



Araştırma Makalesi / Research Article

Cyfluthrinin Tatlı Su Midyesi (*Unio delicatus*, Lea 1823) Primer Hücre Kültürlerinde Oksidatif Stres Etkisinin Belirlenmesi

Determination of The Oxidative Stress Effect of Cyfluthrin on the Primary Cell Cultures of the Freshwater Mussel (*Unio delicatus*, Lea 1823)

Pınar Arslan^{1*}, Aysel Çağlan Günel², Aylin Sepici Dinçel³

¹ Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Çankırı, Türkiye

² Gazi Üniversitesi, Gazi Eğitim Fakültesi, Biyoloji Eğitimi Ana Bilim Dalı Ankara, Türkiye

³ Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya ABD, Ankara, Türkiye

Öz

Amaç: Sentetik piretroitlerden biri olan cyfluthrin, haşere kontrolünde geniş ve yaygın alanlarda kullanımı nedeniyle sucul ekosisteme karışan ve hedef dışı türler üzerinde istenmeyen etkilere yol açan bir insektisit grubudur. Tatlı su midyeleri suları filtreleme yoluyla beslendikleri için sucul biyoindikatör organizmalardan biri olarak sucul izleme ve toksikoloji çalışmalarında kullanılmaktadır. Bu çalışmada, cyfluthrinin oksidatif stres etkisinin primer midye hücre kültürleri üzerinde ileri oksidasyon protein ürünleri yöntemi (AOPP) kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada üç adet tatlı su midyesinden solungaç ve sindirim bezleri alınarak ayrı ayrı hücre kültürü elde edilmiştir. 24 kuyucuklu mikrolakalara 1×10^5 sayıda hücre olacak şekilde hücrelerin ekilmesini takiben mikrolakalara 1mg/L, 10µg/L, 100 ng/L ve 1 ng/L konsantrasyonlarında cyfluthrin çift tekrarlı olacak şekilde konulmuştur ve hücreler bu dozlara 24 saat süre ile maruz kalmıştır. Ayrıca her plakada kontrol ve solvent kontrol grubu da bulunmaktadır.

Bulgular: Elde edilen AOPP değerleri incelendiğinde kontrol gruplarına göre primer solungaç hücre kültürlerinde yüksek, primer sindirim bezi hücre kültürlerinde ise düşük AOPP değerleri bulunmuştur. Primer hücre solungaç ve sindirim bezi hücre kültürleri doza bağımlı olarak kendi içlerinde karşılaştırıldıklarında anlamlı bir farklılık gözlenmemesine rağmen ($p > 0.05$), hücre kültürleri arasında karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık olduğu gözlenmiştir ($p < 0.05$).

Sonuç: Sucul kirletici maddelerin araştırılmasında kullanılan *in vitro* modellerden biri olan primer tatlı su midyeleri hücre kültürleri biyokimyasal parametrelerin araştırılmasında kullanılabilecek iyi bir modeldir.

Anahtar Kelimeler: Midye, Cyfluthrin, Solungaç, Sindirim bezi, *in vitro*, AOPP

Abstract

Objective: Cyfluthrin, one of the synthetic pyrethroid, is an insecticide that interferes with aquatic ecosystems due to its wide range of usage in pest control and causes adverse effects on non-target species. Freshwater mussels are used as one of the aquatic bioindicator organisms in aquatic ecosystem for monitoring and toxicology studies because they feed by filtering the water. This study aimed to investigate the oxidative stress effect of cyfluthrin on primary mussel cell cultures by using advanced oxidation protein products method (AOPP).


Materials and Methods: The gill and digestive gland tissues were taken from three freshwater mussels and the cell cultures were obtained separately. Following the inoculation of cells with 1×10^5 cells in 24-well microplates, cyfluthrin was added to the microplates in duplicate at 1 mg/L, 10µg/L, 100 ng/L, and 1 ng/L concentrations and the cells were exposed to them for 24-hours. There is also control and solvent control group on each plate.

Results: According to AOPP values compared to the control groups, while higher AOPP values were found in primary gill cell cultures, lower were found in primary digestive gland cell cultures. Although no significant difference was observed when primary cell gill and digestive gland cell cultures were dose-dependently compared within themselves ($p > 0.05$), there was a significant difference when compared between cell cultures ($p < 0.05$).

Conclusion: Primary freshwater mussel cell cultures, which is one of the *in vitro* models used in the investigation of aquatic pollutants, is a good model that can be used to investigate biochemical parameters.


Key Words: Mussel, Cyfluthrin, Gill, Digestive gland, *in vitro*, AOPP


İletişim adresi/Address for Correspondence:

Pınar Arslan:  <http://orcid.org/0000-0001-5910-2835>

Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Çankırı Türkiye

E-mail: pinararslan@karatekin.edu.tr

Aysel Çağlan Günel:  <http://orcid.org/0000-0002-9072-543X>

Aylin Sepici Dinçel:  <https://orcid.org/0000-0001-5847-0556>

Geliş Tarihi/Received: 15 Mayıs 2022. Kabul Tarihi/Accepted: 10 Ağustos 2022. Çevrimiçi Yayın: Published Online: 30 Aralık 2022

GİRİŞ

Sentetik piretroidler, halk arasında papatya olarak bilinen *Chrysanthemum* sp. çiçeklerinin ekstraktlarından elde edilen piretrin maddesi ile yapılan bir insektisittir. Bu maddeler, böcekler üzerindeki etkisini sinir sistemi depolarizasyonuna ve hipereksitasyonuna yol açan nöronal membrandaki voltaja bağlı sodyum kanalında meydana getirdiği için nörotoksik insektisitler sınıfında yer almaktadır. Karakteristik olarak, sentetik piretroidler, bir ester bağı ile birleştirilen fenoksibenzoik ve siklopropan kısımları ile tanımlanır. Sentetik piretroidler genellikle fenoksibenzoik bileşenin α -karbonunda bir siyano grubunun yokluğuna (Tip I) veya varlığına (Tip II) bağlı olarak gruplandırılır^{1,2}. Tip I sentetik piretroidler, aşırı uyarılma ve ince titreme (T-sendromu) ile ilişkili iken Tip II sentetik piretroidler, kronik nöbetler (koreoatetoz) ve tükürük salgılaması (CS sendromu) dahil olmak üzere daha karmaşık sendromlarla ilişkilidir^{2,3,4}.

Cyfluthrin (Cas Number: 68359-37-5), Tip II sentetik piretroidler grubuna⁵ dahil olup tarımda, evsel alanda, veterinerlik hekimlikte ve gıda endüstrisinde haşerelere karşı kullanılmaktadır⁶. Kullanım alanının bu şekilde yaygın ve geniş olması nedeniyle özellikle sucul ekosistemlere karışması sonucunda hedef olmayan türler üzerinde toksik etkilere neden olmaktadır⁷.

Sucul organizmalardan biri olan tatlı su midyeleri ailesinden biri olan Unionidae'nin dünya çapında 620'den fazla türü mevcuttur^{8,9,10}. Tatlı su midyeleri, besinlerini buldukları ortamdaki suyu süzerek elde ettikleri için doğal bir arıtım sistemi meydana getirerek ekosistemin önemli bir parçasını oluştururlar^{11,12}. Bu nedenle, sucul ekosistemde biyolojik izleme çalışmalarında kullanılan indikatör organizma gruplarından biridir¹³. Ayrıca laboratuvar ortamında yapılan biyodeneyleerde de iyi bir indikatör organizma grubu olduğu gözlenmiştir^{12,14}.

Sucul toksikoloji çalışmalarında midyelerin *in vivo* kullanımlarının yanı sıra *in vitro* modellerinin de geliştirilmesi ile daha az sayıda canlı organizma kullanılarak çalışmalar yürütülmektedir¹⁵. Bu nedenle bu çalışmada, sucul indikatör türlerden biri olan tatlı su midyelerinin primer hücre kültürleri kullanılarak cyfluthrinin biyokimyasal belirteçlerden biri olan ileri oksidasyon protein ürünleri (AOPP) üzerine etkisinin araştırılması

amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Tatlı su midyelerinin temini

Tatlı su midyeleri *Unio delicatus*, Lea 1823 Gölbaşı Gölü (Adıyaman)'nden temin edilmiştir. Deneyleerde ortalama $36,59 \pm 2,0$ g ağırlığında, $5,13 \pm 0,29$ cm uzunluğunda, $2,07 \pm 0,06$ cm yüksekliğinde ve $1,33 \pm 0,06$ cm kalınlığında tatlı su midyeleri kullanılmıştır. Tatlı su midyeleri optimum şartlarda laboratuvar ortamına getirilmiş ve en az iki gün dinlendirilerek kloru giderilen çeşme suyu ile doldurulan 15 L'lik akvaryuma yerleştirilmiştir. Tatlı su midyelerinin laboratuvar koşullarına aklimasyonu ve depürasyonu iki hafta süre ile yapılmıştır. Adaptasyon sürecinde *Spirulina* sp. ile beslenen tatlı su midyelerinin akvaryum suları üç günde bir sifonlama ile temizlenmiştir.

Primer Hücre Kültürü Yapımı

Tatlı su midyelerinin solungaç ve sindirim bezi hücre kültürleri Yurdakök-Dikmen ve ark.¹² metoduna göre yapılmıştır. Deneyleerde üç adet tatlı su midyesi kullanılmıştır. Tatlı su midyeleri kabuklarının dışında bulunan mantar, bakteri gibi kontaminasyona neden olabilecek organizmalardan arındırılmak üzere %70'lik etil alkol içeren bir kapta 2 dk bekletilmiş ve ardından steril bir pens ile çıkartılarak bek alevinden hızlı bir şekilde geçirilmiştir. Önceden hazırlanmış steril bir ortamda steril pens ve makas yardımı ile disekte edilen midyelerden solungaç ve sindirim bezi dokuları ayrı ayrı olacak şekilde steril plastik petri kapları içerisine konulmuştur. Dokular, primer hücre kültürünün ilk basamağı olan mekanik bir şekilde steril pens ve bisturi ile 3-4 mm uzunluğunda parçalara bölünmüştür. Ardından enzimatik bir ayrışmayı sağlayacak tripsin [0,25% in diphosphate buffer solution (DBPS), Capricorn Scientific, Germany] dokuların üzerine 4 mL eklenmiştir. Bakteriyele kontaminasyonu engellemek amacıyla 1X penisilin-streptomisin (100X, Capricorn Scientific, Germany) 500 μ L ve mantar kontaminasyonunu engellemek amacıyla 100 μ L 1X amphotericin B (100X, Capricorn Scientific, Germany) eklenmiştir. Son olarak petri kaplarına 500 μ L fetal sığır serumu (Capricorn Scientific, Germany) eklenerek 4 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben, 5 mL %10 FBS içeren hücre mediumu Leibovitz 15 (Sigma Aldrich, USA) petri kaplarına eklenen petri kapları 24

saatlik bir inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda, petri kapları içindeki doku-hücre karışımı pipetlenerek cell strainer (100 µm mesh size, NEST) kullanılarak 50 mL'lik steril falkon tüplerine aktarılmıştır. Santrifüj sonra pelet haldeki hücreler 1 mL %10 FBS içeren L-15 içinde resüspanse edilerek tripan mavisi kullanılarak hücre sayımı yapılmıştır. 24 kuyucuklu mikropalakalara 1×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücreler ekilmiştir.

Sentetik piretroid dozlarının hazırlanması

Cyfluthrin (saflık $\geq 94\%$), stok konsantrasyonu 100 mg/L olacak şekilde tartıldıktan sonra balon joje içerisinde dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılarak çözündürülmüştür. Stok çözelti kullanılarak 1 mg/L, 10 µg/L, 100 ng/L ve 1 ng/L doz konsantrasyonları hücre mediyumu kullanılarak elde edilmiştir.

Hücre deneyleri

Primer solungaç ve sindirim bezi hücre kültürleri mikropalakalara ekimi yapıldıktan sonra hücrelerin mikropalaka taban yüzeylerine tutunması için 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından hazırlanan cyfluthrin dozları çift tekrarlı olarak kuyucuklara konulmuştur. Her mikropalakada kontrol ve solvent kontrol grupları bulunmaktadır. Dozlanan mikropalakalar 24 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında AOPP metodu hücre peleti kullanılarak Witko-Sorsat (1996)¹⁶ metoduna göre yapılmıştır. Hücre peleti, 400 µL 20 mM sodyum fosfat (pH 7) içinde insülin iğneleri kullanılarak homojenize edilmiştir. 200 µL homojenat üzerine 10 µL 1.16 M potasyum iyodür ve 20 µL glasiyel asit konularak karıştırılmış ve spektrofotometrede 340 dalga boyunda okunmuştur.

Hücrelerdeki protein tayini ise Bradford yöntemine göre yapılmıştır. Hücre homojenatından 50 µL alınarak üzerine 200 µL Bradford eklenmiş ve karışım spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda okunmuştur.

İstatiksel analiz

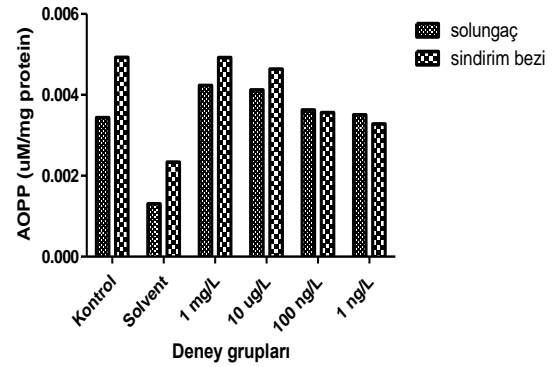
Deney sonuçları Microsoft Excel 13 programına girilmiştir. Ortalama değerlerinin alınmasından sonra GraphPad Prism 5 programında iki yönlü varyans analizi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Sucul bir organizma olan midyeler ile yapılan *in vitro* çalışmalar incelendiğinde, çeşitli dokularının kullanılarak primer hücre kültürü modellerinin yapıldığı çalışmalar ile karşılaşılmaktadır^{12,17}. Geliştirilen bu primer hücre kültürleri, sucul kirletici maddelerin hücre canlılığı üzerine etkilerinin incelendiği çalışmalarda model olarak kullanılmaya başlanmıştır^{12,18,19,20}. Bu kirletici maddelerin etkilerinin incelendiği diğer çalışmalar ise oksidatif stres, moleküler belirteçler veya hücre morfolojileri üzerine yapılan çalışmaları oluşturmaktadır²¹.

Bu çalışmada, tatlı su midyelerinin primer solungaç ve sindirim bezi hücre kültürleri üzerine cyfluthrinin oksidatif stres etkisi AOPP yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir.

Primer solungaç ve sindirim bezi hücre kültürlerinin 1 mg/L, 10 µg/L, 100 ng/L ve 1 ng/L dozlarında cyfluthrine maruz kalması sonucunda elde edilen AOPP değerleri Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Primer solungaç ve sindirim bezi hücre kültürlerinin AOPP değerleri

Primer midye solungaç hücre kültüründen elde edilen AOPP değerleri incelendiğinde hiçbir maddeye maruz kalmayan kontrol grubu AOPP değerlerinin cyfluthrine farklı dozlarda maruz kalan hücrelerden düşük olduğunun gözlenmesine rağmen anlamlı bir farklılık yoktur ($p > 0.05$). 1 mg/L ve 10 µg/L konsantrasyonları uygulanan gruplarda kontrole göre AOPP değerleri oranlandığında 1,2 kat bir farklılık olduğu gözlenmiştir.

Primer midye sindirim bezi hücre kültürü AOPP değerleri incelendiğinde kontrol grubu

değerlerinin 1 mg/L, 10 µg/L, 100 ng/L ve 1 ng/L doz gruplarına göre yüksek olduğu gözlenmiştir. Kontrol ve cyfluthrin grupları AOPP değerleri oranladığında 0.9 ve 0.7 arasında bir farklılık gözlenmesine rağmen anlamlı bir farklılık yoktur ($p>0.05$).

Sucul toksikoloji çalışmalarında tatlı su midyelerinin *in vitro* sistemlerinin kullanıldığı çalışmalarda genellikle ksenobiyotik maddelerin sitotoksik etkilerinin araştırıldığı gözlenmiştir^{12,20,22,23}. Örneğin sentetik piretroid bir madde olan flumethrinin tatlı su midyeleri primer manto, solungaç, gonad ve sindirim bezi hücreleri üzerindeki hücre canlılığının incelendiği bir çalışmada, hücre kültürlerinin flumethrine duyarlılık sıralaması gonad>manto = sindirim bezi>solungaç şeklinde bulunmuştur¹⁹. Midyelerde sindirim bezi ksenobiyotik maddelerin detoksifikasyonundan sorumlu iken solungaç osmoregülasyon, solunum, azotlu atıkların atılması gibi metabolik olaylarda sorumlu organlardır^{24,25}. Bu çalışmada, her ne kadar hücre canlılık parametreleri araştırılmasa da primer solungaç ve sindirim bezi hücre kültürleri AOPP değerleri incelendiğinde ise anlamlı bir farklılık olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$). Hücre kültürü duyarlılık sıralamasında da gözlemlendiği üzere ksenobiyotikten sorumlu bir organ olan sindirim bezi hücrelerinde AOPP değerlerinin yüksek çıkması bu şekilde açıklanabilir. Bir başka çalışmada, organofosforlu bir pestisit olan klorpirifos etilin primer solungaç ve sindirim bezi hücre kültürlerinde AOPP değerlerinin kontrol gruplarına göre düştüğü gözlenmiştir²⁶. Bu çalışmada, solungaç hücre kültürlerinde yüksek AOPP değerlerinin elde edilmesi kimyasal madde gruplarının farklılığından kaynaklanıyor olabilir.

SONUÇ

Bir insektisit olan cyfluthrinin hedef dışı sucul canlılardan biri olan tatlı su midyeleri üzerindeki etkisi primer solungaç ve sindirim bezi hücre kültürleri kullanılarak protein oksidasyon yöntemi ile incelenen bu çalışmada AOPP değerleri kontrol gruplarına göre solungaç hücre kültürlerinde artarken sindirim bezi hücre kültürlerinde azalmıştır. Elde edilen bu sonuçlara göre primer tatlı su midyeleri hücre kültürü modelleri sucul kirletici madde etkilerinin biyokimyasal olarak da

incelenmesinde kullanılabilir bir model olacağını destekler niteliktedir.

Etik Onay: -

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemektedir.

Finansal Destek: -

Ethical Approval:

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest

Financial Support: None

KAYNAKLAR

1. Soderlund, D.M., Clark, J.M., Sheets, L.P., Mullin, L.S., Piccirillo, V.J., Sargent, D., et al. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, 2002, 171, 3-59. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(01\)00569-8](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(01)00569-8)
2. Martínez, M.-A., Rodríguez, J.-L., Lopez-Torres, B., Martínez, M., Martínez-Larrañaga, M.-R., Anadón, A., et al. Oxidative stress and related gene expression effects of cyfluthrin in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: Protective effect of melatonin. *Environmental Research*, 2019, 177, 108579. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108579>.
3. Verschoyle, R.D., Aldridge, W.N. Structure-activity relationships of some pyrethroids in rats. *Archives of Toxicology*, 1980, 45, 325-329. <https://doi.org/10.1007/BF00293813>.
4. Aldridge, W.N. An assessment of the toxicological properties of pyrethroids and their neurotoxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 1990, 21, 89-104. <https://doi.org/10.3109/10408449009089874>.
5. Palmquist, K., Salatas J., Fairbrother, A. Pyrethroid insecticides: use, environmental fate, and ecotoxicology, insecticides - advances in integrated pest management. Dr. Farzana Perveen (Ed.), 2012, ISBN: 978-953-307-780-2, InTech.
6. Verma, R., Rajawat, N.K., Awasthi, K.K., Syed, F., John, P.J., Soni, I. ROS dependent neurotoxicity, genotoxicity & histopathological alterations triggered by β -cyfluthrin, a synthetic pyrethroid. *Materials Today: Proceedings*, 2021, 42, 1737-1743. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matpr.2020.10.959>
7. Serdar, O. Cyfluthrin Pestisitinin Zebra Midyesi (*Dreissena polymorpha*) Üzerindeki Etkisinin Bazı Antioksidan Enzim Aktiviteleriyle Belirlenmesi. *Anadolu Çevre ve Hayvancılık Dergisi*, 2021, 6(1), 77-83. <https://doi.org/10.35229/jaes.804479>.
8. Graf, D.L., Cummings, K.S. Review of the systematics and global diversity of freshwater mussel species (Bivalvia: Unionoida). *Journal of*

- Molluscan Studies, 2007, 73(3), 291–314. <http://dx.doi.org/10.1093/mollus/eym029>.
9. Bogan, A.E. Global diversity of freshwater mussels (Mollusca, Bivalvia) in freshwater. *Hydrobiologia*, 2008, 595(1), 139–147. <https://doi.org/10.1007/s10750-007-9011-7>
 10. Wu, R.-W., Liu, X.-J., Wang, S., Roe, K.J., Ouyang, S., Wu, X.-P. Analysis of mitochondrial genomes resolves the phylogenetic position of Chinese freshwater mussels (Bivalvia, Unionidae). *ZooKeys*, 2019, 812, 23-46. <https://doi.org/10.3897/zookeys.812.29908>
 11. Güler, M., Çoban, D., & Kırım, B. Observations on the reproductive biology of *Unio terminalis* (Bivalvia: Unionidae). *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2017, 4(3), 303-309. <http://dx.doi.org/10.12714/egejfas.2017.34.3>.
 12. Yurdakök-Dikmen, B., Arslan, P., Kuzukıran, Ö., Filazi, A., Erkoç, F. *Unio* sp. primary cell culture potential in ecotoxicology research. *Toxin Reviews*, 2017, 37(1), 75–81. <doi.org/10.1080/15569543.2017.1331360>.
 13. Wagner, A., Boman, J. Biomonitoring of trace elements in Vietnamese freshwater mussels. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2004, 59(8), 1125-1132. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2003.11.009>.
 14. Třešňáková, N., Günal, A.Ç., Başaran Kankılıç, G., Paçal, E., Tavşanoğlu, Ü.N., Uyar, R., et al. Sub-lethal toxicities of zinc pyriithione, copper pyriithione alone and in combination to the indicator mussel species *Unio crassus* Philipsson, 1788 (Bivalvia, Unionidae). *Chemistry and Ecology*, 2020, 36(4), 292-308. <doi.org/10.1080/02757540.2020.1735377>.
 15. Yurdakök Dikmen B, Filazi A, Arslan P. Ekotoksikolojide Omurgasız Hücre Kültürlerinin Kullanımı. Güvenç D, editör. İlaç Araştırma, Geliştirme ve Toksikolojik Çalışmalarda Kullanılan Alternatif Yöntemler.1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri, 2018, 58-64.
 16. Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A.T., Zingraff, J., et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney International*, 1996, 49(5), 1304-1313. <https://doi.org/10.1038/ki.1996.186>
 17. Faucet, J., Maurice, M., Gagnaire, B., Renault, T., Burgeot, T. Isolation and primary culture of gill and digestive gland cells from the common mussel *Mytilus edulis*. *Methods in Cell Science*, 2004, 25, 177–184. <https://doi.org/10.1007/s11022-004-8227-4>.
 18. Arslan, P., Yurdakök-Dikmen, B., Ozeren, S.C., Kuzukıran, O., Filazi, A. In vitro effects of erythromycin and florfenicol on primary cell lines of *Unio crassus* and *Cyprinus carpio*. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021, 28, 48408–48416. <https://doi.org/10.1007/s11356>
 19. Arslan, P., Yurdakök-Dikmen, B., Kuzukıran, O., Ozeren, S.C., Filazi, A. Effects of acetamiprid and flumethrin on *Unio* sp. primary cells. *Biologia*, 2021, 76, 1359–1365. <https://doi.org/10.1007/s11756-021-00692-2>
 20. Parolini, M., Quinn, B., Binelli, A., Provini, A. Cytotoxicity assessment of four pharmaceutical compounds on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) haemocytes, gill and digestive gland primary cell cultures. *Chemosphere*, 2011, 84(1), 91-100. <doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.049>
 21. Birmelin, C., Pipe, R., Goldfarb, P., Livingstone, D.R. Primary cell-culture of the digestive gland of the marine mussel *Mytilus edulis*: a time-course study of antioxidant- and biotransformation-enzyme activity and ultrastructural changes. *Marine Biology*, 1999, 135, 65–75. <https://doi.org/10.1007/s002270050602>
 22. Katsumiti, A., Berhanu, D., Howard, K.T., Arostegui, I., Oron, M., Reip, P., et al. Cytotoxicity of TiO₂ nanoparticles to mussel hemocytes and gill cells in vitro: Influence of synthesis method, crystalline structure, size and additive. *Nanotoxicology*, 2015, 9(5), 543-553. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.952362>
 23. Katsumiti, A., Thorley, A.J., Arostegui, I., Reip, P., Valsami-Jones, E., Tetley, T.D., et al. Cytotoxicity and cellular mechanisms of toxicity of CuO NPs in mussel cells in vitro and comparative sensitivity with human cells. *Toxicology in Vitro*, 2018, 48, 146-158. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.01.013>
 24. Jerome, F.C.; Hassan, A.; Omoniyi-Esan, G.O.; Odujoko, O.O.; Chukwuka, A.V. Metal uptake, oxidative stress and histopathological alterations in gills and hepatopancreas of *Callinectes amnicola* exposed to industrial effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2017, 139, 179-193. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.01.032>
 25. De Marco, G.; Afsa, S.; Galati, M.; Guerriero, G.; Mauceri, A.; Ben Mansour, H.; et al. Time- and dose-dependent biological effects of a sub-chronic exposure to realistic doses of salicylic acid in the gills of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental. Science and Pollution. Research*, 2022, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-21866-8>
 26. Arslan, P. Klorpirifos Etilin *in vitro* Tatlı Su Model Organizmaları Üzerine Oksidatif Stres Etkisinin Belirlenmesi. *Yenilikçi Biyokimya ve Biyobilim*, 2021, 3(2), 50-55. <https://doi.org/10.48086/ASD0031>.