklı dozlarda TiO₂ nanopartiküllerine maruz bırakmışlardır. Artan doz ve maruziyet süresinde solungaçlarda; hemosit infiltrasyonu, sil yapısında bozulma, filament incilmesi ve hiperplazi gözlemlediklerini bildirmektedir. Midye solungaçları sürekli suyla temas halinde olduğundan, ortamda bulunan bir kirleticiyle de ilk temasa geçecek olan organdır. Bu nedenle solungaç dokusunda histopatolojik bulguların ve miktarlarının daha fazla gözlemlenmesi olasıdır. Midyenin solungaçlarında meydana gelen lamellar füzyon, canlı organizmanın kirletici kaynaklı gerçekleşecek tahribasyonu daha aza indirmek için yapmış olduğu defans mekanizmasıdır (Mallat, 1985). Çalışmamızdaki ZnO nanopartiküllerine bağlı gerçekleşen solungaçlardaki bu etkilerin diğer çalışmalarda benzer nedenlerle olduğu düşünülmektedir.

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

Su, yaşamın olmazsa olmazlarından ve aynı zamanda suyun içinde barındırdıkları da bir o kadar önemlidir. İlk bakışta çok temiz olduğu düşünülen suyun içerisinde kirletici olup olmadığını anlamak için farklı yöntemler kullanılır. Bu yöntemlerden en sık kullanılanı olan kimyasal analiz yöntemi, genel kirliliği tespit etmede başvurulacak geleneksel yöntemlerden birisidir. Kimyasal analiz yöntemi, ortamdaki kirletici etki gösteren maddeyi belirtmesine rağmen, canlı organizmada nasıl bir etki yaptığını ortaya koyamaz (Taylan ve Özkoç, 2007). Diğer maddelerin tespiti için kullanılan farklı yöntemlerin çoğu ise nanopartiküllerin tespitinde ne yazık ki olumlu sonuç veremeyebilir. Son dönemlerde yapılan çalışmalarda, bu sorunun üstesinden gelmek için bu tip kirletici maddeleri vücutlarında biriktirerek tespit edilmesini kolaylaştıran canlılar kullanılmaktadır. Bu canlılara “gösterge canlı” ya da “biyoindikatör” canlı denilir. Bu tip canlıları kullanarak gerçekleştirilen testler sayesinde, ortamdaki kirleticilerin tespiti ve kirleticinin konsantrasyonu gibi bilgiler elde edilebilir (Gadzala-Kopciuch vd., 2004). Bu sebepten dolayı *M. galloprovincialis* bivalvi deniz ortamında karşılaşılabilecek kirleticilerle ilgili çalışmalarda biyoindikatör canlı olmasından dolayı en doğru sonucu vereceği düşünüldüğünden tercih edilmiştir.

Canlılığın ilk oluşmaya başladığı dönemler öncesi ve sonrasında da gerçekleşen volkanik patlama gibi çeşitli elementlerin doğaya saçılımı esnasında doğal nanopartiküller oluşmuş ve farklı ekosistemlere dahil olmuştur. Söz konusu farklı ekosistemlere dahil olma süreci doğal ortamda çok uzun bir süreçte gerçekleştiğinden dolayı canlıların adapte olabilmesine olanak sağlamıştır. Fakat insan etkileri, endüstri ve teknolojinin gelişmesiyle doğaya salınan yapay nanopartiküller, canlıların adapte olmasına engel olacak bir hızla dağılım göstermektedir. Nanopartiküllerin kendine has olan özellikleri (yüksek reaksiyon) nedeniyle kirletici pozisyonuyla buldukları ortamlarda yaşayan canlıları tehdit etmektedir. ZnO nanopartikülleri geniş kullanım yelpazesıyla birçok alanda kullanılmaktadır. Bu durum biyoindikatör bir tür olan *M. galloprovincialis* ile birçok araştırmacı tarafından ZnO nanopartikülleri uygulanarak farklı etkileri gözlemlenmiştir. Fakat *M. galloprovincialis* örneklerinin ZnO nanopartiküllerine maruziyet sonucunda histolojik açıdan değerlendirildiği bir çalışmaya literatürde rastlanılamamıştır. Yapılan çalışmanın literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir. 96 saat boyunca ZnO

nanopartikülleri uygulanan çalışmada ortaya çıkan bulguların kirletici ortamdan uzaklaştırıldığında geri dönüşü olan hasarlar oluşturduğu belirlenmiştir. Kirleticinin ortamdan uzaklaştırılmadığı bir senaryoda ise, söz konusu hasarların kalıcı olacağı, nekrotik süreçlerin başlayacağı, hem çevrede hem de bu canlıyla beslenerek yaşayan türlerde olumsuz sonuçlar ortaya çıkacağı düşünülmektedir.



KAYNAKÇA

- Abdel-Azeem, H.H. and Osman, G.Y. (2021). Oxidative stress and histopathological effect of zinc oxide nanoparticles on the garden snail *Helix aspersa*. *Environ Sci Pollut Res* 28, 9913–9920. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11438-z>.
- Aksoy, A., Hale, W. H. and Dixon, J. M. (1999). *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medic. as a Biomonitor of Heavy Metals. *Science of the Total Environment*, 226(2-3), 177-186.
- Aquascope, 2000. Tjarno Marine Biological Laboratory, Stromstad, Sweden. [November 2005].
- Berg, J.M., Romoser, A., Banerjee, N., Zebda R. and Sayes, C.M. (2009). The relationship between pH and zeta potential of ~30 nm metal oxide nanoparticle suspensions relevant to *in vitro* toxicological evaluations. *Journal of Nanotoxicology* 3: 276-283.
- Bouallegui, Y., Ben Younes, R., Bellamine, H. and Oueslati, R. (2017). Histopathology and analyses of inflammation intensity in the gills of mussels exposed to silver nanoparticles: role of nanoparticle size, exposure time, and uptake pathways. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 27(8), 582–591. doi:10.1080/15376516.2017.1337258.
- Bouallegui, Y. Ben Younes, R., Bellamine, H. and Oueslati, R. (2018). Histopathological indices and inflammatory response in the digestive gland of the mussel *Mytilus galloprovincialis* as biomarker of immunotoxicity to silver nanoparticles. *Biomarkers*, 23(3), 277–287. doi:10.1080/1354750x.2017.1409803.
- Chichiricco, G. and Poma, A. (2015). Enetration and toxicity of nanomaterials in higher plants. *Nanomaterials* 5: 851-873.
- Costa, P.M., Carreira, S., Costa, M.H. and Caeiro S. (2013). Development of histopathological indices in a commercial marine bivalve (*Ruditapes decussatus*) to determine environmental quality. *Aquat Toxicol.* 15;126:442-54. doi: 10.1016/j.aquatox.2012.08.013. Epub 2012 Aug 27. PMID: 23010389.
- Cuevas, N., Zorita, I., Costa, P. M., Franco, J. and Larreta, J. (2015). Development of histopathological indices in the digestive gland and gonad of mussels: integration with contamination levels and effects of confounding factors. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 162, 152–164. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.03.011>.

- Dale, L. (2005). Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small Nano Micro* 1: 482-501.
- De Donno A., Liaci, D., Bagordo, F., Lugoli F. and Gabutti G. (2008). *Mytilus galloprovincialis* as a Bioindicator of Microbiological Pollution of Coastal Waters, *Journal of Coastal Research*, 24 (1): 216-221pp.
- Duroudier, N., Cardoso, C., Mehennaoui, K., Mikolaczyk, M., Schäfer, J., Gutleb, A. C., Giamberini, L., Bebianno, M. J., Bilbao, E. and Cajaraville, M. P. (2019). Changes in protein expression in mussels *Mytilus galloprovincialis* dietarily exposed to PVP/PEI coated silver nanoparticles at different seasons. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 210, 56–68. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.02.010>.
- Ebabe Elle, R., Gaillet, S., Vide, J., Romain, C., Lauret, C. and Rugani, N. (2013). Dietary exposure to silver nanoparticles in SpragueDawley rats: Effects on oxidative stress and inflammation. *Food Chem Toxicol* 60: 297-301.
- Ertürk Gürkan, S. and Gürkan, M. (2021). Toxicity of gamma aluminium oxide nanoparticles in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*): histopathological alterations and antioxidant responses in the gill and digestive gland. *Biomarkers*, 26(3), 248–259. doi:10.1080/1354750x.2021.1878558.
- Fahmy, S.R. and Sayed, D.A. (2017). Toxicological perturbations of zinc oxide nanoparticles in the *Coelatura aegyptiaca* mussel. *Toxicology and Industrial Health*. 2017;33(7):564-575. doi:10.1177/0748233716687927.
- Feyman, R.P. (2005). *The pleasure of finding things out*. Helix Books Perseus Publishing, ISBN: 0-7382-0349-1 Cambridge, Massachusetts, 1999: 151-70.
- Fischer, H.C. and Chan, C.W. (2007). Nanotoxicity: the Growing Need for in vivo Study. *Current Opinion in Biotechnology* Volume 18, Pages 565-571.
- Gadzała-Kopciuch, R., Berecka, B., Bartoszewicz, J. and Buszewski, B. (2004). Some Considerations About Bioindicators in Environmental Monitoring. *Polish Journal of Environmental Studies*, 13(5): 453-462.
- Garcia, A., Espinosa, R., Delgado, L., Casals, E. and Gonzalez, E. (2011). Acute toxicity of cerium oxide, titanium oxide and iron oxide nanoparticles using standardized tests. *Desalination* 269: 136-141.
- Gornati, R., Longo, A., Rossi, F., Maisano, M., Sabatino, G., Mauceri, A. and Fasulo, S. (2016). Effects of titanium dioxide nanoparticle exposure in *Mytilus*

- galloprovincialis* gills and digestive gland. *Nanotoxicology*, 10(6), 807–817. doi:10.3109/17435390.2015.1132348
- Gosling, E.M. (1992). Systematics and Geographic Distribution of *Mytilus*. in: Gosling, E.(ed.). *The mussel Mytilus: Ecology, physiology, genetics and culture*. Elsevier, New York, pp. 1-17.
- Hanks, N.A., Caruso, J.A. and Zhang, P. (2015). Assessing *Pistia Stratiotes* for Phytoremediation of Silver Nanoparticles and Ag(I) Contaminated Waters. *Journal of Environmental Management* 164: p. 41-45.
- Hanna, S. K., Miller, R. J., Muller, E. B., Nisbet, R. M. and Lenihan, H. S. (2013). Impact of engineered zinc oxide nanoparticles on the individual performance of *Mytilus galloprovincialis*. *PloSone*, 8(4),e61800.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061800>.
- Heydrnejad, M.S., Samani, R.J. and Aghaeivanda, S. (2015). Toxic effects of silver nanoparticles on liver and some hematological parameters in male and female mice (*Mus musculus*). *Biol Trace Elem Res* 165:153-158.
- Hoet P. H., Brüske-Hohlfeld, I. and Salata O. V. (2004). Nanoparticles Known and Unknown Health Risks. *Journal of Nanobiotechnology*, 2(1), 12.
- Hu W., Culloty S., Darmody G., Lynch S., Davenport J., Ramirez-Garcia S., Dawson K., A., Lynch, I., Blasco, J. and Sheeha D. (2014). Toxicity of Copper Oxide Nanoparticles in the Blue Mussel, *Mytilus edulis*: A redox proteomic investigation. *Chemosphere* 2014, 108 , 289–299.
- Jimeno-Romero, A., Bilbao, E., Izagirre, U., Cajaraville, M. P., Marigómez, I. and Soto, M. (2017). Digestive cell lysosomes as main targets for Ag accumulation and toxicity in marine mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to maltose-stabilised Ag nanoparticles of different sizes. *Nanotoxicology*, 11(2), 168–183. doi:10.1080/17435390.2017.1279358.
- Kádár, E., Lowe, D. M., Solé, M., Fisher, A. S., Jha, A. N., Readman, J. W. and Hutchinson, T. H. (2009). Uptake and biological responses to nano-Fe versus soluble FeCl₃ in excised mussel gills. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(2), 657–666. doi:10.1007/s00216-009-3191-0.
- Li, J., Schiavo, S., Xiangli, D., Rametta, G., Miglietta, M. L., Oliviero, M. and Manzo, S. (2018). Early ecotoxic effects of ZnO nanoparticle chronic exposure in *Mytilus*

- galloprovincialis* revealed by transcription of apoptosis and antioxidant-related genes. *Ecotoxicology*, 27(3), 369–384. doi:10.1007/s10646-018-1901-0.
- Mallat J. (1985). Fish Gill Structural Changes Induced by Toxicants and Other Irritants, A Stastical Review. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 42: 630-648.
- Marisa, I., Matozzo, V., Munari, M., Binelli, A., Parolini, M., Martucci, A. and Marin, M. G. (2016). In vivo exposure of the marine clam *Ruditapes philippinarum* to zinc oxide nanoparticles: responses in gills, digestive gland and haemolymph. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(15), 15275–15293. doi:10.1007/s11356-016-6690-5.
- MolluscaBase (2019). MolluscaBase. *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819. Accessed through: World Register of Marine Species at: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=140481> on 2019-08-02.
- Moore M.N. (2006). Do Nanoparticles Present Ecotoxicological Risks for the Health of the Aquatic Environment. *Environmental International*. 32: 967–976.
- Morse M. P. and Zardus J. D. (1997). *Microscopic Anatomy of İnvertebrates 6A Mollusca II*, Wiley-Liss, Inc., New York, 0-471-15447-4.
- Mumford, S., Heidel, J., Smith, C., Morrison, J., Macconnell, B. and Blazer, V. (2007) *Fish Histology and Histopathology*. 4th Edition, US Fish & Wildlife Service, West Virginia.
- Nations, S., Wages, M., Canas, J.E., Maul, J. and Theodorakis, C. (2011). Acute effects of Fe₂O₃, TiO₂, ZnO and CuO nanomaterials on *Xenopus laevis*. *Chemosphere* 83: 1053-1061.
- Owen G. (1955). Observations on the Stomach and Digestive Diverticula of the Lamellibranchia I. The Anisomyaria and Eulamellibranchia, *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 96 (4), 517-537.
- Owen, G. (1966) *Physiology of mollusca II*, Academic Press, New York.
- Örs, A. (2008). “Önce Deniz Sonra Midyeler Kirlendi”, *yi_2014.pdf* (Erişim Tarihi: 08.05.2015).
- Paur H.R., Cassee F.R., Teeguarden J., Fissan H., Diabate S., Aufderheide M., Kreyling W.G., Hänninen O., Kasper G., Riediker M., Rutishauser B. and Schmid O. (2011). In– Vitro Cell Exposure Studies for the Assessment of Nanoparticle Toxicity in the Lung 46 A Dialog Between Aerosol Science and Biology. *Journal of Aerosol Science*. 42: 668–692.

- Pinto, J., Costa, M., Leite, C., Borges, C., Coppola, F., Henriques, B., Monteiro, R., Russo, T., Di Cosmo, A., Soares, A., Polese, G., Pereira, E. and Freitas, R. (2019). Ecotoxicological effects of lanthanum in *Mytilus galloprovincialis*: Biochemical and histopathological impacts. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 211, 181–192. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.03.017>.
- Rinna, A., Magdolenova, Z., Hudecova, A., Kruszewski, M., Refsnes, M. and Dusinska, M. (2015). Effect of silver nanoparticles on mitogen-activated protein kinases activation: role of reactive oxygen species and implication in DNA damage. *Mutagenesis* 30: 59-66.
- Rocha, T. L., Sabóia-Morais, S. M. T. and Bebianno, M. J. (2016). Histopathological assessment and inflammatory response in the digestive gland of marine mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium-based quantum dots. *Aquatic Toxicology*, 177, 306–315. doi:10.1016/j.aquatox.2016.06.003.
- Roco, M.C. (2005). International perspective on government nanotechnology funding in 2005. *J Nanopart Res* 7: 707-12.
- Ruiz, P., Katsumiti, A., Nieto, J. A., Bori, J., Jimeno-Romero, A., Reip, P. and Cajaraville, M. P. (2015). Short-term effects on antioxidant enzymes and long-term genotoxic and carcinogenic potential of CuO nanoparticles compared to bulk CuO and ionic copper in mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research*, 111, 107–120. doi:10.1016/j.marenvres.2015.07.0
- Salman, S. (2004). Omurgasız Hayvanlar Biyolojisi, Palme yayıncılık, İstanbul, 975-8982- 04-4.
- Seaton, A. and Donaldson, K. (2005). Nanoscience, nanotoxicology, and the need to think small. *The Lancet*, 365(9463), 923–924. doi:10.1016/s0140-6736(05)71061-8.
- Seed R. and Suchanek T.H., (1992). Population and Community Ecology of *Mytilus*. In: Gosling, E.(ed.). *The Mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and Culture*, Elsevier, New York, pp. 87–157.
- Soenen, S.J. and De Cuyper, M. (2009). Assessing cytotoxicity of (iron oxide-based) nanoparticles: an overview of different methods exemplified with cationic magnetoliposomes. *Contrast Media Mol I* 4: 207-219.
- Srivastava, V., Gusain, D. and Sharma, Y.C. (2015). Critical review on the toxicity of some widely used engineered nanoparticles. *Ind. Eng. Chem. Res.* 54: 6209-6233.

- Tiede, K., Hassellöv, M., Breitbarth, E., Chaudhry, Q. and Boxall, A.B.A. (2009). Considerations For Environmental Fate and Ecotoxicity Testing To Support Environmental Risk Assessments For Engineered Nanoparticles. *Journal of Chromatography A*, 1216 (3): 503–509.
- Uysal, H. (1970). Türkiye Sahillerinde Bulunan Midyeler (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck) Üzerine Biyolojik Ve Ekolojik Araştırmalar. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi İlmi Yayınları, No:79.
- Uzunören, N. (1987). Ağır metallerle kirlenmiş sulardan toplanan midyeler ve benzeri deniz ürünlerinde ağır metallerden arsenik ve türevleri ile kirlenme düzeylerinin saptanması. İstanbul Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.
- Wang, B., Feng, W.Y., Zhu, M.T., Wang, Y. and Wang, M. (2009). Neurotoxicity of low-dose repeatedly intranasal instillation of nano and submicron sized ferric oxide particles in mice. *J Nanopart Res* 11: 41-53.
- Wilson, I. and Gamble, M. (2002). The hematoxylin and eosin. Theory and practice of histological techniques. 5th ed. London, UK: Churchill Livingstone, 125–138.
- Wu, F., Sokolov, E. P., Dellwig, O. and Sokolova, I. M. (2020). *Season-dependent effects of ZnO nanoparticles and elevated temperature on bioenergetics of the blue mussel Mytilus edulis*. *Chemosphere*, 127780. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.12.
- Zhu, M. T., Feng, W. Y., Wang, B., Wang, T. C., Gu, Y. Q., Wang, M., Wang, Y., Ouyang, H., Zhao, Y. L. and Chai, Z. F. (2008). Comparative study of pulmonary responses to nano- and submicron-sized ferric oxide in rats. *Toxicology*, 247(2-3), 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.02.011>.