



**T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK  
LİSANS  
TEZİ**

**ÇEVRESEL KİRLETİCİ ÇİNKO VE  
BAKIR PİRİTİYONUN (ZN/CU PYRİTHİONE)  
ZEBRA BALIKLARINDA (DANİO RERİO)  
GENOTOKSİK VE OKSİDATİF  
HASAR ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
BELİRLENMESİ**

**NAGEHAN İPİÇÜRÜK**

**BİYOKİMYA (TIP) ANABİLİM DALI**

**ŞUBAT 2018**



**ÇEVRESEL KİRLETİCİ ÇİNKO VE BAKIR PİRİTİYONUN  
(ZN/CU PYRİTHİONE) ZEBRA BALIKLARINDA (DANİO RERİO)  
GENOTOKSİK VE OKSİDATİF HASAR ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
BELİRLENMESİ**

**Nagehan İPİÇÜRÜK**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOKİMYA (TIP) ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ŞUBAT 2018**

NAGEHAN İPİÇÜRÜK tarafından hazırlanan “Çevresel Kirlenici Çinko ve Bakır Piritiyonun (Zn/Cu pyrithione) Zebra Balıklarında (Danio rerio) Genotoksik ve Antioksidan Sistem Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

**Danışman Üye:** Prof. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL  
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi  
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

AS

**Başkan:** Prof. Dr. Cemal ÇEVİK  
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi  
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

C. Çevik

**Üye:** Doç. Dr. Funda KOSOVA  
Manisa Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Ebelik Bölümü  
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

F. Kosova

Tez Savunma Tarihi: 05 / 02 / 2018

Jüri üyeleri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirim, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Nagehan İPİÇÜRÜK  
(05.02.2018)

ÇEVRESEL KİRLETİCİ ÇİNKO VE BAKIR PİRİTİYONUN (ZN/CU PYRITHIONE)  
ZEBRA BALIKLARINDA (DANİO RERİO) GENOTOKSİK VE OKSİDATİF HASAR  
ÜZERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Nagehan İPİÇÜRÜK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Şubat 2018

ÖZET

Çinko piritiyon (21 numaralı ürün tipi) ve bakır piritiyon antifoling maddelerdir; canlılarda antibakteriyal ve antifungal etkiler için yaygın kullanılan biyositlerdir. Bu çalışmada, her iki çevresel kirleticinin (Zn/Cu piritiyon) sucul toksisitesi ve insanlar üzerine muhtemel olumsuz etkileri Zebra türü balıklarda toksik maruziyet konsantrasyonunda, DNA/RNA oksidatif hasarı araştırılarak bilime, korunma ve tedavi yöntemlerine katkı sağlanması amaçlanmaktadır. Zebrafish (Danio rerio), omurgalıların gelişimi, ilaç keşfi, küçük molekül taraması, hastalık modelleme ve işlevsel sinirbilimi gibi modern biyomedikal araştırmaların birçok alanı için giderek daha güçlü bir model organizma haline geliyor. Akvaryumda belirli bir süre düzenli beslenmesi planlanan Zebra balıkları çinko veya bakır piritiyona farklı konsantrasyonlarda maruz bırakılarak akut toksik etkileri biyokimyasal ve histopatolojik olarak incelendi. Çalışmada 3-4,5 cm boylarındaki erkek ve dişi zebra balıklar kullanıldı. Balıklarda doku ve DNA hasarı oluşturmak için 0,02 mikrogram/Litre Zn/Cu piritiyon düzeylerinden başlanarak görülen etkilere bağlı olarak farklı dozlarda uygulama yapılması planlandı. İleri oksidasyon protein ürünleri (AOPP), lipid peroksidasyon ürünü (MDA), DNA/RNA oksidatif hasar düzeyleri belirlendi. İstatiksel analizler için SPSS versiyon 20.0 programı kullanıldı. Gruplar arasındaki belirgin farklılıkların tayininde normal dağılımlı değişkenler için t-test, değişkenler arası korelasyon için Spearman analizi yapıldı.

Bilim Kodu : 1010. 1.020  
Anahtar Kelimeler : Çevresel Kirletici, Çinko/Bakır Piritiyon, DNA hasarı,  
Zebra balığı  
Sayfa Adedi : 76  
Danışman : Prof. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL

THE GENOTOXIC AND OKSIDATIVE DAMAGE EFFECTS OF ENVIRONMENTAL  
POLLUTANT ZINC AND COPPER PYRITHIONE  
ON ZEBRA FISH (DANIO RERIO)

(M. Sc. Thesis)

Nagehan İPİÇÜRÜK

GAZI UNIVERSITY  
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

February 2018

ABSTRACT

Zinc pyrithione (product type 21) and copper pyrite antifolating agents; are commonly used biocides for antibacterial and antifungal effects in living organisms. Zinc and copper pyrithione are well known antifouling materials and biocides. In this study, it is aimed to contribute to knowing, protection and treatment methods by investigating DNA/RNA oxidative damage in the toxic exposure concentration of both environmental pollutants (Zn/Cu pyrithione) and possible adverse effects on humans by Zebra species. Zebrafish (Danio rerio ) is becoming a more widely used and increasingly powerful model organism for many fields of modern biomedical research including vertebrate development, small molecule screening for drug discovery, disease modelling, and functional neuroscience. Zebrafish fish, which are planned to be fed regularly for a certain period of time in the aquarium, were exposed to zinc or copper pyrithione at different concentrations, and the acute toxic effects were studied biochemically and histopathologically. Male and female zebrafish, 3-4.5 cm long, were used in the study. It was planned to apply the fish at different doses depending on the effects starting from 0.02 microgram/L of Zn/Cu pyrite levels to produce tissue and DNA damage in the fish. Advanced oxidative protein products (AOPP), lipid peroxidation products (MDA), DNA/RNA oxidative damage tests were applied. SPSS version 20.0 program was used for statistical analysis. Spearman analysis was used to determine the significant differences between the groups, t-test for normal variance variables and correlation between variables.

Science Code : 1010. 1.020  
Key Words : Environmental Pollutant, Zinc and Copper Pyrithione,  
DNA damage, Zebra fish  
Page Number : 76  
Supervisor : Prof. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL

## TEŞEKKÜR

Yazsam roman olur cinsinden bir yüksek lisans hikayesinin sonuna geldik. Yıllar sonra cesaret edip yüksek lisansa başladığımda çok heyecanlanmışım ve mutlu olmuşum. Çünkü kendi mesleğimi ve sevdiğim işi yapacaktım ki öyle de oldu. Ama çok da meşakkatli geçen dönemlerim oldu. Bu hikayede bana destek olan herkese...

Gökten düşer gibi kendisine düştüğüm halde çalışmalarında bana yer veren, sabırla beni dinleyen, benle çabalayan, tez çalışmam sırasında her konuda yardımlarını ve desteğini esirgemeyen, tecrübelerini ve bilgisini benle paylaşan çok değerli ve saygıdeğer danışmanım **Prof. Dr. Aylin Sepici Dinçel'e,**

Yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri'ne,

Tez çalışmamın deneysel kısımlarını gerçekleştirirken yardım ve desteklerini esirgemeyen, bilgisini ve tecrübelerini benle paylaşan, canla başla benle birlikte çalışan, kader arkadaşım canım Dr. Rabia Tural'a,

Her konuda manevi desteğini ve yardımlarını esirgemeyen, beni destekleyen çok kıymetli ve değerli, candan öte canlarım; babam Ali İpiçürük, annem Filiz İpiçürük, Kardeşlerim Kübra Yavuz ve Furkan İpiçürük ile yeğenim Ayşen Erkulu'ya,

Manevi desteklerini her zaman hissettiğim arkadaşlarım Dr. Seher Yüksel ve Dr. Alican Kaya ile yolumun kesiştiği ve beni destekleyen diğer tüm değerli arkadaşlarıma, dostlarıma...

teşekkürlerimi sunarım.



## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ÖZET .....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER .....	v
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ .....	viii
RESİMLERİN LİSTESİ .....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Çevre Kirlenmesi ve Kirleticileri [22-23] .....	3
2.1.1. Doğal çevre kirleticileri: .....	3
2.1.2. Yapay çevre kirleticileri .....	3
2.1.3. Çevredeki kirleticilerin yapay çevreye yaptığı etki .....	6
2.1.4. Çevredeki kirleticilerin doğal çevreye yaptığı etki.....	6
2.1.5. Çevresel kirleticilerin sağlık üzerindeki etkisi .....	9
2.1.6. Ağır metaller.....	16
2.1.7. Zebra balığı ( <i>Danio Rerio</i> ) .....	23
2.1.8. Endokrin bozucu kimyasallar .....	26
2.1.9. DNA ve yapısı .....	27
2.1.10. Histolojinin avantajları .....	28
2.1.11. SPSS programı nedir ve ne işe yarar? [29].....	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	31
3.1. Zebra Balığı ( <i>Danio Rerio</i> ) .....	31
3.2. Ortam Koşulları.....	31
3.3. Deney Hayvanlarının Hazırlanması .....	33
3.4. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlarla Malzemeler.....	34
3.5. Deneyler .....	35
3.5.1. DNA ekstraksiyonu .....	35
3.5.2. Doku protein tayini (Lowry deneyi) [28] .....	39

3.5.3. MDA için doku homojenizasyonu.....	41
3.5.4. Malondialdehit (MDA) tayini [25, 26] .....	42
3.5.5. İleri oksidasyon protein ürünleri (AOPP) tayini [27].....	42
3.5.6. DNA/RNA oksidatif hasar ELISA kit (Cayman).....	45
3.5.7. 8-hidroksi-2' deoksiguanozin (8-OHdG) analizi.....	47
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>49</b>
4.1. Doku MDA ve AOPP Deneyleri .....	50
4.1.1. Doku AOPP hesaplama .....	51
4.2. Doku Protein Tayini Deneyi (Lowry Deneyi).....	54
4.2.1. Doku protein tayini hesaplama .....	55
4.3. DNA/RNA Oksidatif Hasar ELISA kit (Cayman).....	56
4.3.1. Hesaplama .....	57
4.4. Histopatoloji Sonuçları.....	59
4.4.1. Solungaç dokularında görülen histopatolojik bulgular.....	59
<b>5. TARTIŞMA</b> .....	<b>61</b>
<b>6. SONUÇ</b> .....	<b>65</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>67</b>
<b>EKLER</b> .....	<b>73</b>
Ek-1.Etik Kurul Onayı.....	74
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>76</b>

**ÇİZELGELERİN LİSTESİ**

<b>Çizelge</b>	<b>Sayfa</b>
Çizelge 2.1. Temel endüstrilerden çevreye atılan metal türleri .....	17
Çizelge 3.1. Zebra balık örneklerinin nanodropta ölçülen DNA miktarları .....	38
Çizelge 3.2. Lowry deneyi standartların ve numunelerin hazırlanması.....	40
Çizelge 3.3. Tüm doku AOPP deneyi numunelerin hazırlanması .....	44
Çizelge 4.1. MDA-AOPP konsantrasyon değerleri .....	49
Çizelge 4.2. Doku MDA ve AOPP deneyleri .....	53
Çizelge 4.3. Doku protein tayini (Lowry deneyi) standartlar değerleri.....	56
Çizelge 4.4. Farklı konsantrasyonlarda Cu-Zn piritiyonları için 8-OHdG (pg/ml) değerleri .....	58
Çizelge 4.5. Farklı konsantrasyonlarda Cu-Zn piritiyonları için 8-OHdG (pg/mL), MDA (nmol/gr), AOPP (µmol/mg) değerleri .....	59

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 3.1. Santrifüj sonrası ependorf.....	37
Şekil 4.1. Malondialdehit (MDA) 520-535 nm dalga boylarında absorbands sonuçları grafiği .....	50
Şekil 4.2. Tüm Doku AOPP deneyi standartların absorbands değerleri .....	50
Şekil 4.3. Tüm doku AOPP deneyi için Kloramin-T standart eğri grafiği.....	51
Şekil 4. 4. Tüm doku AOPP deneyi konsantrasyon değerleri .....	51
Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlarda Cu-Zn piritiyonlar için MDA değerleri grafiği (nmol/g doku).....	53
Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda Cu-Zn piritiyonlar için AOPP değerleri grafiği (µmol/mg protein).....	54
Şekil 4.7. Doku protein tayini (Lowry Deneyi) numunelerin absorbands değerleri .....	54
Şekil 4.8. Doku protein tayini (Lowry Deneyi) standartların absorbands değerleri .....	55
Şekil 4.9. Doku protein tayini deneyi için standart eğri grafiği .....	55
Şekil 4.10. DNA/RNA oksidatif hasar ELISA kit (Cayman) absorbands değerleri .....	56
Şekil 4.11. DNA/RNA oksidatif hasar ELISA kit (Cayman) konsantrasyon (pg/mL) değerleri .....	57
Şekil 4.12. DNA/RNA oksidative damage ELISA kit (Cayman) 420 nm için standart eğri grafiği.....	57
Şekil 4.13. Farklı konsantrasyonlarda Cu-Zn piritiyonlar için 8-OHdG (pg/mL) değerleri grafiği.....	58

## RESİMLERİN LİSTESİ

<b>Resim</b>	<b>Sayfa</b>
Resim 2.1. Sanayi atıklarının çevreye ve canlılara zararları.....	4
Resim 2.2. Sanayi atıklarının çevreye ve canlılara zararları.....	4
Resim 2.3. Nükleer santralin patlaması .....	5
Resim 2.4. Radyasyon kirliliği.....	5
Resim 2.5. Savaşların çevreye verdiği zararlar.....	5
Resim 2.6. Toprak kirliliği.....	7
Resim 2.7. Su kirliliği .....	8
Resim 2.8. Hava kirliliği.....	9
Resim 2.9. Bakır elementi.....	19
Resim 2.10. Çinko elementi.....	21
Resim 2.11. Zebra balıkları.....	23
Resim 2.12. Zebra balığının gelişim evreleri.....	24
Resim 2.13. a) Döllenenmiş zebra balığı yumurtası b) Döllenenmiş zebra balığı yumurtası.....	25
Resim 2.14. a) Kontrol grubu, dekoryonize edilmemiş 1 günlük zebra balığı embriyosu; b:baş bölgesi s:somitler, k:kuyruk, ko:koryon, v:vitellüs b) 2 günlük zebra balığı embriyosu c) 6 günlük prelarva .....	25
Resim 2.15. DNA'nın yapısı.....	27
Resim 3.1. Deney düzeneği .....	32
Resim 3.2. Nanodrop DNA ölçüm grafiği .....	39
Resim 4.1. Solungaç dokularında epitel ayrılması (ok) (H&E,x100).....	59
Resim 5.1. MDA.....	63

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Simge</b>
%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
cc	Cubic Centimeter
cm	santimetre
cm <sup>3</sup>	santimetre küp
dk	Dakika
g	Gram
kg	Kilogram
mg	Miligram
µg	Mikrogram
pg	pikogram
L	Litre
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
Md.	Madde
n	mol
mol	Molarite
M	Molar
mM	Milimolar
µmol	mikro mol
N	Normal
nm	nanometre
nmol	nanomol
Cl	Klorür

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Simge</b>
HCl	Hidroklorik Asit
KCl	Potasyum Klorür
NaCl	Sodyum Klorür
NH <sub>4</sub> Cl	Amonyum Klorür
ZnCl <sub>2</sub>	Çinko Klorür
Cd	Kadmiyum
Cu	Bakır
dH <sub>2</sub> O	Distile Su
Hg	Civa
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Potasyum Di Hihrojen Fosfat
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Di Potasyum Hidrojen Fosfat
KI	Potasyum İyodür
Na-Asetat	Sodyum Asetat
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Sodyum Karbonat
Na <sub>2</sub> Ca <sub>3</sub>	Sodyum Karbonat
Na-K Tartarat	Sodyum Potasyum Tartarat
NaOH	Sodyum Hidroksit
Pb	Kurşun
PT	Piritiyon
Zn	Çinko
vb.	ve benzeri
V	Hacim
CuPT	Bakır piritiyon
ZnPT	Çinko piritiyon
Abs	Absorbans
BPA	Bisfenol A (2,2-bis(4-hidroksifenil) propan)
BSA	Bovin Serum Albumin

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
CI T	Kloramin T
ÇED	Çevresel Etki Değerlendirmesi
DDT	Dikloro Difenil Trikloroethan
DES	Dietilstilbesterol
DFAM	Deferoksamin Mesilat
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EC <sub>50</sub>	Effective concentration 50 (Etkili Konsantrasyon)
EDC	Endokrin Bozucu Kimyasal
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
EIA	Enzim İmmunoassay.
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LC <sub>50</sub>	Lethal concentration 50 (Öldürücü Doz)
OECD	Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (OECD)
PBS	Phosphate Buffered Saline
pH	Potansiyel Hidrojen
RBC	Red Blood Cell
RNA	Ribo Nükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
rpm	Revolutions Per Minute
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
STE	Sodyum Tris EDTA
SDS	Sodyum Dedosil Sülfat
TBA	Tiyobarbütirik Asit
TD1 Çözeltisi	UltraClean® Doku ve Hücreler DNA İzolasyon Kiti
TE	Tris-EDTA Tamponu
THSK	Türk Halk Sağlığı Kurumu



**Kısaltmalar****Açıklama**

TSE

Türk Standartları Enstitüsü

8-OHdG

8-hidroksi-2'-deoksiguanozin





## 1. GİRİŞ

Canlı organizmalar içinde yaşadıkları ortamla yakından ilişkilidirler. Günümüzde her gün yüzlerce kirlenici çevreye atılmakta ve çevrede yaşayan canlıları etkilemektedir. Bu kirlenicilerden birisi de ağır metallerdir.

Doğada ağır metallere çok düşük derişimlerde bulunmaktadır. İnsan nüfusundaki hızlı artış ve sonucunda artan sanayileşme, ortamda bulunan ağır metallere derişimlerinde de artışa neden olmuştur. Ağır metallere temel kaynakları maden ocakları, kömür-motorin gibi fosil yakıtlar, metal, kağıt vb. fabrikaların atık suları, gübreler, pestisitler ve kimyasallardır [1-2].

Atom numarası 20'den ve yoğunlukları genel olarak  $5 \text{ g/cm}^3$ 'den büyük olan metallere ağır metal denir [3-4]. Biyolojik olarak ağır metallere bazıları canlılar için esansiyel olup çeşitli enzim sistemlerinde önemli rollere sahiptirler. Bazıları ise hücre içindeki fonksiyonları kesin olarak bilinmeyen ve biyodegradasyonla uzaklaştırılmayan metallerdir ve genellikle canlılar için çok düşük dozlarda bile toksik etki gösterirler [5-6,7].

Sanayileşmenin artması sonucu, doğal suların bakır (Cu), çinko (Zn), kurşun (Pb), kadmiyum (Cd) ve civa (Hg) gibi ağır metallere kirlenmesi küresel bir sorun haline gelmiştir. Biyolojik çevrimin bir halkasını oluşturan ve önemli protein kaynaklarından biri olarak tüketilen sucul canlılarda özellikle de balıklarda bu ağır metallere etkilerinin belirlenmesi, insan sağlığı ve ekolojik dengenin korunması açısından, ayrı bir önem oluşturmaktadır [1].

Ağır metallere sucul canlılar tarafından çeşitli organ ve dokularda birikir ve belirli dozlara ulaştıktan sonra toksik etki gösterir. Canlı bünyelerinden kolayca atılmadıkları için canlılarda biriken ağır metallere besin zinciri yoluyla insana ve diğer canlılara ulaşır [8].

Ağır metallere tüm ekosistem açısından bir tehdit oluşturdıkları bilinmektedir. Çevreye sızan ağır metallere büyük bir kısmı atmosferden yayılarak, erozyonla taşınarak veya çeşitli insan aktiviteleri sonucu direkt olarak sucul ortama ulaşmaktadır [2]. Ağır metallere sucul canlılar üzerinde metabolik, fizyolojik ve davranışsal etkilerinin olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir [9-10, 11-12, 13].

Kan parametreleri, doku ve immün sistem üzerindeki ağır metallerin etkilerinin incelenmesi için insanlar ve diğer yüksek omurgalılar yerine balıkların iyi bir alternatif model olduğu öne sürülmektedir [14-15].

Su içerisinde bulunan balık kafesleri, petrol kulelerinin su içinde kalan kısımları, tekne ve gemi tabanları gibi yapılar zamanla bakteriler, diatomlar, algler, kaya midyesi, boru kurdu vb. gibi sucul organizmalar tarafından kaplanırlar, bu biofiling olarak bilinir. Bu da zamanla söz konusu yapının bozunmasına ve/veya görevini yapamamasına neden olur. Çinko piritiyon (21 numaralı ürün tipi) ve bakır piritiyon antifoling maddedir; canlılarda antibakteriyal ve antifungal etkiler için yaygın kullanılan bir biyosittir. Bu çalışmada, her iki çevresel kirleticinin (Zn/Cu piritiyon) sucul toksisitesi ve insanlar üzerine muhtemel olumsuz etkileri Zebra türü balıklarda toksik maruziyet konsantrasyonunda, genotoksik ve antioksidan sistem üzerine etkilerinin araştırılarak bilime, korunma ve tedavi yöntemlerine katkı sağlanması amaçlanmaktadır. Çevresel kirleticiler özellikle hedef olmayan canlılarda erken gelişme dönemlerini etkileyerek toksisite göstermektedir [16- 17,18].

Son zamanlarda yapılan birçok çalışma, çevrede bulunan kimyasal maddelerin endokrin sistemin normal fonksiyonlarını etkilediğini göstermiştir. Bu kimyasallar; insan üretimi sonucu da oluşabilir, doğal yolla oluşan bitkisel bileşikler de olabilir. Çevresel kimyasallara maruz kalan insan ve doğadaki canlılarda gerçekleşen endokrin süreçler, endokrin bozucu (EDC) etki gösterdiklerinden bu konuda yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Birkhoj ve ark. 2004 yılında yaptıkları epidemiyolojik araştırma sonuçlarına göre kimyasallara maruz kalındığında insan sağlığının etkilendiğini ve sperm kalitesinin düştüğünü belirtilmiştir. Çevresel kimyasallar su ve gıda yoluyla karışım halinde insana ulaştığından önemli risk oluşturarak çevresel sucul ortamda etkileşerek aditif, sinerjistik, antagonistik etkiler gösterebilmektedir [19].

Oksidatif stresin, çeşitli hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynadığının belirlenmesi, son yıllarda çevresel kirleticiler ile ilişkili olarak konuya verilen önemin giderek artmasına neden olmuştur. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi DNA'nın yapısında hasara yol açabilir. Artmış ROS, DNA'nın yanı sıra, lipid ve proteinler gibi makromoleküllerin oksidatif hasarını da hızlandırabilir. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG), DNA'da pürin artıklarının ROS ile indüklenen değişiklikleridir. 8-OHdG guaninin 8 hidroksilasyonu sonrası, spesifik enzimatik bölünmeyi takiben oluşan oksidatif DNA hasarının bir ürünüdür. 8-OHdG, oksidatif DNA hasarının ve oksidatif stresin gösterilmesinde önemli ve hassas bir belirleyicidir [20-21].

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Çevre Kirlenmesi ve Kirleticileri [22-23]

Çevre kirlenmesi, insanların faaliyetleri sonucunda ortamdaki doğal dengenin fiziksel, kimyasal ve biyolojik etkenlerle bozularak canlıların yaşama ortamlarının kısmen veya tamamen ortadan kalkmasıdır [24].

Doğada bulunan ya da olan hiçbir şey durağan değildir. Doğada düzenli olarak değişimler gerçekleşmektedir. Bu değişimlerin bazıları önceden tahmin edilebilen gelişmelerken bazıları da mevsimsel hava koşulları sonucu normal döngüsel olaylar dizisidir. Ama büyük çoğunluğu önceden tahmin edilemeyen olaylardır. Çevre kirlilikleri doğaya zarar vererek doğrudan veya dolaylı olarak doğada yaşamını sürdüren tüm canlıların zarar görmesine neden olmaktadır.

#### 2.1.1. Doğal çevre kirleticileri:

Çevre kirleticileri insan sağlığına, doğal ve yapay çevreye zarar vermektedir. Meydana gelen sel, deprem, savaş vb. olaylar sonucunda doğal çevre kirliliği oluşmaktadır.

#### 2.1.2. Yapay çevre kirleticileri

##### Sanayilerin atıkları sonucu oluşan kirlilik

Petrol rafineleri, otomobil fabrikaları, elektrik üretim santralleri, çimento fabrikaları, tekstil fabrikaları vb. yerlerde çok sayıda atık üretilir. Bu sanayilerde üretilen ve çevreye arıtılmadan ya da bilinçsizce boşatılan maddeler, sular, molozlar, kimyasal maddeler, gazlar vb. atıklar çevre ve kişi sağlığı açısından tehlike oluştururlar. Sanayisi gelişmiş ülkelerin yeryüzü kaynakları kontrolsüz harcanmaktadır. Bunun sonucunda ozon tabakası tahrip olmakta, asit yağmurları oluşmakta, sera etkileri, hava-kara ve deniz kirlilikleri gözlemlenmekte, ormanlar ve tarım alanları azalmaktadır. Bütün bu olaylar da yaşam alanını daraltmaktadır. Ozon tabakasında oluşan incelmeler cilt kanserleri için başlıca tehlike oluşturmaktadır. Petrol, kömür gibi fosil yakıtlar sera etkisinin oluşmasının temel nedenlerindedir.

Atmosferde ısının artması, buzullardaki erimeler nedeniyle deniz seviyesinin yükselmesi, karalardaki azalmalar, kuraklıklar ve sonucunda oluşan kıtlık, zamanla olabilecek tehlikelerden sayılabilir. İnşaatlerde ve evi içi yapılarda kullanılan malzemeler evdeki havayı kirletir ve sağlık açısından zararlar oluşturabilir. Özellikle asbest ve kurşun içerikli boyalar insan ve çevre sağlığı açısından tehlike oluşturmaktadır. Sanayi atıkları öncelikle havayı ve suyu kirletir böylece de toprak kirlenir. Kirlilik sonucu havada biriken kükürt dioksit, asit yağmurlarına dönüşür. Asit yağmurları da toprağın özelliğini bozar ve yetiştirilen bitkilerde fiziksel bozukluklar ve kirlilikler görülür. Ayrıca bitkilerin kirli sularla sulanması bitkileri olumsuz etkilerken kirli suları içen hayvanlar da olumsuz etkilenir.



Resim 2.1. Sanayi atıklarının çevreye ve canlılara zararları [24]



Resim 2.2. Sanayi atıklarının çevreye ve canlılara zararları [24]

### Kazalar sonucu oluşan kirlilik

Dünya Sağlık Örgütü'nün tanımına göre önceden planlanmayan, beklenmeyen anlarda ortaya çıkan yaralanmalarla, can ve mal kayıplarıyla sonuçlanan olaylara kaza denir. İstatistiklere göre kazaların çoğunluğu trafikte, evde ve iş yerlerinde görülmektedir. Kazaların önlenmesi için ne gibi tedbirlerin alınacağını bilmek hayati açıdan büyük bir önem taşımaktadır. Kazalar insanların bilgisiz, dikkatsiz ve ihmalkâr davranmaları ile kuralları çiğnemeleri sonucu meydana gelmektedir. Kara, deniz, hava ve demir yollarında olan kazalar çevre (hava, su, toprak) kirliliğine neden olurlar. Kazaların sonucunda çıkan yangınlar da ekosisteme zarar vermektedir. Kömür, petrol vb. fosil yakıtlar küresel ısınmaya sebep olurken güneş enerjisi, rüzgâr enerjisi, jeotermal enerji, hidrolik enerjisi, biyokütle enerjisi ve hidrojen enerjisi gibi yenilenebilir enerji kaynakları kullanılan santrallerde olan kazalar etkisi uzun süren ve çok geniş yayılma alanı olan çevre kirliliklerine neden olur ve

bu kirlilik bütün çevreyi ve canlıları etkiler. Örnek olarak, nükleer patlama sonucu oluşan radyasyon kirliliğini verebiliriz.



Resim 2.3. Nükleer santralin patlaması



Resim 2.4. Radyasyon kirliliği

### Savaşlar sonucu oluşan kirlilik

Birleşmiş milletlerin görüşüne göre günümüzde yaşadığımız çevre sorunlarının % 34'ü savaşlar ve silah harcamaları sonucunda meydana gelmektedir. Savaşlar yalnızca savaşın olduğu alanlara ve ülkelere etki etmez. Savaşlar; iklim değişikliklerine, küresel ısınmalara, ekosistemde bozulmalara, toprağın kirlenmesine, kimyasal ve radyoaktif kirliliklere, moloz gibi çöplerden oluşan kirliliklere, doğal hayatın dengesinin bozulmasına ya da yok olmasına, yeryüzü ve yeraltı sularının kirlenmesine, asit yağmurlarının oluşmasına, su-kanalizasyon sistemlerinde çökmelere neden olur. Doğa döngü içindedir ve bu döngünün herhangi bir evresine verilecek zarar diğer evreleri de etkiler. Buradan da anlaşılacağı gibi doğada her şey döngü içinde olduğundan, döngüdeki bir evrenin zarar görmesi diğer evrelerin de zarar görmesine neden olur [73].



Resim 2.5. Savaşların çevreye verdiği zararlar [73]

### 2.1.3. Çevredeki kirleticilerin yapay çevreye yaptığı etki

İnsanlar dünya üzerinde yaşamlarını sürdürmeye başladıkları günlerden beri doğayla iç içe yaşamaktadırlar ve kendi çevrelerini amaçlarına göre değiştirip yapay çevreyi oluştururlar. Günlük yaşamın sürdürüldüğü evler, iş yerleri, taşıtlar, kamuya açık alanlar yapay çevrelerdir. İnsanların yapay çevresinde oluşan kirlilikler insanları en çok etkilendiği kirliliklerdir.

### 2.1.4. Çevredeki kirleticilerin doğal çevreye yaptığı etki

Hava, su ve toprak çevredeki fiziksel unsurları; insanlar, hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalar da biyolojik unsurları oluştururlar. Teknolojinin gelişmesi hayatımızın kolaylaşmasını sağlar ama aynı zamanda da doğa ve çevre kirliliğini de gün geçtikçe artırır.

#### Kirleticilerin hava, su ve toprak üzerindeki etkisi

##### *Toprak üzerindeki etkisi*

Toprağın üzerinde ya da içinde bulunan katı, sıvı ve radyoaktif artık gibi kirleticiler tarafından toprağın fiziksel ve kimyasal özelliklerinin bozulmasına “toprak kirlenmesi” denir. Modern tarıma geçilmesi ve modern tarımın ilerlemesi ile sanayileşmenin artması sonucunda toprak kirliliği de çevre sorunu olarak ortaya çıkmaya başlamıştır. Önceleri kullanılan güç kaynakları ve enerji kaynaklarının yetersizliği, nüfustaki azlık, endüstrileşmenin gelişmemiş olması sebebiyle toprakta herhangi bir kirlenme söz konusu değildi. Nüfusta meydana gelen hızlı artış nedeniyle tarım, sanayi ve teknoloji hızla gelişmiştir ve dolayısıyla toprak kirliliği de artmaya başlamıştır. Toprak kirliliği her geçen gün daha da ciddi boyutlara ulaşmakta ve önemli çevre problemlerinden birisini teşkil etmektedir.





Resim 2.6. Toprak kirliliği [23]

Toprak kirliliği nedenleri;

- Yerleşim alanlarında ortaya çıkan atıklar, egzoz gazları, endüstri atıkları, tarımsal mücadele ilaçları, kimyasal ve suni gübreler,
- Ortaya çıkan çöplerin boşaltıldığı alanlar ile kanalizasyonun arıtılmadan direkt olarak toprağa verilmesi,
- Ozon, karbon monoksit, kükürt dioksit, kurşun, kadmiyum gibi zehirli maddeler,
- Sodyum, fosfor, potasyum, kalsiyum, magnezyum, demir, çinko, bakır, mangan, bor gibi besin maddelerini içeren suni gübrelerdir.

İnsanların ormanları tahrip etmesi, yakıp tarla yapması, tarım topraklarını hatalı işlemesi, meraların ve çayırların bilinçsiz kullanılması, aşırı otlatma gibi sebeplerden dolayı meydana gelen toprak erozyonu, ülkemizin hatta dünyanın birçok bölgesinin en önemli çevre sorunlarından birisidir. Kirleticilerin bazıları toprağın özelliğini bozar bazıları da verimini düşürür.

*Su üzerindeki etkisi*

İnsanların ve canlıların yaşamlarında hayati önem arz eden suyun kullanılabilir olması için tehlikeli kimyasal maddelerden ve bakterilerden arınmış olması gerekmektedir. İnsanların kullanması için doğal ve yapay kaynaklardan (dere, ırmak, göl, baraj) elde edilen su da belirli standartlara uymalıdır. Aksi halde standartlara uymayan sular tehlikeli sonuçlara sebep

olabilmektedir. Zamanla hayatımızda görülen teknolojik gelişmeler, nüfustaki artışlar gibi etmenlerden dolayı su kaynaklarımızı oluşturan dere, göl ve yeraltı sularında da aşırı kirlenmeler gözlemlenmektedir. Şehir, kasaba gibi yerleşim yerlerindeki atık sular ile fabrikalardan çıkan atık sular derelere-göllere bağlanmaktadır. Kullanılabilir sularla atık suların karışması sonucunda atık sulardaki organik bileşikler ve kimyasal maddeler temiz suda çözülmüş halde bulunan oksijenin miktarının azalmasına neden olur. Bundan dolayı suda yaşamını sürdüren hayvan ve bitkilerin ölüm oranlarında artış gözlemlenmektedir. Bunun gibi kirli suların rengi daha koyudur ve bu sular pis kokuludur. Günümüzde bazı dereler ve göllerdeki kirlenmeler sonucunda bu sulardaki canlıların yaşamları sona ermiş ve bu sularda bulunan atıklardan sonucunda adacıklar oluşmuştur [23].



Resim 2.7. Su kirliliği [23]

Doğada suyun döngüsü ile kullanılan sular, insanlar tarafından kullanılıp tekrar bu su döngüsüne karıştırılırlar. Oluşan bu döngü ile yeraltı ve yerüstü suları kirlenir dolayısıyla da fiziksel ve biyolojik özellikleri değişir. Bu özelliklerin değişmesi de kirlenmeyi hızlandırır.

#### *Hava üzerindeki etkisi*

Atmosferde duman, toz, gaz, koku ve saf olmayan su buharı şeklinde bulunan kirleticilerin, insanların ve canlıların sağlığını olumsuz yönde etkileyebilecek, ekosisteme zarar verebilecek veya maddi zararlar meydana getirebilecek miktarlara yükselmesi, “Hava Kirliliği” olarak nitelendirilmektedir. Üretim ve tüketim aktiviteleri gibi çeşitli faaliyetler gerçekleşirken oluşan atıklar havayı kirletir ve bu kirlilik de o çevrede yaşamını sürdüren canlıların hayatını olumsuz yönde etkiler.

Hava kirliliğini kaynaklarına göre inceleyelim:

- *Isınma kaynaklı:* Isınma amacıyla ülkemizde kullanılan yüksek kükürt oranlı ve kalorisi düşük kömürlerin kullanımının yaygın olması ayrıca yakma tekniklerinde yapılan yanlış uygulamalar da havanın kirlenmesine neden olmaktadır.
- *Motorlu taşıt kaynaklı:* Günümüzde hızla artan nüfusun ve insanların gelir düzeylerindeki yükselişlerin sonucunda motorlu taşıtlarda da artış olmuştur. Motorlu taşıtların artması çevreye salınan egzoz gazlarının artmasına dolayısıyla da hava kirliliğinde artışa neden olmaktadır.
- *Sanayi kaynaklı:* Yanlış yerlere kurulan sanayi tesisleri, kurulum sırasında çevrenin korunması için gerekli olduğu halde alınmayan tedbirler (bacalarda kullanılan filtreler, arıtma tesisleri vb.), uygun olmayan teknoloji kullanımı, enerji için kullanılan kükürt oranı yüksek ve kalitesiz yakıtlar havanın kirlenmesine sebep olmaktadır.



Resim 2.8. Hava kirliliği [23]

### 2.1.5. Çevresel kirleticilerin sağlık üzerindeki etkisi

Çevre sağlığı, canlıların yaşamlarını sürdürebilmek için içinde buldukları ortamlarda ihtiyaçları gereği etkileşime girdikleri her türlü faktörlerin istenmeyen etkilerinin engellenmesi amaçlı fikir ve faaliyetlerdir. Sağlık, bir canlının ruhen, bedenen ve sosyal olarak tam bir iyilik hali olarak tanımlanmıştır. Çevre sağlığı, toplumdaki sağlık düzeylerini

önemli ölçüde etkiler. Bu düzeylerin gelişmişliği değişik göstergeler ile ölçülmektedir. Örneklerle anlatacak olursak; hastanelerde bulunan yatakların başına düşen hasta sayıları, sağlık elemanlarına düşen kişi sayıları, hastalıkların ve ölümlerin oranları ve bunların nedenleri gösterge olarak kullanılır. En çok kullanılan göstergelerden birisi “bebek ölüm hızı” göstergesidir.

### Çevre ve sağlık ilişkisi

Kişilerin kendi sağlıklarını korumak ve geliştirmek için yaptıkları şeylerden mesul olmasının yanında çevreye karşı yaptığı olumsuz davranışlarda bulunması başkalarının sağlığını da tehlikeye düşürür. Başkalarına ve çevreye verilen zarar da yasal düzenlemeler ve yaptırım sorunları olarak karşımıza çıkar.

Canlılar döllenme evresinden itibaren çeşitli çevresel sorunlardan etkilenmektedirler. Bu etkileşim doğum ile ölüm arasında değişik boyutlarda karşımıza çıkmaktadır. Yaşanılan çevre hastalıkların nedeni de olabildiği gibi hastalıklara zemin de hazırlayabilir. Ayrıca hastalıkların yayılmasını kolaylaştırabilirken bazı hastalıkların da gidişatını ve sonuçlarını etkileyebilir. Doğrudan veya dolaylı olarak çevre sağlığını etkileyecek birçok etken bulunmaktadır [69].

Anayasa ile devlete herkesin yaşama hakkını sağlama görevi verilmiştir. İnsan Hakları Evrensel Bildirgesi 25. maddesinde; her insanın gerek kendisinin gerekse ailesinin sağlık ve huzurunu güvenceye alacak bir yaşam düzeyine sahip olma hakkından söz edilmektedir. Türkiye Cumhuriyeti, İnsan Hakları Evrensel Bildirgesi ve Dünya Sağlık Örgütü Anayasası'nı da imzalamıştır. Bu uluslararası anlaşmalar ve Türkiye Cumhuriyeti Anayasası'nın buyruklarına uyarak olabildiğince herkese eşit ve etkin sağlık hizmeti vermek amacı ile 1961 yılında 224 sayılı Sağlık Hizmetlerinin Sosyalleştirilmesi Hakkında Yasa çıkarılmıştır. 1961 Anayasası (Md. 49: Devlet herkesin beden ve ruh sağlığı içinde yaşayabilmesini ve tıbbi bakım görmesini sağlamakla yükümlüdür.) ile 1982 Anayasası (Madde 56: Herkes sağlıklı ve dengeli bir çevrede yaşama hakkına sahiptir.)'na göre çevreyi geliştirmek, çevre sağlığını korumak ve çevre kirlenmesini önlemek devletin ve vatandaşların görevidir [53-54].

Canlılar yaşadıkları çevreyle etkileşim hâlinindedirler. Sağlıklı yaşamın sürdürülebilmesi için sağlıklı çevreye ihtiyaç vardır. Çevrede meydana gelen bozulmalar ve ortaya çıkan sorunlar çoğunlukla insanlardan kaynaklanan sebeplerin oluşturduğu doğal dengelerdeki bozulmalarla başlar. Kişilerin yaşamları birçok denge üzerine kuruludur. Çevremiz ile oluşturduğumuz doğal dengemizin zincirindeki halkalardan birinin kopması ya da zarar görmesi bütün zincirin etkilenmesine, dengenin bozularak çevre sorunlarının oluşmasına sebep olur.

### Çevredeki kirleticilerin insan sağlığı üzerine etkisi

Çevredeki kirleticiler ve çevresel faktörler gün geçtikçe halk sağlığı açısından büyük önem kazanmaktadır. Bu da bize gösteriyorki yeni çevresel etkenler etkili olmaya başlamış ve diğer halk sağlığı sorunların kontrol altına alınmaya başlanmıştır. Çevrenin ögesini insan dışındaki diğer bütün etmenler oluşturur.

Çevre sağlığının, toplumların sağlık düzeylerini değişik ölçülerde etkilediğini görmüştük. Sebep sonuç ilişkisine bakarak sağlık hizmetlerini incelersek kirlenen çevrenin ve bozulan ekolojik dengenin toplum sağlığındaki sorunların temelini oluşturduğu görürüz. Buradan da anlaşıldığı üzere ekolojik dengenin ve sosyal çevrenin düzenlenebilmesi, korunabilmesi, geliştirilebilmesi bütün sağlık hizmetlerindeki iyileştirmelerde hayati öneme sahiptir. Sağlığın korunabilmesi için çevre için koruyucu uygulamalar yapılırken kişiler için de koruyucu hekimlik yöntemleri uygulanır. Kişilerin dirençlerinin artması için yeterli ve dengeli beslenmesi, aşılama yapılması, sağlık eğitiminin verilmesi, erken teşhis ve tedavi gibi yöntemler koruyucu hekimlik yöntemleri arasında yer alır.

### *İnsanların çevrelerinde karşılaştığı başlıca problemler şunlardır:*

- Hava, su ve topraklarda meydana gelen gün geçtikçe artan kirlilik oranları ve hava, su ve toprağın önem arz eden bir kısmının kullanılamayacak halde olması,
- Özellikle büyükşehirlerin ve sanayi bölgelerinin oluşan çevre kirlilikleri nedeniyle yaşanılmayacak halde olması,
- Ozon tabakasında meydana gelen delinme,
- Yerkürede meydana gelen ısı artışı,
- Kanseri ve benzeri hastalıklardaki artış,
- Doğal kaynaklarda meydana gelen hızlı tüketim.

## *Çevre sağlığı için koruyucu uygulamalar*

### *Hastalık etkenlerinin oluşumunu önlemek*

- Kanser yapıcı maddelerin kontrol altına alınması ve kullanılmasının önlenmesi,
- Olumsuz sonuçlar doğuracak fiziki etmenleri olabildiğince aza indirmek (radyasyon vb.),
- Sosyal çevrelerde oluşan olumsuz koşulları ortaya çıkarılması (AIDS, verem gibi) ve kontrol altına alınması.

### *Hastalıkların sebeplerini çevre sağlığı bakımından zararsız hale getirebilmek ve çevresel sağlık sakıncalarını en aza indirebilmek*

- Atıkların kontrolü için gerekli görülen her türlü tedbirlerin alınması,
- Kanalizasyon sistemleri bütün konut alanlarını kapsamalı, düzenli çalışmalı ve arıtma tesisleri ile sonlanmalıdır,
- Çöpler uygun biçimde toplanmalı, uygun alanlarda depolanmalı ve bertaraf edilmelidir,
- Endüstriyel atıklar için toplama arıtma tesislerinin kurulması gerekir.

### *Hastalıkların yayılmasını önleme*

- Kirli sular arıtılmalı (dezenfeksiyon),
- Besinler arıtılmalı (pastörizasyon),
- Hastalık taşıyıcı karasinek, sivrisinek gibi haşerelerle mücadele edilmeli,
- Hastalık aracı olan hayvanlar ile savaşılmalı (veba, kuduz vb.).

### *Sağlık yönünden risk altında olan kişilerin, grupların ya da kitlelerin eğitimi vb.*

- Birinci basamak olarak hızlı kentleşme ile birlikte artan kentli nüfusunun sağlık hizmeti taleplerini karşılayacak etkin bir model geliştirilerek etkin bir sağlık sistemi kurulması,
- Çevresel risk faktörlerinin azaltılabilmesi için sektörler arasında iş birliği programlarının geliştirilmesi,
- Yerel yönetimler tarafından çevre sağlığı hizmetlerinin yeterli olacak şekilde güçlendirilmesi,

Sağlık hizmetlerinin yürütülmesi sebep sonuç ilişkileri bakımından dikkate alındığında kirlenen çevre ve bozulan ekolojik denge şartlarının toplum sağlığı sorunlarının temelini oluşturduğu görülmektedir. Bu nedenler ile sosyal çevre ve ekolojik dengenin korunması, düzenlenmesi ve geliştirilmesi tüm sağlık hizmetlerinin iyileştirilmesinde büyük bir öneme sahiptir.

#### Çevredeki kirleticilerin besin kirliliğine etkisi

Doğrudan ya da dolaylı olarak (su ve toprağın kirlenmesine gibi) besinlerde meydana gelen kirlilik sağlığımız açısından önemli sorunlar oluşturmaktadır. Besinlerdeki fiziksel, kimyasal ve biyolojik kirlilik birçok etkenin canlı vücuduna girmesine neden olur. Besinlerde kurallara uygun olarak yapılmayan genetik değişiklikler, hormon ve antibiyotik uygulamaları istenmeyen sonuçlar doğurabilir. Bu durum, sebze ve meyvelerde ürün miktarını artırmada kullanılan hormonlar için de geçerlidir. Üreticilerin “azı yararlı olanın çoğunun daha çok yararlı olacağı” şeklindeki düşünceleri karşımıza büyük bir toplumsal tehlike olarak çıkabilir. Besin maddelerinin içerisinde bulunan kimyasalların birim miktarları için önerilen miktarları aşmamış olması sorunumuzu çözmeyecektir. Bu tür besin maddelerinden olduğundan fazla tüketmek tehlike sınırlarının aşılmasına neden olacaktır.

#### *Besinlerdeki kirlenmenin nedenleri*

Hava, su ve toprak kirliliği, tarım ilaçlarının kullanılıyor olması ve hatta bilinçsizce kullanımı, konserve ya da kurutma işlemleri gibi işlemler yapılırken ve sonrasında bu besinler saklanırken gerekli olan koşulların sağlanmamış olması sonucu yiyeceklerde oluşan bozulmalar besin kirlenmesinin nedenlerindedir. Artan nüfus nedeniyle ürünlerde de çeşitli çalışmalarla artış sağlanır. Ama bu çalışmalar besinlerin kirlenmesine de neden olmaktadır. Besinlerde meydana gelen bu kirlilik bitki çeşitliğinde azalmaya yani bitki türlerinin birçoğunun yok olmasına neden olur. Besin kirliliği sonucundan en çok etkilenenler ve en büyük zararı görenler insanlar ve hayvanlardır. Çünkü bu kirlenen besinlerin tüketimi ile vücuda alınan kirleticiler hastalıklara neden olabileceği gibi bu tüketim sonucunda ölümle de karşılaşılabilir.

Besin kirlenmesinin nedenleri:

- Radyoaktif kirlenmeler,
- Tarımsal ilaçlardan kaynaklı kirlenmeler,
- Saklanma,

- Biyolojik kirlenmeler,
- Taşınma sırasında meydana gelen kirlenmelerdir.

#### *Besin kirliliği için alınabilecek önlemler*

Tarımda zirai mücadeleler için kullanılan ilaçlar, bitkilerin üzerinde birikir ve besinlerle insanlara, hayvanlara geçer. DDT vücudun yağ dokusunda biriken ve vücutta zaman geçtikçe öldürücü olacak boyutlara ulaşabilen kimyasaldır. Nükleer kirlenmeler sonucu çevreye yayılan radyoaktif maddeler bitkilerin üzerine yerleşir ve yağmur suları ile de su kaynaklarına ulaşır. Ürünlerin artışında kullanılan gübreler de besinlerin kirlenmesine yol açar. Gübrelemeler sonucunda zehirli maddeler açığa çıkar ve bu maddeler besin zinciri ile kullanıldığı alanlardan da uzaklara yayılabilmektedir. Kirlenen besinlerin beslenmeyle vücuda girmesi ile mikroplar vücuda yayılır. Bunun sonucunda da besin-gıda zehirlenmeleri, kolera, dizanteri, sarılık gibi hastalıkları görülür.

Besin kirlenmesinde alınabilecek önlemler:

- Besinlerin iyice yıkanıp, temizlendikten sonra tüketilmesi,
- Besinlerin uzun süre bekletilmemesi,
- Ambalajlı satılan besinlerde TSE damgasının aranması,
- Ambalajlı satılan besinlerin son kullanım tarihlerine dikkat edilmesi ve son kullanım tarihi geçmiş olanların kesinlikle tüketilmemesi,
- Ürünlerin üretim sırasında hatalı gübrelenmemesi ve ilaçlanmaması,
- Nükleer sızıntılara veya patlamalara maruz kalmış besinlerin kesinlikle tüketilmemesi,
- Çevrenin kirlenmesi ile birlikte besinlerin kirlenmemesi için atıkların arıtılmadan sulara verilmemesi ve toprağa atılmamasıdır.

#### Çevre kirliliğinde alınabilecek önlemler

Çevredeki bütün canlılar çevrede bulunan diğer varlıklarla bir uyum içerisindeyler. Ormanlardaki bitkilerin, hayvanların ve mikroskobik canlıların uyum içinde yaşaması örnek verilebilir. Çevreyi oluşturan canlı halkalarından birinin zarar görmesi ya da yok olması diğer canlıların olumsuz etkilenmelerine yol açar. Bu da besin zincirinde bozulmalara neden olabilir. Örneğin; ormanların yok olması çevreyi çeşitli yönlerden etkiler. Bunların başında ormanda yaşayan canlı türlerinin yok olması gelirken, hava kirliliğinde artış, yağışlarda azalma, erozyonda artış gibi etkilerdir. Nüfusta meydana gelen hızlı artış, çevrenin de



doğanın da dengesini olumsuz yönde etkiler. Örneğin; artan nüfus nedeniyle insanlar tarım arazilerine yerleşmişler ve bu da yeşil alanlarımızın yok olmasına yol açmıştır. Sonuç olarak toprak, hava ve su kirliliği sonucunda birçok canlı türü yok olmaktadır.

#### *Erozyonun önlenmesi:*

Erozyon, dünyanın birçok yerinde olduğu gibi ülkemizin de en önemli çevre sorunlarından birisidir. Erozyonun olması toprak kaybını artırır. Toprakta su tutma kapasitesi ve verimi düşer, böylece çoraklaşma oluşur. Erozyon sonunda taşınan topraklar gölleri, barajları ve sulama kanallarını doldurur. Buraların temizlenmesi de ekonomik kayıplara neden olur.

Çeşitli nedenlerle yok olan bitki örtüsü erozyona sebep olur. Erozyonla verimli topraklar kaybedilir ve birçok canlı türünün geleceğinde tehlike altına girer. Yaşanılan alanların bozulmadan korunması canlıların hayatını devam ettirebilmesi için gereklidir.

#### *Doğal kaynakların düzenli ve geri dönüşümlü olarak kullanılması:*

Organik atıklar mikroorganizma faaliyetleri sonucunda toprağa karıştır ve ekolojik çevreye, döngüye katılırlar. İnsanların kullanması ile ortaya çıkan atık maddeler yeniden kullanılabilir hale getirilirler. Dünyada geri dönüşümlü kullanım uygulaması hızlı bir şekilde gelişmektedir. Hatta atık sular bile arıtma işleminden geçtikten sonra tekrardan kullanılabilir hale gelmektedir. Geri dönüşümü olmayan veya geri dönüştürülemeyen zararlı atıklar için gerekli önlemler alınmalıdır. Ekolojik dengenin korunması için yapılan bu işlemler çeşitli kesimlerce benimsenmeli ve özellikle de belediyeler tarafından uygulanmalıdır.

#### *Çevresel etki değerlendirmesi (ÇED):*

Gerçekleştirilmesi planlanan projelerin çevreye olabilecek olumlu ve olumsuz etkilerinin belirlenmesinde, olumsuz yöndeki etkilerin önlenmesi ya da çevreye zarar vermeyecek ölçüde en aza indirilmesi için alınacak önlemlerin, seçilen yer ile teknoloji alternatiflerinin belirlenerek değerlendirilmesinde ve projelerin uygulanmasının izlenmesi ve kontrolünde sürdürülecek çalışmalardır. Gerçekleştirilmesi planlanan projenin çevresel etki değerlendirmesinin yapılması için; başvuru, proje öncesi, proje aşaması ve proje sonrası çalışmaları kapsayan süreç olmalıdır.

Ekonomik ve sosyal gelişmelere engel olmaksızın çevre değerlerini ekonomik politikalar karşısında koruyarak, yeni proje ve gelişmelerin çevreye olabilecek sürekli veya geçici potansiyel etkilerinin sosyal sonuçlarını ve alternatif çözümlerini, ilgili tüm tarafların görüş,

kaygı ve önerilerini de dikkate alarak işletme öncesi, işletme sırası ve işletme sonrasını da içine alarak değerlendirilmesinin, izlenmesinin ve denetlenmesi ÇED'in amaçlarındandır. ÇED yaşam standartlarını yükseltmektedir.

### 2.1.6. Ağır metaller

Yaklaşık 60 yıldır “Ağır Metal” terimi farklı tanımlar yapılarak kullanılmaktadır. 1964 yılında  $7 \text{ g/cm}^3$ 'ten büyük element yoğunluğu olan, 1987 yılında yoğunluğu  $4 \text{ g/cm}^3$ 'ten büyük olan, 1992 yılında yoğunluğu  $5 \text{ g/cm}^3$ 'ten büyük olan ve metalik özellik gösteren, 1995 yılında ise yoğunluğu  $6 \text{ g/cm}^3$ 'ten fazla olan ve metalik özellik gösteren elementler ağır metal olarak sınıflandırılmıştır. Bazı bilim adamları da ağır metalleri atom ağırlıklarına, atomik numaralarına, diğer kimyasal özelliklerine ve toksik özelliklerine göre sınıflandırmışlardır. Bu yüzden ağır metallerle ilgili net bir tanım bulunmamakta ve hatta kimya üzerine yetkili kurumlardan olan ve periyodik cetvel sistemini elinde bulunduran Uluslararası Saf ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) raporlarında ağır metal ile ilgili bir bilgi bulunmamaktadır. Biyolojik açıdan ise “Ağır Metal” terimi genellikle metallerin ve metalloidlerin çevre üzerine muhtemel kontaminasyonu ve toksisite veya ekotoksisite açısından kullanılmaktadır [40].

Ağır metaller canlılarda yaşamsal süreçlere katılımlarına göre esansiyel elementler ve esansiyel olmayan elementler olmak üzere sınıflandırılmaktadır. Esansiyel elementler birçok enzim sisteminde kofaktör olarak bulunur ve canlılarda biyolojik süreçlerin içerisinde yapısal bir bileşen olarak yer alır. Örneğin; kobalt (Co), molibden (Mo), bakır (Cu), demir (Fe), nikel (Ni), mangan (Mn), çinko (Zn) bitkilerin gelişimi ve canlılık faaliyetleri için gerekli ağır metallerden olup esansiyel elementler olarak kabul edilirken baryum (Ba), kadmiyum (Cd), civa (Hg), antimon (Sb), kurşun (Pb) ve krom (Cr) gibi ağır metaller bitki ve canlı gelişimi için gerekli olmadığından esansiyel olmayan elementler olarak adlandırılırlar [41-42].

#### Ağır metal kirliliği ve çevreye etkileri

Çevre kirliliğine neden olan etmenlerden biri olan ağır metaller, Amerika Birleşik Devletleri (A.B.D.) Çevre Koruma Ajansının 2011 yılı için listelemiş olduğu 650 toksik ve kirletic kimyasalın bulunduğu listedeki 129 adet öncelikli çevre kirleticilerinin içerisinde yer alır.

Volkanik faaliyetler gibi antropolojik nedenler dışında insan faaliyetleri yüzünden ağır metaller her gün atmosfere, pedosfere ve hidrosfere yayılmaktadır. Çimento fabrikaları ve termik santrallerin bacalarından çıkan uçucu küller, ağır metal içerikli boya kullanımı, yollarda araçlar tarafından salınan benzin ve araçlara ait balata gibi plastik kökenli atıklar, çöp ve atık çamur yakma tesisleri, tarım ilaçları, gübre, kağıt ve pil vb. endüstri atık ve ürünlerinin gelişi güzel bir şekilde doğaya yayılımı ağır metal kirliliğinin temel nedenleri arasında yer alır. Temel endüstrilerden atılan ağır metal türleri genel olarak Çizelge 2.1’de gösterilmiştir [43-44,45].

Çizelge 2.1. Temel endüstrilerden çevreye atılan metal türleri

Endüstri	Metal Türleri				
	Cd	Cr	Cu	Pb	Hg
Organik Kimya Sanayii	X	X	-	X	X
İnorganik Kimya Sanayii	X	X	X	X	X
Lastik İmalat Sanayii	-	X	-	X	-
Kağıt Endüstrisi	-	X	X	X	X
Makine Endüstrisi	X	X	X	X	X
Boya Endüstrisi	X	X	X	X	X
Dokuma Sanayii	-	X	X	-	-
Demir-Çelik Sanayii	X	X	X	X	X
Enerji Üretimi (Termik)	X	X	X	X	X
Çimento Sanayii	X	X	X	X	-
Deri Sanayii	-	X	-	-	-
Petrokimya	X	X	-	X	X
Gübre Sanayii	X	X	X	X	X
Klor-Alkali Üretimi	X	X	-	X	X

Fabrika ve tesis bacalarından saçılan ağır metal içerikli partiküllerin tarım arazilerine inmesi, burada yağmurlar veya sulama aracılığıyla toprak içerisinde çözülmesi ya da endüstriyel atık suların karıştığı sularla tarım arazilerinin sulanması burada yetişen bitkilerde çeşitli hastalıklara yol açarak ürün kayıplarına neden olmakta ve tarım ekonomisine zarar

vermektedir. Ayrıca, ağır metaller ile kontamine olmuş bu alanlarda gelişen bitkiler yüksek konsantrasyonlarda ağır metali bünyesinde biriktirebilir ve besin zinciri yoluyla hayvan ve insanlara ulaşarak sağlığa zarar verebilirler [55-56,57].

### Bakır ile ilgili genel bilgiler

İnsanlar tarafından eski çağlardan beri çeşitli amaçlarla kullanılan ve günümüzde de sanayinin temel girdileri arasında yer alan önemli metallere birisidir, bakır. Endüstride bakır önemli rol oynamakta ve çeşitli alanlarda kullanılabilir. Bunun da nedeni, bakırın çok çeşitli özelliklere sahip olmasıdır. En önemli özellikleri arasında da elektrik ve ısı iletkenliğinin yüksek olması, aşınmaya karşı dirençli olması, dövülebilirlik özelliğinin varlığı ve antikorozyon özelliklerinin olması sayılabilir. Ayrıca bakırın alaşımlarının çok çeşitli olması endüstride değişik amaçlı kullanılmasını sağlamaktadır.

Günümüzde bakırın tüketimi 13 milyon tonun üzerine çıkmıştır ve böylece bakır en çok kullanılan ikinci metal durumuna gelmiştir. Elektrik ve ısı iletkenliklerinin yüksek olması özellikleri bakır, elektrik santralleri ve iletken malzemenin vazgeçilmez girdisi haline getirmektedir. Soğuk hava makine ve teçhizatında, paslanmaz özelliğinden dolayı nakliyelerde kullanılan araç-gereçlerde ve dış kaplamalarda bakırın büyük kullanım alanları bulunmaktadır. Ayrıca bunlara ilave olarak bakırın kaynak işlerinde, metalürjide ve bronz üretiminde de önemli bir yeri vardır.

Bakır; sembolü Cu, atom ağırlığı 63.546 g/mol, atom numarası 29 olan, kırmızımsı bir renge sahip bir geçiş grubu elementidir. Bileşiklerinde +1 veya +2 değerlikli olarak bulunabilir. Yoğunluğu: 8.93 g/cm<sup>3</sup>'dür. Erime noktası 1083 °C iken, kaynama noktası da 2300 °C'dir. Bakır doğada genellikle sülfürlü, oksitli ve kompleks halde bulunur. Yeryüzündeki suların neredeyse tamamı bir miktar bakır içermektedir ve bakır yer kabuğunun % 0.006'sını oluşturmaktadır. Genel olarak toprakta 2-100 Rg, suda ise 1,4-10,0 Rg/l aralığında bulunur [58].



Resim 2.9. Bakır elementi [58]

Bakırın Kullanım Alanları:

- Elektrik sanayileri ve elektronik sanayiler,
- İnşaat sanayileri,
- Ulaşım sanayileri,
- Endüstriyel ekipmanlar,
- Askeri alanlarla diğer sanayi kolları vb.

Yaşayan bütün sistemlerin yaşamsal faaliyetleri için gerekli bir element olan bakır, bu gereklilikten dolayı vücutta demir ve çinkodan sonra en fazla bulunan iz elementtir. Bakır omurgalılarda demir transportu, oksidatif enzim aktivitesi ve hemoglobin sentezi gibi birçok biyolojik olayda görevlidir [59]. Ayrıca immün sistem, sinir sistemi, iskelet sisteminin yapısı ve fonksiyonları için, normal hücrel homeostazisin ve sağlığın devamı için gerekli olan metal içeren enzimlerin ve proteinlerin kofaktörü olarak, biyokimyasal fonksiyonlar ve temel fizyolojik fonksiyonlar için gereklidir. Bakır içeren en önemli enzimler sitokrom c-oksidad, süperoksit dismutaz ve seruloplazmindir.

Normal olarak bakır kanda seruloplazmine ve çok az miktarda da albümine bağlanır. Vücutta en çok bakır içeren dokular karaciğer, kalp, beyin ve böbrektir. Kas ve kemik vücuttaki toplam bakırın %50'sini içerirler. Bakır biyolojik sistemlerde 1 ve 2 değerlikli olmak üzere iki farklı biçimde bulunabilir.

Dokulardaki bakırın çok düşük konsantrasyonları anemiye yol açarken, çok yüksek konsantrasyonları karaciğer hasarına yol açmaktadır. Memelilerde bakırın yüksek konsantrasyonuna maruz bırakılan bireylerde magnezyum yetersizliği sendromları görüldüğü bildirilmiştir ve magnezyum hemoglobin sentezini stimule etmektedir [60].

Bakır bileşikleri uzun yıllardır balık hastalıklarını önlemede profilaktik amaçlı olarak ve balık parazitleri ile mücadelede kullanılmasının yanı sıra havuzlarda alg gelişimini önlemek amacıyla da kullanılmaktadır [61-62]. Ayrıca bakır sülfat bileşiği bir pestisit olarak değerlendirilmektedir [63].

### Çinko ile ilgili genel bilgiler

Çinko ilk olarak M.Ö. 2000 yıllarında Çinliler ve Romalılar tarafından alaşım materyali olarak, pirinç yapımında kullanılmıştır. Çinko metali ile ilgili ilk bilimsel çalışmaları Paracelsus (1490-1541) yapmıştır. Günümüzde çinko; alüminyum, bakır ve çelikten sonra dünyada yıllık kullanımı miktar olarak en fazla olan metaldir. Çinko kimyasal yönden aktif bir metaldir ve diğer metallerle kolayca alaşım yapabilir Bu nedenle de çinko, endüstride birçok alaşımın ve bileşiğin üretiminde kullanılmaktadır. Kuvvetli elektropozitif özelliği bulunan çinko bu özelliğinden dolayı diğer metaller özellikle demir-çelik ürünleri için aşınma karşıtı korunmada kullanılmaktadır.

Çinko; sembolü Zn, atom ağırlığı 65.39 g/mol ve atom numarası 30 olan gümüş renkli bir metaldir. Elementlerin periyodik cetvelindeki geçiş elementleri grubunda bulunur. Yerkabuğunda en çok bulunan elementler arasında 23. sırada yer alır. Çinko, bileşiklerinde +2 değerlikli olarak bulunur. Oluşturduğu bileşiklerle genelde iyonik bağ yapar ve toz halde çok etkili bir indirgeyicidir. Yoğunluğu 7.14 g/cm<sup>3</sup>, erime sıcaklığı 419,47 °C, kaynama sıcaklığı ise 906 °C'dir. Dökülmüş hali kırılgan ve serttir. Elektrokimyasal potansiyel dizisinde demirden daha negatif değerdedir. Bu nedenle de çinko anot olarak katodik korozyon korumada önemli bir kullanım alanı bulur. Bu tür uygulamalardan birisi de galvanizlemedir.



Resim 2.10. Çinko elementi [66]

Çinko mineralleri genel olarak altı grup altında sınıflandırılmaktadır. Sülfürler, sülfatlar, karbonatlar, silikatlar, oksitler ve diğer mineraller.

Çinkonun başlıca kullanıldığı alanlar şunlardır:

- Korozyondan korunması amacıyla, çelik gibi diğer metallerin galvanize edilmesinde,
- Pirinç, nikelli gümüş, alman gümüşü, değişik lehimler gibi alaşımların yapımında,
- Genellikle otomotiv sanayilerinde kullanılan döküm kalıplarında,
- Pillerin gövdelerinin yapımında kullanılırken,
- Çinko oksit, sulu boyalarda beyaz pigment olarak ve lastik sanayinde de aktivatör olarak kullanılır. Reçetesiz satılabilen bazı merhemlerin bileşiminde bulunur ve ince bir tabaka halinde uygulandığında cildin su kaybetmesini önler. Yazın güneş, kışın da soğuk yanıklarına karşı koruyucudur. Bebeklerin bez bağlanan bölgelerinde çok az miktarda kullanılması ciltte meydana gelebilecek kızarıklıkları önleyebilir. Yaşa bağlı olarak meydana gelen göz hastalıklarının tedavisinde de kullanılır.
- Çinko klorür ( $ZnCl_2$ ) ise yara merhemlerinde, deodorantlarda ve ahşap koruyucularda kullanılır [64].

Canlı hücrelerinin proliferasyonları, replikasyonları ve farklılaşmaları için aminoasitlere, glukozaya, yağ asitlerine, vitaminlere ve minerallere ihtiyaç vardır. Çinko, organizma için esansiyel bir mineraldir ve birçok metaloenzimin hem yapısına girer hem de bu enzimlerin fonksiyonlarını düzenler [65]. İntraselüler bir düzenleyici olduğu için moleküler etkileşimlerde proteinlere yapısal destek sağlar.

Çinko, biyolojik membranlar ile iyon kanallarının stabiliteğini ve bütünlüklerini korur. Nükleik asitlerin veya diğer gen düzenleyici proteinlerin yapısında yapısal element olarak rol oynar. Redoks aktivitesi yoktur ve bu nedenle de bağlandığı proteini dayanıklı hale getirir.

Hem sentezinde, karbonhidrat, protein, lipid, nükleik asit sentezlerinde, gen ekspresyonunda, üreme ve embriyogenezde de görevleri vardır. Ayrıca çinkonun serbest radikal oluşumu ve oksidatif strese koruyucu rolü vardır. Oksidatif hasarın neden olduğu kütanöz ve romatolojik inflamatuvar hastalıklarda, alkolizm, karaciğer sirozu ve kardiyovasküler hastalıkların patogeneğinde de rol alır. Diğer taraftan yara iyileşmelerinde de fazlasıyla önemli role sahiptir. Bağı dokusunun biyosentezi ve integrasyonu için de çinko gereklidir. Bu nedendir ki yapılan cerrahi operasyonların sonrasında yeterli oranda çinkonun alınması büyük önem taşımaktadır [66].

Organizmada demirden sonra en çok bulunan eser element çinkodur. 70 kg ağırlığındaki bir insan vücudunda yaklaşık olarak 1,4-2,5 g çinko bulunur. Çinko kanda, çoğunlukla albümin (% 60-70) ve Z<sub>2</sub>-makroglobülin (% 30-40) ile taşınırken daha düşük oranlarda da transferin ve serbest aminoasitlerle de taşınmaktadır. Bağırsaklardan emilen çinko, transferrine bağlanarak karaciğere taşınır. Çinkonun vücuttaki en hızlı birikimi ve dönüşümü karaciğer, dalak ve böbrekte gerçekleşir. Eritrositlerdeki çinko başlıca karbonik anhidraz ve diğer bazı enzimlerin yapısında bulunur. Serumdaki çinko konsantrasyonu, plazmadakinden yaklaşık olarak % 16 daha fazladır. Aradaki bu fark; pıhtılaşma sırasında trombositlerin parçalanmasına, plazma dilüsyonunun hafifçe yüksek olmasına ve hemolize bağlıdır [67]. Pasif difüzyon ile biyolojik membranlardan geçemeyen çinkonun hücreye alınması veya hücreden dolaşıma geçmesi için özel taşıyıcı sistemler gerekmektedir [68].



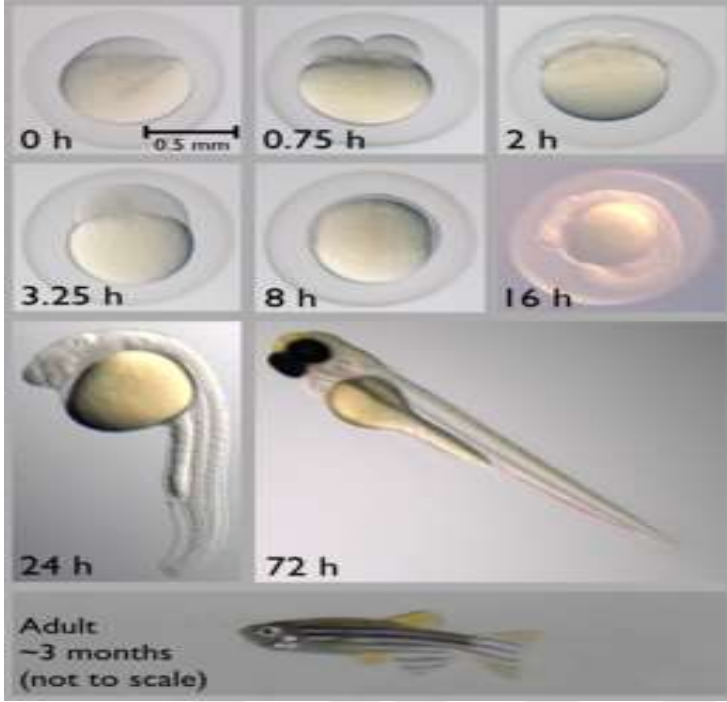
### 2.1.7. Zebra balığı (Danio Rerio)

Kolay üreme kapasitelerine ve şeffaf embriyolara sahip olan Zebra balıkları (*Danio rerio*), bu özelliklerinden dolayı bilimsel çalışmalarda çok sık tercih edilen bir omurgalı modelidir.



Resim 2.11. Zebra balıkları [70]

Zebra balığı cyprinidae familyasına aittir ve tropikal balıklardır. Bu balıkların doğal yaşama ortamları Hindistan, Bangladeş, Pakistan ve Güneydoğu Himalayalardır. Genelde temiz, durgun ve bol oksijenli sularda yaşarlar. Zebra balıklarının gövdelerinde 7-9 adet mavi ve gümüş renkli çizgiler yer alır. Su sıcaklığı açısından geniş bir yelpazede yaşayabilen Zebra balıkları 18-30 °C aralığındaki sularda bir sorun yaşamadan hayatlarını sürdürebilmektedirler. Üremeleri oldukça kolay olan Zebra balıklarının üreme için ideal sıcaklığı 26-28 °C'dir [70-71,72].



Resim 2.12. Zebra balığının gelişim evreleri [2]

Bu balıklarda embriyo gelişimi; zigot, segmentasyon (yarıklanma), blastula, gastrula, faringula (geçiş evresi) ile kuluçka ve larval evreler olmak üzere 7 evredir. Polilesital tipteki zebra balıklarının yumurtasının döllenmesinden sonra 45. dakikaya kadar olan evreye zigot evresi denir. Zigotta meydana gelen ilk bölünmeler 45. dakika itibariyle gerçekleşir. Bölünme gerçekleştikten sonra blastomerler her 15 dakikada bir bölünürler. Yani fertilizasyondan 1 saat sonra 4 blastomer meydana gelir. Bölünmeler meroblastik tiptedir [2].

Blastula, blastodiskinin top gibi küre şeklinde görüldüğü aşamada embriyoya verilen isimdir. Bu aşama, embriyonun 128 blastomerli aşaması ya da diğer bir deyişle 8. zigotik hücre döngüsünün gerçekleştiği aşamadır. Blastula evresi gastrula başlangıcına kadar devam eder. Gastrula aşaması, döllenme olduktan sonra 5. ve 24. saatler arasında gerçekleşen aşamadır. Gastrula aşamasında epiboli şeklinde gastrulasyon gözlenir. İnvölüsyon, gastrulasyon evresinin başlangıcı olarak kabul edilir. Gastrulasyon evresinde gerçekleşen en önemli olaylar kuyruk tomurcuğu ve germ halkasının oluşmasıdır. Bu evrede baş bölgesi belirginleşir ve vitellus küçülmeye başlar. Gastrulasyon evresi sonunda somitlerin oluşumu tamamlanır. Döllenmenin oluşmasından sonraki 24. ve 48. saatler arasındaki evre faringula evresidir. Faringula evresinde yüzgeçler şekillenmeye başlar, pigment hücreleri farklılaşır

ve beyin taslağı oluşur. Ayrıca dolaşım sistemi de bu evrede oluşur ve kalp atmaya başlar. Zebra balıklarında kuluçka evresi 48. saatten itibaren başlar. Gelişimi tamamlanan embriyoda vitellus kesesi küçülür [2].



Resim 2.13. a) Döllenenmemiş zebra balığı yumurtası[2] b) Döllenen zebra balığı yumurtası



Resim 2.14. a) Kontrol grubu, dekoryonize edilmemiş 1 günlük zebra balığı embriyosu; b:baş bölgesi s:somitler, k:kuyruk, ko:koryon, v:vitellüs b) 2 günlük zebra balığı embriyosu c) 6 günlük prelarva [2]

Zebra balıklarının embriyoları 3. günden itibaren koryondan çıktığı evre larval evre olarak adlandırılır. Bu balıklar, gelişiminin 3. ayında ergin döneme ulaşmış olurlar.

Son zamanlarda *Danio rerio* (Zebra balığı) yumurtaları ve embriyoları ekotoksikoloji çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Zebra balıkları, dayanıklı türlerdir ve kolay bulunabilirler. Laboratuvar ortamında kolay beslenebildikleri ve çoğalabildikleri, yüksek fekondite gösterebildikleri (ergin dişiler haftalık aralıklarla yüzlerce yumurta bırakır), dış döllenmeyle üreyebildikleri için ayrıca yumurta ve embriyolarının saydam olması, yumurta ve larva gelişiminin kolay izlenebilmesi, jenerasyon zamanının kısa olması ve toksik ajanlara embriyolarının duyarlı oluşu bakımından toksikoloji çalışmalarında oldukça sık başvurulan bir test organizması haline gelmişlerdir [8-9]. Diğer taraftan son yıllarda Zebra balıkları insan ve diğer omurgalıların hastalıklarının araştırılmasında mükemmel bir model organizma olarak kullanılmaktadır. Model organizma olabilme nedenleri, insan ve diğer

omurgalıların Zebra balıkları ile genom yapılarının benzer olması, metabolizmalarının ve embriyonik gelişmelerinin neredeyse aynı olmasıdır ama en önemli nedeni ise insanlarda bulunan tümör baskılayıcı genin (sitokrom P450 grubu) Zebra balıklarında da keşfedilmiş olmasıdır.

### **2.1.8. Endokrin bozucu kimyasallar**

Endokrin bozucu kimyasallar (EDCs), endokrin sistem ve endokrin sistemle ilişkili tüm sistemlerin çalışmasını etkileyen kimyasal maddelerdir. Sağlıklı organizmalarda veya onların gelecekteki nesillerinde endokrin sistemine dahil olarak ve organizmanın çalışmasını değiştirerek endokrin sistemin fonksiyonunu bozan, sinir, gelişim, immün ve üreme sistemleri üzerine olumsuz etkilere sebep olup sağlık sorunlarına neden olan dışarıdan alınan madde veya madde karışımlarıdır. Bunlar deterjanlar, plastikler, pestisitler, boyalar ve mesleki maruziyeti yüksek endüstriyel kimyasallarda bulunurlar.

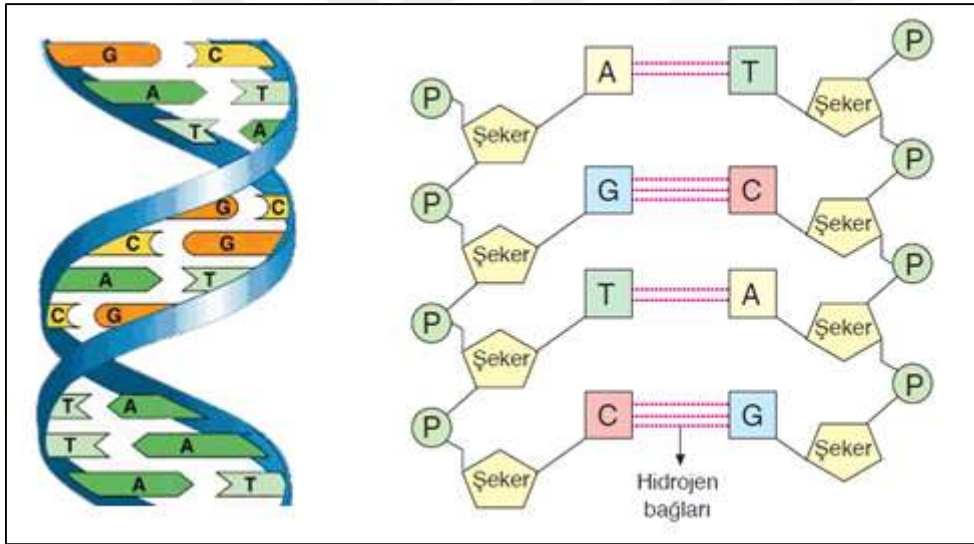
Endokrin bozucu bileşikler, doğal hormonlar ve yapay endokrin bozucular olarak 2 başlık altında incelenebilirler. Doğal endokrin bozucular, yarı ömürleri kısa oldukları ve organizmadan kolayca atılabildikleri için genellikle önemli yan etkilere sahip olmayan bileşiklerdir. Doğal endokrin bozuculara fitoöstrojenleri örnek verilebiliriz. Yapay endokrin bozucular da tarım ve endüstride fazlasıyla kullanılan bileşiklerdir. Bunlara örnek olarak dietilstilbesterol (DES), bisfenol A (2,2-bis(4-hidroksifenil) propan) (BPA), oktilfenol, fitalatlar, dioksin ve dioksin benzeri bileşikler, poliklorine bifeniller, DDT ve bazı pestisitleri verebiliriz. Bu kimyasallar endüstriyel ve evsel atıklarla sucul ortama katılırlar [3,4].

Endokrin bozucular, her zaman aynı etkiyi göstermeyebilirler. Bu kimyasallar, çevrede veya vücutta birikebilir. Bazıları üreme sistemini etkilerken, bazıları ergenlik döneminde gelişim bozukluklarına neden olur. Örneğin düşük doz ile östrojen reseptörlerine bağlanarak etki gösteren bir bozucu, yüksek doz ile androjen reseptörlerine bağlanarak antiandrojenik etki gösterebilir [5]. Endokrin bozucuların etkileri, endokrin bozucu ile karşılaşma sürelerine, miktarlarına, tek veya karışım maddeler ile karşılaşma durumlarına göre değişebilmektedir. Gebelik, çocukluk ve ergenlik dönemleri bu açıdan en hassas dönemlerdir. Gebelikte karşılaşılan endokrin sistemin işlevini bozan çeşitli kimyasal maddeler; fetüsün endokrin sistemini etkileyerek çok sayıda gelişme bozukluğuna sebep olmaktadır. Bu kimyasal maddelerin çoğunluğu plasentada etkisiz hale getirilemezler. Vücutta bulunan kimyasal

maddelerin miktarı ne kadar fazla olursa ortaya çıkan gelişim bozukluğunun derecesi de o kadar ağır olmaktadır [6].

### 2.1.9. DNA ve yapısı

Çift sarmallı bir molekül olan DNA polideoksiribonükleotiddir. Bu yapıda birbirlerine, kovalent olarak 3'-5' fosfodiester bağı ile bağlanmış birçok monodeoksiribonükleotid bulunur. Her bir DNA nükleotidinde bir pentoz şeker, bir fosfat grubu ve azot içeren bir baz bulunmaktadır. DNA zincirinin ana çatısını deoksiriboz-fosfat iskeleti oluşturur. Bazlar pürin (A,G) veya pirimidin (C,T) gruplarından oluşur. 2 polinükleotid zincire ait birbirinin tamamlayıcısı karşılıklı bazlar arasında meydana gelen hidrojen bağları sayesinde DNA'nın ikili zincir yapısı oluşur (Şekil 3.1) [46, 47].



Resim 2.15. DNA'nın yapısı [46]

#### Oluşan DNA Hasarlarının Gruplandırılması

1. Baz modifikasyonları (Pürin, pirimidin bazları)
2. Şeker gruplarında modifikasyonlar
3. DNA- protein arasında çapraz bağların (cross-linkler) kurulması
4. DNA zincir kırıkları

### DNA Hasarı Tamiri

DNA tamiri, genomun bütünlüğünü korumaya yönelik olarak düzenlenmiş bir savunma sistemidir [48].

DNA'da oluşan oksidatif hasar sonucu bazlarda oluşan küçük kimyasal değişimlerin tamirinden başlıca sorumlu arayol, baz eksizyon onarım yoludur (BER-base excision repair pathway) [84]. Hasarlı bazı tanıyıp uzaklaştıran DNA glikozilaz enzimidir. Bazlara spesifik birçok glikozilaz türü tanımlanmıştır. Pek çok DNA oksidatif DNA lezyonu arasında 8-oxoG, ROS tarafından en çok oluşturulan okside bazdır; 8-oxoG, DNA glikozilaz BER arayolunu harekete geçiren en önemli enzimdir. Bir diğer tamir arayolu da nükleotid eksizyon onarım yoludur (NER- nucleotide excision repair pathway) ve bazı okside DNA bazların tamirinde başvurulan bir tamir mekanizmasıdır [49,50].

#### **2.1.10. Histolojinin avantajları**

Her ne kadar biyokimyasal, fizyolojik ve histolojik özelliklerin birlikte değerlendirilmesi daha uygunsa da histopatolojik bulgular ani değişimler olmadığı için daha gerçek sonuçları yansıtmaktadır [51].

Histoloji özellikle kronik çalışmalarda değişik doku ve organlarda etkinin araştırılmasında en hızlı metottur. Histopatolojik hızlı bir şekilde hasarın olduğu birçok bölgeden örnek almaya olanak tanımaktadır [51].

Histoloji saha çalışmalarında da en uygun metot olarak karşımıza çıkmaktadır. Doğada kolay yakalanamayan ya da yetiştiriciliği yapılamayan türlerde yapılan çalışmalarda canlılığın ölüm sonrası incelenmesinden dolayı histolojik analiz biyokimyasal analize göre daha avantajlıdır. Diğer yöntemlerin aksine, örneklerin histolojik olarak hemen incelenmesi gerekmemektedir. Uygun saklama yöntemi (balıklarda Bouin fiksatif ve % 10'luk nötral formalin önerilmektedir) kullanılarak inceleme daha sonra gerçekleştirip tüm organ sistemleri değerlendirebilmektedir [52].

Biyokimyasal olarak değerlendirilemeyecek kadar küçük olan örneklerde dahi histoloji kolaylıkla kullanılabilir. Yumurta ve larvaların gözlenmesinde de önemlidir [51].

Türün normal histolojik yapısı önceden bilinmiyorsa, histopatolojik deneylerde hata olabilmektedir [51]. Histopatolojik çalışmanın gerçekleştirilmesinde canlı örneğin öldürülmesi gerekmektedir [52].

### **2.1.11. SPSS programı nedir ve ne işe yarar? [29]**

#### SPSS Programı Nedir?

SPSS, İngilizce açılımı Statistical Package for the Social Sciences (Sosyal Bilimler İçin İstatistik Programı) olan genellikle Sosyal Bilimcilerin kullandığı istatistik programıdır. Sosyal Bilimler haricinde Eğitim Bilimleri, Sağlık Bilimleri ve Fen Bilimleri alanlarında da kullanılır. Ayrıca kurum ve kuruluşlar tarafından Pazar araştırması yapmak amacıyla da sıklıkla kullanılan bir bilgisayar programıdır. Program Windows ve Mac bilgisayarlarda çalışır ve Microsoft Excel programına benzemektedir.

#### Spss Programı Ne İşe Yarar?

SPSS programında anket analizleri, sağlık bilimleri ve fen bilimleri alanlarında elde edilen bazı ölçümler analiz edilmektedir. Verilerin sayısal dağılımının (adet bazında) belirlenmesinde frekans analizi kullanılır. Elde edilen verilere ilişkin ortalama, standart sapma, mod, medyan gibi değerlerin hesaplanmasında ise tanımlayıcı istatistiklerden yararlanır. Frekans analizi ile tanımlayıcı istatistikler temel analizler olup kolaylıkla yapılabilmektedir. Karşılaştırma ya da ilişki analizleri parametrik ve non parametrik adında iki grup altında toplanır. Parametrik ya da non parametrik analizlerin kullanım kullanılmayacağı belirli kriterlere bağlıdır. Bu kriterlerin başında verilerin normal dağılıma uygun olup olmaması ve homojen olup olmaması gelmektedir. Normal dağılım ve homojenlik kavramları istatistiksel bilgi gerektirmektedir. Kısacası normal dağılım/homojenlik, veri setimizdeki verilerin birbirlerine ne kadar yakın ya da uzak olduğunu, bir başka deyişle ne kadar dağınık olduğunu ifade eder. Frekans ve tanımlayıcı istatistiklerle kıyaslandığında, parametrik testler olan Independent t test (Bağımsız Örneklem t test), One Way ANOVA (Tek Yönlü Varyans Analizi) ve bunların non parametrik karşılığı olan Mann Whitney U testi ile Kruskal Wallis H testi ise kısmen de olsa uzmanlık gerektirmektedir. Bu analizler 2 ve ya daha fazla gruba ait olan ortalamaların/sıra ortalamalarının karşılaştırılması için kullanılır. Karşılaştırma analizlerine ek olarak

regresyon ve korelasyon gibi ilişki analizleri de SPSS programında yapılabilmektedir. Regresyon analizleri sadece normal dağılım gösteren verilere uygulanırken, korelasyon analizi hem normal dağılım gösteren hem de normal dağılım göstermeyen verilere uygulanabilmektedir.

#### Dikkat Edilmesi Gereken Önemli Hususlar

SPSS analizleri yapılırken en büyük hata geleneksel yaklaşımlar kullanmaktır. Analizlerde önemli olan kimin ne şekilde analiz yaptığı değil, kriterlerin sağlanıp sağlanmadığıdır. SPSS programında hangi analizlerin yapılacağı çalışmaya (anket uygulaması, laboratuvar ya da saha testleri) başlamadan önce planlanmalı ve çalışma sırasında bu doğrultuda hareket edilmelidir. Çalışma sonrasında hangi analizlerin yapılacağını kararlaştırmaya çalışmak oldukça riskli bir durumdur ve yapılan bütün ölçümlerin boşa gitmesine neden olabilir. Bu nedenle SPSS ya da bir başka analiz programı kullanılacaksa çalışmaya başlamadan önce bir uzmana danışılması araştırmacının yararına olacaktır.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Zebra Balığı (*Danio Rerio*)

Zebra balıkları, gelişim biyolojisi çalışmalarında kullanılan önemli bir omurgalı modelidir ve zebra balığı ile yapılan çalışmaların pek çok avantajı vardır. Bu organizmaların laboratuvar ortamında üretilmesi ve üretimlerinin devam ettirilmesi kolaydır ve bize dikkate değer deneysel avantajlar sağlar. Bu organizmaların üretimi de ucuzdur. Bir zebra balığı 50 ila 200 arasında yumurta bırakabilir. Döllenme olduktan sonra embriyo hızlı bir şekilde gelişir. Embriyolar şeffaf oldukları için de gelişimlerinin her aşamasını mikroskop altında görmek mümkündür. Ayrıca insanlar ile pek çok ortak gene sahip olan zebra balıklarının erginleşme süreleri de diğer omurgalılara göre oldukça kısadır. Yumurtalar elverişli ortam şartları altında 3 ayda cinsel olgunluğa erişirler [14].

Üzerinde çalışılması zor olan türler hakkında (insan da dahil) biyolojik olayların araştırılması ve bilgi edinilmesi için model organizmalar kullanılır. Bu yüzden çalışmada model organizma olarak zebra balığı seçilmiştir. Çalışmada 3-4,5 cm boylarındaki erkek ve dişi zebra balıkları kullanılmıştır.

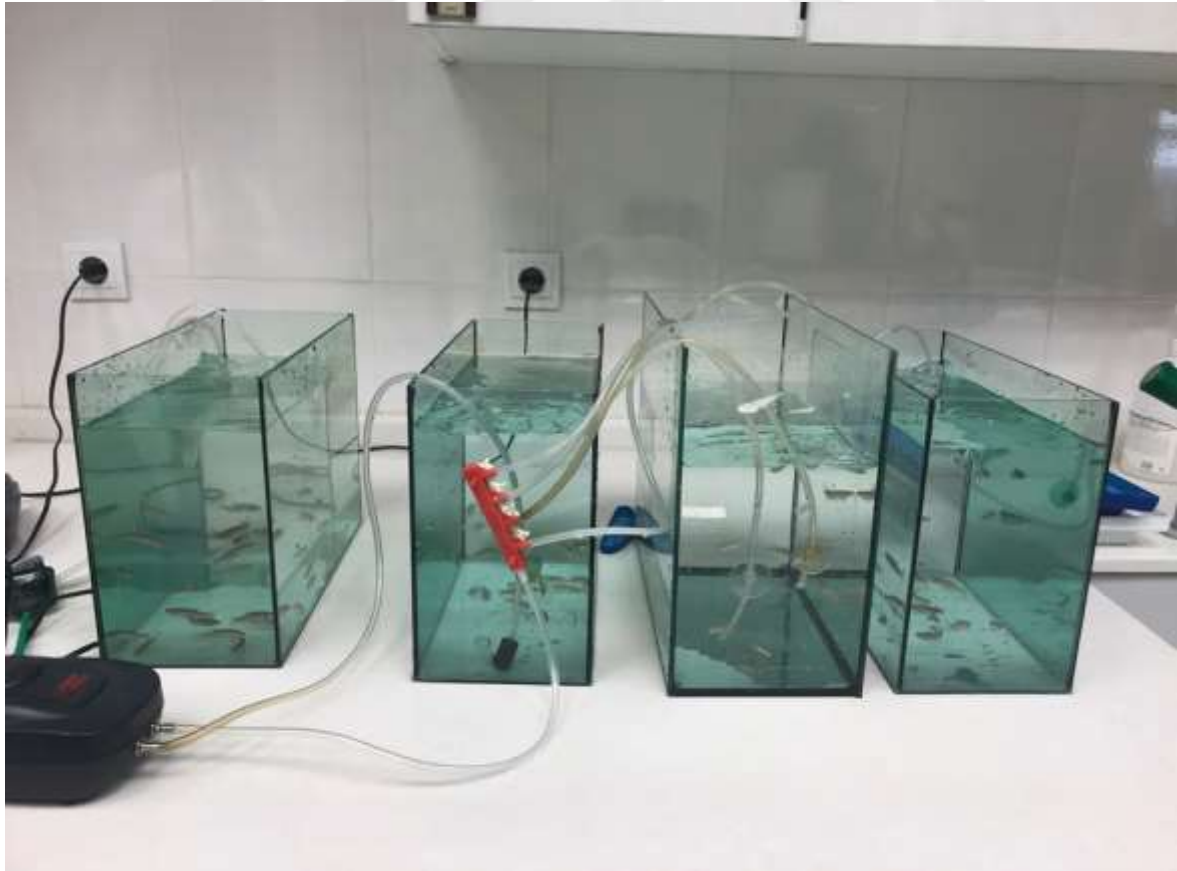
#### 3.2. Ortam Koşulları

Deneysel, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Deney ortamına adaptasyonunun sağlanması için deney başlamadan 15 gün önce akvaryumcudan temin edilen zebra balıkları, stok akvaryumunda tutulmuşlardır. Deneysel için 10x20x35 cm boyutlarında akvaryumlar kuruldu.

Adaptasyon süresi esnasında balıklar günde vücut ağırlıklarının % 2'si oranında uygun yemle beslenmişler ve türünün normal davranışları yönünden izlenmiştir. Havalandırılması yapılan akvaryumlarda günlük sifonlamaları yapılarak, yem ve dışkı atıkları uzaklaştırılmıştır. Deneysel önce, içinde yaklaşık 10 L doğal kaynak suyu konulmuş deney düzeneği hazırlanmıştır (Resim 3.1).

Kullanılan suyun pH'sı 7,2, oksijeni 5,4 mg/L ve iletkenliği de 75,7  $\mu\text{s}/\text{cm}$  (20  $^{\circ}\text{C}$ )'dir. Deney akvaryumları, hava motorları yardımıyla sürekli havalandırılmış ve termostatlı ısıtıcılar vasıtasıyla su sıcaklığı  $21\pm 1$   $^{\circ}\text{C}$ 'de sabit tutulmaya çalışılmıştır. Balıklar, deney akvaryumlarına rastgele stoklanmışlardır. Ayrıca oda iğerisine 14 saat aydınlık, 10 saat karanlık olacak şekilde fotoperiyot kurularak balıkların yaşaması için gereken ortam oluşturulmuştur.

Deneyde kullanılan kimyasal maddeler için stok çözelti, katı çinko ve bakır piritiyonun (Arch Chemicals, U.K.) hassas terazide tartılıp volumetrik cam balon jodede belirli hacim DMSO ile tamamlanması ile hazırlanmıştır. Hazırlanan numuneler kullanım öncesinde belirli sıcaklıkta tutulmuş ve madde ışık ortamında yıkıma uğramaya başladığı için balon jojenin etrafı ışık almayacak şekilde alüminyum folyo ile sarılmıştır. Akvaryum ve cam kaplarda dozlama yapılırken otomatik pipet kullanılmıştır. Akvaryumların kimyasal madde katılması esnasında havalandırılması kesilmiş ve madde cam baget yardımı ile karıştırılmıştır.



Resim 3.1. Deney düzeneği

### 3.3. Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Deney akvaryumlarına alınan zebra balıkları, ön deney sonucu elde edilen veriler ışığında belirlenen subletal konsantrasyonlarda çinko, bakır ve çinko+bakır piritiyona 96 saat süresince maruz bırakılmışlardır. Deneylerde 1 µg/L çinko piritiyon, 0,02 ve 0,1 µg/L bakır piritiyon, 1 µg/L çinko piritiyon + 0,1 µg/L bakır piritiyon ile kontrol grubu kullanılmıştır. Etken madde uygulamasını takip eden 24 ve 96. saatlerde örnekleme yapılmıştır. Deney sonrası balıkların boyları ölçülmüş ve ağırlıkları hassas terazi vasıtasıyla tartılmıştır. Örnekleme yapılırken her gruptan belirlenen sayıda balık % 10'luk tamponlu formole alınarak bir hafta tespit edilmiş ve histolojik doku takibine hazır hale getirilmiştir.

Grup 1 Kontrol 24. Saat (K-24): 1. akvaryumdaki balıklar standart şartlarda izlenip, 24. saatin sonunda örnekleme yapılmıştır.

Grup 2 Kontrol 96. Saat (K-96): 1. akvaryumdaki balıklar standart şartlarda izlenip, 96. saatin sonunda örnekleme yapılmıştır.

Grup 3 0,02 Cu 24. Saat: 0,02 µg/L Cu eklenen akvaryumdaki balıklardan 24. saatin sonunda örnekleme yapılarak bu grup oluşturulmuştur.

Grup 4 0,02 Cu 96. Saat: 0,02 µg/L Cu eklenen akvaryumdaki balıklardan 96. saatin sonunda örnekleme yapılarak bu grup oluşturulmuştur.

Grup 5 0,1 Cu 24. Saat: 0,1 µg/L Cu eklenen akvaryumdaki balıklardan 24. saatin sonunda örnekleme yapılarak bu grup oluşturulmuştur.

Grup 6 0,1 Cu 96. Saat: 0,1 µg/L Cu eklenen akvaryumdaki balıklardan 96. saatin sonunda örnekleme yapılarak bu grup oluşturulmuştur.

Grup 7 1 Zn 24. Saat: 1 µg/L Zn eklenen akvaryumdaki balıklardan 24. saatin sonunda örnekleme yapılarak bu grup oluşturulmuştur.

Grup 8 1 Zn 96. Saat: 1 µg/L Zn eklenen akvaryumdaki balıklardan 96. saatin sonunda örnekleme yapılarak bu grup oluşturulmuştur.

Grup 9 0,1 Cu + 1 Zn 24. Saat: 0,1 Cu + 1 µg/L Zn eklenen akvaryumdaki balıklardan 24. saatin sonunda örnekleme yapılarak bu grup oluşturulmuştur.

Grup 10 0,1 Cu + 1 Zn 96. Saat: 0,1 Cu + 1 µg/L Zn eklenen akvaryumdaki balıklardan 96. saatin sonunda örnekleme yapılarak bu grup oluşturulmuştur.

### 3.4. Deneyleerde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlarla Malzemeler

Deneyleerde kullanılan kimyasallar;

- 1) STE (Sodyum Tris EDTA)
- 2) % 10 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)
- 3) Proteinaz K
- 4) Fenol:Kloroform:İzoamil Alkol (25:24:1)
- 5) Etanol Çözeltisi
- 6) Sodyum Asetat
- 7) % 0,6 TBA
- 8) % 1'lik Fosforik Asit
- 9) n-butanol
- 10) % 1,15'lik KCl
- 11) Fosfat Tamponlu Salin (PBS)
- 12) Potasyum İyodür (KI)
- 13) Kloramin T (Cl T)
- 14) Asetik Asit
- 15) Na<sub>2</sub>Ca<sub>3</sub>
- 16) Na-K tartarat
- 17) CuSO<sub>4</sub>
- 18) NaOH
- 19) Folin ciocalteu's fenol reaktifi
- 20) BSA
- 21) Fosfat Tamponu
- 22) Tris (hidroksimetil) aminometan tampon
- 23) Asetik Asit – Sodyum Asetat Tamponu
- 24) ClF (Kalsiyum akış faktörü) Alkalen Fosfataz

- 25) Deferoksamin Mesilat (DFAM)  
 26) 8-oxodG (dG=deguanozin)  
 27) HCl  
 28) Nükleaz P<sub>1</sub>  
 29) EDTA  
 30) TE (Tris EDTA Tamponu)  
 31) Çözelti TD1 (UltraClean® Doku ve Hücreler DNA İzolasyon Kiti)

#### Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler;

- Vorteks (Biosan)
- Ependorf tüp
- Su banyosu (Leica HI1210)
- ELİZA
- Etüv (Nüve N500)
- Spektrofotometre
- Pens
- Bıçak ya da bistüri
- Otomatik pipet
- Nanodrop
- Temiz gazlı bez veya havlu kağıt

### 3.5. Deneyler

#### 3.5.1. DNA ekstraksiyonu

##### Kimyasalların Hazırlanması:

1- NaCl; M<sub>A</sub>: 58,5 g/mol

58,5 g      1 L      1 M

5,85 g      0,1 L      1 M

0,585 g      0,1 L      0,1 M

2- EDTA; m<sub>W</sub>:292,2 g/mol

292,2 g      1 L      1 M

0,2922 g      1 L      1mM

0,02922 g      0,1 L      1 mM

3- Stok Tris 1 M

Tris HCl pH:8,0, 10 mM

→1 ml Tris + 99 ml distile su eklendi ⇒ 100 ml  
 ⇒ 10 mM

$$M = n / V \Rightarrow n = M.V$$

$$n_1 = n_2 \Rightarrow M_1.V_1 = M_2.V_2$$

$$\Rightarrow 1M.V_1 = 10 \text{ mM}.100 \text{ ml}$$

$$\Rightarrow 1000 \text{ mM}.V_1 = 10 \text{ mM}.100 \text{ ml}$$

$$\Rightarrow V_1 = 1 \text{ ml}$$

4- Tampon Çözelti; 1 L için içerisinde 5,9 g NaCl eklendi.  
 500 ml için ise 2,95 g NaCl eklendi.

5- % 95'lik Etanol Hazırlama (stok % 99)

% 95'lik ⇒ 1000 µl

% 99'luk ⇒ 940 µl etanol

1 ml için; 940 µl etanol + 60 µl distile su

6- % 70'lik Etanol Hazırlama (stok % 99)

% 70'lik ⇒ 500 µl

% 99'luk ⇒ 353,5 µl etanol

500 µl için; 353,5 µl etanol + 146,5 µl distile su eklendi.

7- % 95 etanol ve 1/10 Na-Asetat

95,9 ml etanol alınır, 1 g Na-Asetat eklendi.

8- Fenol % 8'lik 25 ml için

2 g Fenol tartıldı ve 25 ml'ye distile su ile tamamlandı.

**NOT:** 1. aşamada TD1 1000 µl kullanıldı.

2. aşamada TD1 500 µl kullanıldı.

9- STE

0,1 M NaCl: 10 mM Tris HCl pH:8,0; 1 mM EDTA pH:8,0

### 10- % 10 SDS

10 ml için: 10 g SDS; 90 ml dH<sub>2</sub>O

### 11- 500 µl; Fenol: Kloroform: İzooamil Alkol

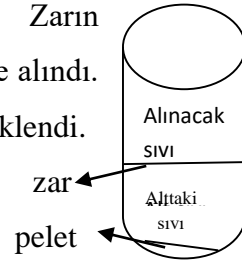
25	24	1
250	240	10

### Deneyin Yapılışı:

Sıvı nitrojende dondurularak -80°C’de saklanan balık örneklerinden Mo Bio marka DNA ekstraksiyon ticari kiti ile DNA ekstraksiyonları yapılmıştır.

Zebra balıkları bistüri ile parçalanıp ependorfa koyuldu. Üzerine 1 ml TD1 (Mo Bio) konulup vortekslendi. 13000 rpm’de 4 dk, oda sıcaklığında santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. 1 ml Liziz (TD1 Mo Bio) eklendi. Peleti kaldırmak için ependorfa yandan vuruldu. 13000 rpm’de 4 dk, oda sıcaklığında santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. 500 µl STE, 30 µl %10 SDS ve 20 µl proteinaz K (proteaz) eklendi. Bir gece 56 °C’de inkübe edildi. 500 µl Fenol: Kloroform: İzooamil Alkol (25:24:1) süpernatantın üzerine eklendi. Vortekslendi. 13000 rpm’de 4 dk, oda sıcaklığında santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası ependorfun dibinde pelet ve sıvı fazlar (Şekil 3.1.). Zarin üzerindeki sıvı faz, zarın altındaki sıvı ile karıştırılmadan temiz bir tüpe alındı. Bu alınan üst sıvıya, 1000 µl % 95 Etanol ve 1/10 oranında Na-asetat eklendi. Tüpteki bu karışım, zar DNA görünene kadar hafifçe alt üst edildi ve DNA iplikçik halinde görüldü.



Şekil 3.1. Santrifüj sonrası ependorf

13000 rpm’de 10 dk, oda sıcaklığında santrifüj edildi. Alkol uzaklaştırıldı. 50 µl %70 etanol eklendi ve tüpe hafifçe vurularak pelet kaldırıldı. 13000 rpm’de 10 dk, oda sıcaklığında santrifüj edildi. Alkol uzaklaştırıldı ve peletin kuruması için 15 dk beklendi. DNA peleti 100 µl TE (pH:7,6) veya distile su kullanılarak çözüldü. DNA 56°C’de 3-4 saat inkübe edildi.

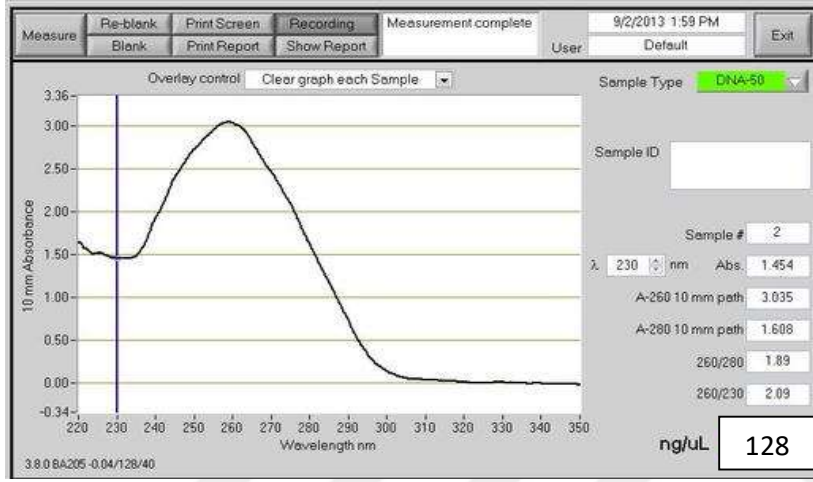
Çizelge 3.1. Zebra balık örneklerinin nanodropta ölçülen DNA miktarları

<b>DOKULAR</b>	<b>Nanodrop (ng/μl)</b>
0.1+1 μl Cu+Zn (24 saat)-2	570
0.1+1 μl Cu+Zn (24 saat)-6	128
0.1+1 μl Cu+Zn (24 saat)-8	691
<b>0.1 μl Cu (24 saat)-1</b>	1177.9
<b>0.1 μl Cu (24 saat)-2</b>	655.8
<b>0.1 μl Cu (24 saat)-3</b>	664
<b>0.1 μl Cu (24 saat)-4</b>	445
<b>0.1 μl Cu (24 saat)-5</b>	864.2
<b>0.1 μl Cu (24 saat)-6</b>	277.1
<b>0.1 μl Cu (24 saat)-7</b>	713.9
<b>0.1 μl Cu (24 saat)-8</b>	18.3
K-1 (96 saat)	11.3
K-2 (96 saat)	260.1
K-3 (96 saat)	321
K-4 (96 saat)	25
K-5 (96 saat)	484.9
K-6 (96 saat)	265.6
<b>1 μl Zn (96 saat)-1</b>	232.5
<b>1 μl Zn (96 saat)-2</b>	37.8
<b>1 μl Zn (96 saat)-3</b>	225.9
<b>1 μl Zn (96 saat)-4</b>	478.6
<b>1 μl Zn (96 saat)-6</b>	95.3
<b>1 μl Zn (96 saat)-7</b>	1651.4
<b>1 μl Zn (24 saat)-1</b>	137
<b>1 μl Zn (24 saat)-2</b>	93
<b>1 μl Zn (24 saat)-3</b>	363
<b>1 μl Zn (24 saat)-4</b>	292
<b>1 μl Zn (24 saat)-5</b>	272
<b>1 μl Zn (24 saat)-6</b>	389
<b>1 μl Zn (24 saat)-7</b>	253
<b>1 μl Zn (24 saat)-8</b>	299
K-1 (24 saat)	277
K-2 (24 saat)	129
K-3 (24 saat)	91
K-4 (24 saat)	232
K-5 (24 saat)	109
K-6 (24 saat)	141.5



Çizelge 3.1. (devam) Zebra balık örneklerinin nanodropta ölçülen DNA miktarları

K-7 (24 saat)	212.8
<b>K - 25 gün - 2</b>	489.8
<b>K - 25 gün - 3</b>	238
<b>K - 25 gün - 4</b>	625
<b>K - 25 gün - 5</b>	407.5
<b>K - 25 gün - 6</b>	532



Resim 3.2. Nanodrop DNA ölçüm grafiği

### 3.5.2. Doku protein tayini (Lowry deneyi) [28]

**Prensip:** Lowry ve ark.'nın tanımladığı metotla spektrofotometrik olarak yapıldı. Bu yöntem alkali ortamda proteinlerin peptid bağlarının bakır iyonları ile kompleks oluşturması esasına dayanır [28]. Bakır-peptid kompleksleri, folin ayırıcı ile reaksiyona girerek mavi-mor renk oluşturur. Standart olarak sığır serum albümini kullanıldı.

**Reaktifler:**  $\text{Na}_2\text{Ca}_3$ , Na-K tartarat,  $\text{CuSO}_4$ , NaOH, Folin & Ciocalteu's fenol reaktifi, BSA kullanıldı.

**Metodun Uygulanışı:** Standart, Bovin Serum Albumin 1 mg / ml olacak şekilde hazırlandı. Kör, standart ve numuneler deney tüplerine hazırlandı. Kör, standartlar (standart 1, 2, 3) ve numune tüplerine Çizelge 3.3.'deki gibi kimyasallar eklendi. Deney tüpleri vortekslelendikten sonra 15 dk bekletildi. Daha sonra deney tüplerine 200  $\mu\text{l}$  folin (F.C.) eklenerek iyice

vortekslendi ve 1 saat karanlıkta bekletildi. Tüplerin spektrofotometrede 750 nm dalga boyunda ölçümleri yapıldı.

Çizelge 3.2. Lowry deneyi standartların ve numunelerin hazırlanması

	BSA	Numune	Distile Su	C Çözültisi
Kör	---	---	100 µl	2 ml
Standart 1	20 µl	---	80 µl	2 ml
Standart 2	40 µl	---	40 µl	2 ml
Standart 3	80 µl	---	20 µl	2 ml
Numune	---	20 µl	80 µl	2 ml

Kimyasalların Hazırlanması:

1- A: % 2 Sodyum Karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (0,1 N Sodyum Hidroksit içinde hazırlandı.)

4 g sodyum karbonat + 196 ml distile su = % 2'lik sodyum karbonat çözeltisi

-- 0,1 N Sodyum Hidroksit (NaOH); 1 litrede 1 M = 1 N

$$M = n/V \quad \text{---} \quad n = m/M_A \quad \Rightarrow \quad M_{A(\text{NaOH})} = 40 \text{ g/mol}$$

$$0,1 \text{ M} = (m/40) / 0,2 \text{ L} \quad \Rightarrow \quad m = 0,8 \text{ g}$$

0,8 g NaOH ve 4 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  tartılıp distile su içinde çözüldü ve 200 ml'ye distile su ile tamamlanarak hazırlandı.

2- B<sub>1</sub>: % 2 Sodyum Potasyum Tartarat ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )

0,2 g sodyum potasyum tartarat tartılıp 9,8 ml distile su içinde çözümlenerek, % 2'lik B<sub>1</sub> çözeltisi hazırlandı.

3- B<sub>2</sub>: % 1 Bakır Sülfat ( $\text{CuSO}_4$ )

0,1 g bakır sülfat tartılıp 9,9 ml distile su içinde çözümlenerek, % 1'lik B<sub>2</sub> çözeltisi hazırlandı.

C: 0,5 ml B<sub>1</sub>, 0,5 ml B<sub>2</sub> ve 16,5 ml A çözeltisi içermektedir.

0,5 ml B<sub>1</sub> + 0,5 ml B<sub>2</sub> + 16,5 ml A = 17,5 ml C çözeltisi oranına göre;

5 ml B<sub>1</sub> + 5 ml B<sub>2</sub> + 165 ml A = 175 ml C çözeltisi hazırlandı.

#### 4- Folin & Ciocalteu's Fenol Çözeltisi:

F.C. 1:1 oranında distile su ile karanlıkta hazırlandı.

#### Hesaplama:

⇒ Lowry standartlarıyla standart eğri çizilir. Numunelerden elde edilen eğriden denklemin formülü hesaplanır.

⇒ Protein miktarı = (Numune Abs / Standart Abs) X standart konsantrasyon sonuçlar 'mg/ml' cinsinden hesaplanır.

#### **3.5.3. MDA için doku homojenizasyonu**

Balık dokuları, kolay homojenize edilebilmesi için, bistüri ile küçük parçalara ayrıldı. 1/10 oranında; 1 birim doku + 9 birim Tris HCL kullanarak, bıçaklı homojenizatör kullanılarak homojenize edildi.

#### Kimyasalların Hazırlanması:

50 mM pH: 7,4 Tris-HCl (1/10 oranında)

1- 1 M Tris pH:7,4 1L için;

121,1 g Tris + 800 ml dH<sub>2</sub>O + 70 ml HCl karıştırıldı ve üzeri 1L'ye dH<sub>2</sub>O ile tamamlandı.

2- 50 mM = 0,05 M Tris pH:7,4 50 ml için;

6,055 g Tris+40 ml dH<sub>2</sub>O + 3,5 ml HCl karıştırıldı ve üzeri 50 ml'ye dH<sub>2</sub>O ile tamamlandı.

~ Trizma-HCl (Sigma Tris HCl)'den Tris-HCl hazırlandı.

Trizma-HCl 2 M pH: 7,5

→ M<sub>1</sub>.V<sub>1</sub> = M<sub>2</sub>.V<sub>2</sub>

→ 2 M. V<sub>1</sub> = 0,05 M. 50 ml ⇒ V<sub>1</sub> = 1,25 ml alınıp 50 ml'ye dH<sub>2</sub>O ile tamamlandı.

100 ml için;

→ 2 M.  $V_2 = 0,05$  M. 100 ml  $\Rightarrow V_2 = 2,5$  ml alınıp 100 ml'ye dH<sub>2</sub>O ile tamamlandı.

### 3.5.4. Malondialdehit (MDA) tayini [25, 26]

Prensip: MDA tayini, Uchiyama tarafından geliştirilen metotla spektrofotometrik olarak yapıldı. Tüpün üst kısmındaki n-butanol fazı spektrofotometrede okundu [25, 26].

Reaktifler: %0.6'lık TBA, %1'lik fosforik asit, n-butanol, %1.15 KCl

#### Kimyasalların Hazırlanması:

- 1) KCl (% 1,15)  $\Rightarrow$  1,15 g KCl tartılıp 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.
- 2) % 6 TBA  $\Rightarrow$  0,6 g TBA tartılıp 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.
- 3) % 1'lik Fosforik Asit  $\Rightarrow$  3 ml fosforik asit alınıp 300 ml'ye distile su ile tamamlandı.
- 4) n-butanol

Metodun Uygulanışı: % 10'luk doku homojenatından 0,5 ml alındı. Üzerine sırasıyla 3 ml % 1'lik fosforik asit, 1 ml % 6'lık TBA eklendi. Vorteksle karıştırıldı. 45 dk kaynar su banyosunda bekletildi. Kaynar su banyosundan çıkarılan tüpler soğutuldu. 4 ml n-butanol eklendi. Vorteksle karıştırıldı. 3000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Üstteki n-butanol fazı, spektrofotometrede 520 ve 535 nm dalga boylarında okundu. İki absorbans arasındaki fark nanomol/g doku TBA düzeyi olarak hesaplandı.

Hesap: Absorbans farkı= nmol/g doku TBA

### 3.5.5. İleri oksidasyon protein ürünleri (AOPP) tayini [27]

Prensip: Plazma/serumda bulunan uzun ömürlü klorlu oksidanlar ile proteinlerin çapraz bağlama ürünlerinin, potasyum iyodürü oksitlemesi ve açığa çıkan triiyodid iyonunun, 340 nm' de ölçülmesi esasına dayanır [27]. AOPP konsantrasyonu ölçümünde bu ilişki nedeni ile Kloramin - T standart olarak (0-100  $\mu$ M arasındaki konsantrasyonlarda) kullanılmıştır. Yöntem Witko- Sarsat ve ark. ve Çakatay U. ve ark.'nın tanımladığı spektrofotometrik yöntemdir [27,74].

Reaktifler:

- 1) PBS ( fosfat tampon solüsyonu, pH: 7,4)
- 2) 1,16 M KI (Potasyum iyodür)
- 3) Asetik asit % 100
- 4) Kloramin T
- 5) Tris-HCl, 20 mM, pH: 7,4

Kimyasalların Hazırlanması:

## 1) Fosfat Tamponlu Salin (PBS)

80 g NaCl + 2 g KCl + 14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ⇒ pH:7,4'te 1 L distile suda çözüldü (800 ml distile suda HCl ile pH ayarlandı sonra 1000 ml'ye distile su ile tamamlandı).

1 hacim PBS, 10 hacim distile su oranında çalışma çözeltisi hazırlandı.

## 2) 1,16 M Potasyum İyodür (KI)

KI: 166 g/mol

$$** M = n / V \quad ** n = M / M_A$$

$$1,16 M = (m / 166) / 1 L \Rightarrow m = 192,56 g KI$$

1000 ml için 192,56 g KI gerekirken, 10 ml için 1,9256 g KI gerekir.

1,9256 g KI alınıp 10 ml'ye distile su ile tamamlandı.

## 3) Kloramin T (CI T)

CI T: 227,6 g/mol

Kloramin T için, CI T.3 H<sub>2</sub>O (M<sub>A</sub>: 281,69 g/mol) kullanıldı.

227,6 g CI T' den 11 mg alınması gerekirken, 281,69 g CI T.3 H<sub>2</sub>O' dan 13,61 g alındı.

13,61 g CI T.3 H<sub>2</sub>O alınıp 500 ml'ye dH<sub>2</sub>O ile tamamlandı.

## 4) Asetik Asit

Numunelerin Hazırlanması:

-- Süpernatant 1/20 dilüsyon oranıyla;

10 µl süpernatant + 190 µl PBS çalışma çözeltisi ile karıştırıldı.

Çizelge 3.3. Tüm doku AOPP deneyi numunelerin hazırlanması

	Standart	Kör	Numune
Standart (0-100 µl) CI T	200 µl	-	-
PBS çalışma çözeltisi	-	200 µl	190 µl
Numune	-	-	10 µl
KI	10 µl	10 µl	10 µl
Asetik Asit	20 µl	20 µl	20 µl

-- Daha sonra çalışılan numuneler, spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda okundu.

Standartların Hazırlanması:

100 µM için; 13,61 g CI T.3 H<sub>2</sub>O tartılıp, 500 ml dH<sub>2</sub>O içinde çözüldü (stok olarak kullanıldı).

Standart 1: 200 µl CI T stok (CI T.3H<sub>2</sub>O)

Standart 2: 150 µl CI T stok + 50 µl dH<sub>2</sub>O

Standart 3: 100 µl CI T stok + 100 µl dH<sub>2</sub>O

Standart 4: 50 µl CI T stok + 150 µl dH<sub>2</sub>O

Standart 5: 25 µl CI T stok + 175 µl dH<sub>2</sub>O

Standart 6: 12,5 µl CI T stok + 187,5 µl dH<sub>2</sub>O

Deneyin Yapılışı:

Balık dokuları, 1/10 oranında, 50 mM, pH:7,4 Tris-HCl tamponunda bıçaklı homojenizatör kullanılarak homojenize edildi. Elde edilen homojenat +4°C'de 3500 rpm'de 1 saat santrifüj

edildi ve -80°C soğutucuda muhafaza edildi. Süpernatandan AOPP ölçümü yapıldı. 200 µl süpernatant 1:5 oranında fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile dilüe edildi. Örneklere 10 µl KI ve 20 µl asetik asit eklenerek vorteksledikten sonra 340 nm dalga boyunda PBS'e karşı spektrofotometrik ölçümü yapıldı.

#### Hesaplama:

⇒ CI T standartlarıyla standart eğri çizilir. Numunelerden elde edilen eğriden denklemin formülü hesaplanır.

⇒ Doku proteine bölünerek, sonuçlar 'µmol/mg protein' cinsinden hesaplanır.

### **3.5.6. DNA/RNA oksidatif hasar ELISA kit (Cayman)**

#### Kimyasalların Hazırlanması:

- 250 µl Nükleaz P1 buffer içinde Nükleaz P1 çözüldü.
- 121 µl Alkalen fosfataz tamponu içine, 11 µl Alkalen fosfataz eklendi.
- EIA (Enzim İmmunoassay) Tamponu (10X) : 1 birim tampon + 9 birim ultrasaf H<sub>2</sub>O olacak şekilde;
  - 2 ml EIA tampon + 18 ml HPLC kaliteli H<sub>2</sub>O ile hazırlandı.
- Tracer: 6 ml EIA tampon içinde tracer çözündürüldü.
- Antibody: 6 ml EIA tampon içinde antibody çözündürüldü.

#### Tamponlar

- 1) 200 mmol/L asetat tamponu pH:5,0
- 2) 1 mol/L Tris-HCl pH:8,5 (6.05 g / %0 ml)
- 3) 50 mmol/L EDTA (10 mmol/L DFAM içinde)
- 4) 3 mol/L fosfat tamponu

#### 1) Fosfat Tamponu

Asit: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> → 4.35 g – 500 ml distile su

Baz: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> → 3.4 g – 500 ml distile su

2) *Tris*: Tris (hidroksimetil) aminometan tampon

-- 0,08 mol/L olacak bir tampon için 10,114 g/L olacak şekilde hazırlandı.

pH:8,5 için hazırlanan bu çözeltilerden 50 ml alındı, 0,1 mol/L olacak bir değer için 15 ml HCl alındı ve total hacim 100 ml'ye tamamlandı.

3) *Asetik Asit – Sodyum Asetat Tamponu*:

pH:5,0 tampon hazırlama

$CH_3COOH$  → 200 mmol/L için;

11,5 ml asetik asit reaktifinden alınıp 1 L'ye tamamlandı ve bu çözeltilerden 30 ml alındı.

$CH_3COONa$  → 200 mmol/L için;

16,4 g/L olacak şekilde hazırlandı ve bu çözeltilerden 70 ml alındı, tampon oluşturuldu.

Sonuçlar: nanomol 8-oxodG /  $10^5$  nanomol dG

Deneyin Yapılışı:

Önceden ekstrakte edilen DNA örnekleri 95°C'de 3 dakika ısıtıldı. Sonra buz üzerinde soğutuldu. Denatüre DNA'ya 2 mmol (100 µl) DFAM 65°C'de + 4 µl Nükleaz P1 eklendi (DFAM; oksidasyonu önleyici madde). 20 µl Tris tamponu eklendi. 4 µl alkalin fosfataz eklendi. 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. 20 µl, 3 mol/L asetat tamponu (pH:5,0) eklendi. 20 µl 50 mmol/L EDTA (10 mmol/L DFAM içinde) eklenerek, filtre edildi. 4°C'de, 10000 rpm'de, 20 dakika santrifüj edildi ve örnekler 8-hidroksi-2' deoksiguanozin (8-OHdG) analizi için hazır hale getirildi.

Hesaplama:

⇒ Standartlarla 405 nm ve 420 nm dalga boyları için standart eğriler çizilir. Numunelerden elde edilen eğriden denklemin formülü hesaplanır.

⇒ Konsantrasyonlar (x) 'pg/ml' cinsinden hesaplanır.



### 3.5.7. 8-hidroksi-2' deoksiguanozin (8-OHdG) analizi

Deneyin bu aşamasında Cayman DNA/RNA Oksidatif Hasar EIA (Ürün No: 589320) ticari kit kullanılmıştır.

Tüm tampon ve reaktifler Cayman DNA/RNA Oksidatif Hasar EIA kitin kataloğunda anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. 96 kuyucuktan oluşan plate'e deney protokolüne uygun şekilde standartlar, numuneler ve çalışma kimyasalları eklenmiştir. Plate'in üzeri plastik film ile kapatılıp, çalkalayıcıda 1,5 saat bekletilir. Daha sonra 405-420 nm arası dalga boyunda plate okutularak absorbanslar kaydedilmiştir.





## 4. BULGULAR

Zebra balıkları farklı konsantrasyonlarda çinko/bakır piritiyona (Zn/Cu) 24 ve 96 saat boyunca maruz bırakılmıştır. Meydana gelen olası toksik etkiler, bu saatlerin sonunda histoloji ve biyokimyasal analizler için doku örnekleri alınarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.1. MDA-AOPP konsantrasyon değerleri

GROUP		MDA (nmol/gr doku)	AOPP ( $\mu$ mol/mg protein)
Group 6 (Kontrol) n=8	F (6)	9,00 $\pm$ 3,61	5,43 $\pm$ 0,55
Group 7 (1 $\mu$ g/L Zn 96 saat) n=8	G (7)	7,30 $\pm$ 2,04	5,72 $\pm$ 1,03
Group 5 (0,1 $\mu$ g/L Cu 24 saat) n=8	E (5)	2,04 $\pm$ 1,79	6,05 $\pm$ 2,12
Group 2 (0,1 $\mu$ g/L Cu 96 saat) n=8	B (2)	31,05 $\pm$ 4,75	13,41 $\pm$ 1,79
Group 4 (0,1 Cu + 1 $\mu$ g/L Zn 24 saat) n=8	D (4)	9,46 $\pm$ 3,41	7,64 $\pm$ 3,18
Group 3 (0,1 Cu + 1 $\mu$ g/L Zn 96 saat) n=8	C (3)	30,40 $\pm$ 6,52	11,65 $\pm$ 7,45

MDA ve AOPP için Gruplarımız:

A (1)  $\rightarrow$  0,02 Cu 96 saat

B (2)  $\rightarrow$  0,1 Cu 96 saat

C (3)  $\rightarrow$  0,1 + 1 Cu + Zn 96 saat

D (4)  $\rightarrow$  0,1 + 1 Cu + Zn 24 saat

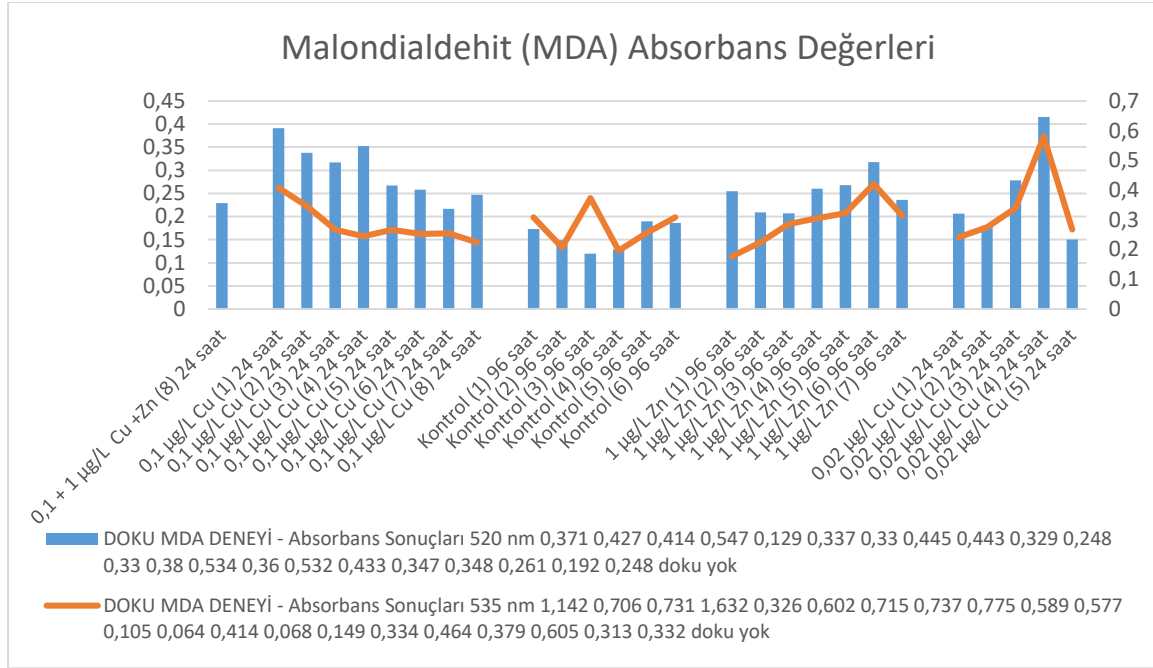
E (5)  $\rightarrow$  0,1 Cu 24 saat

F (6) → Kontrol 96 saat

G (7) → 1 Zn 96 saat

H (8) → 0,02 Cu 24 saat

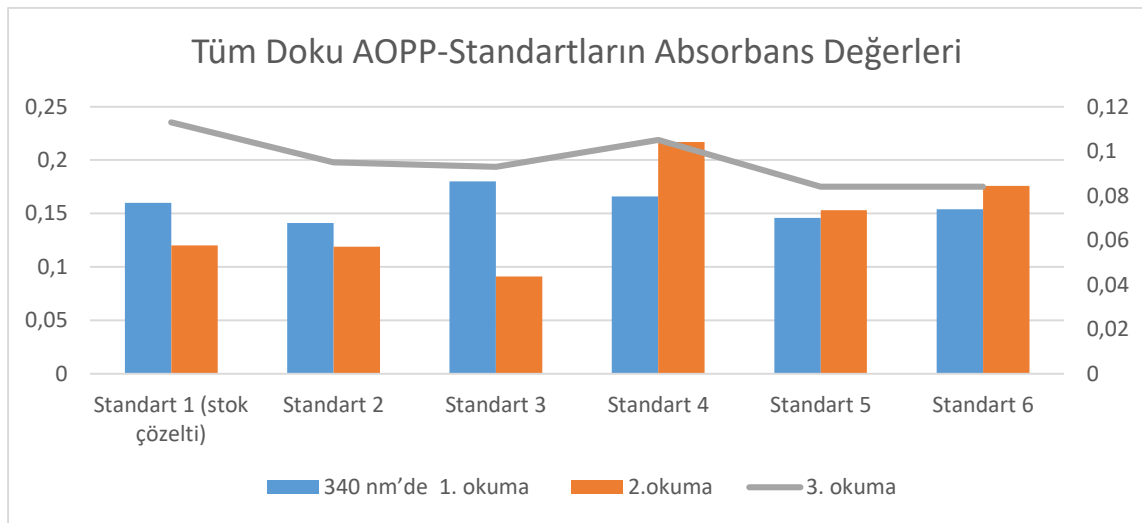
#### 4.1. Doku MDA ve AOPP Deneyleri



Şekil 4.1. Malondialdehit (MDA) 520-535 nm dalga boylarında absorbans sonuçları grafiği

-- Tüpün üst kısmındaki n-butanol fazı 535 ve 520 nm’de spektrofotometrede okutuldu.

-- Hesap: Absorbans farkı= nmol/g doku TBA



Şekil 4.2. Tüm Doku AOPP deneyi standartların absorbans değerleri

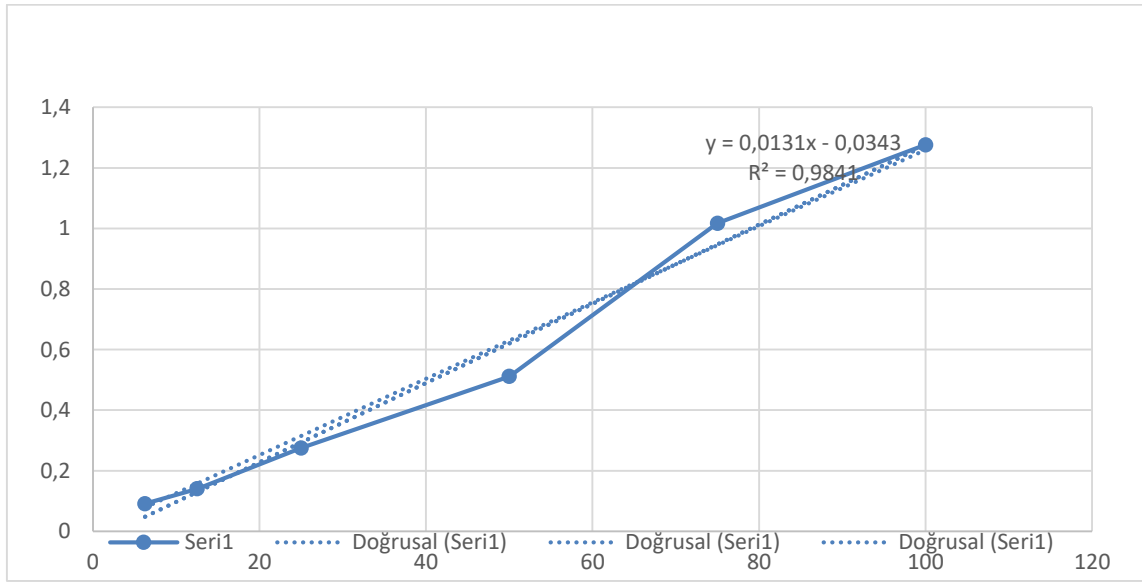
#### 4.1.1. Doku AOPP hesaplama

⇒ CI T standartlarıyla standart eğri çizildi. Numunelerden elde edilen eğriden denklemin formülü hesaplandı.

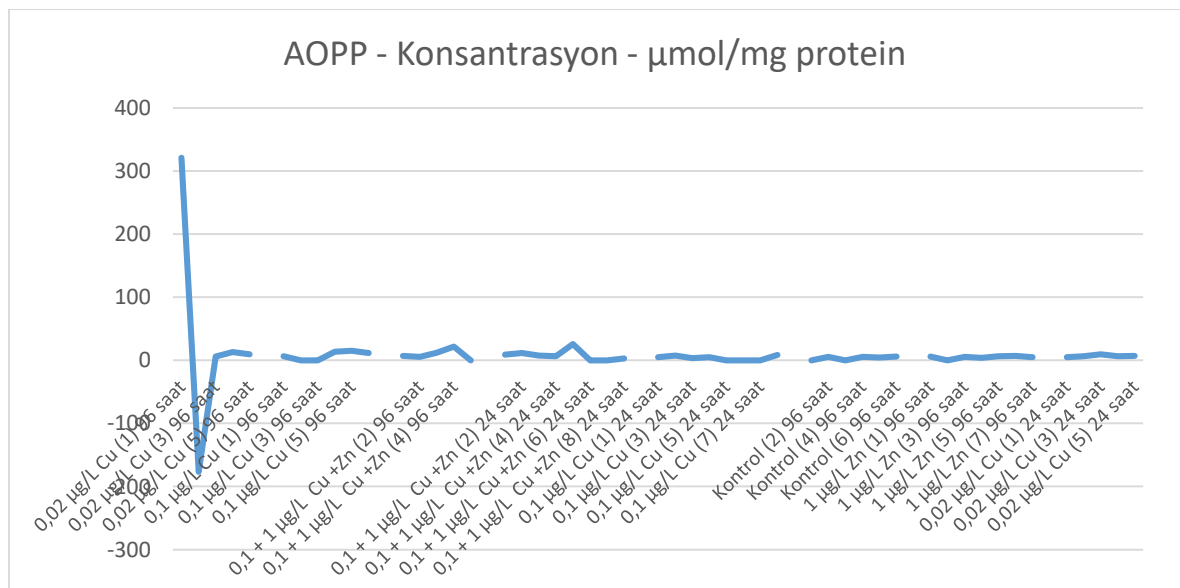
$$y = 0,0131x - 0,0343$$

$$R^2 = 0,9841$$

⇒ Doku proteine bölünerek sonuçlar 'µmol/mg protein' cinsinden hesaplandı.



Şekil 4.3. Tüm doku AOPP deneyi için Kloramin-T standart eğri grafiği



Şekil 4.4. Tüm doku AOPP deneyi konsantrasyon değerleri

*AOPP*

- 96 saatlik 0.1 µg/L Cu grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında AOPP değerinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir.
- 96 saatlik 0.1 µg/L Cu grubu, 24 saatlik 0.1 µg/L Cu grubu ile karşılaştırıldığında AOPP değerinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir.

*MDA*

- 24 saatlik 0.1 µg/L Cu grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MDA düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir.
- 96 saatlik 0.1 µg/L Cu grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MDA düzeylerinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir.
- 96 saatlik 0.1 Cu + 1µg/L Zn grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MDA düzeylerinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir.
- 24 saatlik 0.1 µg/L Cu grubu, 96 saatlik 1 µg/L Zn grubu ile karşılaştırıldığında MDA düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir.
- 96 saatlik 0.1 µg/L Cu grubu, 96 saatlik 1 µg/L Zn grubu ile karşılaştırıldığında MDA düzeylerinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir.
- 96 saatlik 0.1 Cu + 1 µg/L Zn grubu, 96 saatlik 1 µg/L Zn grubu ile karşılaştırıldığında MDA düzeylerinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir.
- 96 saatlik 0.1 µg/L Cu grubu, 24 saatlik 0.1 µg/L Cu grubu ile karşılaştırıldığında MDA düzeylerinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir.
- 24 saatlik 0.1 Cu + 1 µg/L Zn grubu, 24 saatlik 0.1 µg/L Cu grubu ile karşılaştırıldığında MDA düzeylerinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir.
- 96 saatlik 0.1 Cu + 1 µg/L Zn grubu, 24 saatlik 0.1 µg/L Cu grubu ile karşılaştırıldığında MDA düzeylerinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir.
- 24 saatlik 0.1 Cu + 1 µg/L Zn grubu, 96 saatlik 0.1 µg/L Cu grubu ile karşılaştırıldığında MDA düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir.
- 96 saatlik 0.1 Cu + 1 µg/L Zn grubu, 24 saatlik 0.1 Cu + 1 µg/L Zn grubu ile karşılaştırıldığında MDA düzeylerinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir.

-- Doku MDA ve AOPP deneyleri için SPSS 20.0 programı ile istatistiksel anlamlılıklarını düzenleyip, grafiğini oluşturuldu. Anlamlılık dereceleri aşağıdaki gibidir (çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. Doku MDA ve AOPP deneyleri

	Kontrol (n=5)	1 µg/L Zn 96 saat (n=5)	0,1 µg/L Cu 24 saat (n=5)	0,1 µg/L Cu 96 saat (n=5)	0,1 Cu + 1 µg/L Zn 24 saat (n=5)	0,1 Cu + 1 µg/L Zn 96 saat (n=5)
MDA (nmol/g doku)	9,00±3,61	7,30±2,04	2,04±1,79 <sup>a,b</sup>	31,05±4,75 <sup>a,b,c</sup>	9,46±3,41 <sup>c,d</sup>	30,40±6,52 <sup>a,b,c,e</sup>
AOPP (µmol/mg protein)	5,43±0,55	5,72±1,03	6,05±2,12	13,41±1,79 <sup>a,c</sup>	7,64±3,18	11,65±7,45

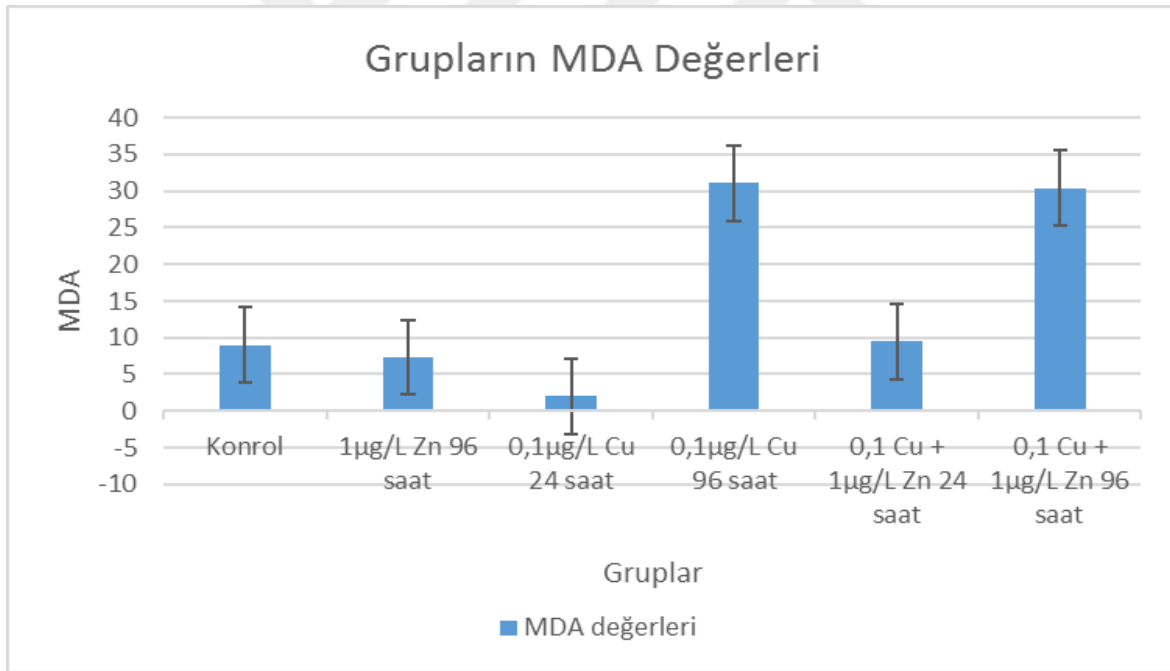
<sup>a</sup>  
p: Kontrol grubuna göre p<0,05

<sup>b</sup>  
P: 96 saatlik 1 µg/L Zn grubuna göre p<0,05

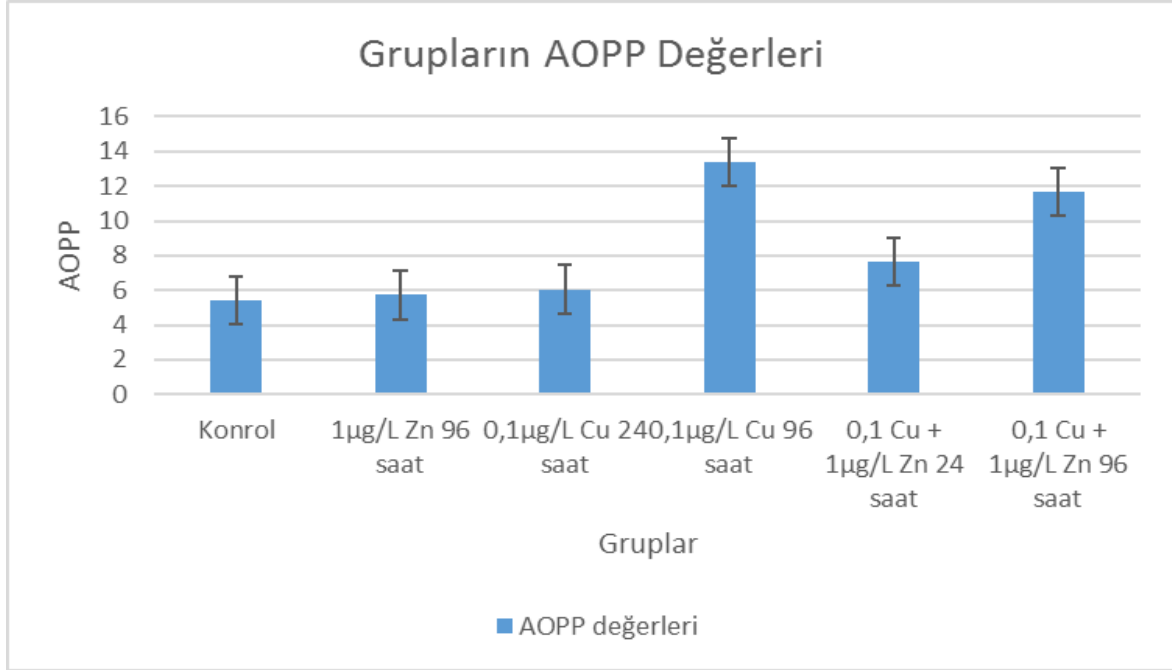
<sup>c</sup>  
p: 24 saatlik 0.1 µg/L Cu grubuna göre p<0,05

<sup>d</sup>  
p: 96 saatlik 0.1 µg/L Cu grubuna göre p<0,05

<sup>e</sup>  
p: 24 saatlik 0.1 Cu + 1 µg/L Zn grubuna göre p<0,05



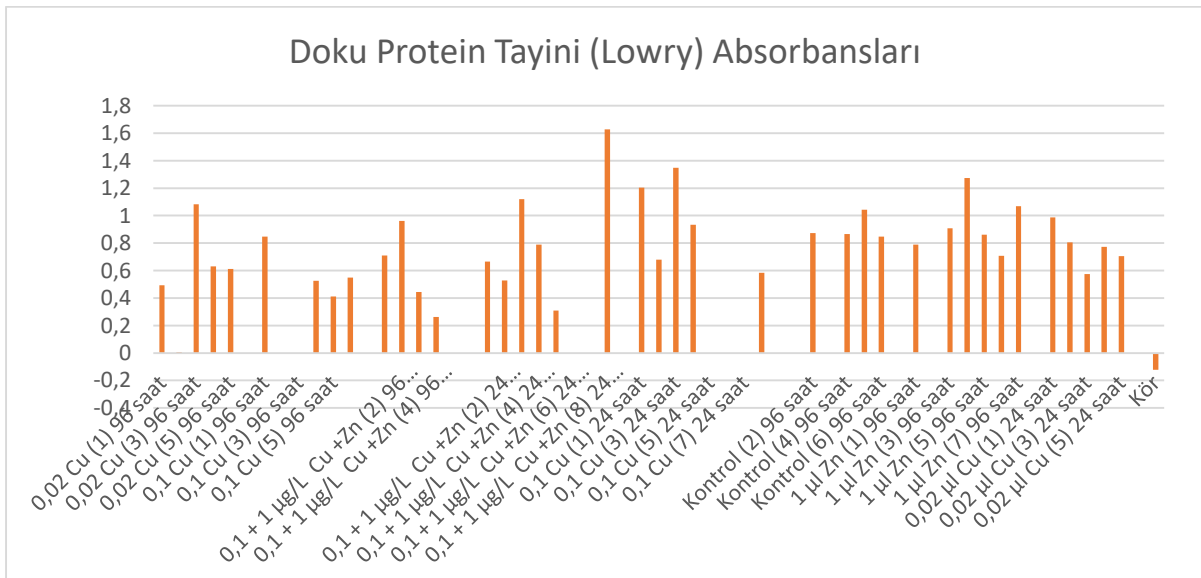
Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlarda Cu-Zn piritiyonlar için MDA değerleri grafiği (nmol/g doku)



Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda Cu-Zn piritiyonlar için AOPP değerleri grafiği ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein)

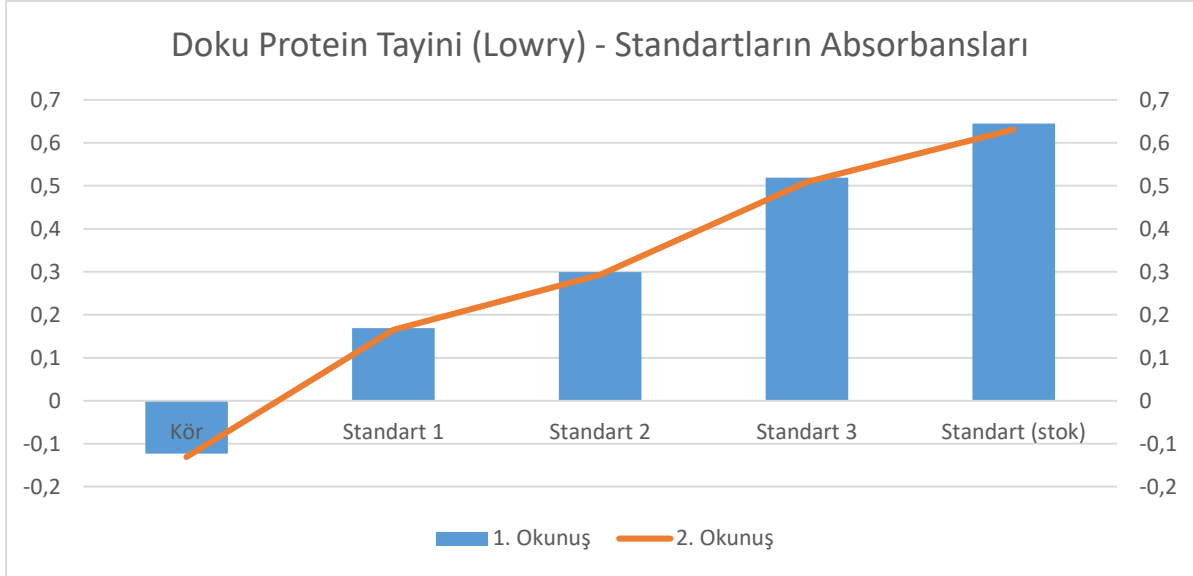
#### 4.2. Doku Protein Tayini Deneyi (Lowry Deneyi)

Deney aşamaları bitince, hazırlanan numuneler ve standart tüpleri spektrofotometrede 750 nm dalga boyunda köre karşı okutuldu ve grafiğe göre hesaplaması yapıldı.



Şekil 4.7. Doku protein tayini (Lowry Deneyi) numunelerin absorbans değerleri





Şekil 4.8. Doku protein tayini (Lowry Deneyi) standartların absorbans değerleri

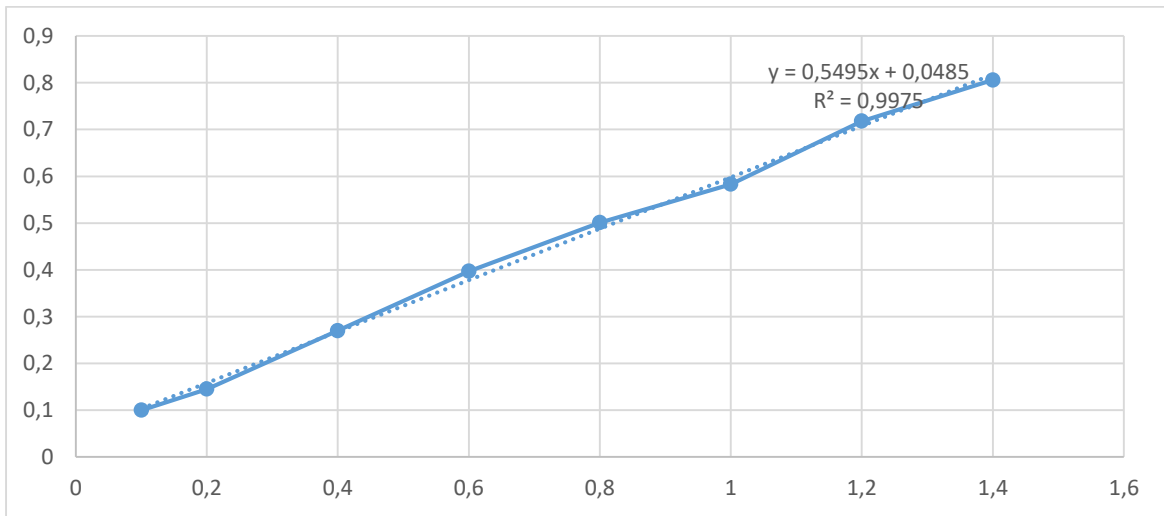
#### 4.2.1. Doku protein tayini hesaplama

⇒ Lowry standartlarıyla standart eğri çizildi. Numunelerden elde edilen eğriden denklemin formülü hesaplandı.

$$y = 0,5495x - 0,0485$$

$$R^2 = 0,9975$$

⇒ Protein miktarı = (Numune Abs / Standart Abs) X standart konsantrasyon sonuçlar 'mg / ml' cinsinden hesaplandı.



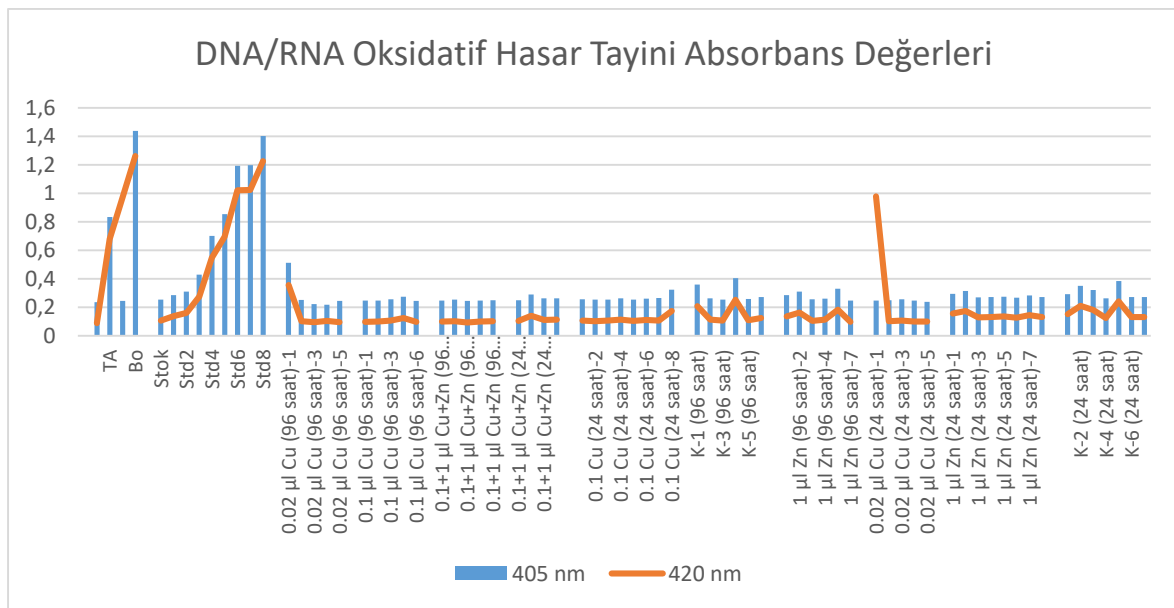
Şekil 4.9. Doku protein tayini deneyi için standart eğri grafiği

Çizelge 4.3. Doku protein tayini (Lowry deneyi) standartlar değerleri

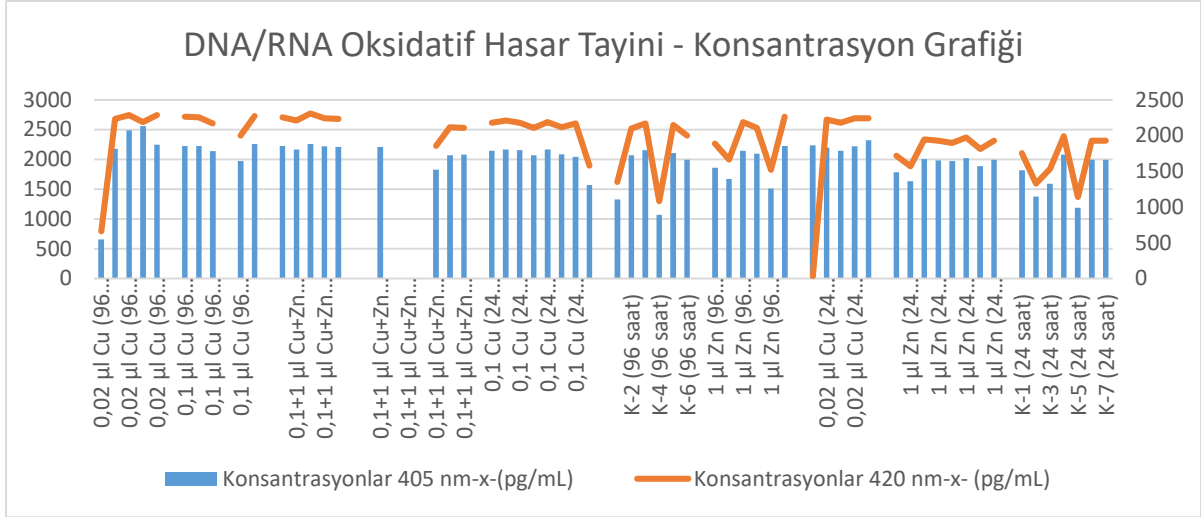
Standartlar	750 nm	Stok BSA µl	Su µl	Std kons.(µg/ml)
Standart 1	0,145	0	100	0,0
Standart 2	0,1	5	95	0,1
Standart 3	0,145	10	90	0,2
Standart 4	0,27	20	80	0,4
Standart 5	0,397	30	70	0,6
Standart 6	0,501	40	60	0,8
Standart 7	0,583	50	50	1
Standart 8	0,718	60	40	1,2
Standart 9	0,806	70	30	1,4

-- Stok BSA 2 mg / ml (her dilüsyondan 0,1 ml konulacak)

#### 4.3. DNA/RNA Oksidatif Hasar ELISA kit (Cayman)



Şekil 4.10. DNA/RNA oksidatif hasar ELISA kit (Cayman) absorbans değerleri



Şekil 4.11. DNA/RNA oksidatif hasar ELISA kit (Cayman) konsantrasyon (pg/mL) değeri

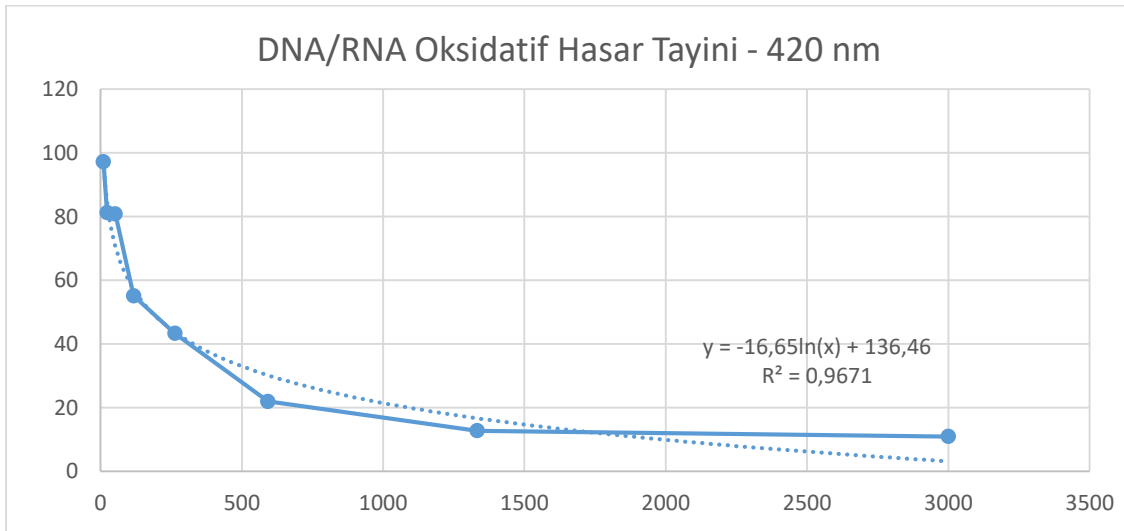
#### 4.3.1. Hesaplama

Standartlarla 420 nm dalga boyu için standart eğri grafiği çizildi. Numunelerden elde edilen eğriden denklemin formülü hesaplandı.

$$y = -16,65 \ln(x) + 136,46$$

$$R^2 = 0,9668$$

Konsantrasyonlar (x) 'pg/mL' cinsinden hesaplandı.



Şekil 4.12. DNA/RNA oksidative damage ELISA kit (Cayman) 420 nm için standart eğri grafiği

-- DNA/RNA Oksidatif Hasar ELISA kit (Cayman) deneyi için SPSS 20.0 programı ile istatistiksel anlamlılıklarını düzenleyip, grafiğini oluşturduk. Anlamlılık dereceleri aşağıdaki gibidir (Çizelge 4.11.).

Çizelge 4.4. Farklı konsantrasyonlarda Cu-Zn piritiyonları için 8-OHdG (pg/ml) değerleri

	Kontrol 24 saat	Kontrol 96 saat	0,02 µg/L Cu 24 saat	0,02 µg/L Cu 96 saat	0,1 µg/L Cu 24 saat	0,1 µg/L Cu 96 saat	1 µg/L Zn 24 saat	1 µg/L Zn 96 saat	0,1 + 1 µg/L Cu + Zn 24 saat	0,1 + 1 µg/L Cu + Zn 96 saat
8-OHdG (pg/mL)	1718,94 ± 343,16	2081,21 ± 68,88 <sup>a</sup>	2224,00 ± 64,49 <sup>a,b</sup>	2368,23 ± 184,69 <sup>a,b</sup>	2118,74 ± 52,36 <sup>a,c,d</sup>	2167,90 ± 115,68 <sup>a</sup>	1909,69 ± 136,57 <sup>b,c,d,e,f</sup>	1918,63 ± 286,65 <sup>c,d</sup>	2044,61 ± 159,26 <sup>d</sup>	2215,24 ± 33,48 <sup>a,b,c,g,h,i</sup>

<sup>a</sup>  
p: 24 saatlik kontrol grubuna göre, p<0.05

<sup>b</sup>  
p: 96 saatlik kontrol grubuna göre, p<0.05

<sup>c</sup>  
p: 24 saatlik 0,02 µg/L Cu grubuna göre, p<0.05

<sup>d</sup>  
p: 96 saatlik 0,02 µg/L Cu grubuna göre, p<0.05

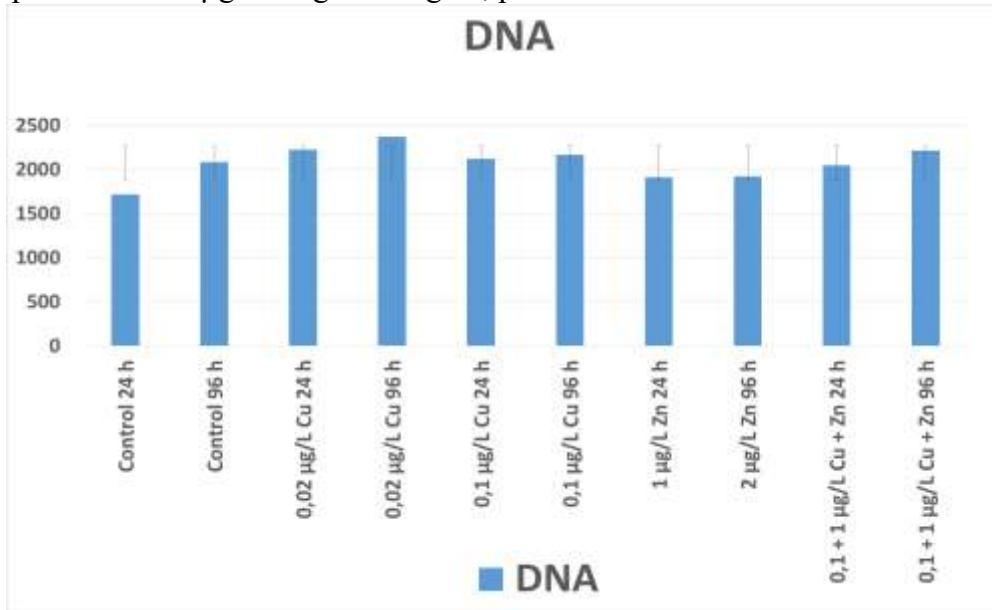
<sup>e</sup>  
p: 24 saatlik 0,1 µg/L Cu grubuna göre, p<0.05

<sup>f</sup>  
p: 96 saatlik 0,1 µg/L Cu grubuna göre, p<0.05

<sup>g</sup>  
p: 24 saatlik 1 µg/L Zn grubuna göre, p<0.05

<sup>h</sup>  
p: 96 saatlik 1 µg/L Zn grubuna göre, p<0.05

<sup>i</sup>  
p: 96 saatlik 1 µg/L Zn grubuna göre, p<0.05



Şekil 4.13. Farklı konsantrasyonlarda Cu-Zn piritiyonlar için 8-OHdG (pg/mL) değerleri grafiği

-- 8-OHdG (pg/ml), MDA (nmol/gr) ve AOPP ( $\mu\text{mol/mg}$ ) deneylerinin bulgularını tek bir çizelgede birleştirelim:

Çizelge 4.5. Farklı konsantrasyonlarda Cu-Zn piritiyonları için 8-OHdG (pg/mL), MDA (nmol/gr), AOPP ( $\mu\text{mol/mg}$ ) değerleri

	Kontrol 24 saat	Kontrol 96 saat	0,02 $\mu\text{g/L}$ Cu 24 saat	0,02 $\mu\text{g/L}$ Cu 96 saat	0,1 $\mu\text{g/L}$ Cu 24 saat	0,1 $\mu\text{g/L}$ Cu 96 saat	1 $\mu\text{g/L}$ Zn 24 saat	1 $\mu\text{g/L}$ Zn 96 saat	0,1 + 1 $\mu\text{g/L}$ Cu + Zn 24 saat	0,1 + 1 $\mu\text{g/L}$ Cu + Zn 96 saat
8-OHdG (pg/mL)	1718,94 $\pm$ 343,16	2081,21 $\pm$ 68,88 <sup>a</sup>	2224,00 $\pm$ 64,49 <sup>a,b</sup>	2368,23 $\pm$ 184,69 <sup>a,b</sup>	2118,74 $\pm$ 52,36 <sup>a,c,d</sup>	2167,90 $\pm$ 115,68 <sup>a</sup>	1909,69 $\pm$ 136,57 <sup>b,c,d,e,f</sup>	1918,63 $\pm$ 286,65 <sup>c,d</sup>	2044,61 $\pm$ 159,26 <sup>d</sup>	2215,24 $\pm$ 33,48 <sup>a,b,e,g,h,i</sup>
MDA (nmol/g doku)		9,00 $\pm$ 3,61			2,04 $\pm$ 1,79 <sup>a,b</sup>	31,05 $\pm$ 4,75 <sup>a,b,c</sup>		7,30 $\pm$ 2,04	9,46 $\pm$ 3,41 <sup>c,d</sup>	30,40 $\pm$ 6,52 <sup>a,b,c,e</sup>
AOPP ( $\mu\text{mol/mg}$ protein)		5,43 $\pm$ 0,55			6,05 $\pm$ 2,12	13,41 $\pm$ 1,79 <sup>a,c</sup>		5,72 $\pm$ 1,03	7,64 $\pm$ 3,18	11,65 $\pm$ 7,45

#### 4.4. Histopatoloji Sonuçları

##### 4.4.1. Solungaç dokularında görülen histopatolojik bulgular

Farklı konsantrasyonlar da çinko/bakır piritiyona (Zn/Cu) 24 ve 96 saat boyunca maruz bırakılan zebra balıklarında meydana gelen olası toksik etkilerin solungaç dokularına ilişkin histopatolojik bulguları incelenmiştir. Zebra balıklarından elde edilen solungaç dokularına ilişkin histopatolojik bulgular Resim 4.1. de verilmiştir.



Resim 4.1. Solungaç dokularında epitel ayrılması (ok) (H&E,x100)

Histopatolojik çalışmalar, çevresel kirleticilerin suda yaşayan organizmalardaki etkilerini değerlendirmek için yararlı ve güçlü göstergelerdir. Solungaçlar bu göstergeler için esas alınır ve su kalitesinin aynası olarak değerlendirilir. Solungaç histolojisi, çevresel kontaminasyonların izlenmesinde yararlı biyolojik indikatörlerden biri olarak düşünülmektedir.

Solungaç dokularında hiperemi ve epitel ayrılması en çok tespit edilen histopatolojik bulgular olarak belirlenmiştir. Toksik maddeye daha uzun süre maruz kalma solungaç dokularında elde edilen epitel ayrılması bulgusunun şiddetlenmesine, daha yoğun olmasına ve daha fazla balıkta görülmesine sebebiyet vermezken hipereminin daha şiddetli görülmesine neden olmuştur.

## 5. TARTIŞMA

Su içerisinde bulunan balık kafesleri, tekne ve gemi tabanları, petrol kulelerinin su içinde kalan kısımları gibi yapılar zamanla bakteriler, diatomlar, algler, kaya midyesi, boru kurdu vb. sucul organizmalar tarafından kaplanması biofouling olarak bilinmektedir. Bu kaplanma, zamanla söz konusu yapının bozunmasına ve/veya görevini yapamamasına neden olmaktadır. Bu durumların önlenmesi için bir tür biyosidal ürün antifouling boyalar kullanılmaktadır. Biyosidal ürün; bir veya birden fazla aktif madde içeren, kullanıma hazır halde satışa sunulmuş, kimyasal ve biyolojik açıdan herhangi bir zararlı organizma üzerinde kontrol edici etki gösteren veya hareketini kısıtlayan, uzaklaştıran, zararsız kılan, yok eden aktif maddeleri ve müstahzarları (kullanıma hazır hale getirilmiş) olarak tanımlanır (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Biyosidal Ürün Yönetmeliği [THSK], 2009) [30].

Çinko piritiyon (ZnPT) (21 numaralı ürün tipi) ve bakır piritiyon (CuPT) antifouling maddelerdir; canlılarda antibakteriyal ve antifungal etkiler için yaygın kullanılmaktadırlar. Ülkemizde piyasada bulundurulmasına izin verilen bozunmayı önleyici ürünlerde en çok çinko ve bakır oksit ikilisi (%13,16) ile bakır piritiyon (Cu Pyrithione) ve bakır oksit ikilisi (%81,58) kullanılmaktadır ve bu ürünlerin tamamı profesyonel kullanıcılara yöneliktir. Çinko 2014 yılında, bakır piritiyon ise 2015 yılında bozunmayı önleyici ürünlerde aktif madde olarak kullanımına onay verilen kimyasallardandır, bakır oksit ise halen değerlendirilmekte olan bir kimyasaldır [THSK], 2015) [31]. Bakır piritiyon esas olarak antimikrobiyal olarak kullanılır. Yüksek konsantrasyonlarda tekrarlanan maruz kalmalar sonucu iskelet kası atrofisi, periferik sinir hasarı hayvan çalışmalarında rapor edilmiştir (Arch Chemicals, 2010) [32]. Bakır piritiyon son derece etkin geniş spektrumlu bir biyosit olup birçok sucul canlı üzerinde olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir. Balıklarda notokord anormallikleri, kas liflerinde dağınıklık, oksidatif stres oluşumu (Trombetta, 2015) [33], deniz kestanesinde erken embriyogenez döneminde embriyotoksik olduğu ve embriyolarda mortalite görüldüğü bildirilmiştir (H. Wang, Li, Huang, Xu, ve Y. Wang, 2011) [34]. Dahllöf ve arkadaşları tarafından (2005:22,23) yılında yapılan çalışmada deniz suyunda CuPT ve ZnPT için bozunma zamanının dolaylı yoldan tahmini yapılmaya çalışılmıştır [35]. Biyo-bozunma sulandırılmış ZnPT ve CuPT, steril deniz suyu veya doğal EC<sub>50</sub> CuPT ve ZnPT toksisitesi pelajik bakteri, yosun ve zooplankton toplulukları için 1,60-60 nM arasında değişmiştir. 0,001 nM/g kuru konsantrasyonu besin döngüsünü deniz suyunda incelenmiştir. Fotodegradasyon yarı ömrü ZnPT için  $8,3 \pm 0,9$  dk ve CuPT  $7,1 \pm 0,2$  dk olarak tahmin

edilmiştir. Deniz suyunda CuPT ve ZnPT etkisi araştırılmıştır. EC<sub>50</sub> CuPT ve ZnPT toksisitesi pelajik bakteri, yosun ve zooplankton toplulukları için 1,60-60 nM arasında değişmiştir. 0,001 nM/g kuru konsantrasyonu besin döngüsünü etkilemiştir. 2006 yılında Mochida ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada antifouling bileşikler olan CuPT, ZnPT ve Cu'nun Pagrus Major (Temminck & Schlegel, 1843) ve Heptacarpus futihirostris (Bate, 1888) üzerinde toksisitesi incelenmiştir [36-37,38]. 96.saat LC<sub>50</sub> değeri CuPT ve ZnPT için kırmızı çipurada sırasıyla 9,3 ve 98,2 g/L, karides için 2,5 ve 120 g/L olduğu gözlemlenmiştir. Histolojik gözlemlerde solungaçlarda ikincil lamellerde hipoksi oluşması ölüme neden olduğu düşünülmüştür. CuPT için LC<sub>50</sub> değeri kırmızı çipura ve karides için 84,4 ve 113 g/L olarak bulunmuştur. Bu çalışmada, her iki çevresel kirleticinin (çinko ve bakır piritiyon) sucul ekosisteme ve insanlar üzerine muhtemel olumsuz endokrin bozucu etkileri zebra balıklarda (Danio rerio) toksik maruziyet konsantrasyonunda, genotoksik ve oksidatif hasar belirteçleri araştırılarak bilime, korunma ve tedavi yöntemlerine katkı sağlanması amaçlanmıştır.

Çevresel kimyasallara maruz kalan insan ve doğadaki canlılarda endokrin süreçler, endokrin bozucu (EDC) etki gösterdiklerinden son yıllarda bu konuda yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Çevresel kimyasallar su ve gıda yoluyla karışım halinde insana ulaştığından önemli risk oluşturarak çevresel sucul ortamda etkileşerek aditif, sinerjistik, antagonistik etkiler gösterebilmektedir (Cui ve arkadaşları, 2014) [39]. Mevcut literatürde tüm canlı hayvanlarda endokrin-aracılı karşıt etkilerin tanımı mevcut değildir, türe özgü memeli ve memeli olmayan (omurgasız, balık, amfibi ve kuş) canlılarda OECD ve EPA'nın ilgili yönergeleri de yetersiz kalmaktadır. Bu iki maddenin yaygın kullanımı ve sucul ekosistemlere kontaminasyon riskleri açısından, ekotoksikolojide omurgasız model organizma olan zebra balıklarında etkilerinin saptanması bilimsel ve insan sağlığı açısından da önem arz etmektedir.

Biz bu çalışmamızda DNA hasarını 8-OHdG miktarı olarak, lipid peroksidasyon ürünü olarak (MDA), protein oksidatif hasar belirteci olarak ileri oksidatif protein ürünü (AOPP) düzeyleri ile değerlendirdik.

MDA, üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit (MDA) meydana gelir.





Resim 5.1. MDA

Malondialdehit (MDA) kan ve idrarda ortaya çıkar, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamakla beraber lipid peroksidasyonunun düzeyi ile korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde MDA ölçülmesi lipid peroksidasyonunun seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır. Nonenzimatik lipid peroksidasyonu bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehitlerle indirekt olarak diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece doku hasarına ve birçok hastalığa neden olur. Bazı deneysel sistemlerde kullanılan TBA yönteminin esas olarak MDA'nın kendisini ölçtüğü gösterilmiştir.

İleri oksidatif protein ürünleri AOPP, ditirozin içeren çapraz bağlı protein ürünleri olarak tanımlanır ve protein hasarının saptanmasında güvenilir bir belirteç olduğu düşünülmektedir [74]. İlk defa 1996'da Witko-Sarsat vd. (1996) tarafından üremik hastalarda tanımlanmıştır [27].

Çalışma kapsamında elde edilen veriler doğrultusunda sucul ekosisteme kontamine olan her iki maddenin, su canlıları ve besin zinciri yoluyla insanlar ve diğer hayvanlara etkisine ilişkin bir ön verinin temin edildiği düşünülmektedir.



## 6. SONUÇ

Farklı konsantrasyonlar da çinko/bakır (Zn/Cu) piritiyona maruz bırakılacak zebra balıklarında meydana gelen olası toksik etkiler DNA hasarı ve oksidatif hasar belirteçlerinde gözlenen değişiklikler ile açıklanarak bu biyokimyasal parametreler endokrin bozucu biyobelirteç olarak değerlendirildi.

Yaptığımız MDA, AOPP ve DNA hasarı çalışmalarının yanında histopatolojik olarak özellikle solungaç epitel yapısında bozulma tespit edilmiştir.

Çevresel kirleticiler özellikle hedef olmayan canlılarda süreye bağlı olarak endokrin bozucu etki göstermektedir. Bu çalışmada da Zn ve Cu piritiyonun maruziyet süresi arttıkça toksik etkinin de arttığı gözlemlenmiştir.

Yapılan deneyler sonucunda lipid peroksidasyonu düzeyinde artmış toksik etkinin akut dönemde değil artan maruziyet süresine bağlı olarak ortaya çıktığı görüldü. Çalışma grubunun ve önceki çalışmaların kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, grupların 8-hidroksi-2 deoksiguanozin (pg/mL) değerleri istatistiksel olarak anlamlı artmış bulundu ( $p<0,05$ )

Histopatolojik sonuçlara göre; solungaç dokuları hem çinko hem de bakır piritiyonda hasar gördü. Tüm çinko, çinko + bakır ve bakır piritiyon konsantrasyonlarında hiperemi, epitel bozulma ve hiperplazi gözlenmiştir. Lezyonlar bakır piritiyonda daha şiddetli etki göstermiştir.

Deniz kirliliği ve ekosistemlerin bozulması doğrudan insanları etkiler. Çalışma sonuçlarımız, çevre kirliliği, deniz kirliliği ve sağlık sorunları arasında farkındalık yaratmaktadır. Çevresel kirleticilerin oluşturduğu DNA hasarı ve oksidatif hasar besin ağı üzerindeki organizmaların farklı evrelerinde etkili olmaktadır. Çalışmamız insanlar üzerindeki olası etkileri anlamak ve tahmin etmek için temel veriler sağlamaktadır.



## KAYNAKLAR

1. Sağlamtimur, B. (1998). *Bakır ve kadmiyum karışımının etkisinde Tilapia nilotica'nın farklı dokularında bakır ve kadmiyum birikimi*. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin.
2. Kalay, M. and Canlı, M. (2000). Elimination of essential (Cu and Zn) and non-essential (Cd and Pb) metals from tissue of a freshwater fish, Tilapia zilli. *Turkish Journal of Zoology*, 24, 429-436.
3. Eaton, A.D., Clesceri, L.S., Greenberg, A.E. and Franson, M.A.H. (1995). Standart methods for the examination of water and waste water. (19th Ed). Washington DC: American Public Health Association.
4. Mason, C.F. (1996). Aquatic toxicology. In: Biology of freshwater pollution. 3rd Ed. Essex, England: Addison Wesley Longman Limited, 20.
5. Gill, T.S. and Pant, J.C. (1985). Mercury-induced blood anomalies in the freshwater teleost Barbus conchonus. *Water, Air and Soil Pollution*, 24, 165-171.
6. Abel, D. and Papoutsoglou, S.E. (1986). Lethal toxicity of cadmium to Cyprinus carpio and Tilapia aurea. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 37, 382-386.
7. Sovenyi, J. and Szokolczai, J. (1993). Studies on the toxic and immunosuppressive effects of cadmium on the common carp. *Acta Veterinaria Hungarica*, 41, 415-426.
8. Göksel, H. (1993). *Trabzon limanı ve çevresinden avlanan mezzit balıklarında bazı ağır metal (Cu, Mn, Zn) birikimlerinin araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
9. Sorengas, J.L., Agra-Lago, M.J., Carballo, B., Andres, M.D. and Veira, J.A.R. (1996). Effects of an acute exposure to sublethal concentrations of cadmium on liver carbohydrate metabolism of Atlantic salmon, Salmo salar. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 57(4), 625-631.
10. Roche, H. and Boge, G. (1996). Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical intoxication. *Marine Environmental Research*, 41(1), 27-43.
11. Shah, S.L. and Altındağ, A. (2004a). Behavioural abnormalities of tench (Tinca tinca L.1758) on exposure to mercury, cadmium and lead. Fresen. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 13(12B), 1482-1486.
12. Shah, S.L. and Altındağ, A. (2004b). Hematological parameters of tench (Tinca tinca L.) after acute and chronic exposure to lethal and sublethal mercury treatments. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 73, 911-918.
13. Shah, L.S. and Altındağ, A. (2005). Alterations in the immunological parameters of tench (Tinca tinca) after acute and chronic exposure to lethal and sublethal treatments

- with mercury, cadmium and lead. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29, 1163-1168.
14. Zelikoff, J.T. (1998). Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals. *Toxicology*, 129, 63-71.
  15. Fajer-Avilla, E. J., Parra, I. S., Zarate, G. A., Contreas, R., Ramirez, J. Z. and Betancourt, M. (2003). Toxicity of formalin bullseye puffer fish and its effectiveness to control ectoparasites. *Aquaculture*, 223, 41-50.
  16. Abarzua, S. and Jakubowski, S. (1995). Biotechnological investigation for the prevention of biofouling. I. Biological and biochemical principles for the prevention of biofouling. *Marine Ecology Progress Series*, 123, 301-312.
  17. Maraldo, K. and Dahllöf, I. (2004). Indirect estimation of degradation time for zinc pyrithione and copper pyrithione in seawater. *Marine Pollution Bulletin*, 48(9-10), 894-901.
  18. DG Petersen, I Dahllof, LP Nielsen. (2004). Effects of zinc pyrithione and copper pyrithione on microbial community function and structure in sediments. *Toxicology and Chemistry*, 23 (4), 921-928.
  19. Birkhøj, M., Nellemann, C., Jarfelt, K., Jacobsen, H., Andersen, H. R., Dalgaard, M., and Vinggaard, A. M. (2004). The combined antiandrogenic effects of five commonly used pesticides. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 201(1), 10-20.
  20. Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G. ve Yönden, Z. (2015). Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6 (3), 331-336.
  21. E Tabakoğlu, R Durgut. (2013). Veteriner hekimlikte oksidatif stres ve bazı önemli hastalıklarda oksidatif stresin etkileri. *Avkae Dergisi*, 3(1), 69-75.
  22. Karpuzcu, M. (2007). *Çevre kirlenmesi ve kontrolü kitabı*. İstanbul: Kubbealtı Neşriyat
  23. KV Genjatulin. (1990). Controlling chemical and biological water pollution by quantitative bioassaying. *Water Research*, 24(5), 539-542.
  24. Ardalı, Y. (1990). *Endüstriyel atık sulardan metallerin adsorbisyon ile uzaklaştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, 19 Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
  25. Mihara M, Uchiyama M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*, 86(1), 271-8.
  26. Buege JA, Aust SD. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52, 302-10
  27. Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A. T., Zingraff, J. and Descamps-Latscha, B. (1996). Advanced oxidation protein

- products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney International*, 49(5), 1304-1313.
28. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
  29. Pallant, J.S. (2007). *SPSS survival manual book. a step by step guide to data analysis using Ibm SPSS*. England: Open Universty Press.
  30. İnternet: Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (2009). *Biyosidal Ürün Yönetmeliği*. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fcevre.sagligi.thsk.saglik.gov.tr%2F2013-08-28-13-18-43%2Fmevzuat%2F978-biyosidal-%25C3%25BCr%25C3%25BCnler-y%25C3%25B6netmeli%25C4%259Fi.html&date=2018-03-05>, Son Erişim Tarihi: 23.01.2018
  31. İnternet: Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (2015). *Biyosidal Ürün Yönetmeliği*. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fcevre.sagligi.thsk.saglik.gov.tr%2F2013-08-28-13-18-43%2Fmevzuat%2F978-biyosidal-%25C3%25BCr%25C3%25BCnler-y%25C3%25B6netmeli%25C4%259Fi.html&date=2018-03-05>, Son Erişim Tarihi: 23.01.2018
  32. İnternet: Arch Chemicals. (2010). *United states securities and exchange commission*. URL: [http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fgetfilings.com%2Fsec-filings%2F100219%2FARCH-CHEMICALS-INC\\_10-K%2F&date=2018-03-05](http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fgetfilings.com%2Fsec-filings%2F100219%2FARCH-CHEMICALS-INC_10-K%2F&date=2018-03-05), Son Erişim Tarihi: 23.01.2018
  33. Trombetto, B., D'Atanasio, E. and Massaia, A. (2015). Regional differences in the accumulation of SNPs on the male-specific portion of the human Y chromosome replicate autosomal patterns: Implications for genetic dating. *PLoS One*, 10(7), e0134646.
  34. Xu X, Guan YY, Tian T, Wu WP, Wang Q, Huang Y, Li GQ, Wang LY. (2011). Distribution of the intermediate hosts of *Echinococcus multilocularis* in Shiqu County, Sichuan, China. *Chinese Medical Journal* 124(18), 2834-7
  35. Grunnet KS, Dahllöf I. (2005). Environmental fate of the antifouling compound zinc pyrithione in seawater. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(12), 3001-6.
  36. Mochida, K., Ito, K., Harino, H., Kakuno, A., and Fujii, K. (2006). Acute toxicity of pyrithione antifouling biocides and joint toxicity with copper to red sea bream (*Pagrus major*) and toy shrimp (*Heptacarpus futilirostris*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(11), 3058-3064.
  37. Mihok, T., Košuth, P., Kočišová, A., Pekárik, L., Bártová, E., and Major, P. (2011). The intestinal parasite *Pseudocapillaria tomentosa* (Dujardin, 1843) of the invasive fish species topmouth gudgeon, *Pseudorasbora parva* (Temminck and Schlegel), in Slovakia. *Journal of Fish Diseases*, 34(9), 711-714.
  38. Ahamed, F., Cardoso, I. A., Ahmed, Z. F., Hossain, M. and Ohtomi, J. (2017). An overview of the genus *Plesionika* Bate, 1888 (Decapoda, Caridea, Pandalidae) in Asian waters. *Zootaxa*, 4221(5), 575-593.

39. He, X. S., Xi, B. D., Cui, D. Y., Liu, Y., Tan, W. B., Pan, H. W., and Li, D. (2014). Influence of chemical and structural evolution of dissolved organic matter on electron transfer capacity during composting. *Journal of Hazardous Materials*, 268, 256-263.
40. Duffus, J. H. (2002). Heavy metals a meaningless term, *Pure and Applied Chemistry*, 74(5), 793- 807.
41. Bera, A. K., Bera, A. and Roy, S. B. (2005). *Impact of heavy metal pollution in plants, development in physiology, Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 1, 105-124.
42. Marschner, H. (1995). Mineral nutrition of higher plants, *Academic Press*, 2 edition May 12, 899 p.
43. Robert, H. M. (1995). Contaminants in the Upper Mississippi River: Boston, Butterworth Publishers, 195-230.
44. Dean, J. G., Bosqui, F. L. and Lanouette, V. H. (1972). Removing heavy metals from waste water: *Environmental Science and Technology*, 6, 518-522.
45. Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S. (2004). Metallerin çevresel etkileri-I, *Metalurji Dergisi*, 136, 47-53.
46. Tsutsui, H., Ide, T., Shiomi, T., Kang, D., Hayashidani, S., Suematsu, N., Wen, J., Utsumi, H., Hamasaki, N., Takeshita, A. and et al. (2001). 8-oxodGTPase, which prevents oxidative stress-induced DNA damage, increases in the mitochondria from failing hearts. *Circulation*, 104(24), 2883-5.
47. Floyd, R.A. (1990). The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 11(9), 1447-50.
48. Berwick, M. and Vineis, P.J. (2000). Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review. *National Cancer Institute*, 92(11), 874-97.
49. Bohr, V. (2002). Repair of Oxidative DNA Damage in Nuclear and Mitochondrial DNA, and Some Changes with Aging in Mammalian Cells. *Free Radical Biology & Medicine Journal*, 32(9), 804-12.
50. Yndestad, A., Neurauter, C.G., Oie, E., Forstrom, R.J., Vinge, L.E, Eide, L., Luna, L., Aukrust, P. and Bjoras, M. (2009). Up-regulation of myocardial DNA base excision repair activities in experimental heart failure. *Mutation Research*, 666 (1-2), 32-8.
51. Hinton, D., E. and Lauren, D.J. (1990). Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes potential biomarkers of exposure. In: McCarthy, J.F., Shugart, L.R. (eds.). Lewis Publishers. Boca Raton: *Biomarkers of environmental contamination*, p:17-57.
52. Teh, S.J., Adams, S.M. and Hinton, D.E. (1997). Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquatic Toxicology*, 37, 51-70.



53. İnternet: İnsan Hakları Evrensel Bildirgesi. (1949). 25.Madde. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.danistay.gov.tr%2Fupload%2Finsanhaklarievrenselbeyannamesi.+&date=2018-03-05>, Son Erişim Tarihi: 23.01.2018
54. İnternet: Türkiye Cumhuriyeti Anayasası (1961). 49. Madde ve (1982), 56.Madde. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.tbmm.gov.tr%2Fanayasa%2Fanayasa61.htm&date=2018-03-05>, Son Erişim Tarihi:23.01.2018
55. Vousta, D., Grimanins, A., Sammara, C. (1996). Trace elements in vegetable grown in an industrial areas in relation to soil and air particulate matter, *Environmental Pollution*, 94(3), 325–335.
56. Alloway, B. J. (1990). *Heavy Metal in soils*. UK: Blackie Glasgow 368 p.
57. Forstner, U. (1984). *Changing metal cycles and human health*. Berlin: Technology, Medicine Verlag, 71-94.
58. Brooks, K.M. (2000). Assessment of the Environmental Effects Associated with Wooden Bridges Preserved with Creosote, Pentachlorophenol, or Chromated 113 Copper Arsenate. Madison, WI: U.S. *Department of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory*. FPL–RP–587, 100 p
59. Sorensen, EMB. (1991). Copper. In Sorensen, EMB, editor. *Metal Poisoning in Fish*. Washington: CRC, Boca Raton, 235–284.
60. Lontie, R. (1984). *Copper proteins and copper enzymes*. Washington: CRC Press, Boca Raton, 101-118.
61. Moore, B.K., Mitchell, A.J., Griffin, B.R. and Huffman, G.L. (1984). *Parasites and diseases of pond fishes. Third report of the fish farmers: US Fish and Wildlife Services*, Washington: CRC, Boca Raton, 165 – 176.
62. Straus, D.L. and Tucker, C.S. (1993). Acute toxicity of copper sulphate and chelated copper to channel catfish. *Journal of the World Aquaculture Society*, 24(3), 390-395.
63. Anonymous. (2003, November). Draft update of ambient water quality criteria for copper. *United States Environmental Protection Agency, US EPA*, 822-R-03-026. 86.
64. Addemir, O., Açma E. ve Arslan C. (1994). *Çinko*. İstanbul: Sistem Yayıncılık.
65. Valee, B.L. and Auld, D.A. (1990). Zinc coordination, function and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry*, 29(24), 5647-5659.
66. Vallee, B.L. and Falchuk, K.H. (1993). The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological Reviews*, 73, 79-118.
67. Berg, J.M. and Shi, Y. (1996). The galvanization of biology; a growing appreciation for the roles of zinc. *Science*, 271, 1081-1085

68. McMahon, R.J. and Cousins R.J. (1998). Mammalian zinc transporters. *Journal of Nutrition*, 128, 667-670.
69. Durmaz, E., Özmert, EN. (2010). Fitalatlar ve çocuk sağlığı. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 53, 305- 317.
70. C.B. Kimmel, W.W. Ballard, S.R. Kimmel, B.Ullmann, T.F. (1995). Schilling, “Stages Of Embryonic- Development Of The Zebrafish”, *Developmental Dynamycs*, 203, 253-310.
71. Z. Lele, P.H. (1996). Krone, “The Zebrafish As A Model System In Developmental, Toxicological And Transgenic Research”. *Biotechnology Advances*, 14, 57-72
72. Mills, D. (1994). *Akvaryum bakımı*. İstanbul: İnkılap Kitabevi.
73. Savaş ve Çevre. (2006-07). *Halk sağlığı semineri*. Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye.
74. Çakatay, U., Telci, A., Kayalı, R, Tekeli, F., Akcay, T. and Sivas, A. (2003). Relation of aging with oxidative protein damage parameters in the rat skeletal muscle. *Clinical Biochemistry*, 36 (1), 51-55.



**EKLER**

## Ek-1.Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 16/06/2017-E.87684



T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : 66332047-604.01.02-  
Konu : Değerlendirme ve Onay

**Sayın Doç. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL**  
**Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi**

Araştırmacı grubu Aylin Sepici DİNÇEL ve A.Çağlan GÜNAL(KARASU BENLİ), Rabia TURAL, Nagehan İPİÇÜRÜK'ten oluşan G.Ü.ET-17.038 kod numaralı ve "*Zebra Balıklarında Çinko ve Bakır Pritiyonun (Zn/Cu pyrithione) Çevresel Kirlenici Etkilerin (Danio rerio) Oksidatif ve Genotoksik Belirteçler ile Belirlenmesi*" başlıklı araştırma öneriniz; konu ile ilgili Yasa ve Yönetmelikler gereği balık ve benzeri türler ile yapılan çalışmalarda Etik Kurul raporuna gerek olmamasına rağmen araştırmacı grubunun isteği üzerine metodolojik ve deney hayvanları araştırma etiği çerçevesinde incelenmiş olup, Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelerine uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

**e-İmzalıdır**  
**Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ**  
**Kurul Başkanı**

Hayvan Türü: Zebra Balığı(Danio rerio)  
Hayvan Sayısı: 480

Ek:1 Liste





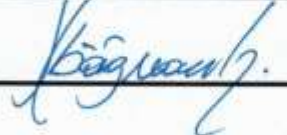



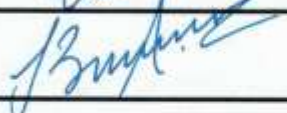
Arlıkara  
Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76  
e-Posta: hadyekt@gazi.edu.tr - İnternet Adresi: http://hadyek.gazi.edu.tr/

Bilgi için: Esengül BOÇNAK  
Genel Evrak Sorumlusu

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

## Ek-1.(Devam) Etik Kurul Onayı

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM**  
**LİSTESİ**

TOPLANTI TARİHİ :02.06.2017		TOPLANTI SAYISI : 05
ADI-SOYADI	İMZA	
Prof.Dr.Abdulkadir BEDİRLİ (Başkan)		
Uzm.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL (Başkan Yrd.)		
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU		
Prof.Dr.Tuncay PEKER		
Prof.Dr.Fatma AKAR	KATILMADI	
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIACIK		
Doç.Dr.Mecit Orhan ULUDAĞ	KATILMADI	
Doç.Dr.Süleyman YEŞİL	KATILMADI	
Doç.Dr.Emre BARIŞ		
Doç.Dr.İpek SÜNTAR		
Doç.Dr.Neşet Volkan ASAR		
Vet.Hek.Burcu AVCI		
Osman İÇ	KATILMADI	

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı Adı : İPİÇÜRÜK Nagehan  
 Uyuğu : T.C.  
 Doğum tarihi ve yeri : 1988, Kayseri  
 Medeni hali : Bekar  
 Telefon : 05074439287  
 e-mail : nagehan2235@gmail.com



### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/Tıbbi Biyokimya	Devam Ediyor
Lisans	Ege Üniversitesi/Biyokimya	2010
Lise	Mustafa Özkan Anadolu Lisesi	2006

### İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2017-Devam Ediyor	Gümrük ve Ticaret Bakanlığı	Memur
2015-2017	OSGB	C Sınıfı İş Güvenliği Uzmanı
2012-2013	Royal İlaç San.Tic.Ltd.Şti.	AR-GE Uzman Yardımcısı
2010-2012	Varyap San.Tic.Ltd.Şti.	Yönetici Asistanı

### Yabancı Dil

- İngilizce ( okuma ve yazma ileri seviyede konuşma iyi)
- Fransızca (başlangıç seviyesi)
- Almanca (başlangıç seviyesinde)

### Hobiler

Kitap okumak, Resim ve ebru yapmak, Fotoğraf çekmek, Yüzmek



*GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..*

