T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BEŞ FARKLI METAL KARIŞIMININ ERGİN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio,* Hamilton 1822) SOLUNGAÇ DOKUSUNDA OKSİDATİF STRES CEVABI

MARTİN ORLİNOV KANEV

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: DOÇ. DR. FULYA DİLEK GÖKALP

EDİRNE-2016

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Mustafa ÖZCAN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

Prof. Dr. Yılmaz ÇAMLITEPE

Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Fulya Dilek GÖKALP

Tez Danışmanı

Bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoloji Anabilim Dalında bir Yüksek lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	İmza
Doç. Dr. Fulya Dilek GÖKALP	
Doç. Dr. Utku GÜNER	
Yrd. Doç. Dr. Pınar GÖÇ RASGELE	

Tarih: 30/06/2016

Tarih: 16/06/2016

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI LİSANSÜSTÜ PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

16/06/2016

Martin Orlinov KANEV

Yüksek Lisans Tezi

Beş Farklı Metal Karışımının Ergin Zebra Balığı (*Danio rerio*, Hamilton 1822) Solungaç Dokusunda Oksidatif Stres Cevabı

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Endüstrileşme ve şehirleşmedeki artış antropojenik kirleticilerin miktar ve çeşitliliğinde artışa neden olmakta, denizler ve tatlı sulara ulaşarak canlılar için tehlike oluşturmaktadır. Çevrede karışımlar halinde bulunan metallerin organizmalarda oluşturduğu toksik cevap temel toksikoloji konularından biridir.

Bu çalışmada alüminyum (Al), arsenik (As), kadmiyum (Cd), kobalt (Co) ve krom (Cr) metallerinin içme suyu ve sulama suyu standartları limitlerine göre Zebra balığına karışım halinde muamelesi sonucu solungaç dokularında ICP-MS ile metal birikimi, RAPD-PCR ile DNA hasarı ve qRT-PCR ile de oksidatif stres oluşumuna etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Karışım halinde etkileşimleri test edilecek olan metaller iki farklı konsantrasyon serisi ile; içme suyu limitlerinde Al, As, Cd, Co ve Cr için sırasıyla 300, 10, 5, 10 ve 50 µg/L ve sulama sularında izin verilen limitlerde sırasıyla 5000, 100, 10, 50 ve 100 µg/L olarak Zebra balıkları ile 5, 10 ve 20 gün kronik muamele yapılarak test edilmiştir.

Ağır metal birikimleri değerlendirildiğinde, test edilen metallerden sadece Co' ın Zebra balığı solungaç dokusunda uygulama dozu ve süreye bağlı olarak artış göstermediği saptanmıştır. Diğer metallerde zamana ve doza bağlı birikim değişimleri gözlenmiştir. Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA analiz sonuçları, doza ve zamana bağlı yüzde genomik kalıp stabilitede azalma meydana gelerek DNA hasarı oluşturduğunu göstermektedir. Antioksidan sistem elemanlarından olan Katalaz ve CuZn-SOD gen ifadelerinde kontrole göre anlamlı artışlar olmasına rağmen, süre artışı ile gen ifadelerinin azaldığı saptanmıştır.

Yıl : 2016
Sayfa Sayısı : 80
Anahtar Kelimeler : Alüminyum, Antioksidan enzim, Arsenik, DNA hasarı, Kadmiyum, Kobalt, Krom, Metal birikimi, Oksidatif stres, Zebra balığı

Master's Thesis

Oxidative Stress Response of Five Different Mixed Metals on Adult Zebra Fish (*Danio rerio*, Hamilton 1822)

Trakya University Institute of Natural Sciences

Department of Biology

ABSTRACT

The increase in industrialization and urbanization leads to an increase in the quantity and variety of anthropogenic pollutants, it is dangerous for organisms when reaching the groundwater. Toxic substance response is the basic research area of the metals exist in environment.

In this study, it is aimed to investigate the accumulation and formation of oxidative stress of mixtures of Aluminum, chromium, cobalt, cadmium and arsenic metals in drinking water and irrigation water exposure limits on gill tissues of Zebra fish. Metal accumulation was analyzed with ICP-MS, DNA damage with RAPD-PCR method, and the antioxidant enzymes was evaluated by qRT-PCR method. Two different concentration series were used to investigate the genotoxic effect; drinking water limits of arsenic, cadmium, chromium, cobalt and aluminum, respectively 10 µg / L, 5 µg / L, 50 µg / L, 10 µg / L, 300 µg / L and within the allowed irrigation waters limits at 100 µg / L, 10 µg / L, 100 µg / L, 50 µg / L and 5000 µg / L respectively with the chronic treatment of 5,10, and 20 days.

When metal accumulation evaluated, only cobalt accumulation was not significantly increased as the time and concentration increase in Zebrafish gill tissue. Accumulation of the other metals also increased. RAPD analysis results showed that % genomic template stability was decreased as the concentration and exposure time increase. Although gene expressions of Catalase and CuZn-SOD which antioxidants elements were significantly increased compare wtih control, gene expressions were improved with time.

Year : 2016
Number of Pages : 80
Keywords : Aluminium, Antioxidant enzym, Arsenic, Cadmium, Chromium, Cobalt, DNA damage, Metal accumulation, Oxidative stress, Zebra fish

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde, araştırma aşamasında, sonuçların değerlendirilmesi ve tamamlanmasında hem lisans hem de lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini paylaşarak yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Doç. Dr. Fulya Dilek GÖKALP' e teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmamızı, maddi olarak 2015/179 no'lu proje ile destekleyen TÜBAP'a ve çalışmanın bir kısmının yürütüldüğü TÜTAGEM'e teşekkür ederim.

Çift lisansüstü eğitimin zorluğuna rağmen her zaman anlayışı ile yanımda olan diğer danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Elvan BAKAR' a; sucul organizmalarla deneysel çalışmalar konusundaki bilgileri için Doç. Dr. Utku GÜNER' e; kalitesi ve farklılığı ile her zaman desteklerini esirgemeyen Arş. Gör. Gamze ALTINTAŞ KAZAR' a teşekkür ederim.

Gerek tez çalışmalarım sırasında gerekse sosyal hayatta destekleriyle her zaman yanımda olan, bana sabreden ve destek veren dostlarım Onur DİNÇ ve Kezban ÖZDEMİR' e; tanıdığım için hiç pişman olmadığım Furkan Vahit ÖZALIR' a; bilgi ve deneyimleriyle yeni bakış açıları kazanmamı sağlayan hem de hayatta sahip olmak isteyebileceğiniz bir manevi aile ortamı yaratan hocalarım Sayın Arş. Gör. Dr. Mitat AYDOĞDU ve Yrd. Doç. Dr. Halide AYDOĞDU' ya sonsuz minnetimi sunarım.

Bugünlere gelmemde kuşkusuz en büyük paya sahip olan ve bana her konuda sonuna kadar destek veren aileme en içten teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER **Sayfa**

ÖZET I

ABSTRACT III

TEŞEKKÜR V

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ VIII

ŞEKİLLER DİZİNİ XI

TABLOLAR DİZİNİ XII

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

2.1. Metaller 3

2.1.1. Canlılarda Metallerin Biyobirikimi 7

2.1.2. Sucul Organizmalarda Metal Toksisitesi 8

2.1.3. Metallerin Genotoksisitesi 9

2.1.3.1. Alüminyum (Al) 10

2.1.3.2. Arsenik (As) 12

2.1.3.3. Kadmiyum (Cd) 14

2.1.3.4. Kobalt (Co) 16

2.1.3.5. Krom (Cr) 17

2.2. Ekotoksikoloji Çalışmalarında Balıkların Kullanımı 19

2.2.1. Zebra Balığının Genel Özellikleri 21

2.2.1.1. Zebra Balığı ile Çalışmanın Avantajları 22

2.2.2. Solungaç Yapı ve İşlevleri 23

2.3. Oksidatif Stres 24

2.3.1. Serbest Oksijen Radikallerinin (ROS) Oluşumu 25

2.3.1.1. Oksidanların Kaynakları 26

2.3.1.1.1. Oksidanların Endojen Kaynakları 26

2.3.1.1.2. Oksidanların Eksojen Kaynakları 27

2.3.2. Oksidanların Oluşumunun Engellenmesi 28

2.3.2.1. Antioksidanlar 29

2.3.2.1.1. Süperoksid Dismutaz (SOD) 30

2.3.2.1.2. Katalaz (CAT) 31

2.4. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) 32

2.4.1. RAPD'in Mekanizması ……... 33
2.5. Kantitatif Real Time PCR …….. 34
2.5.1. Taq-Man® Prob Yöntemi ……... 35
2.5.2. SYBR Green Yöntemi ……..... 36
2.6. ICP-MS Test Yöntemi ……... 36
MATERYAL VE METOD ……..... 38
3.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Adaptasyonu …….. 38
3.2. Deneyde Kullanılan Metal Çözeltileri Muamelesi ……. 38
3.3. Deneysel Çalışma ……... 39
3.4. Metal Birikiminin Belirlenmesi …… 39
3.5. DNA Ekstraksiyonu ve RAPD Analizi …….. 40
3.6. RNA Analizi …….. 41
3.7. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) Çalışmaları ……... 41
3.8. İstatistiksel Analiz …….. 42
SONUÇLAR …… 43
4.1. Solungaç Dokularında Metal Birikimleri ……... 43
4.2. Toplam DNA Hasarı …….. 50
4.3. Gen Ekspresyon Düzeyleri ……. 54
TARTIŞMA ……. 57
KAYNAKLAR …… 65
ÖZGEÇMİŞ …… 80

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Al	**:**	Alüminyum
As	**:**	Arsenik
ATP	**:**	Adenozin tri fosfat
℃	**:**	Santigrad derece
CAT	**:**	Katalaz
Cd	**:**	Kadmiyum
cDNA	**:**	Tamamlayıcı deoksiribo nükleik asit
CH_3OH	**:**	Metanol
Cl	**:**	Klor
cm	**:**	Santimetre
Co	**:**	Kobalt
Cr	**:**	Krom
Cu-Zn-SOD	**:**	Bakır-Çinko süperoksit dismutaz
DNA	**:**	Deoksiribo nükleik asit
dNTP	**:**	Deoksinükleotid
e^-	**:**	Elektron
EDTA	**:**	Etilendiamin tetraasetik asit
ETS	**:**	Elektron transfer sistemi
Fe-SOD	**:**	Demir süperoksit dismutaz
GSH	**:**	Glutatyon
GSH-Px	**:**	Glutatyon peroksidaz
GTS	**:**	Genomik kalıp stabilitesi
H	**:**	Hidrojen
HNO_3	**:**	Nitrik asit
HO_2•	**:**	Hidroperoksi radikali
H_2O_2	**:**	Hidrojen peroksit
Hg	**:**	Civa
HO•	**:**	Hidroksil radikali
HOCl	**:**	Hipoklorit
IARC	**:**	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
ICP-MS	**:**	İndüktif olarak eşleştirilmiş plazma - kütle spektrometresi

IL-1β	**:**	İnterlökin 1 beta
IL-6	**:**	İnterlökin 6
IL-8	**:**	İnterlökin 8
K	**:**	Potasyum
KCl	**:**	Potasyum klorür
L	**:**	Litre
LC_{50}	**:**	Ortalama öldürücü doz
LPO	**:**	Lipid peroksidasyonu
LOOH	**:**	Lipid hidroperoksit
m^3	**:**	Metre küp
mg	**:**	Miligram
mm	**:**	Milimetre
Mn	**:**	Mangan
Mn-SOD	**:**	Mangan süperoksit dismutaz
mRNA	**:**	Mesajcı ribonükleik asit
µM	**:**	Mikromolar
µg	**:**	Mikrogram
µL	**:**	Mikrolitre
Na	**:**	Sodyum
NADPH	**:**	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
Ni	**:**	Nikel
Ni-SOD	**:**	Nikel süperoksit dismutaz
ng	**:**	Nanogram
NO	**:**	Nitrik oksit
O_2	**:**	Oksijen
O_2•	**:**	Süperoksit radikali
O_2^{-2}	**:**	Peroksit
$^1O_2$	**:**	Singlet oksijen
OH•	**:**	Hidroksil radikali
Ort	**:**	Ortalama
p	**:**	Anlamlılık
ppb	**:**	Milyarda bir

ppm	**:**	Milyonda bir
PCR	**:**	Polimeraz zincir reaksiyonu
Pb	**:**	Kurşun
qRT-PCR	**:**	Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RAPD	**:**	Rastgele çoğaltılmış polimorfik deoksiribonükleik asit
RNA	**:**	Ribonükleik asit
RNS	**:**	Reaktif nitrojen türleri
RO_2	**:**	Alkoksil radikali
RO_2•	**:**	Alkil peroksi radikali
ROS	**:**	Reaktif oksijen türleri
Se	**:**	Selenyum
SH	**:**	Standart hata
Sn	**:**	Kalay
SO_4	**:**	Sülfat
SOD	**:**	Düperoksit dismutaz
SPSS	**:**	Sosyal bilimler için istatistik paket programı
TAE	**:**	Tris, asetat ve etilendiamin tetraasetik asit
TNF-α	**:**	Tümör nekroz faktör alfa
UV	**:**	Ultra viyole

ŞEKİLLER DİZİNİ **Sayfa**

Şekil 2.1. Ağır metallerin balıklarda vücuda alınımı ve dağılımı …… 5
Şekil 2.2. Ağır metallerin doğaya yayılımları …….. 6
Şekil 2.3. Alüminyumun oksidatif stres oluşumundaki rolü …… 11
Şekil 2.4. İnorganik arseniğin metabolizması …….. 13
Şekil 2.5. Kadmiyum kaynaklı oksidatif stres oluşum mekanizması ……... 15
Şekil 2.6. Kobaltın reaktif oksijen türleri oluşumuna etkisi ……..... 17
Şekil 2.7. Kromun neden olduğu oksidatif stresin oluşumu ……..... 18
Şekil 2.8. Zebra balığı (*Danio rerio*, Hamilton 1882) …….. 21
Şekil 2.9. Balıklarda solungaç yapısı …… 23
Şekil 2.10. Reaktif oksijen türlerinin endojen kaynakları …… 27
Şekil 2.11. Reaktif oksijen türlerinin eksojen kaynakları ……..... 28
Şekil 2.12. Antioksidanların genel çalışma mekanizması …… 29
Şekil 2.13. SOD aktivitesi …… 31
Şekil 2.14. RAPD-PCR reaksiyonunun şematik gösterimi …….. 33
Şekil 2.15. Taq-Man ® prob yöntemi ……..... 35
Şekil 2.16. SYBR Green' in çift iplikli DNA' ya bağlanması ……. 36
Şekil 2.17. ICP-MS test sistemi …… 37
Şekil 4.1. Zebra balığı solungaç dokusunda alüminyum birikimi ……..…….. 45
Şekil 4.2. Zebra balığı solungaç dokusunda arsenik birikimi ……..……. 45
Şekil 4.3. Zebra balığı solungaç dokusunda kadmiyum birikimi ……..……... 46
Şekil 4.4. Zebra balığı solungaç dokusunda kobalt birikimi ……..…….. 46
Şekil 4.5. Zebra balığı solungaç dokusunda krom birikimi ……..…… 47
Şekil 4.6. Metal muamelesi sonucu farklı primerlere ait RAPD profilleri ….. 51
Şekil 4.7. Solungaç dokusu % GTS değerlerinde meydana gelen değişim …. 54
Şekil 4.8. Katalaz gen ifadesindeki değişimler ……. 55
Şekil 4.9. CuZn-SOd gen ifadesindeki değişimler ……... 56

TABLOLAR DİZİNİ **Sayfa**

Tablo 3.1. qRT-PCR'da kullanılan genler ve primer sekansları ile RAPD kullanılan primerler ve sekansları ……..... 42

Tablo 4.1. Zebra balığı solungaç dokularındaki metal birikimleri ……... 43

Tablo 4.2. 5.gün düşük doz metal uygulaması sonucu metaller arasındaki korelasyon ……. 47

Tablo 4.3. 5.gün yüksek doz metal uygulaması sonucu metaller arasındaki korelasyon ……. 48

Tablo 4.4. 10.gün düşük doz metal uygulaması sonucu metaller arasındaki korelasyon ……. 48

Tablo 4.5. 10.gün yüksek doz metal uygulaması sonucu metaller arasındaki korelasyon ……. 49

Tablo 4.6. 20.gün düşük doz metal uygulaması sonucu metaller arasındaki korelasyon ……. 49

Tablo 4.7. 20.gün yüksek doz metal uygulaması sonucu metaller arasındaki korelasyon ……. 50

Tablo 4.8. RAPD profillerinde oluşan ve yok olan bantların moleküler büyüklükleri …….. 52

Tablo 4.9. Ağır metal uygulaması sonucu oluşan ve yok olan bantların sayısı 53

Tablo 4.10. Balık solungaç dokusunda ağır metal uygulamasına bağlı % GTS' de meydana gelen değişimler ……. 53

BÖLÜM 1

GİRİŞ VE AMAÇ

İnsan faaliyetleri ile çeşitli metaller yeraltı ve yüzey sularına salınmaktadır. Metallerin canlılar üzerinde gösterdiği etkiler çevreye salınan bu metallerin kontrol edilmesi ve sınırlamalar getirilmesi açısından önem taşımaktadır. Çevrede bulunan metaller karışımlar halinde bulunmakta ve beraber bulunmaları ayrı ayrı etkilerinden farklı sonuçlar ortaya çıkarabilmektedir.

İçerikleri ve biyolojik etkileşimleri karmaşık olan metal karışımların etkisinin tahmin edilmesi insan hayatı ve ekolojik risk değerlendirmesi açısından dikkat çekici sonuçlar doğurmuştur [1]. Birçok ağır metal karışımı için bu kompleks durum, bu metallerin temel hücresel hedefler ile etkileşime girmesi fakat bu hedeflere afinitelerinin farklılık göstermesinden ileri gelir [2]. Su kalite standartlarını oluşturmak üzere tek çeşit metalin toksisitesinin araştırıldığı çalışmalar gerçekte kompleks doğal çevrede meydana gelen oluşumları yansıtmamaktadır ve dolayısıyla şu anki standartlara göre metallerin toksik etkileri düşük veya yüksek tahmin edilebilmektedir [3].

Metaller reaktif oksijen türevleri oluşturarak protein, DNA ve hücresel lipidler üzerinde değişiklikler meydana getirmekte ve hücre ölümüne sebep olmaktadırlar [4, 5]. Al, As, Cd, Co ve Cr çeşitli kaynaklarca salınmaları sonucu çevre sularında bulunan metallerdir. Al, As, Cd, Co ve Cr metallerinin ayrı ayrı test edilerek insanlar, memeliler ve balıklar üzerinde yapılan çalışmalarında, bu metallerin hücre siklusunu değiştirdiği,

antioksidan sistem üzerinde etkili olduğu, çok sayıda genin ifadesini değiştirdiği saptanmıştır [6, 5]. Bu metallerin karışım halinde canlılar üzerinde muamelesi ile oksidatif strese cevabın araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu sebepten dolayı Al, As, Cd, Co ve Cr metallerin Zebra balığı üzerinde farklı sürelerde muamele edilmesiyle solungaç dokusunda antioksidan sistem üzerinde genotoksik etkisinin tespit edilmesi araştırma konusunu oluşturmaktadır.

Bu çalışmada ilk defa beş farklı ağır metalin (Al, As, Cd, Co, Cr) beraber kullanımının Zebra balığı solungaç dokusu üzerinde ICP-MS ile metal birikimi, RAPD-PCR ile DNA hasarı, qRT-PCR ile oksidatif stres oluşumuna etkisinin araştırılarak, genotoksik etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Elde edilecek sonuçlar bu konudaki eksik veriyi tamamlar nitelikte olabilecektir. Metaller çalışmada içilebilir veya içme suyu olarak işlenebilir metal dozlarında balık üzerinde muamele yapılması, insanların doğal olarak bu metalleri alması ile paralel uygunluk gösteren materyal metoda sahiptir. Elde edilecek sonuçlar toplum sağlığı açısından bir veri niteliğinde olabilecek ve insan sağlığı ile ilgili daha ileri çalışmalara ışık tutabilecek nitelikte olabilecektir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Metaller

Endüstri ve uygarlığın temelini oluşturan metaller organizmalar için hayati öneme sahiptir [7, 8]. Fazla ya da doğal yapıda olmayan metalloidlerin canlı yapısına girmesi toksik etkilere yol açabilmektedir. Metallerin diğer toksik maddelerden ayırıcı özelliği yok edilememeleridir. Metallerin organizmaya giriş yolları; çevresel taşınım sonucu besinler ve içme suları ile insanlar tarafından ya da antropojenik olarak hava, su, toprak, besinler yolu ile gerçekleşebilir. Periyodik tabloda bulunan 105 elementten 80 kadarını metaller oluşturur. Kadmiyum (Cd), alüminyum (Al), kurşun (Pb), civa (Hg) ve manganez (Mn) gibi ağır metaller biyolojik sistemlerle etkileşerek ciddi sağlık sorunlarına yol açabilmektedir [9].

Metaller biyolojik olarak 3 grupta incelenebilir [10]:

1. Esas elementler (Hafif metaller): Na, K, Ca gibi sıvı ortamlarda hareketli katyonlar olarak taşınırlar.

2. Yan elementler (Geçiş elementleri): Fe, Cu, Co, Mn gibi düşük konsantrasyonlarda esansiyel olan, yüksek konsantrasyonlarda ise toksik etki gösteren metallerdir.

3. İz elementler (Metalloitler): Hg, Pb, Cd, As gibi metabolik aktiviteler için sıklıkla ya da hiç kullanılmayan fakat çok düşük konsantrasyonlarda hücrede toksik etki gösteren metallerdir.

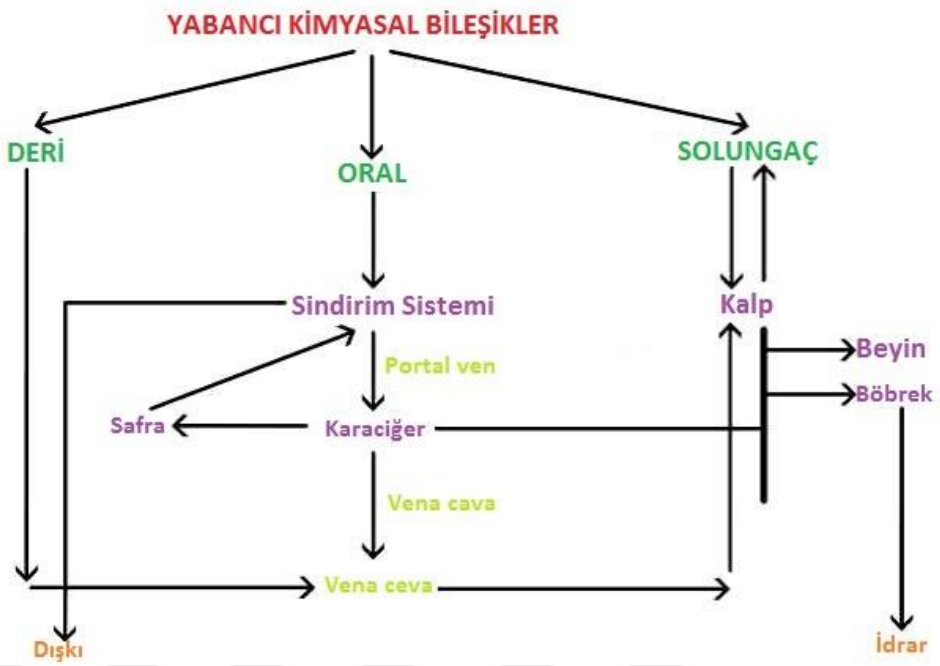
Yan elementler ve iz elementler literatürde ağır metal olarak adlandırılırlar. Maden ocakları, çeşitli metal ve kağıt endüstrilerinin atık suları, gübreler, fosil yakıtlar, pestisitler, çeşitli kimyasallar ve evsel atıklar, ağır metallerin doğaya karışmasına sebep olan başlıca kaynaklardır [11].

Ekosistemin büyük bölümünü oluşturan su ortamı, pek çok atığın bulunduğu bölgedir. Ekosistem kirliliğinin en büyük kaynağı ağır metallerdir. Doğal sular, toksik etki oluşturmayacak şekilde ağır metal içermektedir [12].

Deniz, göl ve akarsular gibi su kaynakları atıkların yoğun olarak bulunması sonucu derişimleri sürekli artan ağır metaller, sucul organizmalar tarafından alınmaktadır. Böylece ağır metaller besin zinciri aracılığıyla tüm canlılara ulaşmakta ve aktif doku ve organlarında birikmektedir. Organizmalarda metal birikimi hücresel ve moleküler düzeyde işlev ve yapı bozukluklarına sebep olmaktadır [13].

Bazı metaller çok yüksek derişimlere ulaştıklarında organizmada depolanmaya başlarlar. Canlının ağır metale maruz kalma süresi ve ortamın derişimi organizmada birikme sınırını etkileyen faktörlerdendir. Balıkların metabolik olarak aktif organlarında öldürücü olmayan derişimlerde daha fazla birikmesinin, en yüksek düzeyde karaciğerde, en düşük düzeyde ise kas dokusunda depolandığını rapor edilmiştir [12].

Sucul organizmalardaki ağır metal birikimi canlının türüne, metalin özelliklerine, derişimine, canlıya etki süresine, canlının hangi gelişme evresinde olduğuna ve ortamın fiziksel/ kimyasal özelliklerine bağlı olarak değişebilmektedir [13]. Karnivor balıkların vücutlarındaki ağır metal konsantrasyonu, herbivor balıklara kıyasla daha yüksektir. Besin zincirinin üst basamaklarında bulunan balıklar besin yoluyla diğer canlılarda bulunan metalleri de aldıklarından fazla biriken metaller akut veya kronik zehirlenmelere yol açarlar [8] (Şekil 2.1). Metaller doğal su ortamlarında serbest iyonlar, inorganik veya organik bileşikler ya da partikül maddelerle absorbe şekilde bulunabilirler. Doğal su ortamlarının sedimenti içinde, çökmüş veya absorbe olmuş metaller, fiziksel ve kimyasal yollarla iyonik forma dönüşerek toksik etki gösterebilirler.



Şekil 2.1. Ağır metallerin balıklarda vücuda alınımı ve dağılımı

Sucul ortamda farklı formlarda bulunabilen metaller su canlılarının vücutlarında birikirler. Birikim aşağıda belirtildiği gibi gerçekleşir:

1. Su bulunan çözünmüş veya organik moleküllere bağlı iyonların su ile beraber alınmasıyla,

2. İçinde metalleri biriktirmiş besin maddelerinin alınmasıyla,

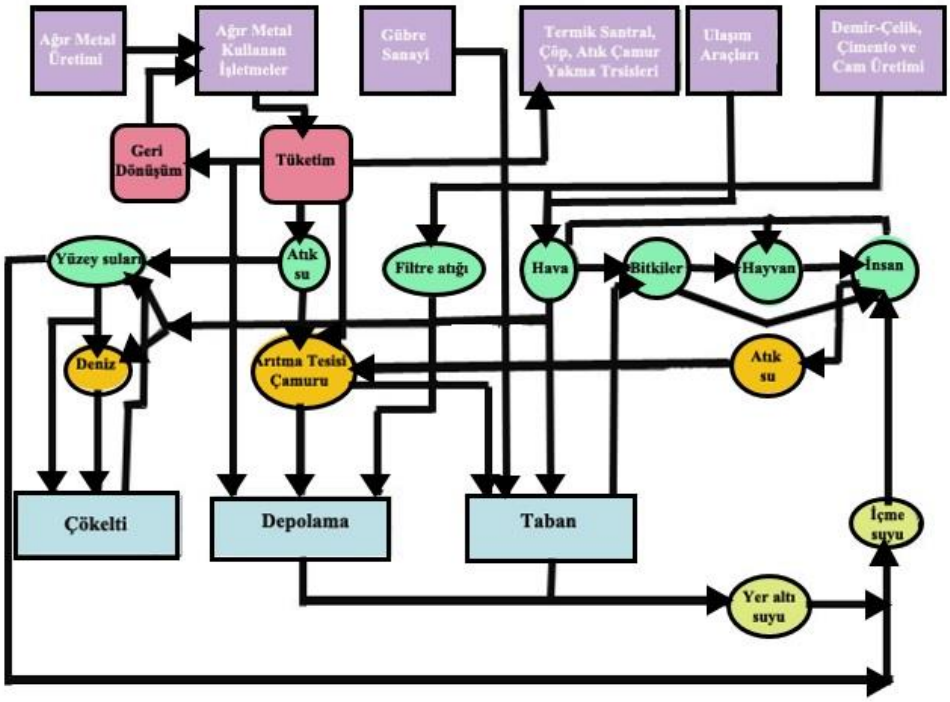
3. Yüzeylerinde ağır metalleri absorbe etmiş sestonlar ile,

4. Toksik metal iyonları ile organizmaların ürettiği bazı maddeler arasındaki çekim nedeni ile ortaya çıkan absorbsiyon yoluyla [5].

Metaller ekosistemde birikim gösterdikleri için en sık rastlanan toksik maddeler olarak karşımıza çıkmaktadır. Metaller doğaya sadece volkanik püskürmeler, orman yangınları ve doğal kayaçların çözünmesi ile değil aynı zamanda madencilik faaliyetleri, yakıt olarak kullanılan maddeler, kentsel kanalizasyon atıkları ve tarımsal uygulamalar gibi antropojenik faaliyetler sonucunda da karışmaktadır [14] (Şekil 2.2). Küresel ölçekte dağlardan tepelere, denizlerden okyanuslara kadar insan faaliyetleri sonucu kirlenmiş birçok alan bulunmaktadır. Bazı metaller ise suya direkt karışma yerine atmosferde

yoğunlaşma sonucu yağmur ile sulara dolaylı yoldan karışmaktadır. Nehirler ile taşınan metaller deniz ekosistemine en fazla metal girişini sağlamaktadır. Nehirler insanların hem yaşamsal hem de endüstriyel faaliyetlerini sürdürdüğü alanlardan geçerken buradan nehirlere dökülen metalleri, sularını boşalttıkları denizlere de dökerler [15].

Ekotoksikologlar ve çevre bilimciler doğada yoğun birikim olan ve çevreye zarar veren metaller için "ağır metal" terimini kullanmayı tercih etmektedirler (Şekil 2.3). En yoğun çalışılan ağır metaller ise kadmiyum (Cd), civa (Hg), çinko (Zn), bakır (Cu), nikel (Ni), krom (Cr), kurşun (Pb), kobalt (Co), vanadyum (Vn), titanyum (Ti), demir (Fe), mangan (Mn), gümüş (Ag) ve kalay (Sn) dır. Cd, Pb ve Hg gibi bazı ağır metaller toksik etkilerinin fazla olmasından dolayı özellikle çalışılan metaller olmuştur [16]. Birçok metal de canlı vücudu için gerekli olmasına rağmen yüksek dozlarda toksik etki göstermektedir. Örneğin Fe hemoglobin yapısında bulunur, Cu solunum pigmentlerinde, Co B12 vitamininde, Mo, Zn ve Mn enzimlerin yapısında bulunmaktadır. Hafif metaller olan Ca, Na ve K da birçok biyolojik olayda görev alır [17].



Şekil 2.2. Ağır metallerin doğaya yayılımları

Fe, Cu, Co ve Mn gibi geçiş metalleri gerekli elementler olmalarına karşılık yüksek oranda bulunduklarında toksik etki gösterirler. Hg, Pb, Sn, Ni, Se, Cr ve As gibi bazı metaller de metabolik reaksiyonlarda genellikle görev almamalarına karşılık düşük konsantrayonda bulunduklarında sorun yaratmazken yüksek konsantrasyona ulaştıklarında canlı vücudu için zehir özelliği göstermektedirler [18].

2.1.1. Canlılarda Metallerin Biyobirikimi

Metallerin canlılardaki biyobirikimi, toplam miktarlarına, biyoyararlanıma, çevresel depolama kapasitelerine ve geri dönüşüm mekanizmaları gibi birçok faktöre bağlıdır. Temel metaller için her organizmanın ihtiyacı değişmesine karşılık optimum konstantrasyon aralıkları sık sık homeostasi mekanizması ile kontrol altına alınmaktadır. Bir organizmada olması gerekenden fazla metal birikimi olursa aktif hücre veya doku tarafından dışarıya atılır ya da immobilize edilir. Bazı metallerin bu korunma yollarından kaçmaları toksik ve diğer yan etkilere neden olmaktadır [19].

Sucul ortamda canlılar pasif taşınma veya kolaylaştırılmış alım yolu ile metalleri vücutlarında biriktirirler. Temel metaller biyokimyasal yolaklarda çeşitli moleküllere bağlanarak reaksiyonlarda görevli enzimler üzerinde indükleyici ya da katalizör gibi arttırıcı etki gösterirler [20]. Temel metallerin yüksek konsantrayonlarda bulunmaları da bazı organizmalarda subletal toksik etkilere ya da ölüme neden olabilmektedir. Ayrıca gerekli oranda az bulunmaları da canlı için olumsuz etkiler doğurmaktadır. Böylece temel metallerin azlığı veya çokluğuna bağlı olarak çift yönlü toksik etkileri mevcuttur [21].

Canlı organizmalarda sürekli çevresel olarak yüksek dozda metallere maruziyet sonrası, vücutlarına aldıkları metalleri etkisiz hale getirmek veya vücut dışına atılımlarını kolaylaştırmak amacıyla çeşitli korunma mekanizmaları gelişmektedir [22]. Metaller, metallotionin gibi metal bağlayan proteinlere bağlanarak hücresel vezikül ve granüllerde birikebilirler. Bunun gibi birikim mekanizmaları canlının ihtiyacı olduğunda metalin salımı için de kullanılmaktadır [23].

Sucul organizmalar çeşitli fizyolojik olaylar ile kendi içlerindeki metal düzeylerini düzenleyebilirler. Bunu alımı azaltma, atılımı arttırma şeklinde gerçekleştirirler. Örneğin midyeler istiridyeler ile benzer beslenme şekillerine sahip olmalarına karşın midyelerin

iç metal seviyelerini düzenleme yetenekleri farklıdır [24]. Krustaselerden Decapodlar Cu, Mn ve Zn için dokularında gelişmiş düzenleyiciler içermektedir. Balıklar, halkalı solucanlar ve çift kabuklu yumuşakçalar gibi bazı sucul canlılar da dokularındaki metal düzeylerini düzenleyebilme yeteneklerine sahiptirler [25].

Biyolojik sistemlerde metal konsantrayonlarının değerlendirilmesi sıcaklık, redoks koşulları (çözünmüş oksijen miktarı), iyonik kuvvet, organik kompleks, metal ve onu bağlayan moleküllerin karşılıklı konsantrasyonları, pH, genel fizyolojik durum, hayat döngüsü ve geçmişi gibi bazı faktörlerle değerlendirilmelidir [26].

Metal kirliliği sonucu oluşan oksidatif ve karsinojenik potansiyel biyolojik sistemler için zararlı kabul edilmektedir [27]. Metallerin veya metal adüktlerinin nükleik asitlere bağlanarak hücresel DNA ile reaksiyona girmesi sonucu çeşitli mutasyonlara, DNA ipliklerinde kesilmelere, baz modifikasyonları gibi çeşitli zararlı sonuçlara neden olduğu görülmüştür. Ayrıca metalik katyonların yüksek konsantrasyonlarda bulunmaları durumunda DNA replikasyonunu etkiledikleri bulunmuştur [28]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda da metallerin, oksidatif mekanizmalar yolu ile serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturarak DNA hasarına ve kansere neden olduğu bildirilmiştir [29].

2.1.2. Sucul Organizmalarda Metal Toksisitesi

Metaller canlı organizmalarda özellikle reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ile oksidatif biyokimyasal reaksiyonlarda toksik etki gösterirler [30]. Ağır metal sitotoksisitesinin moleküler mekanizmasında plazma membran hasarı, onu takip eden protein ve fosfolipidlere bağlanma, Na-K bağlı ATPazların inhibisyonu, membranlar arası aminoasit transportunun engellenmesi, enzim inhibisyonu, lipid peroksidasyonu ve oksidatif DNA hasarı, ROS oluşumu boyunca antioksidan enzimlerin (örneğin glutatyon) azaltılması gibi olaylar gerçekleşmektedir [31].

Metal iyonları hücresel metabolizmayı bozarak nükleusa ulaşabilmektedir. Metal katyonları iyonik ve koordine bağlarla tersinir bir şekilde DNA'ya bağlanabilir fakat doğrudan hücrelerin kromatin materyallerinde lezyonlar oluşturmayabilirler. Bu nedenle nükleer kromatin materyali üzerinde metallerin sadece doğrudan etkileri değil aynı

zamanda DNA hasarındaki dolaylı etkileri de göz ardı edilmemelidir [32]. Son on yılda metal kanserojenliğinin reaktif oksijen türlerinin oluşumu (özellikle hidroksil iyonları, HO·) ve ROS'ların aracılığı ile oluşan reaksiyonlar sonucu olduğu kanıtlanmıştır.

Nükleus içine bazı metallerin girişi metallotioninler için RNA kodlarının sentezini arttırabilir. Metallotioninler sitozol, lizozom ve nükleusta bulunan düşük molekül ağırlıklı, sisteinler gibi yüksek tiol grubu içeren bir protein grubudur. Metallotioninlerde bulunan tiol grubu ağır metallerin bağlanmasında rol oynar [33]. Metallotioninler özellikle yüksek metal bağlama kapasitelerinden dolayı sucul organizmalar için önemli bir protein ailesini teşkil ederler. Bu nedenle sucul organizmaların dokularındaki metallotioninlerin değerledirilmesi ortamdaki metal kirliliği ve organizmadaki biyobirikimi açısından bir fikir vermektedir [34].

Sucul organizmalardaki ağır metal kirliliği ile ilgili toksikolojik çalışmalarda metallerin alımı, birikimi ve toksisitesi aynı zamanda metallerin birbirleri ile olan etkileşimlerine de bağlıdır [35].

2.1.3. Metallerin Genotoksisitesi

Metallerin endüstri, tarım, evsel ve tıbbi teknolojilerdeki (örneğin protezlerde metallerin yoğun bulunması) kullanımı çevresel kirlenmenin artışında önemli rol oynamaktadır. Metallerin toksisiteleri, bireyler arası farklılıkların yanı sıra doz, bulunma formları, maruziyet süresi ve şekli gibi çevresel faktörlere bağlı olarak değişmektedir [36]. Özellikle ağır metaller olarak sınıflandırılan grupların düşük seviyelerde maruziyeti bile çoklu organ bozukluklarına neden olmaktadır. Biyolojik sistemlerde özellikle hücre membranı, mitokondri, lizozom, endoplazmik retikulum ve nükleus gibi hücre komponentlerine ilaveten detoksifikasyon ve hücresel hasarı onaran enzimleri de olumsuz yönde etkilemektedirler [37]. Yapılan birçok çalışma Cd, As, Cr, Al ve Co' ın oksidatif strese, ROS üretimini tetikleyerek ve antioksidan sistemi bloke ederek etki gösterdiğini bulmuştur [38-42].

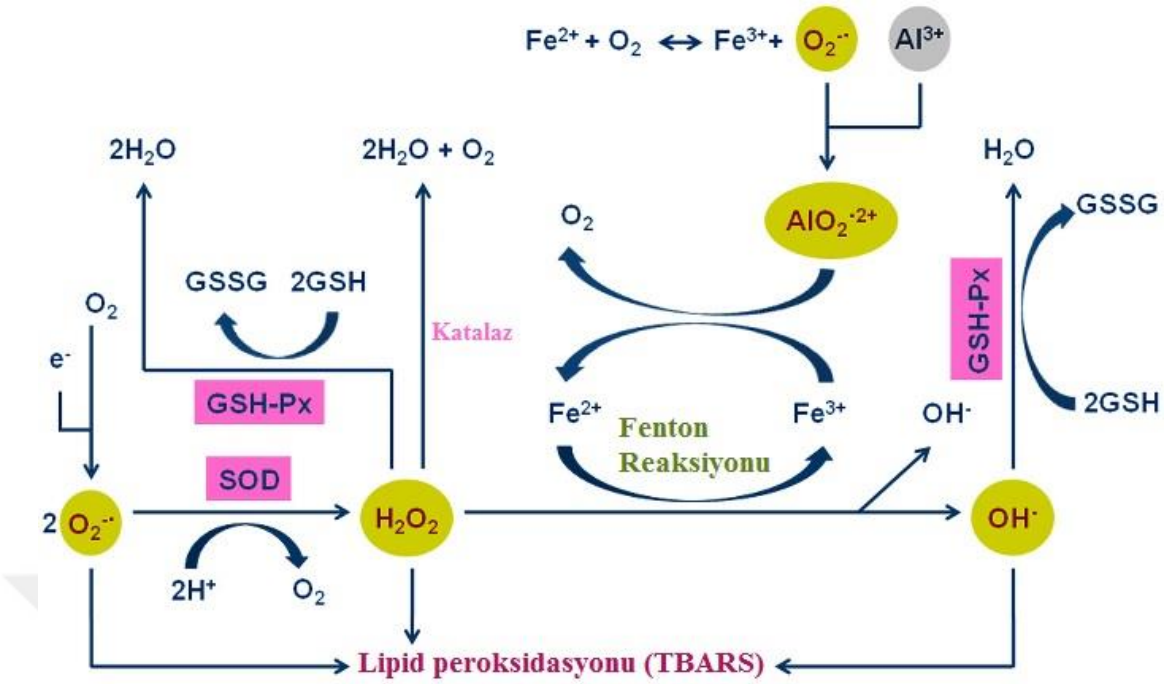
2.1.3.1. Alüminyum (Al)

Al yerkabuğunda en bol bulunan 3.elementtir. Hava, su ve toprakta doğal olarak meydana gelir [43]. Madencilik faaliyetleri ve işleme tesisleri çevredeki Al düzeyini yükseltmektedir. Son araştırmalar çevresel ortamda bulunan Al' un bitki, hayvan ve insanlar için risk oluşturduğunu ortaya koymuştur [44]. Özellikle sulardaki pH gradienti ve organik madde yoğunluğu Al' un toksisitesini değiştiren faktörler arasındadır. Azalan pH değeri Al' un toksisitesini arttırmaktadır [45].

Sulardaki artan Al oranı ile birlikte buharlaşma sonucu havaya karışan Al iyonları asit yağmurları toprağa dönerek toprak kirliliğine de neden olmaktadır. Bu sonuçlar sucul organizmalarda artan ölüm, ormanlarda meydana gelen kuruma, insan ve hayvanlarda meydana gelen çeşitli fonksiyonel bozukluklar şeklinde kendini göstermektedir [46]. Sucul organizmalardan su yosunları ve kerevitler özellikle Al toksisitesinden en fazla etkilenen gruplardır [47].

Al DNA ve RNA'ya yüksek afinite gösterdiği için hekzokinaz, fosfooksidaz, fosfodiesteraz ve alkali fosfataz gibi enzimleri kolaylıkla inhibe edebilmektedir. Ayrıca Ca, P ve Fe metabolizması da Al tarafından olumsuz olarak etkilenmektedir. Al' un toksisitesi, Al ile plazma membranı, apoplastik ve simplastik hedefler arasındaki etkileşimlerden kaynaklanmaktadır [48].

Al nispeten küçük redoks potansiyeline sahip olmasına karşın çeşitli yollar ile oksidatif stresi tetikleyebilir [49]. Aynı zamanda ROS üretimini tetikler, Fe bağımlı lipid peroksidasyonunu tetikler ve Fe ile başlatılan Fenton reaksiyonlarını meydana getirir. Al^{+3} tarafından süperoksitin nötralize edilmesi ile oluşan $Al\text{-}O_2\cdot$ kompleksi sonucu süperoksitin oksidatif kapasitesi artar [50] (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Alüminyumun oksidatif stres oluşumundaki rolü

Al' un balıklardaki negatif etkileri birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır [51-54]. Al alımı organizmada ROS oluşumuna [55, 56], lipid peroksidasyonu başlangıcına, SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan enzimlerin aktivitesinin bozulmasına neden olmaktadır [57, 58]. Balıklarda Al birikimi; osmoregülasyonda meydana gelen bozulmadan dolayı solungaçlarda hasara ve lenfositlerde oksidatif strese neden olmaktadır [59, 60]. Ayrıca Al alımı mitokondriyi ve LPO ile ROS oluşumda rol oynayan elektron transfer zincirini de etkileyerek toksik etki gösterebilmektedir [61, 62]. Ot sazanında 48 saatlik Al muamelesinin SOD aktivitesinde zamana bağlı artışa neden olduğu bildirilmiştir [63]. Al' un düşük dozlarda bile sazan lenfositlerinde zamana bağlı DNA hasarına neden olduğu belirlenmiştir [64]. *Prochilodus lineatus'* ta 6 ve 24 saatlik Al maruziyeti CAT ve GST ifadesinde artışa ve DNA hasarına neden olmuştur [65]. Al alımı aynı zamanda solungaçta iyon değişimi ve osmoregülasyonda görevli hücrelerde apoptozis ve nekrozise neden olmaktadır [66].

2.1.3.2. Arsenik (As)

As su, toprak ve havada doğal olarak bulunan bir metalloiddir. Pb' dan sonra toksikolojisi en çok çalışılan metaldir. Jeolojik faaliyetler, maden döküm işlemleri, fosil yakıt kullanımı, pestisit ve herbisitlerin yaygın kullanımı sonucu doğaya salınmaktadır [67] (Şekil 2.12). As doğada en çok 3 değerlikli meta-arsenat (As^{+3}) veya 5 değerlikli arsenat (As^{+5}) inorganik formlarında bulunur. Yüzey sularında arsenat (As^{+5}) formu daha fazla iken kuyu gibi oksijence fakir derin dip sularında meta-arsenat (As^{+3}) formu daha çok bulunmaktadır. Meta-arsenatın, arsenata oranla daha toksik olduğu bilinmektedir [68]. İnsanlar hava ve gıdalar yoluyla As' e maruz kalabilir. Bunun yanında özellikle Hindistan, Bangladeş, Çin, bazı orta ve Güney Amerika ülkelerinde olduğu gibi kirli içme suları ile de inorganik As' e maruz kalmaktadırlar [69].

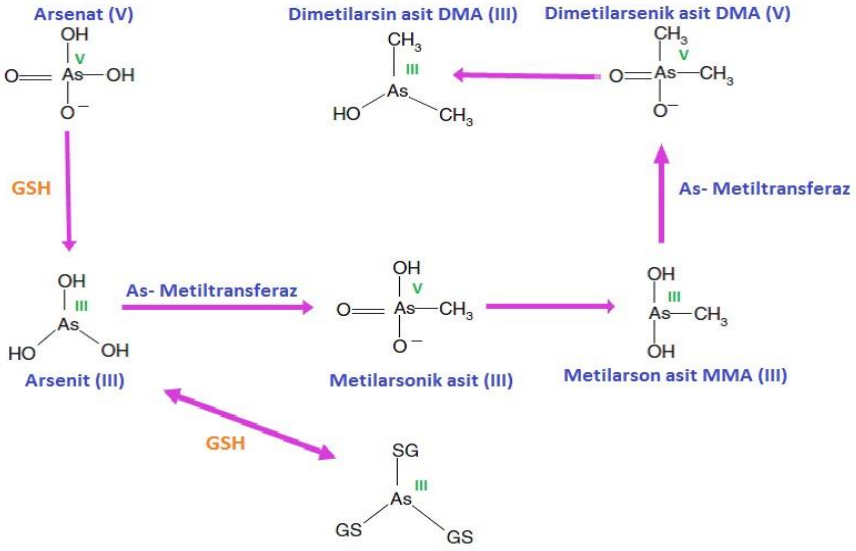
As hücrede bazı metallerle reaksiyona girerek serbest radikallerin hücrede birikmesine ve böylece oksidatif stres oluşumuna neden olmaktadır. As kaynaklı oluşan başlıca serbest radikaller ise süperoksit iyonu ($O_2^{\cdot -}$), hidroksil ($OH^{\cdot}$) radikali, hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen ($^1O_2$) ve peroksil radikalleridir [70].

Memelilerde metilasyon için arsenatın meta-arsenata indirgenmesi gerekmektedir. As^{+3} ve As^{+5} arasındaki indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonları plazmada gerçekleşirken, metilasyon işlemleri karaciğerde gerçekleşmektedir. As metabolizması için normal redüksiyon, oksidatif metilasyon ve glutatyon konjugatları oluşturma gibi bazı yollar mevcuttur [71].

As metilasyonu önceleri basit bir As detoksifikasyon reaksiyonu olarak düşünülmekteydi. Sonradan yapılan çalışmalar ile bu sürecin çok daha karmaşık olduğu anlaşılmıştır. Bu süreçte arsenat ve meta-arsenatın, hücre proliferasyonunu uyardığını, enzimleri inhibe ettiğini, hücrelerde DNA hasarına neden olduğunu, stres kaynaklı stres transdüksiyonunu uyardığı ve adipositlerce glikoz alımının engellendiğini göstermişlerdir. Bu toksik belirtilerin çoğu ROS üretimi ile ilişkilendirilmiştir [72].

As toksisitesinde kan dokusu ve yumuşak dokularda oluşan ROS üretimi biyobelirteç olarak kabul görmektedir [73]. Diğer taraftan ROS' nin endojen olarak üretimi arsenik kaynaklı üretimi tespit etmeyi zorlaştırmaktadır. Önemli biyomoleküller olan lipidler, As kaynaklı ROS oluşumun belirlenmesi için özellikle kullanılmaktadır. Plazmadaki lipid

peroksidasyonu klinik ve pre-klinik çalışmalarla idrar ve doku örneklerinde incelendiğinde, As maruziyetine bağlı LPO'da pozitif korelasyon bulunmuştur [74] (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. İnorganik arseniğin metabolizması

As mitokondrinin morfolojik bütünlüğünü bozmakta ve mitokondriyel membran potansiyelinde hızlı bir düşüşe neden olmaktadır. Mitokondriyel değişim alanları kontrolsüz süperoksit anyonun oluşması için birincil bölgeler olarak kabul edilmektedir [75]. Ayrıca As maruziyeti sonrası ROS oluşumuna ek olarak reaktif nitrojen türleri (RNS) de oluşabilmektedir [76].

As' in genotoksik etkileri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır [77-80]. İnsan fibroblastları, lökositler, lenfositler ve hamster embriyo hücreleri ile yapılan *in vitro* çalışmalarda As' in kromozom aberasyonları ve kardeş kromatid değişimine neden olduğu bulunmuştur [81, 78]. İnsan, fare ve hamster hücreleri kullanılarak yapılan benzer çalışmalarda DNA hasarının arttığı veya DNA sentezinin inhibe edildiği belirlenmiştir [82]. Ayrıca organik As' in genotoksik etkileri de doğrudan incelenmiş ve DNA'da tek zincir kırıklara, apürinik veya apirimidinik bölge oluşmasına, DNA temelli oksidasyon sonucu oksidatif

stres oluşumuna, DNA-protein bağlantılarında hatalara ve kromozomal aberasyonlara neden olduğu bildirilmiştir [83-85].

Hayvanlarda As genotoksisitesine yönelik en fazla çalışılan konular membran potansiyelinde meydana gelen değişimler ve DNA oksidasyonunun ana ürünlerinden olan 8-OH-G oluşumunun incelenmesi olmuştur. Yapılan birçok çalışmada As' e maruz kalmış hayvanlarda mitokondri membran bütünlüğünde morfolojik değişimler olduğu, membran potansiyelinin değiştiği ve 8-OH-G seviyesinde artış olduğu belirlenmiştir [86, 75, 87].

2.1.3.3. Kadmiyum (Cd)

1817 yılında Alman bir kimyacı olan Friedrich Strohmeyer tarafından keşfedilen Cd, yaklaşık kırk yıl sonra özellikle parlatma ajanı olarak kullanılan Cd karbonat formu akut gastrointestinal ve solunum sıkıntıları çeken hastalarda tanımlanmıştır [88]. Son 50 yılda Cd toksisitesinin anlaşılması ve konu ile ilgili tehlikelerin farkına varılması sonucu geniş bir bilgi birikimi olmaya başlamıştır. Cd 20. yüzyılın elementi olarak anılmaya başlanmıştır [89].

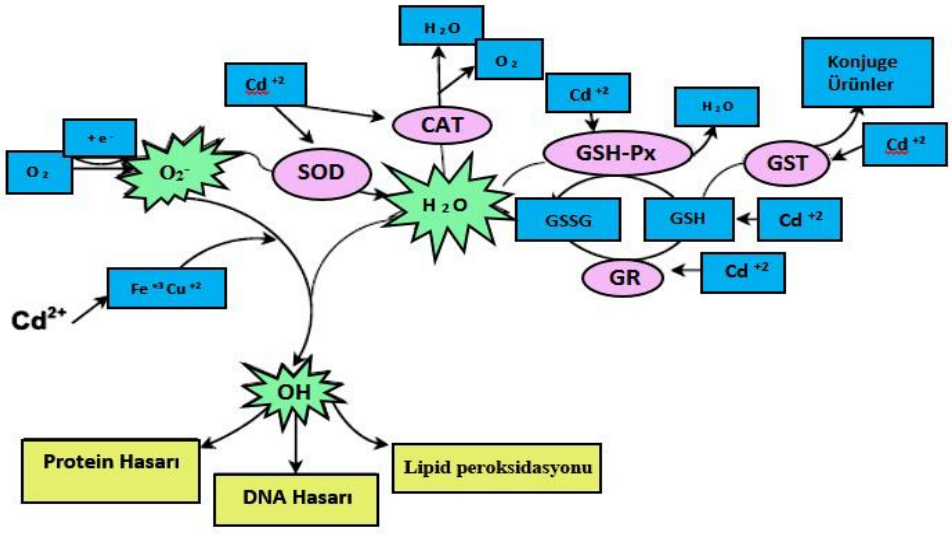
Cd' un insan tarafından kullanımı ile oluşan kaynakları arasında en önemlileri Cu ve Ni döküm merkezleri ile fosil yakıtların kullanımıdır. Cd uzun yarılanma ömrü (15-20 yıl), kararlılığı ve çevresel ortamda birikiminde dolayı hastalıkların oluşumu için önemli bir risk teşkil etmektedir [89].

Hem doğal hem insan kaynaklı faaliyetler çevresel kadmiyum düzeyinde önemli artışlara neden olmuştur. Cd' un doğal kaynağı volkanik patlamalar, orman yangınları ve rüzgarla taşınan toprak parçalarıdır [90].

Hava ve içme suyu Cd düzeyleri 0.04 $\mu g/m^3$ ve 1 µg/L düzeylerinden aşağıda tutulduğunda önemli bir risk oluşturmamaktadır. ABD kaynaklı bir kanunda oluşturulan öncelik listesinde Cd en tehlikeli maddeler sıralamasında 7. Sırada yer almaktadır [91]. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) ve Amerika Ulusal Toksikoloji Programında Cd insan kanser riskleri arasında kategori 1'de değerlendirilmektedir [92, 93].

Cd oksidatif stres rolü ile ilgili ilk kanıt Müller tarafından kültüre fare hepatositlerinde lipid peroksidasyonunun (LPO) değerlendirilmesi ile elde edilmiştir. ROS üretimi ise infekte diğer hayvan türlerinde de açıklanmıştır [94]. Cd herhangi bir redoks etkiye sahip olmadığından serbest radikallerin süpürücüsü olan glutatyon (GSH) gibi molekülleri baskılayarak ya da detoksifiye edici moleküller olan süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerini inhibe ederek etki gösterdiği düşünülmektedir [95]. Süperoksit iyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerinin oluşumu ile mevcut veriler, bunların oluşumuna GSH'daki azalma ve antioksidan enzimlerin aktivitesindeki değişimlerin neden olduğunu kanıtlamaktadır [96].

Cd kaynaklı oksidatif stres oluşumu ile ilgili başka görüşler de bulunmaktadır. Bunlardan biri de kadmiyumun karaciğerde neden olduğu inflamasyona dayandırılmaktadır. Kupffer hücreleri Cd maruziyeti sonrası aşırı aktivasyon göstererek karaciğerde serbest radikallerin oluşumuna aracılık eden IL-1β, TNF-α, IL-6, ve IL-8 molekülleri üretmektedir [97]. Ayrıca mitokondrinin de Cd toksisitesi için önemli bir hedef olduğu ileri sürülmüştür [98] (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Kadmiyum kaynaklı oksidatif stres oluşum mekanizması

ROS üretimi kronik Cd kaynaklı nefrotoksisite, immünotoksisite ve karsinogenezde önemli rol oynamaktadır [99]. Diğer yandan kronik Cd maruziyeti dokularda LPO seviyesinde artış olmamasına karşılık GSH seviyesini yükseltmektedir [100].

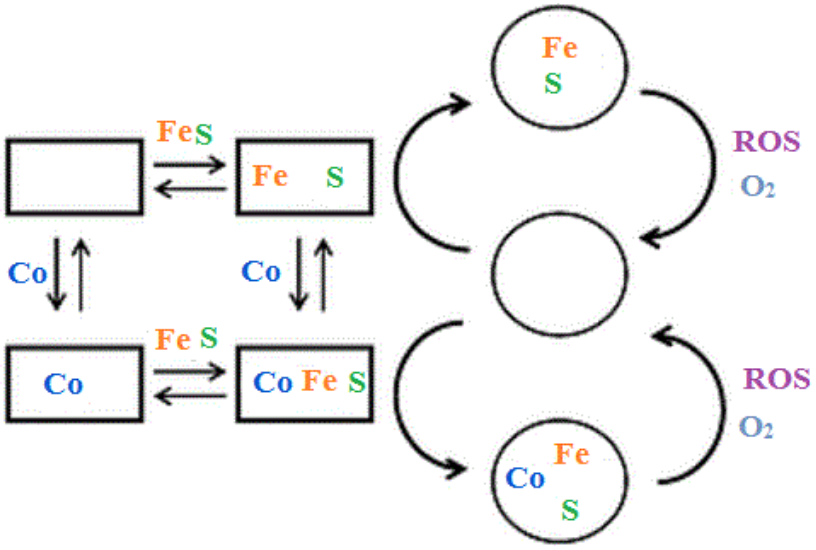
Cd herhangi bir redoks aktivitesi olmadığı için GSH gibi serbest radikal süpürücüleri baskılayarak oksidatif stres oluşumuna neden olmaktadır [101]. Ayrıca Cd birçok sitoplazmik ve membran proteininde yer alan Fe' in yerine bağlanarak iyonik Fe konsantrasyonunu arttırmakta ve buna bağlı ROS oluşumuna neden olur [102]. Cd çeşitli dozları ile muamele edilen farelerin karaciğerinde 6, 12 ve 24 saat sonunda LPO ve MDA oluşumunda artışa neden olduğu bulunmuştur [103]. Yapılan çalışmalarda Cd' un en fazla solungaçlarda sonra böbrekte, karaciğerde ve kas dokusunda birikim gösterdiği bildirilmiştir [104]. Ayrıca balıklarla yapılan başka bir çalışmada Cd' un hem hücresel hem de moleküler düzeyde morfolojik ve fonksiyonel bozukluklara neden olduğu belirlenmiştir [105].

2.1.3.4. Kobalt (Co)

Co, B12 vitamininin (hidroksikobalamin) ve diğer kobalaminlerin oluşumunda rol oynayan bir eser elementtir. Co eksikliği anemi, gelişim anormallikleri ve bebeklerde büyüme geriliğine neden olurken fazlası da toksik etkiler göstermektedir. Çeşitli sanayi dallarında (protez üretimi vb.) kullanılan Co çevre kirlenmesi için risk teşkil etmektedir [41].

Özellikle protezlerde kullanımı sonucu elektrokimyasal korozyondan dolayı periprostetik boşlukta Co iyonları oluşabilmektedir. Buna ek olarak metal parçacıkların fagosite edilmesi ve yabancı cisimleri yok etme üzerine gelişen oksidatif süreçte de serbest iyonlar oluşabilmektedir [106].

Co birçok hücre hattında sitotoksiktir ve apoptozis ile nekrozis gibi süreçleri tetikleyebilmektedir. Co' ın toksik etkisi ile mekanizmalar tam olarak anlaşılamasa da muhtemel mekanizmalar önerilmiştir [107]. Co, DNA sarmalarında kesilmelere, ROS üretiminde artışa ve DNA ile diğer biyomoleküllerin ROS'lerine karşı afinite geliştirmesine neden olmaktadır. Bu etkinin özellikle UV ve hidrojen peroksit gibi oksidanların varlığında daha da arttığı bulunmuştur.



Şekil 2.6. Kobaltın reaktif oksijen türleri oluşumuna etkisi

Co iyonları Fenton reaksiyonlarına katılma ve ROS üretimini tetikleme özelliğine sahiptir [108] (Şekil 2.6). Bunlara ilaveten, Co iyonları karsinogenezin ve mutagenezin önlenmesindeki en önemli mekanizmalar olan nükleotid çıkarılması ve DNA tamirini inhibe etmektedir. Bu sebeplerden dolayı Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından oluşturulan listede grup 2 potansiyel kanser yapıcı elementtir [109].

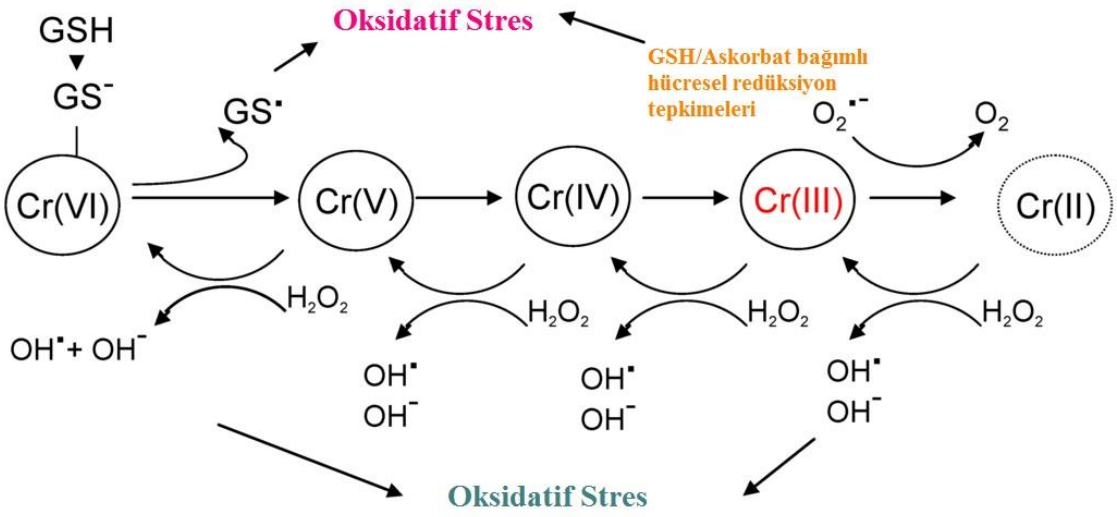
Co' ın 96 saatlik muamelesi sonucu altın balığı (*Carassius auratus*) beyin ve karaciğer dokularında LOOH seviyelerinde artış saptanmıştır [110]. Sazan (*Cyprinus carpio*) ile yapılan bir çalışmada ise karaciğer, beyin ve böbrekte Co birikimine bağlı olarak LOOH seviyelerinde artış belirlenmiştir [111]. Yapılan başka bir çalışmada ise balıklarda Co alımına bağlı olarak protein karbonil gruplarında yapısal değişiklikler bulunmuştur [112]. Birçok çalışmada Co uygulamasına bağlı olarak beyinde GPx ifadesinde bir artış gözlenmezken GSH seviyesinde artma belirlenmiştir. Co uygulaması sonucu CAT seviyesi değişmezken SOD seviyesinde artış olduğu da bir başka çalışma ile bildirilmiştir [113, 114].

2.1.3.5. Krom (Cr)

Cr yeryüzünde yedinci en bol bulunan elementtir. Cr doğada Cr^{+2}'den Cr^{+6} formuna kadar çeşitli şekilde bulunmaktadır [115]. Cr' un insan, hayvan ve bitkilerde en

sık görülen formları ise Cr^{+3} ve Cr^{+6}'dur. Cr^{+3} immobil ve suda çözünmez iken, Cr^{+6} mobil ve suda çözünebilir haldedir [116]. Yaygın olarak metalürji, galvanik kaplama, boya ve pigment, tabaklama, ahşap koruma, kimyasal üretim, kağıt hamuru ve üretimi sektörlerinde kullanılmaktadır. Bu endüstriler biyolojik ve ekolojik hayat için olumsuz etkiler oluşturmaktadır [117].

Doğal ve insan faaliyetleri sonucu toprağa, havaya ve suya salınımı gerçekleşmektedir. Endüstriyel ve tarımsal uygulamalar sonucu doğaya salınan Cr düzeyi toksik etkisinden dolayı endişe uyandırmaktadır [42]. Özellikle suda çözünme ve mobilitesinden dolayı Cr^{+6} çevresel bir kirletici olarak daha fazla dikkat çekmektedir. Ortamda aşırı oksijen varlığından dolayı Cr^{+3}, Cr^{+6}' ya okside olur ve bu da Cr' un toksisitesini arttırır [118] (Şekil 2.7). Endüstriyel atıklar ve yeraltı suyundaki kirlenme önemli ölçüde topraktaki Cr konsantrasyonunu arttırmıştır [119].



Şekil 2.7. Kromun neden olduğu oksidatif stresin oluşumu

Ortamda bulunan Cr^{+3} konsantrasyonu düşük olduğu takdirde membran geçirgenliği için zarar teşkil etmez. Heksavalent Cr (Cr^{+6})ise SO_4^{-2} gibi izoelektrik anyon kanalları ve fagositoz yolu ile alınan kromatlar aracılığı ile membran geçirgenliğini arttırmaktadır.

Heksavalent Cr' un stabilizasyonu glutatyon tarafından sağlanır ve bu nedenle hücre içi Cr^{+6} redüksiyonunda hedef bölgeden uzaklaştırdığı için bir detoksifikasyon yolu gelişmiştir. Cr^{+6} ve tioller, askorbat gibi biyolojik ürünler ile reaksiyona girince sonuç olarak reaktif oksijen türleri oluşur ve sonuç olarak hücrede oksidatif stres oluşarak DNA hasarı meydan gelir [120]. Bu yüzden Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından insanlarda kansere neden olan maddeler ile oluşturulan listede, Cr^{+6} 1.kategoride yer almaktadır [117].

Cr' un heksavalent formu birçok balıkta biyokimyasal bozuklukların yanı sıra genotoksik etkilere de neden olmaktadır [121, 122]. *Anguilla anguilla'* da akut Cr uygulaması, nükleer anormalliklerde artış neden olarak genotoksik etki oluşturmuştur. Pentavalent Cr formu da 7, 14 ve 21 günlük sürelerle balıklar ile muamele edilmiş ve zamana bağlı mikronükleus sayısında artış olduğu bildirilmiştir [120]. Cr^{+3} formu ise *Pimephales promelas'* ta çalışılmış ve mikronükleus sayısında kontrole göre artış belirlenmiştir [123]. Trivalent Cr aynı zamanda *Fundulus heteroclitus* çeşitli gen ifadelerinde değişimlere neden olmuştur. Bu çalışmada Cr uygulaması sonucu yağ asidi bağlayan protein, sitokrom P450 ve translasyon başlatıcı faktör genlerinde yaklaşık 3 kat ifade artışına neden olmuştur [124]. *Oreochromis niloticus'* te çeşitli Cr formları uygulaması sonucu loblu nükleus, çentikli nükleus ve tomurcuklu nükleus gibi nükleer anormalliklerin sayısında artışa neden olduğu belirlenmiştir [125]. *Pseudopleuronectes americanus'* ta Cr maruziyeti sonucu incelenen 29 farklı gen ifadesinde doza ve zamana bağlı olarak değişimler saptanmıştır [126]. Ayrıca gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) Cr uygulaması sonucu SOD ifadesinde kontrole göre belirgin artış tespit edilmiştir [127].

2.2. Ekotoksikoloji Çalışmalarında Balıkların Kullanımı

Arazide ve laboratuvarda gerçekleştirilen toksikoloji çalışmalarında balıkların kullanılmasının tarihi 1930'lara kadar dayanmaktadır. Bu çalışmalar özellikle toksik kimyasallar, tarım ile endüstri atıklarının sucul ortama boşaltılması sonucu oluşan kirlilik, göl ve deniz ekosistemlerindeki birikimler üzerine yapılan toksik değerlendirmelerde balıklar kullanılmıştır [128].

Özellikle tatlı su balıkları ticari ve ekolojik önemlerinden dolayı ekotoksikoloji çalışmalarında özellikle tercih edilmektedirler [129]. Olgunlaştıklarında balıklar sucul ekosistemlerde besin piramidinin en üst basamağını oluştururlar. Balıklar sucul ekosistemlerde koruyucu elemanlar olarak görev yapmaktadırlar [10]. Yaşam döngüleri boyunca özellikle algler, rotiferler, mikrokrustaseler, omurgasızlar, yüksek bitkiler ve diğer küçük balıklar ile beslenirler. Beslenme ve üreme dönemlerinden kaynaklanan balık göçleri aynı zamanda bir ortamda bulunan kirleticilerin hem diğer ortamlara taşınmasında hem de aslında o ortamda bulunmayan bazı maddelerin deneyler sonucunda o ortamda varmış gibi gözükmesine neden olmaktadır. Bu sebeple ekotoksikoloji çalışmalarında seçilecek balıkların biyolojileri de iyi bilinmelidir [130].

Ekotoksikolojik çalışmalarda balıklar akut, kronik ve subkronik periyotlar ile çeşitli maddelerle muamele edilmektedirler. Toksikolojik analizlerde belirli zaman periyotları için kullanılan bazı balık türleri ve maruziyet süreleri aşağıda verilmiştir:

Oncothynchus mykiss (Gökkuşağı alabalığı, ılıman): Akut çalışmalarda 7 gün, subkronikte 250 gün ve kronikte 250 günden fazla şekilde muamele edilebilir.

Brachydanio rerio (Zebra balığı, tropikal): Akut çalışmalarda 4 gün, subkronikte 30 gün ve kronikte 30 günden fazla süre ile maruziyete bırakılabilir.

Pimephales promelas (İribaş golyan, ılıman-subtropikal): Akut çalışmalarda 7 gün, subkronikte 50 gün, kronikte 50 günden daha uzun muameleye uygundur [131].

Son 30 yılda laboratuvarda balıklarla yürütülen toksikolojik çalışmalar için çeşitli protokol ve prosedürler geliştirilmiştir. Çalışmalarda kullanılcak balıklar ya uygun sahalardan toplanmalı ya da uygulamanın yapılacağı laboratuvarda veya yetiştirme çiftliklerinde yetiştirilmelidir. Balıklar uygun saklama ve yaşam sürdürme ortamlarında bulunmalıdır [132].

Toksikolojik ve ekotoksikolojik çalışmaların ana amaçlarından biri de canlı organizmalar üzerinde antropojenik kirlenmelerden biri olan metal kirliliğinin canlılar üzerindeki etkilerini araştırmaktır. Bu araştırmalar sucul ekosistemlerde geri dönüşü mümkün olmayan hasarların önlenebilmesi için oldukça önemlidir. Özellikle biyomontitörleme çalışmaları su ortamlarında metaller tarafından oluşturulan kirliliğin düzeyini ortaya koymaktadır [133].

2.2.1. Zebra Balığının Genel Özellikleri

- Regnum: Animalia (Hayvanlar)
- Filum: Chordata (Kordalılar)
- Subfilum: Vertebrata (Omurgalılar)
- Superklasis: Pisces (Balıklar)
- Klasis: Osteichthyes (Kemikli Balıklar)
- Subklasis: Actinopterygii (Işınsal Yüzgeçliler)
- Superordo: Teleostei (Gerçek Kemikli Balıklar)
- Ordo: Cypriniformes (Sazanlar)
- Familya: Cyprinidae (Sazangiller)
- Cins: *Danio*
- Tür: *Danio rerio* (Hamilton, 1822)

Tropikal bir tür olan zebra balığı, *Danio rerio* Cyprinidae familyasına aittir [134] (Şekil 2.8). Anavatanı Güneydoğu Asya olan zebra balıkları yoğun olarak da Pakistan ve Hindistan'da da bulunmaktadır. Balığın gövdesi ışığa bağlı olarak koyu mavi, gümüş beyazı veya altın sarısı çizgilerle örtülüdür [135]. Zebra balığının bakımının kolay olması, çok sayıda yumurta vermesi ve yumurtalarının şeffaf olması, 1930'lu yıllardan beri yaygın olarak üzerinde araştırmalar yapılan bir tür olmasının nedenidir [136]. Genç bireylerin boyları 4.5-5 cm uzunluktadır. Morfolojik olarak erkek bireyler dişi bireylerden farklılık göstermektedir. Erkek bireylerin anal yüzgeçleri dişi bireylere göre daha büyük ve genital papillaya sahiptir [137].



Şekil 2.8. Zebra balığı (*Danio rerio*, Hamilton 1882)

Zebra balıkları ovipar (yumurta vererek) üreme göstermektedir. 74-75 günlük zebra balıklarından erkekler yaklaşık 23.1 mm uzunluğuna, dişi bireyler ise 24.9 mm uzunluğa ulaştıklarında üreme davranışı gösterebilmektedirler. Dişi zebra balığı bir üreme döneminde 150-400 arasında yumurta üretebilmektedir. Dolayısıyla yaşamı boyunca 1500-1800 arasında yumurta verebilmektedir [138].

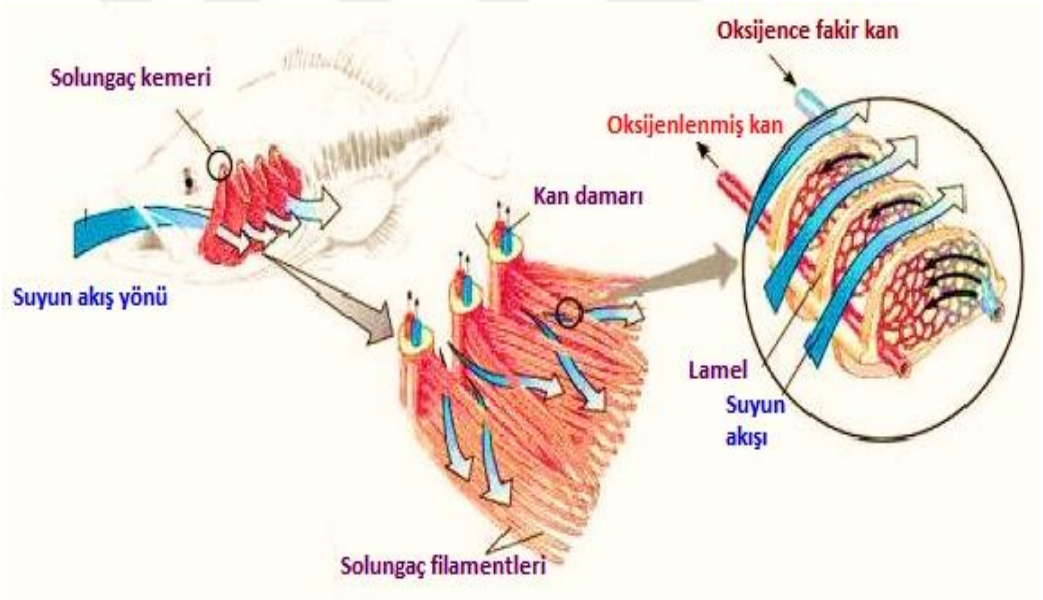
2.2.1.1. Zebra Balığı ile Çalışmanın Avantajları

Sucul omurgalılar çevreden yayılan çeşitli stres faktörlerine diğer canlılardan daha fazla maruz kalmalarından dolayı balıklarla ilgili yapılan ekotoksikolojik araştırmalar oldukça önemlidir [139]. Zebra balıkları, dayanıklı bir tür olmaları, kolay bulunmaları, laboratuvar ortamında kolay beslenebilmeleri ve çoğalmaları, ergin dişilerin haftalık aralıklarla yüzlerce yumurta bırakabilmeleri, dış döllenmeyle üremeleri, yumurta ve embriyoların saydam oluşu, yumurta ve larva gelişimlerinin kolay izlenebilmesi, jenerasyon zamanının kısa olması ve embriyolarının toksik ajanlara duyarlı oluşu nedenleriyle toksikoloji çalışmalarında sıklıkla kullanılan model organizmalardan biridir [140]. Zebra balığı insan ve diğer omurgalıların hastalıklarının araştırılmasında iyi bir model organizma olarak kullanılmaktadır [141]. Zebra balığı ile insan ve diğer omurgalıların genom yapılarının benzer oluşu, metabolizmalarının ve embriyonik gelişimlerinin hemen hemen aynı olması, en önemlisi insanlarda bulunan tümör baskılayıcı genin (sitokrom P450 grubu) Zebra balığında da keşfedilmiş olması, Zebra balığının model organizma olarak kullanılmasının başlıca nedenleri arasındadır [142]. Ek olarak ksenobiyotik metabolizmanın faz I ve faz II enzim sistemi bu balık türünde de bulunmaktadır [143]. Zebra balıklarının hayat döngüsünün laboratuvar farelerine göre daha kısa sürede tamamlanması, farelerle yapılan deneylerin aynılarının bu balık türüyle de yapılabilmesi ve hatta daha fazla neslin takip edilebilmesi (özellikle teratojenik testlerde) diğer bir tercih nedeni olmuştur [144]. Keza farelerde embriyo gelişimi anne vücudu içinde olduğu için araştırıcıya embriyoyu en başından takip etme şansını vermemektedir. Oysa Zebra balığı embriyoları anne vücudu dışında gelişmekte ve böylece döllenmeden itibaren zigotun gelişimi takip edilebilmektedir [145]. Toksikoloji

araştırmalarında Zebra balığının tercih edilmesinin diğer bir nedeni uygulanan testin kısa oluşu ve sonuçların oldukça hassas oluşudur [146].

2.2.2. Solungaç Yapı ve İşlevleri

Solungaçlar, yutak bölgesinde, her iki yanda uzanan yarıklar içinde bulunurlar. Teleost balıklar her bir tarafta dört solungaç kemerine sahiptirler. Her bir kemer, solungaç filamentinin iki dizisine sahiptir. Bu dizilerin her birine, hemibranş adı verilir. Her bir hemibranş, tarak benzeri dizilmiş, primer lamel olarak adlandırılan solungaç filamentlerinin bir dizisinden ibarettir. Her filamentin alt ve üst her iki yüzünde, filament eksenine dikey olarak oluşmuş ve filamentintin enine ikincil katları olan, çok sayıda sekonder solungaç lameli bulunur. Solungaç lamellerinin serbest kenarları, çok ince tek tabakalı bir epitel ile örtülüdür [147] (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Balıklarda solungaç yapısı

Su ve kan arasındaki gaz değişimi, solungaçlar ve genel vücut yüzeyinde yapılmaktadır. Ancak solungaçların yüzey alanı, vücudun arda kalan yüzeyinden daha büyük olduğu için gaz değişiminde önemli bir yerdir [148].

Solungaçların başlıca işlevi, solunum yani gaz değişimi yapmaktır. Solungaçlar ayrıca, elektrolitlerin aktif transportunda, osmo-düzenlenimde, asit-baz dengesinin kurulmasında hayati öneme sahiptir [149].

Balıklarda solungaçlar çevre kirliliğinden ilk etkilenen organlardır. Geniş yüzey alanları toksik maddelerin geçişini kolaylaştırmaktadır. Solungaç hasarının derecesi toksik bileşiğin etki gücü ile doğru orantılıdır. Bilinen solungaç lezyonları iki ana gruba ayrılabilir; bunlardan ilki; bileşiğin yıkıcı etkileri, ikincisi ise savunma sonucu oluşanlardır [150].

2.3. Oksidatif Stres

Hücre yaralanması ve hücreyi ölüme kadar götüren olaylardan sorumlu mekanizmalar çok komplekstir ve fiziksel, kimyasal, enfeksiyöz, immünolojik, beslenme nedenlerle oluşabilir [151].

Hücrede apoptozis ve nekrozise neden olan faktörlerin başında oksidan maddeler gelir. Oksidan maddeler, hücrede lipidler, proteinler ve DNA üzerindeki toksik etkileri ile hücre hasarlanmasına ve ölümüne yol açarlar [152].

Hücrelerde bulunan başlıca oksidan maddeler ve öncülleri; moleküler oksijen (O_2), singlet oksijen ($^1O_2$), süperoksit radikali ($O_2\cdot$), hidroksil radikali ($OH\cdot$), alkoksil radikali (RO_2), alkil peroksi radikali ($RO_2\cdot$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroperoksi radikali ($HO_2\cdot$), nitrik oksit (NO), hipoklorit ($ClO\cdot$) gibi maddelerdir [153].

Oksidan maddeler, biyolojik membranlar için son derece önemli olan lipidlerin peroksidasyonunu hızlandırdığı için de hücre hasarı ve ölümü açısından çok önemlidir [154]. Lipid peroksidasyonu, fosfolipid, glikolipid, gliserid ve steroidlerin yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin, oksidan maddeler etkisiyle alkol, aldehit, hidroksi asit, etan, pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılmasını kapsayan reaksiyonlar dizisidir. Lipid peroksidasyon ürünleri olan LOOH gibi maddeler biyomembranlar, hücre organelleri ve enzimler başta olmak üzere birçok yerde etkilidir [155]. Bunlar, membran permeabilitesini ve mikroviskozitesini değiştirerek membranın akışkanlığını azaltır. Membrana bağlı enzim ve reseptörlerin inaktivasyonuna neden olur, hücresel organellerin yapı ve fonksiyonlarını bozarlar [156].

2.3.1. Serbest Oksijen Radikallerinin (ROS) Oluşumu

Serbest radikaller bir ya da daha çok sayıda eşleşmemiş elektron çifti içeren atom veya moleküller olarak tanımlanır. O_2' nin redüksiyonu, hücrelere zarar veren serbest oksijen radikalleri (ROS)'nin oluşumuna yol açmakta, bu özel durum ise "oksijen peroksidasyonu" olarak adlandırılmaktadır [157].

Oksidanlar, radikaller denilen tek elektron eksikliği nedeniyle diğer moleküllerle kolayca elektron değiş-tokuşu yapanlar ve non-radikal olarak bilinen elektron eksiklikliği olmamasına rağmen diğer moleküller ile radikal gruplara oranla zayıf bağlantı kuranlar olarak iki kategoride toplanabilir [158].

Bu oksidan maddelerden, süperoksit radikali, hidroksil radikali, alkoksil radikali, peroksil radikali ve hiperoksi radikali, radikal oksidanlar iken; hidrojen peroksit, nitrik oksit ve hipoklorit non-radikal oksidanlardır [159].

Doğal oksijen molekülünün, çevresindeki herhangi bir molekülden bir elektron alması ile süperoksit radikali oluşur.

$O_2 + e^- \rightarrow O_2\cdot$ (Süperoksit)

Doğal oksijen molekülü, çevresindeki moleküllerden iki elektron alırsa, peroksit oluşur. Bu molekül bazen süperoksidin bir elektron alması ile de oluşabilir.

$O_2 + 2\ e^- \rightarrow O_2^{-2}$ (Peroksit)

$O_2^- + 1\ e^- \rightarrow O_2^{-2}$

Peroksit molekülü iki H^+ atomu ile birleşirse hidrojen peroksit molekülü oluşur.

$O_2^{-2} + 2\ H^+ \rightarrow H_2O_2$ (Hidrojen peroksit)

Tek atom halinde ve elektronu eksik olan oksijen partikülü ile bir H^+ birleşecek olursa reaktivitesi güçlü olan hidroksil radikali oluşur.

$\cdot O^- + H^+ \rightarrow OH\cdot$ (Hidroksil radikali)

Tek atom halinde ve eksiksiz elektronu olan oksijen iki H^+ alırsa su molekülü oluşur.

$\cdot O^- + 2\ H^+ \cdot \rightarrow H_2O$ (su)

Hidrojen peroksit molekülünün bir Cl atomu ile reaksiyona girmesi sonucu ise hipoklorit oluşur [160].

$H_2O_2 + Cl \rightarrow HOCl$ (hipoklorit) + OH

2.3.1.1. Oksidanların Kaynakları

Fizyolojik şartlarda gerçekleşen pek çok hücresel aktivite oksidan oluşumuna yol açar. Bu oksidan moleküller, organizmanın canlılığı devam ettiği sürece, normal biyolojik işlemler sırasında oluşmalarının yanı sıra, organizmaya girince hastalık oluşturabilecek yabancı bir maddenin vücuda girmesi durumunda da az çok oluşur [161].

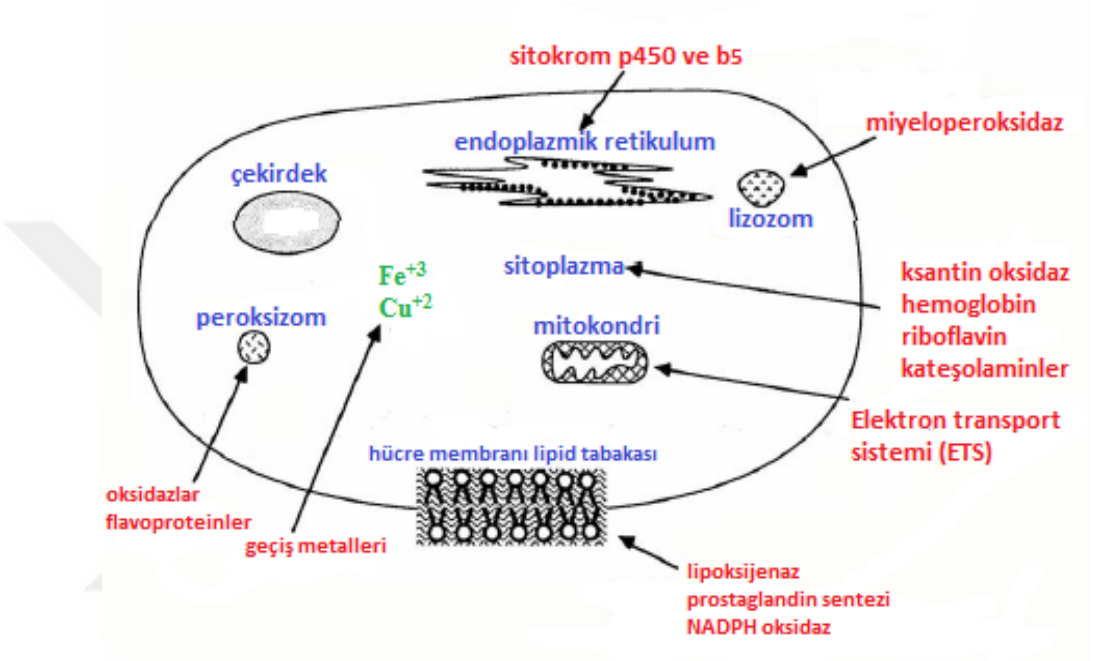
Normal biyolojik işlemlerden mitokondrideki O_2'li solunum sırasında Elektron Transfer Sistemi (ETS)'nde, katabolik ve anabolik reaksiyonlar sırasında, endoplazmik retikulumda sitokrom P450 sisteminde meydana gelen elektron kaçakları sonucunda oksidanların oluşması kaçınılmazdır. Ancak, hücre içine alınan oksijenin tahminen %1-4'ünün kısmen indirgenmiş oksijen türlerine yani reaktif oksijen türlerine dönüştüğü bilinmektedir [162]. Serbest oksijen radikallerinin iki önemli kaynağı bulunmaktadır [163].

2.3.1.1.1. Oksidanların Endojen Kaynakları

Hücredeki oksidanların endojen kaynakları şunlardır:

- Yaşlanma
- Peroksizomlarda var olan enzimler
- Nükleus membran ve endoplazmik retikulumda bulunan elektron transport sistemleri (sitokrom p-450)
- Mitokondride bulunan elektron transport sistemi
- İskemi, travma, intoksikasyon sonucu oluşan oksidatif stres
- Ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, adenozin deaminaz, hemoglobin gibi enzim ve proteinler

- Katekolaminler, tioller, tetrahidroproteinler, hidrokinonlar gibi küçük moleküllerin otooksidasyonu
- Geçiş metallerine afinitesi olan antibiyotikler
- Makrofaj ve diğer fagositik hücrelerin aktivasyonu
- NADPH oksidaz, lipooksijenaz, prostaglandin sentetaz içeren plazma membran enzimleri ve lipid peroksidasyonu [164] (Şekil 2.10).

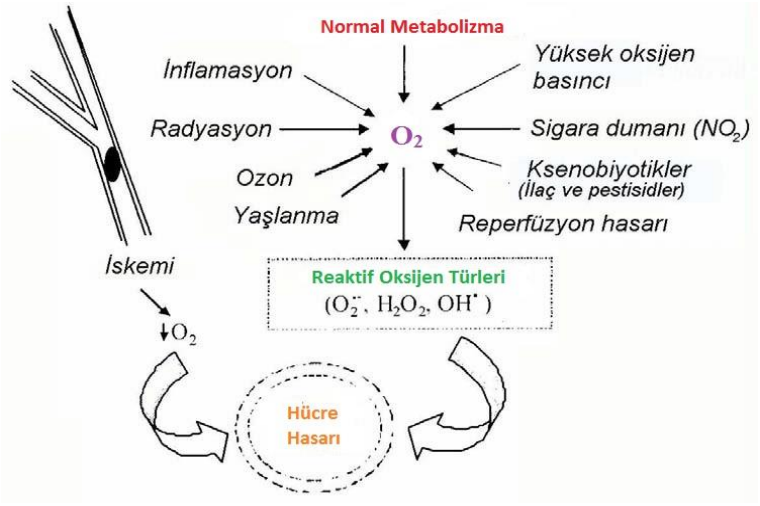


Şekil 2.10. Endojen reaktif oksijen türlerinin kaynakları

2.3.1.1.2. Oksidanların Eksojen Kaynakları

Hücredeki oksidanların eksojen kaynakları şunlardır:

- İyonize ve non-iyonize radyasyon
- Metal iyonları
- Ksenobiyotikler: hiperoksi, hava kirliliği, anestezik maddeler, pestisitler, solventler, aromatik hidrokarbonlar ve sigara dumanı (Şekil 2.11)



Şekil 2.11. Eksojen reaktif oksijen türlerinin kaynakları

- Bağışıklık yapan maddeler: alkol, uyuşturucu maddeler
- Stres; stres durumunda vücutta katekolamin düzeyi artar ve oksidasyon ile radikal üretimi de artar
- Yiyeceklerde bulunan çeşitli katkı maddeleri
- Egzersiz
- Sisplatin, doksorubisin, metotreksat, bleomisin, siklosporin gibi antineoplastik ilaçlar [165].

2.3.2. Oksidanların Oluşumunun Engellenmesi

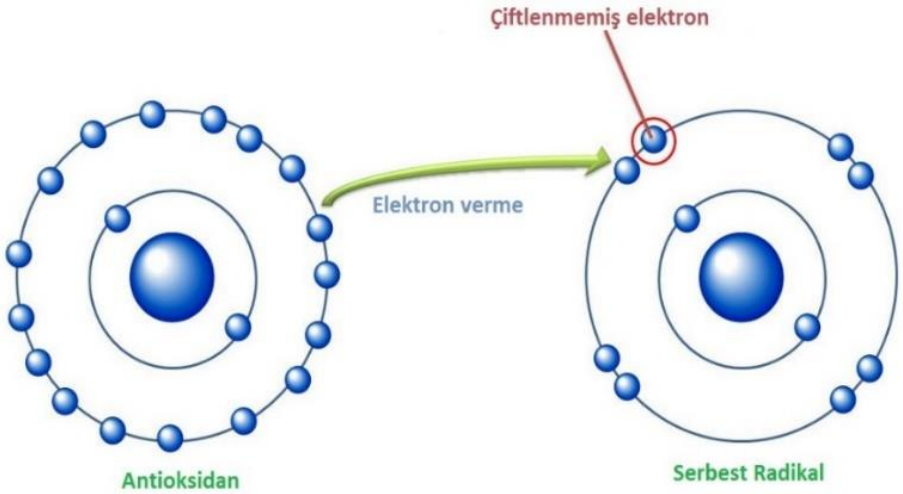
Oksidan madde oluşumunun engellenmesinde ilk aşama oksidatif stres yaratıcı etkenlerin ortadan kaldırılmasıdır. Ayrıca doku hasarı ile oksidan oluşumuna neden olan biyokimyasal reaksiyonların inhibe edilmesi ve oksidan madde salgılayan hücrelerin inaktive edilmesi de etkili bir yöntemdir [166].

Ancak ROS'ların oluşumu belirli sınırlar içinde kaçınılmaz olup, üretilen oksidan maddelere bağlı olarak gelişecek hasarı önlemek için, artmış oksidanları etkisizleştirecek antioksidan maddelerin kullanılması gerekir. Antioksidan maddeler, çeşitli mekanizmalarla bu olayı gerçekleştirir. Oksidanlarla etkileşip, onları tutarak çok daha zayıf etkisiz bir moleküle çevirebilir. Örneğin doğal antioksidanlardan enzimler bu şekilde etki gösterir. Oksidanlarla etkileşime girerek, onlara bir hidrojen aktarmak

suretiyle, oksidan maddeleri inaktif hale getirebilen maddeler vardır. Vitaminler, flavanoidler, mannitol böyle bir etkiye sahiptirler. Hemoglobin, seruloplazmin ve ağır minareller de oksidan maddeleri kendilerine bağlayarak, oksidan zincirleri kırabilirler [167].

2.3.2.1. Antioksidanlar

Oksidatif stresin olumsuz etkilerine karşı kullanılan antioksian maddeler, doğal antioksidanlar ve ilaçlar olmak üzere iki farklı grupta incelenebilir. Doğal antioksidanlar, organizmadaki bazı enzimler, mikro ve makro moleküllerden oluşur [168]. Çeşitli reaksiyonlarda rol alan süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, hidroperoksidaz, sitokrom C oksidaz gibi enzimler antioksidan özelliğe sahiptir [169]. Ayrıca seruloplazmin, transferrin, ferritin, hemoglobin, myoglobin gibi protein yapısındaki makromoleküller ve E Vitamini, C Vitamini, tiol içeren bileşikler, glikoz, bilirübin gibi mikromoleküllerin de antioksidan özelliğe sahip olduğu ve oksidatif stres yaratan durumlarda vücutta bu maddelerin sentez ve salınımınm arttığı da bilinmektedir. Ayrıca son zamanlarda, yapılan yoğun araştırmalar sonucunda pineal bezden salgılanan bir hormon olan melatoninin de kuvvetli antioksidan özelliğe sahip olduğu gözlenmiştir [170] (Şekil 2.12). Oksidatif stress sonucu meydana gelen oksidan maddelerin zararlı etkilerinden korunmak amacıyla sitokinler, barbitüratlar, Fe şelatörleri, ksantin oksidaz inhibitörleri ve mannitol gibi ajanların kullanımı da oldukça yaygındır [171].



Şekil 2.12. Antioksidanların genel çalışma mekanizması

Antioksidanlar etkilerini dört farklı şekilde gerçekleştirmektedir:

Süpürücü etki (scavenging): Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya reaktif olmayan yeni bir moleküle çevirme işlemine süpürücü (toplayıcı) etki denir.

Baskılayıcı etki (quencher): Serbest oksijen radikalleri ile etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya inaktif şekle dönüştüren etkiye baskılayıcı etki denir.

Onarıcı etki (repair): DNA'daki hasarların tamir edilmesinde bu etki geçerlidir.

Zincir kırıcı etki (chain breaking): Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak zincirlerini kırarak fonksiyonlarını engelleyici etkiye zincir kırıcı etki denir [172].

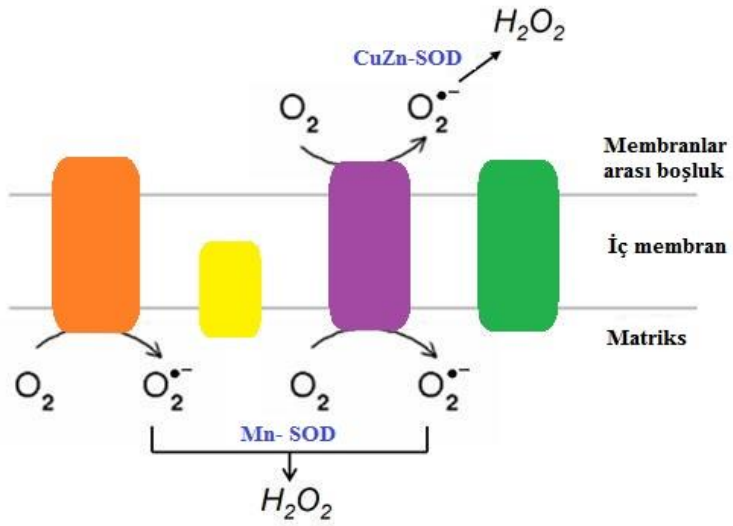
2.3.2.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (SOD), oksijeni metabolize eden tüm hücrelerde en önemli antioksidan enzimlerden biridir. Bu nedenle, SOD aktivitesi üzerine yapılan araştırmalar gittikçe artmakta ve antioksidan sistemlerin anlaşılmasına katkı sağlamaktadır [173]. Süperoksit dismutazlar metal içerikleri dikkate alınarak dört sınıfa ayrılır. Sınıflardan biri ökaryotların sitoplazmasında, kloroplastlarda ve bazı prokaryotların periplazmasında bulunan Cu^{+2}-Zn^{+2}-SOD; ikinci sınıf bakteriler, arkeler, mitokondri ve kloroplastlarda bulunan Mn^{+3}-SOD; üçüncü sınıf ise aerobik ve anaerobik bakterilerde, arkelerde ve bitkilerde bulunan Fe^{+3}-SOD'dur. Dördüncü tip olan Ni-SOD ise sadece bazı *Streptomyces* türlerinde tespit edilmiştir [174].

Süperoksit dismutaz, süperoksit serbest radikallerinin oksijen ve hidrojen peroksite dönüşümünü katalize eden enzimdir. Biyolojik sistemlerde elektron kaynağı genellikle enzimler ve indirgeyici maddelerdir. İndirgeyici maddeler reaktif türleri azaltarak antioksidan olarak hareket ederken, elektron vericiler tipik olarak geçiş metali iyonlarının indirgenme/ oksidasyon reaksiyonlarına aracılık ederek daha az reaktif türleri azaltarak pro-oksidanlar olarak hareket ederler [175] (Şekil 2.13).

$$2\ O_2^{\cdot} + 2\ H^+ \text{----------} > H_2O_2 + O_2$$

SOD'lar $O_2 \cdot$ konsantrasyonunu değiştirerek hem süperoksit toksisitesinden hem de CAT aktivasyonu ile dolaylı olarak oluşabilecek $OH \cdot$ ve H_2O_2 toksisitesinden hücreyi korumuş olur. Cu-Zn SOD, siyanür ve H_2O_2 tarafından inaktive edilir [176].



Şekil 2.13. SOD aktivitesi

2.3.2.1.2. Katalaz (CAT)

Katalaz tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan bir enzimdir. Özellikle eritrositlerde ve karaciğer dokusunda bol bulunur. Enzim; %20 oranında sitoplazmada, %80 oranında da peroksizomlarda lokalizedir [177]. Molekül alt birimlerinin ayrılması ise; enzimin inaktive olmasına yol açar. Enzimler arasında en yüksek katalitik dönüşüm hızına sahip olan katalazın aktivitesi için Fe gerekmektedir. CAT tüm enzimler içinde, en büyük reaksiyon hızına sahip olanıdır. Bir molekül CAT bir dakikada 6 milyon hidrojen peroksit molekülünü su ve oksijene dönüştürebilir [178].

Dokularda enzimin aktivitesi büyük farklılık gösterir. Karaciğer ve böbrekte en yüksek aktivite, destek dokuda ise en düşük aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. H_2O_2'in yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu ortamlarda oldukça etkilidir [179]. Ortamda oluşan H_2O_2'i okside edici enzimlerin etkisiyle direkt olarak suya dönüştürür. Katalazın bu reaksiyonu iki basamakta gerçekleşir. Birinci basamakta, kompleks I olarak ifade edilen ara ürün oluşur. Bu ara ürün, hidrojen peroksidin enzime bağlanması ile oluşur.

Kompleks-I'in ikinci hidrojen peroksit molekülüyle reaksiyonu, su ve moleküler oksijen oluşumuyla sonuçlanır [180].

$CAT + H_2O_2 \rightarrow CAT - H_2O_2$ (Kompleks I)

$CAT - H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow CAT + 2\ H_2O + O_2$ (Katalaz aktivitesi)

Eğer, metanol, etanol gibi bir hidrojen verici kompleks I ile reaksiyona girerse, oluşan ürün su ve bir aldehittir.

$CAT - H_2O_2 + CH_3OH \rightarrow CAT + 2\ H_2O + HCOH$ (peroksidatik aktivite)

Ortamdaki H_2O_2 konsantrasyonu düşük olduğu durumlarda hidrojen peroksiti substrat olarak kullanan diğer antioksidan enzimler (GSH-Px gibi) devreye girerek hidrojen peroksiti ortamdan uzaklaştırırlar. CAT ve GSH-Px enzimlerinin benzer etkisi olduğu halde hücre içindeki yerleşim ve etki yerleri bakımından farklılık vardır. GSH-Px enzimi başlıca sitozol ve mitokondride bulunurken, CAT enzimi peroksizomlarda mevcuttur [181].

2.4. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)

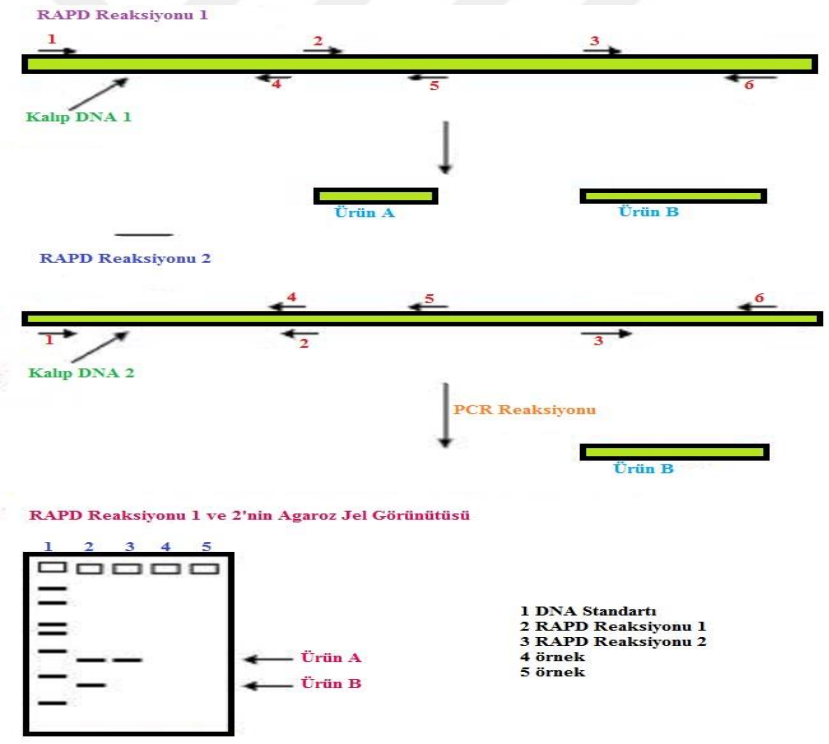
Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA olarak tanımlanan ve genetik polimorfizmi belirleyen bir tekniktir. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) metoduna dayalıdır ve rastgele dizilimdeki kısa oligonükleotid primerler kullanılarak genomik DNA üzerinde belirlenen parçacıklar çoğaltılmakta olup reaksiyonun gerçekleşmesi için araştırılan genomun baz dizilimi hakkında herhangi bir ön bilgiye ihtiyaç yoktur.

RAPD tekniği kullanılarak belirlenen DNA polimorfizmi; agaroz jelde RAPD bandının varlığı veya yokluğu ile kendini göstermekte ve genomda şekillenen delesyon, insersiyon veya primerlenme bölgelerindeki ya da bölgeler arasındaki nükleotid dizilim farkını yansıtmaktadır. Rastgele primerlerin genomdaki sayısız bölgeyi çoğaltabilme potansiyeli ve çoğalan DNA parçacıklarının genetik sınıflara özgü tabiatı RAPD tekniğini genetik çalışmalar için tercih nedeni haline getirmiştir [182].

2.4.1. RAPD' in Mekanizması

Standart bir PCR'da, genellikle her biri 18-25 baz uzunluğunda, DNA iplikçiğine spesifik primerler kullanılmaktadır [183]. Primerlerdeki baz diziliş sıraları, hedef dizinin yan bölgelerindeki DNA dizi bilgisine dayalıdır. Ayrışarak tek iplikçiğe dönüşmüş DNA kalıbındaki bu spesifik bölgelere, PCR'ın yapışma fazında primerler bağlanırlar ve çoğalacak bölgeleri tanımlarlar [184] (Şekil 2.14).

RAPD tekniğinin PCR aşamasında ise, rastgele dizilimdeki primerler kullanılmaktadır. Rasgele seçilmiş olan primer, RAPD'in yapışma fazı boyunca tamamlayıcısı olan bölgelere bağlanmaktadır. Eğer primerlerden ikisi karşılıklı iplikçiklerdeki kalıba uygun bölgede ve çoğalabilecek mesafede (yaklaşık 2500 veya daha az baz uzunluğu) bağlanırlarsa, bu durumda farklı bir parçacık çoğalabilmektedir [185].



Şekil 2.14. RAPD-PCR reaksiyonunun şematik gösterimi

Her bir RAPD primeri aynı PCR esnasında, farklı lokuslardan farklı sayılarda (1-10 veya daha fazla) DNA parçacıklarını çoğaltma potansiyeline sahiptir. Diğer bir ifadeyle farklı primerler farklı RAPD polimorfizmlerini üretmektedir. Amplifikasyon sonucunda oluşan DNA ürünü, agaroz jel elektroforezi işlemine tabi tutulur [186]. Örneklerin hepsinde

bulunan RAPD bantları monomorfik olarak kabul edilmektedir. Bazı bireylerde bulunmayanlar veya değişken mobiliteye sahip olanlar ise polimorfik olarak kabul edilmektedir. Elde edilen RAPD bantlarında gözlemlenen polimorfizmlerin, genetik ilişkilerin belirlenmesinde önemli olduğu kabul edilmiştir [187].

RAPD polimorfizmleri, primer yapışmasını önleyen bir veya her iki primerlenme bölgesindeki dizi farklılığından kaynaklanmaktadır. RAPD polimorfizmleri primer bağlanma bölgesinin varlığını veya bulunduğu bölgeyi etkileyen ve bu bölgeler arası kısmın ölçüsünü değiştiren mutasyonlardan kaynaklanabildiği gibi, amplifikasyonu önleyen mutasyonlardan (delesyon, insersiyon ve inversiyon gibi) da kaynaklanabilmektedir. Tekniğin, primer ve kalıp arasındaki tek baz yanlış eşleşmelerini belirlemedeki duyarlılığı da kanıtlanmıştır. RAPD polimorfizmleri, varyasyon oluşumunda ve nokta mutasyonlarında olduğu gibi, primer bağlayan bölgeler arasındaki alanların farklılıklarından kaynaklanmaktadır. Bu bölgelerdeki mutasyonlar, sekonder yapıların şekillenmesini sağlayabilmekte, bozabilmekte veya RAPD polimorfizmleri ile sonuçlanabilmektedir. RAPD tekniğindeki ana güçlük, sonuçta oluşan bant profillerinin reaksiyon şartlarındaki varyasyonlara, DNA kalitesine ve PCR ısı profiline çok duyarlı olmasıdır [188, 189].

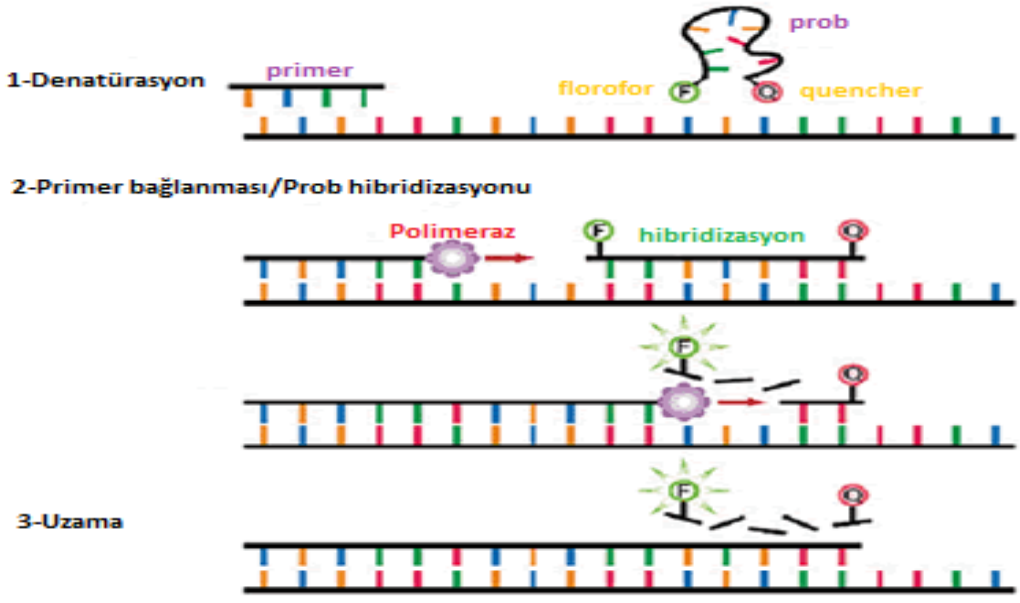
2.5. Kantitatif Real-Time PCR

Real-time PCR, DNA'nın çoğaltılmasını ve ürünlerin sadece bir tüpte belirlenmesine olanak sağlayan bir yöntemdir [190]. Bu metotta, gen ifadesinin değerlendirilmesinde basit PCR metotu ile gen analizi birlikte kullanılmaya başlanmıştır. Yöntemde PCR sonucu oluşan çoğaltımlar görünür hale gelmiş ve görüntülenebilen floresan işaretleyicili boya ve probların kullanıldığı, çoğalan DNA ile floresanın paralel şekilde arttığı bir amplifikasyon sistemidir [191, 192].

Elde edilen DNA'nın kopya sayısının ve mRNA'nın sayısal değerlerle ifade edilmesi en sık kullanılan amaçlarındandır. Bu amaçların dışında SNP analizi, tek nokta mutasyonları, kromozom bozuklukları, DNA hasarı, metilasyon tespiti ve patojen belirleme çalışmalarında da sıklıkla kullanılmaktadır [193, 194].

2.5.1. Taq-Man® Prob Yöntemi

Tag-Man® prob yönteminde, çoğaltılmak istenilen DNA'ya tamamlayıcı ve floresan olarak işaretlenmiş tek zincirli bir prob kullanılmaktadır. Floresan işaretli probun 5' ucunda "fluorophore" ve 3' ucunda da "quencher" bulunmaktadır. 3' ucunda bulunan baskılayıcı özellikteki TAMRA boyası 5' uçta bulunan FAM boyasının sinyal oluşturmasını baskılamaktadır. Prob, hedef DNA'ya bağlansa dahi floresan sinyalleri zayıftır. Amplifikasyon esnasında hedef nükleik asitler üzerinde primerlerin bağlanma bölgelerinde Taq-Man problar bağlanma gösterirler. Primerler bağlandıktan sonra oluşan yeni zincir uzamaya başlar. Probun bağlandığı bölgeye gelindiği zaman Taq-DNA polimeraz, 5'→3 nükleaz aktivitesi sonucu probu 5' uçtan uzaklaştırır. Serbest kalan prob 5' uçta FAM boyası ile sinyal oluşturur. Her siklusta amplikon miktarına bağlı olarak sinyal artmaktadır [195, 196] (Şekil 2.15).



Şekil 2.15. Taq-Man® prob yöntemi

2.5.2. SYBR Green Yöntemi

Özgül olmayan çift iplikli DNA'nın çoğaltılmasında kullanılan bu yöntemde, kullanılan floresan boya yalnızca çift iplikli DNA'ya bağlandığı için çoğalan DNA' nın miktarının artışına paralel bir şekilde gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu cihazında okunan floresanın miktarı da aynı doğrultuda artmaktadır. SYBR Green I bu yöntemde en sık kullanılan boyadır ve 497 nm dalga boyunda yükseltgenerek, 520 nm dalga boyunda indirgenmektedir. Çift iplikli DNA' da küçük oluğa bağlanarak çok sayıda amplifikasyona olanak sağlamaktadır (Şekil 2.16.) [197].

Çoğaltımın başlamasından önce reaksiyon homejonatında çift iplikli DNA, SYBR Green I boyası ve primerler bulunur. Primerler bağlandığında uzama başlar ve boya çift iplikli DNA'ya bağlanır ve floresan ışıma başlar. Başlangıçtaki döngülerde floresan sinyaller zayıftır ancak çoğalan ürün miktarı fazlalaştıkça yayılan floresan miktarında da hızla artış başlar. Bu yöntem standardize PCR koşullarında ve dizaynı iyi yapılmış primerlerin seçimi ile çok sayıda hedef genin doğru bir şekilde çoğaltılmasına olanak sağlar [198].

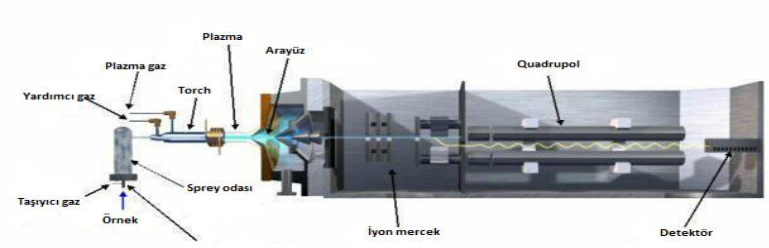


Şekil 2.16. SYBR Green'ın çift ipilikli DNA'ya bağlanması

2.6. ICP-MS Test Yöntemi

ICP-MS (İndüktif Olarak Eşleştirilmiş Plazma - Kütle Spektrometresi) yöntemi, örneklerin yüksek sıcaklık barındıran plazmaya, çoğunlukla argon, gönderilmesi sonucu moleküller arası bağlarda kırılmaların meydana geldiği ve bunun sonucunda atomlarda iyonlaşmanın meydana geldiği analitik bir metottur [199]. Katı ve sıvı örneklerde bulunan elementlerin yapı ve miktarını tayin eden test yöntemidir. Örnek genellikle bir solüsyon olarak giriş sistemi ile nebulizöre ve sprey odacığına alınır. Bu sistemde yüksek hızlı

argon akımı vasıtasıyla solüsyonda sisleşme meydana gelir. Sadece çok küçük damlacıklar argon plazmasına taşınır, diğerleri doğrudan atığa gider. 6000 Kelvin civarında sıcaklıklardaki plazma örneği buharlaştırır ve iyonize eder. İyonlar, atmosferik basınçtan örnekleyici ve süzücü konlarla yüksek vakumlu ortama geçerler. Sonra iyon akımı, iyon lensleri ile quadrupola odaklanarak kütle filtresine yönlendirilir. İyonlar, kütle spektrometresinde kütle/yük oranına göre ayrılarak ölçülürler [200] (Şekil 2.17).



Şekil 2.17. ICP-MS test sistemi

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD

3.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Adaptasyonu

Çalışmada kullanılan Zebra balıkları ticari firmalardan temin edilmiş ve Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü Sucul Hayvan Deneyleri Araştırma Laboratuvarına plastik torbalar ile getirilmiştir. Getirilen balıklar 50x50x100 cm, 100 L'lik cam akvaryumlar içinde 26 °C'de sürekli havalandırma yapılarak, pH 7-8'de, 12:12 gece-gündüz periyodunda 2 hafta boyunca ortama adapte edilmiştir. Adaptasyon süresi boyunca balıklar her gün kuru balık yemi ile beslenmiştir.

3.2. Deneyde Kullanılan Metal Çözeltileri Muamelesi

Çalışmada test edilecek metal konsantrasyonları ülkemizde sulama suyu ve içme suyu limitlerine göre belirlenmiştir. Buna göre 2 konsantrasyon belirlenmiş olup, en düşük konsantrasyon, İnsani tüketim amaçlı sular hakkında yönetmeliğine göre [201] As, Cd ve Cr için sırasıyla 10 µg/L, 5 µg/L ve 50 µg/L ve Co ve Al için su kirliliği kontrolü yönetmeliği kıta içi su kaynakları 1. Sınıf içme suyu kalitesinde kabul edilebilir limitler olan sırasıyla 10 µg/L ve 300 µg/L [202] olarak belirlenmiştir. Metal konsantrasyonları Su kirliliği kontrolü yönetmeliği teknik usuller tebliğine göre sulama sularında izin verilebilen maksimum ağır metal ve toksik elementlerin konsantrastrasyon değerleri en yüksek değer olarak belirlenmiştir. Buna göre Al, As, Cd, Co ve Cr için en yüksek

değerler sırasıyla, 5000 µg/L, 100 µg/L, 10 µg/L, 50 µg/L ve 100 µg/L olarak belirlenmiştir.

3.3. Birikim Deneyleri

Statik deney koşullarında, aktif karbondan geçmiş içme suyunda bulunan zebra balıklarına, Al, As, Cd, Co, Cr metalleri karışım halinde iki farklı konsantrasyon serisi ile 5, 10, 20 günlük periyotlarda muamele edilmiştir. Al ($AlNH_3SO_4$), As (Na_2HAsO_4), Cd ($CdSO_4$), Co ($Cl_2Co.4H_2O$), Cr ($K_2Cr_2O_7$) tuzlarından hazırlanan stok çözeltilerinin seri sulandırılmasıyla 50x50x100 cm, 100 L'lik deney akvaryumlarında öngörülen konsantrasyon metal karışımlarını hazırlanmıştır.

Zebra balıkları her grupta 5 balık olacak şekilde gruplara ayrılmıştır. Akvaryumlardaki su sıcaklığı 24-26 °C ve aydınlık: karanlık (12:12) olacak şekilde sabitlenmiştir. Deney süresince akvaryumlar sürekli havalandırılmıştır. Muamele solüsyonları gün aşırı değiştirilmiştir. Beslenme günde bir kez kuru yem verilerek yapılmıştır. Kontrol grubuna metal muamelesi yapılmamıştır. Deney 3 kez tekrar edilmiştir.

Belirlenen deney süreleri sonunda kontrol ve en düşük konsantrasyonlardan başlayarak deney akvaryumlarından çıkarılan zebra balıkları pellet buz-su karışımında anestezi yapılarak sakrifiye edilmiş ve solungaç diseksiyonu gerçekleştirilmiştir. Alınan solungaç dokuları tartılmıştır, Ağırlık ölçümlerinde ± 0.01 g hassasiyetli elektronik terazi kullanılmıştır. Çalışma sonunda balıklar solungaçlar alınarak sıvı azot (-80 °C) içinde dondurulmuş ve genetik analizlerde kullanılmak üzere -86 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

3.4. Metal Birikiminin Belirlenmesi

Solungaç dokusu örnekleri tartılarak yaklaşık 1 gram doku % 35 HNO_3 (Merck-CAS no: 7697-37-2) ile 4 mL' ye tamamlanmıştır. Örnekler CEM Mars 6 mikrodalga yakma sisteminde yakılmıştır. Yakılan örnekler % 2'lik HNO_3 çözeltisiyle falkon tüp içeresinde 10 ml'ye tamamlanmış ve ICP-MS (Agilent 7700 xx, USA) oto örnekleme sisteminde okutulmuştur. ICP-MS cihazının kalibrasyonu her bir element için 6 standart ağır metal çözeltisi kullanılarak (0, 12,5, 25, 50, 100, 200 ppb) yapılmıştır.

3.5. DNA Ekstraksiyonu ve RAPD Analizi

Solungaç dokusundan Genomik DNA'lar DNeasy® Tissue-Blood (Qiagen, USA) kit ile kit protokolü kullanılarak izole edilmiştir. Total DNA, PCR reaksiyonu öncesi nukleaz free su kullanılarak 25 ng/µL konsantrasyona ayarlanmıştır. Standart 50 µl PCR reaksiyonu; 2 µL (50±10 ng) kalıp DNA, 5µL 10× Taq tamponu + KCl (Fermentas, EP0071), 1.25 U Taq DNA polymerase (Fermentas, EP0401), 6 µL 2.5 mM MgCl2 (Fermentas, R0971), 1 µL 10× dNTPs (Fermentas,R0181), 1µL her bir primer ve nukleaz free su (10977-015, Invitrogen™) maddelerinin Applied Biosystems® ProFlex™ PCR sisteminde kullanılması ile yapılmıştır. DNA amplifikasyonu ABI PCR [40 döngü 95 °C denatürasyon (30 saniye), 37 °C eşleşme (30 saniye) ve 72 °C uzama (90 saniye)] ile başlangıç 94 °C denatürasyon (3 dakika) ve son uzama 72 °C (30 dakika) olarak gerçekleştirilmiştir. DNA ile çoğaltılan örneklerden, 15 µL alınarak 3 µL yükleme boyası (R0611, Fermentas) eklenmiş ve % 2 agaroz jel + etidyum bromit, 2× TAE (1.6 M Tris, 0.8 M asetik asit, 40 mM EDTA, Ambion® 10X TAE) tampon içerisinde yürütülmüştür. Moleküler ağırlık standardı olarak üretici talimatlarına göre 100 baz çiftlik DNA (Geneaid, DL007) kullanılmıştır. Elde edilen bantlar UV transilluminatörde (Viber Lourmat, Quantum ST4) izlenmiş ve BIO-PROFIL, BIO-1D++ programları kullanılarak analiz edilmiştir. Genomik Kalıp Stabilitesi (GTS), rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA verileri kullanılarak hesaplanmıştır. Buna göre;

$c = (a+ b)/2$

$GTS (\%) = [1 - (c/n)] \times 100$

a = yeni görünen bantlar,

b = kaybolan bantlar,

c = toplam polimorfik bant sayısının ortalaması

n = kontroldeki toplam bantların sayısını ifade etmektedir [203].

3.6. RNA Analizi

Dokulardan total RNA izolasyonu için Total RNA PureLink® RNA Mini Kit (Life Sciences) kullanılmış ve RNA kit protokolüne göre izole edilmiştir. Protokole göre hücre homojenatlarına %70 etanol ilave edilmiştir. Homojen bir görüntü elde edilene kadar vorteksleme yapılmıştır. 700 µL örnek 12.000 x g' de 15 dakika santrifüj edilmiş ve santrifüj sonrası presipitant atılarak hücreleri üzerine 700 µL yıkama tamponu ilave edilmiştir. 12.000 x g' de 15 dakika tekrar santrifüjden sonra toplama tüpüne alınan hücrelere yıkama tamponu ilave edilmiştir. 12.000 x g' de 15 dakika santrifüj işlemi 2 kez daha tekrar edildikten sonra hücreler özel filtreli tüplere alınmış ve üerine 100 µL RNase-free su ilave edilmiştir. 1 dakika oda sıcaklığında inkübasyon sonrası 12.000 x g'de 2 dakika santrifüj yapılmıştır. Son kez filtreden geçirilen hücre homojenatından izole edilen RNA miktarları OPTIZEN NanoQ mikrohacim fotometresi ile belirlenmiştir. Total RNA konsantrasyonu, High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) kullanarak tamamlayıcı DNA (cDNA)'nın birinci zincirinin sentezi için 50 ng/µL olarak ayarlanmıştır. Applied Biosystems® ProFlex™ PCR sistemi (adım 1: 25 °C, 10 dakika; adım 2: 37 °C, 120 dakika; adım 3: 85 °C, 5 dakika) ile cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA'lar daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

3.7. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) Çalışmaları

Elde edilen cDNA'lar SYBR® Select Master Mix (Life Technologies, USA) ile ABI Step One Plus Real-Time PCR'da protokole uygun olarak Tablo 3.1'de verilen primer problar kullanılmıştır.

Gen ekspresyonlarında göreceli kat değişimleri kontrol ile karşılaştırılmış ve standart olarak 18S mRNA ekspresyonları kullanılmıştır. Karşılaştırmalı döngü eşiği (ΔCt) metodu ile mRNA' ların ekspresyon düzeyleri analiz edilmiştir.

Tablo 3.1. qRT-PCR'da kullanılan genler ve primer sekansları ile RAPD' te kullanılan primerler ve sekansları

qRT-PCR'da Kullanılan Genler	Primer Sekansları
Süperoksid dismutaz (CuZn-SOD)	F:5'-TGACAACACAAACGGCTGC-3' R:5'-ACTTTCCTCATTGCCACCC-3'
Katalaz (CAT)	F:5'-AACTGCATAAGTAGCCAAG-3' R:5'-CTGTGAAATGTAGAATAGCC-3'
RAPD' te Kullanılan Primerler	**Sekansları**
S 91	5' TGCCCGTCGT 3'
OPU 16	5' CTGCGCTGGA 3'
OPU 11	5' AGACCCAGAG 3'
RAPD 6	5' CCCGTCAGCA 3'

3.8. İstatistiksel Analiz

Metal birikimlerinin belirlenmesi, RAPD analizi sonucu % GTS değerleri ve gen ifade düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde; kontrol grubu ve deneme gruplarının karşılaştırılmasında ve ortalamaların girdiği grupların belirlenmesinde Tukey Testi kullanılmıştır. Metal birikimlerinde metallerin birbirleri ile olan etkileşimleri korelasyon testi ile değerlendirilmiştir. Analizlerde anlamlılık düzeyi ($p \leq 0.05$) olacak şekilde SPSS 17.0 yazılımı kullanılmıştır.

BÖLÜM 4

SONUÇLAR

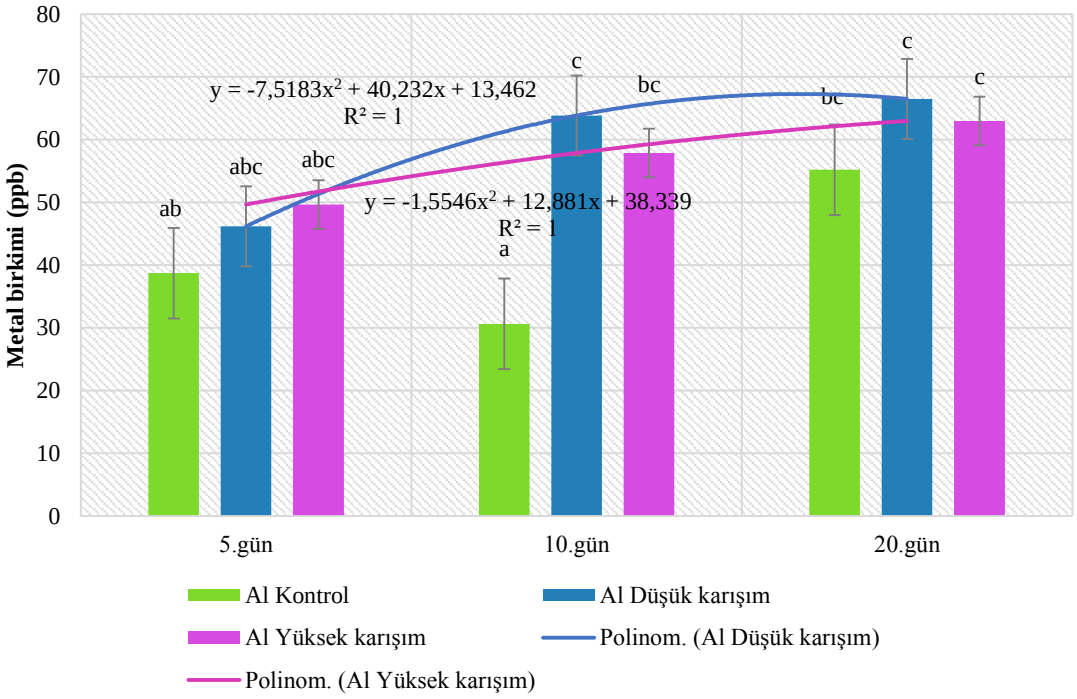
4.1. Solungaç Dokularında Metal Birikimleri

Balık solungaç dokularından alınan örneklerde metal düzeylerinin belirlenmesi için yapılan çalışmanın sonuçları Tablo 4.1'de verilmiştir.

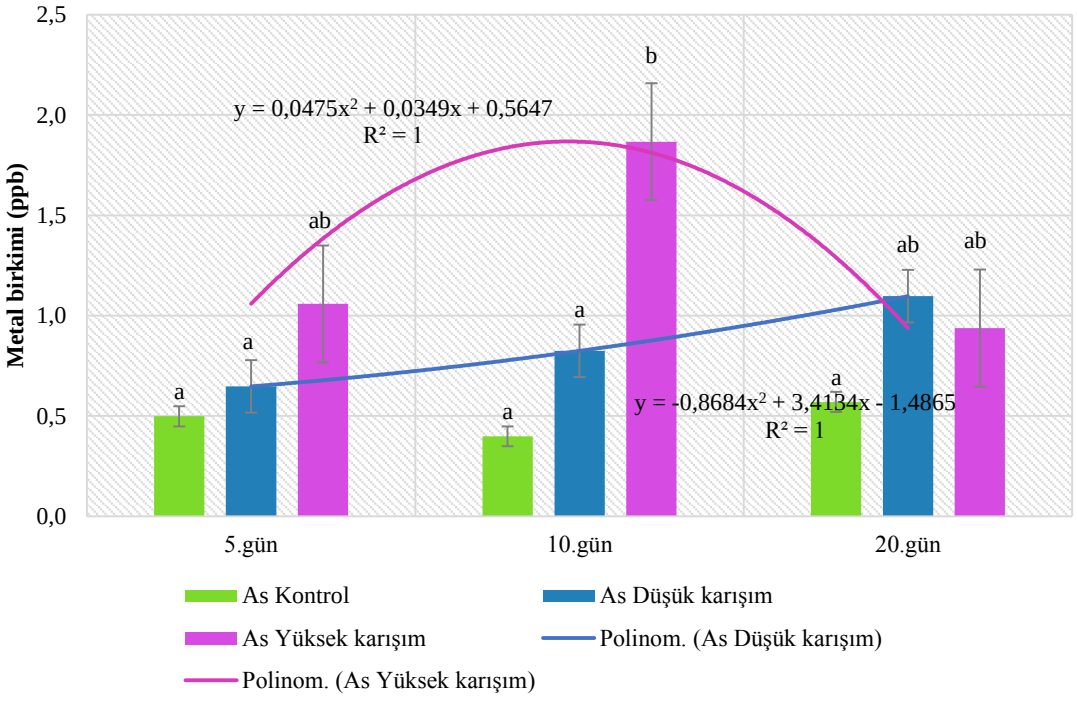
Tablo 4.1. Zebra balığı solungaç dokularındaki metal birikimleri. Anlamlılık sonuçları p≤0,05 * ; p≤0,01 ** ; p≤0,001 *** olacak şekilde değerlendirilmiştir. Düşük doz karışımı: Al, As, Cd, Co, Cr; 300, 10, 5, 10, 50 µg/L, Yüksek doz karışımı: Al, As, Cd, Co, Cr; 5000, 100, 10, 50, 100 µg/L.

Metaller	Dozlar	5.gün (ppb) (Ort ± SH)	10.gün (ppb) (Ort ± SH)	20.gün (ppb) (Ort ± SH)
Al	Kontrol	38,72 ± 3,94	30,64 ± 2,31	55,2 ± 1,95
	Düşük doz	46,18 ± 3,69	63,85 ± 8,76 **	66,49 ± 7
	Yüksek doz	49,67 ± 1,74	57,88 ± 3,61 *	62,99 ± 0,74
As	Kontrol	0,5 ± 0,07	0,4 ± 0,05	0,57 ± 0,02
	Düşük doz	0,65 ± 0,05	0,82 ± 0,07	1,1 ± 0,26
	Yüksek doz	1,06 ± 0,32	1,87 ± 0,33 **	0,94 ± 0,18
Cd	Kontrol	0,63 ± 0,03	0,59 ± 0,14	0,61 ± 0,
	Düşük doz	0,7 ± 0,1	1,14 ± 0,17	1,38 ± 0,39 *
	Yüksek doz	1,68 ± 0,26 **	2,14 ± 0,67 **	1,21 ± 0,29
Co	Kontrol	0,79 ± 0,09	0,61 ± 0,08	0,86 ± 0,04
	Düşük doz	0,83 ± 0,06	0,92 ± 0,16	1,27 ± 0,21
	Yüksek doz	0,86 ± 0,14	1,15 ± 0,24	0,95 ± 0,1
Cr	Kontrol	0,21 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,21 ± 0,01
	Düşük doz	0,25 ± 0,01	0,26 ± 0,05	0,61 ± 0,19 **
	Yüksek doz	0,57 ± 0,09 **	0,99 ± 0,16 ***	0,21 ± 0,04

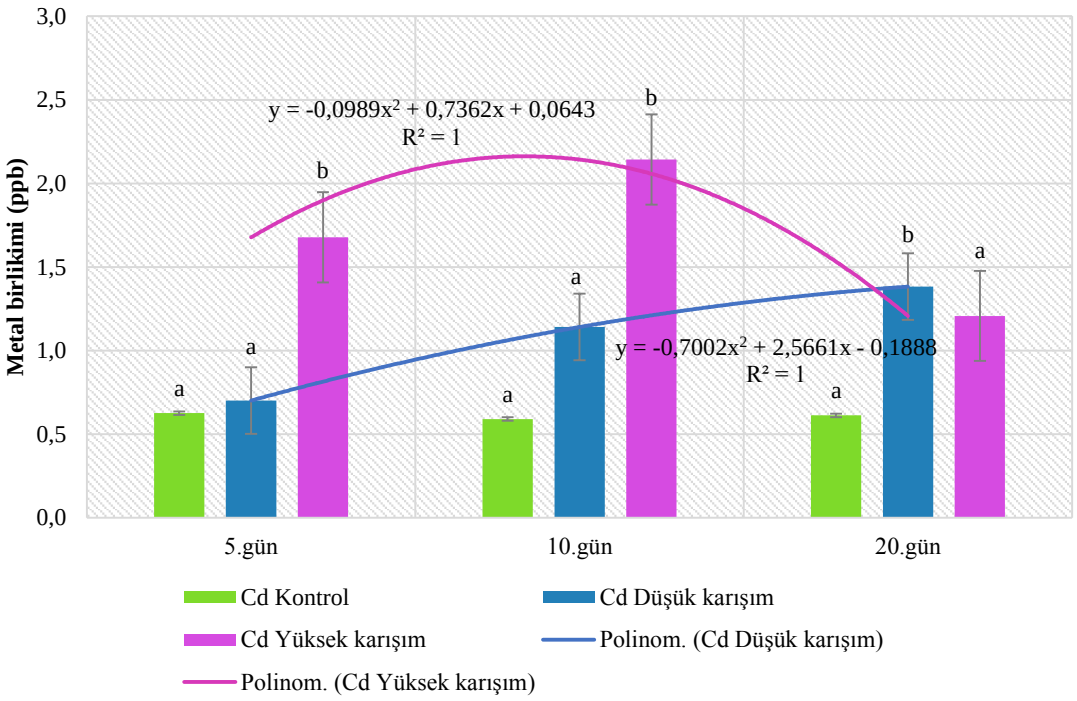
Zebra balığı solungaç dokusunda Al birikimi, 5 ve 20 günlük metal karışımı uygulamaları sonucunda kontrole göre farklılık göstermezken ($p>0,05$); 10 günlük muamelede hem düşük doz hem de yüksek doz karışım uygulamaları sonrası Al birikimi kontrolden istatistiki olarak farklıdır ($p=0,001$; $p=0,015$). Muamele günleri ile uygulanan dozlar karşılaştırıldığında, düşük dozlar ve yüksek dozlar zamana bağlı olarak anlamlı değişim göstermemiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.1). As birikimi 10.günde yüksek doz muamele ile hem kontrol hem de düşük doz muamele grupları arasında anlamlı bir farklılık göstermiştir ($p=0,002$; $p=0,011$) (Şekil 4.2). Cd birikimi değerlendirildiğinde 5. günde yüksek doz muamelesi hem kontrolden hem de düşük doz muameleden farklılık göstermiştir ($p=0,005$; $p=0,004$). Ayrıca Cd' un 10 günlük yüksek doz uygulaması ve 20 günlük düşük doz uygulaması sonucunda solungaç dokusunda meydana gelen birikim kontrolden istatistiki olarak farklıdır ($p=0,017$; $p=0,048$) (Şekil 4.3). Cr birikimi hem 5.günde ve 10.günde yüksek dozda hem de 20.gün düşük dozda kontrole göre anlamlı bir artış göstermiştir ($p=0,012$; $p=0,016$; $p=0,0001$). Ayrıca 5 ve 10 günlük Cr birikiminde, düşük ve yüksek doz grupları arasında istatistiki olarak fark bulunmuştur ($p=0,003$; $p=0,001$). Cr' un 10 ve 20 günlük birikim sonuçları karşılaştırıldığında 20.günde birikimde anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir ($p=0,0001$) (Şekil 4.4). Co birikiminde muamele grupları ile kontrol arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$). Al' birikiminde olduğu gibi Co birikimleri de zamana bağlı herhangi bir anlamlı değişim göstermemiştir (Şekil 4.) (Şekil 4.5).



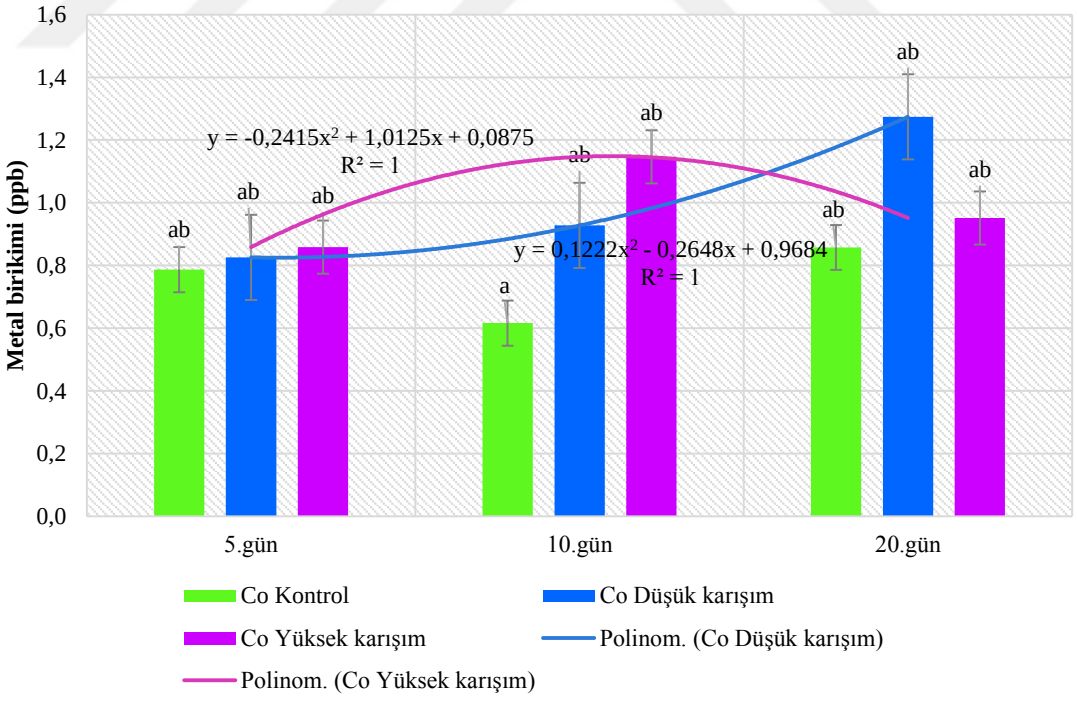
Şekil 4.1. Zebra balığı solungaç dokusunda alüminyum birikim düzeyleri. Veriler üzerinde görülen farklı harfler Tukey testi sonucu elde edilen istatistiki olarak birbirinden farklı grupları göstermektedir.



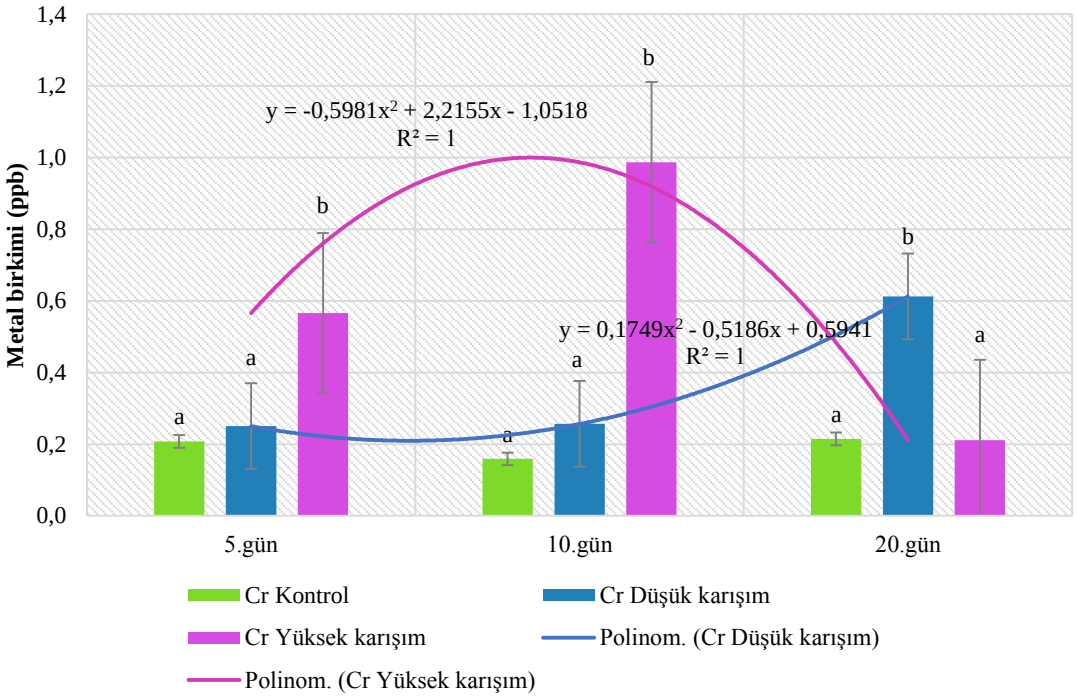
Şekil 4.2. Zebra balığı solungaç dokusunda arsenik birikim düzeyleri. Veriler üzerinde görülen farklı harfler Tukey testi sonucu elde edilen istatistiki olarak birbirinden farklı grupları göstermektedir.



Şekil 4.3. Zebra balığı solungaç dokusunda kadmiyum birikim düzeyleri. Veriler üzerinde görülen farklı harfler Tukey testi sonucu elde edilen istatistiki olarak birbirinden farklı grupları göstermektedir.



Şekil 4.4. Zebra balığı solungaç dokusunda kobalt birikim düzeyleri. Veriler üzerinde görülen farklı harfler Tukey testi sonucu elde edilen istatistiki olarak birbirinden farklı grupları göstermektedir.



Şekil 4.5. Zebra balığı solungaç dokusunda krom birikim düzeyleri. Veriler üzerinde görülen farklı harfler Tukey testi sonucu elde edilen istatistiki olarak birbirinden farklı grupları göstermektedir.

5 günlük düşük doz ve yüksek doz metal karışımı uygulaması sonucunda metaller arasında korelasyon incelendiğinde, metaller arasında hem negatif hem de pozitif korelasyonlar olmasına rağmen istatistiki olarak anlamlı değildir ($p>0,05$) (Tablo 4.2, 4.3).

Tablo 4.2. 5.gün düşük doz metal uygulaması sonucu metaller arasındaki korelasyon

		Al	Cr	Co	As	Cd
Al	Pearson Korelasyon	1	0,668	0,204	0,516	0,452
	Anlamlılık		0,147	0,698	0,295	0,368
Cr	Pearson Korelasyon	0,668	1	0,667	0,662	0,185
	Anlamlılık	0,147		0,148	0,152	0,725
Co	Pearson Korelasyon	0,204	0,667	1	0,054	0,565
	Anlamlılık	0,698	0,148		0,919	0,243
As	Pearson Korelasyon	0,516	0,662	0,054	1	-0,250
	Anlamlılık	0,295	0,152	0,919		0,632
Cd	Pearson Korelasyon	0,452	0,185	0,565	-0,250	1
	Anlamlılık	0,368	0,725	0,243	0,632	

Tablo 4.3. 5.gün yüksek doz metal uygulaması sonucu metaller arasındaki korelasyon

		Al	Cr	Co	As	Cd
Al	Pearson Korelasyon	1	-0,054	-0,302	0,802	0,235
	Anlamlılık		0,919	0,560	0,055	0,655
Cr	Pearson Korelasyon	-0,054	1	-0,284	-0,226	0,252
	Anlamlılık	0,919		0,585	0,667	0,631
Co	Pearson Korelasyon	-0,302	-0,284	1	0,147	0,655
	Anlamlılık	0,560	0,585		0,781	0,158
As	Pearson Korelasyon	0,802	-0,226	0,147	1	0,369
	Anlamlılık	0,055	0,667	0,781		0,472
Cd	Pearson Korelasyon	0,235	0,252	0,655	0,369	1
	Anlamlılık	0,655	0,631	0,158	0,472	

10 günlük düşük doz metal karışımı uygulamaları sonrası metaller arasındaki korelasyon değerlendirildiğinde Al ile Cr, Co ve Cd arasında; Cr ile Co ve Cd arasında anlamlı düzeylerde pozitif korelasyon bulunmaktadır (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. 10.gün düşük doz metal uygulaması sonucu metaller arasındaki korelasyon. Tablodaki anlamlılık dereceleri p≤0,05 *; p≤0,01 ** şeklinde verilmiştir.

		Al	Cr	Co	As	Cd
Al	Pearson Korelasyon	1	0,850*	0,856*	0,138	0,857*
	Anlamlılık		0,032	0,030	0,795	0,029
Cr	Pearson Korelasyon	0,850*	1	0,955**	0,284	0,958**
	Anlamlılık	0,032		0,003	0,586	0,003
Co	Pearson Korelasyon	0,856*	0,955**	1	0,413	0,979**
	Anlamlılık	0,030	0,003		0,416	0,001
As	Pearson Korelasyon	0,138	0,284	0,413	1	0,439
	Anlamlılık	0,795	0,586	0,416		0,384
Cd	Pearson Korelasyon	0,857*	0,958**	0,979**	0,439	1
	Anlamlılık	0,029	0,003	0,001	0,384	

10 günlük yüksek doz metal karışımı uygulaması sonucunda Al ile Cr, Co ve Cd arasında ve Cr ile As arasında negatif korelasyon bulunmasına rağmen istatistiki olarak anlamlı değildir (p>0,05) (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. 10.gün yüksek doz metal uygulaması sonucu metaller arasındaki korelasyon

		Al	Cr	Co	As	Cd
Al	Pearson Korelasyon	1	-0,770	-0,364	0,017	-0,479
	Anlamlılık		0,073	0,478	0,974	0,336
Cr	Pearson Korelasyon	-0,770	1	0,658	-0,066	0,681
	Anlamlılık	0,073		0,156	0,901	0,137
Co	Pearson Korelasyon	-0,364	0,658	1	0,284	0,257
	Anlamlılık	0,478	0,156		0,586	0,623
As	Pearson Korelasyon	0,017	-0,066	0,284	1	0,379
	Anlamlılık	0,974	0,901	0,586		0,459
Cd	Pearson Korelasyon	-0,479	0,681	0,257	0,379	1
	Anlamlılık	0,336	0,137	0,623	0,459	

20 günlük düşük doz metal karışımı muamelesi sonucunda Al ile Co, As ve Cd arasında; Cr ile As arasında; Co ile As ve Cd arasında; Cd ve As arasında istatistiki olarak anlamlı pozitif korelasyonlar tespit edilmiştir (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. 20.gün düşük doz metal uygulaması sonucu metaller arasındaki korelasyon. Tablodaki anlamlılık dereceleri $p \leq 0,05$ *; $p \leq 0,01$ ** şeklinde verilmiştir.

		Al	Cr	Co	As	Cd
Al	Pearson Korelasyon	1	0,655	0,937**	0,934**	0,905*
	Anlamlılık		0,158	0,006	0,006	0,013
Cr	Pearson Korelasyon	0,655	1	0,539	0,861*	0,704
	Anlamlılık	0,158		0,269	0,028	0,118
Co	Pearson Korelasyon	0,937**	0,539	1	0,860*	0,949**
	Anlamlılık	0,006	0,269		0,028	0,004
As	Pearson Korelasyon	0,934**	0,861*	0,860*	1	0,924**
	Anlamlılık	0,006	0,028	0,028		0,008
Cd	Pearson Korelasyon	0,905*	0,704	0,949**	0,924**	1
	Anlamlılık	0,013	0,118	0,004	0,008	

20 günlük yüksek doz metal karışımı uygulaması sonucunda Al ile Cr, Co ve Cd arasında ve Co ile As arasında negatif korelasyon olmasına rağmen istatistiki olarak anlamlı değildir ($p>0,05$) (Tablo 4.7).

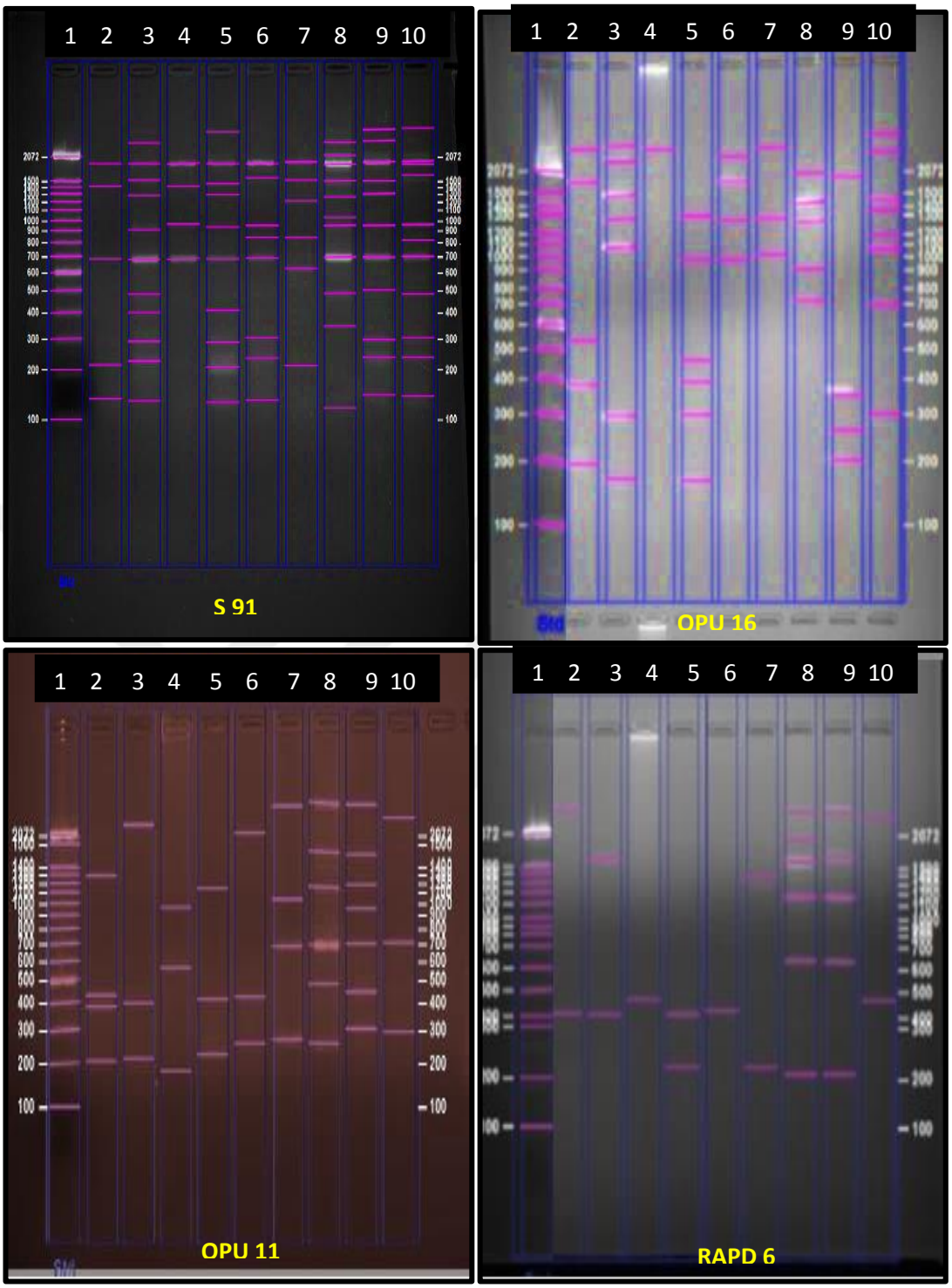
Tablo 4.7. 20.gün yüksek doz metal uygulaması sonucu metaller arasındaki korelasyon

		Al	Cr	Co	As	Cd
Al	Pearson Korelasyon	1	-0,479	-0,539	0,083	-0,186
	Anlamlılık		0,336	0,269	0,876	0,724
Cr	Pearson Korelasyon	-0,479	1	0,081	0,534	0,517
	Anlamlılık	0,336		0,878	0,275	0,294
Co	Pearson Korelasyon	-0,539	0,081	1	-0,427	0,373
	Anlamlılık	0,269	0,878		0,399	0,466
As	Pearson Korelasyon	0,083	0,534	-0,427	1	0,451
	Anlamlılık	0,876	0,275	0,399		0,369
Cd	Pearson Korelasyon	-0,186	0,517	0,373	0,451	1
	Anlamlılık	0,724	0,294	0,466	0,369	

4.2. Toplam DNA Hasarı

Genotoksik etkinin bir diğer göstergesi de DNA polimorfizmidir. DNA polimorfizmi belirlemek için yapılan çalışmada Şekil 4.6' daki RAPD profilleri elde edilmiştir. Kaybolan ve oluşan bantların moleküler büyüklükleri Tablo 4.8' de, oluşan ve kaybolan bantların sayıları ise Tablo 4.9' da gösterilmiştir.

En fazla bant oluşumu düşük doz metal karışımın 20 gün süreyle balıklara verilmesi sonucunda bulunmuştur. En fazla kaybolan bant sayısı ise yüksek dozun 20 günlük uygulamasında meydana gelmiştir. Tablo 4. 10 ve Şekil 4.7' de görüldüğü gibi oluşan ve yok olan bant sayıları göz önüne alınarak hesaplanan % GTS verileri sonucunda zamana ve doza bağlı olarak % GTS miktarının azaldığı belirlenmiştir. % GTS' lerde meydana gelen değişimler hesaplanınca düşük doz karışım uygulamasında 20.günde ($p=0,012$); yüksek doz karışım uygulamasında ise tüm günlerde ($p=0,019$; $p=0,035$; $p=0,027$) kontrole göre anlamlı azalmalar bulunmuştur. En fazla % GTS azalması yüksek doz karışımının 5 günlük uygulaması sonucu meydana gelmiştir.



Şekil 4.6. Metal muameleleri sonucu farklı primerlere ait RAPD profilleri. Resimlerdeki numaralar: 1-Standart; 2- 5.gün kontrol; 3- 5.gün düşük doz; 4- 5.gün yüksek doz; 5- 10.gün kontrol; 6- 10.gün düşük doz; 7- 10.gün yüksek doz; 8- 20.gün kontrol; 9- 20.gün düşük doz; 10- 20.gün yüksek dozu ifade etmektedir.

Tablo 4.8. RAPD profillerinde oluşan ve yok olan bantların moleküler büyüklükleri (baz çifti). A: Oluşan bantlar; D: Kaybolan bantlar.

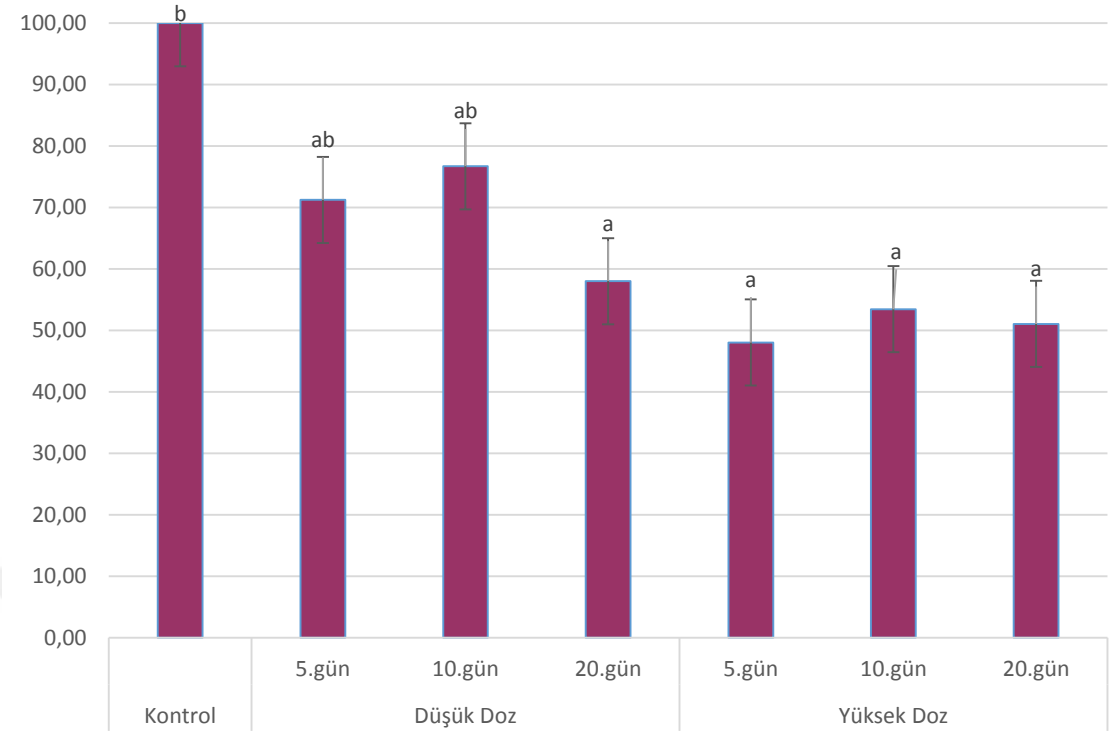
Primer	Kontrol 5.Gün	5.Gün Düşük Doz	5.Gün Yüksek Doz	Kontrol 10.Gün	10.Gün Düşük Doz	10.Gün Yüksek Doz	Kontrol 20.Gün	20.Gün Düşük Doz	20.Gün Yüksek Doz
S 91	2072, 1500, 1000, 500, 400, 200,100	A: 1300,700, 300	A:-	2072,1500, 300,200	A:1400	A: 900,600	2072,1500, 1400,1300, 800,400, 300	A:1200,500	A: 500
		D: 1500,1000	D: 2072,1500, 1000,500		D: -	D: -		D:1500,1400, 1300,800	D: 1500,1400, 1300,800, 400
OPU 16	1500, 100	A: 700	A: -	1000, 700	A: -	A:500	2072,1000, 900,800, 700, 500	A: -	A: 300
		D: 1000	D: 1000		D: 700	D:700		D: 800	D: 2072,900, 800, 700,500
OPU 11	2072, 1500, 900,800, 500,400	A:-	A: 1400,1200, 600,300	2072,1500, 1400,1000, 800,600, 500, 400,300	A:900,700, 200, 100	A:900,700	2072,1500, 1400,1200, 1000,500, 400,200, 100	A:1100,900, 800,300	A:1100,900, 800,300
		D: 800,400	D: 1500,800, 500,400		D: -	D: 1500,1400, 1000		D:1500,1400, 1200,1000, 500, 400, 200,100	D:1400,1200, 1000,500, 400, 200,100
RAPD 6	2072, 1000, 900, 500	A: -	A: 1500, 400,300	1000,800, 400	A: 1500	A:1500,1300, 700	2072,1500, 1000,800, 500,300	A: 1400, 900, 700, 400	A: 900
		D: 800	D: 2072,1000, 800,500		D: 800	D: 800,400		D: 500,300	D: 1500,1000, 500,300

Tablo 4.9. Ağır metal uygulaması sonucu oluşan ve yok olan bantların sayısı. a: oluşan bant sayısı; b: yok olan bant sayısı..

	5.Gün					10.Gün					20.Gün				
		Düşük Doz		Yüksek Doz			Düşük Doz		Yüksek Doz			Düşük Doz		Yüksek Doz	
Primerler	**Kontrol**	a	b	a	b	**Kontrol**	a	b	a	b	**Kontrol**	a	b	a	b
S 91	7	3	2	0	4	4	1	0	2	0	7	2	4	1	5
OPU 16	2	1	1	0	1	2	0	1	1	1	6	0	1	1	5
OPU 11	6	0	2	4	4	9	4	0	2	3	9	4	8	4	7
RAPD 6	4	0	1	3	4	3	1	1	3	2	6	4	2	1	4
Toplam bant	19	4	6	7	13	16	6	2	8	6	28	10	15	7	21

Tablo 4.10. Balık solungaç dokusunda ağır metal uygulamasına bağlı % GTS' de meydana gelen değişimler. Ort: Ortalama; SS: Standart sapma.

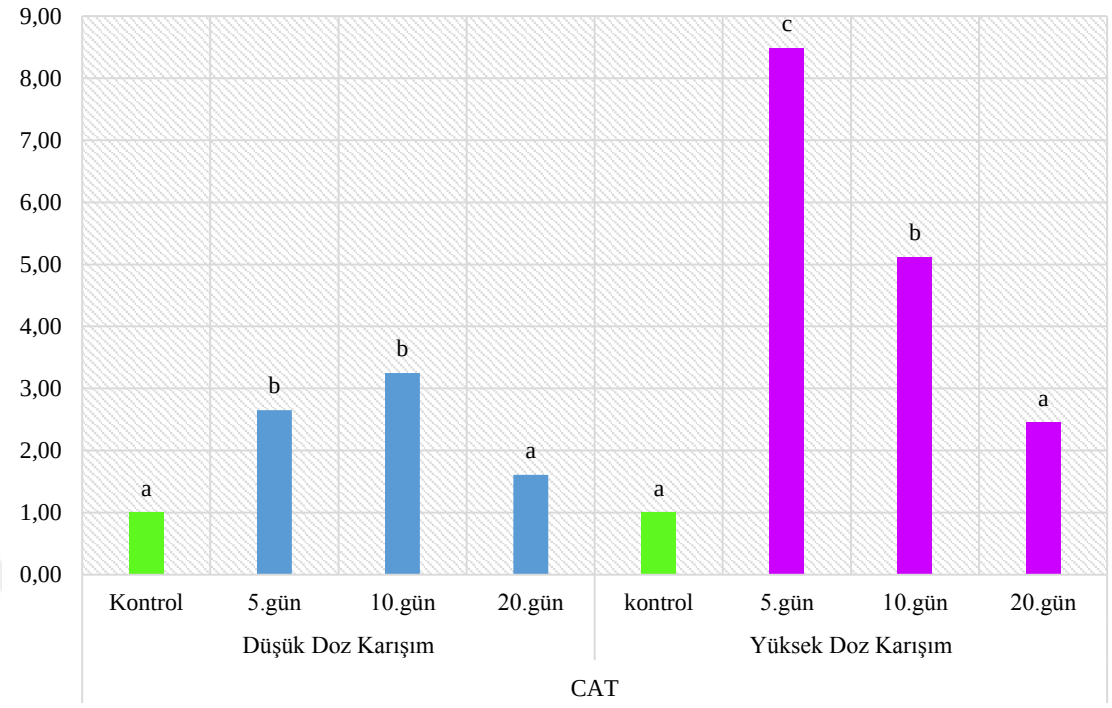
5.Gün			
Primer	**Kontrol**	**Düşük Doz**	**Yüksek Doz**
S 91	100	64,28	71,42
OPU 16	100	50	75
OPU 11	100	83,33	33,33
RAPD 6	100	87,5	12,5
Ort±SS	100	71,27±17,41	48,06±30,29 *
10.Gün			
Primer	**Kontrol**	**Düşük Doz**	**Yüksek Doz**
S 91	100	87,5	75
OPU 16	100	75	50
OPU 11	100	77,77	72,22
RAPD 6	100	66,66	16,66
Ort±SS	100	76,73±8,59	53,47±26,96 *
20.Gün			
Primer	**Kontrol**	**Düşük Doz**	**Yüksek Doz**
S 91	100	57,14	57,14
OPU 16	100	91,66	50
OPU 11	100	33,33	38,88
RAPD 6	100	50	58,33
Ort±SS	100	58,03±24,53 *	51,08±8,93 *



Şekil 4.7. Solungaç dokusu % GTS değerlerinde meydana gelen değişim. Veriler üzerinde görülen farklı harfler Tukey testi sonucu elde edilen istatistiki olarak birbirinden farklı grupları göstermektedir.

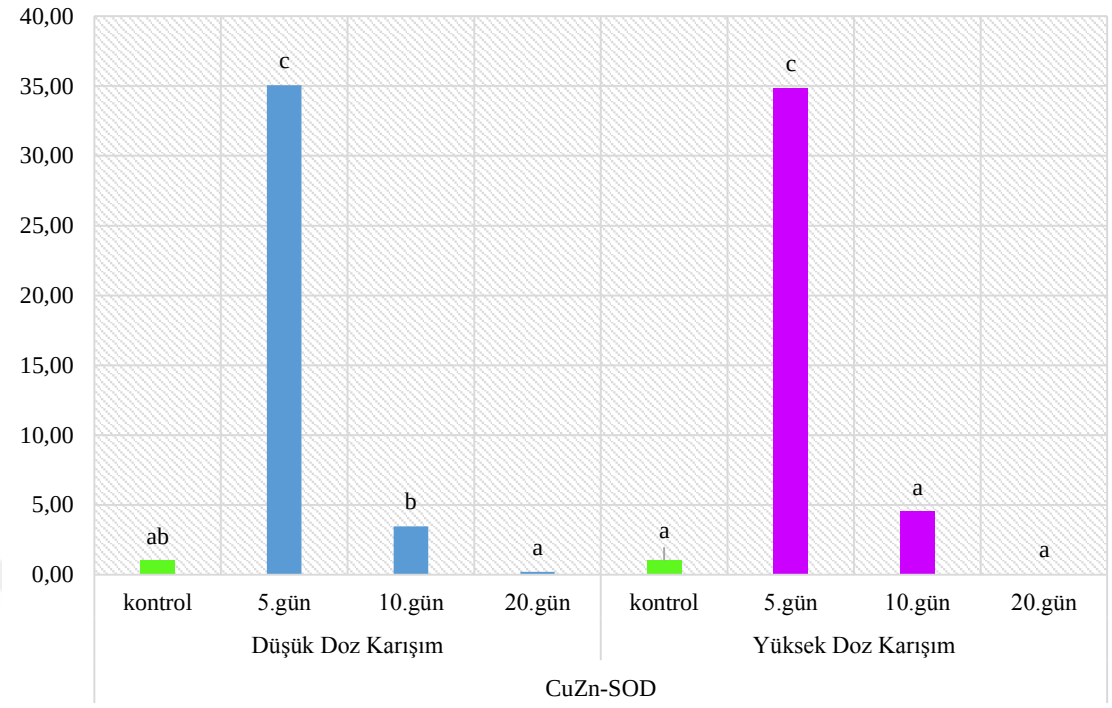
4.3. Gen Ekspresyon Düzeyleri

Birçok organizmada çeşitli metal uygulamaları oksidatif stres kaynaklı ROS üretimine neden olabilir. Yetersiz antioksidan sistemden dolayı artan ROS düzeyleri gen baskılanması veya aşırı ifadesi gibi genotoksik etkilere yol açmaktadır. Antioksidan genler, doku ve hücrelerde oksidatif stresin izlenmesi için hızlı ve duyarlı biyogöstergelerdir. Katalaz gen ekspresyonu değerlendirildiğinde 5.gün sonunda hem düşük ($p=0,0001$) hem de yüksek dozda ($p=0,0001$) kontrole göre anlamlı artış gözlenmiştir. Düşük ve yüksek dozların 5 günlük muamelesi sonucu gen ifadelerinde birbirinden farklılık tespit edilmiştir ($p=0,0001$). 10 günlük muamele sonucunda düşük ve yüksek doz hem kontrolden ($p=0,0001$; $p=0,0001$) hem de birbirlerinden farklı olarak gen ifadesinde artış olduğu bulunmuştur ($p=0,028$). 20.gün sonunda 5 ve 10 günlük değerlendirmelerde olduğu gibi katalaz ifadesi hem düşük hem de yüksek dozda artış göstermesine rağmen istatistiki olarak anlamlı değildir ($p=0,096$; $p=0,097$) (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Katalaz gen ifadesindeki değişimler. Veri etiketlerindeki harflerin farklı olmaması grupların birbirinden istatistiki olarak farklı olmadığını göstermektedir ($p>0,05$).

Katalaz gen ifadesinin, düşük doz muamelesi sonucu zamana bağlı değişimi ele alındığında 5 ile 20 ve 10 ile 20 günlük uygulamalar arasında anlamlı bir azalma gösterdiği belirlenmiştir ($p=0,007$; $p=0,0001$). Yüksek doz uygulaması sonucunda tüm günler kıyaslandığında katalaz gen ifadesinin 5.günden 10. ve 20.güne doğru azalma gösterdiği görülmüştür ($p=0,001$; $p=0,0001$; $p=0,005$).



Şekil 4.9. CuZn-SOD gen ifadesindeki değişimler. Veri etiketlerindeki harflerin farklı olmaması grupların birbirinden istatistiki olarak farklı olmadığını göstermektedir ($p>0,05$).

CuZn-SOD gen ifadeleri incelendiğinde, düşük doz karışım uygulaması sonucunda 5 günlük gen ifadesinde ($p=0,0001$); yüksek doz karışım uygulaması sonucunda ise hem 5 hem de 10 günlük gen ifadelerinde kontrole göre anlamlı azalmalar meydana gelmiştir ($p=0,0001$; $p=0,0001$) (Şekil 4.9). 10 ve 20 günlük düşük doz uygulamaları sonucunda 5.günlük muameleye kıyasla istatistiki olarak anlamlı gen ifadesi azalmaları belirlenmiştir ($p=0,0001$). Ayrıca düşük doz karışım uygulaması sonucunda 20.gün sonundaki gen ifadesi de 10.günlük uygulamadan daha düşük olarak tespit edilmiştir ($p=0,018$). Yüksek doz muamelelerinde ise tüm günler arasında yüksek derecede farklılık ile gen ifadesinde azalma olduğu bulunmuştur ($p=0,0001$).

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Al toksisitesi, balık solungaçlarındaki osmoregülasyonun bozulması sonucu dokularda birikim göstermesi ile kendini göstermektedir [204]. Zebra balığı ile yapılan gelişimsel biyoloji çalışmasında embriyolar 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 ve 0.1 ppm Al ile 1-2 saat muamele edilmiştir. Çalışma sonucunda embriyolarda ölüm gözlenmezken bölünmelerde kontrole göre bir yavaşlama belirlenmiştir [205]. *Salmo trutta* ile yapılan bir başka çalışmada İsveç'te yüksek asidite gösteren bölgelerden alınan su örneklerindeki Al' un, normal pH'a ya sahip bölgelerden alınan su örneklerinden daha fazla birikime neden olduğu belirlenmiştir [206]. *Anodonta anatina* ve *Urio pictorum* ile yapılan çalışmada organizmalar 3 hafta boyunca 300 ve 900 µg/L Al' a maruz bırakılmıştır. Canlılara ait doku örnekleri incelendiğinde biriken metal düzeyinde ciddi bir artış belirlenmiştir [207]. Al, Cu, Pb ve Hg' nın ayrı ayrı ve karşım halinde bulunmaları sonucu meydana gelen birikimin değerlendirildiği çalışmada metallerin karışım halinde bulunduğunda organizmanın solungaç dokusunda daha fazla birikime neden olduğu belirlenmiştir [208]. Bu çalışmada 10. günde hem düşük doz hem de yüksek doz uygulamasında balık solungaç dokusunda anlamlı bir birikim artışı belirlenmiştir. Diğer gün ve dozlarda da belirgin bir artış olsa da kontrole göre farklılık göstermemektedir.

Akuatik organizmalarda As' e bağlı olarak balık hücre hatlarında sitotoksitenin artması, oksidatif stres oluşumu, azalan antioksidan enzim aktivitesi ve artan antioksidan gen ifadesi düzeyleri gibi birçok toksik etki gözlenmektedir [209]. As' in üç farklı

konsantrasyonu ile 48 saat boyunca muamele edilen Zebra balıklarının solungaç dokularında artan As birikimi gözlenmiştir [210]. Bir başka çalışmada 1 ve 10 mg/L sodyum arsenatın 90 gün boyunca uygulanması neticesinde balık dokularında zamana ve doza bağlı olarak metal birikimi belirlenmiştir. Nehir sularında bulunan As miktarı ile Zebra balığında yapılan bir çalışmada, diğer çalışmalarda olduğu gibi zamana ve doza bağlı olarak artan birikim ölçülmüştür [211]. Yeşil güneş balığı (*Lepomis cyanellus*) ile yapılan başka bir çalışmada As' in birikimi değerlendirilmiş ve 1 ppm AS uygulaması sonucunda balık dokusunda metal birikimde anlamlı bir artış gözlenmiştir [212]. As ve Cd' un balık solungaç dokusunda ayrı ayrı ve beraber kullanımının değerlendirildiği bir çalışmada, metallerin birlikte kullanımının solungaç dokusunda As birikimini düşürdüğü belirlenmiştir [213]. Bu çalışmada sadece 10 günlük yüksek doz As uygulamasında kontrole göre anlamlı bir artış gözlenmiş, 20.günde yüksek dozlarda metallerin beraber bulunması As birikimini düşürmüştür.

Cd, endüstriyel kullanımın artması sonucu son yıllarda çevresel kirleticiler arasında yüksek toksisitesi ile dikkat çekmektedir. Yapılan birçok çalışma doğrudan veya dolaylı olarak Cd maruziyeti sonucu sucul canlılarda birikime bağlı toksik etkiler gözlenmektedir. Cd birikimi bazı protoonkogenlerin oluşumunu tetiklemekte, DNA onarım sistemini inhibe etmekte ve oksidatif strese cevap veren bazı enzimleri baskılamaktadır. Ayrıca mitokondriyel solunum zincirini inhibe etmekte ve DNA hasarı ile apoptozise yol açmaktadır. Cd özellikle metabolik olarak aktif olan solungaç, karaciğer, böbrek ve sindirim sistemi organları gibi yapılarda birikim gösterme eğiliminde olan bir elementtir. Birikim bölgeleri balık türleri ve uygulama periyotlarına bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. Ayrıca su ile taşınan Cd, zebra balıklarında diyet yoluyla uygulanan Cd' dan daha fazla birikim göstermektedir [214-216]. Zebra balığının 1 mg/L Cd ile 2, 7 ve 16 günlük muamelesi sonucu uygulama yapılan günlerde kontrole göre anlamlı derecede Cd birikimi gözlenmiştir. 16.gün sonunda balık beyninde ölçülen Cd birikimi kontrolün yaklaşık 100 katıdır [217]. Zebra balığının 2 µg/L ve 10 µg/L Cd ile 21 günlük muamelesi sonucu beyin, solungaç, karaciğer ve kas dokularında yapılan incelemelerde kontrole göre artmış Cd birikimi belirlenmiştir. Yüksek doz Cd uygulaması sonucunda solungaçta kontrole göre yaklaşık 12 kat fazla birikim tespit edilmiştir [218]. Zebra balığı embriyoları ile yapılan bir başka çalışmada 5, 10, 25, 50, 75 ve 100 mg/L Cd' un 48 saatlik uygulaması sonucunda doza bağlı olarak Cd birikiminde artış olduğu

tespit edilmiştir [219]. Cd' un 0,003 ve 0,025 µM dozlarda uygulanmasıyla Zebra balığı solungaç dokularında doza bağlı birikimde artış olduğu gözlenmiştir [220]. Cd, Ni ve Zn' un tekli ve beraber bulunmaları durumunda *Cyprinus carpio*'da meydana gelen birikimleri değerlendirilmiş ve metallerin kombine kullanımı sonucu balıkta birikim miktarında artış olduğu bildirilmiştir [221]. Bu çalışmada diğer metallerin yüksek konsantrasyonları ile beraber verildiğinde 5. ve 10.günde; diğer metallerin düşük konsantrasyonları ile beraber verildiğinde 20.günde solungaç dokusunda anlamlı birikim gözlenmiştir.

Erkek Zebra balıklarında Co' ın genotoksik etkisinin araştırıldığı çalışmada zamana ve doza ağlı olarak balık dokusunda Co birikiminde artış olduğu gözlenmiştir [222]. Altın balığı *Carassius auratus* ile yapılan bir araştırmada, balık 96 saat süreyle 50, 100 ve 150 mg/L Co ile muamele edilmiş ve beyin, karaciğer, böbrekteki metal birikimi ölçülmüştür. Metal birikiminin değerlendirildiği tüm organlarda doza bağlı olarak artan Co birikimi tespit edilmiştir [41]. Zebra balığı embriyolarının kullanıldığı başka bir çalışmada, döllenme sonrası 1 ve 144 saatlik embriyolar 1 ile 100 mg/L arasında değişen konsantrasyonlardaki Co ile muamele edilmiş ve çalışma sonunda hem zamana hem de doza bağlı olarak metal birikiminde değişim gözlenmiştir [108]. Co ve Fe' in beraber ve ayrı ayrı kullanımları altın balığında (*Carassius auratus*) çalışılmış ve birlikte kullanımları sonucu balık dokularında daha fazla birikime neden olduğu belirlenmiştir [223]. Bu çalışmada Co birikimi değerlendirildiğinde zamana ve doza bağlı olarak kontrolden farklı bir birikim artışı bulunmamıştır.

Endüstriyel kullanım sonucu oluşan Cr atıkları sucul ekosistemleri kirletebilmektedir. Cr' un toksik ve karsinojenik olduğu bilinmektedir. Bunların yanında balıkların metabolik olarak aktif organlarında da birikim gösterdiği düşünülmektedir [224]. Zebra balığının embriyo ve yetişkinleri ile yapılan bir çalışma sonucunda embriyoda yetişkinlere oranla daha fazla Cr birikimi gözlenmiştir [225]. *Channa punctatus* kullanılan başka bir çalışmada ise Cr' un subletal dozları denenmiş ve 30 günlük muamele sonucunda karaciğer, kas, böbrek, beyin ve solungaçlarında krom birikimindeki değişimler belirlenmiştir [226]. *Brachydanio rerio*'nun kullanıldığı bir çalışmada Cr'un birikimi değerlendirilmiş ve doza bağlı olarak oluşan birikim ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır [227]. Cr, Ni ve Cu' ın kombine kullanımı sonucu balık solungaç dokusunda beyin ve kas dokusuna oranla daha fazla birikime neden

olduğu belirlenmiştir [228]. Bu çalışmada 5. ve 10.günde yüksek doz karışım uygulaması ile 20.günde düşük konsantrasyon karışım uygulaması sonucunda solungaç dokusunda kontrole göre anlamlı birikim belirlenmiştir.

Bu çalışmada yüksek doz metal karışımı uygulaması sonucu 5. ve 10. günde birikim artmakta iken 20. güne gelindiğinde organizmada birikim miktarı azalmaktadır. Oysa düşük doz metal karışımları muamele edildiğinde organizmada toksik maddelere karşı cevabın oluşması daha uzun zaman almakta, muamele süreci arttıkça birikim miktarı artış göstermektedir. Metaller; maden çıkarma, fosil yakıt kullanımı, kanalizasyon, tarımsal uygulamalar, endüstriyel kullanım ve evsel atıklar ile doğaya karışabildikleri için çevresel toksik etkilere sahiptir. Sucul ekosistemlerdeki balıklar için iyon regülasyonu, metallerin akut toksik hedefleri halindedir [229]. Kirlenmiş çevresel ortamlarda birçok metal yüksek konsantrasyonlarda birlikte bulunmaktadır. Bu metallerin bir arada bulunmaları bazen tek tek bulunmalarından farklı etkiler doğurabilmektedir. Bu yüzden bu elementlerin birlikte bulunmaları; sucul organizmalar tarafından alımları, birikimleri ve toksisitesi için önemli bir etken oluşturmaktadır [230]. Karışım halindeki metallerin alımı, rekabetçi veya rekabetçi olmayan inhibisyon gösterebilir ya da alımı hızlandırabilir. Bu etkileşimler çevresel ortamdaki metallerin konsantrasyonuna, kullanılabilirliğine, maruziyet şekli ve süresine, çalışılan deney hayvanı ve incelenen organa bağlı olarak farklılık göstermektedir. Düşük konsantrasyonlardaki metal-metal etkileşimleri, çeşitli ortamlarda özellikle balıkların içinde yer aldığı sucul ekosistemlerde birçok çalışma ile gösterilmiştir [231]. Metallerin yaygın kullanımın etkileri Biyotik Ligand Modeli ile açıklanabilse de bu yöntem metallerin tek tek ortamda bulunmalarına bağlıdır. O yüzden metallerin ortamda karışımlar halinde bulunmaları sonucu meydana gelen toksik etkiler daha fazla çalışılma gerekliliği doğurmaktadır [232]. Çoklu metal ilişkilerinin Zebra balığında incelenmesi sonucunda Cd ve Pb' un alımı ortamda bulunan Cu, Ni ve Zn tarafından etkilendiği gösterilmiştir. Ayrıca özellikle Cd alımı Cu, Pb ve Zn tarafından inhibe edilirken, Ni varlığında hızlanmaktadır [233]. Çeşitli metallerin akut toksisitesi incelendiğinde ise Cu varlığının Ni ve Cd' un LC_{50} değerini arttırdığını göstermektedir [234]. *Dreissena polymorpha*'da Cu, Cd ve Zn' un karışım halinde ve tek tek toksisiteleri değerlendirildiğinde, metallerin karışım halinde daha toksik oldukları rapor edilmiştir [235]. *Tilapia nilotica*'nın karaciğer, solungaç ve kas dokusunda Cd ve Zn' un birlikte kullanımlarının tekli kullanıma oranla daha fazla birikime neden olduğu

ortaya çıkmıştır [236]. Bu çalışmada, düşük konsantrasyonlu karışımlarda süre uzadıkça metallerin birikimi arttığı gözlenmiştir. Bununla beraber yüksek konsantrasyonlu karışımlarda 5. ve 10.günlerde artış olmuş fakat 20.günde düşüş gözlenmiş olup, uzun sürede yüksek konsantrasyonlu metal karışımları muamelelerinde metal-metal etkileşimleri veya metabolik cevabın etkili olabileceği tespit edilmiştir. Çeşitli enzim sistemlerinin ortamdaki metal konsantrasyonlarını düzenleme ve zamana bağlı olarak metallerin birikiminin tolere edilebilmesi gibi çeşitli mekanizmalar da canlının çevresel şartlara adaptasyonu için geliştirdiği tepkiler olabileceğini düşündürmektedir.

Rastgele dizilimdeki kısa oligonükleotid primerlerinin kullanılarak genomik DNA üzerinde belirlenen parçaların polimeraz zincir reaksiyonuna göre çoğaltılmasına dayanan RAPD-PCR ile bu teknikle elde edilen amplifikasyon ürünü standart bir jel elektroforezinde yürütülmekte ve çoğaltma ürünleri bantlar halinde gözlenmektedir. Bu bantların çeşitli uygulamalar sonucunda yok olması veya oluşması değerlendirilmektedir. Bu yöntem sayesinde primerlerin bağlandığı alanları etkileyen inversiyonlar, nokta mutasyonlar, delesyonlar, insersiyonlar veya kromozomal yeniden düzenlenmeler olduğunda RAPD sonucu görüntülenen bantlarda yok olma veya oluşma gözlenebilmektedir. RAPD çalışması sonucunda uygulanan metal karışımlarına ve uygulama süresine bağlı olarak değişen elektroforetik bantlar ve % GTS, canlıda oluşan reaktif oksijen türlerinden kaynaklanabilmektedir. RAPD bant polimorfizmi, genom yeniden düzenlenmesinden kaynaklanan oligonükleotidlerin bağlanma bölgelerindeki değişiklikler sonucunda da oluşabilmektedir [237, 238]. Yeni oluşan bantlar ortamdaki stres faktörleri sonucu oluşan DNA hasarı kaynaklı olabilmektedir. Ayrıca yeni bant oluşumu genomik kalıp kararsızlığından da kaynaklanabilmektedir [239]. Genetik stabilite, hücredeki DNA tamir ve replikasyon mekanizmasının etkinliğine bağlı oluşan DNA hasarı ile ilişkilidir [240]. Yapılan birçok çalışmada çeşitli ajanlara maruziyet sonucu canlıların çeşitli dokularına ait RAPD profillerinde değişiklikler gözlenmiştir. Altın balığı (*Carassius auratus*) ile yapılan, nehir suyunun ekotoksikolojik etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada Brezilya'daki bir nehre ait su örneklerinde metal düzeyleri ve bu metallerin organizmada neden olduğu toplam DNA hasarı RAPD yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışma sonucunda nehir suyunda bulunan metallere bağlı olarak kontrol grubunda görülen DNA bantlarının sayısı muamele gruplarında azalma göstermiştir. *Carassius auratus* ile yapılan başka bir çalışmada Ni, Cd, Zn ve Cu maruziyeti sonrasında

organizmanın beyin dokusundaki DNA hasarı araştırılmış ve RAPD profillerinde kontrole göre gözlenen bant sayısında değişimler bulunmuştur [218, 182, 241]. Bu çalışmada da diğer çalışmalarda olduğu gibi hem doza hem de zamana bağlı olarak gözlenen bant ve % GTS değişimleri, metal uygulaması sonucu hücrenin kimyasal kompozisyonunun ve redoks potansiyelinin bozulması ile ortamdaki reaktif oksijen türlerinin uzaklaştırılamadığı ve gen onarım mekanizmasının yetersizliğine bağlı DNA hasarı oluştuğunu göstermektedir.

Oksidatif stres, antioksidan sistem ve hücresel lipid katmanında peroksidasyona sebep olan serbest radikal oluşumudur. Antioksidan savunma sistemi ise oksidatif strese neden olan ve bunun sonucunda hücresel hasar oluşumunu sağlayan ROS üretimini durdurmak veya oluşanları ortadan kaldıran elemanlardan oluşmaktadır [242]. Canlı organizma endojen ve eksojen kaynaklı herhangi bir oksidatif stres faktörüne maruziyet gösterirse, antioksidan savunma sisteminde yer alan enzimlerin sentezlenmesini arttırarak cevap oluşturmaktadır [243]. Yapılan pek çok çalışma göstermiştir ki bu çalışmada da kullanılan metaller dahil birçok metal sucul organizmaların çeşitli doku ve organlarında oksidatif strese neden olarak antioksidan savunma sisteminde yer alan enzimlerin sentezlenmesini arttırmıştır [244, 245, 36]. Zebra balığında Zn ve Cd tekli ve karışım halinde çeşitli gen ifadeleri üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada solungaç, beyin, karaciğer ve kas dokularına ait SOD ifadesinde metallerin karışım halinde kullanılması sonucunda tekli kullanımlarından daha fazla gen ifadesini artttırdığı belirlenmiştir [246]. Bu sentezlenmedeki artış modern moleküler biyolojik yöntemlerden kantitatif real time PCR ile hassas ve hızlı bir şekilde değerlendirilebilmektedir. Co, oksidatif stres sürecinde Fenton reaksiyonlarında yer alarak reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olmaktadır [247]. Bu çalışmada qRT-PCR metodu ile Zebra balığı solungaç dokularında CuZn-SOD ve CAT gibi en önemli enzimatik antioksidan elemanların gen ifadelerinde meydan gelen değişim değerlendirildiğinde daha önceki çalışmalar ile paralel sonuçlar elde edilmiştir. Doza bağlı olarak vücuda alınan metallerin konsantrasyonlarındaki artış aynı zamanda organizmanın bu eksojen kaynaklı oksidatif stres faktörüne cevap olarak antioksidan enzimlerin sentezini arttırması ile karakterize edilebilir. Bu çalışmada katalaz ifadesinin düşük konsantrasyonlu karışımlarda 5. ve 10.günlerde giderek arttığı, yüksek konsantrasyonlu karışımlarda ise hücrenin hızla ve yüksek oranda cevap oluşturarak 10. ve 20.günlerde giderek azaldığı tespit edilmiştir. CuZn-SOD ifadesi düşük ve yüksek

konsantrasyonlu metal karışımları ile muamelenin 5.gününde en yüksek düzeyde iken 10. ve 20.günlerde giderek azaldığı gözlenmiştir.

SOD, ortamdaki süperoksit iyonlarının dismutasyonu neden olarak ortamdan bu serbest radikalleri süpürebilen en önemli antioksidan enzimlerden biridir. CAT ise ortamda SOD aktivitesi veya diğer kaynaklı oluşan hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalayarak zararsız hale getirebilmektedir [248]. Metal kaynaklı hem sitosolik hem de mitokondriyal SOD ile CAT ifade düzeylerinde meydana gelen artış daha önce birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir [249-251]. Artan gen ifadesi düzeylerinin sebebi olan ROS oluşumu, RAPD yöntemi ile belirlenen DNA hasarının da sebebini de açıklamaktadır. Antioksidan genlerin ifadelerinde meydana gelen artış ve genomik kalıp stabilitesindeki azalma DNA hasarının göstergesi niteliğindedir [252]. Ortamdaki ROS' lar nükleik asitler ile kolaylıkla etkileşime girebilme ve özellikle hidroksil radikali varlığında nükleik asitlere hidrojen katılması veya çıkarılması şeklinde reaksiyonlara neden olabilmektedir. Hidrojen peroksitin ortamdan uzaklaştırılamaması sonucu, H_2O_2 hücre zarından kolaylıkla geçebilir ve sonucunda nükleer DNA'da hasar meydana getirebilir [253]. DNA'ya bağlanan metal iyonları ile hidrojen peroksitin DNA üzerinde tepkimeye girmesi sonucu oluşan hidroksil radikalleri antioksidan elemanlar tarafından uzaklaştırılmadıkları takdirde bu antioksidan enzimlerin meydana getirdiği radikaller de DNA'da hasara neden olabilmektedir [254]. Serbest radikaller hücrede birçok yapıya saldırabilir en önemlisi DNA'ya direkt saldırısı sonucu genlerde tahribata neden olabilir. Genlerde nükleotid dizilerinde meydana gelecek delesyon ve translokasyon da yanlış aminoasit kodlamalarına neden olabilir. Serbest radikal etkisi sonucu DNA ve kromozomlarda RAPD profillerinde ortaya çıkabilen kırılmalar mevcuttur [255].

Bu çalışmada düşük konsantrasyonlu karışım uygulaması sonucunda solungaç dokusundaki ağır metal birikimi zamana bağlı olarak artmakta Al için 10.günde Cd ve Cr içinse 20.günde anlamlılık kazanmaktadır. Genomik stabilite sonuçları düşük doz karışım uygulaması gruplarında benzer etki göstererek 5., 10. ve 20.günlerde değişim göstermiş, bu değişim 20.günde anlamlı hale gelmiştir. Bu sonuç düşük doz karışımlarının uzun sürede (20 gün) stres yarattığı, DNA hasarı yaptığı veya hücre savunma mekanizmalarını aktive ettiği anlamına gelebilmektedir. Antioksidan aktivitenin ise her iki uygulamada da (düşük doz ve yüksek doz karışım) 5. ve 10.günlerde yüksek seviyelerde aktive olarak stresi azaltmaya yönelik aktivasyonu gözlenmektedir. Katalaz ve CuZn-SOD

aktivasyonunun 20.günde düştüğü belirlenmiştir. Ancak genomik stabiliteni düşük konsantrasyonlu karışımda 20.günde, yüksek konsantrasyonlu karışımda 5.günden itibaren anlamlı olarak değişmesi diğer bazı genlerin aktive/inhibe olduğunu veya DNA hasarı meydana gelmiş olabileceğinin göstergesidir.

Sonuç olarak balıklar yaşadıkları sucul ekosistemlerde patojenler dahil birçok etken bulunmasına rağmen kolaylıkla metabolik bozukluklar yaşamazlar. Fakat ortama dışarıdan verilen metaller, organizmanın gerek canlılığının devamı gerekse canlı kaldığı süre boyunca metabolik faaliyetlerinin sağlıklı bir şekilde sürdürülebilmesi için oksidatif stres oluşumu gibi tehlikeli bir sürece neden olarak etki göstermektedirler. Sucul organizmalar ile yapılan metal birikimi ve etkilerine yönelik araştırmalar, metallere karşı duyarlılığın belirlenmesi ve organizmanın fizyolojik, biyokimyasal ve genetik parametrelerin belirlenmesi açısından da önemlidir. Bu nedenle su kaynakların yakın yerlerdeki endüstriyel faaliyetlerin ve kuruluşların sıklıkla denetlenmelidir. Su ortamı ve sucul organizmalarda kirliliğe yönelik izleme programları ile ekotoksikolojik risk değerlendirme araştırmaları özellikle metal salınımının yoğun olduğu ortamlarda periyodik olarak izlenmelidir.

KAYNAKLAR

[1] K Sexton , D Hattis, ***Assessing cumulative health risks from exposure to environmental mixtures - three fundamental questions,*** Environmental health perspectives, 115, 5, 825-832, (2007).

[2] DO Carpenter, K Arcaro , DC Spink, ***Understanding the human health effects of chemical mixtures,*** Environmental health perspectives, 110 Suppl 1, 25-42, (2002).

[3] G Wang , BA Fowler, ***Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic,*** Toxicology and applied pharmacology, 233, 1, 92-99, (2008).

[4] F Henkler, J Brinkmann , A Luch, ***The role of oxidative stress in carcinogenesis induced by metals and xenobiotics,*** Cancers, 2, 2, 376-396, (2010).

[5] M Valko, H Morris , MT Cronin, ***Metals, toxicity and oxidative stress,*** Current medicinal chemistry, 12, 10, 1161-1208, (2005).

[6] SS Leonard, GK Harris , X Shi, ***Metal-induced oxidative stress and signal transduction,*** Free radical biology & medicine, 37, 12, 1921-1942, (2004).

[7] N Vural, ***Toksikoloji,*** Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 73, (1996).

[8] ST Özan, ***Beyşehir Gölünde Yaşayan Sazan (Cyprinus carpio, L., 1758)'ndaki Parazitlerin ve Ağır Metal Birikiminin Araştırılması,*** Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D. Doktora Tezi, (2005).

[9] Ö Göktaş, ***Kadmiyumun Neden Olduğu Oksidatif Stres Üzerine Resveratrolün Koruyucu Etkisi,*** İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji A.B.D. Yüksek Lisans Tezi, (2007).

[10] A Kahru , HC Dubourguier, ***From ecotoxicology to nanoecotoxicology,*** Toxicology, 269, 2-3, 105-119, (2010).

[11] M Kalay, E Koyuncu , AE Dönmez, ***Mersin Körfezi'nde yakalanan Sparus aurata ve Mullus barbatus 'un Kas ve Karaciğer Dokularındaki Kadmiyum Düzeylerinin Karşılaştırılması,*** Ekoloji Çevre Dergisi, 13, 51, 19-23, (2004).

[12] MN Muşlu, ***İstanbul Boğazı'ndaki Sarıkuyruk İstavrit Balığı (Trachurus mediterraneus) 'nın Kas ve Solungaçlarındaki Kurşun Düzeyleri,*** Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D. Yüksek Lisans Tezi, (2008).

[13] U Güner, ***Carassius carassius 'da Bakır-Kadmiyum Etkileşiminin Karaciğer Total Protein Miktarı Üzerine Etkisi,*** Journal of Fisheries Sciences.com, 2, 1, 54-65, (2008).

[14] ZL He, XE Yang , PJ Stoffella, ***Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment,*** Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements, 19, 2-3, 125-140, (2005).

[15] R Baca, L Naval, R Llistosella , JJ Naval, ***[Toxic effects of metals used in dentistry],*** Revista espanola de estomatologia, 35, 5, 355-360, (1987).

[16] MM Siddiqui, BH Abbasi, N Ahmad, M Ali , T Mahmood, ***Toxic effects of heavy metals (Cd, Cr and Pb) on seed germination and growth and DPPH-scavenging activity in Brassica rapa var. turnip,*** Toxicol Ind Health, 30, 3, 238-249, (2014).

[17] RA Mandour , YA Azab, ***The prospective toxic effects of some heavy metals overload in surface drinking water of Dakahlia Governorate, Egypt,*** The international journal of occupational and environmental medicine, 2, 4, 245-253, (2011).

[18] HH Fang, LC Xu , KY Chan, ***Effects of toxic metals and chemicals on biofilm and biocorrosion,*** Water research, 36, 19, 4709-4716, (2002).

[19] VJ Sharma , S Satyanarayan, ***Effect of selected heavy metals on the histopathology of different tissues of earthworm Eudrillus eugeniae,*** Environ Monit Assess, 180, 1-4, 257-267, (2011).

[20] AA Al-Janabi, ***Toxic effect of heavy metals on dermatophytes,*** Mycoses, 54, 4, 345-349, (2011).

[21] A Lukacinova, O Racz, E Lovasova , F Nistiar, ***Effect of lifetime low dose exposure to heavy metals on selected serum proteins of Wistar rats during three subsequent generations,*** Ecotoxicology and environmental safety, 74, 6, 1747-1755, (2011).

[22] R Bajpai , DK Upreti, ***Accumulation and toxic effect of arsenic and other heavy metals in a contaminated area of West Bengal, India, in the lichen Pyxine cocoes (Sw.) Nyl,*** Ecotoxicology and environmental safety, 83, 63-70, (2012).

[23] F Wang, J Yao, Y Si, H Chen, M Russel, K Chen, Y Qian, G Zaray , E Bramanti, ***Short-time effect of heavy metals upon microbial community activity,*** Journal of hazardous materials, 173, 1-3, 510-516, (2010).

[24] AE Marcon, M Ferreira Dde, F de Moura Mde, TF Campos, VS do Amaral, LF Agnez-Lima , SR Batistuzzo de Medeiros, ***Genotoxic analysis in aquatic environment under influence of cyanobacteria, metal and radioactivity,*** Chemosphere, 81, 6, 773-780, (2010).

[25] C Lafabrie, KM Major, CS Major , J Cebrian, ***Trace metal contamination of the aquatic plant Hydrilla verticillata and associated sediment in a coastal Alabama creek (Gulf of Mexico-USA),*** Marine pollution bulletin, 68, 1-2, 147-151, (2013).

[26] X Zhang, Y Tian, Q Wang, L Chen , X Wang, ***Heavy metal distribution and speciation during sludge reduction using aquatic worms,*** Bioresource technology, 126, 41-47, (2012).

[27] JC Lee, YO Son, P Pratheeshkumar , X Shi, ***Oxidative stress and metal carcinogenesis,*** Free radical biology & medicine, 53, 4, 742-757, (2012).

[28] A Galanis, A Karapetsas , R Sandaltzopoulos, ***Metal-induced carcinogenesis, oxidative stress and hypoxia signalling,*** Mutation research, 674, 1-2, 31-35, (2009).

[29] P Pereira, H de Pablo, S Guilherme, S Carvalho, MA Santos, C Vale , M Pacheco, ***Metal accumulation and oxidative stress responses in Ulva spp. in the presence of nocturnal pulses of metals from sediment: a field transplantation experiment under eutrophic conditions,*** Marine environmental research, 94, 56-64, (2014).

[30] MD Poteat , DB Buchwalter, ***Four reasons why traditional metal toxicity testing with aquatic insects is irrelevant,*** Environmental science & technology, 48, 2, 887-888, (2014).

[31] C Falugi, MG Aluigi, MC Chiantore, D Privitera, P Ramoino, MA Gatti, A Fabrizi, A Pinsino , V Matranga, ***Toxicity of metal oxide nanoparticles in immune cells of the sea urchin,*** Marine environmental research, 76, 114-121, (2012).

[32] PS Rainbow, ***Trace metal bioaccumulation: models, metabolic availability and toxicity,*** Environ Int, 33, 4, 576-582, (2007).

[33] G Souid, N Souayed, F Yaktiti , K Maaroufi, ***Effect of acute cadmium exposure on metal accumulation and oxidative stress biomarkers of Sparus aurata,*** Ecotoxicology and environmental safety, 89, 1-7, (2013).

[34] XG Liu, JJ Zhao , QY Wu, ***Oxidative stress and metal ions effects on the cores of phycobilisomes in Synechocystis sp. PCC 6803,*** FEBS letters, 579, 21, 4571-4576, (2005).

[35] S Pokhrel, AE Nel , L Madler, ***Custom-designed nanomaterial libraries for testing metal oxide toxicity,*** Accounts of chemical research, 46, 3, 632-641, (2013).

[36] K Jomova, D Vondrakova, M Lawson , M Valko, ***Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders,*** Molecular and cellular biochemistry, 345, 1-2, 91-104, (2010).

[37] R Ruciniska-Sobkowiak, ***[Oxidative stress in plants exposed to heavy metals],*** Postepy biochemii, 56, 2, 191-200, (2010).

[38] B Nazima, V Manoharan , S Miltonprabu, ***Oxidative stress induced by cadmium in the plasma, erythrocytes and lymphocytes of rats: Attenuation by grape seed proanthocyanidins,*** Human & experimental toxicology, (2015).

[39] A Jain, GJ Flora, R Bhargava , SJ Flora, ***Influence of age on arsenic-induced oxidative stress in rat,*** Biological trace element research, 149, 3, 382-390, (2012).

[40] S Jolly, A Jaffal, L Delahaut, O Palluel, JM Porcher, A Geffard, W Sanchez , S Betoulle, ***Effects of aluminium and bacterial lipopolysaccharide on oxidative stress and immune parameters in roach, Rutilus rutilus L,*** Environ Sci Pollut Res Int, 21, 22, 13103-13117, (2014).

[41] OI Kubrak, VV Husak, BM Rovenko, JM Storey, KB Storey , VI Lushchak, ***Cobalt-induced oxidative stress in brain, liver and kidney of goldfish Carassius auratus,*** Chemosphere, 85, 6, 983-989, (2011).

[42] N Soudani, A Ibtissem Ben, A Troudi, H Bouaziz, T Boudawara , N Zeghal, ***Oxidative stress induced by chromium (VI) in bone of suckling rats,*** Toxicol Ind Health, 27, 8, 724-734, (2011).

[43] M Dudhane, M Borde , PK Jite, ***Effect of aluminium toxicity on growth responses and antioxidant activities in Gmelina arborea Roxb. inoculated with AM fungi,*** International journal of phytoremediation, 14, 7, 643-655, (2012).

[44] C Exley , JD Birchall, ***The cellular toxicity of aluminium,*** Journal of theoretical biology, 159, 1, 83-98, (1992).

[45] R Naskar, NS Sen , MF Ahmad, ***Aluminium toxicity induced poikilocytosis in an air-breathing teleost, Clarias batrachus (Linn.),*** Indian J Exp Biol, 44, 1, 83-85, (2006).

[46] A Tanaka, ***Toxicity of indium arsenide, gallium arsenide, and aluminium gallium arsenide,*** Toxicology and applied pharmacology, 198, 3, 405-411, (2004).

[47] C Exley, AJ Wicks, RB Hubert , JD Birchall, ***Polynuclear aluminium and acute aluminium toxicity in the fish,*** Journal of theoretical biology, 167, 4, 415-416, (1994).

[48] Bharathi, P Vasudevaraju, M Govindaraju, AP Palanisamy, K Sambamurti , KS Rao, ***Molecular toxicity of aluminium in relation to neurodegeneration,*** The Indian journal of medical research, 128, 4, 545-556, (2008).

[49] VM Achary, S Jena, KK Panda , BB Panda, ***Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of Allium cepa L,*** Ecotoxicology and environmental safety, 70, 2, 300-310, (2008).

[50] L Tamas, J Huttova, I Mistrik, M Simonovicova , B Siroka, ***Aluminium-induced drought and oxidative stress in barley roots,*** Journal of plant physiology, 163, 7, 781-784, (2006).

[51] JS Meyer, WJ Adams, DK DeForest, RL Dwyer, RW Gensemer, JW Gorsuch, RK Johnston, RC Santore , E Van Genderen, ***Water chemistry matters in metal-toxicity papers,*** Environmental toxicology and chemistry / SETAC, 31, 4, 689-690; author reply 690-682, (2012).

[52] E Lydersen, B Salbu, ABS Poleo , IP Muniz, ***The influences of temperature on aqueous aluminium chemistry,*** Water, Air and Soil Pollution 51, 203-215, (1990).

[53] AL Hicks, KA Martin, DS Ditor, AE Latimer, C Craven, J Bugaresti , N McCartney, ***Long-term exercise training in persons with spinal cord injury: effects on strength, arm ergometry performance and psychological well-being,*** Spinal cord, 41, 1, 34-43, (2003).

[54] MY Monette , SD McCormick, ***Impacts of short-term acid and aluminum exposure on Atlantic salmon (Salmo salar) physiology: a direct comparison of parr and smolts,*** Aquatic toxicology, 86, 2, 216-226, (2008).

[55] S Sinha, S Mallick, RK Misra, S Singh, A Basant , AK Gupta, ***Uptake and translocation of metals in Spinacia oleracea L. grown on tannery sludge-amended and contaminated soils: effect on lipid peroxidation, morpho-anatomical changes and antioxidants,*** Chemosphere, 67, 1, 176-187, (2007).

[56] S Sinha, AK Gupta , K Bhatt, ***Uptake and translocation of metals in fenugreek grown on soil amended with tannery sludge: involvement of antioxidants,*** Ecotoxicology and environmental safety, 67, 2, 267-277, (2007).

[57] S Parvez , S Raisuddin, ***Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish Channa punctata (Bloch),*** Environmental toxicology and pharmacology, 20, 1, 112-117, (2005).

[58] BC Almroth, J Sturve, A Berglund , L Forlin, ***Oxidative damage in eelpout (Zoarces viviparus), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers,*** Aquatic toxicology, 73, 2, 171-180, (2005).

[59] M Galar-Martinez, LM Gomez-Olivan, A Amaya-Chavez, C Razo-Estrada , S Garcia-Medina, ***Oxidative stress induced on Cyprinus carpio by contaminants present in the water and sediment of Madin Reservoir,*** J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng, 45, 2, 155-160, (2010).

[60] S Garcia-Medina, AC Razo-Estrada, LM Gomez-Olivan, A Amaya-Chavez, E Madrigal-Bujaidar , M Galar-Martinez, ***Aluminum-induced oxidative stress in lymphocytes of common carp (Cyprinus carpio),*** Fish Physiol Biochem, 36, 4, 875-882, (2010).

[61] SJ Stohs , D Bagchi, ***Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions,*** Free radical biology & medicine, 18, 2, 321-336, (1995).

[62] A Campbell, D Hamai , SC Bondy, ***Differential toxicity of aluminum salts in human cell lines of neural origin: implications for neurodegeneration,*** Neurotoxicology, 22, 1, 63-71, (2001).

[63] ML Fernandez-Davila, AC Razo-Estrada, S Garcia-Medina, LM Gomez-Olivan, MJ Pinon-Lopez, RG Ibarra , M Galar-Martinez, ***Aluminum-induced oxidative stress and neurotoxicity in grass carp (Cyprinidae--Ctenopharingodon idella),*** Ecotoxicology and environmental safety, 76, 2, 87-92, (2012).

[64] S Garcia-Medina, C Razo-Estrada, M Galar-Martinez, E Cortez-Barberena, LM Gomez-Olivan, I Alvarez-Gonzalez , E Madrigal-Bujaidar, ***Genotoxic and cytotoxic effects induced by aluminum in the lymphocytes of the common carp (Cyprinus carpio),*** Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP, 153, 1, 113-118, (2011).

[65] BA Galindo, G Troilo, IMS Colus, CBR Martinez , SH Sofia, ***Genotoxic effects of aluminium on the Neotropical fish Prochilodus lineatus,*** Water Air Soil Poll, 212, 419-428, (2010).

[66] HE Witters, S Van Puymbroeck, AJHX Stouthart , SEW Bonga, ***Physicochemical changes of aluminium in mixing zones: Mortality and physiological disturbances in brown trout (Salmo trutta L.).*** Environmental Toxicology and Chemistry, 15, 986-996, (1996).

[67] A Bhattacharya , S Bhattacharya, ***Induction of oxidative stress by arsenic in Clarias batrachus: involvement of peroxisomes,*** Ecotoxicology and environmental safety, 66, 2, 178-187, (2007).

[68] M Mittal , SJ Flora, ***Vitamin E supplementation protects oxidative stress during arsenic and fluoride antagonism in male mice,*** Drug Chem Toxicol, 30, 3, 263-281, (2007).

[69] M Shri, S Kumar, D Chakrabarty, PK Trivedi, S Mallick, P Misra, D Shukla, S Mishra, S Srivastava, RD Tripathi , R Tuli, ***Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings,*** Ecotoxicology and environmental safety, 72, 4, 1102-1110, (2009).

[70] SS Haider , MS Najar, ***Arsenic induces oxidative stress, sphingolipidosis, depletes proteins and some antioxidants in various regions of rat brain,*** Kathmandu University medical journal, 6, 1, 60-69, (2008).

[71] MF Hughes, ***Arsenic methylation, oxidative stress and cancer--is there a link?,*** Journal of the National Cancer Institute, 101, 24, 1660-1661, (2009).

[72] A De Vizcaya-Ruiz, O Barbier, R Ruiz-Ramos , ME Cebrian, ***Biomarkers of oxidative stress and damage in human populations exposed to arsenic,*** Mutation research, 674, 1-2, 85-92, (2009).

[73] JP Wu, LW Chang, HT Yao, H Chang, HT Tsai, MH Tsai, TK Yeh , P Lin, ***Involvement of oxidative stress and activation of aryl hydrocarbon receptor in elevation of CYP1A1 expression and activity in lung cells and tissues by arsenic: an in vitro and in vivo study,*** Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology, 107, 2, 385-393, (2009).

[74] KT Kitchin , R Conolly, ***Arsenic-induced carcinogenesis--oxidative stress as a possible mode of action and future research needs for more biologically based risk assessment,*** Chemical research in toxicology, 23, 2, 327-335, (2010).

[75] DK Gupta, M Inouhe, M Rodriguez-Serrano, MC Romero-Puertas , LM Sandalio, ***Oxidative stress and arsenic toxicity: role of NADPH oxidases,*** Chemosphere, 90, 6, 1987-1996, (2013).

[76] M Dutta, D Ghosh, AK Ghosh, G Bose, A Chattopadhyay, S Rudra, M Dey, A Bandyopadhyay, SK Pattari, S Mallick , D Bandyopadhyay, ***High fat diet aggravates arsenic induced oxidative stress in rat heart and liver,*** Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association, 66, 262-277, (2014).

[77] D Sayed Ael, HA Elbaghdady , E Zahran, ***Arsenic-induced genotoxicity in Nile tilapia (Orechromis niloticus); the role of Spirulina platensis extract,*** Environ Monit Assess, 187, 12, 751, (2015).

[78] R Colognato, F Coppede, J Ponti, E Sabbioni , L Migliore, ***Genotoxicity induced by arsenic compounds in peripheral human lymphocytes analysed by cytokinesis-block micronucleus assay,*** Mutagenesis, 22, 4, 255-261, (2007).

[79] TK Hei , M Filipic, ***Role of oxidative damage in the genotoxicity of arsenic,*** Free radical biology & medicine, 37, 5, 574-581, (2004).

[80] H Yi, L Wu , L Jiang, ***Genotoxicity of arsenic evaluated by Allium-root micronucleus assay,*** The Science of the total environment, 383, 1-3, 232-236, (2007).

[81] M Kumar, M Lalit , R Thakur, ***Natural Antioxidants Against Arsenic-Induced Genotoxicity,*** Biological trace element research, 170, 1, 84-93, (2016).

[82] Y Lai, W Zhao, C Chen, M Wu , Z Zhang, ***Role of DNA polymerase beta in the genotoxicity of arsenic,*** Environmental and molecular mutagenesis, 52, 6, 460-468, (2011).

[83] F Faita, L Cori, F Bianchi , MG Andreassi, ***Arsenic-induced genotoxicity and genetic susceptibility to arsenic-related pathologies,*** Int J Environ Res Public Health, 10, 4, 1527-1546, (2013).

[84] G Avani , MV Rao, ***In vitro genotoxicity assays to evaluate the role of vitamin A on arsenic in human lymphocytes,*** Ecotoxicology and environmental safety, 72, 2, 635-638, (2009).

[85] P Ramos-Morales , R Rodriguez-Arnaiz, ***Genotoxicity of two arsenic compounds in germ cells and somatic cells of Drosophila melanogaster,*** Environmental and molecular mutagenesis, 25, 4, 288-299, (1995).

[86] S Ahmed, S Mahabbat-e Khoda, RS Rekha, RM Gardner, SS Ameer, S Moore, EC Ekstrom, M Vahter , R Raqib, ***Arsenic-associated oxidative stress, inflammation, and immune disruption in human placenta and cord blood,*** Environmental health perspectives, 119, 2, 258-264, (2011).

[87] TS Lin, CC Wu, JD Wu , CH Wei, ***Oxidative DNA damage estimated by urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and arsenic in glass production workers,*** Toxicol Ind Health, 28, 6, 513-521, (2012).

[88] JL Peters, TS Perlstein, MJ Perry, E McNeely , J Weuve, ***Cadmium exposure in association with history of stroke and heart failure,*** Environ Res, 110, 2, 199-206, (2010).

[89] GF Nordberg, ***Historical perspectives on cadmium toxicology,*** Toxicology and applied pharmacology, 238, 3, 192-200, (2009).

[90] L Friberg, ***Proteinuria in chronic cadmium poisoning after comparatively short exposure to cadmium dust; a report of two cases,*** A.M.A. archives of industrial health, 16, 1, 30-31, (1957).

[91] CDM del, NV Gonzalez, S Gomez, MA Quiroga, R Najle , CG Barbeito, ***Effect of a single dose of cadmium on pregnant Wistar rats and their offspring,*** Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene, 49, 6, 1049-1056, (2014).

[92] IAfRoC (IARC), ***Cadmium and cadmium compounds, In: IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans,*** Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry, 58, 119-237, (1993).

[93] NTPo America, ***NTP Report on Carcinogens Background Document for Cadmium,*** NIEHS Contract No. NO1-ES-25346, (1999).

[94] X Zhang, C Li , Z Nan, ***Effects of cadmium stress on growth and anti-oxidative systems in Achnatherum inebrians symbiotic with Neotyphodium gansuense,*** Journal of hazardous materials, 175, 1-3, 703-709, (2010).

[95] A Pretto, VL Loro, B Baldisserotto, MA Pavanato, BS Moraes, C Menezes, R Cattaneo, B Clasen, IA Finamor , V Dressler, ***Effects of water cadmium concentrations on bioaccumulation and various oxidative stress parameters in Rhamdia quelen,*** Archives of environmental contamination and toxicology, 60, 2, 309-318, (2011).

[96] G Swapna, AG Reddy , AR Reddy, ***Cadmium-induced Oxidative Stress and Evaluation of Embilica Officinalis and Stressroak in Broilers,*** Toxicology international, 17, 2, 49-51, (2010).

[97] A Cuypers, M Plusquin, T Remans, M Jozefczak, E Keunen, H Gielen, K Opdenakker, AR Nair, E Munters, TJ Artois, T Nawrot, J Vangronsveld , K Smeets, ***Cadmium stress: an oxidative challenge,*** Biometals, 23, 5, 927-940, (2010).

[98] D Martinez Dominguez, F Cordoba Garcia, A Canalejo Raya , R Torronteras Santiago, ***Cadmium-induced oxidative stress and the response of the antioxidative defense system in Spartina densiflora,*** Physiologia plantarum, 139, 3, 289-302, (2010).

[99] S Milton Prabu, K Shagirtha , J Renugadevi, ***Quercetin in combination with vitamins (C and E) improves oxidative stress and renal injury in cadmium intoxicated rats,*** European review for medical and pharmacological sciences, 14, 11, 903-914, (2010).

[100] K Muthukumar , V Nachiappan, ***Cadmium-induced oxidative stress in Saccharomyces cerevisiae,*** Indian journal of biochemistry & biophysics, 47, 6, 383-387, (2010).

[101] A Buha, Z Bulat, D Dukic-Cosic , V Matovic, ***Effects of oral and intraperitoneal magnesium treatment against cadmium-induced oxidative stress in plasma of rats,*** Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 63, 3, 247-254, (2012).

[102] T Hsu, KM Huang, HT Tsai, ST Sung , TN Ho, ***Cadmium(Cd)-induced oxidative stress down-regulates the gene expression of DNA mismatch recognition proteins MutS homolog 2 (MSH2) and MSH6 in zebrafish (Danio rerio) embryos,*** Aquatic toxicology, 126, 9-16, (2013).

[103] V Matovic, A Buha, Z Bulat, D Ethukic-Cosic, M Miljkovic, J Ivanisevic , J Kotur-Stevuljevic, ***Route-dependent effects of cadmium/cadmium and magnesium acute treatment on parameters of oxidative stress in rat liver,*** Food and chemical toxicology : an international

journal published for the British Industrial Biological Research Association, 50, 3-4, 552-557, (2012).

[104] H Zhang, C Cai, C Shi, H Cao, Z Han , X Jia, ***Cadmium-induced oxidative stress and apoptosis in the testes of frog Rana limnocharis,*** Aquatic toxicology, 122-123, 67-74, (2012).

[105] F Atif, M Ali, M Kaur, H Rehman , S Raisuddin, ***Modulatory effect of cadmium injection on endosulfan-induced oxidative stress in the freshwater fish, Channa punctata Bloch,*** Bulletin of environmental contamination and toxicology, 74, 4, 777-784, (2005).

[106] WP Zijlstra, SK Bulstra, JJ van Raay, BM van Leeuwen , R Kuijer, ***Cobalt and chromium ions reduce human osteoblast-like cell activity in vitro, reduce the OPG to RANKL ratio, and induce oxidative stress,*** Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society, 30, 5, 740-747, (2012).

[107] CP Lewis, M Demedts , B Nemery, ***Indices of oxidative stress in hamster lung following exposure to cobalt(II) ions: in vivo and in vitro studies,*** American journal of respiratory cell and molecular biology, 5, 2, 163-169, (1991).

[108] G Cai, J Zhu, C Shen, Y Cui, J Du , X Chen, ***The effects of cobalt on the development, oxidative stress, and apoptosis in zebrafish embryos,*** Biological trace element research, 150, 1-3, 200-207, (2012).

[109] F Ahmad, H Yao, Y Zhou , X Liu, ***Toxicity of cobalt ferrite (CoFe2O4) nanobeads in Chlorella vulgaris: Interaction, adaptation and oxidative stress,*** Chemosphere, 139, 479-485, (2015).

[110] P Comba, S Kuwata, G Linti, H Pritzkow, M Tarnai , H Wadepohl, ***Oxidative N-dealkylation in cobalt-bispidine-H2O2 systems,*** Chemical communications, 19, 2074-2076, (2006).

[111] AP Iastrebov, ***[Study of the oxidative metabolism of bone marrow during stimulation of erythropoiesis by cobalt],*** Biulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny, 73, 7, 50-52, (1972).

[112] Y Liu, C Wang, Y Wang, Z Ma, J Xiao, C McClain, X Li , W Feng, ***Cobalt chloride decreases fibroblast growth factor-21 expression dependent on oxidative stress but not hypoxia-inducible factor in Caco-2 cells,*** Toxicology and applied pharmacology, 264, 2, 212-221, (2012).

[113] GI Stangl, FJ Schwarz, B Jahn , M Kirchgessner, ***Cobalt-deficiency-induced hyperhomocysteinaemia and oxidative status of cattle,*** The British journal of nutrition, 83, 1, 3-6, (2000).

[114] Y Jo, J Annaraj, MS Seo, YM Lee, SY Kim, J Cho , W Nam, ***Reactivity of a cobalt(III)-peroxo complex in oxidative nucleophilic reactions,*** Journal of inorganic biochemistry, 102, 12, 2155-2159, (2008).

[115] N Soudani, M Rafrafi, I Ben Amara, A Hakim, A Troudi, KM Zeghal, H Ben Salah, T Boudawara , N Zeghal, ***Oxidative stress-related lung dysfunction by chromium(VI): alleviation by Citrus aurantium L,*** Journal of physiology and biochemistry, 69, 2, 239-253, (2013).

[116] V Velma , PB Tchounwou, ***Oxidative Stress and DNA Damage Induced by Chromium in Liver and Kidney of Goldfish, Carassius auratus,*** Biomarker insights, 8, 43-51, (2013).

[117] K Ambreen, FH Khan, S Bhadauria , S Kumar, ***Genotoxicity and oxidative stress in chromium-exposed tannery workers in North India,*** Toxicol Ind Health, 30, 5, 405-414, (2014).

[118] MS Kumar, R Praveenkumar, A Ilavarasi, K Rajeshwari , N Thajuddin, ***Oxidative stress response and fatty acid changes associated with bioaccumulation of chromium [Cr(VI)] by a fresh water cyanobacterium Chroococcus sp,*** Biotechnology letters, 34, 2, 247-251, (2012).

[119] OV Lushchak, OI Kubrak, IM Torous, TY Nazarchuk, KB Storey , VI Lushchak, ***Trivalent chromium induces oxidative stress in goldfish brain,*** Chemosphere, 75, 1, 56-62, (2009).

[120] I Ahmad, VL Maria, M Oliveira, M Pacheco , MA Santos, ***Oxidative stress and genotoxic effects in gill and kidney of Anguilla anguilla L. exposed to chromium with or without pre-exposure to beta-naphthoflavone,*** Mutation research, 608, 1, 16-28, (2006).

[121] JH Kim , JC Kang, ***Oxidative stress, neurotoxicity, and metallothionein (MT) gene expression in juvenile rock fish Sebastes schlegelii under the different levels of dietary chromium (Cr(6+)) exposure,*** Ecotoxicology and environmental safety, 125, 78-84, (2016).

[122] SS Anand, ***Pyridoxine attenuates chromium-induced oxidative stress in rat kidney,*** Basic & clinical pharmacology & toxicology, 97, 1, 58-60, (2005).

[123] B Duarte, V Silva , I Cacador, ***Hexavalent chromium reduction, uptake and oxidative biomarkers in Halimione portulacoides,*** Ecotoxicology and environmental safety, 83, 1-7, (2012).

[124] OI Kubrak, OV Lushchak, JV Lushchak, IM Torous, JM Storey, KB Storey , VI Lushchak, ***Chromium effects on free radical processes in goldfish tissues: comparison of Cr(III) and Cr(VI) exposures on oxidative stress markers, glutathione status and antioxidant enzymes,*** Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP, 152, 3, 360-370, (2010).

[125] K Kumari, A Khare , S Dange, ***The applicability of oxidative stress biomarkers in assessing chromium induced toxicity in the fish Labeo rohita,*** BioMed research international, 2014, 782493, (2014).

[126] D Bagchi, SJ Stohs, BW Downs, M Bagchi , HG Preuss, ***Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium,*** Toxicology, 180, 1, 5-22, (2002).

[127] A Kart, E Koc, KY Dalginli, C Gulmez, M Sertcelik , O Atakisi, ***The Therapeutic Role of Glutathione in Oxidative Stress and Oxidative DNA Damage Caused by Hexavalent Chromium,*** Biological trace element research, (2016).

[128] R Wu , BJ Richardson, ***6th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology,*** Marine pollution bulletin, 63, 5-12, 71-72, (2011).

[129] DL Villeneuve , N Garcia-Reyero, ***Vision & strategy: Predictive ecotoxicology in the 21st century,*** Environmental toxicology and chemistry / SETAC, 30, 1, 1-8, (2011).

[130] RY Kong, JP Giesy, RS Wu, EX Chen, MW Chiang, PL Lim, BB Yuen, BW Yip, HO Mok , DW Au, ***Development of a marine fish model for studying in vivo molecular responses in ecotoxicology,*** Aquatic toxicology, 86, 2, 131-141, (2008).

[131] NC Bols, JL Brubacher, RC Ganassin , LE Lee, ***Ecotoxicology and innate immunity in fish,*** Dev Comp Immunol, 25, 8-9, 853-873, (2001).

[132] A Castano, N Bols, T Braunbeck, P Dierickx, M Halder, B Isomaa, K Kawahara, LE Lee, C Mothersill, P Part, G Repetto, JR Sintes, H Rufli, R Smith, C Wood, H Segner , E Workshop, ***The use of fish cells in ecotoxicology. The report and recommendations of ECVAM Workshop 47,*** Altern Lab Anim, 31, 3, 317-351, (2003).

[133] MI Chubirko, GM Basova, NN Stepanova, TA Popova, LN Iakushkina , VP Kuralesina, ***[Biomonitoring of salivary heavy metals],*** Gigiena i sanitariia, 2, 66-67, (2005).

[134] J Ninkovic , L Bally-Cuif, ***The zebrafish as a model system for assessing the reinforcing properties of drugs of abuse,*** Methods, 39, 3, 262-274, (2006).

[135] MC Mione , NS Trede, ***The zebrafish as a model for cancer,*** Disease models & mechanisms, 3, 9-10, 517-523, (2010).

[136] A Miklosi , RJ Andrew, ***The zebrafish as a model for behavioral studies,*** Zebrafish, 3, 2, 227-234, (2006).

[137] C Medina , JL Royo, ***Zebrafish as a model organism to study host-pathogen interactions,*** Methods, 62, 3, 241-245, (2013).

[138] J Mesureur , AC Vergunst, ***Zebrafish embryos as a model to study bacterial virulence,*** Methods in molecular biology, 1197, 41-66, (2014).
[139] IV Mizgirev , S Revskoy, ***A new zebrafish model for experimental leukemia therapy,*** Cancer biology & therapy, 9, 11, 895-902, (2010).
[140] AB Mohseny , PC Hogendoorn, ***Zebrafish as a model for human osteosarcoma,*** Advances in experimental medicine and biology, 804, 221-236, (2014).
[141] JA Morris, ***Zebrafish: a model system to examine the neurodevelopmental basis of schizophrenia,*** Progress in brain research, 179, 97-106, (2009).
[142] KS Moshal, KF Ferri-Lagneau , T Leung, ***Zebrafish model: worth considering in defining tumor angiogenesis,*** Trends in cardiovascular medicine, 20, 4, 114-119, (2010).
[143] MY Mushtaq, R Verpoorte , HK Kim, ***Zebrafish as a model for systems biology,*** Biotechnology & genetic engineering reviews, 29, 187-205, (2013).
[144] A Muto , K Kawakami, ***Prey capture in zebrafish larvae serves as a model to study cognitive functions,*** Frontiers in neural circuits, 7, 110, (2013).
[145] M Newman, E Ebrahimie , M Lardelli, ***Using the zebrafish model for Alzheimer's disease research,*** Frontiers in genetics, 5, 189, (2014).
[146] W Norton , L Bally-Cuif, ***Adult zebrafish as a model organism for behavioural genetics,*** BMC neuroscience, 11, 90, (2010).
[147] DH Evans, ***The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants,*** Environmental health perspectives, 71, 47-58, (1987).
[148] G Danko, J Szabo , J Szakolczai, ***[Gill rot of sheat fish (Silurus glanis)],*** Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite naturwissenschaftliche Abt.: Allgemeine, landwirtschaftliche und technische Mikrobiologie, 121, 5, 523-531, (1967).
[149] K Bresolin de Souza, F Jutfelt, P Kling, L Forlin , J Sturve, ***Effects of increased CO2 on fish gill and plasma proteome,*** PloS one, 9, 7, e102901, (2014).
[150] CY Huang , HC Lin, ***The effect of acidity on gill variations in the aquatic air-breathing fish, Trichogaster lalius,*** Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology, 158, 1, 61-71, (2011).
[151] A Jain, J Mal, V Mehndiratta, R Chander , SK Patra, ***Study of oxidative stress in vitiligo,*** Indian journal of clinical biochemistry : IJCB, 26, 1, 78-81, (2011).
[152] S Brkic, D Maric, S Tomic , R Dimitrijevic, ***[Viral infections and oxidative stress],*** Vojnosanitetski pregled, 67, 12, 1015-1020, (2010).
[153] PB Desai, S Manjunath, S Kadi, K Chetana , J Vanishree, ***Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in rheumatoid arthritis: a case control study,*** European review for medical and pharmacological sciences, 14, 11, 959-967, (2010).
[154] DP Kadam, AN Suryakar, RD Ankush, CY Kadam , KH Deshpande, ***Role of oxidative stress in various stages of psoriasis,*** Indian journal of clinical biochemistry : IJCB, 25, 4, 388-392, (2010).
[155] DN Smarsh, N Liburt, J Streltsova, K McKeever , CA Williams, ***Oxidative stress and antioxidant status in intensely exercising horses administered nutraceutical extracts,*** Equine veterinary journal. Supplement, 38, 317-322, (2010).
[156] W Wei, XF Li, XN Li, XM Chen, AL Liu , WQ Lu, ***Oxidative stress and cell-cycle change induced by coexposed PCB126 and benzo(a) pyrene to human hepatoma (HepG2) cells,*** Environmental toxicology, 27, 5, 316-320, (2012).
[157] C Ziskoven, M Jager, C Zilkens, W Bloch, K Brixius , R Krauspe, ***Oxidative stress in secondary osteoarthritis: from cartilage destruction to clinical presentation?,*** Orthopedic reviews, 2, 2, e23, (2010).

[158] K Stadler, ***Oxidative stress in diabetes,*** Advances in experimental medicine and biology, 771, 272-287, (2012).
[159] M Zarbin, ***Treatment of oxidative stress with chelation therapy,*** Archives of ophthalmology, 130, 12, 1597-1598, (2012).
[160] P Castrogiovanni , R Imbesi, ***Oxidative stress and skeletal muscle in exercise,*** Italian journal of anatomy and embryology = Archivio italiano di anatomia ed embriologia, 117, 2, 107-117, (2012).
[161] S Ondei Lde, F Estevao Ida, MI Rocha, S Percario, DR Souza, MA Pinhel , CR Bonini-Domingos, ***Oxidative stress and antioxidant status in beta-thalassemia heterozygotes,*** Revista brasileira de hematologia e hemoterapia, 35, 6, 409-413, (2013).
[162] M Siwek, M Sowa-Kucma, D Dudek, K Styczen, B Szewczyk, K Kotarska, P Misztakk, A Pilc, M Wolak , G Nowak, ***Oxidative stress markers in affective disorders,*** Pharmacological reports : PR, 65, 6, 1558-1571, (2013).
[163] M Rafieian-Kopaei, A Baradaran , M Rafieian, ***Oxidative stress and the paradoxical effects of antioxidants,*** Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences, 18, 7, 629, (2013).
[164] AV Burlev, VA Burlev, NA Il'iasova , EM Shifman, ***[Oxidative stress in perioperative period of cesarean section],*** Anesteziologiia i reanimatologiia, 59, 6, 23-28, (2014).
[165] A Hamdallah, VV Davydov , VN Shvets, ***Oxidative stress and the enzyme system of aldehyde catabolism in the muscle mitochondria of immobilized pubertal rats,*** Ukrainian biochemical journal, 86, 6, 50-55, (2014).
[166] S Batirel, P Bozaykut, E Mutlu Altundag, N Kartal Ozer , CS Mantzoros, ***The effect of Irisin on antioxidant system in liver,*** Free radical biology & medicine, 75 Suppl 1, S16, (2014).
[167] K Yogesh, SN Jha , T Ahmad, ***Antioxidant potential of aqueous extract of some food grain powder in meat model system,*** Journal of food science and technology, 51, 11, 3446-3451, (2014).
[168] W Suttirak , S Manurakchinakorn, ***In vitro antioxidant properties of mangosteen peel extract,*** Journal of food science and technology, 51, 12, 3546-3558, (2014).
[169] F Aydogan, E Tastan, E Aydin, M Senes, S Akgedik, R Berkem, A Tekeli, A Hakligor , H Ustun, ***Antioxidant role of selenium in rats with experimental acute otitis media,*** Indian journal of otolaryngology and head and neck surgery : official publication of the Association of Otolaryngologists of India, 65, Suppl 3, 541-547, (2013).
[170] EM Perez-Perez, P Vit, E Rivas, R Sciortino, A Sosa, D Tejada , AJ Rodriguez-Malaver, ***Antioxidant activity of four color fractions of bee pollen from Merida, Venezuela,*** Archivos latinoamericanos de nutricion, 62, 4, 375-380, (2012).
[171] R Choudhary, AE Saroha , PL Swarnkar, ***Effect of abscisic acid and hydrogen peroxide on antioxidant enzymes in Syzygium cumini plant,*** Journal of food science and technology, 49, 5, 649-652, (2012).
[172] M Kosanic, B Rankovic , M Dasic, ***Mushrooms as possible antioxidant and antimicrobial agents,*** Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR, 11, 4, 1095-1102, (2012).
[173] SC Hou, XB Ai, JG Gao, H Zhu , XQ Sun, ***[CuZn-SOD and MDA in the serum and EPS of chronic prostatitis patients: quantitative determination and analysis],*** Zhonghua nan ke xue = National journal of andrology, 16, 11, 1012-1015, (2010).
[174] O Onaca, DW Hughes, V Balasubramanian, M Grzelakowski, W Meier , CG Palivan, ***SOD antioxidant nanoreactors: influence of block copolymer composition on the nanoreactor efficiency,*** Macromolecular bioscience, 10, 5, 531-538, (2010).
[175] U Marzec-Wroblewska, P Kaminski, P Lakota, M Szymanski, K Wasilow, G Ludwikowski, M Kuligowska-Prusinska, G Odrowaz-Sypniewska, T Stuczynski , J Michalkiewicz, ***Zinc and iron***

concentration and SOD activity in human semen and seminal plasma, Biological trace element research, 143, 1, 167-177, (2011).

[176] X Chen, E Zhang, L Fang, J Zhang, J Zhu, W He , X Luo, ***Repair effects of exogenous SOD on Bacillus subtilis against gamma radiation exposure,*** Journal of environmental radioactivity, 126, 259-263, (2013).

[177] EK Vialykh, MA Solidolova, O Bushueva, IV Bulgakova , AV Polonikov, ***[Catalase gene polymorphism is associated with increased risk of cerebral stroke in hypertensive patients],*** Zhurnal nevrologii i psikhiatrii imeni S.S. Korsakova / Ministerstvo zdravookhraneniia i meditsinskoi promyshlennosti Rossiiskoi Federatsii, Vserossiiskoe obshchestvo nevrologov [i] Vserossiiskoe obshchestvo psikhiat, 112, 8 Pt 2, 3-7, (2012).

[178] M Hebert-Schuster, EE Fabre , V Nivet-Antoine, ***Catalase polymorphisms and metabolic diseases,*** Current opinion in clinical nutrition and metabolic care, 15, 4, 397-402, (2012).

[179] JS da Costa Junior, AA de Almeida, JP Costa, AM das Gracas Lopes Cito, J Saffi , RM de Freitas, ***Superoxide dismutase and catalase activities in rat hippocampus pretreated with garcinielliptone FC from Platonia insignis,*** Pharmaceutical biology, 50, 4, 453-457, (2012).

[180] JW Whittaker, ***Non-heme manganese catalase--the 'other' catalase,*** Archives of biochemistry and biophysics, 525, 2, 111-120, (2012).

[181] SA Spence, VL Clark , VM Isabella, ***The role of catalase in gonococcal resistance to peroxynitrite,*** Microbiology, 158, Pt 2, 560-570, (2012).

[182] A Lerebours, S Cambier, L Hislop, C Adam-Guillermin , JP Bourdineaud, ***Genotoxic effects of exposure to waterborne uranium, dietary methylmercury and hyperoxia in zebrafish assessed by the quantitative RAPD-PCR method,*** Mutation research, 755, 1, 55-60, (2013).

[183] ER Duarte , JS Hamdan, ***RAPD differentiation of Malassezia spp. from cattle, dogs and humans,*** Mycoses, 53, 1, 48-56, (2010).

[184] CB Cerqueira-Silva, LD Conceicao, ES Santos, CB Cardoso-Silva, AS Pereira, AC Oliveira , RX Correa, ***Genetic variability in wild genotypes of Passiflora cincinnata based on RAPD markers,*** Genetics and molecular research : GMR, 9, 4, 2421-2428, (2010).

[185] X Ma, SY Chen, SQ Bai, XQ Zhang, DX Li, CB Zhang , JJ Yan, ***RAPD analysis of genetic diversity and population structure of Elymus sibiricus (Poaceae) native to the southeastern Qinghai-Tibet Plateau, China,*** Genetics and molecular research : GMR, 11, 3, 2708-2718, (2012).

[186] RC Paraguison, MP Faylon, EB Flores , LC Cruz, ***Improved RAPD-PCR for discriminating breeds of water buffalo,*** Biochem Genet, 50, 7-8, 579-584, (2012).

[187] I Uzonur, G Akdeniz, Z Katmer , SK Ersoy, ***RAPD-PCR and real-time PCR HRM based genetic variation evaluations of Urtica dioica parts, ecotypes and evaluations of morphotypes in Turkey,*** African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM / African Networks on Ethnomedicines, 10, 2, 232-245, (2013).

[188] Y Bakri, MI Arabi , M Jawhar, ***RAPD technique is a useful tool to distinguish Penicillium species,*** Polish journal of microbiology / Polskie Towarzystwo Mikrobiologow = The Polish Society of Microbiologists, 56, 4, 273-276, (2007).

[189] SS Mikhailovskii, AM Kulikov, SG Potapov, OE Lazebnyi , VG Mitrofanov, ***[A RAPD fingerprinting of sibling species of the Drosophila virilis group],*** Genetika, 43, 1, 105-109, (2007).

[190] M Kotepui, C Thawornkuno, P Chavalitshewinkoon-Petmitr, P Punyarit , S Petmitr, ***Quantitative real-time RT-PCR of ITGA7, SVEP1, TNS1, LPHN3, SEMA3G, KLB and MMP13 mRNA expression in breast cancer,*** Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP, 13, 11, 5879-5882, (2012).

[191] Y Miyajima, K Satoh, T Uchida, T Yamada, M Abe, S Watanabe, M Makimura , K Makimura, ***Rapid real-time diagnostic PCR for Trichophyton rubrum and Trichophyton***

mentagrophytes in patients with tinea unguium and tinea pedis using specific fluorescent probes, Journal of dermatological science, 69, 3, 229-235, (2013).

[192] A Vegi , CE Wolf-Hall, ***Multiplex real-time PCR method for detection and quantification of mycotoxigenic fungi belonging to three different genera,*** Journal of food science, 78, 1, M70-76, (2013).

[193] IS Pagani, O Spinelli, E Mattarucchi, C Pirrone, D Pigni, E Amelotti, S Lilliu, C Boroni, T Intermesoli, U Giussani, L Caimi, F Bolda, R Baffelli, E Candi, F Pasquali, F Lo Curto, A Lanfranchi, F Porta, A Rambaldi , G Porta, ***Genomic quantitative real-time PCR proves residual disease positivity in more than 30% samples with negative mRNA-based qRT-PCR in Chronic Myeloid Leukemia,*** Oncoscience, 1, 7, 510-521, (2014).

[194] F Yang, X Dao, A Rodriguez-Palacios, X Feng, C Tang, X Yang , H Yue, ***A real-time PCR for detection and quantification of Mycoplasma ovipneumoniae,*** J Vet Med Sci, 76, 12, 1631-1634, (2014).

[195] R Kumar , RP Sinha, ***Real-time immuno-PCR: an approach for detection of trace amounts of transgenic proteins,*** Journal of AOAC International, 97, 6, 1634-1637, (2014).

[196] A Balboni, L Gallina, A Palladini, S Prosperi , M Battilani, ***A real-time PCR assay for bat SARS-like coronavirus detection and its application to Italian greater horseshoe bat faecal sample surveys,*** TheScientificWorldJournal, 2012, 989514, (2012).

[197] AI Dragan, R Pavlovic, JB McGivney, JR Casas-Finet, ES Bishop, RJ Strouse, MA Schenerman , CD Geddes, ***SYBR Green I: fluorescence properties and interaction with DNA,*** Journal of fluorescence, 22, 4, 1189-1199, (2012).

[198] A Sanchez-Matamoros, D Kukielka, AI De las Heras , JM Sanchez-Vizcaino, ***Development and evaluation of a SYBR Green real-time RT-PCR assay for evaluation of cytokine gene expression in horse,*** Cytokine, 61, 1, 50-53, (2013).

[199] V Fiorito, S Geninatti Crich, L Silengo, F Altruda, S Aime , E Tolosano, ***Assessment of iron absorption in mice by ICP-MS measurements of (57)Fe levels,*** European journal of nutrition, 51, 7, 783-789, (2012).

[200] S Crotti, C Granzotto, WR Cairns, P Cescon , C Barbante, ***Elemental labeling for the identification of proteinaceous-binding media in art works by ICP-MS,*** Journal of mass spectrometry : JMS, 46, 12, 1297-1303, (2011).

[201] S Bakanlığı, ***YÖNETMELİK İTASH,*** Resmi Gazete, 25730, (17 Şubat 2005).

[202] R Gazete, ***TEBLİĞİ SKKYTU,*** TEBLİĞİ SKKYTU, 20748 (7 Ocak 1991).

[203] FA Atienzar, M Conradi, AJ Evenden, NA Jha , HM Depledge, ***Qualitative assessment of genotoxicity using random amplified polymorphic DNA: Comparison of genomic template stability with key fitness parameters in Daphnia magna exposed to benzo[a]pyrene,*** Environmental Chemistry, 18, 10, 2275–2282, (1999).

[204] G Papathanasiou, KN White, R Walton , S Boult, ***Toxicity of aluminium in natural waters controlled by type rather than quantity of natural organic matter,*** The Science of the total environment, 409, 24, 5277-5283, (2011).

[205] FJ Stephens , M Ingram, ***Two cases of fish mortality in low pH, aluminium rich water,*** Journal of fish diseases, 29, 12, 765-770, (2006).

[206] A Dobranskyte, R Jugdaohsingh, CR McCrohan, E Stuchlik, JJ Powell , KN White, ***Effect of humic acid on water chemistry, bioavailability and toxicity of aluminium in the freshwater snail, Lymnaea stagnalis, at neutral pH,*** Environ Pollut, 140, 2, 340-347, (2006).

[207] K Pynnonen, ***Aluminum Accumulation and Distribution in the Fresh-Water Clams (Unionidae),*** Comp Biochem Phys C, 97, 1, 111-117, (1990).

[208] G Barone, R Giacominelli-Stuffler , MM Storelli, ***Comparative study on trace metal accumulation in the liver of two fish species (Torpedinidae): concentration-size relationship,*** Ecotoxicology and environmental safety, 97, 73-77, (2013).

[209] CP Liang, CW Liu, CS Jang, SW Wang , JJ Lee, ***Assessing and managing the health risk due to ingestion of inorganic arsenic from fish and shellfish farmed in blackfoot disease areas for general Taiwanese,*** Journal of hazardous materials, 186, 1, 622-628, (2011).

[210] J Ventura-Lima, MR de Castro, D Acosta, D Fattorini, F Regoli, LM de Carvalho, D Bohrer, LA Geracitano, DM Barros, LF Marins, RS da Silva, CD Bonan, MR Bogo , JM Monserrat, ***Effects of arsenic (As) exposure on the antioxidant status of gills of the zebrafish Danio rerio (Cyprinidae),*** Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP, 149, 4, 538-543, (2009).

[211] FJ Liu, GP Cobb, TA Anderson, QQ Cheng , CW Theodorakis, ***Uptake, accumulation and depuration of sodium perchlorate and sodium arsenate in zebrafish (Danio rerio),*** Chemosphere, 65, 10, 1679-1689, (2006).

[212] EM Sorensen, ***Toxicity and accumulation of arsenic in green sunfish, Lepomis cyanellus, exposed to arsenate in water,*** Bulletin of environmental contamination and toxicology, 15, 6, 756-761, (1976).

[213] O Doganlar, ZB Doganlar, FDG Muranli , U Guner, ***Genotoxic Effect and Carcinogenic Potential of a Mixture of As and Cd in Zebrafish at Permissible Maximum Contamination Levels for Drinking Water,*** Water Air Soil Poll, 227, 3, (2016).

[214] CA Mebane, FS Dillon , DP Hennessy, ***Acute toxicity of cadmium, lead, zinc, and their mixtures to stream-resident fish and invertebrates,*** Environmental toxicology and chemistry / SETAC, 31, 6, 1334-1348, (2012).

[215] CJ Schmitt, JJ Whyte, WG Brumbaugh , DE Tillitt, ***Biochemical effects of lead, zinc, and cadmium from mining on fish in the Tri-States District of northeastern Oklahoma, USA,*** Environmental toxicology and chemistry / SETAC, 24, 6, 1483-1495, (2005).

[216] Y Keskin, R Baskaya, O Ozyaral, T Yurdun, NE Luleci , O Hayran, ***Cadmium, lead, mercury and copper in fish from the Marmara Sea, Turkey,*** Bulletin of environmental contamination and toxicology, 78, 3-4, 258-261, (2007).

[217] I Ferrandino, R Favorito, M Annunziata , MC Grimaldi, ***Cadmium induces apoptosis in the pituitary gland of Podarcis sicula,*** Annals of the New York Academy of Sciences, 1163, 386-388, (2009).

[218] S Cambier, P Gonzalez, G Durrieu , JP Bourdineaud, ***Cadmium-induced genotoxicity in zebrafish at environmentally relevant doses,*** Ecotoxicology and environmental safety, 73, 3, 312-319, (2010).

[219] AV Hallare, M Schirling, T Luckenbach, HR Kohler , R Triebskorn, ***Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (Danio rerio) embryos,*** J Therm Biol, 30, 1, 7-17, (2005).

[220] I Komjarova , NR Bury, ***Evidence of common cadmium and copper uptake routes in zebrafish Danio rerio,*** Environmental science & technology, 48, 21, 12946-12951, (2014).

[221] PMD Prasath , TH Khan, ***Impact of Tsunami on the Heavy Metal Accumulation in Water, Sediments and Fish at Poompuhar Coast, Southeast Coast of India,*** E-J Chem, 5, 1, 16-22, (2008).

[222] HC Reinardy, JR Syrett, RA Jeffree, TB Henry , AN Jha, ***Cobalt-induced genotoxicity in male zebrafish (Danio rerio), with implications for reproduction and expression of DNA repair genes,*** Aquatic toxicology, 126, 224-230, (2013).

[223] M Zyadah , A Chouikhi, ***Heavy metal accumulation in Mullus barbatus, Merluccius merluccius and Boops boops fish from the Aegean Sea, Turkey,*** International journal of food sciences and nutrition, 50, 6, 429-434, (1999).

[224] HJ Jo, J Son, K Cho , J Jung, ***Combined effects of water quality parameters on mixture toxicity of copper and chromium toward Daphnia magna,*** Chemosphere, 81, 10, 1301-1307, (2010).

[225] I Domingues, R Oliveira, J Lourenco, CK Grisolia, S Mendo , AMVM Soares, ***Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): Comparison of responses in zebrafish early life stages and adults,*** Comp Biochem Phys C, 152, 3, 338-345, (2010).

[226] KV Sastry , S Tyagi, ***Toxic effects of chromium in a freshwater teleost fish, Channa punctatus,*** Toxicology letters, 11, 1-2, 17-21, (1982).

[227] C Bellavere , J Gorbi, ***A Comparative-Analysis of Acute Toxicity of Chromium, Copper and Cadmium to Daphnia-Magna, Biomphalaria-Glabrata, and Brachydanio-Rerio,*** Environ Technol Lett, 2, 3, 119-128, (1981).

[228] G Deviller, O Palluel, C Aliaume, H Asanthi, W Sanchez, MAF Nava, JP Blancheton , C Casellas, ***Impact assessment of various rearing systems on fish health using multibiomarker response and metal accumulation,*** Ecotoxicology and environmental safety, 61, 1, 89-97, (2005).

[229] VA Mesquita, CF Silva , EV Soares, ***Toxicity Induced by a Metal Mixture (Cd, Pb and Zn) in the Yeast Pichia kudriavzevii: The Role of Oxidative Stress,*** Current microbiology, 72, 5, 545-550, (2016).

[230] S Naz , M Javed, ***Growth Responses of Fish During Chronic Exposure of Metal Mixture under Laboratory Conditions,*** Pak Vet J, 33, 3, 354-357, (2013).

[231] C Kamunde , R MacPhail, ***Metal-metal interactions of dietary cadmium, copper and zinc in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss,*** Ecotoxicology and environmental safety, 74, 4, 658-667, (2011).

[232] RJ Erickson, ***The biotic ligand model approach for addressing effects of exposure water chemistry on aquatic toxicity of metals: genesis and challenges,*** Environmental toxicology and chemistry / SETAC, 32, 6, 1212-1214, (2013).

[233] I Komjarova , R Blust, ***Multimetal interactions between Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn uptake from water in the zebrafish Danio rerio,*** Environmental science & technology, 43, 19, 7225-7229, (2009).

[234] D Alsop , CM Wood, ***Metal and pharmaceutical mixtures: is ion loss the mechanism underlying acute toxicity and widespread additive toxicity in zebrafish?,*** Aquatic toxicology, 140-141, 257-267, (2013).

[235] MHS Kraak, D Lavy, H Schoon, M Toussaint, WHM Peeters , NM Vanstraalen, ***Ecotoxicity of Mixtures of Metals to the Zebra Mussel Dreissena-Polymorpha,*** Environ Toxicol Chem, 13, 1, 109-114, (1994).

[236] F Kargin , HY Cogun, ***Metal interactions during accumulation and elimination of zinc and cadmium in tissues of the freshwater fish Tilapia nilotica,*** Bulletin of environmental contamination and toxicology, 63, 4, 511-519, (1999).

[237] FA Atienzar, M Conradi, AJ Evenden, AN Jha , MH Depledge, ***Qualitative assessment of genotoxicity using random amplified polymorphic DNA: comparison of genomic template stability with key fitness parameters in Daphnia magna exposed to benzo[a]pyrene,*** Environ Toxicol Chem, 18, 2275–2282, (1999).

[238] C Conte, I Mutti, P Puglisi, A Ferrarini, G Regina, E Maestri , N Marmiroli, ***DNA fingerprinting analysis by a PCR based method for monitoring the genotoxic effects of heavy metals pollution,*** Chemosphere, 37, 14-15, 2739-2749, (1998).

[239] W Liu, PJ Li, XM Qi, QX Zhou, L Zheng, TH Sun , YS Yang, ***DNA changes in barley (Hordeum vulgare) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis,*** Chemosphere, 61, 2, 158-167, (2005).

[240] I Silins , J Hogberg, ***Combined toxic exposures and human health: biomarkers of exposure and effect,*** Int J Environ Res Public Health, 8, 3, 629-647, (2011).

[241] SL Johnson, CN Midson, EW Ballinger , JH Postlethwait, ***Identification of RAPD primers that reveal extensive polymorphisms between laboratory strains of zebrafish,*** Genomics, 19, 1, 152-156, (1994).

[242] D Zivna, L Plhalova, E Praskova, S Stepanova, Z Siroka, M Sevcikova, J Blahova, M Bartoskova, P Marsalek, M Skoric , Z Svobodova, ***Oxidative stress parameters in fish after subchronic exposure to acetylsalicylic acid,*** Neuro Endocrinol Lett, 34 Suppl 2, 116-122, (2013).

[243] S Kakoolaki, ZS Talas, O Cakir, O Ciftci , I Ozdemir, ***Role of propolis on oxidative stress in fish brain,*** Basic and clinical neuroscience, 4, 2, 153-158, (2013).

[244] P Morcillo, MA Esteban , A Cuesta, ***Heavy metals produce toxicity, oxidative stress and apoptosis in the marine teleost fish SAF-1 cell line,*** Chemosphere, 144, 225-233, (2016).

[245] M Fatima, N Usmani, F Firdaus, MF Zafeer, S Ahmad, K Akhtar, SM Dawar Husain, MH Ahmad, E Anis , M Mobarak Hossain, ***In vivo induction of antioxidant response and oxidative stress associated with genotoxicity and histopathological alteration in two commercial fish species due to heavy metals exposure in northern India (Kali) river,*** Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP, 176-177, 17-30, (2015).

[246] A Arini, PY Gourves, P Gonzalez , M Baudrimont, ***Metal detoxification and gene expression regulation after a Cd and Zn contamination: an experimental study on Danio rerio,*** Chemosphere, 128, 125-133, (2015).

[247] SJ Frank, MJ Johansen, KS Martirosyan, M Gagea, CS Van Pelt, A Borne, Y Carmazzi , T Madden, ***A biodistribution and toxicity study of cobalt dichloride-N-acetyl cysteine in an implantable MRI marker for prostate cancer treatment,*** International journal of radiation oncology, biology, physics, 85, 4, 1024-1030, (2013).

[248] VI Lushchak, ***Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals,*** Aquatic toxicology, 101, 1, 13-30, (2011).

[249] V Paskova, K Hilscherova , L Blaha, ***Teratogenicity and embryotoxicity in aquatic organisms after pesticide exposure and the role of oxidative stress,*** Rev Environ Contam Toxicol, 211, 25-61, (2011).

[250] H Paskerova, K Hilscherova , L Blaha, ***Oxidative stress and detoxification biomarker responses in aquatic freshwater vertebrates exposed to microcystins and cyanobacterial biomass,*** Environ Sci Pollut Res Int, 19, 6, 2024-2037, (2012).

[251] N von Moos , VI Slaveykova, ***Oxidative stress induced by inorganic nanoparticles in bacteria and aquatic microalgae--state of the art and knowledge gaps,*** Nanotoxicology, 8, 6, 605-630, (2014).

[252] KM Crowe, JC Newton, B Kaltenboeck , C Johnson, ***Oxidative stress responses of gulf killifish exposed to hydrocarbons from the Deepwater Horizon oil spill: Potential implications for aquatic food resources,*** Environmental toxicology and chemistry / SETAC, 33, 2, 370-374, (2014).

[253] LL Amado , JM Monserrat, ***Oxidative stress generation by microcystins in aquatic animals: why and how,*** Environ Int, 36, 2, 226-235, (2010).

[254] MJ Koivula , T Eeva, ***Metal-related oxidative stress in birds,*** Environ Pollut, 158, 7, 2359-2370, (2010).

[255] CC Tsou, C Chiang-Ni, YS Lin, WJ Chuang, MT Lin, CC Liu , JJ Wu, ***Oxidative stress and metal ions regulate a ferritin-like gene, dpr, in Streptococcus pyogenes,*** International journal of medical microbiology : IJMM, 300, 4, 259-264, (2010).

ÖZGEÇMİŞ

2 Mart 1992 yılında Tekirdağ'da doğdu. 2006 yılında İstanbul Bahçeşehir Süleyman Demirel İlköğretim Okulundan, 2010 yılında İstanbul Esenkent Halil Akkanat Çok Programlı Lisesi Sayısal Bilimler Alanından mezun oldu. 2010 yılında Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümüne başladı. 2012 yılında Trakya Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi İşletme Bölümünde yan dal eğitimine başladı. 2014 yılında hem lisans hem de yan dal eğitiminden mezun oldu. 2014 yılında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı ile Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Nanoteknoloji Anabilim Dalında lisansüstü eğitime başladı. Lisansüstü eğitimi boyunca SCI indekslerine giren dergilerde 2, diğer ulusal ve uluslararası hakemli dergilerde 3 adet makale; lisans ve lisansüstü eğitimi sırasında hakemli ulusal ve uluslararası kongrelerde 1 sözlü, 10 poster bildirisi yayınladı. SCI indekslerine giren dergilerde 5 adet araştırma makalesinde hakemlik yaptı. İstanbul Üniversitesi Genetik Kulübü (İÜGEN) tarafından düzenlenen Uluslararası Katılımlı Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okullarında 2013, 2014 ve 2015 yıllarında en iyi poster yarışmalarında 1.lik kazandı.