

Ham Petrolün *Poecilia sphenops* (Valenciennes, 1846) (Cyprinidae, Teleostei) Deri Histolojisi Üzerine Etkileri ^[1]

Özlem ÖNEN *,**  Burak GÖKÇE * Gürsel ERGEN * Sema İŞİSAĞ ÜÇÜNCÜ *

[1] Bu çalışma Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi tarafından hazırlanan Deney Hayvanları İçin Etik Kurul Kararlarına göre ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurulu 2008-49 Sayılı Raporu uyarınca yürütülmüştür

* Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zooloji Anabilim Dalı, TR-35100 Bornova, İzmir - TÜRKİYE

** Kafkas Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zooloji Anabilim Dalı, TR-36000 Kars - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2011-5549

Özet

Günümüzde endüstriyel teknolojinin gelişmesinde temel enerji kaynağı olan ham petrol, ekotoksikant olarak geniş çapta araştırılmaktadır. Ham petrolün teleostlarda deri üzerine etkilerini ortaya koymak için *Poecilia sphenops* örnekleri, ham petrolün suda çözünebilen kısımlarına dört farklı etki süresince (24, 48, 72, 96 saat) üç ayrı konsantrasyonuna (%10, %20, %40) maruz bırakılmış ve histolojik değişiklikler belirtilmiştir. Düşük konsantrasyon, kısa uygulama süresinde epidermiste hafif aşınma ve dermiste melanofor birikimi gözlenmiştir. Beklenildiği üzere dermis bozulması, subkutanöz kas tabakasında nekrotik alanların oluşumu ve fibrozis gibi ham petrolün çarpıcı etkileri, artan uygulama süresi ve konsantrasyona paralellik göstermiştir.

Anahtar sözcükler: Ham petrol, *Poecilia sphenops*, Deri, Histopatoloji

The Effects of Crude Oil on Skin Histology of *Poecilia sphenops* (Valenciennes, 1846) (Cyprinidae, Teleostei)

Summary

As being the main energy source that is needed for all of the industrial processes, crude oil is evaluated as a widely investigated ecotoxicant. In order to identify the effects of crude oil on the skin of teleosts, *Poecilia sphenops* specimens were exposed to three different concentration of soluble part of crude oil (10%, 20%, 40%) at four different exposure time (24, 48, 72, 96 h); and the histopathological changes were reported. A slight epidermis corrosion and melanophore aggregation in dermis were observed at low concentration and short exposure time. As estimated, the striking effects of the crude oil; such as dermis disintegration, necrotic areas and fibrosis in subcutaneous muscle layer; were extended prominently in parallel with increasing concentrations and exposure time.

Keywords: Crude oil, *Poecilia sphenops*, Skin, Histopathology

GİRİŞ

Özellikle petrol arama ve çıkarma çalışmaları sırasında oluşabilecek kazalar ve ayrıca rafinerizasyon süreçleri, kullanım ve depolama aşamalarında sucül çevreye yayılma olasılığı yüksek bir fosil yakıt olan ham petrolün suda çözünebilen kısımlarında bulunan ve toksik özellik gösteren hidrokarbon bileşikleri, biyolojik birikim mekanizmalarıyla en üst organizmalara kadar ulaşabilirler ^{1,2}. Ham petrol içeriğinde bulunan poliaromatik hidrokarbonların çeşitli biyolojik süreçlerdeki olumsuz etkilerine ilişkin çok sayıda araştırma vardır ³⁻¹².

Sucül omurgalılar petrol kirliliğinin doğal çevreye etkilerinin belirlenmesinde çok yaygın kullanılan organizmalardır ¹³. Çok özelleşmemiş ve ince yapısıyla deri ve hemen altında yer alan subkutanöz kas tabakası bütün sucül omurgalılarda olduğu gibi teleostlarda da, herhangi bir toksik maddeye maruz kalındığında çeşitli düzeylerde patolojik oluşumlar sergiler ¹⁴. Sucül ortamda bulunan toksik maddelerle ilk olarak karşılaşan bu yapılarda izlenen histopatolojik değişimler, metabolik etkilenme süreçlerine ilişkin önemli ön veriler olarak değerlendirilir ¹⁵.



İletişim (Correspondence)



+90 232 3112420



ozlem.onen@ege.edu.tr, ozlem.onen@hotmail.com

Bu çalışmada, ham petrolün suda çözünebilir kısımlarından hazırlanan farklı konsantrasyonlarının, iyi bilinen bir akvaryum balığı olan *Poecilia sphenops* (ay moli) derisinde oluşturduğu histolojik değişimlerin ortaya konması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

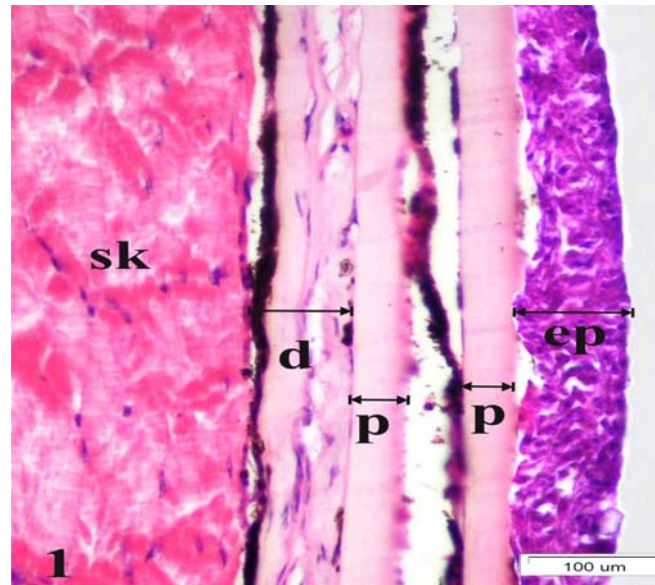
Ticari akvaryumculardan sağlanan toplam 20 adet *Poecilia sphenops* örneği, dört adet 10 litrelik cam akvaryumlarda dinlendirilmiş Bornova şehir suyunda ve doğal fotoperiyotta iki hafta süreyle tutularak laboratuvar koşullarına alıştırmıştır. Adaptasyon süresi bitiminde balıklar beşer örnekten oluşan %10, %20 ve %40 konsantrasyonlardaki üç deneme grubu ve bir kontrol grubuna ayrılmış ve bütün gruplar ticari balık yemleriyle (Sera-San) beslenerek su parametreleri (pH: 7,5-8; oksijen: 3,5-4 mg/l; sıcaklık: $22\pm 2^\circ\text{C}$) sürekli denetlenmiştir. Ham petrol örneği Tüpraş A.Ş.den temin edilmiştir. Deneme gruplarına manyetik karıştırıcı aracılığı ile 1/9 oranında suda çözülerek hazırlanan ham petrol çözeltisi belirtilen konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Her deneme grubu ve kontrol grubu için 24, 48, 72, 96 saatlik uygulama sürelerinin sonunda alınan balıklar, eter kullanılarak bayıldıktan sonra alınan deri örnekleri Bouin sıvısında tespit edilerek parafine gömülmüş ve 5-7 µm kalınlığında kesitler alınarak Hematoxilen-Eosin ile boyanıp ışık mikroskopunda incelenip fotoğrafları çekilmiştir.

BULGULAR

Kontrol grubunda (Şekil 1) birkaç hücre sırasından oluşan epidermis tabakasının hemen altında iki-üç sıra halinde şeritler oluşturan pullar ve homojen görümlü dermis tabakası yer alır. Her bir pul sırasının üzerinde epi-

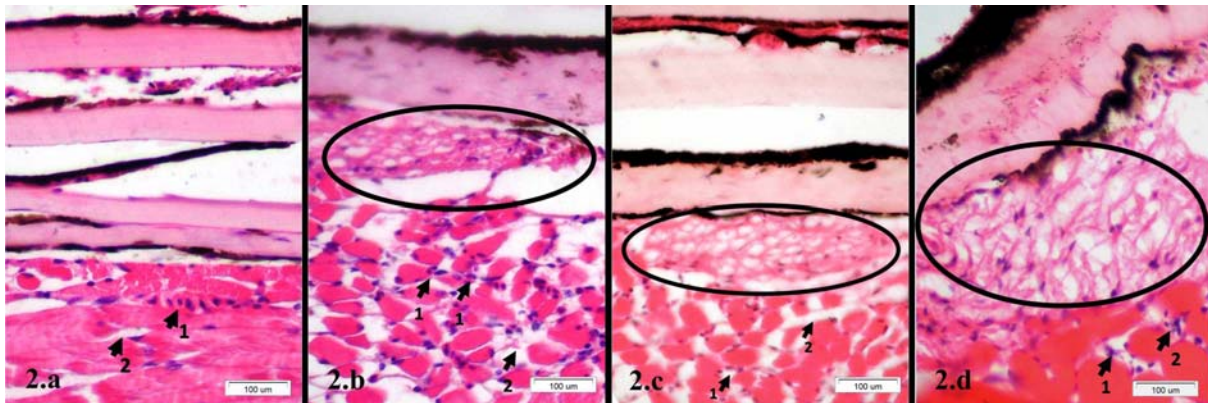
dermis sıraları ayrıca izlenebilir. Dermisde çok koyu renkli melanoforlar kolayca ayırt edilir. Subkütanöz tabaka aralarında boşluklar bulunan çizgili kas demetlerinden oluşur.

%10 konsantrasyon grubunda 24 saatlik uygulama grubunda belirgin bir değişim olmamakla birlikte (Şekil 2.a) izlenen ilk değişim olan epidermis aşınması 48 saatlik uygulama gruplarında görülmektedir (Şekil 2.b). Ayrıca 48 saat uygulama grubunda dermis tabakasının üst kısımlarında melanofor yığılmaları izlenmeye başlamış, dermis tabakasının hemen altında küçük çapta fibrozis oluşumları görülmüştür (Şekil 2.b). 72 saat uygulama grubunda ise epidermis tabakası tam olarak ayırt edilememekle birlikte



Şekil 1. Deri kontrol kesiti, ep- epidermis tabakası, p- pullar, d- dermis, sk- subkütanöz kas tabakası

Fig 1. Skin control section, ep- epidermis layer, p- scales, d- dermis layer, sk- subcutaneous muscle layer



Şekil 2. a- %10 konsantrasyon 24 saat uygulama, başlangıç aşamasındaki hemorajik bölgeler (1 nolu ok), başlangıç aşamasındaki nekrotik alanlar (2 nolu ok), b- %10 konsantrasyon 48 saat uygulama, dermis altındaki fibrilasyon (daire), hemoraji görülen bölgeler (1 nolu oklar), nekrotik alanlar (2 nolu oklar), c- %10 konsantrasyon 72 saat uygulama, dermis altındaki devam eden fibrilasyon (daire), hemoraji (1 nolu ok), nekrotik bölgeler (2 nolu ok), d- %10 konsantrasyon 96 saat uygulama, fibrilasyon (daire), hemorajik bölgeler (1 nolu ok), nekrotik alanlar (2 nolu ok)

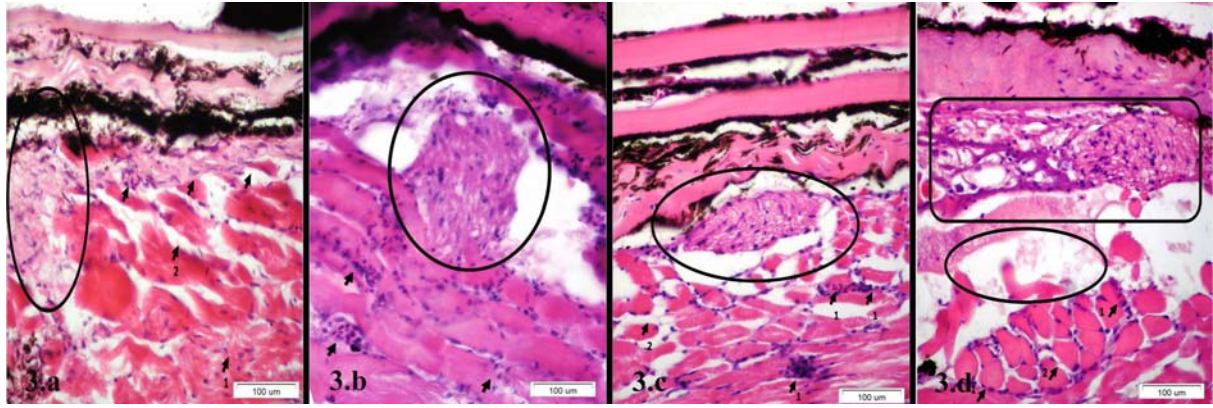
Fig 2. a- 10% concentration, 24 h exposure, fibrillation under dermis (round), necrotic areas (horizontal arrows); b- 48 h exposure, fibrillation (round), necrotic areas (horizontal arrows); c- 72 h exposure, fibrillation under dermis (round), hemoragic and necrotic vesicles (horizontal arrows); d- 96 h exposure, pigmentation (vertical arrows), change orientation of dermis and increasing of fibrillation (round), pigmentation (vertical arrows)

dermis tabakasının hemen altında fibrozis izlenmekte, ve genişleyen nekrotik alanlar göze çarpmaktadır (Şekil 2.c). Bunun yanında çok belirgin olmasa da ayırt edilebilen hemoraji elde edilen bulgular arasında yer almaktadır (Şekil 2.c). 96 saat uygulama grubunda ise epidermis 24 saatlik grupta elde edilen bulgularla paralellik göstermektedir. Dermis tabakasında fibriler yapıda bozulmalar gözlenmekte, ayrıca fibroblast nükleusları seçilememektedir (Şekil 2.d). Sayıları artan melanoforlar kalın ve dalgali bir tabaka halinde izlenmektedir. Aralarında makrofajlarında izlendiği fibrotik ve nekrotik alanların genişlediği görülmekte, hemorajinin devam ettiği izlenmektedir (Şekil 2.d).

%20 konsantrasyon 24 saat uygulama grubunda ise ilk olarak; %10 konsantrasyon 24 saatte dejenere olmaya başlamış olan epidermis tabakası, artık sadece tek hücre sırası olarak görülmekte hatta yer yer tamamiyle kaybol-

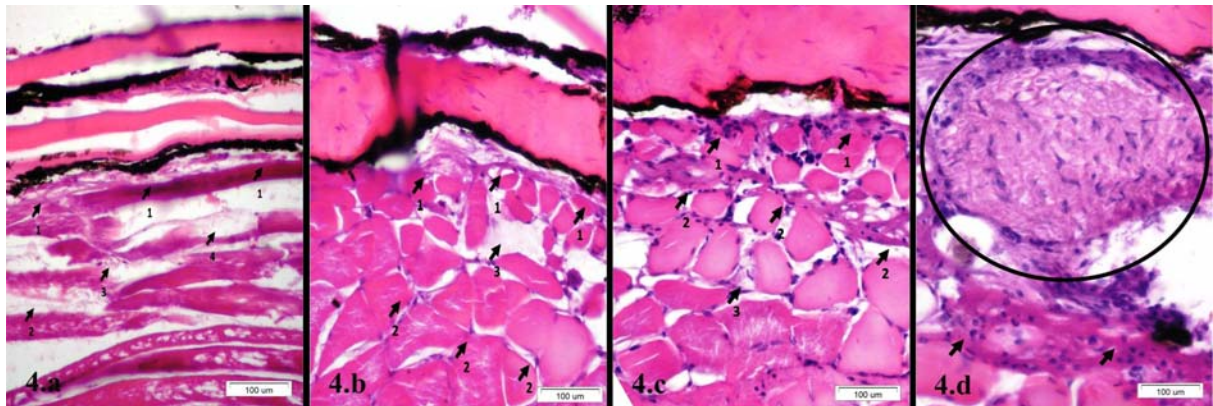
duğu anlaşılmaktadır (Şekil 3.a). Dermis yer yer parçalanmış ve bu parçalanmış kısımlarda melanofor birikimleri izlenmektedir. Subkutanöz tabakada fibrozis oluşumu ayrı alanlar halinde değil, hemoraji izlenen bölgelerde yayılmış olarak izlenmektedir. Nekrotik alanlar yaygın olarak yer almaktadır (Şekil 3.a). 48 saat uygulama grubunda ise epidermis aynı şekilde ayırt edilememektedir. Dermis tabakasında yoğun melanofor birikimi gözlenmektedir (Şekil 3.b). Subkutanöz tabakada hem geniş alanlarda, hem de kas demetleri arasında tipik fibrözis izlenmekte ve nekrotik oluşumlar devam etmektedir (Şekil 3.b). 72 ve 96 saatlik gruplarda gözlenen bulgular 24 ve 48 saatlik bulgulara paralellik göstermekte belirgin bir değişiklik izlenmemektedir (Şekil 3.c,d).

%40 konsantrasyon 24 saat uygulama grubunda daha önceki gruplara nazaran belirgin bir bulgu farklılığı olma-



Şekil 3. a- %20 konsantrasyon 24 saat uygulama, pigmentasyon (dikey oklar), kas tabakası seperasyonu ve nekrotik alanlar, dermis altında fibrozis oluşumu (daire), b- 48 saat uygulama, kas tabakası nekrotik alanlarda fibrilasyon (yatay oklar), fibrozis (daire), c- 72 saat uygulama, kas tabakası fibrillerinde düzensizleşme (yatay oklar) ve fibrozis (daire), d- 96 saat uygulama, kas tabakası nekrotik alanlar ve fibrilasyon (yatay oklar) ve dermis tabakası altında yayılmış halde fibrozis (daire)

Fig 3. a- 20% concentration, 24 h exposure, pigmentation (vertical arrows), separation of muscle fibriles and necrotic areas (horizontal arrows), fibrosis under dermis layer (round); b- 48 h exposure, fibrillation between muscle fibriles and necrotic areas (horizontal arrows), fibrosis (round); c- 72 h exposure, disorders of muscle fibriles, separations and necrotic areas (horizontal arrows), fibrosis (round); d- 96 h exposure, fibrillation between muscle fibriles and necrotic areas (horizontal arrows), fibrosis under dermis layer (round)



Şekil 4. a- %40 konsantrasyon, 24 saat uygulama, kas fibrillerinde seperasyon ve nekrotik alanlar (oklar), b- 48 saat uygulama, dermis tabakasında düzensizleşme ve nekrotik alanlar (oklar), c- 72 saat uygulama, kas tabakası arasında nekrotik alanlar ve dağılım halinde fibrilasyon (oklar), d- 96 saat uygulama, belirgin fibrozis ve kas tabakası hasarı (daire)

Fig 4. a- 40% concentration, 24 h exposure, separation of muscle fibriles, necrotic areas between muscle fibriles (arrows), b- 48 h exposure, defect of dermis (arrows), c- 72 h exposure, dispersed fibrillation between muscle layer and necrotic areas (arrows), d- 96 h exposure, marked fibrillation and muscle layer injury (round)

masına karşın 48 saat uygulama grubunda farklı olarak dermiste yer yer ayrılmalar izlenmektedir (Şekil 4.a,b). Kas tabakasında ise en belirgin değişiklik fibrotik oluşumların kist benzeri yapılar halinde izlenmesidir (Şekil 4.b). Bununla birlikte kas tabakasındaki nekrotik alanlar yaygın halde devam etmektedir (Şekil 4.b). 72 saat uygulama grubunda da önceki bulgulardan farklı bir bulgu izlenmemektedir (Şekil 4.c). 96 saat uygulama grubunda dermis yapısında çarpıcı bir şekilde bozulmalar izlenmektedir (Şekil 4.d). Melanoforlarda çok yaygın infiltrasyon izlenmektedir (Şekil 4.d). Kas tabakasında ise fibrotik oluşumlar etrafları boşlukla çevrili tipik kistik görünümündedir ve kas demetleri arasında nekrotik alanlar izlenmeye devam etmektedir (Şekil 4.d). Ayrıca kasların fibriler yapısında belirgin bozulmalar söz konusudur (Şekil 4.d).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Teleostlarda deri, solungaçlarla beraber toksik maddeyle ilk temasın sağlandığı doku olması açısından etki derecelenmesinde öncelikle incelenmesi gereken yapılar dandır. Bu çerçevede çeşitli toksik maddelerin deri üzerindeki etkileri farklı araştırmalara konu olmuştur¹⁶. Ancak ulaşılabilen kaynaklarda ham petrolün deri üzerindeki etkilerine yönelik herhangi bir araştırmaya rastlanmaması, bulguların karşılaştırılmasını zorlaştırmaktadır.

Ham petrol içeriğinde bulunan kimyasallara ilk olarak karşı karşıya gelen yüzey olan epidermis tabakasının, sunulan çalışmada kullanılan en düşük uygulama konsantrasyonunda ve en kısa sürede incelenip neredeyse yok olması; tahmin edilen bir sonuç olarak *Oreochromis niloticus* operkulum epitelinde¹⁶; *Poecilia sphenops* barsak epitelinde¹⁷; *Oncorhynchus gorbuscha*, *Prochilodus scrofa*, *Mugil sp.*, *Cyprinus carpio*, *Barbus sp.*, *Metynnis roosevelti* ve *Astyanax sp.* gibi birçok türde de solungaç epitelinde^{15,18,19} kaydedilen bulgulara uygundur.

Dermiste toksik madde uygulaması sonucunda kaydedilen başlıca histolojik bozulmalar nekrotik alan ve fibrozis oluşumları olarak kaydedilmiştir^{19,20}. Bazı Salmonidae üyelerinde fenolik bileşenlerin uygulanması sonucunda deride rapor edilen ülseratif oluşumlara^{16,21} çalışmamızda rastlanmamıştır. Ham petrol uygulaması sonucunda gözlenen histolojik deformasyonlar genel anlamda önceki araştırmaların sonuçlarına benzemektedir, ancak diğer rapordan farklı olarak dermiste yoğun bir pigment birikimi not edilmiştir. Özellikle mukoz membranlara özgü ve çok iyi tanımlanmış bir olgu olan prekanseröz melanosis^{22,23}, ham petrolün teleostlardaki ekotoksikolojik etkileri konusunda çok daha dikkatli olunması gerektiğinin bir işareti olarak düşünülmelidir. Bu durumun, yapılan uygulama ile epidermin neredeyse yok olmuş olmasıyla bağlantılı olabileceği öne sürülebilir, hatta ham petrolün pigment oluşum-farklılaşma - birikim mekanizmalarını düzenleyen nöroendokrin sistem üzerinde de etkili olduğu da akla gelebilir.

Ancak bu varsayımların kanıtlanabilmesi için çok daha ayrıntılı araştırmalar gerekmektedir.

Dermiste konsantrasyon ve maruziyet süresi bağlamında giderek artan şiddette izlenen fibrozis oluşumuna dair herhangi bir rapora ulaşılamamıştır. Bu oluşumların onarıcı yapılaşmalar olarak değerlendirilip değerlendirilemeyecekleri, bir diğer deyişle kronik maruziyette nasıl bir seyir izleyecekleri, özellikle incelenmesi gereken bir konudur.

Araştırmamızda özellikle subkütanöz tabakada giderek genişleyen nekrotik alanların varlığı, ham petrol çözeltisinin sitolojik açıdan güçlü toksik etkisi hakkında bir diğer önemli histolojik kanıt olarak değerlendirilmiştir. Toksik maddelerin, hücre zarları geçirgenliğini değiştirerek sitosol pH'ı ve mitokondriyal enzim aktivasyonundaki değişimlere yol açabilecekleri, böylece nekroz oluşumunu tetikledikleri öne sürülmektedir²³. Bu görüşün sadece histolojik bulgularla değerlendirilmesi elbette olası değildir, ancak artan konsantrasyon ve uzayan uygulama süresinin, nekrotik alanlarda çok belirgin genişlemeye yol açtığı net olarak söylenebilir.

Ham petrol uygulaması sonucunda subkutanöz kas tabakasında ortaya çıkan ve giderek belirgin ölçüde genişleyen nekrotik alanların varlığı, dermomyositis olgusunu düşündürcek boyuttadır. Dermomyositis, enflamatuvar myopati ailesinin bir alt grubu olarak sınıflandırılan otoimmün bir bağ doku hastalığıdır. Bu hastalık endotel duvarlarının hasarına bağlı olarak ortaya çıkar ve endomiyumu da etkiler. Endotel hücrelerin şişmesi ve sınırlarının değişmesine bağlı olarak gelişir, çünkü hücrelerde mikrovakuol oluşumları artar. Ayrıca düz endoplazmik retikulum yok olabilir veya gelişimi gerileyebilir. Tüm bu etmenler vasküler nekrozla sonuçlanan bir dizi patolojik durumu tetikler^{19,23}.

Çizgili kaslar birçok ilaç ve toksik maddeden kolayca etkilenebilen bir dokudur. Herhangi bir nedenle kas doku fibrillerinde oluşan hasar kalsiyum iyonu salınmasına yol açarak miyosit membranlarında bozulmalara neden olur²⁰. Doku tahribatı makroskobik ve mikroskobik lezyonların yanı sıra fizyolojik olarak da lenfosit miktarını arttırmaktadır²¹.

Uygulama sonuçlarımızda subkütanöz tabakada izlenen bir diğer histopatoloji ise kas demetlerinde fibriler yapının kaybolmaya yüz tutmasıdır. Bu durum da polimiyositis olarak nitelendirilebilir. Fibriler yapıda nekroz oluşumu olarak da tanımlanabilen, sitotoksositeye bağlı olarak gelişebileceği bildirilen polimiyositisde T hücrelerinin rol oynayabileceği, ayrıca makrofaj sayısının ve CD₈ reseptör ifadesinin arttığı kaydedilmektedir²³.

Yukarıda da belirtildiği üzere hem polimiyositis, hem de dermomyositis olgularının sitotoksositeyle ilgili olabilecekleri öne sürülse de, sebepleri konusunda henüz tam bir açıklık olmadığını belirtmek gerekir^{19,22,23}. Bu noktada

her iki hastalığın mekanizmaları da bilindiği kadarıyla aktarılmıştır. Ancak bulgularımız, ham petrol etkisinin sadece deri ile sınırlı kalmayacağını ve subkütanöz tabaka üzerinden sistemik etki gösterebileceğini kuvvetle düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. **Marty GD, Hoffmann A, Okihiro MS, Hepler K, Hanes D:** Retrospective analysis: bile hydrocarbons and histopathology of demersal rockfish in Prince William Sound, Alaska, after the Exxon Valdez oil spill. *Mar Environ Res*, 56, 569-584, 2003.
2. **Fent K:** Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology*, 205 (3): 223-240, 2004.
3. **Carls MG, Rice SD, Hose JE:** Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval Pacific herring (*Clupea pallasii*). *Environ Toxicol Chem*, 18 (3): 481-493, 1999.
4. **Heintz RA, Short JW, Rice SD:** Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part II. Increased mortality of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) embryos incubating downstream from weathered Exxon Valdez crude oil. *Environ Toxicol Chem*, 18 (3): 494-503, 1999.
5. **Heintz RA, Rice SD, Wertheimer AC, Bradshaw R, Thrower FP, Joyce JE, Short JW:** Delayed effects on growth and marine survival of pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha* after exposure to crude oil during embryonic development. *Mar Ecol Prog Ser*, 208, 205-216, 2000.
6. **Peterson CH, Rice SD, Short JW, Esler D, Bodkin JL, Ballachey BE, Irons DB:** Long-term ecosystem response to the Exxon Valdez oil spill. *Science*, 302 (5653): 2082-2086, 2003.
7. **Incardona JP, Carls MG, Teraoka H, Brown DW, Collier TK, Scholz NL:** Aryl hydrocarbon receptor-independent toxicity of weathered crude oil during fish development. *Environ Health Perspect*, 113 (12): 1755-1762, 2005.
8. **Incardona JP, Collier TK, Scholz NL:** Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol Appl Pharmacol*, 196 (2): 191-205, 2004.
9. **Berdougo E, Coleman H, Lee DH, Stainier DY, Yelon D:** Mutation of *weak* atrium/atrial myosin heavy chain disrupts atrial function and influences ventricular morphogenesis in zebrafish. *Development*, 130 (24): 6121-6129, 2003.
10. **Joseph EM:** Zebrafish IRX1b in the embryonic cardiac ventricle. *Dev Dyn*, 231(4): 720-6, 2004.
11. **Scott KK, Norris RA, Potter SS, Norrington DW, Baybo MA, Hicklin DM, Kern MJ:** GeneChip microarrays facilitate identification of Protease Nexin-1 as a target gene of the Prx2 (S8) homeoprotein. *Cell Biol*, 22 (2): 95-105, 2003.
12. **Cowart LA, Okamoto Y, Pinto FR, Gandy JL, Almeida JS, Hannun YA:** Roles for sphingolipid biosynthesis in mediation of specific programs of the heat stress response determined through gene expression profiling. *J Biol Chem*, 278 (32): 30328-30338, 2003.
13. **Brand DG, Fink R, Bengueyfield W, Birtwell IK, Mcallister CD:** Salt water-acclimated pink salmon fry (*Oncorhynchus gorbuscha*) develop stress-related visceral lesions after 10-day exposure to sublethal concentrations of the water-soluble fraction of north slope crude oil. *Toxicol Pathol*, 29 (5): 574-584, 2001.
14. **Machado M R, Fanta E:** Effects of Organophosphorus Metyl Parathion on the Branchial Epithelium of a Freshwater Fish *Metynnis roosevelti*. *Braz Arch Biol Technol*, 46(3): 361-372, 2003.
15. **Akaishi FM, Silva de Assis HC, Jakobi SCG, Eiras-Stofella DR, St-Jean SD, Courtenay SC, Lima EF, Wagener ALR, Scofield AL, Oliveira Ribeiro CA:** Morphological and neurotoxicological findings in Tropical Freshwater fish (*Astyanax sp.*) after waterborne and acute exposure to Water Soluble Fraction (WSF) of crude oil. *Arch Environ Contam Toxicol*, 46: 244-253, 2004.
16. **Law M:** Differential diagnosis of ulcerative lesions in fish. *Environ Health Perspect*, 109 (Suppl. 15): 681-686, 2001.
17. **Önen Ö, Gündüz Ö, İşisağ Üçüncü S:** Ham petrolün suda çözünebilir kısımlarının *Pelvicachromis pulcher* (Boulenger, 1901) (Cichlidae, Teleostei) bağırsak ve karaciğeri üzerindeki etkileri. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17 (Suppl-A): S105-S110, 2011.
18. **Baumann PC:** The use of tumors in wild fish to assess ecosystem health. *Aquat Ecosyst Health*, 1: 135-142, 1992.
19. **Engel AG, Arahata K:** Mononuclear cells in myopathies: quantitation of functionally distinct subsets, recognition of antigenspecific cell-mediated cytotoxicity in some diseases, and implications for the pathogenesis of the different inflammatory myopathies. *Hum Pathol*, 17, 704-721, 1986.
20. **Jerusalem F, Rakusa M, Engel AG, MacDonald RD:** Morphometric analysis of skeletal muscle capillary ultrastructure in inflammatory myopathies. *J Neurol Sci*, 23, 391-401, 1974.
21. **Whitaker JN, Engel WK:** Vascular deposits of immunoglobulin and complement in idiopathic inflammatory myopathy. *N Engl J Med*, 286, 333-338, 1972.
22. **Illa I, Nath A, Dalakas MC:** Immunocytochemical and virological characteristics of HIV-associated inflammatory myopathies: similarities with seronegative polymyositis. *Ann Neurol*, 49, 474-481, 1991.
23. **Emslie-Smith AM, Arahata K, Engel AG:** Major histocompatibility complex class-I antigen expression, immunolocalization of interferon subtypes and T-cell-mediated cytotoxicity in myopathies. *Hum Pathol*, 20, 224-231, 1989.