

TC  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

BAZI AĞIR METALLERİN SUBLETAL DOZLARININ  
GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDA (*ONCORHYNCHUS MYKISS*,  
WALBAUM 1792) KATALAZ, SÜPEROKSİT DİSMUTAZ,  
GULUTATYON PEROKSİDAZ ENZİM AKTİVİTELERİ VE mRNA  
EKSPRESYONLARI ÜZERİNE ETKİLERİ

Kübra ATABEYOĞLU

SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

ERZURUM  
2011

Her hakkı saklıdır



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

BAZI AĞIR METALLERİN SUBLETAL DOZLARININ GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDA (*ONCORHYNCHUS MYKISS*, WALBAUM 1792) KATALAZ, SÜPEROKSİT DİSMUTAZ VE GULUTATYON PEROKSİDAZ ENZİM AKTİVİTELERİ VE mRNA EKSPRESYONLARI ÜZERİNE ETKİLERİ

Prof.Dr. Orhan ERDOĞAN danışmanlığında, Kübra ATABEYOĞLU tarafından hazırlanan bu çalışma 19/12/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof.Dr. Muhammed ATAMANALP

İmza :

Üye : Prof.Dr. Orhan ERDOĞAN

İmza :

Üye : Prof.Dr. Serap PULATSÜ

İmza :

Üye : Doç.Dr. Şükrü BEYDEMİR

İmza :

Üye : Yrd.Doç.Dr. Memiş ÖZDEMİR

İmza :

(imza)

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

**Enstitü Müdürü**

**Prof.Dr. Ömer AKBULUT**

Bu çalışma BAP projesi kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: BAP-2010/48

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

Doktora Tezi

BAZI AĞIR METALLERİN SUBLETAL DOZLARININ GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDA  
(*ONCORHYNCHUS MYKISS*, WALBAUM 1792) KATALAZ, SÜPEROKSİT DİSMUTAZ,  
GULUTATYON PEROKSİDAZ ENZİM AKTİVİTELERİ VE mRNA EKSPRESYONLARI ÜZERİNE  
ETKİLERİ

Kübra ATABEYOĞLU

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Su Ürünleri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

Bu çalışmada, aynı koşullarda yetiştirilmiş olan Gökkuşuğu alabalıklarına (*Oncorhynchus mykiss*) 0,16 mg/lit ve 0,32 mg/lit bakır klorür, 0,94 mg/lit ve 1,89 mg/lit çinko klorür, 3,25 mg/lit ve 6,5 mg/lit nikel klorür, 2,25 µg/lit ve 4,5 µg/lit kadmiyum klorür uygulanmıştır. Ağır metal uygulamasının balıkların karaciğer, böbrek ve kas dokularında enzim aktiviteleri ve yalnız kas dokusunda ise gen ekspresyonları üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Gökkuşuğu alabalıklarında CAT % aktivitesi için bakır ağır metal uygulaması sonrası alınan karaciğer dokusu hariç diğer karaciğer dokularının CAT aktivitelerinde istatistiksel düzeyde farklılık tespit edilmiştir. CAT enzim aktiviteleri bakır ve çinko uygulaması sonrası alınan böbrek dokusuna ait istatistiksel analizde farklı bulunmamıştır. Çinko ağır metali uygulaması sonrası alınan kas dokusu hariç diğer kas dokularının CAT aktiviteleri önemsiz bulunmuştur. Cu, Zn, Ni ve Cd uygulaması sonrası Gökkuşuğu alabalıkların karaciğer ve kas dokularının SOD aktivitelerinde istatistiksel düzeyde farklılık tespit edilememiştir. Bakır ve çinkoya maruz kalmış alabalıkların SOD aktiviteleri böbrek dokularında önemli bulunmuştur. GSH-Px % aktivitesi Cu, Zn, Ni ve Cd'a maruz kalmış alabalıkların karaciğer dokularında istatistiksel düzeyde farklı, kas dokularında ise farksız bulunmuştur. Nikel ağır metaline maruz kalmış alabalıkların böbrek dokularında GSH-Px aktivitesi önemli bulunmuştur.

Ayrıca kadmiyum ağır metaline maruz kalan alabalıkların kas dokularının gen ekspresyonları arasında önemli bir farklılık saptanamamıştır. Diğer üç ağır metalin uygulanması sonucu balıklardan alınan kas dokularında ise gen ekspresyonları açısından bazı önemli farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Cu, Zn, Ni ve Cd uygulaması sonrası enzim aktivitesi ve gen ekspresyonunun ortak dokusu olan kas dokusu için CAT ve SOD genlerinin ekspresyonları ile CAT ve SOD enzim aktiviteleri istatistiksel olarak benzer sonuçlar gösterirken, GSH-Px gen ekspresyonu ile GSH-Px enzim aktivitesi sonuçları farklılık göstermiştir.

**2011, 132 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Ağır metal, Gökkuşuğu alabalığı, antioksidan enzimler, gen ekspresyonu

## ABSTRACT

PhD Thesis

EFFECTS OF SUBLETHAL DOSES OF SOME HEAVY METALS ON THE CATALASE, SUPEROXIDE DISMUTASE, GLUTATION PEROXIDASE ENZYME ACTIVITIES AND mRNA EXPRESSIONS IN RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS*, WALBAUM 1792)

Kübra ATABEYOĞLU

Atatürk University  
Graduate School of Natural and Applied Science  
Department of Fisheries

Supervisor: Prof.Dr. Orhan ERDOĞAN

In the present study, *Oncorhynchus mykiss* growing under the same conditions were applied to 0,16 mg/lit and 0,32 mg/lit copper chloride, 0,94 mg/lit and 1,89 mg/lit zinc chloride, 3,25 mg/lit and 6,5 mg/lit nickel chloride, 2,25 µg/lit and 4,5 µg/lit cadmium chloride. Effects of heavy metal treatment were investigated on various tissues of fish, enzyme activities and gene expressions.

In *Oncorhynchus mykiss*, differences were found in liver tissues to be statistically significant for CAT activities (%) excepting liver tissue taken after copper heavy metal treatment. CAT enzyme activities after copper and zinc treatments were not statistically significant. CAT activities in all tissues except for treated with zinc were found to be statistically insignificant. SOD activities in the liver and muscle tissues of *Oncorhynchus mykiss* were found to be statistically insignificant after Cu, Zn, Ni and Cd treatment. SOD activity of *Oncorhynchus mykiss* treated with copper and zinc was found to be statistically significant in kidney tissue. There were statistically significant differences in GSH-Px (%) activity in the liver tissues of *Oncorhynchus mykiss* treated with Cu, Zn, Ni and Cd while no statistically significant differences were seen in muscle tissues. GSH-Px activity was found to be significant in kidney tissue of fish treated with nickel.

In addition, there were no statistically significant differences between the gene expression of muscle tissues treated with cadmium while there were some differences in gene expression of fish treated with other three heavy metals.

CAT and SOD gene expressions and CAT and SOD enzyme activities had the similar results for Cu, Zn, Ni and Cd treatment in muscle tissues while the results of GSH-Px gene expression and GSH-Px enzyme activity were different.

**2011, 132 pages**

**Keywords:** Heavy metal, rainbow trout, antioxidant enzymes, gene expression

## TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu alıŐma Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Fakóltesinde yapılmıştır.

BAP-2010/48 nolu bilimsel araştırma projesi ile tezimi maddi olarak destekleyen Atatürk Üniversitesi Rektörlüğu Bilimsel Araştırma Fonuna teşekkür ederim.

Tezim süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen tez izleme komitesi ve jüri üyeleri; danıŐmanım Sayın Prof.Dr. Orhan ERDOĞAN, dekanım Sayın Prof.Dr. Muhammed ATAMANALP, Sayın Doç.Dr. Şükrü BEYDEMİR, Sayın Yrd.Doç.Dr. Memiş ÖZDEMİR ve Sayın Prof.Dr. Serap PULATSÜ'ye, desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Sayın ArŐ.Gör.Dr. Ömer ATABEYOĞLU, Sayın Yrd.Doç.Dr.ERCÜMENT AKSAKAL'a ve bölümümdeki diğer hocalarım ve arkadaşlarıma teŐekkürlerimi sunarım.

ÇalıŐmam boyunca sabırlarını, teŐvik ve desteklerini esirgemeyen, her zaman ve her güçlükte yanımda olan, yaşamın zorluklarını göğüslemeyi ve yılmamayı öğreten annem F. Nilgün ATABEYOĞLU, babam YaŐar ATABEYOĞLU ve abim Ömer ATABEYOĞLU'na sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

Kübra ATABEYOĞLU  
Aralık 2011

## İÇİNDEKİLER

|  |           |
|--|-----------|
| ÖZET.....  | i         |
| ABSTRACT.....  | ii        |
| ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....   | iii       |
| SİMGELER DİZİNİ.....   | vi        |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....   | viii      |
| ÇİZELGELER DİZİNİ.....   | xii       |
| <b>1. GİRİŞ.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2. KAYNAK ÖZETLERİ.....</b>   | <b>28</b> |
| <b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>  | <b>46</b> |
| 3.1. Materyal.....   | 46        |
| 3.1.1. Araştırma yeri.....   | 46        |
| 3.1.2. Su materyali.....   | 46        |
| 3.1.3. Deneme ünitesi.....   | 46        |
| 3.1.4. Balık materyali.....  | 47        |
| 3.1.5. Uygulanan ağır metaller.....  | 47        |
| 3.1.6. CAT, SOD ve GSH-Px enzim genleri için primer ve prob dizaynı.....     | 49        |
| 3.1.7. Kullanılan kimyasal maddeler.....                                     | 50        |
| 3.1.7.a. RNA izolasyonunda kullanılan kimyasal maddeler.....                 | 50        |
| 3.1.7.b. Elektroforezde kullanılan kimyasal maddeler.....                    | 51        |
| 3.1.7.c. cDNA kütüphanesinin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler... | 51        |
| 3.1.7.d. Homojenat hazırlamada kullanılan kimyasal maddeler.....             | 51        |
| 3.1.7.e. Enzim aktivitesinde kullanılan çözeltiler.....                      | 51        |
| 3.1.7.f. Multipleks real time PCR’da kullanılan kimyasal maddeler.....       | 52        |
| 3.1.8. Yararlanılan alet ve ekipmanlar.....                                  | 52        |
| 3.2. Yöntem.....   | 52        |
| 3.2.1. Balıklara kimyasal uygulaması.....                                    | 52        |
| 3.2.2. Balıklardan doku örneklerinin alınması.....                           | 53        |
| 3.2.3. Enzim aktivite tayini için homojenat hazırlama.....                   | 54        |
| 3.2.3.a. Kullanılan çözeltilerin hazırlanışları.....                         | 54        |
| 3.2.3.b. Homojenat hazırlama.....  | 54        |

|   |            |
|---|------------|
| 3.2.4. Antioksidan enzimlerin (CAT, SOD, GSH-Px) aktivite tayini..... | 55         |
| 3.2.4.a. Kullanılan çözeltilerin hazırlanışları.....                  | 55         |
| 3.2.4.b. Katalaz enzim aktivitesinin ölçülmesi.....                   | 56         |
| 3.2.4.c. Süperoksit dismutaz enzim aktivitesinin ölçülmesi.....       | 57         |
| 3.2.4.d. Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesinin ölçülmesi.....      | 58         |
| 3.2.5. Total RNA ve mRNA izolasyonu.....                              | 59         |
| 3.2.6. Total RNA'nın kalitatif tayini.....                            | 60         |
| 3.2.6.a. RNA örneğinin hazırlanması.....                              | 60         |
| 3.2.6.b. Agaroz jelin hazırlanması.....                               | 60         |
| 3.2.6.c. Elektroforez kuvvet solüsyonu.....                           | 60         |
| 3.2.6.d. Örneklerin jele yüklenmesi.....                              | 61         |
| 3.2.7. cDNA kütüphanesinin oluşturulması.....                         | 61         |
| 3.2.8. cDNA'nın kantitatif tayini.....                                | 62         |
| 3.2.9. Multipleks kantitatif gen ekspresyonu (real time PCR).....     | 62         |
| 3.2.10. İstatistiksel analizler.....                                  | 64         |
| <b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....</b>                        | <b>65</b>  |
| 4.1. Araştırma bulguları.....   | 65         |
| 4.1.1. RNA görüntüsü.....   | 65         |
| 4.1.2. Homojenat eldesi.....  | 66         |
| 4.1.3. Antioksidan enzimlerin aktivite ölçümleri.....                 | 67         |
| 4.1.3.a. CAT.....   | 67         |
| 4.1.3.b. SOD.....   | 68         |
| 4.1.3.c. GSH-Px.....  | 69         |
| 4.1.4. Nanometrik ölçüm.....  | 70         |
| 4.1.5. Multipleks real time PCR.....                                  | 71         |
| 4.1.6. İstatistiksel sonuçlar.....                                    | 72         |
| 4.1.6.a. CAT, SOD ve GSH-Px enzim aktivite sonuçları.....             | 72         |
| 4.1.6.b. Gen ekspresyonu sonuçları.....                               | 95         |
| <b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>                                      | <b>102</b> |
| KAYNAKLAR.....  | 109        |
| EKLER.....  | 119        |
| ÖZGEÇMİŞ.....   | 120        |

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

|                                 |                                   |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| A                               | Adenin                            |
| Ag                              | Gümüş                             |
| BFB                             | Brom fenol blue (yükleme tamponu) |
| bp                              | Baz çifti                         |
| BSA                             | Sığır albümin                     |
| C                               | Sitozin                           |
| CAT                             | Katalaz                           |
| Cd                              | Kadmiyum                          |
| cDNA                            | Komplementer DNA                  |
| CdCl                            | Kadmiyum klorür                   |
| cm                              | Santimetre                        |
| Cr                              | Krom                              |
| Cu                              | Bakır                             |
| CuCl                            | Bakır klorür                      |
| CuCl <sub>2</sub>               | Bakır klorür                      |
| ddH <sub>2</sub> O              | Distile steril su                 |
| DNA                             | Deoksiribonükleik asit            |
| dNTP                            | Deoksinükleotid trifosfat         |
| DPEC                            | Dietil pirokarbonat               |
| DTT                             | Dithiothreito                     |
| E                               | Ekstinsiyon katsayısı             |
| EDTA                            | Etilen diamin tetra asetat        |
| EtBr                            | Etidyum bromür                    |
| g                               | Gram                              |
| G                               | Guanin                            |
| GAPDH                           | Glyceraldehyde-3P-dehydrogenase   |
| GSH                             | Redükte glutatyon                 |
| GSH-Px                          | Glutatyon peroksidaz              |
| Hg                              | Civa                              |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>   | Hidrojen peroksid                 |
| kg                              | Kilogram                          |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | Potasyum dihidrojenfosfat         |
| LC50                            | Öldürücü doz                      |
| lt                              | Litre                             |
| mg                              | Miligram                          |
| MOPS                            | Morpholinopropanesulphonic asit   |
| mRNA                            | Mesajcı RNA                       |



|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| MT                              | Metallotiyonin   |
| $\mu$                           | Mikro  |
| $\mu\text{g}$                   | Mikrogram  |
| NaCl                            | Sodyum klorür  |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | Sodyum karbonat  |
| NADPH                           | Nikotinamid adenin dinükleotidfosfat                                     |
| NBT                             | Nitro blue tetrazolium   |
| Ni                              | Nikel  |
| NiCl                            | Nikel klorür   |
| nm                              | Nanometre  |
| PCR                             | Polimeraz zincir reaksiyonu  |
| pH                              | Bir çözeltinin asitlik veya alkalinite derecesini tarif eden ölçü birimi |
| Pb                              | Kurşun   |
| RNA                             | Ribonükleik asit   |
| rRNA                            | Ribozomal RNA  |
| RNaseOUT                        | Rekombinant ribonükleaz inhibitörü                                       |
| RT-PCR                          | Reverstranskriptaz-PCR   |
| SOD                             | Süperoksit dismutaz  |
| tRNA                            | Transfer RNA   |
| U                               | Urasil   |
| UV                              | Ultraviyole  |
| Zn                              | Çinko  |
| ZnCl                            | Çinko klorür   |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| Şekil 1.1. Metalin su ortamında izlediği yol .....  | 2  |
| Şekil 1.2. Metallerin çevrede devri .....   | 3  |
| Şekil 1.3. Ağır metallerin besin zinciriyle balıklara geçişi .....  | 4  |
| Şekil 1.4. Toksik elementlerin organizmadaki fizyolojik yolları ve biyolojik<br>yanıtları.....                                    | 7  |
| Şekil 1.5. Gökkuşuğu alabalığı ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) .....   | 13 |
| Şekil 1.6. RNA'nın yapısı .....   | 19 |
| Şekil 1.7. Real Time PCR'in 3 temel fazı .....  | 23 |
| Şekil 1.8. Taqman Real Time PCR .....   | 25 |
| Şekil 1.9. Real time PCR'daki temel göstergeler .....   | 26 |
| Şekil 3.1. Deneme ünitesi .....   | 47 |
| Şekil 3.2. Alabalık anatomisi .....   | 53 |
| Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan kas, solungaç, karaciğer ve böbrek dokuları .....   | 54 |
| Şekil 3.4. Real time PCR protokolü .....  | 63 |
| Şekil 4.1. Elde edilen RNA'nın görüntüsü .....  | 65 |
| Şekil 4.2. Elde edilen homojenatların görüntüsü .....   | 66 |
| Şekil 4.3. Amplifikasyon grafiği .....  | 71 |
| Şekil 4.4. GAPDH primer etkinlik oranı .....  | 72 |
| Şekil 4.5. Katalaz primer etkinlik oranı .....  | 72 |
| Şekil 4.6. Süperoksit dismutaz primer etkinlik oranı .....  | 73 |
| Şekil 4.7. Glutasyon peroksidaz primer etkinlik oranı .....   | 73 |
| Şekil 4.8. Subletal bakır dozlarına maruz kalmış Gökkuşuğu alabalıklarının<br>karaciğer dokularında katalaz % aktiviteleri .....  | 74 |
| Şekil 4.9. Subletal bakır dozlarına maruz kalmış Gökkuşuğu alabalıklarının<br>böbrek dokularında katalaz % aktiviteleri .....     | 75 |
| Şekil 4.10. Subletal bakır dozlarına maruz kalmış Gökkuşuğu alabalıklarının kas<br>dokularında katalaz % aktiviteleri .....       | 75 |
| Şekil 4.11. Subletal çinko dozlarına maruz kalmış Gökkuşuğu alabalıklarının<br>karaciğer dokularında katalaz % aktiviteleri ..... | 76 |
| Şekil 4.12. Subletal çinko dozlarına maruz kalmış Gökkuşuğu alabalıklarının   |    |

|   |    |
|---|----|
| böbrek dokularında katalaz % aktivitelemi   | 76 |
| Şekil 4.13.Subletal çinko dozlarına maruz kalmış Gökkuşuğı alabalıklarının kas dokularında katalaz % aktivitelemi                   | 77 |
| Şekil 4.14.Subletal nikel dozlarına maruz kalmış Gökkuşuğı alabalıklarının karaciğer dokularında katalaz % aktivitelemi             | 78 |
| Şekil 4.15.Subletal nikel dozlarına maruz kalmış Gökkuşuğı alabalıklarının böbrek dokularında katalaz % aktivitelemi                | 78 |
| Şekil 4.16.Subletal nikel dozlarına maruz kalmış Gökkuşuğı alabalıklarının kas dokularında katalaz % aktivitelemi                   | 79 |
| Şekil 4.17.Subletal kadmiyum dozlarına maruz kalmış Gökkuşuğı alabalıklarının karaciğer dokularında katalaz % aktivitelemi          | 80 |
| Şekil 4.18.Subletal kadmiyum dozlarına maruz kalmış Gökkuşuğı alabalıklarının böbrek dokularında katalaz % aktivitelemi             | 80 |
| Şekil 4.19.Subletal kadmiyum dozlarına maruz kalmış Gökkuşuğı alabalıklarının kas dokularında katalaz % aktivitelemi                | 81 |
| Şekil 4.20.Subletal bakır dozlarına maruz kalmış Gökkuşuğı alabalıklarının karaciğer dokularında süperoksit dismütaz % aktivitelemi | 82 |
| Şekil 4.21.Subletal bakır dozlarına maruz kalmış Gökkuşuğı alabalıklarının böbrek dokularında süperoksit dismütaz % aktivitelemi    | 82 |
| Şekil 4.22.Subletal bakır dozlarına maruz kalmış Gökkuşuğı alabalıklarının kas dokularında süperoksit dismütaz % aktivitelemi       | 83 |
| Şekil 4.23.Subletal çinko dozlarına maruz kalmış Gökkuşuğı alabalıklarının karaciğer dokularında süperoksit dismütaz % aktivitelemi | 83 |
| Şekil 4.24.Subletal çinko dozlarına maruz kalmış Gökkuşuğı alabalıklarının böbrek dokularında süperoksit dismütaz % aktivitelemi    | 84 |
| Şekil 4.25.Subletal çinko dozlarına maruz kalmış Gökkuşuğı alabalıklarının kas dokularında süperoksit dismütaz % aktivitelemi       | 84 |
| Şekil 4.26.Subletal nikel dozlarına maruz kalmış Gökkuşuğı alabalıklarının karaciğer dokularında süperoksit dismütaz % aktivitelemi | 85 |
| Şekil 4.27.Subletal nikel dozlarına maruz kalmış Gökkuşuğı alabalıklarının böbrek dokularında süperoksit dismütaz % aktivitelemi    | 85 |

|  |    |
|--|----|
| Şekil 4.28.Subletal nikel dozlarına maruz kalmış Gökkuşağı alabalıklarının kas dokularında süperoksit dismütaz % aktiviteleri .....          | 86 |
| Şekil 4.29.Subletal kadmiyum dozlarına maruz kalmış Gökkuşağı alabalıklarının karaciğer dokularında süperoksit dismütaz % aktiviteleri.....  | 86 |
| Şekil 4.30.Subletal kadmiyum dozlarına maruz kalmış Gökkuşağı alabalıklarının böbrek dokularında süperoksit dismütaz % aktiviteleri.....     | 87 |
| Şekil 4.31.Subletal kadmiyum dozlarına maruz kalmış Gökkuşağı alabalıklarının kas dokularında süperoksit dismütaz % aktiviteleri .....       | 87 |
| Şekil 4.32.Subletal bakır dozlarına maruz kalmış Gökkuşağı alabalıklarının karaciğer dokularında glutatyon peroksidaz % aktiviteleri .....   | 88 |
| Şekil 4.33.Subletal bakır dozlarına maruz kalmış Gökkuşağı alabalıklarının böbrek dokularında glutatyon peroksidaz % aktiviteleri .....      | 88 |
| Şekil 4.34.Subletal bakır dozlarına maruz kalmış Gökkuşağı alabalıklarının kas dokularında glutatyon peroksidaz % aktiviteleri .....         | 89 |
| Şekil 4.35.Subletal çinko dozlarına maruz kalmış Gökkuşağı alabalıklarının karaciğer dokularında glutatyon peroksidaz % aktiviteleri .....   | 90 |
| Şekil 4.36.Subletal çinko dozlarına maruz kalmış Gökkuşağı alabalıklarının böbrek dokularında glutatyon peroksidaz % aktiviteleri .....      | 90 |
| Şekil 4.37.Subletal çinko dozlarına maruz kalmış Gökkuşağı alabalıklarının kas dokularında glutatyon peroksidaz % aktiviteleri .....         | 91 |
| Şekil 4.38.Subletal nikel dozlarına maruz kalmış Gökkuşağı alabalıklarının karaciğer dokularında glutatyon peroksidaz % aktiviteleri .....   | 92 |
| Şekil 4.39.Subletal nikel dozlarına maruz kalmış Gökkuşağı alabalıklarının böbrek dokularında glutatyon peroksidaz % aktiviteleri .....      | 92 |
| Şekil 4.40.Subletal nikel dozlarına maruz kalmış Gökkuşağı alabalıklarının kas dokularında glutatyon peroksidaz % aktiviteleri .....         | 93 |
| Şekil 4.41.Subletal kadmiyum dozlarına maruz kalmış Gökkuşağı alabalıklarının karaciğer dokularında glutatyon peroksidaz % aktiviteleri..... | 93 |
| Şekil 4.42.Subletal kadmiyum dozlarına maruz kalmış Gökkuşağı alabalıklarının böbrek dokularında glutatyon peroksidaz % aktiviteleri .....   | 94 |
| Şekil 4.43.Subletal kadmiyum dozlarına maruz kalmış Gökkuşağı alabalıklarının  |    |

|   |     |
|---|-----|
| kas dokularında glutatyon peroksidaz % aktiviteleri .....   | 94  |
| Şekil 4.44. Subletal bakıra maruz kalmış Gökkuşığı alabalığının kas dokularında katalaz mRNA seviyeleri .....                 | 95  |
| Şekil 4.45. Subletal çinkoya maruz kalmış Gökkuşığı alabalığının kas dokularında katalaz mRNA seviyeleri .....                | 96  |
| Şekil 4.46. Subletal nikele maruz kalmış Gökkuşığı alabalığının kas dokularında katalaz mRNA seviyeleri .....                 | 96  |
| Şekil 4.47. Subletal kadmiyuma maruz kalmış Gökkuşığı alabalığının kas dokularında katalaz mRNA seviyeleri .....              | 97  |
| Şekil 4.48. Subletal bakıra maruz kalmış Gökkuşığı alabalığının kas dokularında süperoksit dismütaz mRNA seviyeleri .....     | 98  |
| Şekil 4.49. Subletal çinkoya maruz kalmış Gökkuşığı alabalığının kas dokularında süperoksit dismütaz mRNA seviyeleri .....    | 98  |
| Şekil 4.50. Subletal nikele maruz kalmış Gökkuşığı alabalığının kas dokularında süperoksit dismütaz mRNA seviyeleri .....     | 99  |
| Şekil 4.51. Subletal kadmiyuma maruz kalmış Gökkuşığı alabalığının kas dokularında süperoksit dismütaz mRNA seviyeleri .....  | 99  |
| Şekil 4.52. Subletal bakıra maruz kalmış Gökkuşığı alabalığının kas dokularında glutatyon peroksidaz mRNA seviyeleri .....    | 100 |
| Şekil 4.53. Subletal çinkoya maruz kalmış Gökkuşığı alabalığının kas dokularında glutatyon peroksidaz mRNA seviyeleri .....   | 100 |
| Şekil 4.54. Subletal nikele maruz kalmış Gökkuşığı alabalığının kas dokularında glutatyon peroksidaz mRNA seviyeleri .....    | 101 |
| Şekil 4.55. Subletal kadmiyuma maruz kalmış Gökkuşığı alabalığının kas dokularında glutatyon peroksidaz mRNA seviyeleri ..... | 101 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| Çizelge 1.1. Temel endüstrilerden atılan metal türleri .....                    | 3  |
| Çizelge 1.2. Sucul ortamda ağır metallerin kabul edilebilir değerleri .....     | 5  |
| Çizelge 1.3. Balık dokularında ağır metallerin kabul edilebilir değerleri ..... | 5  |
| Çizelge 1.4. Ağır metallerin insan üzerindeki toksik etkileri .....             | 6  |
| Çizelge 1.5. FAMRA ve TAMRA floresan boya ların dalga boyları .....             | 25 |
| Çizelge 1.6. Ağır metallerin letal (LC <sub>50</sub> , öldürücü) dozları .....  | 27 |
| Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan suyun kimyasal özellikleri .....            | 46 |
| Çizelge 3.2. Bakır klorür .....   | 48 |
| Çizelge 3.3. Çinko Klorür .....   | 48 |
| Çizelge 3.4. Nikel Klorür .....   | 48 |
| Çizelge 3.5. Kadmiyum Klorür .....  | 49 |
| Çizelge 3.6. Primer dizilimi .....  | 50 |
| Çizelge 3.7. Uygulanan subletal dozlar .....                                    | 52 |
| Çizelge 3.8. Katalaz .....  | 56 |
| Çizelge 3.9. Süperoksit dismütaz .....  | 57 |
| Çizelge 3.10. Glutasyon peroksidaz .....  | 58 |
| Çizelge 3.11. Multipleks real time PCR reaksiyon karışımı .....                 | 63 |
| Çizelge 4.1. Katalaz'ın % aktivitesi .....                                      | 67 |
| Çizelge 4.2. Süperoksit dismütaz'ın % aktivitesi .....                          | 68 |
| Çizelge 4.3. Glutasyon peroksidaz'ın % aktivitesi .....                         | 69 |
| Çizelge 4.4. cDNA'ların saflık değerleri ve konsantrasyonları .....             | 70 |

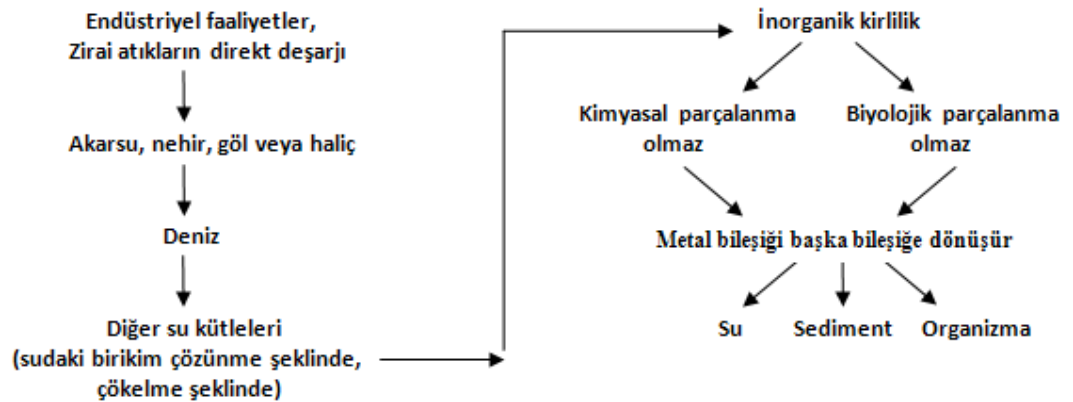
## 1. GİRİŞ

İçinde bulunduğumuz yüzyılda ülkemizde ve dünyadaki organik maddeler, evsel atıklar, tarım gübreleri ve ağır metaller gibi kirletici unsurlar doğal ortamları tahrip etmekte, gün geçtikçe suyun kalitesini bozmakta ve su canlılarına da zarar (hastalık, ölüm vs.) vermektedirler. Sucul ortamda, en fazla bu kirleticileri bünyelerine solungaçlar, vücut yüzeyi ve sindirim sistemi yoluyla alan balıklar etkilenmektedir. En toksik kirletici, vücutta birikme özelliğinden dolayı ağır metallerdir. Bu kalıcı özelliğinden dolayı ağır metaller hem balığın hem de onu tüketen insanın sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir.

Sürekli artan dünya nüfusu, çarpık kentleşme, plansız ve bilinçsiz endüstrileşme, verimi arttırmak amacıyla kullanılan tarım ilaçları, yapay gübreler ve deterjan gibi rahat yaşamı sağlayan kimyasal maddeler giderek çevreyi kirletmektedir. Bunu, artan kirlilik sonucu doğal dengenin bozulmasından, insan ve hayvan sağlığının tehlike altında olmasından, besin kirlenmelerinden ayrıca su ürünleri çerçevesinde bakılırsa doğal kaynaklarda su ürünlerinin hızla azalmasından ve değerli balık türlerinin birçoğunun yok olma sınırına dayanmış olmasından anlamaktayız (Sonal 1994). Webb and Gagnon (2002)'a göre ekosistemde canlılar arasındaki dengeyi bozan kirleticileri organik ve inorganik kirleticiler olarak sınıflandırmak mümkündür. Bu kirleticiler metaller, pestisitler, poliklorlu bifeniller, poliaromatik hidrokarbonlar'dır. Bunlar organizmalara toksik etki yapmaktadırlar (Taylan ve Özkoç 2007). Metaller ve diğer inorganik atıklardan oluşan kirleticiler çok çeşitli kaynaklardan ortaya çıkabilmeleri, yaygın bir kirlenme nedeni oluşturmaları, daima biyolojik sistemlere yönelik etki göstermeleri ve kolaylıkla besin zincirine girerek gelişmiş canlılarda artan yoğunluklarda birikebilmeleri nedeniyle diğer kimyasal kirleticiler arasında ayrı bir öneme sahiptirler (Erdoğan vd 2004; Erdoğan vd 2005; Erdoğan ve Ateş 2006). Serfor-Armah *et al.* (2001)'a göre kirleticilerden organik kontaminantların aksine, inorganik kökenli olan ağır metaller konsantrasyonlarını ya da toksisitelerini azaltan parçalanma işlemine uğramazlar. Bazı ağır metaller akutik organizmalara doğrudan zehirli olan çoğu deniz ve nehir organizması tarafından önemli seviyelerde birikirler. Bu birikim, hem sahil ortamındaki canlılar üzerinde metallerin

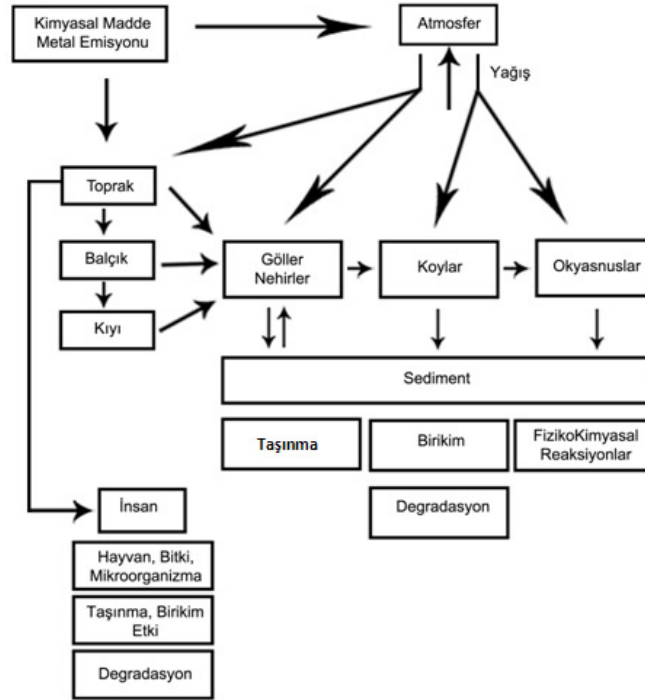
muhtemel zararlı etkileri, hem de insan sağlığı üzerindeki potansiyel etkileri açısından bir fikir verir (Taylan ve zko 2007).

Kirleticilerin bir bölümünü oluşturan ağır metaller, metal bileşikleri ve çeşitli mineraller; gller, nehirler, körfez ve okyanuslar ile bunların sedimentlerinde geniş bir şekilde yayılmıştır (Bryan and Uysal 1978; Erdoğrul vd 2005). evre ve besin kirlenmesine neden olan binlerce kimyasal madde arasında metal kalıntılarının önemli bir payı vardır. Doğal olarak havada, toprakta ve sularda bulunan metallerle özellikle son yarım yüzyılda dünyanın önemli lde kirlendiği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Sonal 1994). Rainbow (1995)'a göre metal kirliliğinin çoğu sularda birikir. Sulardaki birikim, znme şeklinde olabileceği gibi, znmeden suların dibinde çökelme şeklinde de olabilir. Bu şekilde bir kirlenme endüstriyel ve zirai atıklardan meydana geldiği gibi herhangi bir yolla atmosfere verilen metal türü maddelerden de meydana gelebilir. Atmosfere verilen metal türü maddeler sonunda yeryüzüne dönerler ve akarsular yolu ile su yataklarına sürüklenirler. Metaller, organik kirleticiler gibi kimyasal ve biyolojik yollarla parçalanmazlar, bir metal bileşiği başka bir metal bileşiğine dönüşür. Dönüşme ne olursa olsun metal iyonu kaybolmaz (şekil 1.1, 1.2) (Taylan ve zko 2007).



şekil 1.1. Metalin su ortamında izlediği yol (Rainbow 1995)





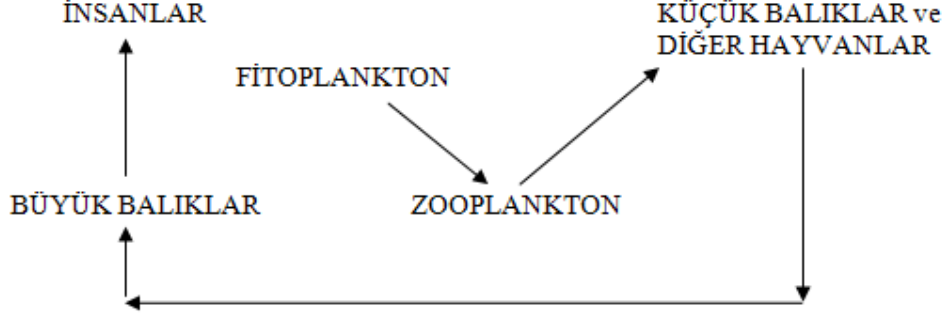
Şekil 1.2. Metallerin çevrede devri (Vural 2005)

Endüstriyel üretimler arasında çimento, demir-çelik, termik santraller, cam, çöp ve atık çamur yakma tesisleri gibi alanlar önde gelmektedir. Çizelge 1.1’de bazı endüstri gruplarından atılan metal türlerinin dağılımı görülmektedir (Bakar ve Baba 2009).

Çizelge 1.1. Temel endüstrilerden atılan metal türleri (Kahvecioğlu vd 2009)

| Endüstri                | Cd | Cu | Ni | Zn |
|-------------------------|----|----|----|----|
| Kağıt Endüstrisi        | -  | +  | +  | -  |
| Petrokimya              | +  | -  | -  | +  |
| Klor-alkali Üretimi     | +  | -  | -  | +  |
| Gübre Sanayi            | +  | +  | +  | +  |
| Demir-Çelik Sanayi      | +  | +  | +  | +  |
| Enerji Üretimi (Termik) | +  | +  | +  | +  |

Ağır metallerin doğaya yayınımları dikkate alındığında çok çeşitli sektörlerden farklı işlem kademelerinden biyosfere ağır metal atılımı gerçekleştiği bilinmektedir (Şekil 1.3).



**Şekil 1.3.** Ağır metallerin besin zinciriyle balıklara geçişi (Tumantozlu 2010)

Metaller erozyonla taşınan kaya parçalarıyla, rüzgarın taşıdığı tozla, volkanik aktivitelerle, ormanların yanmasıyla ve bitki örtüsüyle sulara taşınır. Denizdeki metaller, birçok nehrin bu denize katılımı sonucu birikir. Ayrıca bu nehirlerin endüstriyel ya da kentsel bölgelerden geçmesi sonucu insan atıkları nedeniyle birikim çok daha fazla olabilir. Suda çözünür halde bulunan metaller çökerek sedimentte birikir, özellikle de nehrin denizle birleştiği geniş kısımlarda ağır metallerin birikimi daha yoğundur (Fergusson 1990).

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın su ürünleri yönetmeliğine göre sucul ortamdaki ve balık dokularındaki ağır metallerin kabul edilebilir değerleri Çizelge 1.2 ve Çizelge 1.3'de verilmiştir (Anonim 2002).

**Çizelge 1.2.** Sucul ortamda ağır metallerin kabul edilebilir değerleri (Anonim 2002)

| <b>Ağır Metaller</b> | <b>Kabul Edilebilir Değer<br/>(mg/lt)</b> |
|----------------------|---|
| Cu                   | 0,010                                     |
| Zn                   | 0,003                                     |
| Cd                   | 0,010                                     |
| Ni                   | 0,300                                     |

Değişik yollardan canlı bünyesine alınan ağır metal iyonları her organ ve dokuda farklı düzeyde birikmektedir. Canlı bünyesinde çeşitli metabolik olaylara katıldıktan sonra vücut dışına atılabilen metallerden fizyolojik öneme sahip olanlar depolanır. Eğer bunlar toksik metallerden biri ise enzimlerin yapısını bozabilmekte ve bazen de hücre içersinde özel bir şekilde bağlanarak toksik etkileri ortadan kaldırılabilmektedir (Yazkan vd 2004).

**Çizelge 1.3.** Balık dokularında ağır metallerin kabul edilebilir değerleri (Anonim 2002)

| <b>Ağır Metaller</b> | <b>Kabul Edilebilir Değer<br/>(mg/kg)</b> |
|----------------------|---|
| Cd                   | 0,1                                       |
| Cu                   | 20  |
| Zn                   | 50  |

Sucul ortamlarda yüksek oranda çözünürlüğe sahip olan ve mikroorganizmalar tarafından kolayca absorbe edilebilen toksik ağır metaller gıda zinciri yolu ile balıklara geçerler. Balıklarda biriken ağır metaller de besin yoluyla insan vücuduna girerler. Kabul edilebilen limitlerin üzerinde vücuda alınan ağır metaller ciddi sağlık sorunlarına neden olurlar. Ağır metallerin insan sağlığı üzerine olumsuz etkileri Çizelge1.4'de verilmiştir (Anonim 2011a).

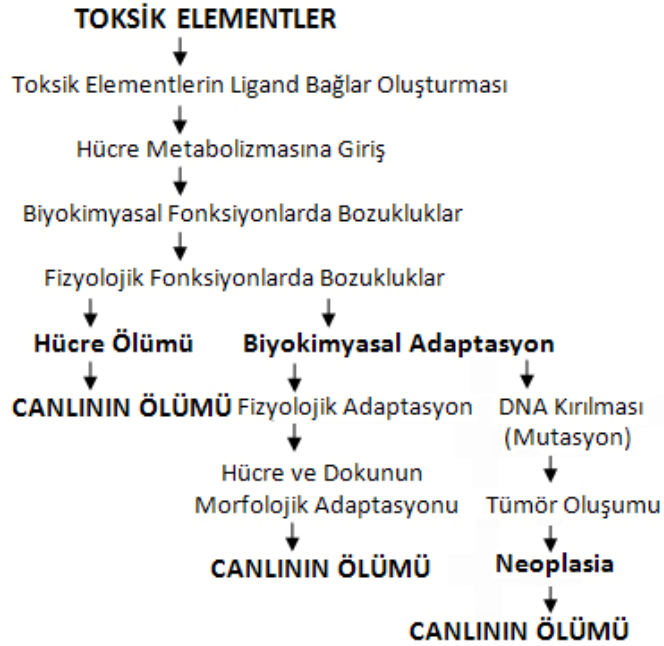
**Çizelge 1.4.** Ağır metallerin insan üzerindeki toksik etkileri (Anonim 2011 a)

| Ağır Metaller | Toksin Etkileri   |
|---------------|---|
| Zn (II)       | Depresyon, uyuşukluk, felç ve adalelerde uyum bozukluğu gibi nörolojik belirtiler, artan susuzluk |
| Cu (II)       | Karaciğer tahribatı, Wilson hastalığı, uykusuzluk   |
| Cd (II)       | Böbrek tahribatı, böbrek bozukluğu, insanla ilgili kansorejen                                     |
| Ni (II)       | İltihap, mide bulantısı, kronik astım, öksürme, insanla ilgili kansorejen                         |

Organizma, su ortamındaki ağır metali ya çözünmüş halde solüsyondan ya da ağır metali daha önceden bünyesine almış başka bir organizmanın besin olarak tüketilmesiyle alır. Alınan ağır metalin organizmada kullanım ihtiyacının teorik olarak tahminini yapmak mümkündür. Ancak metabolizmada kullanılmayan, potansiyel formdaki (birikme eğiliminde) metal toksik olur ve sonuçta toksikliğin azaltılması ya da metalin vücuttan atılması gerekir. Bünye için gerekli olmayan kadmiyum, kurşun, cıva gibi metaller minimum konsantrasyonda dahi canlıya gerekli değildir, metabolizmadan detoksifiye olmalıdırlar (Rainbow 2002).

Toksik bir madde “herhangi bir organizmada veya onun yavrularında ölüme, hastalığa, anormal davranışlara, fiziksel veya üreme bozukluklarına ya da fiziksel deformasyonlara neden olabilen, besin zinciri veya diğer maddelerle birleşmesi durumundaki konsantrasyonlarda zehirlenme etkisi oluşturabilen madde” olarak tanımlanmaktadır. Bir maddenin toksisitesi ise hedef bölgede maruz kalınan biyolojik olarak kullanılabilir konsantrasyonu ile belirlenir. Biyolojik olarak kullanılabilir bölüm ise; hedef bölgedeki etkili konsantrasyonun tam olarak belirlenmesi oldukça güç olan vücut hasarları ile belirlenebilir (Kurt 2000).

Bu bağlamda Kasap ve Dilbirliği (1995)’ne göre ağır metaller hücrelerde plazmanın sertleşmesine, şişme ve büzülme neden olur. Proteinleri de çöktürürler, bunun sonucu solunum sıklığı ve oksijen tüketimi de azalır (Şekil 1.4) (Güney 2007).



**Şekil 1.4.** Toksik elementlerin organizmadaki fizyolojik yolları ve biyolojik yanıtları (Kayhan vd 2009)

Su ortamındaki metalin canlı üzerindeki etkisi, ekolojik ihtiyaçlar, metabolizma, besin, sediment ve diğer faktörlerle (mevsimsel değişimler, tuzluluk, sıcaklık, interaktif ajanlar) değişebilmektedir (Bryan 1976).

Bigersson *et al.* (1988)'a göre ağır metaller biyolojik proseslere katılma derecelerine göre yaşamsal ve yaşamsal olmayan olarak sınıflandırılırlar. Yaşamsal olarak tanımlananların organizma yapısında belirli bir konsantrasyonda bulunmaları gereklidir ve bu metaller biyolojik reaksiyonlara katıldıklarından dolayı düzenli olarak besinler yoluyla alınmaları zorunludur. Örneğin bakır hayvanlarda ve insanlarda kırmızı kan hücrelerinin ve birçok oksidasyon ve redüksiyon prosesinin vazgeçilmez parçasıdır. Buna karşın Duffus and Worth (1996)'a göre yaşamsal olmayan ağır metaller çok düşük konsantrasyonda dahi psikolojik yapıyı etkileyerek sağlık problemlerine yol açabilmektedirler. Bu gruba en iyi örnek kükürtlü enzimlere bağlanan cıvadır.

Bir ağır metalin yaşamsal olup olmadığı dikkate alınan organizmaya da bağlıdır. Örneğin nikel bitkiler açısından toksik etki gösterirken, hayvanlarda iz elementi olarak bulunması gerekir. Bazı sistemlerde ağır metallerin etki mekanizması konsantrasyona bağlı olarak da değişir. Bu tür organizmalarda metallerin konsantrasyonu dikkate alınmalıdır (Kahvecioğlu vd 2009).

Ağır metaller konsantrasyon sınırını aştıkları zaman toksik olarak etki gösterirler. Bu genel gösterimin aksine ağır metaller canlı bünyelerde sadece konsantrasyonlarına bağlı olarak etki göstermezler, etki canlı türüne ve metal iyonunun yapısına bağlıdır (çözünürlük değeri, kimyasal yapısı, redoks ve kompleks oluşturma yeteneği, vücuda alınış şekline, çevrede bulunma sıklığına, lokal pH değeri vb.). Bu nedenle özellikle düzenli olarak tüketildiğinden dolayı içme sularının ve yiyeceklerin içerebileceği maksimum konsantrasyon sınır değerleri sınırlandırılmıştır ve yasal kuruluşlar tarafından düzenli olarak kontrol edilmesi zorunludur (Kahvecioğlu vd 2009).

Aberhart *et al.* (1984) ve Eduljee *et al.* (1985) tarafından bildirildiğine göre kadmiyum 1817 yılında keşfedilmiş toksik bir metaldir. Endüstriyel kullanımı 50 yıl öncesine dayanır (Baş ve Demet 1992). Her zaman çinko ile kombinasyon halinde bulunur. Kadmiyum ayrıca, endüstrilerde çinko, kurşun ve bakır ekstraksiyonunun kaçınılmaz yan ürünüdür. Doğaya başlıca toprak yolu ile girmektedir, çünkü kadmiyum gübre ve pestisitlerde bulunmaktadır (Anonim 2011b). Diğer ağır metaller içinde suda çözünme özelliği en yüksek olan elementtir. Bu nedenle doğada yayılım hızı yüksektir ve insan yaşamı için gerekli elementlerden değildir. Suda çözünebilir özelliğinden dolayı  $Cd^{2+}$  halinde bitki ve deniz canlıları tarafından biyolojik sistemlere alınır ve akümüle olma özelliğine sahiptir (Kahvecioğlu vd 2009). Massoud *et al.* (1981)'a göre toprak ve suda biriken kadmiyum, önce sudaki mikroroganizmalara, buradan da besinlerle hayvan ve insanlara geçmektedir (Baş ve Demet 1992). Günümüzde endüstriyel olarak nikel/kadmiyum pillerde, korozyona karşı özellikle denizel koşullara dayanımı nedeniyle gemi sanayinde çeliklerin kaplanmasında, boya sanayinde, PVC stabilizatörü olarak, alışımlarda ve elektronik sanayinde kullanılır. Kadmiyum fosfatlı gübrelerde, deterjanlarda ve rafine petrol türevlerinde bulunur ve bunların çok yaygın kullanımı

sonucunda da önemli miktarda kadmiyum kirliliği ortaya çıkar. Anonim 2011c'e göre kadmiyumun yıllık doğaya yayılım miktarı 25000 – 30000 tondur ve bunun 4000 – 13000 tonu insan faaliyetlerine bağlı olarak ortaya çıkar (Kahvecioğlu vd 2009). Et, balık ve sebzelerde 1-50 µg/kg, tahıllarda 10-150 µg/kg ve daha yoğun konsantrasyonlarda da hayvan karaciğer ve böbreklerinde bulunur. Gıdalarla yüksek düzeylerde kadmiyum alınması akut toksikasyona neden olur (Baş ve Demet 1992). Hollis *et al.* (1999) ve Wong and Wong (2000) yaptıkları çalışmalara göre sudaki kadmiyum balıkların vücut yüzeyi ve solungaçları ile etkileştikten sonra diğer dokulara geçmektedir. DeConto *et al.* (1999), De Smet *et al.* (2001), Wu *et al.* (1999) ve Serafim *et al.* (2002)'e göre karaciğer dokusu ağır metallerin taşınmasında ve detoksifikasyonunda görev yapan metalloproteinin (MT) ve benzeri proteinlerin başlıca sentez yerlerinden biri olduğu için, kadmiyum detoksifikasyonundaki işlevi oldukça fazladır. Ancak kadmiyum birikim düzeyi bakımından, özellikle kronik çalışmalarda karaciğer dokusuna göre birikimin en fazla böbrek dokusunda olduğu belirlenmiştir. Hapke (1991) ve Şanlı ve Kaya (1995) tarafından kadmiyum düzeyinin balıklarda 10-60 ppb (µg/l) dolayında bulunduğu belirtilmiştir. Ülkemizde Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Su Ürünleri Yönetmeliği (2003) ve Tebliğine (2004) göre kabul edilebilir en yüksek değer olarak Cd için 0,1 mg/l'tir. Güven ve Öztürk (2005)'e göre balıklarda 96 saat süredeki kadmiyumun letal etkisi 11,7 µg/l'den başlamaktadır. Kronik etkileşimde ise 0,5 ve 5,2 µg/l konsantrasyonlarda balıkların yarısı 168 ve 408 saatte ölmektedir. Balık embriyo ve yavrularının çok daha hassas olduğu da bir gerçektir. Katalay ve Parlak (2004)'e göre düşük konsantrasyonlarda bile su canlıları için son derece zararlı etkilere sahiptir. Kadmiyumun özellikle çevre kirliliği görülen denizlerde su canlısının vücuduna alınarak birikmekte olduğu ve değişik seviyelerde zararlı toksik etkiler meydana getirdiği görülmüştür. Serafim *et al.* (2002), Clark (2003)'e göre kadmiyumun hedef organı böbrektir. Kirliliğin söz konusu olmadığı yörelerde su ortamının kadmiyum düzeyi 0,01-5 µg/l arasında ve genellikle 2 µg/l'nin altındadır. Ancak endüstriyel kirliliğin yoğun olduğu yörelerde suların kadmiyum düzeyi 1000 µg/l'ye ulaşabilmektedir. Egemen ve Sunlu (2003)'ya göre alabalıklar için letal kadmiyum derişimi 8 µg/l'dir. Kadmiyuma ek olarak ortamda çinko ve bakır bulunursa balıklar üzerindeki toksik etkinin daha da arttığı belirtilmektedir. Tuzluluk, kadmiyum birikimini etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Kadmiyum toksisitesi ile ilgili

yapılan birçok çalışmada tatlı su canlılarının kadmiyuma daha duyarlı oldukları tespit edilmiştir (Kayhan 2006).

Çinko beslenme açısından esansiyel bir metaldir. Deniz ürünleri, et, tahıl, kanatlılardan elde edilen ürünler ve kabuklu yemişler yüksek oranda çinko içerirler. Saltes and Bailey (1984)'e göre aşırı çinko alımına bağlı zehirlenmeler yaygın değildir (Baş ve Demet 1992). Çinko insanlarda protein sentezinde, büyüme ve seksüel olgunlaşmada kritik rol oynar. Yara iyileşmesi, tad ve koku duyuları için önemlidir. İnsülin ve porfirin metabolizmasındaki enzimlerin aktivitelerinde rol oynar (Anonim 2011b). Belirli konsantrasyonlarda çinko sulardaki mikroflorayı olumsuz yönde etkiler. Balıklar için toksisite sınırı 0,3 mg/lt (sert olmayan sulara 0,15 mg/lt)'dir. Bakır ve nikel, çinkonun zehir etkisini arttırmırlar. İçme suyunda 5 mg/lt çinko zararsız sayılmaktadır (Anonim 2011d).

Çinko, canlı organizmalar için gerekli bir iz elementtir. Biyolojik sistemlerde yalnız +2 değerlikli olarak bulunur. Yaklaşık 300 enzimin yapısına girer. Çinko taşıyan metallo enzimlerden karbonik anhidraz, alkalın fosfataz, RNA ve DNA polimerazlar, alkol dehidrogenaz, glutamik asit dehidrogenaz, süperoksit dismutaz gibi pek çok enzimin integral bir komponentidir. Çinko içeren enzimlerin; karbonhidrat, lipid ve nükleik asit metabolizmasında, protein sentezinde önemli fonksiyonları vardır (Vallae 1959). Çinko zehirliliği fazla olan bir metal değildir. Çinko bileşiklerinin toksik etkisi su sertliğine, oksijen miktarına ve sıcaklığa bağlıdır. Çinkonun etki şekli henüz bilinmemekle beraber solungaç dokusunu tahribata uğrattığı saptanmıştır (Kandil 1988).

Nikel, çevrede çok düşük seviyede bulunan bir elementtir. Gıda maddeleri, doğal olarak küçük miktarlarda nikel içerir. Aslında nikelin az miktarda alınması vücut için gereklidir; fakat aşırı dozda alınırsa insan sağlığı için tehlikeli olabilir (Anonim 2011b). Bu metalin zararlılık sınırı balıklar için 1-5 mg/lt, küçük su canlıları için ise 3-4 mg/lt'dir. 6 mg Ni/lt dozu sudaki mikrobiyolojik olayları engeller (Anonim 2011d).



Bakır çok yaygın bir ağır metaldir ve doğal olarak bulunur. Bakır birçok çeşitli gıdada, içme suyunda ve havada bulunabilir. Bakırın absorpsiyonu gereklidir, çünkü bakır insan sağlığı için gerekli olan bir iz elementtir (Anonim 2011b). Bakır küçük canlılar için de yüksek derecede zehirlidir. Hafif alkali sularda hidroksit, çürüyen organik madde içeren sularda sülfür şeklinde çökelir. Bakır balıklar için kuvvetli bir zehirdir. Alabalıklar için toksite sınırı 0,14 mg Cu/lt'dir (Cu çözünen tuz olarak suda bulunuyorsa). Sert sularda zehir etkisi daha azdır. Suda çözülmüş halde bulunan diğer tuzlar bakırın zehir etkisini azaltır. 2,5 mg Cu/lt yüksek su bitkilerine zarar vermez. İçme sularında en fazla 0,05 mg Cu/lt bulunmaktadır (Anonim 2011d).

Bakır tuzları halinde veteriner hekimlik ve tarımda geniş şekilde kullanılır. Böcek öldürücü ya da fungusid amaçla kullanımı sonucunda ve bakır işletmeleri çevresinde sulara karışabilir (Kaya vd 2002). Balıklar tarafından bakırın alınması büyük oranda solungaçlar ve besinlerle olmaktadır. Bakırın vücuttan atılması ise idrar ve dışkı yolu ile olmaktadır (Kargın ve Erdem1989). Hayati öneme sahip enzimlerin etkinliklerinin bakır tarafından engellenmesi karaciğerin görevinin bozulmasına sebep olur. Bakır düzeyinin vücutta artışına bağlı olarak balıkta solunum güçlükleri ve hareket bozuklukları görülür (Kaya vd 2002).

Selinus *et al.* (2005), Bilir ve Yıldız (2004), TC Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı (1985), Chuang (2005), Eto (2000)'ya göre metallerle ilgili sağlık problemleri yeryüzünde kullanılmaya başlanması ile birlikte gözlenmeye başlanmıştır. Kurşun ile sağlık arasındaki ilişki her ne kadar günümüzde daha iyi tanımlanmış olsa da etkileri çok eski zamanlardan beri bilinmektedir. Metallerle insan sağlığı arasındaki ilişkilerin en tipik örneklerinden birisi Japonya'nın Minamata Körfezi'nde gözlenen metilcıva salgınıdır. 1950'li yıllarda Minamata Körfezinde atıklarını doğrudan denize boşaltan kimyasal fabrikalar bulunmaktaydı. Bu fabrikalardan bazıları katalizatör olarak inorganik cıva kullanmaktaydı ve bunun bir kısmı denize dökülmeden metilleniyordu. Mikroorganizmalar inorganik cıvayı metilcıvaya dönüştürmekte, daha sonra da planktonlar tarafından tutulmaktadır. Planktonlar aracılığı ile balıklara geçen metilcıva besin zinciri yolu ile insanlara ulaşmaktadır. Bu yolla 1953 yılında görülen

zehirlenmede 46 ölüm olmuştur. Minamata hastalığının yarattığı salgın ve benzeri olaylar, dünyanın değişik bölgelerinde, özellikle de sanayileşme ile birlikte daha sık gözlenir olmuştur. Metallerin, özellikle de ağır metallerin yarattığı sağlık problemlerinin çoğu ileri derecede tanı ve tedavi olanakları gerektiren kronik hastalıklar ya da kanserlerdir (Bakar ve Baba 2009).

Yukarıda görüldüğü üzere kirlenen çevre, canlılar için zararlı, yaşamı etkileyen ve çeşitli hastalıklara neden olan tehlikeli bir ortam durumuna gelmektedir. Bu ağır metaller besin zinciri yoluyla canlılarda birikmekte ve insana kadar ulaşmaktadır. Son yıllarda suçlu ortamdaki kirliliklerin etki mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik toksikoloji çalışmalarında moleküler yöntemlerin kullanılması en çok tercih edilen metotlardan biridir. Ancak şu ana kadar ülkemizde toksikoloji ve moleküler biyoloji çalışmalarını ortak bir şekilde içeren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Gen teknolojisi, yaklaşık 40 yıl içinde tıp ve tarım başta olmak üzere ormancılıktan çevre mühendisliğine, enerji sektöründen kozmetik endüstrisine kadar yaşamın hemen her alanında etkisini göstermiş durumdadır. Genetik materyal kullanılarak yapılan çalışmalarda güvenilirlik oranı oldukça yüksektir. Yine günümüzde genetik materyal kullanılarak yapılan çalışmaların popüleritesinin ve bilim sahasındaki kabul edilebilirlik oranının oldukça yüksek oluşu da dikkat çekicidir. Dolayısıyla toksikoloji ile ilgili yapılan çalışmalarda kirletici ve kimyasalların suçlu organizmalara olan etkisinin gen ekspresyonuna bağlı olarak belirlenmesi büyük önem arz etmektedir.

Çalışmada materyal olarak iç sularımızda bulunan, dünyada yüzlerce yıldır kültürü yapılan, gıda olarak oldukça kaliteli olan ve bundan dolayı insanlar tarafından fazlaca tüketilen Gökkuşığı alabalığı kullanılmıştır.

Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), 1882 yılında Kuzey Amerika'dan Avrupa'ya, getirilmiş olan bir alabalık türüdür. Gökkuşığı alabalığı 80 cm uzunluğa ve 10 kilo ağırlığa varabilir. Şekil 1.5'de görüldüğü gibi yan tarafındaki kıvrık çizgisi ile göze çarpar. Dere Alabalığına çok benzer ama kıvrık noktaları onunkinden daha belirgindir, kafası daha kısadır ve çenesinin alt kısmı özellikle erkek bireylerde üreme

zamanında daha öne çıkmıştır (Anonim 2010a). Gökkuşığı alabalığı Kamchatka'daki örneklerle dayanılarak 1792'de Johann Julius Walbaum tarafından isimlendirilmiştir (Anonim 2010b). Ülkemize 1970'lı yıllarda gelen gökkuşığının taksonomik sınıflandırılması ile ilgili olarak 30'dan fazla tür ismi tanımlanmıştır. Uzun yıllar *Salmo gairdneri* R. ismiyle bilinmiştir. Ancak 1988'de Amerika Balıkçılık Derneği Balık İsimlendirme Komitesi, bütün Pasifik Alabalık ve Salmonlar için *Oncorhynchus*'un cins ismi olarak kullanılmasını ve böylelikle, Atlantik Alabalık ve Salmonlardan ayırt edilmesini kararlaştırmıştır. Böylece gökkuşığının tür ismi olarak bilinen *Salmo gairdneri* yerine *Oncorhynchus mykiss* tür ismi olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu isim değişikliği uluslararası düzeyde de kabul görmüştür (Emre 2004). Son zamanlarda DNA çalışmaları Rainbow trout'un genetik olarak Brown trout (*Salmo trutta*) veya Atlantic salmondan (*Salmo salar*) daha çok Pasifik salmonuna (*Oncorhynchus* türleri) yakın olduğunu göstermiştir (Anonim 2010b).



**Şekil 1.5.** Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)

Bu çalışmada Gökkuşığı alabalığının toksik ağır metallere maruz kaldığında, hücrelerin zarar görmesini önleyen antioksidan enzimlerin aktivitelerindeki değişimler ve gen ekspresyonlarında meydana gelen değişimler moleküler olarak incelenmiştir.

Antioksidanlar vücut hücrelerine hasar veren serbest radikallerin yarattığı oksidasyon oluşumunu yavaşlatan veya önleyen moleküllerdir. Antioksidanlar vitamin ve mineral gibi besin öğeleri ve vücuttaki kimyasal reaksiyonları destekleyen protein yapısındaki

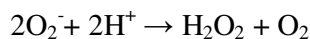
enzimlerdir (Anonim 2011e). Elliot (1999)'e göre serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddelere “antioksidan” adı verilir.

Cheeseman and Slater (1993) ve Isbir (1994)'e göre reaktif oksijen türlerinin düzeylerini ve bunların meydana getirdiği hasarı sınırlandırmak için canlılarda antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve/veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler (Kılbaş 2006).

Diplock (1998)'a göre antioksidanlar mekanizmalarına göre, birincil ve ikincil antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Birincil antioksidanlar; mevcut radikallerle reaksiyona girerek bunların daha zararlı formlara dönüşmelerini ve yeni serbest radikal oluşumunu önleyen bileşiklerdir. Birincil antioksidan kategorisinde yer alan süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) gibi enzim sistemleri serbest radikalleri yok etme yeteneğindedir. Bu enzimler genel olarak serbest radikallerin DNA, proteinler ve lipidler gibi hücrenel bileşenlere zarar vermesini sınırlandırmak suretiyle bir hücrenel bölgeden diğesine geçişini de önleyebilmektedirler (Anonim 2011f).

Antioksidan savunma sistemi enzimatik (glutatyon peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon reduktaz) ve enzimatik olmayan savunma sistemi (vitamin E, vitamin A, glutatyon) olarak da sınıflandırılabilir (Akay 2004).

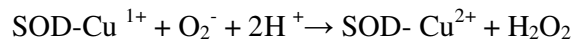
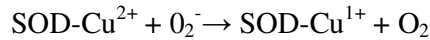
Gürdal ve Ademoğlu (2005), Onat vd (2002)'e göre süperoksit dismutaz (SOD) enzimi, süperoksit radikalının hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizlemektedir. SOD enzimi, süperoksit düzeylerini kontrol etmede önemli bir rol üstlenmektedir.



Bu reaksiyon spontan olarak meydana gelebilir, fakat SOD tarafından katalizlendiğinde reaksiyon hızı yaklaşık 4000 kat artabilmektedir. İnsanda SOD'un üç tipi bulunmaktadır. Bunlardan ikisi sitozolde bulunan dimerik, Cu ve Zn içeren izomer (Cu/Zn-SOD) ile mitokondride bulunan tetramerik, Mn ihtiva eden izomerdir (Mn-SOD). Üçüncü tip ise ekstraselüler SOD'dir. SOD'nin ekstraselüler aktivitesi çok düşüktür. Genel olarak, hücrede en bol bulunan izomer sitozolik Cu/Zn- SOD'dir (Kılbaş 2006).

Enzimin primer fonksiyonu, hücreleri süperoksit radikalinin zararlı etkilerinden korumaktır. Bu şekilde hücrelerdeki lipid peroksidasyonu da inhibe edilmiş olur (Kılbaş 2006).

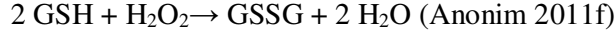
Gürdal ve Ademoğlu (2005), Onat vd (2002)'e göre süperoksit dismutazın süperoksit anyon radikaline etkisi şu şekildedir. Süperoksit anyonu,  $\text{Cu}_2^+$  ve bir arginin rezidüsü'nün guanido grubuna bağlanır. Bu bağlanma sonucunda süperoksitten bir elektron  $\text{Cu}_2^+$  'a transfer olurken  $\text{Cu}_1^+$  ve moleküler oksijen meydana gelir. İkinci bir süperoksit anyonu  $\text{Cu}_1^+$  'dan bir elektron, bağlanma ortağından ise iki proton alarak hidrojen peroksidi oluştururken, enzim tekrar  $\text{Cu}_2^+$  formuna dönmüş olur.



SOD, fagosite edilen bakterilerin intrasellüler öldürülmesinde de rol oynamaktadır. Bu nedenle, SOD granülosit fonksiyonu için çok önemlidir (Kılbaş 2006).

SOD, oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunan ve  $\text{O}_2^-$ 'nin  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'e dismutasyonunu katalizleyen bir metalloenzimdir (Fridovich 1995).

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumludur. Tetramerik yapıdadır ve 4 selenyum (kofaktor) atomu ihtiva etmektedir.



Diyetteki selenyum desteği enzim aktivitesini modüle etmektedir. Enzim aktivitesi heksoz monofosfat yolunda üretilen NADPH'a bağımlıdır. Düşük konsantrasyonlardaki  $\text{H}_2\text{O}_2$ , öncelikle GSH-Px tarafından temizlenir. Bu enzim, redükte glutasyonun okside glutatyonu çevrildiği ortamda hidrojen peroksidi yüksek spesifite ile detoksifiye etmektedir. Redükte glutasyonun (GSH) okside glutatyon (GSSG) haline dönüştüğü reaksiyonda GSH-Px enzimiyle hidrojen peroksit suya indirgenmiş olur. Daha sonra glutasyon redüktaz enziminin katalizlediği reaksiyon ile NADPH harcanarak, okside glutatyon redükte hale dönüştürülür (Kılbaş 2006).

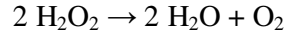
Gürdal ve Ademoğlu (2005), Onat vd (2002)'e göre GSH-Px'in, fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmelerini engeller. Eritrositlerde de GSH-Px oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksidin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar.

Sitosolik glutasyon peroksidaz (GPx; EC 1.11.1.9) sitosolde ve mitokondriyal matriksde bulunur (Yılmaz 2010).

Katalaz (CAT), Gürdal ve Ademoğlu (2005), Onat vd (2002)'e göre glikoprotein yapısında bir hemoproteindir. Enzimin molekül ağırlığı 240.000 daltondur. Her biri ferriprotoporfirin grubu içeren dört adet alt üniteden oluşmuştur. Ferriprotoporfirin, prostetik grubunda +3 değerlikli Fe atomu bulunan protoporfirin IX halkasıdır.

Eritrositler yüksek oranda CAT içermekte olup, CAT aktivitesinin %98'den fazlasını sağlarlar. CAT enzim aktivitesinin en yüksek olduğu dokular karaciğer ve böbrek dokularıdır. Enzim dokularda başlıca mitokondri ve peroksizom partiküllerine bağlı

olarak bulunmaktadır. Bundan başka endoplazmik retikulum ve sitoplazmada da aktivite göstermektedir. CAT, okside edici enzimlerin etkisiyle ortamda oluşan hidrojenperoksidi direkt olarak suya dönüştürür. Ortamdaki hidrojen peroksit konsantrasyonunun düşük olduğu durumlarda hidrojen peroksidi substrat olarak kullanan diğer antioksidan enzimler (GSH-Px) devreye girerek hidrojen peroksidi ortamdan uzaklaştırırlar. Aynı etkileri gösteren CAT ve GSH-Px enzimleri, hücre içi yerleşimleri ve etki yerleri bakımından farklılıklar gösterirler. CAT enzimi peroksizomlarda daha etkin iken, GSH-Px enzimi başlıca sitozol ve mitokondride etkindir.



CAT'ın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit ve metil-etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine ise etki etmez (Kılbaş 2006).

Hemen hemen tüm aerobik hücrelerde CAT (EC 1.11.1.6) bulunur. Balıklarda, amfibilerde ve memelilerde karaciğer, böbrek, kalp ve beyinde yüksekten düşüğe doğru aktivite dağılımı gösterip hiçbir ekstraselüler sıvıda bulunmaz (Ahmad 1995).

Moleküler biyoloji son yıllarda önem kazanan genetik, biyokimya, hücre biyolojisi ve biyofizik gibi dalların gelişmesiyle ortaya çıkmıştır. Canlı organizmada hayati önemleri oldukça fazla olan nükleik asitler, proteinler ve enzimlerin yapılarının tamamen aydınlatılması moleküler biyolojinin ilgi alanıdır (Atabeyoğlu 2007).

Bir organizmanın genetik yapısını DNA'da bulunan deoksiribonükleotid dizeleri belirler. Her ne kadar genetik bilgi DNA moleküllerinde depolanmışsa da, bu bilginin ifade edilmesi "ribonükleikasit"lerle (RNA) sağlanır. DNA'nın belirli bölgelerinden genetik bilgi kopyalanarak RNA moleküllerinin üzerine aktarılır. Bu olaya transkripsiyon denilir. Transkripsiyon çok seçici bir işlemdir. DNA bölgelerinden çok miktarda replikasyon yapılırken bazı bölgelerinden hiç yapılmamaktadır.

Transkripsiyonun ikinci önemli özelliği ise oluşan RNA'ların sonra bazı değişimlere uğramasıdır. Bu değişimler:

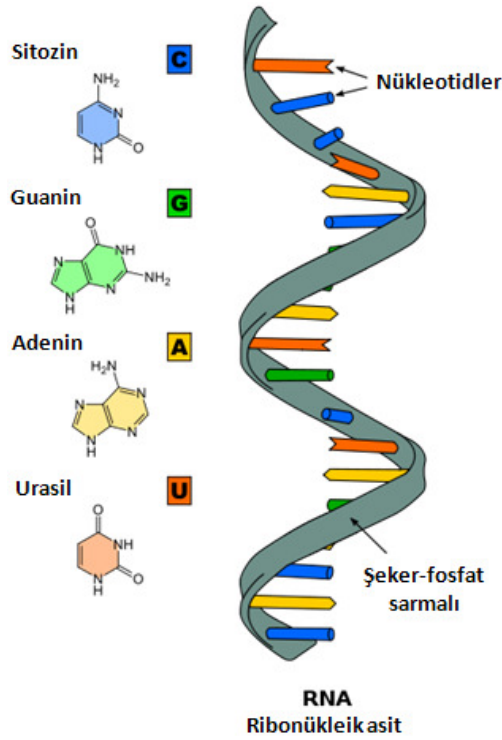
- RNA zincir uçlarına bazı bazların eklenmesi, değiştirilmesi ve çıkarılması
- RNA zincir iç kısımlarından bazı bazların (intronlar: protein kodlamayan bölümler) çıkarılması
- RNA'nın bazı yerlerden kesilmesi olarak sayılabilir. Bu işlemler sayesinde inaktif primer RNA daha işlevsel bir molekül haline çevrilir.

RNA'nın özellikleri,

- Riboz
- A, G, C, U
- Tek zincir
- G=C, A=U
- m, t, r, Hn ve SnRNA tipleri vardır
- Alkali ile muamele edilince hidroliz olur
- Nükleaz aktivitesi vardır

DNA benzeri RNA molekülleri de düz zincirlidir ve fosfodiester bağı ile birleşmiş mononükleotidlerden oluşur (Şekil 1.6) (Anonim 2011g).





**Şekil 1.6.** RNA'nın yapısı (Anonim 2011h)

Transkripsiyon, RNA polimeraz tarafından katalizlenen DNA kalıptan RNA sentezlenme işidir. RNA polimerazda temel olarak DNA'yı 3'→ 5' yönünde okur ve 5'→ 3' yönünde tek sarmallı bir RNA molekülü sentezler. RNA polimeraz bir primere gereksinim göstermez ve direkt olarak yeni zinciri sentezleyebilir. Sentezlenen RNA protein sentezine girmeden önce modifiye edilir (Anonim 2011g).

Transkripsiyonla RNA'ya kopyalanan, bir protein molekülüne ait genetik bilgilerin okunması veya bir protein molekülü haline çevrilmesine translasyon adı verilir (Anonim 2011ı).

Protein sentezinde üç tip RNA rol oynar:

- Ribozomal RNA (rRNA)
- Transfer RNA (tRNA)
- Mesajcı RNA (mRNA)

rRNA'lar ribozomlarda bulunan RNA'dır. Değişik proteinlerle beraber rRNA'lar ribozomları oluşturur. Hücredeki RNA'nın %80'lik kısmını oluşturur. Ribozomlar protein sentezinin olduğu yerlerdir. Ökaryotik hücrelerde 28S, 18S, 5.8S ve 5S olmak üzere 4 tip rRNA vardır (Anonim 2011g).

mRNA hücredeki RNA'ların yaklaşık olarak %5'ini oluşturur fakat büyüklük açısından en heterojen RNA tipidir. En kısa yarı ömrü olan RNA'dır yaklaşık 20-30 sn'dir. Diğer bir deyişle molekül ağırlıkları farklı çok sayıda mRNA, DNA'dan aldığı genetik bilgiyi sitozole taşır. Burada protein sentezi için mRNA kalıp olarak kullanılır. Oluşan mRNA'lar bir kaç tane proteini kodlayacak özelliktedir (Anonim 2011g).

tRNA en küçük RNA molekülleridir. Hücredeki RNA'ların %15'lik kısmını oluşturur. Proteinlerde yer alan 20 aminoasidin her birine özgü tRNA'lar bulunur. Bunların dışında az miktarda farklı tRNA'larda bulunmaktadır. tRNA moleküllerinde anormal bazlar bulunabilir. Her tRNA kendine özgü aminoasidi taşır ve bunu protein sentezi olan yere götürür. Protein sentezi olan yerde, mRNA'daki genetik koda uygun olan tRNA buraya bağlanır ve taşıdığı aminoasidin uzamakta olan moleküle bağlanmasını sağlar. Aminoasitleri tRNA'ya amino-açıl-tRNA sentetaz bağlar (Anonim 2011g).

Transkripsiyon ve translasyon olaylarının toplamı, gen ifadesi (gen ekspresyonu) olarak tanımlanır (Anonim 2011i).

Genler etkilerini mRNA üretimi ile ortaya çıkarırlar. mRNA'lar RNase enzimlerinin aktivitesi ile normal koşullarda çok çabuk parçalandıklarından, cDNA'ya çevrilirler ve bu halde kullanılırlar (Özcan vd 2001). Elde edilen bu yapılara, bir organizmada hemen hemen bütün gen yapısını ihtiva edebildiklerinden dolayı cDNA kütüphanesi denilmektedir.

DNA zincirinin önceden belirlenen bir bölgesini çoğaltmak için kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), moleküler genetik alanında devrim niteliği taşıyan bir yöntemdir (Anonim 2011i).

Bu teknolojiyi genişletmek ve geliştirmek çabasıyla geleneksel PCR'ın birçok modifikasyonu geliştirilmiştir. Multipleks PCR birçok primer düzenekte kullanılır ve tek bir reaksiyon karışımında birçok organizmanın veya birçok hedefin teşhisinde kullanılabilir (Anonim 2011j). 1988'de Chamberlian ve arkadaşları tarafından tanımlanan Multipleks PCR delesyonları, mutasyonları ve polimorfizmleri içeren birçok DNA analizlerinde uygulanmaktadır (Anonim 2011k).

Multiplex PCR, PCR'ın bu modifikasyonunda birden fazla DNA segmentinin, birden fazla primer çifti kullanarak aynı amplifikasyon reaksiyonunda çoğaltılması söz konusudur (Anonim 2011i).

Multipleks PCR; genetik araştırma, mikrosatellit araştırma ve tek bir reaksiyonda çeşitli ürünleri amplifiye edilmesi gerekli olan diğer uygulamalar için dikkat gerektiren bir PCR tekniğidir. Bu teknik sık sık primer dimerleri ve diğer spesifik olmayan ürünlerin spesifik ürünlerin amplifikasyonu ile karışabileceğinden dolayı kapsamlı optimizasyon gerektirir. Primer dimer oluşumundan genellikle hot start PCR kullanılarak kaçınılabilmesine rağmen spesifik amplifikasyon PCR tamponu ve primer konsantrasyonu gibi diğer faktörler tarafından etkilenir (Löffert *et al.* 1999).

PCR teknolojisinde yakınlardaki belki de en önemli gelişme tek bir kapalı sistemde floresan amplikon tespiti ile eşzamanlı yapılan hızlı döngülü nükleik asit amplifikasyonunun kullanılmasıdır (saatler ve günler süren geleneksel PCR'a göre bu PCR 30 dakikada yapılır), bu ayrıca gerçek zamanlı PCR olarak da bilinir. Gerçek zamanlı PCR amplikonun çapraz kontaminasyon riskini en aza indirir ve çok esnek, hızlı ve duyarlı PCR platformlarıdır. Değişik internal prob biçimi mevcuttur, hibridizasyon problemleri, floresan rezonans enerji transfer (FRET) problemleri, TaqMan (Applied Biosystems) kimya kullanan hidroliz problemleri ve moleküler işaret problemleri gibi.

Gerçek zamanlı PCR çok duyarlı nicel bir tespit ölçümü olarak uygulanabilir veya bir numunede patojene özgü nükleik asit miktarının tayininde kullanılabilir. Özellikle gerçek zamanlı nicel PCR ölçümleri sıklıkla geleneksel PCR ölçümlerinden daha geniş lineer sınırlar sağlar (Anonim 2011j).

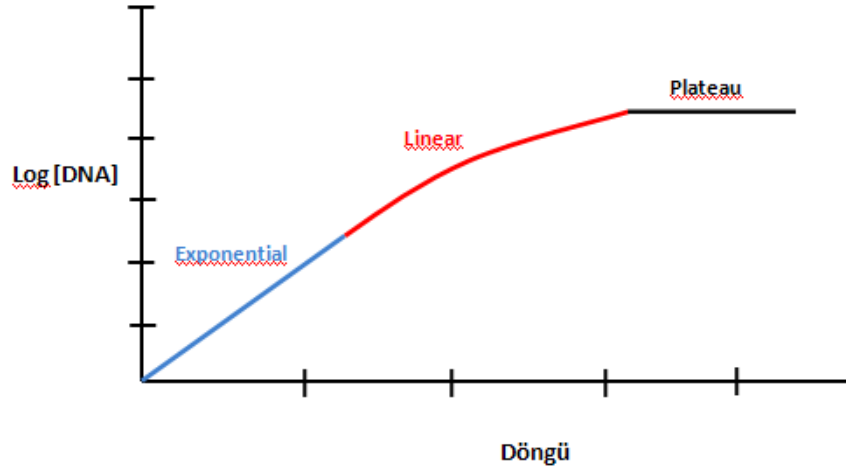
1988 yılında “thermus aquaticus” bakterisinden saflaştırılan, ısıya dayanıklı polimerazın (taq polimeraz) kullanımı ile birlikte polimeraz zincir reaksiyonları için (PCR) otomatize termal siklüs cihazları geliştirilmeye başlanmıştır. Floresan ışımaya tekniklerinin de kullanıma girmesiyle kinetik revers transkriptaz-PCR (RT-PCR)’da bir devrim yaşanmaktadır. Bu gelişim sayesinde artık gen kopya ürünlerinin düzeylerini sayısal değerlere dönüştürerek ölçmek, devam eden PCR reaksiyonunu ekranda izleyerek ‘Real Time’ (eş zamanlı) olarak reaksiyonun gidişine müdahale etmek ve PCR döngülerinin sayısı ile oynayabilmek de mümkündür. Birçok adlandırmayla anılan bu teknolojiye floresan okuma yapması nedeniyle yabancı yayınlarda Floresan Kantitatif RT-PCR, Kantitatif-kinetik PCR gibi çeşitli adlar altında rastlamak mümkündür (Anonim 2011m).

Her bir reaksiyon döngüsünde, üretilen PCR ürününün miktarı ile orantılı olarak bu sinyal artar. Her bir döngüde floresan sinyal miktarı kaydedilir ve logaritmik faz boyunca PCR reaksiyonu görüntülenir (Ahmed 2002).

Gen ekspresyonunun kantitasyonu, DNA hasarı (mikrosatellit instabilitesi) tespiti “Real Time PCR” genel kullanım alanlarından sadece birkaçıdır (Anonim 2011m).

Real Time PCR’in 3 temel fazı vardır.

- Exponential Faz
- Linear Faz (yüksek farklılık)
- Plateu Faz (End-point) (Şekil 1.7) (Anonim 2011ö)



**Şekil 1.7.** Real Time PCR'ın 3 temel fazı (Anonim 2011ö)

Exponential (üssel) fazda, PCR ürün miktarı her siklusta tam olarak iki kat artar. Reaksiyon spesifik ve tamdır. Reaksiyonun etkinliği % 100'dür. Reaksiyonun tüm bileşenleri tazedir. Floresan ışımının Ct olarak tanımlanan eşik değere ulaştığı fazdır. Eşik-değer döngü (threshold cycle = Ct) değeri bize; ürünlerdeki ilk anlamlı artışın olduğu noktayı belirtir. Bir Ct değeri 40 ve üzerinde ise bunun anlamı reaksiyonun gerçekleşmediğidir.

Linear faz (doğrusal, yüksek farklılık) esnasında, reaksiyonun komponentleri tükenmeye başlar. Reaksiyon yavaşlar. Oluşan PCR ürünleri parçalanmaya başlar.

Plateu fazında (End-point) ise, geleneksel PCR'larda jel bazlı tanının olduğu aşamadır. Reaksiyon sonlanmaktadır. Yeni PCR ürünü oluşmaz. PCR ürünlerinin degrade olması artmaktadır (Anonim 2011ö).

FRET boyaları verici florofordan, alıcı fluorofora enerji transferine dayanır (Haugland 2002). Verici ve alıcı moleküller birbirine yakın olmalıdır. Böylece vericinin mavi ışıkla uyarılması enerji transferi ile sonuçlanır. Alıcı böylelikle daha uzun dalga boylarında ışık yayar. PCR ürünlerinin oluşumu, PCR primerlerinin yanı sıra, hibridizasyon probu

olarak adlandırılan, floresanla işaretlenmiş iki adet sekans spesifik oligonükleotid prob kullanılarak görüntülenir. Hibridizasyon problemleri çift olarak dizayn edilir ve çiftlerden biri verici boya (3'-Floresin), diğeri ise alıcı boya (5'-Red-640 veya 5'-Red-705) ile işaretlenir. Hibridizasyon problemleri hedef DNA'nın birbirine yakın bölgelerine hibridize olacak şekilde tasarlanır (genellikle iki bağlanma bölgesinin arasında 1-5 nükleotidlik boşluk olur). Eğer iki probda hibridize olur ise, iki boyada birbirine yaklaşır ve FRET alıcı boyası flourometre ile ölçülebilen sinyale neden olur (Querci *et al.* 2010).

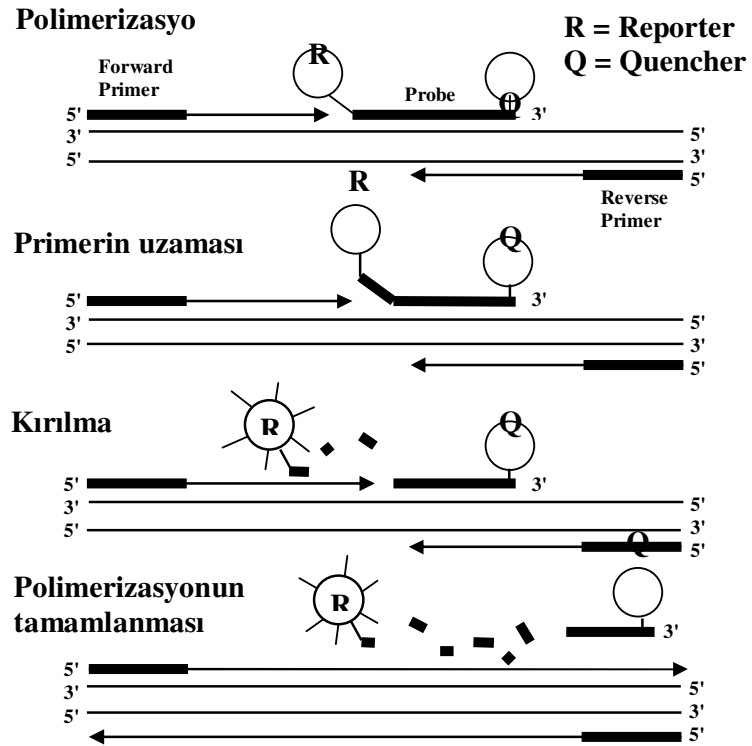
Degradasyon probu (ya da TaqMan probu) genellikle 20-30 baz uzunluğunda bir oligonükleotittir. Tm'leri genellikle primerin Tm'lerinden 10°C yüksektir. 5' ucunda reporter (haberci) floresan boya 3' ucunda ise quencher (söndürücü) boya bulunur. 3' ucu bloke olduğu için prob primer gibi uzamaz. Hedef DNA'nın varlığında, PCR reaksiyonu boyunca spesifik olarak sağ ve sol primer bölgeleri arasına bağlanır. Prob sağlam durumda iken reporter boyanın quencher boyaya yakınlığı haberci floresanın baskılanmasına neden olur (Forster 1948, Lakowicz 1983). Reaksiyon esnasında Taq DNA polimerazın 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi, eğer hedef DNA ile hibridize olmuş durumda ise, haberci ve söndürücü boyalar arasındaki probu azaltır. Bu, amplifikasyon ilerledikçe floresanın artmasına neden olur. PCR ürününün birikimi haberci boya floresanında artış görüntülenmesine yol açar. Bu işlem, her döngüde tekrarlanır ve ürünün eksponansiyel birikimini etkilemez. FRET problemlerinden farklı olarak degradasyon problemleri her bir döngüde, bir önceki yayıma yeni boya ekleyerek floresan salar. Sonuç olarak floresan sinyali her bir döngüde artar. Florejenik problemler için özel gereksinim 5' ucunda G bazının olmamasıdır. Haberci boyaya bitişik G bazı kesimden sonra bile haberci floresanı söndürür (Querci *et al.* 2010).

TaqMan sisteminde 5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli prob kullanılmaktadır. Prob'un 5' ucunda reporter florokrom (6-carboxy fluorescein=6-FAM), 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine=TAMRA) bulunmaktadır. Prob, tek sarmal hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Prob-hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece reporter florokrom maddenin

sinyal oluşturması, 3' uğtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanması takiben başlatılan primer uzaması prob'un bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uğtan yıkmaya başlar. Bۆylece reporter florokrom serbest hale geğer ve sinyal oluşturur (şekil 1.8). Her siklusta üretilen amplicon miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artmaktadır (ęizelge 1.5) (Anonim 2011ö).

**ęizelge 1.5.** FAMRA ve TAMRA floresan boyaların dalga boyları (Anonim 2011a)

|       | Uyarılma (nm) | Yayılma (nm) |
|-------|---------------|--------------|
| FAM   | 495           | 520          |
| TAMRA | 557           | 583          |

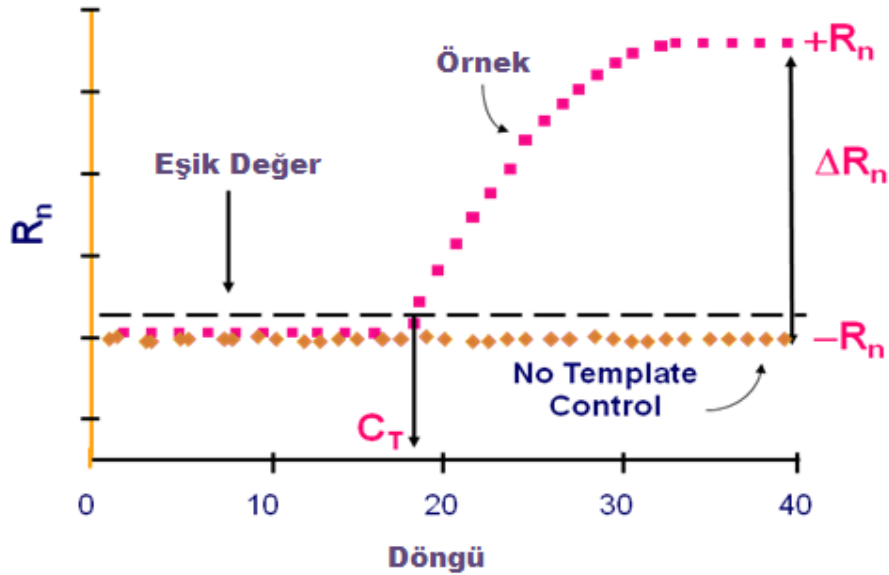


**şekil 1.8.** Taqman Real Time PCR (Anonim 2011p)

Eş zamanlı PCR uygulanırken floresan veri ( $R_n$  biriminde) döngü sayısına karşı sinyal miktarını bulmak için bir grafikte toplanır. Genellikle bu grafik yarı logaritmik bir ölçekte oluşturulur (Querci *et al.* 2010).

Eş zamanlı PCR çıktısı,  $R_n+$  (tüm parçaları içeren floresan sinyali) ve  $R_n-$  (reaksiyonun arka plandaki sinyali, başlangıç ya da NTC örneğinin sinyali) arasındaki fark  $\Delta R_n$ 'dir (Querci *et al.* 2010).

Eşik-değer döngü (threshold cycle =  $C_T$ ) değeri bize; üründeki ilk anlamlı artışın olduğu noktayı belirtir. Threshold cycle sistem başladığından itibaren, üstel oranda ürün oluşması ve logaritmik lineer faza geçiş noktasıdır. Bu bize reaksiyon hakkında çok önemli bilgiler verir. Logaritmik faza yakınlık reaksiyonun gücünü gösterir. Bu ise % 90-100 arasında olmalıdır. Değişkenlerden herhangi biri PCR nin gücünü etkileyebilir. Bu faktörler arasında amplikonun uzunluğu, ikincil yapılar ve primerin kalitesi sayılabilir (Şekil 1.9) (Anonim 2011r)



**Şekil 1.9.** Real time PCR'daki temel göstergeler (No Template Control; cDNA örneği içermeyen negatif kontrol) (Anonim 2011ö)



Çalışma ağır metallere (bakır, kadmiyum, çinko, nikel) bağlı kirliliğin etki mekanizmasını açıklamaya yönelik olduğundan büyük bir önem arz etmektedir. Ülkemizde son yıllarda sucul kirleticilere bağlı nedenlerden meydana gelen toplu balık ölümleri ve özellikle sucul organizmalardaki kalıcı etkilerinden kaynaklanan arazların tespitine yönelik çalışmaların yetersizliği, konunun anlam ve önemini artırmaktadır.

Bu çalışmada; Çizelge 1.6'da verilen bakır (Cu), çinko (Zn), nikel (Ni) ve kadmiyum (Cd) ağır metallerinin LC<sub>50</sub> değerlerinin ½ ve ¼ konsantrasyonlarında Gökkuşığı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) antioksidan enzim aktiviteleri (katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz) ve gen ekspresyonlarındaki değişiklikler incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğal ortamda bulunan balıklara model teşkil edeceğinden biyomarker olarak kullanılabilir. Böylelikle kimyasala maruz kalmış balıklarda meydana gelen arazlar ve bunları tüketen insanlarda neden olacağı olumsuz sonuçlar ortaya konacaktır. Ayrıca materyal olarak Gökkuşığı alabalığının kullanılması ve toksikolojik çalışmaların moleküler biyoloji alanındaki örneklerine çok az rastlanmasından dolayı da önemlidir.

**Çizelge 1.6.** Ağır metallerin letal (LC<sub>50</sub>, öldürücü) dozları

|                 | <b>Letal Doz</b> | <b>Referans</b>             |
|-----------------|------------------|-----------------------------|
| <b>Bakır</b>    | 0,65 mg/lt       | Bagdonas and Vosylienė 2006 |
| <b>Çinko</b>    | 3,79 mg/lt       | Bagdonas and Vosylienė 2006 |
| <b>Nikel</b>    | 13 mg/lt         | Brix <i>et al.</i> 2004     |
| <b>Kadmiyum</b> | 9 µg/lt          | Kay <i>et al.</i> 1986      |

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Su, canlılar için vazgeçilmez bir unsurdur. Yaşam için gereken tüm fiziksel olaylar suyun sayesinde gerçekleşebilmektedir, bu nedenle biyologlar suyu "yaşam sıvısı" olarak adlandırmışlardır. Ne var ki insanoğlu, tabiatta var olan ekolojik dengeyi bilinçsiz kullanımdan dolayı gün geçtikçe bozmaktadır.

Sarıyüpoğlu ve Say (1991)'a göre teknolojinin hızlı gelişimine paralel olarak sanayi ve kentsel atıkların bulunduğu kanalizasyon suları, boşaltıldığı nehir ve gölleri kirletmekte, sucul ortamda yaşayan canlı organizmaları da tehdit etmektedir (Ağcasulu 2007 ).

Ekolojik dengeyi bozan kirletici unsurlar; bazı organik maddeler, endüstriyel atıklar, petrol ve türevleri, yapay tarımsal gübreler, deterjanlar, radyoaktivite, pestisitler, inorganik tuzlar, yapay organik kimyasal maddeler, ağır metaller ve atık ısı olarak bilinen maddelerdir. Özellikle son çalışmalar sucul ortamların ağır metaller tarafından kirletildiğini ve bu kirlilik etmeninin su canlılarında hücresel ve moleküler düzeyde yapısal işlev bozukluklarına ve DNA kırılmaları frekanslarında artışa sebep olduğunu ortaya koymaktadır (Kayhan *et al.* 2009).

Doğal su kaynaklarında sanayi atığı kökenli ağır metallerin yoğunluğu giderek artmaktadır (Görmez 1997). Bu kaynaklardaki ağır metal kirliliği son yıllarda ciddi bir çevre problemi olarak algılanmakta ve pek çok araştırmaya konu olmaktadır (Dural vd 2007).

Sayılsız kullanım yeri olan metaller biyolojik anlamda üç gruba ayrılabilir.

- **Esansiyel elementler:** Canlının yaşaması için mutlaka gerekli olan metallerdir. Sıvı ortamlarda hareketli katyonlar olarak taşınırlar. Kalsiyum, potasyum, sodyum, magnezyum gibi.

- **Yan elementler (Geçiş elementleri):** Düşük konsantrasyonlarda esansiyel olan fakat yüksek konsantrasyonlarda toksik etki yapan elementlerdir. Demir, bakır, kobalt, manganez, çinko, molibden, krom gibi.
- **Eser elementler (Metaloitler):** Metabolik aktivite için genelde gerekli olmayan ve oldukça düşük konsantrasyonlarda hücrede toksik etki yapan elementlerdir. Kadmiyum, arsenik, cıva, kurşun, kalay, selenyum, berilyum gibi.  
Bu üç gruptan yan ve eser elementler genelde ağır metal olarak adlandırılır. Özgül ağırlığı  $5 \text{ gr/cm}^3$ 'den büyük ve atom numarası 22'den 92'ye kadar olan elementler ağır metal olarak tanımlanır.

Sulardaki inorganik kirlenmenin en önemli kaynağını ağır metaller oluşturur. Bazı ağır metaller uygun konsantrasyonlarda canlı yaşamı için gerekli olup eksikliklerinde çeşitli semptomatik bozukluklar ortaya çıkar. Ancak bu metaller doğal konsantrasyonları aşıldığında önemli bir enzim engelleyici grubu oluştururlar. Gümüş, cıva, bakır, kadmiyum ve kurşun gibi metaller bu nedenle zehirlidir (Förstner and Wittmann 1981).

Metallerin zehirliliği özelliklerine göre değişir. Elementlerin zehirliliği sırasıyla; cıva, gümüş, bakır, kadmiyum, çinko, kurşun, krom, nikel ve kobalt şeklindedir. Bu diziliş kesin olmayıp farklılık gösterebilmektedir. Ağır metaller, organizmalara gerekli olsun ya da olmasın yüksek konsantrasyonlarda potansiyel olarak zehirlidir (Bryan 1976).

Ağır metaller beslenme zinciriyle, ya doğrudan planktonlarla ya da su ortamındaki diğer tüketici organizmalarla balıklara geçmektedir. Bu metallerin balıklardaki konsantrasyonu, balık türünün beslenme alışkanlığı ile ilgili olduğu gibi balığın dokuları ve organları arasında da farklılık gösterir (Kargın ve Erdem 1991). Biyolojik döngünün bir halkasını oluşturan ve önemli bir protein kaynağı olarak tüketilen balıklarda giderek artan ağır metal birikimi hem balıklarda toksik etki yapmakta hem de insan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir (Dural vd 2007).

Ağır metallerin toksik etkileri birçok grupta toplanarak incelenebilir (Vural 2005).

- **Enzim inhibisyonu:** Birçok metal birden fazla organ sistemini etkiler. Bu toksik etki yerleri biyokimyasal proseslerin yani enzimlerin bulunduğu hücre membranları ve organellerdir. Çok toksik olan metaller, esansiyel aminoasitlerin sülfidril, histidil veya karboksil gruplarına yüksek afinite gösterirler ve proteinlerle etkileşerek enzimatik reaksiyonları inhibe ederler.
- **Esansiyel elementlerin yerini alma:** Bazı metaller, metabolik olarak benzedikleri elementlerin yerine geçerek toksik etki gösterirler.
- **Proteinlerle birleşme:** Bazı toksik metaller ise proteinlerle birleşip intersellüler birikimlerine rağmen hücre hasarına neden olmazlar. Metallerin bu şekilde proteinlerle kompleks oluşturması detoksikasyon veya koruyucu bir mekanizma olarak ortaya çıkar.
- **Metallerin oksidasyon basamağı ve bileşik şekli:** Toksisitelerini önemli derecede etkiler.  $Cr^{+6}$  bileşiklerinin  $Cr^{+3}$ 'den daha toksik olması; organik metal bileşiklerinin (alkil kurşun ve alkil civa gibi) inorganik bileşiklerine göre (kurşun asetat ve civa-2- klorür gibi) daha çok toksik olmaları örnek verilebilir.
- **Dış faktörler:** Besin, evre ve endüstride toksik bir metale maruziyet, esansiyel elementin organizmadaki (moleküler, hücre, doku ve organdaki) biyolojik düzeyini değiştirebilir. Örneğin bakır eksikliği, aşırı miktarda çinkoya maruziyet sonucu görülür. Bazı araştırmacılar tarafından ağır metallerin biyolojik membran boyunca taşınım yolları açıklanmıştır. Eser metallerin çoğunun taşıyıcı ortam yoluyla sitoplazmik membran boyunca taşınabileceği vurgulanmıştır (Luoma 1983). Metaller, hücre tarafından absorpsiyonundan sonra plazma membranı boyunca hücrenin iç kısımlarına ilerleyerek membranın lipid tabakasındaki seçici proteinler ile kompleks yaparak hücrenin daha iç kısımlarına taşınıp diffüze olurlar, sonrasında da sitosoller

(sitoplazmanın daha sıvı kısmı) içerisinde dayanıksız hidrofilik kompleksler olarak çözünürler (Taylan ve Özkoç 2007).

Normal koşullarda ağır metallerin doğadaki oranı düşüktür. Doğal ortamdaki konsantrasyon oranı arttığında gümüş, cıva, bakır, kadmiyum ve kurşun gibi ağır metaller özellikle organizmalar üzerinde toksik etki yapmakta ve enzimleri inhibe etmektedir. Canlılardaki bazı enzimatik aktiviteler için bazı metaller belli konsantrasyonlarda olmak şartı ile gereklidir (Balkıs ve Algan 2005). Ağır metaller, subletal ortam derişimlerinin etkisinde balıkların karaciğer, böbrek ve dalak gibi metal metabolizması ve metal detoksifikasyonu ile ilgili organlarda yüksek düzeyde birirmektedir (Kayhan vd 2009). Değişik yollardan canlı bünyesine alınan ağır metaller her organ ve dokuda farklı düzeyde birikirler. Canlı bünyesinde çeşitli metabolik yollara katıldıktan sonra vücut dışına atılabilen metallerden fizyolojik öneme sahip olanlar depolanır. Eğer bunlar toksik metallerden biri ise, enzimlerin yapısını bozabilmektedir (Yazkan vd 2004).

Balıklar ağır metalleri vücut yüzeyinden, solungaçlardan ve sindirim sisteminden olmak üzere başlıca üç yoldan vücutlarına alırlar. En fazla ağır metal absorpsiyonu solungaçlarla gerçekleşirken vücut yüzeyinden absorpsiyon oldukça azdır (Amundsen *et al.* 1997).

- **Solungaçlardan absorpsiyon:** Balıklar, ağız yoluyla alınan sudaki oksijenin solungaçlardaki kılcal damarlardan geçmesi sırasında, suda çözülmüş veya askıda bulunan maddeleri de alırlar. Bu sırada suda bulunan ağır metaller de solungaçlardaki lameller tarafından vücut içerisine alınır (Heath 1987).

- **Sindirim sisteminden absorpsiyon:** Balıklarda en çok zehirlenmeler ağız yoluyla alınan toksik maddelerle olmaktadır. Bu nedenle gastrointestinal absorpsiyon oldukça önemlidir. Sindirim kanalından absorbe olan toksik madde, kan dolaşımı ile tüm vücuda dağılarak zehirlenmeye yol açabilir. Bu zehirlenme, zehrin türüne, şiddetine

ve absorbe olan konsantrasyonuna bağlı olarak değişiklik gösterir. Ağız yoluyla vücuda giren toksik maddelerin absorpsiyonlarının fazla olduğu yer ince bağırsaklardır (Dökmeci 1988).

- **Deriden absorpsiyon:** Deri genellikle toksik maddelerle temas halindedir. Ancak derinin ağır metallere karşı fazla geçirgen olmayışı nedeniyle canlıların bu yolla zehirlenmeleri daha az görülür. Deride epidermis bölgesinde bulunan *stratumcorneum* tabakası epidermik bir bariyer olarak birçok kimyasal maddenin geçişini önlemektedir (Dökmeci 1988).

Absorbe olan iz elementler solungaçlardan ve bağırsaklardan kana transfer edilip vücudun diğer kısımlarına dağıtılır. Her metalin dağılışı yeri farklıdır. Balık kronik olarak bakıra maruz kaldığında daha çok karaciğerde biriktiği görülür. Solungaçların epitel hücrelerinden çinkonun transferi oldukça hızlıdır. Çinko daha çok deride ve kasta dağılım gösterirken, karaciğer ve böbrekte daha az oranlarda birikir. Çinkonun karaciğer ve böbrekteki atılımı oldukça hızlıdır. Oysa deride, kasta ve kemikte daha yavaş elimine olurlar. Kadmiyum balıkta çok yavaş birikir. Kadmiyumun esas biriktiği organlar böbrek ve karaciğerdir (Hogstrand and Haux 1991).

İkuta and Morikava (1991)'ya göre su canlılarındaki metal birikimi üzerine konsantrasyon, suyun sıcaklığı, tuzluluğu, derinliği yanında o canlının türü, cinsiyeti, boy ve ağırlığı ile yaşının da etkili faktörlerden olduğunu belirtmişlerdir (Kayhan 2006).

Flos *et al.* (1979) yaptıkları çalışmada; sucul ortamdaki ağır metallerin balıklar tarafından bünyelerine en fazla solungaçlar, vücut yüzeyi ve sindirim sistemi ile alındığını tespit etmişlerdir. Kalay vd (2004); Levesque *et al.* (2002); Giordano *et al.* (1989)'a göre ağır metaller su canlılarında hücrenel ve moleküler düzeyde yapısal işlev bozukluklarına ve DNA kırılmaları frekanslarında artışa sebep olmaktadır. Son on yıldaki endüstriyel gelişmeler deniz çevrelerinin ağır metaller tarafından kontamine edildiği ve bu kirlenmenin besin zincirine de yansıdığı gerçeğini ortaya koymaktadır.

Kadmiyum en toksik ağır metallere biridir. Düşük konsantrasyonlarda bile su canlıları için son derece zararlı etkilere sahiptir. Kadmiyum özellikle çevre kirliliği görülen denizlerde su canlılarında birikmekte olduğu ve değişik seviyelerde toksik etkiler meydana getirdiği yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir (Sağlamtimur vd 2003; Kalay vd 2004).

Bakır ve çinko organizmaların bünyesinde yetersiz miktarlarda bulunduğu büyüme sınırlandırırken, yüksek miktarları ise toksik olabilmektedir.

Metallerin etkilerinin incelendiği organlardan biri olan karaciğer dokusu ağır metallerin taşınmasında ve detoksifikasyonunda görev yapan metal bağlayıcı proteinler ve buna benzer proteinlerin başlıca sentez yerlerinden biri olduğu için, kadmiyum detoksifikasyonundaki işlevi oldukça fazladır. Buna rağmen, kadmiyum birikim düzeyi bakımından özellikle kronik çalışmalarda, karaciğer dokusuna oranla birikimin en fazla böbrek dokusunda olduğu belirtilmiştir (De Conto *et al.* 1999, De Smet *et al.* 2001, Wu *et al.* 1999, Serafım *et al.* 2002). Balık dokuları (kas, karaciğer, böbrek, gonad, mide vs) deniz ortamındaki ağır metal konsantrasyon derecesini belirlemek için indikatör olarak kullanılmaktadır. Özellikle karaciğer dokusu balığın diğer organlarına göre su kirliliğinin çevresel indikatörü olarak sıklıkla tavsiye edilmektedir. Karaciğer dokusu ağır metal birikiminde büyük öneme sahiptir (Olsvik *et al.* 2001). Balıklarda kas dokusu ağır metal bağlamada fazlaca etkili değildir. Bununla birlikte, insanlar tarafından tüketildiği ve sağlık riski taşıdığı için kas dokusu analizlerinin yapılması da gereklidir (Flos *et al.* 1979).

Diplock (1998)'a göre oksijen insan yaşamı için çok elzem olmasına karşın, normal metabolizma sırasında üretilen bazı reaktif oksijen türleri vücuda yoğun bir zarar verme potansiyeline sahiptir. Nawar (1996)'e göre çoğunu serbest radikallerin oluşturduğu reaktif oksijen türleri normal oksijen molekülüyle karşılaştırıldığında, kimyasal reaktivitesi daha yüksek olan oksijen formlarıdır. Diplock (1998)'a göre serbest radikaller; yüksek enerjili, stabil olmayan bileşiklerdir. Serbest radikaller protein, lipid,

DNA ve nükleotid koenzimler gibi birçok biyolojik materyale zarar vermektedirler (Anonim 2011f).

Serbest radikallerin etkilerini 3 ana başlık altında açıklayabilmek mümkündür.

### **1. Proteinlere Etkileri**

Erden ve Bor (1984), Mitchell and Russo (1987)'e göre doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğu için; triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi aminoasitleri içeren proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerde fragmantasyon ve çapraz bağlanmalar meydana gelebilir. Bunlar da protein fonksiyonlarında bozulmalara yol açabileceği gibi, immun sistemini uyarabilecek antijenik değişiklikler de oluşturabilirler (Kılbaş 2006).

### **2. Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri**

Blakely (1990), Mason (1990) göre DNA yapısında oksidatif hasara yol açan birçok faktör vardır. Bunlar (iyonize radyasyon, çeşitli kimyasallar) aşırı derecede serbest radikaller meydana getirip direkt olarak DNA'da hasara yol açabilirler. Direkt etkinin yanında DNA'da tamir defektleri oluşturarak da hasara yol açabilirler. Oluşan bu serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyonlara ve ölüme yol açarlar. Sitotoksiste büyük oranda ya nükleik asit baz modifikasyonlarından doğan kromozomal değişikliklere ya da DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır (Kılbaş 2006).

### **3. Membran Lipidlerine Etkileri**

Blakely (1990)'a göre hücre membranı serbest radikaller için kritik bir bariyerdir, çünkü serbest radikaller hücre komponentleri ile etkileşim için bu bariyeri geçmek



zorundadırlar. Lipid peroksidasyonu serbest radikallerin en önemli etkilerindedir. Lipid peroksidasyonu kuvvetli yükseltgeyici bir radikalın etkisiyle başlayan ve membran yapısındaki doymamış yağ asitlerinin yıkımıyla sonuçlanan kimyasal bir olaydır. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ürünler proteinlere ve DNA'ya bağlanarak kalıcı değişiklikler oluştururlar (Kılbaş 2006).

Canlılarda, kimyasal süreçler özellikle oksitlenme, serbest radikallerin oluşmasına neden olur. Yüksek derecede reaktif olan serbest radikaller farklı moleküller ile kolayca reaksiyona girebilir, böylece hücrelere ve canlıya zarar verebilir. Antioksidanlar, serbest radikallerle reaksiyona girerek bunların hücrelere zarar vermelerini önler. Antioksidanlar bu özellikleriyle hücrelerin, anomalileşme ve tümör oluşturma risklerini azalttıkları gibi, hücre yıkımını da azalttıkları için, daha sağlıklı bir yaşam yaşama şansını yükseltir (Anonim 2009).

Antioksidan özelliği keşfedilen birçok farklı madde vardır. Bu maddelerin bir kısmı diyetlerle (özellikle bitkilerden) alınırken, bir kısmını vücut kendisi, serbest radikallere karşı bir savunma sistemi olarak üretir. Vücudun serbest radikallere karşı savunma olarak ürettiği antioksidanlar; katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi enzimlerdir (Anonim 2009).

Süperoksit dismutaz (EC 1.15.1.1, EC-SOD), süperoksit serbest radikalının ( $O_2^-$ ) hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve moleküler oksijene ( $O_2$ ) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir. Cu-Zn SOD sitozolde bulunur, Cu ve Zn içerir. Mn SOD mitokondride bulunur, Mn içerir. Genel olarak hücrede en bol bulunan Cu-Zn SOD'dır. SOD'ın fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikalının ( $O_2^-$ ) lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korumaktır. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır (Anonim 2010).

Glutatyon peroksidaz (glutatyon: $H_2O_2$  oksidoredüktaz, EC 1.11.1.9), hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) sitozolde bulunur. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, oksijen tüketiminin hızla arttığı (solunum

patlaması) sırada serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini önler. GSH-Px eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır (Anonim 2010).

Katalaz ( $H_2O_2:H_2O_2$  oksidoredüktaz, EC 1.11.1.6), yapısında dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Katalaz, hücreyi kendi solunumsal patlamasına karşı koruma işlevini de görür (Anonim 2010).

Bütün aerobik (oksijenli) organizmalar gibi balık da, reaktif oksijen türlerinin saldırısına duyarlıdır ve antioksidan savunma sistemini geliştirmiştir. Katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) gibi adapte olmuş enzimler ve glutatyona bağlı enzimler (glutasyon peroksidaz, GPX ve glutasyon redüktaz, GR) pek çok balık türünde saptanmıştır (Rudneva 1997). Bu enzimlerle beraber carotenoidler, vitamin E, K ve C, amino asitler, peptitler (glutasyon) ve düşük molekül ağırlıklı enzimlerin de balıkta antioksidan savunma sisteminde var oldukları saptanmıştır (Martinez-Alvarez *et al.* 2005).

Ahmad *et al.* (2006a), *Anguilla anguilla* ile yaptıkları çalışmada kroma maruz kalmış balıkların solungaç ve böbrek dokularında CAT aktivitelerinde düşüşler olduğunu bildirmişlerdir.

Zagal (2008) bu çalışmada tekstil atık suyunun antioksidan savunma sistemi üzerine etkilerini *Oreochromis niloticus*'un karaciğer ve solungaç dokularında incelemiştir. Balıkların bir kısmını 15, 30 ve 45 gün süreyle tekstil atık suyunun öldürücü olmayan konsantrasyonlarına (%0,1, %1 ve %10) maruz bırakmıştır. Kontrol grubu balıklarını ise çeşme suyu içeren akvaryumlarda tutmuştur. Karaciğer ve solungaç dokularında antioksidan durumunun göstergesi olarak süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzim aktivitelerini ölçmüştür. SOD, CAT enzim aktivitelerinin doza bağlı değişim gösterdiğini saptamıştır. Tekstil atık suyunun %1 ve %10'luk dozlarının uygulanması sonucunda SOD, CAT aktivitelerinde artışlar olduğunu gözlemlemiştir. Karaciğer ve

solungaçta 15. ve 30. günlerde ölçülen parametrelerde gözlenen artışların 45. günde adaptasyona bağlı olarak azaldığını belirlemiştir.

Bhattacharya *et al.* (2007) ağır metallere maruz bırakılan *Clarias batrachus*'un karaciğer SOD enzim aktivitesinin arttığını, CAT enzim aktivitesinin azaldığını bildirmişlerdir.

Cd, Cr, Se, Cd+Se ve Cr+Se'a bir hafta süreyle maruz bırakılan Gökkuşluğu alabalıklarının karaciğer ve solungaç dokularında selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz (Se-GSHPx), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz aktiviteleri incelenmiştir. Çalışma sonucunda Cd, Cr, Cd+Se ve Cr+Se'a maruz kalmış grupların enzim aktivitelerinde kontrole göre istatistiksel açıdan önemli oranda düşüşlerin olduğu ( $p<0,05$ ) gözlenmiştir. Se maruzatının ise enzim aktiviteleri düzeylerinde önemli değişimlere yol açmadığı belirlenmiştir (Alkan 2005).

Gül vd (2004) sucul ortamlarda kirliliğin artışına bağlı olarak yaptıkları çalışmada, kirli sularda yaşayan sazanların karaciğerinde SOD enzim aktivitesinin temiz sularda yaşayanlardan yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. SOD artışı hücre içinde yüksek miktarda  $H_2O_2$  oluşumuyla ilişkilendirilmiştir.

Bainy *et al.* (1996) kirli sularda yaşayan *O. niloticus*'un karaciğerinde artan süperoksit radikali üretimine bağlı olarak SOD enzim aktivitesinin önemli derecede arttığını, fakat SOD'da ki bu adaptif yanıtın ROT tarafından oluşturulan zarara karşı hücreleri korumak için yeterli olmadığını belirtmişlerdir.

*A. anguilla* ile yapılan çalışmada zirai kimyasallar, ağır metaller ve evsel atık suları ile kirlenen doğal su ortamında yaşayan yılan balıklarının solungaçlarında katalaz enzim aktivitesinin artışı belirtilmiştir (Ahmad *et al.* 2006b).

Teknoloji; malzeme ve yeni kimyasalların girişiyle birlikte gün geçtikçe gelişmektedir. Real time revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), PCR reaksiyonunun herbir döngüsü esnasında amplifikasyon ürünlerinin üretilmesini gözlemek için floresan haberci moleküllerini kullanır (Bustin *et al.* 2005, Wong and Medrano 2005). RT-PCR, belirlenen mRNA seviyelerinin miktarını ölçmek için temel araştırma, moleküler tıp ve biyoteknolojide kullanılan önemli bir yöntemdir (Bustin 2002, Bustin 2005, Huggett *et al.* 2005).

Gerçek zamanlı PCR (Real-time PCR) amplifikasyon esnasında ürün oluşumunun izlenmesi ve kalıp DNA miktarının tahmini temeline dayanmaktadır. Çoğaltma ile birlikte ve eş zamanlı olarak gerçekleşen saptama, DNA'ya bağlanan boyalar veya floresan veren boyalar ve işaretili proplar ile gerçekleştirilmekte ve deteksiyon sinyallerin ölçülmesi ile değerlendirilir. PCR rnlerinin miktarındaki ilk önemli artış (CT-thresholdcycle) hedef template'in başlangıç miktarı ile orantılıdır. Tp içinde oluşan fluorescence saptanır (Anonim 2011n). Floresan sinyali PCR rn miktarıyla doğru orantılı olarak artmaktadır. Amplifikasyon sırasında saptama yapılır (Anonim 2011o).

Real-time PCR'in avantajları;

- Spesifik olmayan amplifikasyonlardan etkilenmeme
- Reaksiyon boyunca veri toplanarak aynı anda analiz imkanı
- PCR sonrası ürünlerin ikincil bir işlemi gerektirmemesi
- Ultra-hızlı siklus (30 dk-2 saat)
- İki kat değişikliği hızla tanımlayabilme
- Spesifik erime eğrisi analizleri ile spesifik amplifikasyonların tanımlanması
- Duyarlılığı, özgüllüğü ve tekrarlanabilirliğinin yüksek oluşu
- Konvensiyonel PCR'dan daha pahalı olmaması (Anonim 2011)

Real-time PCR'in dezavantajları;

- Teknik donanım, alt yapı, beceri ve tecrübe gerektirmesi
- Yüksek donanıma ihtiyaç duyulması
- Aynı ve farklı laboratuvarlar arasında sonuçlar arası farklılıklar
- Standardizasyon problemi (Anonim 2011)

Mersin balığı ve alabalığın farklı dokularında enzimatik antioksidan aktiviteleri (süperoksit dismutaz, katalaz, glutasyon peroksidaz, glutasyon redüktaz) ve lipid peroksidasyon seviyeleri incelenmiştir. Katalaz hariç, diğer antioksidan enzim aktiviteleri alabalıkta mersin balığından daha yüksek bulunmuştur. İki türde de, sindirim sisteminde lipid peroksidasyonun diğer dokulara kıyasla daha yüksek değer gösterdiği saptanmıştır. Alabalığa kıyasla mersin balığının, kas ve karaciğerinde yağ gibi daha yüksek enerji içeriği depoladığı ve böylece oksidasyona karşı hayat kurtaran bir etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir (Trenzado *et al.* 2006).

Olsvik *et al.* (2005), Parr-smolt geçişi süresince çözünmüş oksijenin farklı konsantrasyonlarına maruz kalmış Atlantik salmonun karaciğerinde oksidatif stresin biyomarkerları olarak kullanılabilen süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutasyon peroksidaz (GSH-Px) antioksidan enzimlerinin mRNA seviyelerindeki değişiklikleri gözlemlenmiştir. Oksidatif stresin geleneksel markerları, toplam glutasyon (GSH) ve azalan okside olmuş glutasyon (GSSG)'nin seviyelerini ve sonuçta oksidatif stres indeksini (OSI) incelemiştir.

Tatlı su ekosisteminin en yaygın pestisiti olan atrazineye (ATZ) maruz bırakılmış Zebra balığının karaciğer ve ovaryumunda gen ekspresyonunun değişikliği ve oksidatif stres çalışılmıştır. Zebra balığı 14 gün ATZ'nin farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılmış, bu süre boyunca özellikle değişime uğrayan karaciğerde antioksidan enzim aktiviteleri (CAT ve SOD), GSH ve MDA içeriği ayrıca Cu/Zn-Sod, Mn-Sod, Cat ve Gpx gibi bu

antioksidant proteinlerini şifreleyen genler için mRNA seviyeleri belirlenmiştir (Jin *et al.* 2010).

Woo *et al.* (2009), strese neden olan biyomarkerları şifreleyen sekiz genin farklı ekspresyonlarını, 24 saat boyunca altı ağır metale (Ag, Cd, Cr, Cu, Ni ve Zn) maruz bırakılmış Medeka balığından alınmış karaciğer dokusunda real-time kantitatif PCR ile incelemiştir. Katalaz (OjaCAT), sitokrom P450 (OjaCYP1A), glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (OjaG6PD), glutatyon peroksidaz (OjaGPx), glutatyon redüktaz (OjaGR), glutatyon S-transferaz (OjaGST), süperoksit dismütaz (OjaSOD) ve ubikuitin (OjaUB) içeren antioksidan genlerin tümünde transkripsiyona ait değişiklikleri incelemiştir.

*Paralichthys olivaceus* (Japon dere pisi) balığında glutatyon peroksidaz (GPX) ve glutatyon S-transferaz (GST) izole edilmiş ve kantitatif PCR ile tuzluluk değişimleri (35, 17.5, 8.75, 4 ve 0 psu) süresince zeytin yeşili dil balığının karaciğerlerindeki bu enzimlerin mRNA'larının ekspresyonları incelenmiştir. Hem GPX hem de GST'nin mRNA ekspresyonlarının, 4 psu'da en üst seviyede olduğu ve daha sonra 0 psu'da azaldığı gözlemlenmiştir. Bu bulgularla da, GPX ve GST'in moleküler karakterizasyonu gösterilmiş ve ROS'un (Reactive oxygen species-reaktif oksijen türleri) detoksifikasyonunda GPX ve GST'in önemli roller oynadıkları ortaya koyulmuştur (Choi *et al.* 2008).

Kolaylı *et al.* (1999), Gökkuşuğu alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) iki grubunun kırmızı kan hücreleri ve karaciğerinde antioksidant enzim aktiviteleri ve thiobarbituric asit reaktif maddesi (TBARS) üzerine karşılaştırmalı çalışmalar yapmışlardır. Birinci grup balığı, tatlı suda kültüre alırlarken diğer grup balığı ise tatlı sudan deniz suyuna alarak adapte etmişlerdir. CAT, GPX ve GST aktivitelerini, her iki grupta karaciğere bağlı olmayan dokularda ve karaciğerde daha yüksek, SOD aktivitesini ise tuzlu suya adapte edilmiş balıklarda tatlı suda kültüre alınmış balıklardan daha düşük seviyede bulmuşlardır. Her iki dokuda da, TBARS'ın tuzlu suya adapte edilmiş alabalıklarda tatlı sudaki alabalıklardakinden daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir.

Bakır/inko süperoksit dismütaz (Cu/Zn-SOD; SOD1) ve manganez süperoksit dismütaz (Mn-SOD; SOD2), *Haliotis discus discus*'dan izole edilmiştir. Her iki SOD enziminin mRNA'daki ekspresyonu, ısı muamelesine (yüksek sıcaklık) ve ağır metallere (bakır, çinko, kadmiyum) maruz kalmış örneklerin çeşitli dokularında (tarak, kas, gençlerdeki hepatopankreas ve yetişkinlerdeki kan hücreleri) yüksek bir şekilde değişmiş bulunmuştur. Her iki SOD enziminin mRNA seviyelerinin, ısı ve metal muamelesi süresince arttığı gözlemlenmiştir (Kim *et al.* 2007).

Tilapia (*Oreochromis niloticus*) ile yapılan çalışmada, bakır-kadmiyum karışımının etkisinde solungaç, karaciğer, böbrek ve kas dokusundaki bakır birikimi, bakırın tek başına etkisinde saptanan birikim ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda gerek bakır, gerekse bakır-kadmiyum karışımının etkisinde, bakırın en fazla karaciğerde birikirken en az kas dokusunda biriktiği belirlenmiştir (Sağlamtimur vd 2003).

Choi *et al.* (2007) bu çalışmada Japon balığında (*Carassius auratus auratus*) CdCl<sub>2</sub>'ün zamana ve doza bağlı etkisini glutatyon peroksidazın mRNA seviyeleri üzerine incelemişlerdir. CdCl<sub>2</sub>'ye maruz kalmış Japon balığının karaciğer ve böbrek dokularında GPX mRNA seviyelerini doza ve zamana bağlı olarak azalmış hatta 12, 24 ve 36 saat sonra ölçülemez bulmuşlardır.

Yumuşakçalar şubesine ait bir tür olan *Haliotis discus discus*'un laboratuvar ortamında ağır metallere (bakır, çinko, kadmiyum) ve ısı muamelelerine (yüksek sıcaklık) maruz kalmış çeşitli dokularında (solungaç, kas, genç bireylerdeki sindirim bezi ve yetişkin bireylerde kan hücresi) SOD mRNA ekspresyonunun değişiklik gösterdiği saptanmıştır. Genelde SOD mRNA seviyelerinin metal ve sıcaklık uygulaması esnasında artmış olduğu belirlenmiştir (Kim *et al.* 2007).

Kim *et al.* (2010) yaptıkları çalışmada kadmiyum ağır metaline maruz bırakılan Kirpi balığının (*Takifugu obscurus*) karaciğer dokusunun diğer dokulara göre en yüksek ekspresyonu gösterdiği belirlenmiştir. GR antioksidan geninin karaciğerde daha yüksek

eksprese olduğunu, CAT, GPx ve Cu/Zn-SOD antioksidan genlerinin takip ettiğini saptamışlardır. Karaciğerde Cu/Zn-SOD geninin Cd'dan fazla etkilenmediğini, kontrole kıyasla karaciğere ait GR, CAT ve Mn-SOD mRNA seviyelerinde 5 katı değişim olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu bulgular ile *T. obscurus*'un karaciğerinin güçlü bir antioksidan sisteme sahip olduğunu, ayrıca bu sonuçların Cd ağır metale maruz kalmanın antioksidan genlerinin ekspresyonunu düşürdüğünü göstermişlerdir.

Hansen *et al.* (2006), doğal çevrede üç farklı ağır metale maruz kalmış olan Kahverengi alabalıkta metallothionein (MT), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) antioksidanlarını çalışmışlar ve bunların mRNA ekspresyonlarını bulmak için de RT-PCR'ı kullanmışlardır. Glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GR)'ında mRNA seviyelerini çalışmışlardır. Balıkların solungaçlarında antioksidanların mRNA seviyelerini düşük, karaciğerde ise SOD, CAT ve GPx'in mRNA seviyelerini metale maruz kalmış alabalıklarda yüksek bulmuşlardır. Metale maruz kalmış gruplar, maruz kalmamış referans alabalıkla karşılaştırıldığında hem karaciğerde SOD enziminin daha yüksek aktivitesini bulmuşlar hem de CAT aktivitesini, Cu ile maruz kalmış alabalığın böbreklerinde daha yüksek bulmuşlardır.

Papağan balığı (*Oplegnathus fasciatus*) üzerinde yapılan bu çalışmada SOD mRNA ekspresyon seviyesinin ağır metallerin maruz kalınan dozlarına bağlı olduğu, SOD miktarının böbrek ve solungaçtan daha fazla karaciğerde yüksek olduğu ve kadmiyumun SOD geninin artan ekspresyonunun bakır ve çinkodan daha fazla olduğu ortaya çıkarılmıştır. 14 veya 28 günlük periyotlarda kadmiyumun düşük ve yüksek dozları kullanılmış ve papağan balığının bu ağır metale maruz kalması sonucu SOD ekspresyonunun seviyesinin yüksek doz ve yüksek periyotta daha fazla olduğu gösterilmiştir (Cho *et al.* 2006).

Ağır metaller sucul ortamlarda birbirlerinden bağımsız bulunmadıklarından ağır metal karışımlarının sucul organizmalar üzerine yaptığı etkilerin incelendiği araştırmaların sayısı gittikçe artmaktadır (Kayhan 2006).



Olvisk (2001), Alabalık (*Salmo trutta*) ile yaptığı bir çalışmada kadmiyumun en fazla karaciğerde biriktiğini belirlemiştir. Ayrıca kadmiyuma kısa süreli maruz kalma sonucu *Salmo gairdneri* türü balıklarda karaciğer büyüklüğünde artış gözlenmiştir (Lowe-Jinde and Nimi 1986).

Gerhardt (1998), maden atıklarının farklı konsantrasyonlarının Gökkuşaağı alabalığına toksik etkilerini araştırmışlar ve konsantrasyon yükseldikçe yaşama gücü ve aktivitenin düştüğünü, solunumun ise yükseldiğini ve balıkların ölmeye önce renklerinin koyulaştığını bildirmiştir (Atamanalp ve Telat 2003).

Hollis *et al.* (1999) göre kadmiyum miktarları arttıkça Gökkuşaağı alabalıklarında zamana bağlı olarak oksijenden yararlanmada düşüş olduğu tespit edilmiştir (Atamanalp ve Telat 2003).

Balık fizyolojisi üzerine kirlilik etkileri çalışmalarında en yaygın olarak görülen metaller; bakır, çinko, kalay, kadmiyum, cıva, krom, kurşun, nikel, arsenik ve alüminyumdur. Salmonlarda toksik etki açısından ağır metallerin sıralanışı  $Hg \geq Cd > Cu$  şeklindeyken, vücutta birikme bakımından sıralama  $Hg > Pb > Cr > Cd$  olmaktadır (Yanık ve Atamanalp 2001).

Tekman (2007), glutatyon redüktaz (GR) enzimini Gökkuşaağı alabalık karaciğer dokusundan saflaştırarak, karakterize etmiştir. Ayrıca çeşitli kinetik özellikleri ve saflaştırılan GR enzimi üzerine bazı metal iyonlarının inhibisyon etkisini de incelemiştir. Bu amaçla  $Hg(NO_3)_2$ ,  $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ ,  $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ ,  $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ ,  $Pb(NO_3)_2$  ve  $CdCl_2 \cdot H_2O$  maddelerini çalışmıştır. Sonuç olarak GR enzimini inhibe ederek dengeyi bozabilecek olan bu metallerin kullanımında dikkatli olunması gerektiğini belirlemiştir.

Krom, kadmiyum ve selenyumun Gökkuşaağı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) karaciğer ve solungaç dokularındaki bazı biyokimyasal parametreler üzerine etkileri

araştırılmıştır. Bu metallere bir hafta süreyle maruz bırakılan Gökkuşuğu alabalıklarının karaciğer ve solungaç dokularında glutatyon peroksidaz (Se-GSHPx), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz aktiviteleri ile malondialdehit (MDA) düzeyindeki değişimler incelenmiştir. Çalışma sonucunda Cd, Cr, Cd+Se ve Cr+Se'a maruz kalmış grupların enzim aktivitelerinde kontrole göre istatistiksel açıdan önemli oranda düşüşlerin ve MDA düzeylerinde kontrole göre istatistiksel olarak önemli artışların olduğu belirlenmiştir. Se maruzatı ise enzim aktiviteleri ile MDA düzeylerinde önemli değişimler yaratmamıştır. Bu sonuçlar, ağır metallere maruz bırakılmış grupların biyokimyasal parametrelerinde meydana gelen olumsuz etkilerin, Se ilavesi ile giderilebileceğini ortaya koymaktadır (Alkan 2005).

De Conto *et al.* (1999)'a göre normal koşullarda ağır metallerin doğadaki düzeyi düşüktür. Canlılarda enzimatik aktivite için bazı ağır metallerin gerekliliği sadece belli konsantrasyonlardadır. Doğal konsantrasyon düzeylerinin arttığı durumlarda, örneğin gümüş, cıva, bakır, kadmiyum ve kurşun gibi ağır metaller özellikle toksik etki yapmakta ve enzimleri inhibe etmektedir. Birçok ağır metal, gerekli olsun veya olmasın canlı organizmalar için potansiyel birer toksik ajanlardır.

Bazı ağır metaller, uygun konsantrasyonlarda enzim aktiviteleri için gerekli olmasına karşılık doğal konsantrasyonlar (organizmaya özgü eşik konsantrasyonu) aşıldığında enzim aktivitelerini inhibe ederler. Ag, Hg, Cu ve Pb gibi metaller özellikle toksiktirler, enzim aktivitelerini durdururlar (Taylan ve Özkoç 2007).

D'Souza *et al.* (2003), Chan and Cherian (1992)'a göre ağır metallerin organizmaya alındıklarında veya organizmadaki derişimleri arttığında MT sentezinin de arttığını belirlemişlerdir. Ağır metaller, metabolik aktivitesi yüksek olan dokularda total protein derişimini de arttırırlar (Kaya 1998).

Çevresel problemler söz konusu olduğunda ağır metal "nispeten yüksek yoğunluğa sahip ve düşük konsantrasyonlarda bile toksik veya zehirleyici olan metal" olarak

tanımlanır. Bu yaygın kanıya, ağır metallerin belirli bir zaman aralığında canlı organizmada diğer metallere kıyasla akümülyasyonunun fazla olması ve bunun sonucu negatif etkinin giderek artması yol açmaktadır. Gerçekte ağır metal tanımı fiziksel özellik açısından yoğunluğu  $5 \text{ g/cm}^3$ 'ten daha yüksek olan metaller için kullanılır. Bu gruba kurşun, kadmiyum, krom, demir, kobalt, bakır, nikel, cıva ve çinko olmak üzere 60'tan fazla metal dahildir. Bu elementler doğaları gereği yerkürede genellikle karbonat, oksit, silikat ve sülfür halinde stabil bileşik olarak veya silikatlar içinde hapis olarak bulunurlar (Kahvecioğlu vd 2009).

Ağır metaller endüstriyel atık suların içme sularına karışması yoluyla veya ağır metallerle kirlenmiş partiküllerin tozlaşması yoluyla da hayvan ve insanlar üzerinde etkin olurlar (Kahvecioğlu vd 2009).

Anonim (1997) ve Rether (2002)'e göre ağır metallerin ekolojik sistemde yayınımları dikkate alındığında doğal çevrimlerden daha çok insanın neden olduğu etkiler nedeniyle çevreye yayınımlı söz konusu olduğu görülmektedir. Sürekli ve kullanıma bağlı kirlenmenin yanısıra kazalar sonucu da ağır metallerin çevreye yayınımlı önemli miktarlara ulaşabilmektedir. Yıllık olarak doğal çevrimler sonucu 7600 ton Cd, 18800 ton arsen, 3600 ton cıva, 332000 ton kurşun atmosfere atılmakta iken insan faaliyetleri sonucu deşarj edilen miktarlar dikkate alındığında ise selen (19 kat), kadmiyum (8 kat), cıva, kurşun, kalay (6 kat), arsen, nikel ve krom (3 kat) daha fazladır (Kahvecioğlu vd 2009).

Kayhan vd (2009)'e göre dokularda biriken ağır metaller, metabolik olaylarda toksik potansiyellerine ve faydalarına bağlı olarak kullanılabilir, elemine edilebilir veya dışarıya atılabilirler (Atabeyoğlu ve Atamanalp 2010).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Araştırma yeri

Deneme, Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesine ait Toksikoloji Deneme Ünitesinde kurulmuştur. Laboratuvar çalışmaları ise Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkez Müdürlüğü, Fen Fakültesi Kimya Bölümü ile Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarlarında yapılmıştır.

##### 3.1.2. Su materyali

Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesinde, Alabalık Üretim Tesislerine ait kaynak suyu kullanılmıştır.

**Çizelge 3.1.** Araştırmada kullanılan suyun kimyasal özellikleri

| Parametre                     | Değer      |
|-------------------------------|------------|
| O <sub>2</sub>                | 8,8 ppm    |
| pH                            | 7,9        |
| SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> | 0,33 mg/l  |
| NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>  | 3,45 mg/l  |
| İletkenlik                    | 240 µs/cm  |
| Sıcaklık                      | 9,6 ±1,0°C |

##### 3.1.3. Deneme ünitesi

Araştırmada 1 m<sup>3</sup>'lük 9 adet fiberglas tank kullanılmıştır (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1.** Deneme ünitesi

### **3.1.4. Balık materyali**

Çalışmada Atatürk Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Alabalık Üretim ve Araştırma Merkezinden alınan 1+ yaşındaki 90 adet Salmoniformes formu, Salmonidae familyasına ait Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) kullanılmıştır.

### **3.1.5. Uygulanan ağır metaller**

1 deneme tankı negatif kontrol (kimyasalsız) olmak üzere geriye kalan 8 deneme tankındaki Gökkuşluğu alabalıkları 21 gün süreyle bakır, çinko, nikel ve kadmiyum ağır metallerinin tuz formları olan bakır klorür, çinko klorür, kadmiyum klorür ve nikel klorürün subletal dozlarına maruz bırakılmıştır (Çizelge 3.1, 3.2, 3.3, 3.4).

**Çizelge 3.2.** Bakır klorür (Anonim 2010c)

|                          |   |
|--------------------------|---|
| <b>Molekül Formülü</b>   | CuCl <sub>2</sub>                             |
| <b>Molekül Ağırlığı</b>  | 134,45 g/mol                                  |
| <b>Görünüş</b>           | Yeşil-kahverengi toz                          |
| <b>Yoğunluk</b>          | 3,386 g/cm <sup>3</sup>                       |
| <b>Erime Sıcaklığı</b>   | 498 °C  |
| <b>Kaynama Sıcaklığı</b> | 993 °C  |
| <b>Suda Çözünebilme</b>  | 70,6 g/100 ml (0 °C)<br>75,7 g/100 ml (25 °C) |

**Çizelge 3.3.** Çinko Klorür (Anonim 2010d)

|                          |   |
|--------------------------|---|
| <b>Molekül Formülü</b>   | ZnCl <sub>2</sub>   |
| <b>Molekül Ağırlığı</b>  | 136,315 g/mol   |
| <b>Görünüş</b>           | Beyaz kristal<br>Higroskopik (Havadaki su buharını absorbe etme eğiliminde) |
| <b>Yoğunluk</b>          | 2,907 g/cm <sup>3</sup>   |
| <b>Erime Sıcaklığı</b>   | 292 °C  |
| <b>Kaynama Sıcaklığı</b> | 756 °C  |
| <b>Suda Çözünebilme</b>  | 432 g/100 ml (25 °C)  |

**Çizelge 3.4.** Nikel Klorür (Anonim 2010e)

|                         |   |
|-------------------------|---|
| <b>Molekül Formülü</b>  | NiCl <sub>2</sub>   |
| <b>Molekül Ağırlığı</b> | 129,5994 g/mol  |
| <b>Görünüş</b>          | Sarı-yeşil kristaller<br>Deliküsan (Sıvı olma noktasında havanın nemini absorbe eden) |
| <b>Yoğunluk</b>         | 3,55 g/cm <sup>3</sup>  |
| <b>Erime Sıcaklığı</b>  | 1001 °C   |
| <b>Suda Çözünebilme</b> | 64 g/100 ml   |

**Çizelge 3.5.** Kadmiyum Klorür (Anonim 2010f)

|                          |  |
|--------------------------|--|
| <b>Molekül Formülü</b>   | CdCl <sub>2</sub>  |
| <b>Molekül Ağırlığı</b>  | 183,32 g/mol   |
| <b>Görünüş</b>           | Beyaz katı<br>Higroskopik  |
| <b>Yoğunluk</b>          | 4,047 g/cm <sup>3</sup>  |
| <b>Erime Sıcaklığı</b>   | 564 °C   |
| <b>Kaynama Sıcaklığı</b> | 960 °C   |
| <b>Suda Çözünbilme</b>   | 100 g/100 ml (0 °C)<br>135 g/100 ml (20 °C)<br>147 g/100 ml (100 °C) |

### 3.1.6. CAT, SOD ve GSH-Px enzim genleri için pimer ve prob dizaynı

Gen materyali olarak RNA, primer olarak ise katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve GAPDH'e spesifik primerler kullanılmıştır. İnternet ortamındaki gen bankasından (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) Gökkuşağı alabalığına ait CAT, SOD, GSH-Px ve GAPDH genlerinin sırasıyla BE669040.1, NM\_001160614.1, AY622862.1 ve NM\_001124246 kod numaralı mRNA verileri ışığında baz dizilimleri değerlendirmeye alınmış ve bu genlerin amplifikasyonu için, internet ortamındaki başka bir primer dizayn programı ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi/](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi/)) kullanılarak genlerin maksimum 250 bp'lik kısmına spesifik primerler tarafımızdan dizayn edilmiştir. Oluşturulan primerlerin bağlanma sıcaklıkları ve ilgili bölgeye spesiflikleri (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) kullanılarak kontrol edilmiştir (Çizelge 3.5). Dizayn edilen primerler, çalışıp çalışmadıkları ve spesiflikleri real time PCR yapıp kontrol edildikten sonra kullanılmıştır.

**Çizelge 3.6.** Primer dizilimi

| GENLER                     | PRİMER ve PROBLAR                               | ÜRÜN UZUNLUĞU |
|----------------------------|---|---------------|
| CAT için Forward Primer    | 5'-TGGCTTTGCAGTCAAGTTCTAC-3'                    | 87 bp         |
| CAT için Reverse Primer    | 5'-CTTCTTTATCAGGGACGCCAT-3'                     |               |
| CAT için TaqMan Probe      | FAM <sup>-</sup> TGACGAGGGCAACTGGGACCTT-TAMRA   |               |
| SOD için Forward Primer    | 5'-ACGGACTTTGTGAACTTGCAG-3'                     | 85 bp         |
| SOD için Reverse Primer    | 5'-TGTTACCGGGACCGTATTCTT-3'                     |               |
| SOD için TaqMan Probe      | FAM <sup>-</sup> TGCTGAAGGCTGTTTGCGTGCT-TAMRA   |               |
| GSH-Px için Forward Primer | 5'-AGCAGCACACCCATTACCTT-3'                      | 130 bp        |
| GSH-Px için Reverse Primer | 5'-TGTGAGAGGGATGTCTGATGA-3'                     |               |
| GSH-Px için TaqMan Probe   | FAM <sup>-</sup> TCATGTGCCGTGCTCTCATATGCA-TAMRA |               |
| GAPDH için Forward Primer  | 5'-ATCAAAGGGGCTGTCAAGAA-3'                      | 106 bp        |
| GAPDH için Reverse Primer  | 5'-AGGAGTGGGTGTCTCCAATG-3'                      |               |
| GAPDH için TaqMan Probe    | Cy5 <sup>-</sup> CGCCGAAGGACCCATGAAGG -BQ2      |               |

### 3.1.7. Kullanılan kimyasal maddeler

#### 3.1.7.a. RNA ekstraksiyonunda kullanılan kimyasal maddeler

RNA ekstraksiyonunda; trizol, kloroform, izopropil alkol, % 70'lik etanol, DPEC kullanılmıştır.



**3.1.7.b. Elektroforezde kullanılan kimyasal maddeler**

Hazırlanan RNA örneği ve elektroforez için ddH<sub>2</sub>O, MOPS, formamid, agaroz, EtBr (10 mg/ml), ve yükleme tamponu (BFB) kullanılmıştır.

**3.1.7.c. cDNA kütüphanesinin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler**

0,1 M DTT (500 µl), 5x First Strand Buffer (1 ml), Oligo dT<sub>20</sub> (0,1 ml), dNTP, 10x reaksiyon buffer, amplifikasyon grade DNase I (1 unit/µl), super script III RT (200 unit/µl), stop solüsyonu, ddH<sub>2</sub>O.

**3.1.7.d. Homojenat hazırlamada kullanılan kimyasal maddeler**

Homojenat hazırlamada; sodyum klorür, sıvı azot ve potasyum dihidrojen fosfat kullanılmıştır.

**3.1.7.e. Enzim aktivitesinde kullanılan çözeltiler**

Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi için; kloroform, etil alkol, fosfat tamponu, NBT, sodyum karbonat, sığır albumin, ksantin, hemolizat, distile su, bakır klorür kullanılmıştır.

Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi için; tris-EDTA, GSH, glutasyon redüktaz, NADPH, hemolizat, distile su, t-butylhidroperoksit kullanılmıştır.

Katalaz enzim aktivitesi ölçümü için; kloroform, etanol, hidrojen peroksit, fosfat tamponu kullanılmıştır.

### 3.1.7.f. Multipleks real time PCR’da kullanılan kimyasal maddeler

cDNA, ddH<sub>2</sub>O, taqman probe master, hydrolysis probe, forward primer, reverse primer kullanılmıştır.

### 3.1.8. Yararlanılan alet ve ekipmanlar

Laboratuarda yapılan işlemler sırasında; PCR, Real time PCR, nanodrop, UV görüntüleme sistemi, yatay elektroforez, mikrodalga fırın, otoklav, derin dondurucu, -80 buzdolabı, santrifüj, mikrosantrifüj, çeker ocak, saf su cihazı, su trompu, elektronik terazi (0,001 g - 320 g), vorteks, pH metre, otomatik pipetler, PCR tüpleri, plastik tüp, cerrahi makas, pensetler, pensler, bisturi ve değişik ebatlarda cam malzemeler (beher, erlenmayer, ölçü silindirivs.) kullanılmıştır.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Balıklara kimyasal uygulanması

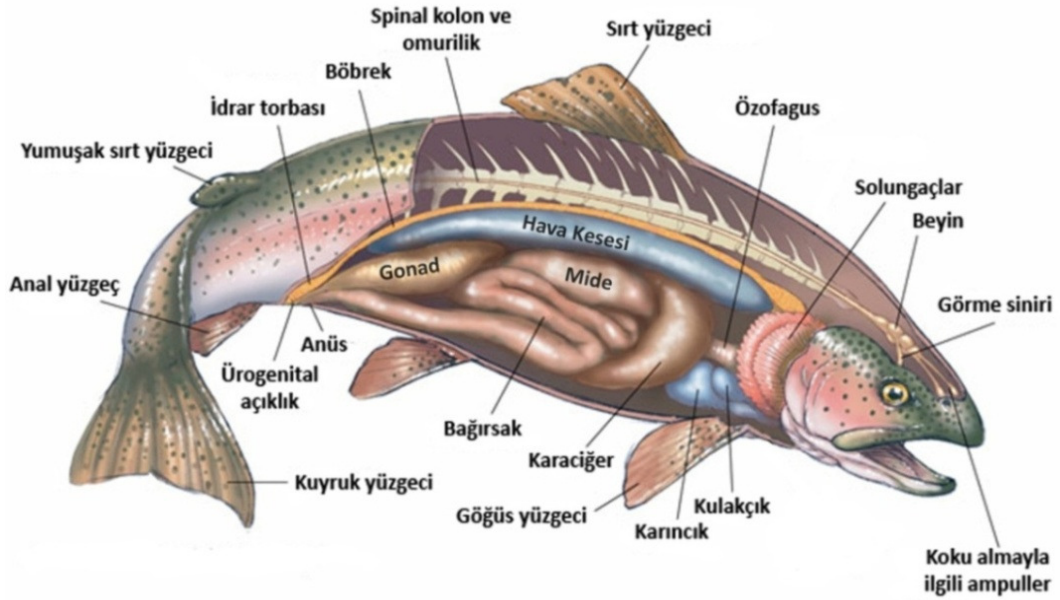
Alabalıklar, 21 gün 4 farklı ağır metalin (Cu, Zn, Cd, Ni) subletal konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır (Çizelge 3.6).

**Çizelge 3.7.** Uygulanan subletal dozlar

|                        | <b>¼ Konsantrasyon</b> | <b>½ Konsantrasyon</b> |
|------------------------|------------------------|------------------------|
| <b>Bakır Klorür</b>    | 0,16 mg/lt             | 0,32 mg/lt             |
| <b>Çinko Klorür</b>    | 0,94 mg/lt             | 1,89 mg/lt             |
| <b>Nikel Klorür</b>    | 3,25 mg/lt             | 6,50 mg/lt             |
| <b>Kadmiyum Klorür</b> | 2,25 µg/lt             | 4,50 µg/lt             |

### 3.2.2. Balıklardan doku örneklerinin alınması

Balıklar, kimyasallara maruz bırakılması sonrasında öldürüldükten sonra enzim aktivite ölçümleri (karaciğer, kas, böbrek) ve mRNA ekspresyonu (kas) için doku örnekleri alınmıştır. Örnekler bazı işlemlerden geçirildikten sonra kullanılmak üzere  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Çalışmada kullanılmayan kısımlar yakılarak imha edilmiştir (Şekil 3.2, 3.3).



Şekil 3.2. Alabalık anatomisi (Anonim 2011s)



**Şekil 3.3.** Çalışmada kullanılan kas, karaciğer ve böbrek dokuları

### **3.2.3. Enzim aktivite tayini için homojenat hazırlama**

#### **3.2.3.a. Kullanılan çözeltilerin hazırlanışları**

**1.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tampon çözeltisi (10 Mm, pH: 7):** 0,68 gr potasyum dihidrojenfosfat bir miktar saf suda çözüldükten sonra toplam hacim 500 ml'ye tamamlanır.

**2. % 0,9'luk NaCl çözeltisi:** 9 gr NaCl toplam hacim 1 lt olacak şekilde saf su ile çözüldürülür.

#### **3.2.3.b. Homojenat hazırlama**

**1.** Sıvı azotta dondurulduktan sonra  $-80^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilen balıktan alınan doku örnekleri (karaciğer, kas, böbrek) oda sıcaklığına çıkarılır ve 5-15 dk çözünmeleri beklenir.

2. Çözünen doku örnekleri hassas terazide tartılır. Doku örnekleri 0,5-5 gr aralığında olmalıdır. Tartılan doku yeterli miktarda % 0,9'luk NaCl çözeltisinde iyice yıkanır.
3. Yıkanan doku örnekleri makas veya neşterle iyice küçük parçalara ayrılır.
4. Parçalanmış doku örnekleri önceden  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de soğutulmuş porselen havana alınarak tokmakla iyice ezilir ve üzerine bir miktar sıvı azot eklenerek ezmeye devam edilir.
5. Hamur haline gelen doku örneğinin üzerine doku örneğinin 3 katı kadar  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tampon çözeltisi eklenir.
6. Örnekler santrifürij tüpüne alınarak 13000 rpm'de 2 saat  $4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifürlenir.
7. Santrifürij sonrası süpernatant alınır ve bu süpernatant üzerinden enzim aktiviteleri ölçülür.

### **3.2.4. Antioksidan enzimlerin (CAT, SOD, GSH-Px) aktivite tayini**

#### **3.2.4.a. Kullanılan çözeltilerin hazırlanışları**

1. **150  $\mu\text{M}$  NBT:** 0,0123 gr NBT bir miktar saf suda çözüldükten sonra toplam hacim 100 ml'ye tamamlanır.
2. **400 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ :** 4,24 gr  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  bir miktar saf suda çözüldükten sonra toplam hacim 100 ml'ye tamamlanır.
3. **1 gr/lit Sığır albümin:** 0,1 gr BSA bir miktar saf suda çözüldükten sonra toplam hacim 100 ml'ye tamamlanır.
4. **0,6 mM/lit EDTA:** 0,018 gr EDTA bir miktar saf suda çözüldükten sonra toplam hacim 100 ml'ye tamamlanır.

**5. 0,8 mM Bakır klorür:** 0,0108 gr  $\text{CuCl}_2$  bir miktar saf suda çözüldükten sonra toplam hacim 100 ml'ye tamamlanır.

**6. 0,11 M Fosfat tamponu:** 3,02 gr potasyum dihidrojen fosfat bir miktar saf suda çözülür, pH 6,5'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 200 ml'ye tamamlanır.

**7. 2 mM NADPH (indirgenmiş hal):** 0,0167 gr NADPH bir miktar saf suda çözüldükten sonra toplam hacim 10 ml'ye tamamlanır.

**8. 0,1 M GSH:** 0,155 gr GSH bir miktar saf suda çözüldükten sonra toplam hacim 5 ml'ye tamamlanır.

**9. 7 mM t-butil hidroperoksit:** 1 ml t-butil hidroperoksit 1143 ml saf su ile karıştırılır.

**10. 10 U/ml Glutasyon redüktaz:** Orijinal tüpün içerisine 3 ml Tris-EDTA eklenir.

**11. Hidrojen peroksit (CAT ölçüm karışımı, 0,019 M  $\text{H}_2\text{O}_2$  içeren 0,05 M Fosfat tamponu (pH: 7)):** 1,7 gr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  bir miktar saf suda çözülür, pH 7'ye ayarlandıktan sonra üzerine 400  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  eklenir. Toplam hacim 250 ml'ye tamamlanır.

### 3.2.4.b. Katalaz enzim aktivitesinin ölçülmesi

Köre ve numune küvetine kimyasallar eklendikten sonra 3 dk boyunca 230 nm'de 1 dk'daki köre karşı aktivite ölçülmüştür (Çizelge 3.7) (Beutler 1984).

**Çizelge 3.8.** Katalaz

|                        | Numune ( $\mu\text{l}$ ) | Kör ( $\mu\text{l}$ ) |
|------------------------|--------------------------|-----------------------|
| Fosfat Tamponu         | -                        | 2990                  |
| $\text{H}_2\text{O}_2$ | 2990                     | 10                    |
| Hemolizat              | 10                       | -                     |

$$EU/ml = \frac{\Delta A \times V_T}{E \times V_H}$$

$\Delta A$  : Absorbans farkı

$V_T$  : Deneý çözeltisinin toplam hacmi (ml)

$V_H$  : Deneýde numune olarak kullanılan süpernatantın hacmi (ml)

E : Ekstinsiyon katsayısı

0,071 : 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin oluşturduğu absorbans değeri (E)

### 3.2.4.c. Süperoksit dismütaz enzim aktivitesinin ölçülmesi

Kör olarak fosfat tamponu kullanılmıştır. 560 nm'de ölçüm gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.8) (Bayır 2005).

**Çizelge 3.9.** Süperoksit dismütaz

|                                     | Numune (µl) | Kontrol (µl) |
|-------------------------------------|-------------|--------------|
| <b>Fosfat Tamponu</b>               | 310         | 310          |
| <b>NBT</b>                          | 300         | 300          |
| <b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b> | 200         | 200          |
| <b>Sığır Albumin</b>                | 100         | 100          |
| <b>Ksantin</b>                      | 40          | 40           |
| <b>Hemolizat</b>                    | 30          | -            |
| <b>Distile Su</b>                   | -           | 30           |
| <b>Ksantin Oksidaz</b>              | 20          | 20           |
| Oda sıcaklığında 20 dk inkübasyon   |             |              |
| <b>CuCl<sub>2</sub></b>             | 500         | 500          |

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{Kontrolün absorbansı} - \text{Numunenin absorbansı}}{\text{Kontrolün absorbansı}} \times 100$$

$$\text{Aktivite (EU/ml)} = \% \text{ İnhibisyon} / 50 \times 0,1$$

### 3.2.4.d. Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesinin ölçülmesi

Aktivite, NADPH oksidasyonunu takiben spektrofotometrik olarak 340 nm'deki düşüştten hesaplanır (Çizelge 3.9) (Beutler 1984).

**Çizelge 3.10.** Glutasyon peroksidaz

|                          | Numune (µl) | Kör (µl) |
|--------------------------|-------------|----------|
| Tris-EDTA                | 100         | 100      |
| GSH                      | 20          | 20       |
| Glutasyon Redüktaz       | 100         | 100      |
| NADPH                    | 100         | 100      |
| Hemolizat                | 10          | 10       |
| Distile Su               | 660         | 670      |
| 37°C'de 10 dk inkübasyon |             |          |
| t-butilhidroperoksit     | 10          | -        |

$$\text{EU/ml} = \frac{\Delta A}{E} \times \frac{V_T}{V_H}$$

6,22: 1 mM NADPH'ın oluşturduğu absorbans değeri (E)



### 3.2.5. Total RNA ve mRNA izolasyonu

1. Her 4 ml Trizol başına 400-750 mg doku örneği kullanılmış ve örnek Trizol içinde homojenize edilmiştir (Örnek Trizolün %10'undan fazla olmamalıdır).
2. Homojenizasyonun ardından 4°C'de 10 dk 11000 devirde santrifüj edilip supernatant alınmıştır.
3. 800 µl kloroform eklenerek tüplerin ağızları güvenli bir şekilde kapatılıp, 15 sn süreyle elle çok güçlü bir şekilde çalkalanmış ve oda sıcaklığında 2-3 dk inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyondan sonra örnekler 4°C'de 15 dk 11000 rpm de santrifüjlenerek supernatant alınmıştır.
5. Örnekler 2 ml izopropil alkol katılmış ve oda sıcaklığında 5-10 dk inkübasyona bırakılmıştır.
6. Örnekler 11000 rpm' de 4°C de 15 dk santrifüj edilip üst faz tamamen uzaklaştırılmıştır.
7. Altta kalan kısma 4 ml %70 etanol ilave edilerek hafifçe vortekslenmiş ve 8000 rpm'de 4°C'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
8. Etenol uzaklaştırılarak tüpler kurutma kağıdına ters çevrilip kurutulmuştur.
9. Örneğe 40 µl DEPC su ilave edilerek -80°C' de stoklanmıştır (İnvitrogen).

### **3.2.6. Total RNA'nın kalitatif tayini**

Elde edilen RNA'nın kontrolü için agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Elektroforetik analizin temeli molekülün elektriksel alanda jel üzerinde koşmasına dayanır. UV ışık altında floresan etki gösteren etidyum bromür boyasının kullanımı ile genin jel üzerindeki yerini belirlemek mümkündür. Agaroz kırmızı bir alg türü olan agar agar'dan izole edilen doğrusal bir polisakarittir. Sıcak suda çözünür. Soğutulduğu zaman polimerde karşılıklı hidrojen bağlarının oluşumu ile jel yapısı oluşur (Anonim 2011ş).

#### **3.2.6.a. RNA örneğinin hazırlanması**

Elde edilen RNA'dan 1 µl alınarak üzerine 3,5 µl ddH<sub>2</sub>O, 0,5 µl 20xMOPS solüsyonundan ve 5 µl formamid katılmış daha önce 65°C'ye ayarlanan etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

**20xMOPS:** 41,9 gr MOPS, 6,8 gr sodyum asetat ve 2,6 gr EDTA 400 ml DEPC su içinde çözülür, pH 7,0'ye NaOH ile ayarlandıktan sonra toplam hacim DEPC'li su ile 500 ml'ye tamamlanır.

#### **3.2.6.b. Agaroz jelin hazırlanması**

Bu aşamada iken 1,88 ml 20xMOPS, 0,3 gr agar, 28,5 ml ddH<sub>2</sub>O konularak mikrodalga fırında kaynatılmış biraz soğutulduktan sonra 6,68 µl formamid ve 5,5 µl EtBr (10 mg/ml) konularak jel küveti içerisine dökülmüştür. Agaroz donduktan sonra tarak çıkarılarak örnek yüklenecek kuyucuklar oluşturulmuştur.

#### **3.2.6.c. Elektroforez küvet solüsyonu**

1xMOPS tamponu kullanılmıştır.

### 3.2.6.d. Örneklerin jele yüklenmesi

Her bir kuyuya 10 µl örnek ve 2 ml yükleme tamponu konulmuş ve 116 V'da 20 dk yürütülmüştür.

### 3.2.7. cDNA kütüphanesinin oluşturulması

Elde edilen RNA'ların elektroforezde varlığı tespit edildikten sonra Super Script TM III Reverse Transcriptase ile cDNA kütüphanesi oluşturulmuştur. Bunun için önce izole edilen RNA'ların nanometrik ölçümle cDNA kütüphanesi oluşturmada kullanılacak konsantrasyonları hesaplanmıştır.

#### 1. Steril bir mikrosantrifüj tüpüne;

1 µl Oligo dT<sub>20</sub> (50 µM)

10 pg-5 µg total RNA

1 µl dNTP Mix (10 mM) (pH=7,0 olan dATP, dGTP, dCTP ve dTTP'nin her birinden 10 mM)

13 µl'ye ddH<sub>2</sub>O ile tamamlanmıştır.

#### 2. Karışım 65°C'de 5 dakika ısıtılıp buz üzerinde en az 1 dakika inkübe edilmiştir.

#### 3. Karışım kısa süreli santrifüjlenip üzerine aşağıdaki kimyasallar eklenmiştir;

4 µl 5xFirst-Strand Buffer

1 µl 0.1 M DTT

1 µl RNaseOUT™ (Cat. no. 10777-019, 40 units/µl)

1 µl of SuperScript™ III RT (200 units/µl)

#### 4. Karışım hafif bir pipetleme ile karıştırılmış ve 50°C'de 50 dk inkübe edilmiştir.

#### 5. Reaksiyonu durdurmak için 85°C'de 5 dk ısıtılmış ve 2 dk buzda bekletilmiştir.

6. RNA'yı ortadan kaldırmak için 1µl RNase H ilave edilmiş ve 37°C'de 20 dk inkübe edilmiştir (İnvitrogen).

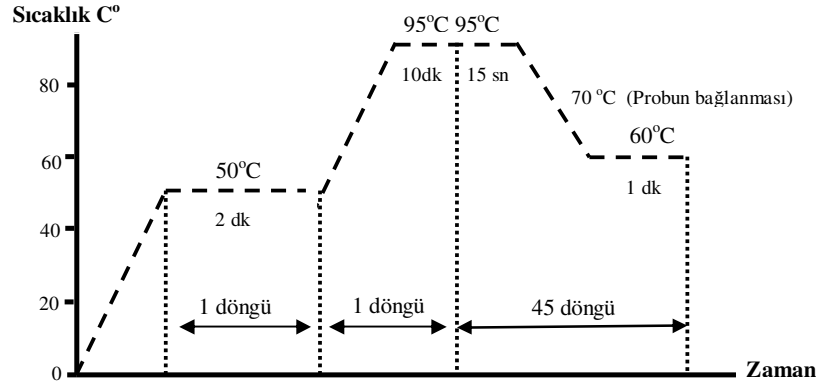
### 3.2.8. cDNA'nın kantitatif tayini

Elde edilen cDNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları Nano Drop (ND-1000) spektrofotometrede 260 ve 280 nm'de okuma yapılarak belirlenmiştir.

Nano Drop (ND-1000) spektrofotometrede, nükleik asit için 1 µl örnekle ölçüm yapılır. Yüksek doğruluk verir. 220 nm-750 nm arası ölçümler yapılır. Ölçüm sonrası elde edilen 260/280 oranı, RNA'nın saflığının tayininde önemlidir. Bu oran 1,8-2,0 arasında ise saf bir RNA'yı işaret eder (Anonim 2011t).

### 3.2.9. Multiplex kantitatif gen ekspresyonu (Real-Time PCR)

Farklı ağır metallerin subletal dozlarına maruz bırakılmış alabalıklardan elde edilen dokularda kantitatif gen ekspresyonunun belirlenmesi amacıyla multiplex real time PCR analizi yapılmıştır. Bu maksatla farklı deneme gruplarından elde edilen doku örneklerinden izole edilmiş olan cDNA'lar kullanılmıştır. Floresan işaretli TaqMan probu kullanılarak genlerin ekspresyon miktarları ölçülmüştür. Genlerin ekspresyon dereceleri Real time PCR'da ilgili bölgenin çoğaltılması esnasındaki kantitatif olarak oluşan ürüne TaqMan probun bağlanması ve belirli dalga boyunda ışımaya yaparak absorbans vermesi esasına dayanır. Böylece oluşan ürünün miktarı kantitatif olarak ölçülür. TaqMan Probe kullanılarak gerçekleştirilecek Real time PCR protokolü; 2 dk 50°C, 10 dk 95°C ve 45 döngü olmak üzere 95°C'de 15 sn ve 60°C'de 1 dk şeklindedir (Şekil 3.4). Reaksiyon karışımı ise Çizelge 3.10'da verilmiştir. Multipleks real time PCR'da stok cDNA'lar 1/25 oranında sulandırıldıktan sonra kullanılmışlardır. Genlerin; kas dokusundaki ekspresyon dereceleri ve uygulanan bakır, kadmiyum, nikel ve çinko konsantrasyonlarıyla olan ilgisi belirlenmeye çalışılmıştır.



Şekil 3.4. Real time PCR protokolü

Çizelge 3.11. Multipleks real time PCR reaksiyon karışımı

| Bileşenler                     | Final Konsantrasyonu | Miktar (µl) |
|--------------------------------|----------------------|-------------|
| FastStart TaqMan® Probe Master | -                    | 12,5        |
| Hydrolysis Probe               | 10 pmol              | 0,5         |
| cDNA                           | -                    | 5           |
| Forward Primer                 | 20 pmol              | 1           |
| Reverse Primer                 | 20 pmol              | 1           |
| ddH <sub>2</sub> O (Steril)    | -                    | 5           |
| <b>Toplam Hacim</b>            | -                    | <b>25</b>   |

**Not;** FastStart TaqMan® Probe Master; AmpliTaq Gold DNA Polimeraz, AmpErase urasil N-glikoliz (UNG), dNTP (Deoxynucleoside triphosphates), dUTP (Deoxyuridine triphosphate) ve optimize edilmiş tampon bileşeninden oluşur.

Real time PCR'da karşılaştırmalı (göreceli) ölçüm için matematiksel model,

$$\text{Relatif ekspresyon seviyesi} = \frac{(E_{\text{Hedef Gen}})^{\Delta CP_{\text{Hedef (Kontrol-Örnek)}}}}{(E_{\text{Referans Gen}})^{\Delta CP_{\text{Referans (Kontrol-Örnek)}}}}$$

|   |   |
|---|---|
| $E_{\text{Hedef Gen}}$                        | : Hedef geni çoğaltan primerin etkinlik oranı   |
| $E_{\text{Referans Gen}}$                     | : Referans geni çoğaltan primerin etkinlik oranı  |
| $\Delta CP$                                   | : PCR reaksiyonu esnasında ürünün miktarsal olarak artışının gerçekleştiği $C_T$ değeri |
| $\Delta CP_{\text{Hedef (Kontrol-Örnek)}}$    | : Hedef genin ortalama $CT$ değeri  |
| $\Delta CP_{\text{Referans (Kontrol-Örnek)}}$ | : Referans genin ortalama $CT$ değeri (Pfaffl 2001).                                    |

### 3.2.10. İstatistiksel analizler

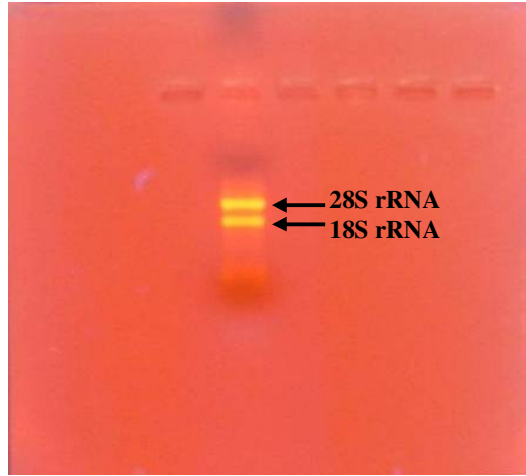
Özellikle primer etkinlik oranı Real time PCR uygulamalarında en önemli hususlardan biridir. Bu nedenle analiz yapılan tüm örneklerde primer etkinliğinin %100 (ise primer etkinlik oranı 2'dir) veya %100'e yakın olması göz önünde bulundurulmuştur.  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  metoduna göre ürünler arasındaki kantitatif ilişki mRNA düzeyinde belirlenmiştir (Livak and Schmittgen 2001). Enzim aktivitesi ve gen ekspresyonu çalışmalarından elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde SPSS 17,0 istatistik paket programından yararlanılmıştır. Gruplar arası farklılığı testetmek amacıyla Varyans Analizi (ANOVA) uygulanmış, farklı bulunan ortalamalar arasındaki farklılığın kontrolünde ise Duncan Çoklu Karşılaştırma testi kullanılmıştır (Yıldız 1994). Varyans Analizinin uygulanamadığı durumlarda alternatif non-parametrik test olan Kruskal-Wallis testinden yararlanılmıştır.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Araştırma Bulguları

#### 4.1.1. RNA görüntüsü

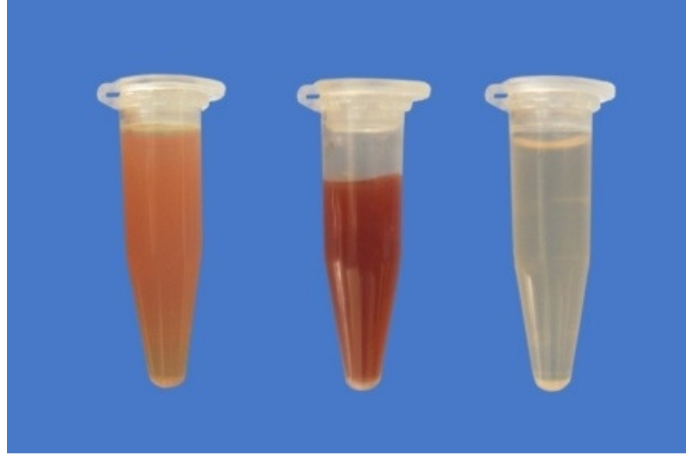
Kontrol ve kimyasal uygulanan grupların kas dokusundan izole edilen total RNA'ların varlığı Şekil 4.1'de ispat edilmiştir.



**Şekil. 4.1.** Elde edilen RNA'nın görüntüsü

#### 4.1.2. Homojenat eldesi

Enzim aktivitesi için tüm grupların karaciğer, böbrek ve kas dokularından homojenatlar elde edilmiştir (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2.** Elde edilen homojenatların görüntüsü (Soldan sağa doğru karaciğer, böbrek, kas)



### 4.1.3. Antioksidan enzimlerinin aktivite ölçümleri

#### 4.1.3.a. CAT

**Çizelge 4.1.** Katalaz'ın % aktivitesi

| Gruplar              | Dokular   | % Aktivite |
|----------------------|-----------|------------|
| Kontrol              | Karaciğer | 100        |
|                      | Böbrek    | 100        |
|                      | Kas       | 100        |
| 0,16 mg/lit Bakır    | Karaciğer | 136        |
|                      | Böbrek    | 104        |
|                      | Kas       | 87         |
| 0,32 mg/lit Bakır    | Karaciğer | 131        |
|                      | Böbrek    | 62         |
|                      | Kas       | 29         |
| 0,94 mg/lit Çinko    | Karaciğer | 154        |
|                      | Böbrek    | 67         |
|                      | Kas       | 19         |
| 1,89 mg/lit Çinko    | Karaciğer | 101        |
|                      | Böbrek    | 62         |
|                      | Kas       | 46         |
| 3,25 mg/lit Nikel    | Karaciğer | 182        |
|                      | Böbrek    | 92         |
|                      | Kas       | 81         |
| 6,5 mg/lit Nikel     | Karaciğer | 150        |
|                      | Böbrek    | 78         |
|                      | Kas       | 55         |
| 2,25 µg/lit Kadmiyum | Karaciğer | 202        |
|                      | Böbrek    | 82         |
|                      | Kas       | 79         |
| 4,5 µg/lit Kadmiyum  | Karaciğer | 80         |
|                      | Böbrek    | 70         |
|                      | Kas       | 55         |

## 4.1.3.b. SOD

Çizelge 4.2. Süperoksit dismütaz'ın % aktivitesi

| Gruplar              | Dokular   | % Aktivite |
|----------------------|-----------|------------|
| Kontrol              | Karaciğer | 100        |
|                      | Böbrek    | 100        |
|                      | Kas       | 100        |
| 0,16 mg/lit Bakır    | Karaciğer | 94         |
|                      | Böbrek    | 81         |
|                      | Kas       | 78         |
| 0,32 mg/lit Bakır    | Karaciğer | 99         |
|                      | Böbrek    | 67         |
|                      | Kas       | 101        |
| 0,94 mg/lit Çinko    | Karaciğer | 83         |
|                      | Böbrek    | 40         |
|                      | Kas       | 98         |
| 1,89 mg/lit Çinko    | Karaciğer | 96         |
|                      | Böbrek    | 84         |
|                      | Kas       | 86         |
| 3,25 mg/lit Nikel    | Karaciğer | 86         |
|                      | Böbrek    | 80         |
|                      | Kas       | 53         |
| 6,5 mg/lit Nikel     | Karaciğer | 86         |
|                      | Böbrek    | 95         |
|                      | Kas       | 126        |
| 2,25 µg/lit Kadmiyum | Karaciğer | 89         |
|                      | Böbrek    | 69         |
|                      | Kas       | 233        |
| 4,5 µg/lit Kadmiyum  | Karaciğer | 70         |
|                      | Böbrek    | 49         |
|                      | Kas       | 517        |

## 4.1.3.c. GSH-Px

Çizelge 4.3. Glutatyon peroksidaz'ın % aktivitesi

| Gruplar              | Dokular   | % Aktivite |
|----------------------|-----------|------------|
| Kontrol              | Karaciğer | 100        |
|                      | Böbrek    | 100        |
|                      | Kas       | 100        |
| 0,16 mg/lit Bakır    | Karaciğer | 35         |
|                      | Böbrek    | 33         |
|                      | Kas       | 161        |
| 0,32 mg/lit Bakır    | Karaciğer | 56         |
|                      | Böbrek    | 79         |
|                      | Kas       | 144        |
| 0,94 mg/lit Çinko    | Karaciğer | 53         |
|                      | Böbrek    | 79         |
|                      | Kas       | 106        |
| 1,89 mg/lit Çinko    | Karaciğer | 44         |
|                      | Böbrek    | 42         |
|                      | Kas       | 222        |
| 3,25 mg/lit Nikel    | Karaciğer | 26         |
|                      | Böbrek    | 54         |
|                      | Kas       | 194        |
| 6,5 mg/lit Nikel     | Karaciğer | 44         |
|                      | Böbrek    | 29         |
|                      | Kas       | 222        |
| 2,25 µg/lit Kadmiyum | Karaciğer | 49         |
|                      | Böbrek    | 54         |
|                      | Kas       | 89         |
| 4,5 µg/lit Kadmiyum  | Karaciğer | 19         |
|                      | Böbrek    | 104        |
|                      | Kas       | 183        |

#### 4.1.4. Nanometrik ölçüm

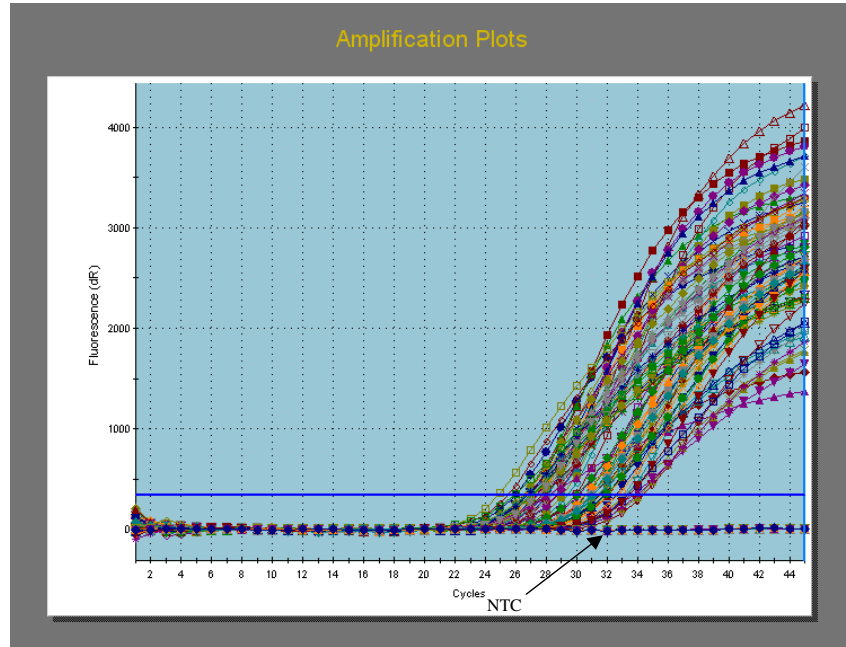
DNA'ların saflıkları ispat edilmiştir ve konsantrasyonları bulunmuştur (Çizelge 4.4).

**Çizelge 4.4.** cDNA'ların saflık değerleri ve konsantrasyonları

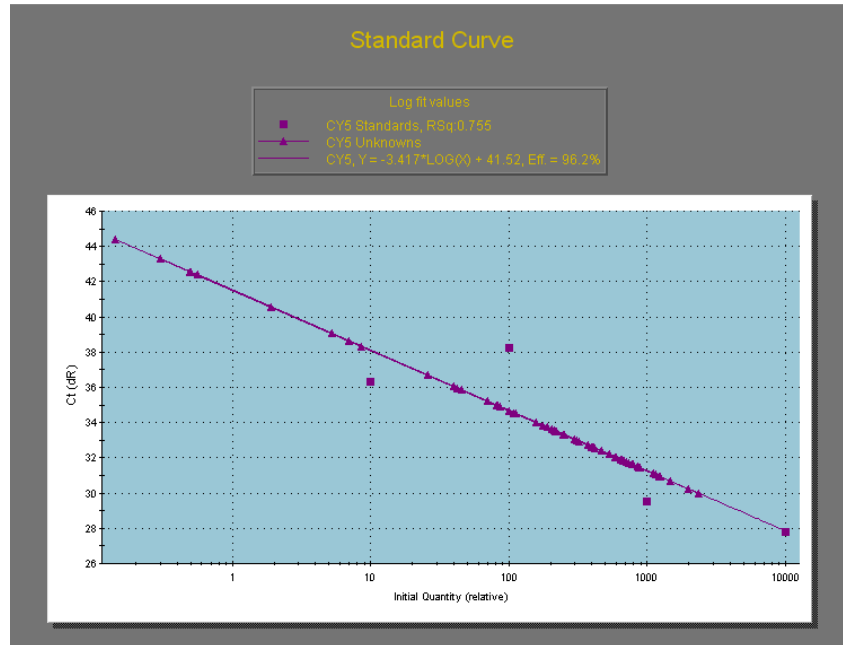
| <b>Gruplar</b>       | <b>260 / 280</b> | <b>ng / µl</b> |
|----------------------|------------------|----------------|
| Kontrol              | 1,83             | 2567,3         |
|                      | 1,76             | 2451,8         |
|                      | 1,76             | 2954,5         |
|                      | 1,79             | 2646,7         |
| 0,16 mg/lit Bakır    | 1,77             | 1962,0         |
|                      | 1,80             | 2709,0         |
|                      | 1,81             | 2325,3         |
|                      | 1,75             | 2037,0         |
| 0,32 mg/lit Bakır    | 1,76             | 2167,7         |
|                      | 1,77             | 2321,0         |
|                      | 1,79             | 2306,8         |
|                      | 1,77             | 1865,4         |
| 0,94 mg/lit Çinko    | 1,78             | 2542,5         |
|                      | 1,81             | 2743,4         |
|                      | 1,70             | 2097,9         |
|                      | 1,77             | 2349,4         |
| 1,89 mg/lit Çinko    | 1,78             | 2679,7         |
|                      | 1,80             | 2828,5         |
|                      | 1,81             | 2382,2         |
|                      | 1,77             | 2257,8         |
| 3,25 mg/lit Nikel    | 1,78             | 2587,3         |
|                      | 1,73             | 1460,0         |
|                      | 1,79             | 2457,4         |
|                      | 1,76             | 2585,0         |
| 6,5 mg/lit Nikel     | 1,76             | 2299,6         |
|                      | 1,80             | 2596,1         |
|                      | 1,77             | 2262,8         |
|                      | 1,81             | 2946,4         |
| 2,25 µg/lit Kadmiyum | 1,90             | 2629,9         |
|                      | 1,86             | 2507,4         |
|                      | 1,86             | 2473,9         |
|                      | 1,71             | 1643,2         |
| 4,5 µg/lit Kadmiyum  | 1,77             | 2299,8         |
|                      | 1,67             | 3006,1         |
|                      | 1,78             | 2274,0         |
|                      | 1,69             | 2523,5         |

#### 4.1.5. Multipleks real time PCR

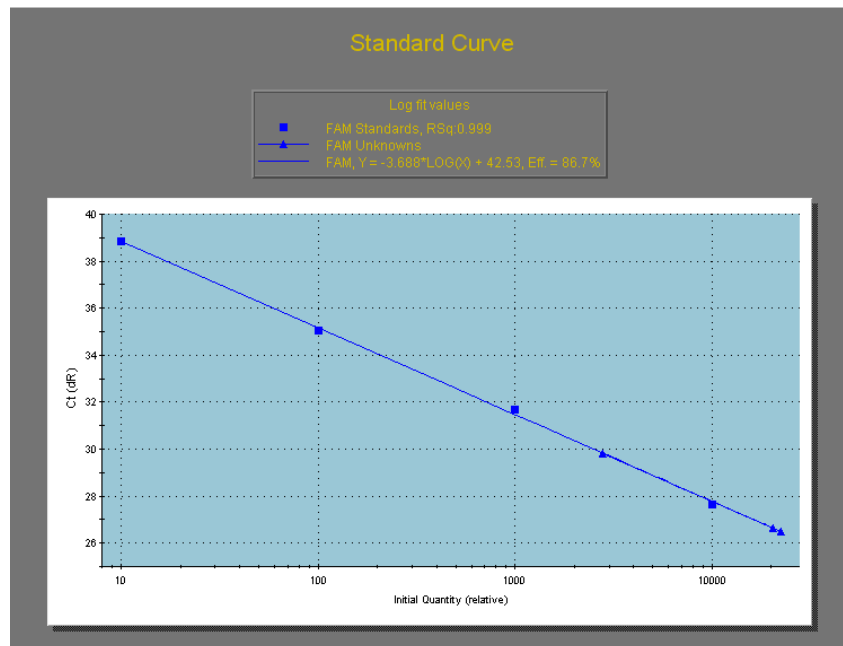
Şekil 4.3’de verilen amplifikasyon grafiği ile dizayn edilen primerlerin çalıştığı ve Şekil 4.4, 4.5, 4.6, 4.7’da verilen primer etkinlik oranı ile de primerlerin genlere spesifik oldukları belirlenmiştir.



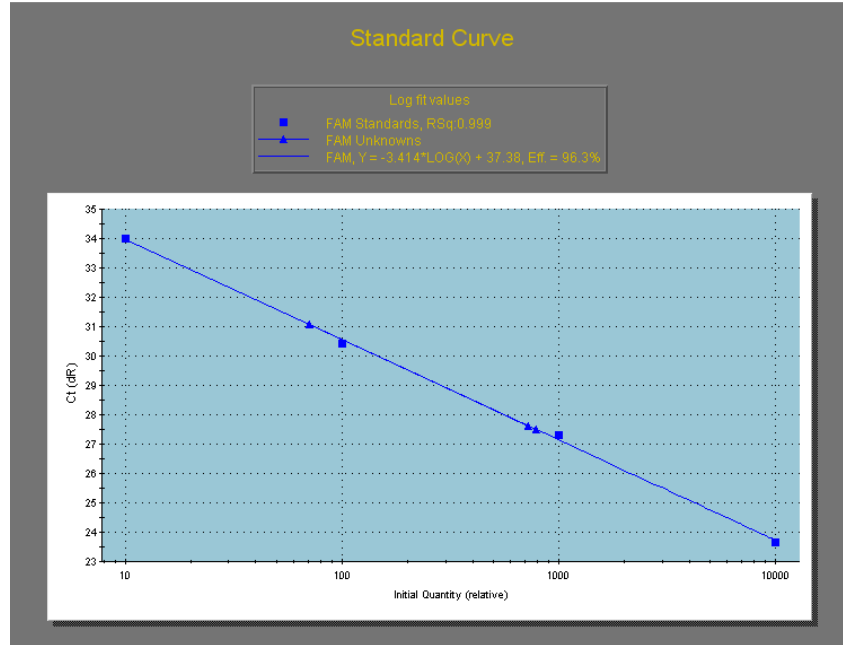
Şekil 4.3. Amplifikasyon grafiği



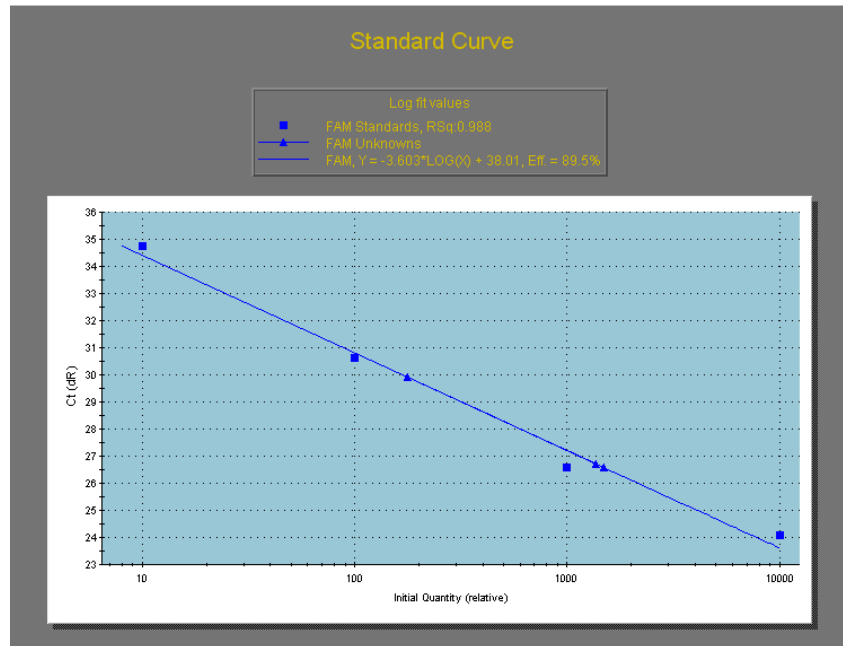
Şekil 4.4. GAPDH primer etkinlik oranı



Şekil 4.5. Katalaz primer etkinlik oranı



Şekil 4.6. Süperoksit dismutaz primer etkinlik oranı

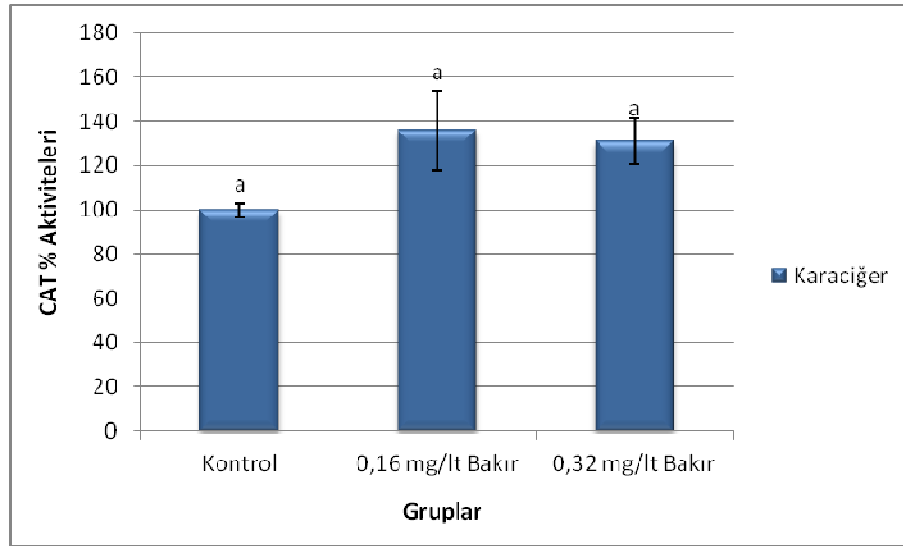


Şekil 4.7. Glutatyon peroksidaz primer etkinlik oranı

#### 4.1.6. İstatistiksel sonuçlar

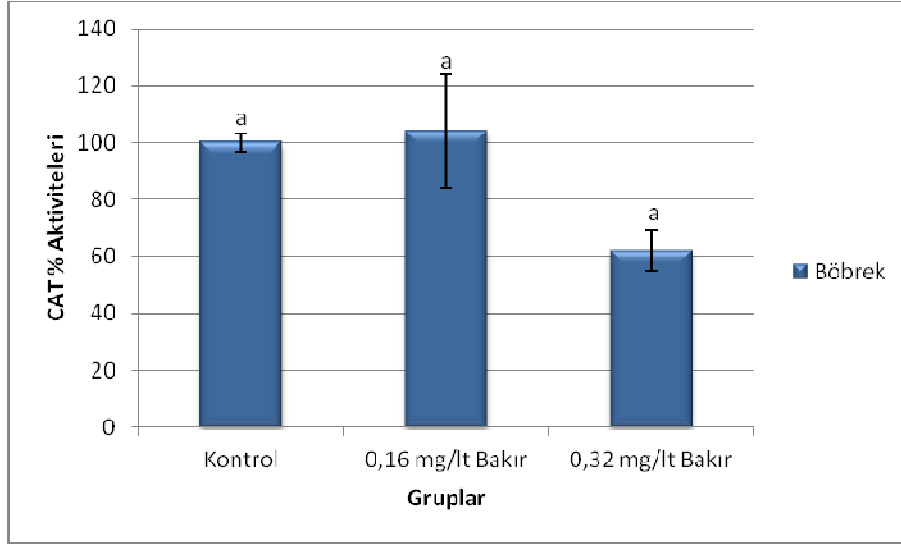
##### 4.1.6.a. CAT, SOD ve GSH-Px enzim aktivite sonuçları

Bakır ağır metalinin subletal dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının karaciğer, böbrek ve kas dokularındaki katalaz % aktiviteleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunamamıştır ( $p>0,05$ ) (Şekil 4.8, 4.9, 4.10).

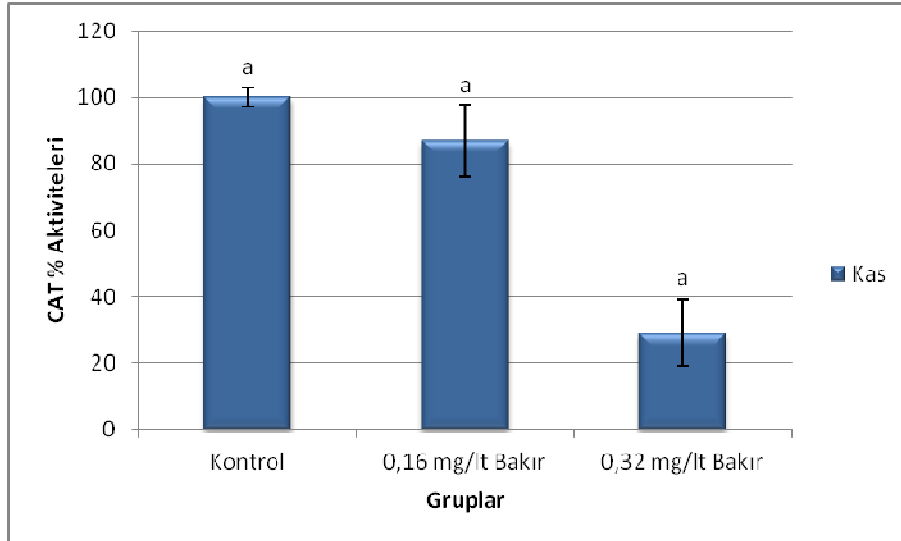


**Şekil 4.8.** Subletal bakır dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının karaciğer dokularında katalaz % aktiviteleri





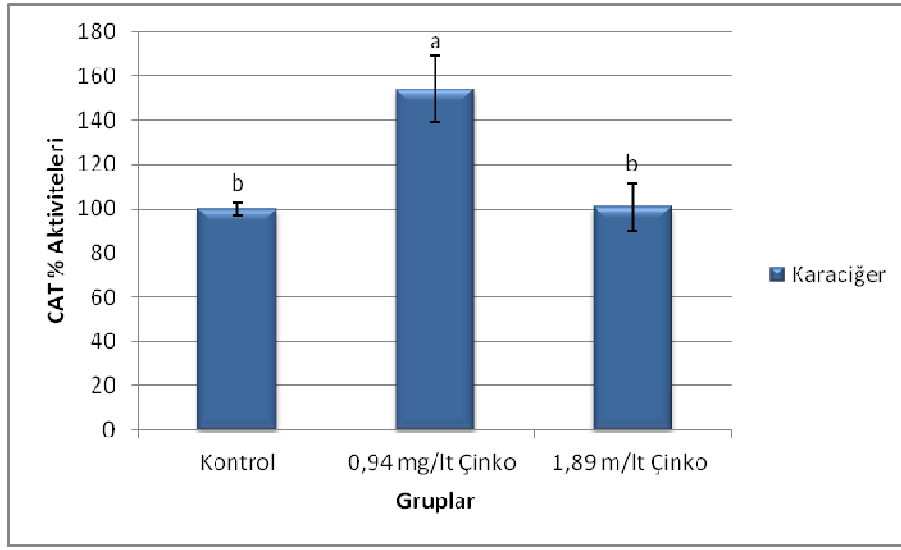
**Şekil 4.9.** Subletal bakır dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının böbrek dokularında katalaz % aktiviteleri



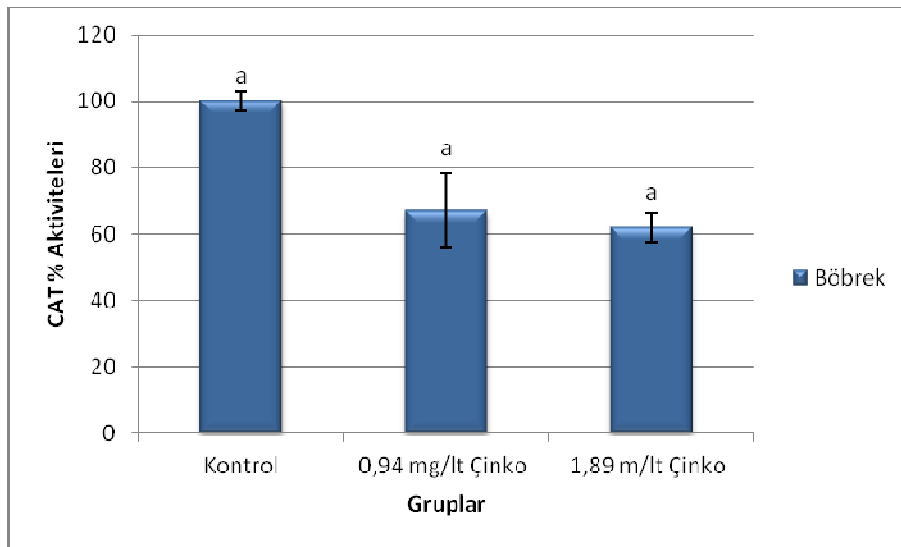
**Şekil 4.10.** Subletal bakır dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının kas dokularında katalaz % aktiviteleri

Şekil 4.11’de kontrol ve çinkonun 1,89 mg/lit dozuna maruz kalmış karaciğer dokuları arasındaki katalaz % aktivite seviyesinde önemli düzeyde farklılık tespit edilememişken ( $p>0,05$ ), bu iki grup ile çinkonun 0,94 mg/lit dozuna maruz kalmış karaciğer dokusu arasında farklılık tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). En yüksek aktivite çinkonun 0,94 mg/lit dozuna maruz kalmış karaciğer dokusunda ölçülmüştür. Şekil 4.12’de ki böbrek

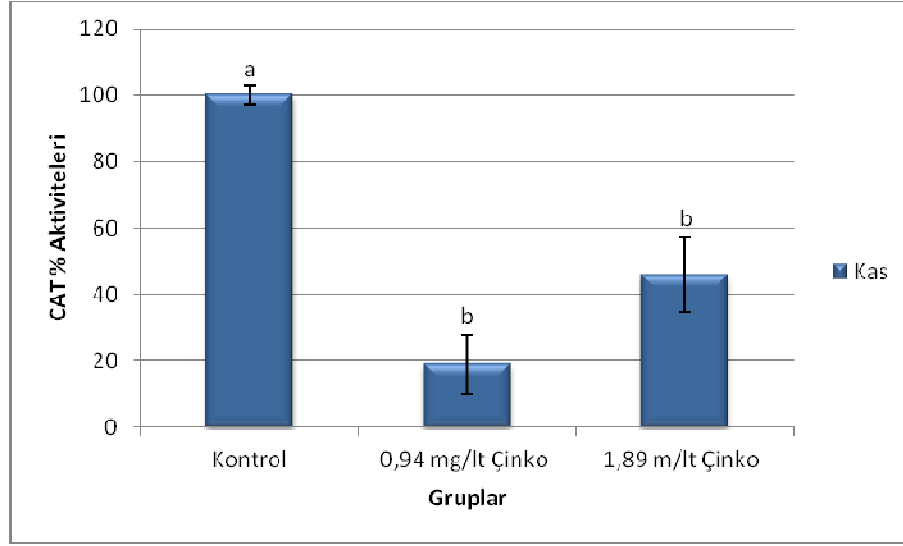
dokusunun analizinde önemlilik bulunamamıştır. Şekil 4.13’de ise 0,94 mg/lt ve 1,89 mg/lt çinkoya maruz kalmış kas dokularının CAT % aktiviteleri istatistiksel olarak kontrol grubundan önemli derecede düşük bulunmuştur ( $p<0,01$ ).



**Şekil 4.11.** Subletal çinko dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının karaciğer dokularında katalaz % aktiviteleri ( $p<0,05$ ).

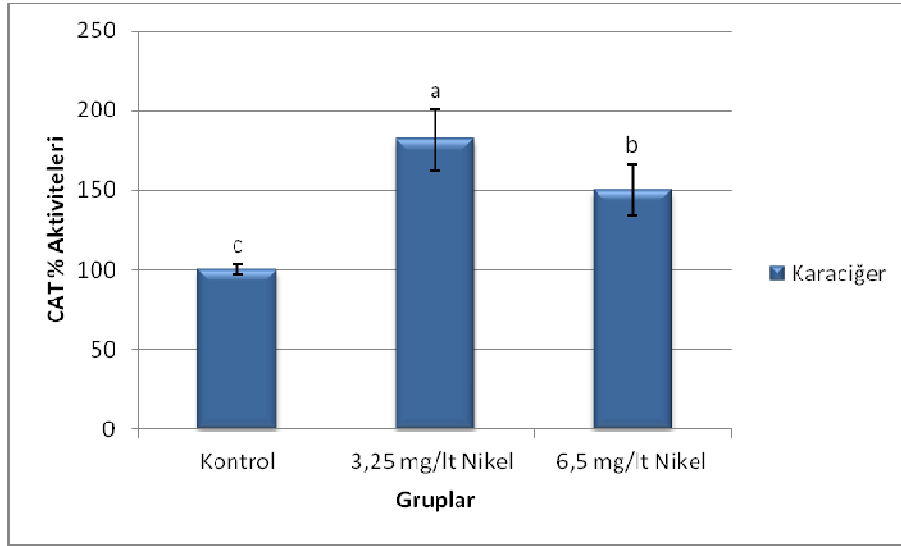


**Şekil 4.12.** Subletal çinko dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının böbrek dokularında katalaz % aktiviteleri

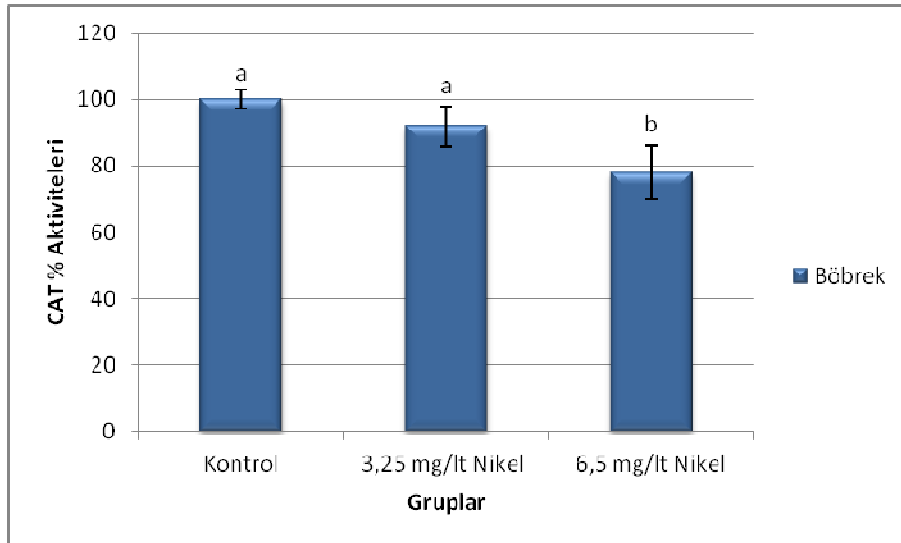


**Şekil 4.13.** Subletal çinko dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının kas dokularında katalaz % aktiviteleri ( $p<0,01$ )

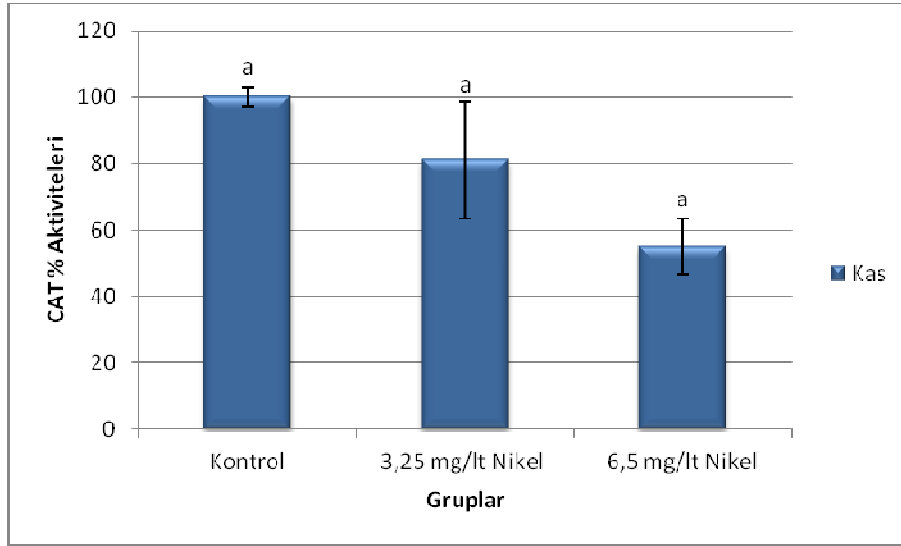
Nikel ağır metalinin subletal dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının karaciğer dokularındaki katalaz % aktivitesi istatistiksel olarak çok önemli bulunmuştur ( $p<0,01$ ). En yüksek aktivite 3,25 mg/lit nikle maruz kalan grupta, en düşük aktivite ise kontrol grubunda ölçülmüştür (Şekil 4.14). Kontrol ve 3,25 mg/lit nikle maruz kalmış böbrek dokularının CAT % aktiviteleri istatistiksel olarak 6,5 mg/lit nikle maruz kalmış gruptan önemli derecede yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.15). Ancak kas dokusuna ait analizde istatistiksel düzeyde farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.16).



**Şekil 4.14.** Subletal nikel dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının karaciğer dokularında katalaz % aktiviteleri ( $p < 0,01$ )

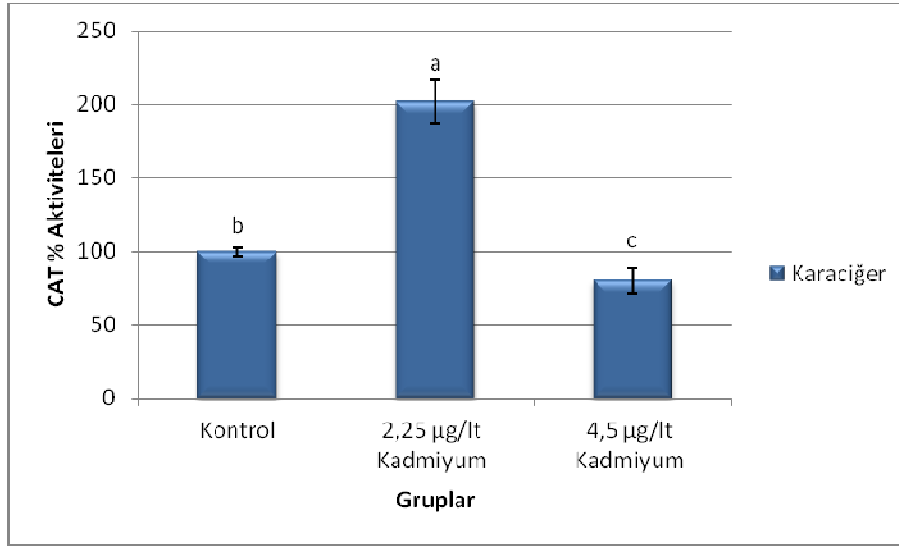


**Şekil 4.15.** Subletal nikel dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının böbrek dokularında katalaz % aktiviteleri ( $p < 0,05$ )

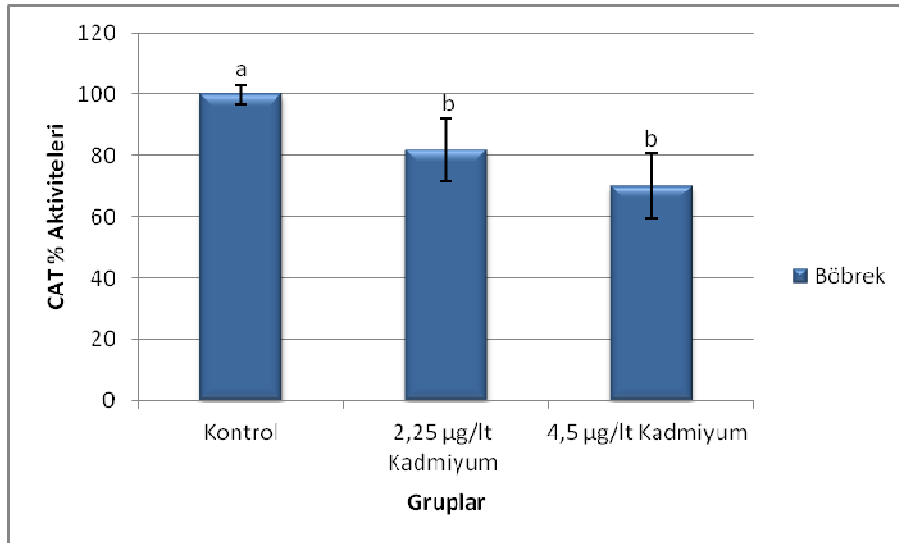


**Şekil 4.16.** Subletal nikel dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının kas dokularında katalaz % aktiviteleri

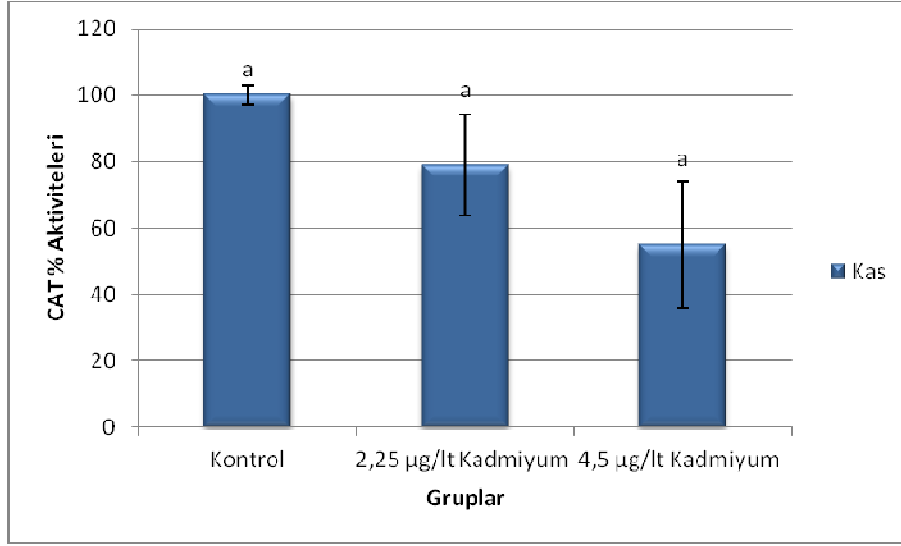
Kadmiyum ağır metalinin subletal dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının karaciğer dokularındaki CAT % aktivitesi istatistiksel olarak çok önemli bulunmuştur ( $p < 0,01$ ). En yüksek aktivite 2,25  $\mu\text{g}/\text{lt}$  kadmiyum maruz kalan grupta, en düşük aktivite ise 4,5  $\mu\text{g}/\text{lt}$  kadmiyum maruz kalan grupta ölçülmüştür (Şekil 4.17). 2,25 ve 4,5  $\mu\text{g}/\text{lt}$  kadmiyuma maruz kalmış böbrek dokularının CAT % aktiviteleri istatistiksel olarak kontrol grubundan önemli derecede düşük bulunmuştur ( $p < 0,05$ ) (Şekil 4.18). Kas dokusuna ait istatistiksel analizde ise farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.19).



**Şekil 4.17.** Subletal kadmiyum dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının karaciğer dokularında katalaz % aktiviteleri ( $p < 0,01$ )

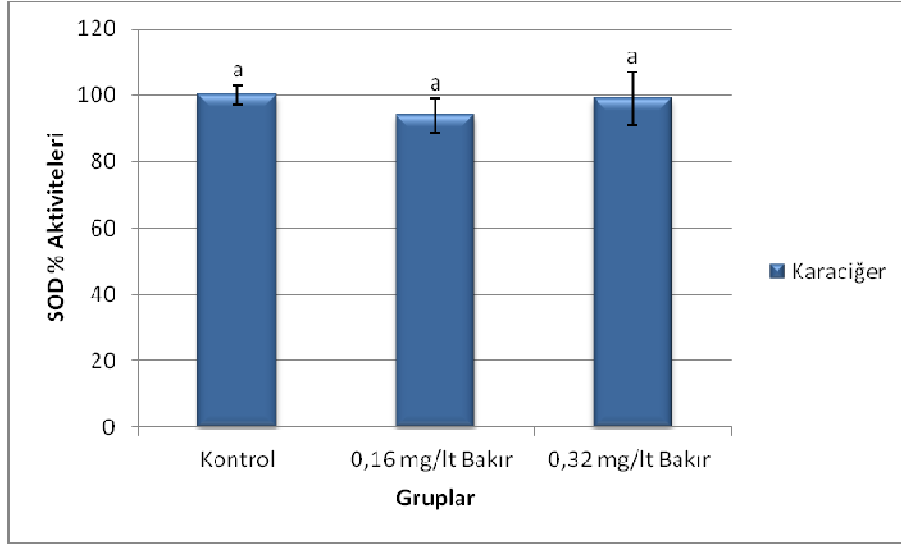


**Şekil 4.18.** Subletal kadmiyum dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının böbrek dokularında katalaz % aktiviteleri ( $p < 0,05$ )

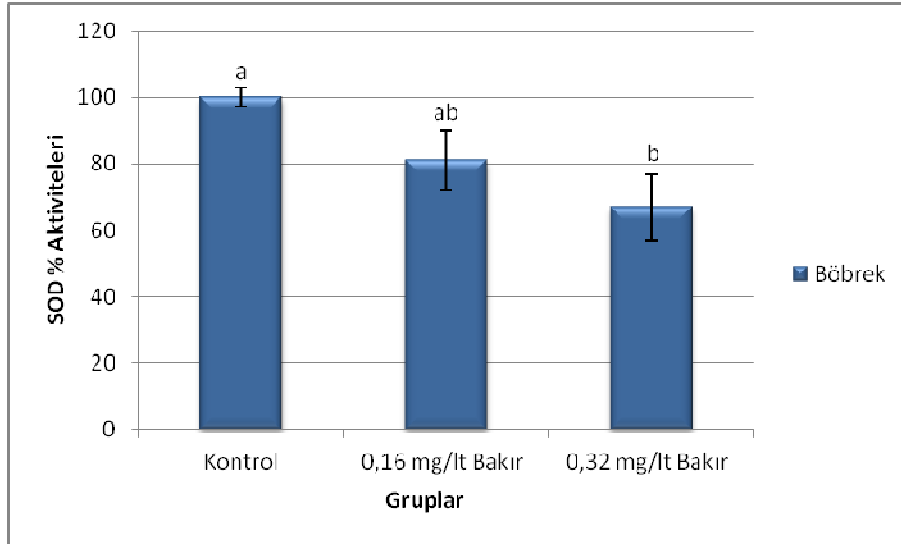


**Şekil 4.19.** Subletal kadmiyum dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının kas dokularında katalaz % aktiviteleri

Bakır ağır metalinin subletal dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının karaciğer ve kas dokularındaki SOD % aktiviteleri istatistiksel olarak önemli bulunamamıştır ( $p > 0,05$ ) (Şekil 4.20, 4.22). Böbrek dokularındaki SOD % aktivitesi gruplar arasında farklılık oluştururken ( $p < 0,05$ ), 0,32 mg/lt bakıra maruz kalmış grup, kontrol grubundan önemli derecede düşük bulunurken, 0,16 mg/lt bakıra maruz kalmış gruba göre herhangi bir farklılık oluşturmamıştır (Şekil 4.21).

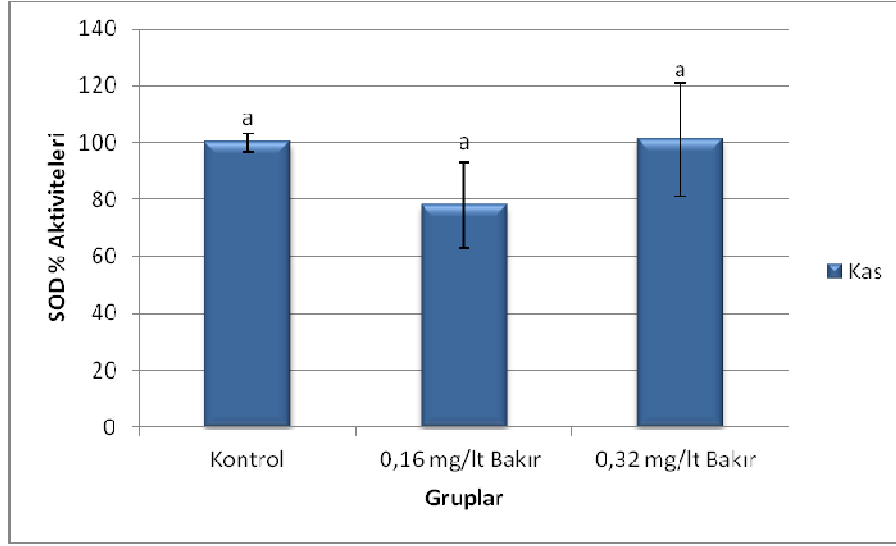


**Şekil 4.20.** Subletal bakır dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının karaciğer dokularında süperoksit dismütaz % aktivitelemi



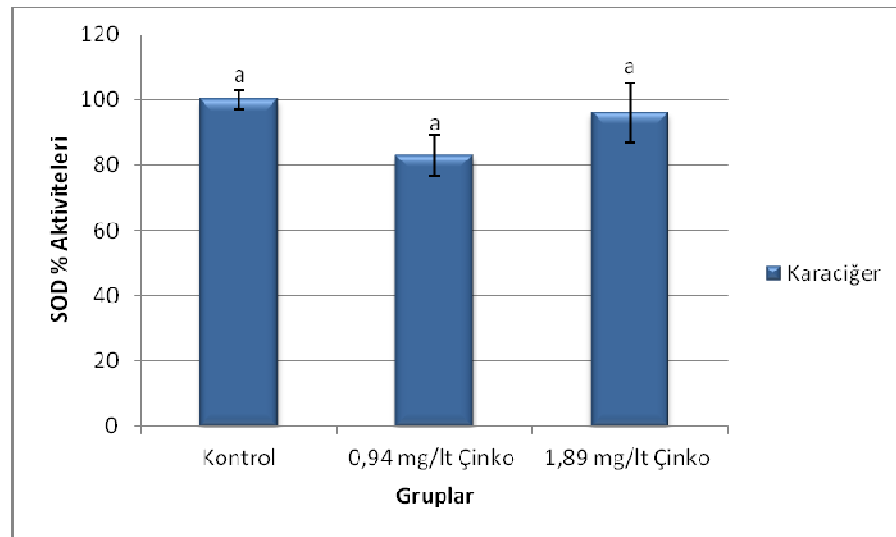
**Şekil 4.21.** Subletal bakır dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının böbrek dokularında süperoksit dismütaz % aktivitelemi ( $p < 0,05$ )



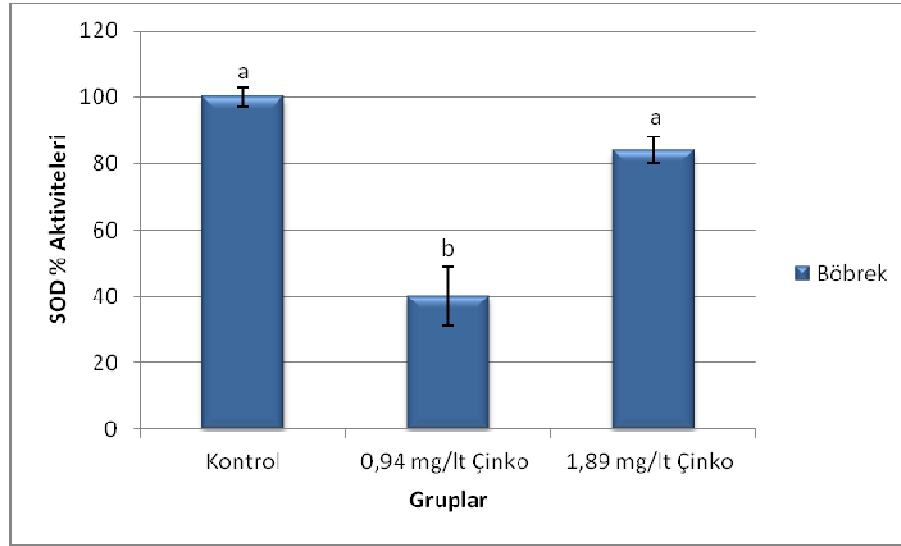


**Şekil 4.22.** Subletal bakır dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının kas dokularında süperoksit dismütaz % aktivitelemi

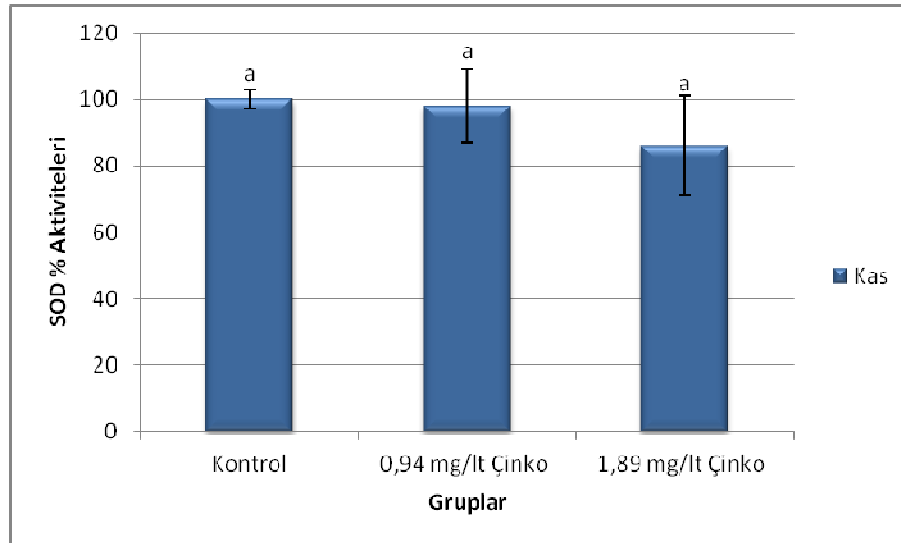
Çinko ağır metalinin subletal dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının süperoksit dismütaz % aktivitelemi karaciğer ve kas dokularında önemli bulunamamıştır ( $p>0,05$ ) (Şekil 4.23, 4.25). Böbrek dokularında ise 0,94 mg/lt çinkoya maruz kalmış grub, diğer iki gruba göre istatistiksel olarak önemli derecede düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.24).



**Şekil 4.23.** Subletal çinko dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının karaciğer dokularında süperoksit dismütaz % aktivitelemi

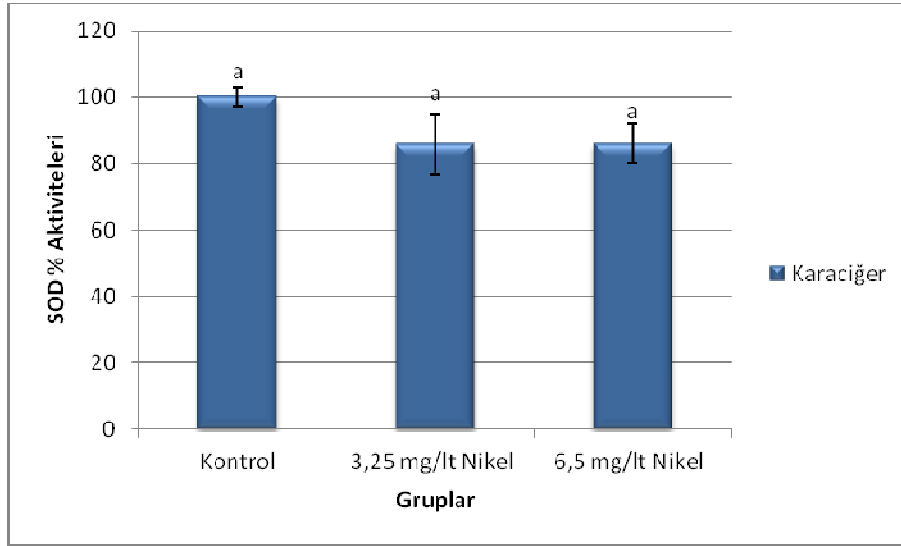


**Şekil 4.24.** Subletal çinko dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının böbrek dokularında süperoksit dismütaz % aktivitelemi ( $p < 0,05$ )

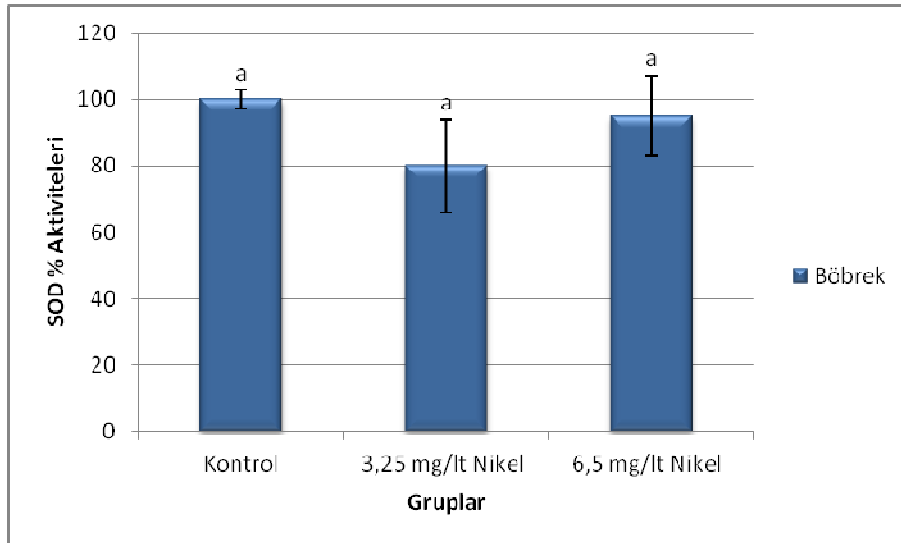


**Şekil 4.25.** Subletal çinko dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının kas dokularında süperoksit dismütaz % aktivitelemi

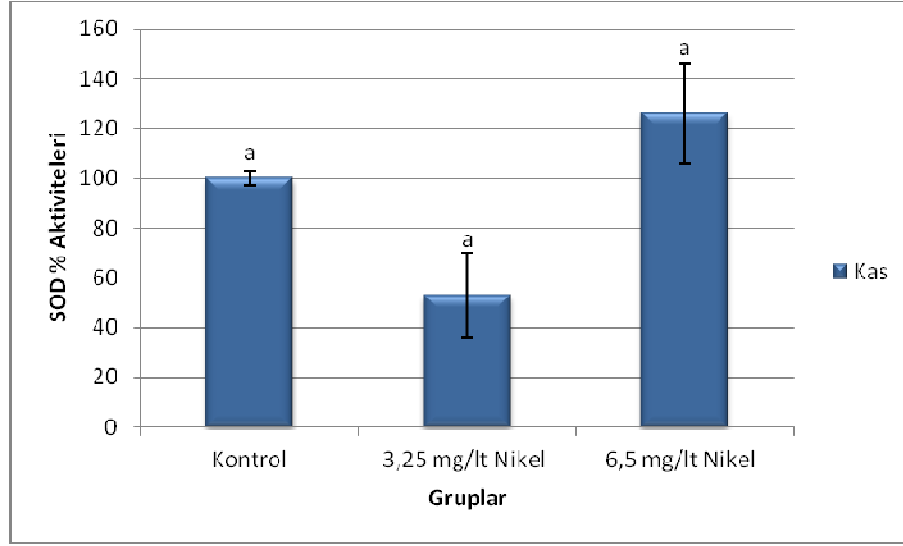
Nikel ağır metalinin subletal dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının karaciğer, böbrek ve kas dokularındaki süperoksit dismütaz % aktivitesinde istatistiksel düzeyde farklılık tespit edilememiştir ( $p > 0,05$ )(Şekil 4.26, 4.27, 4.28).



**Şekil 4.26.** Subletal nikel dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının karaciğer dokularında süperoksit dismütaz % aktivitelemi

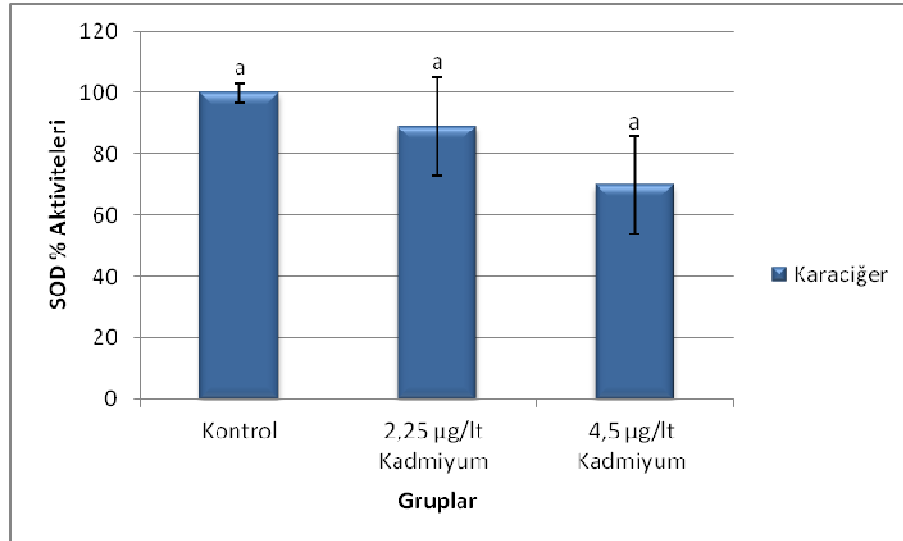


**Şekil 4.27.** Subletal nikel dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının böbrek dokularında süperoksit dismütaz % aktivitelemi

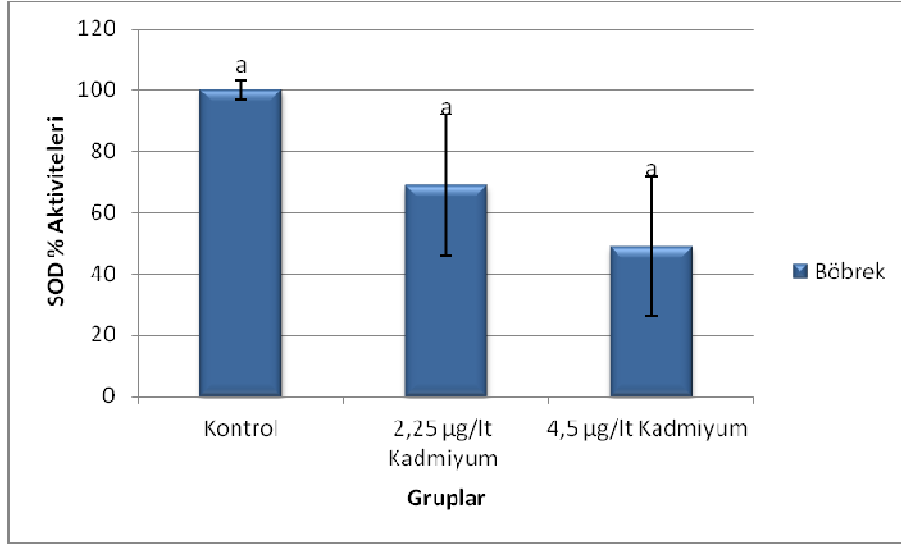


**Şekil 4.28.** Subletal nikel dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının kas dokularında süperoksit dismütaz % aktivitelemi

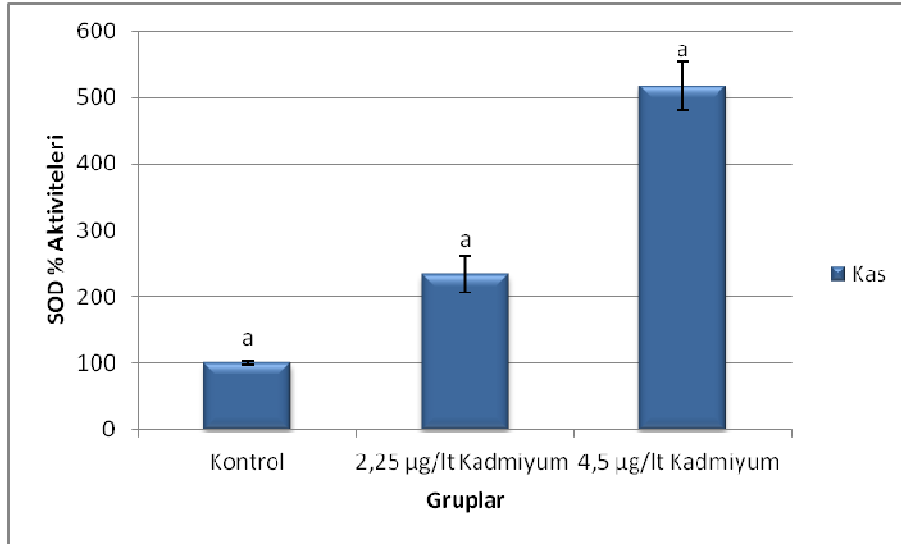
Aynı nikel ağır metalinde olduğu gibi kadmiyum ağır metalinin subletal dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının hiçbir dokusunda süperoksit dismütaz % aktivitelemi istatistiksel düzeyde önemli bulunamamıştır ( $p>0,05$ ) (Şekil 4.29, 4.30, 4.31).



**Şekil 4.29.** Subletal kadmiyum dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının karaciğer dokularında süperoksit dismütaz % aktivitelemi

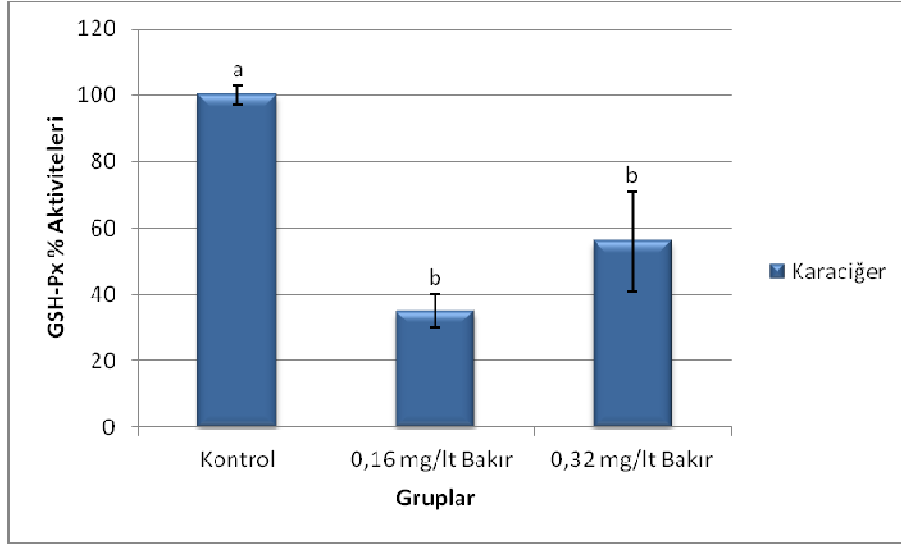


**Şekil 4.30.** Subletal kadmiyum dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının böbrek dokularında süperoksit dismütaz % aktiviteleri

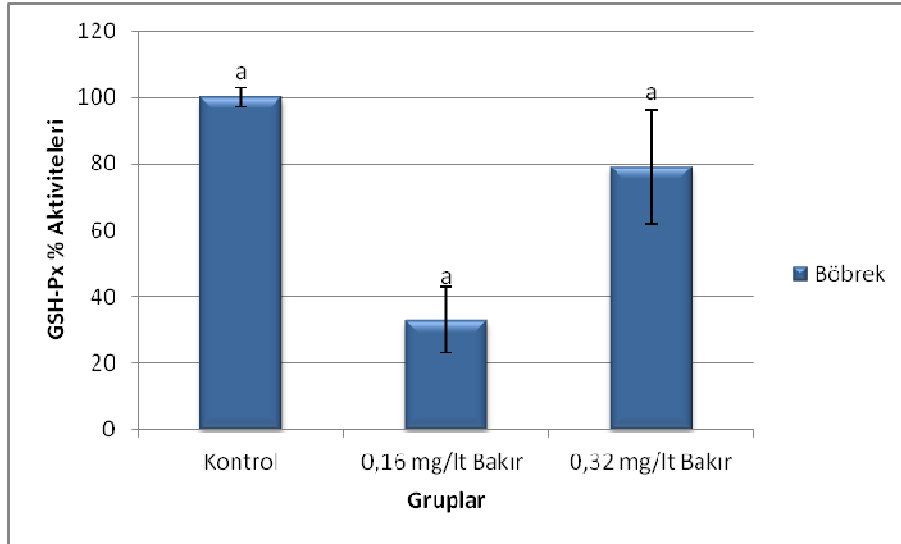


**Şekil 4.31.** Subletal kadmiyum dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının kas dokularında süperoksit dismütaz % aktiviteleri

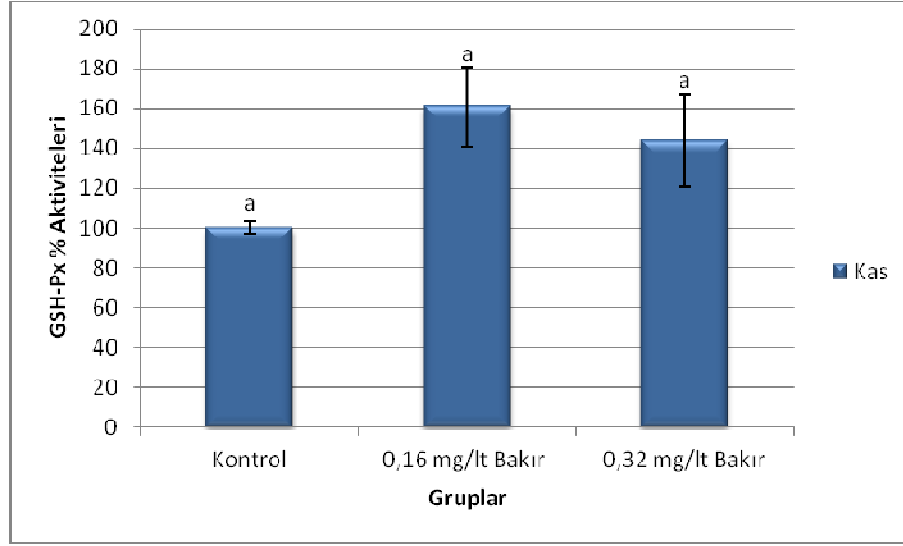
Bakır ağır metalinin subletal dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalık gruplarının karaciğer dokusunda glutasyon peroksidaz % aktivitesi kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede düşük bulunurken ( $p < 0,05$ ), böbrek ve kas dokularında ise gruplar arasında herhangi bir farklılık bulunamamıştır ( $p > 0,05$ ) (Şekil 4.32, 4.33, 4.34).



**Şekil 4.32.** Subletal bakır dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının karaciğer dokularında glutatyon peroksidaz % aktiviteleri ( $p < 0,05$ )

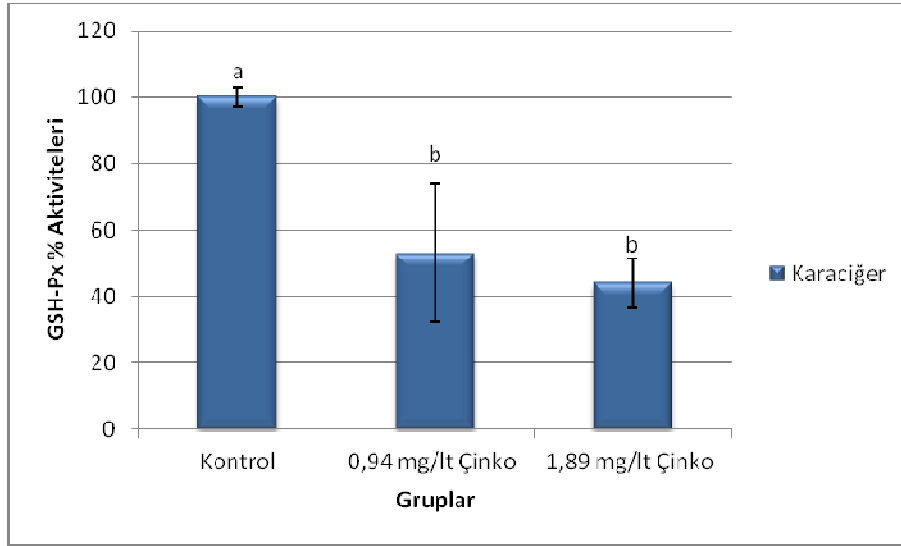


**Şekil 4.33.** Subletal bakır dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının böbrek dokularında glutatyon peroksidaz % aktiviteleri

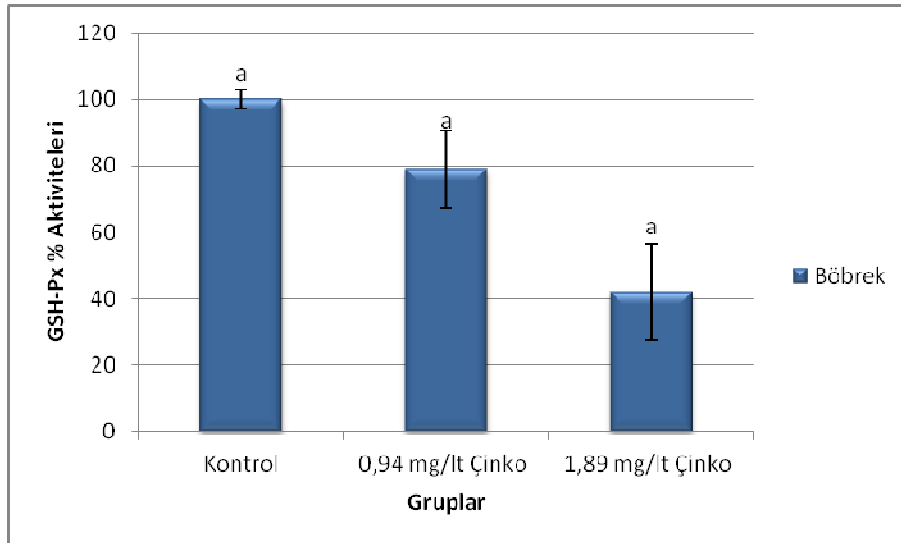


**Şekil 4.34.** Subletal bakır dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının kas dokularında glutatyon peroksidaz % aktiviteleri

Çinko ağır metalinin subletal dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının karaciğer dokusundaki glutatyon peroksidaz % aktivitesi istatistiksel düzeyde çok önemli bulunmuştur ( $p < 0,01$ ). Kontrol grubunun aktivitesi, 0,94 mg/lit ve 1,89 mg/lit çinkoya maruz kalmış karaciğer dokularınınkinden yüksek ölçülmüştür (Şekil 4.35). Böbrek ve kas dokularında ise gruplar arasında GSH-Px aktivitesi bakımından istatistiksel olarak farklılık bulunamamıştır ( $p > 0,05$ ) (Şekil 4.36, 4.37).

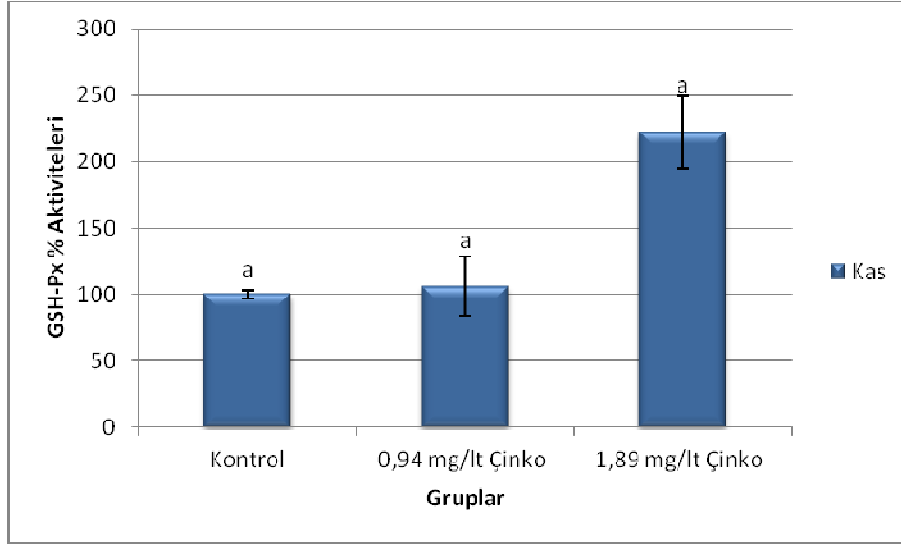


**Şekil 4.35.** Subletal çinko dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının karaciğer dokularında glutatyon peroksidaz % aktiviteleri ( $p < 0,01$ )



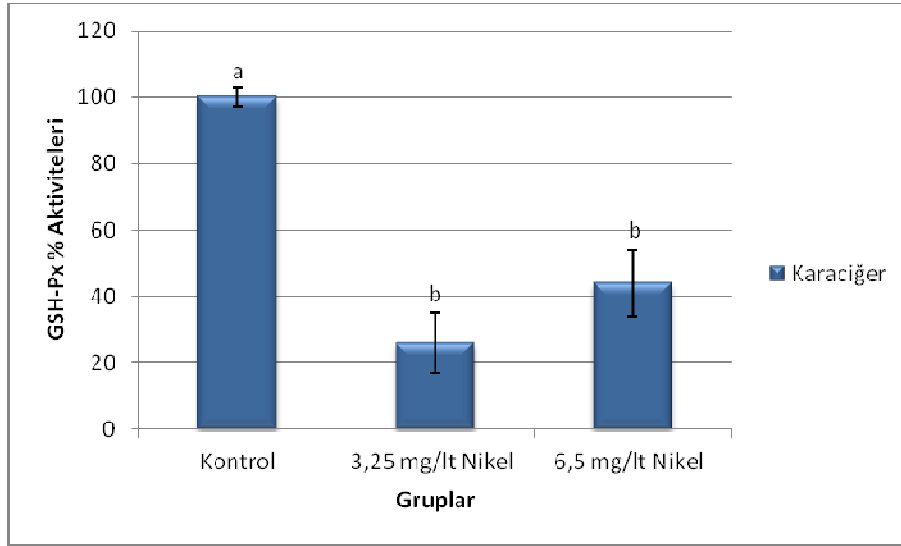
**Şekil 4.36.** Subletal çinko dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının böbrek dokularında glutatyon peroksidaz % aktiviteleri



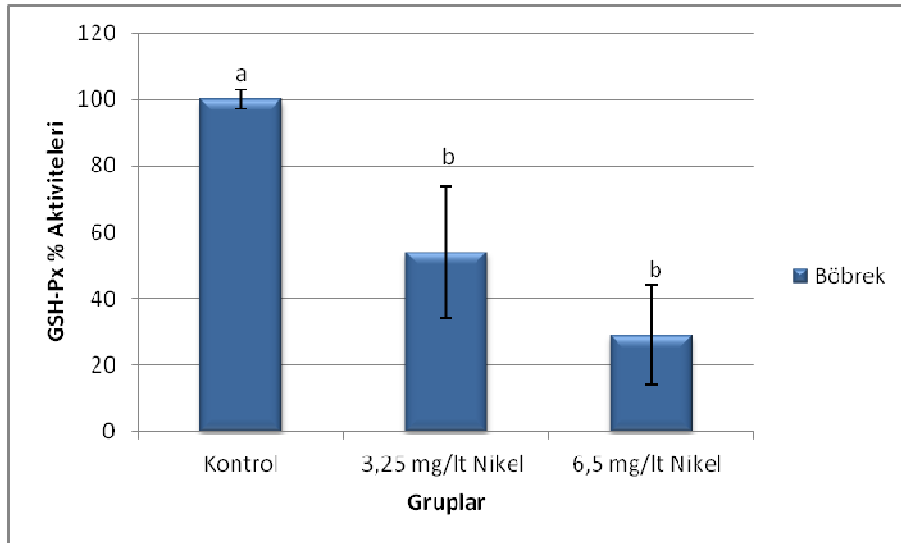


**Şekil 4.37.** Subletal çinko dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının kas dokularında glutatyon peroksidaz % aktiviteleri

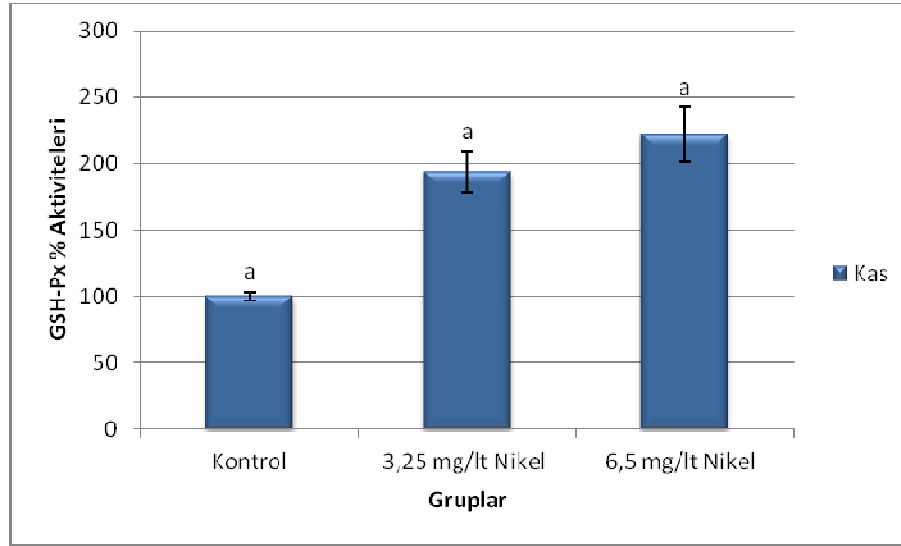
Glutatyon peroksidaz % aktivitelerinin istatistiksel düzeyde farklılığı nikel ağır metalinin subletal dozlarına maruz kalmış ve kalmamış Gökkuşığı alabalık gruplarında karaciğer ve böbrek dokularında çok önemli bulunmuştur ( $p < 0,01$ ). Her iki dokuda da kontrol grubunun aktivitesi diğer iki gruba göre istatistiksel düzeyde yüksek belirlenmiştir (Şekil 4.38, 4.39). Kas dokusunda ise GSH-Px aktivitesi önemli bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ) (Şekil 4.40).



**Şekil 4.38.** Subletal nikel dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının karaciğer dokularında glutasyon peroksidaz % aktiviteleri ( $p<0,01$ )

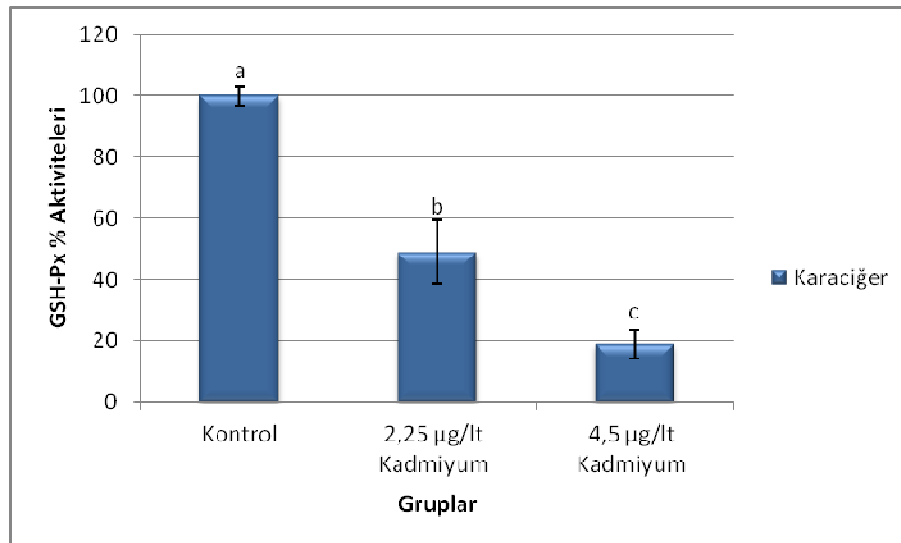


**Şekil 4.39.** Subletal nikel dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının böbrek dokularında glutasyon peroksidaz % aktiviteleri ( $p<0,01$ )

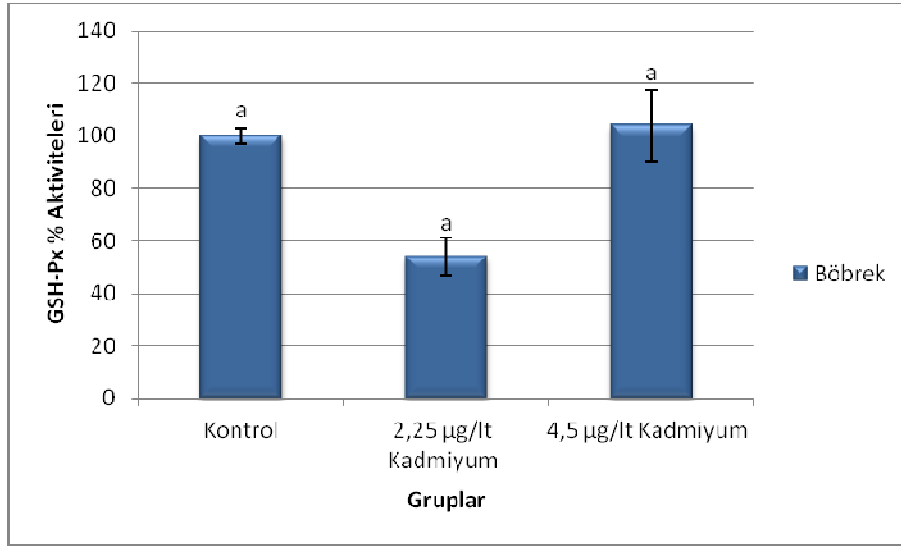


**Şekil 4.40.** Subletal nikel dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının kas dokularında glutasyon peroksidaz % aktiviteleri

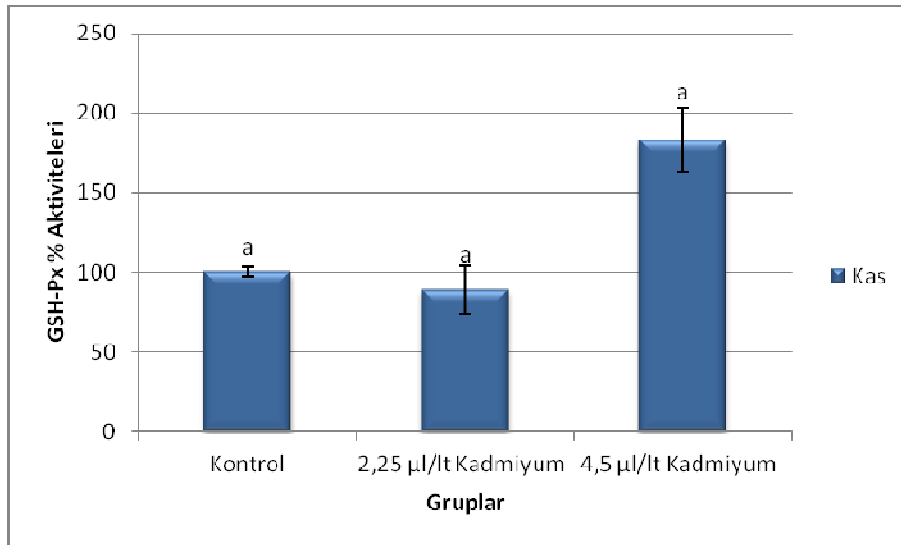
Kadmiyum ağır metalinin subletal dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının karaciğer dokularındaki GSH-Px % aktiviteleri çok önemli bulunmuştur ( $p < 0,01$ ). En yüksek aktivite kontrol grubunda, en düşük aktivite ise 4,5  $\mu\text{g}/\text{lt}$  kadmiyuma maruz kalmış grupta ölçülmüştür (Şekil 4.41). Böbrek ve kas dokularında ise önemli bulunamamıştır ( $p > 0,05$ ) (Şekil 4.42, 4.43).



**Şekil 4.41.** Subletal kadmiyum dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının karaciğer dokularında glutasyon peroksidaz % aktiviteleri ( $p < 0,01$ )



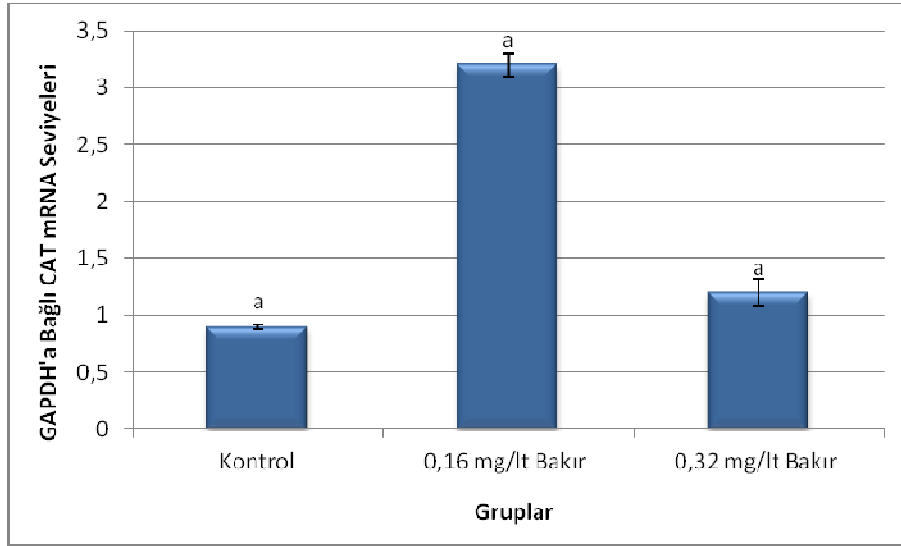
**Şekil 4.42.** Subletal kadmiyum dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının böbrek dokularında glutasyon peroksidaz % aktiviteleri



**Şekil 4.43.** Subletal kadmiyum dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının kas dokularında glutasyon peroksidaz % aktiviteleri

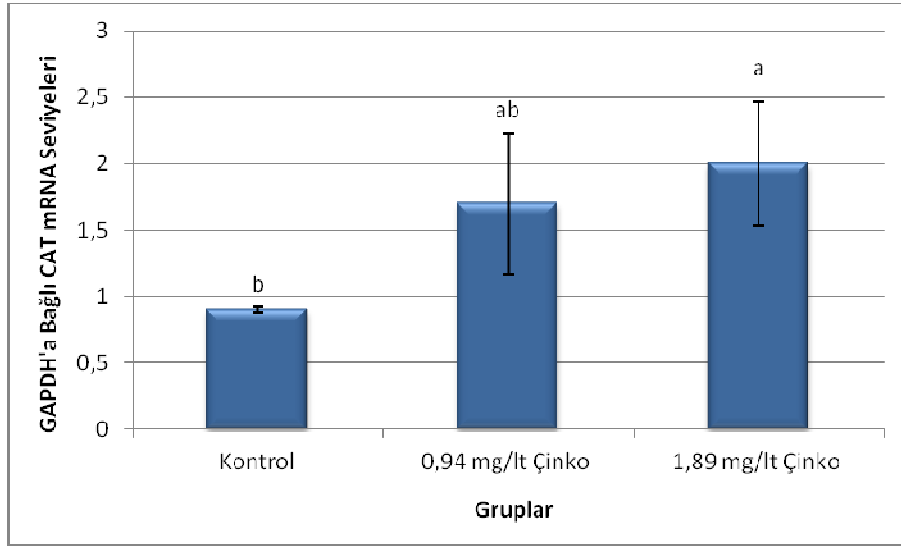
#### 4.1.6.b. Gen ekspresyonu sonuçları

Bakır ağır metalinin subletal dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının kas dokularındaki katalaz gen ekspresyonu istatistiksel olarak önemli bulunamamıştır ( $p>0,05$ ) (Şekil 4.44).



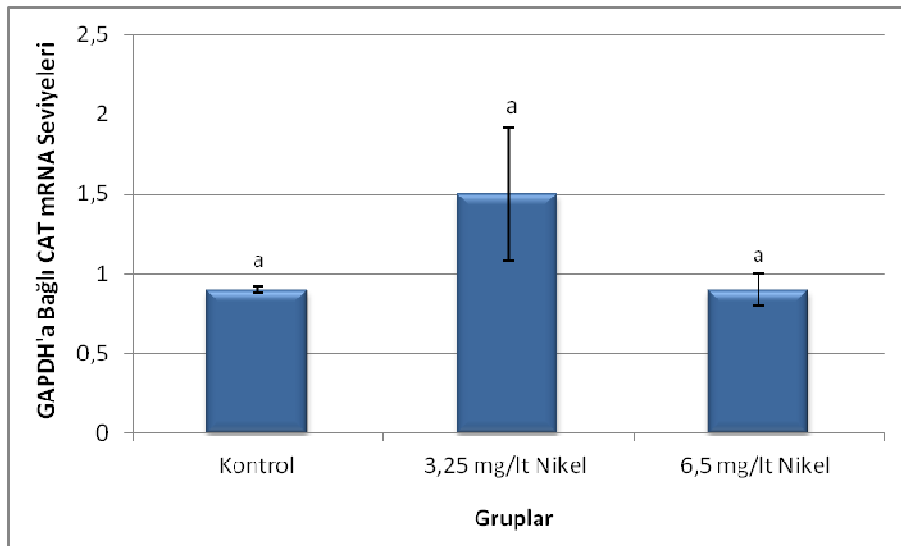
**Şekil 4.44.** Subletal bakıra maruz kalmış Gökkuşığı alabalığının kas dokularında katalaz mRNA seviyeleri

Çinko ağır metalinin subletal dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalık grupları kas dokularındaki GAPDH'a bağlı katalaz gen ekspresyonu seviyeleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Gruplar arasında yapılan karşılaştırmada ise; 1,89 mg/lit çinkoya maruz kalmış grup kontrol grubundan önemli derecede düşük bulunurken ( $p<0,05$ ), 0,94 mg/lit çinkoya maruz kalmış grubdan ise istatistiksel düzeyde farklılık oluşturmamıştır ( $p>0,05$ ) (Şekil 4.45).



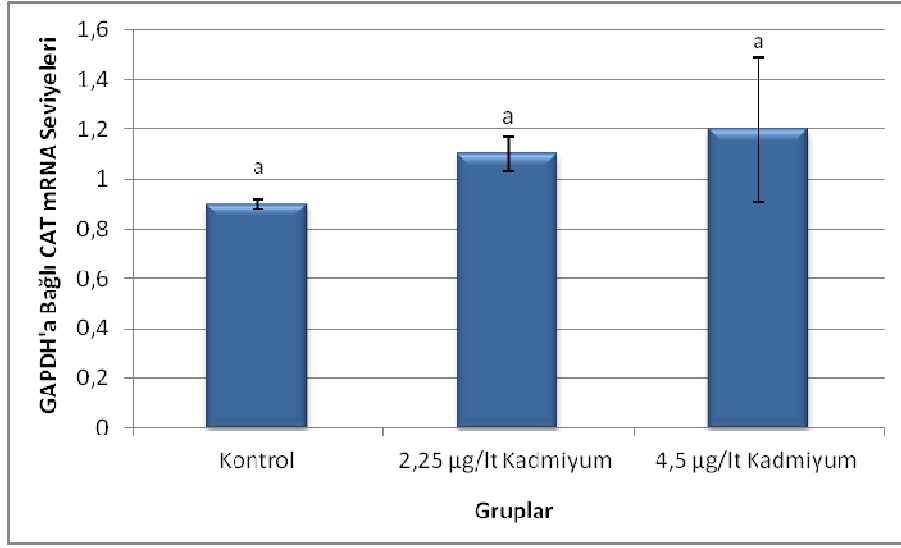
**Şekil 4.45.** Subletal çinkoya maruz kalmış Gökkuşığı alabalığının kas dokularında katalaz mRNA seviyeleri ( $p < 0,05$ )

Şekil 4.46'da görüldüğü üzere nikel ağır metalinin subletal dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının kas dokularında kontrol, 3,25 mg/lit ve 6,5 mg/lit nikel arasında GAPDH'a bağlı CAT mRNA seviyesinde önemli farklılık tespit edilememiştir ( $p > 0,05$ ).



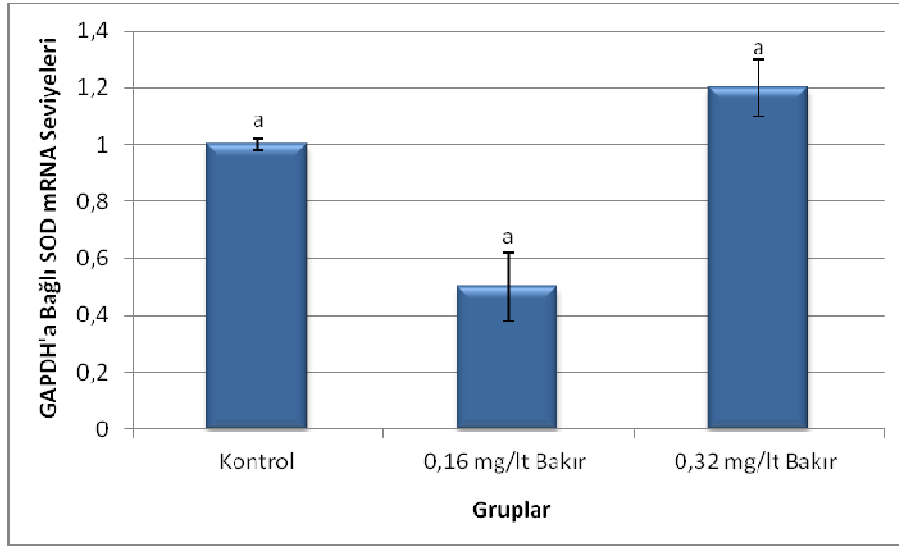
**Şekil 4.46.** Subletal nikel maruz kalmış Gökkuşığı alabalığının kas dokularında katalaz mRNA seviyeleri

Kadmiyum ağır metalinin subletal dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarının kas dokularında kontrol, 2,25  $\mu\text{g}/\text{lt}$  ve 4,5  $\mu\text{g}/\text{lt}$  kadmiyum arasında CAT mRNA seviyesi açısından istatistiksel düzeyde farklılık bulunamamıştır ( $p>0,05$ ) (Şekil 4.47).

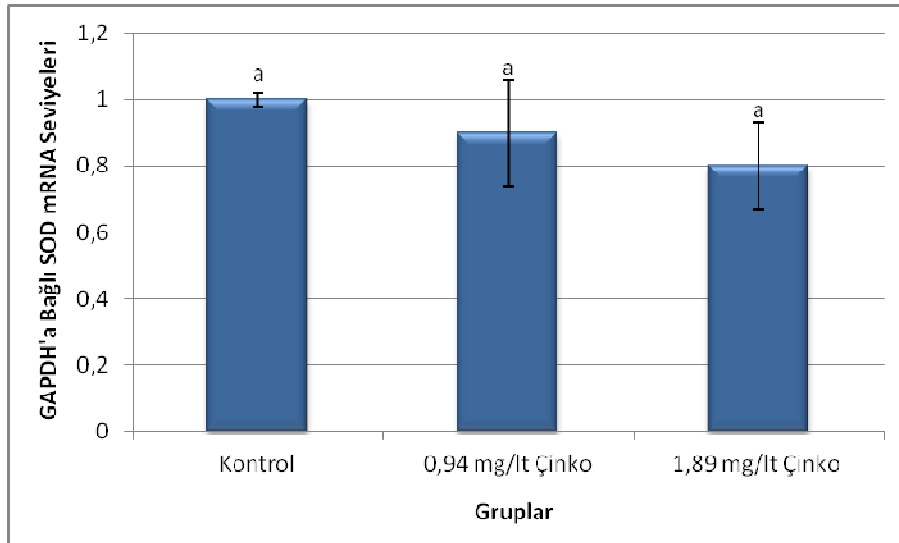


**Şekil 4.47.** Subletal kadmiyuma maruz kalmış Gökkuşığı alabalığının kas dokularında katalaz mRNA seviyeleri

0,16 mg/lt - 0,32 mg/lt bakır, 0,94 mg/lt - 1,89 mg/lt çinko, 3,25 mg/lt - 6,5 mg/lt nikel ve 2,25  $\mu\text{g}/\text{lt}$  - 4,5  $\mu\text{g}/\text{lt}$  kadmiyum subletal dozlarına maruz kalmış ve kalmamış Gökkuşığı alabalıklarının kas dokularındaki GAPDH'a bağlı süperoksit dismütaz gen ekspresyonu istatistiksel olarak önemli farklılık bulunamamıştır ( $p>0,05$ ) (Şekil 4.48, 4.49, 4.50, 4.51).

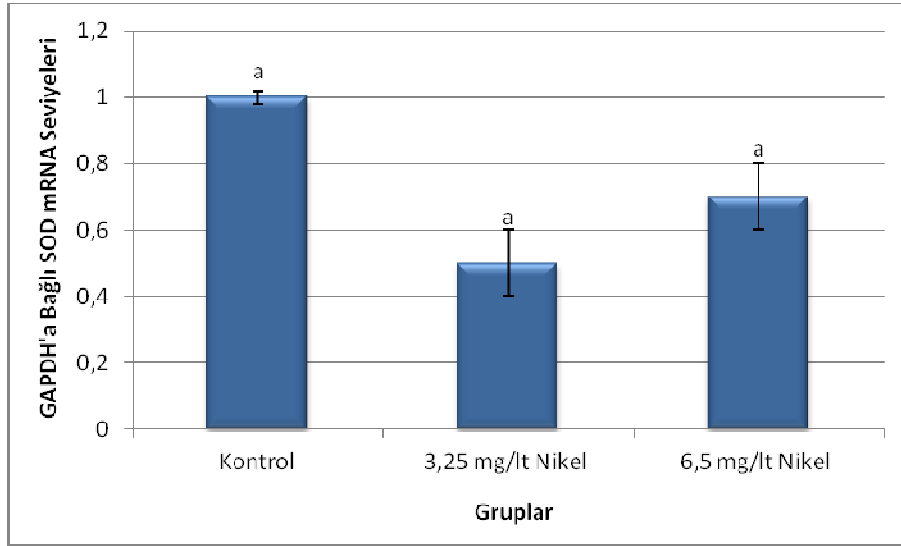


**Şekil 4.48.** Subletal bakıra maruz kalmış Gökkuşáğı alabalığının kas dokularında süperoksit dismütaz mRNA seviyeleri

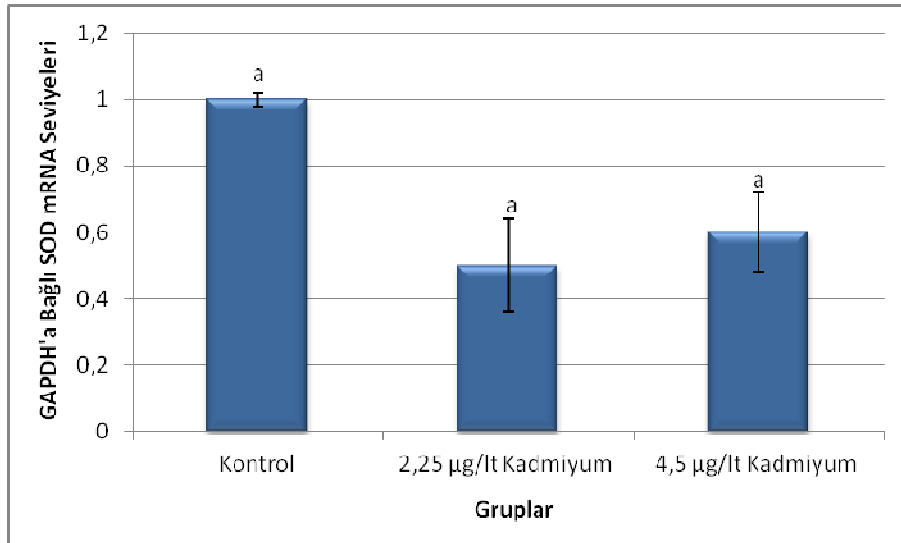


**Şekil 4.49.** Subletal çinkoya maruz kalmış Gökkuşáğı alabalığının kas dokularında süperoksit dismütaz mRNA seviyeleri





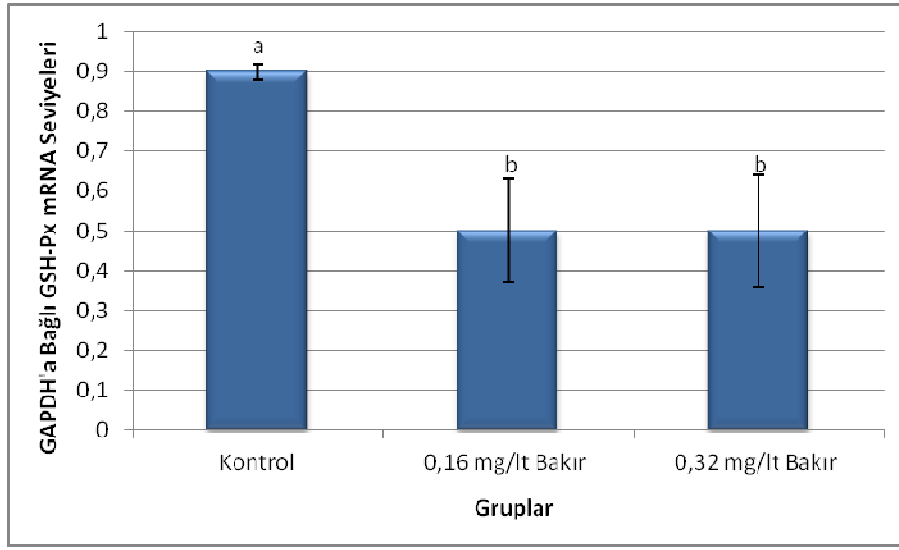
**Şekil 4.50.** Subletal nikel maruz kalmış Gökkuşığı alabalığının kas dokularında süperoksit dismutaz mRNA seviyeleri



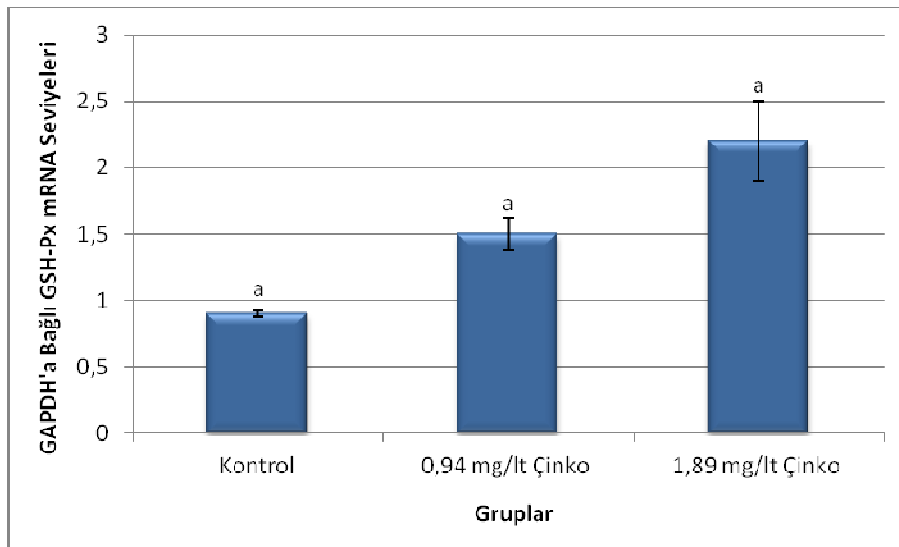
**Şekil 4.51.** Subletal kadmiyuma maruz kalmış Gökkuşığı alabalığının kas dokularında süperoksit dismutaz mRNA seviyeleri

Bakır ağır metalinin subletal dozlarına maruz kalmamış negatif kontrol olan Gökkuşığı alabalıklarının kas dokularındaki GSH-Px mRNA seviyesi 0,16 mg/lit ve 0,32 mg/lit bakıra maruz kalmış gruplarından istatistiksel düzeyde çok önemli ve yüksek olarak bulunmuştur ( $p < 0,01$ ) (Şekil 4.52). Çinko ağır metalinin subletal dozlarına maruz

kalmış ve kalmamış alabalıkların kas dokularının GAPDH'a bağlı glutatyon peroksidaz gen ekspresyonları arasında ise önemli farklılık tespit edilememiştir (Şekil 4.53).

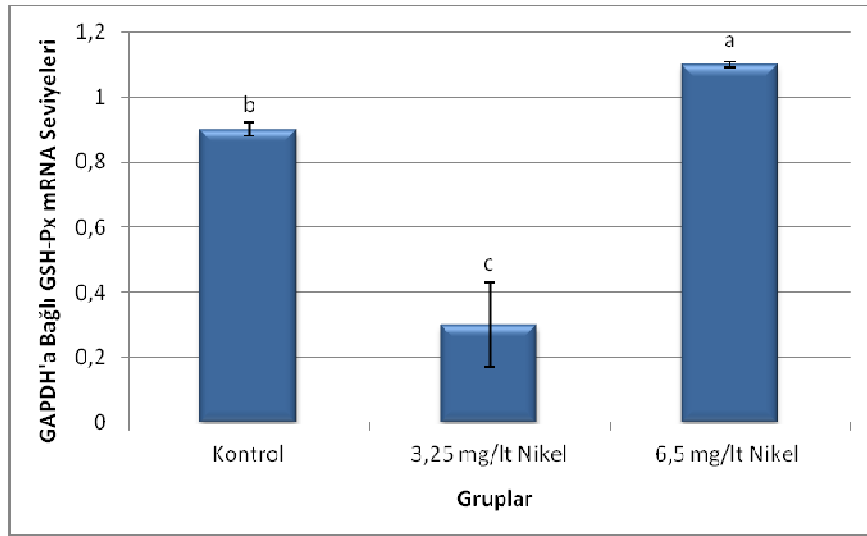


**Şekil 4.52.** Subletal bakıra maruz kalmış Gökkuşığı alabalığının kas dokularında glutatyon peroksidaz mRNA seviyeleri ( $p < 0,01$ )

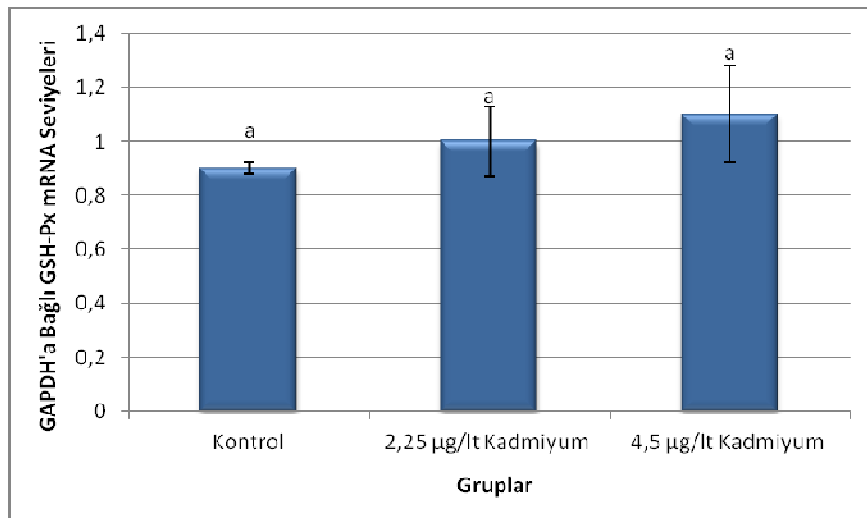


**Şekil 4.53.** Subletal çinkoya maruz kalmış Gökkuşığı alabalığının kas dokularında glutatyon peroksidaz mRNA seviyeleri

Gökkuşığı alabalıklarının nikel ağır metalinin subletal dozlarına maruz kalmış kas dokularının GSH-Px mRNA seviyesi arasında istatistiksel olarak önemli farklılık bulunmuştur ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.54). En yüksek aktivite 6,5 mg/lt, en düşük aktivite ise 3,25 mg/lt nikle maruz kalmış gruplarda ölçülmüştür. Kadmiyuma ise glutatyon peroksidaz gen ekspresyonları arasında önemli farklılık tespit edilememiştir ( $p>0,05$ ) (Şekil 4.55).



**Şekil 4.54.** Subletal nikle maruz kalmış Gökkuşığı alabalığının kas dokularında glutatyon peroksidaz mRNA seviyeleri ( $p<0,05$ )



**Şekil 4.55.** Subletal kadmiyuma maruz kalmış Gökkuşığı alabalığının kas dokularında glutatyon peroksidaz mRNA seviyeleri

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bir metal, bir biyolojik sisteme girdiği zaman, o canlının tüm dinamik yaşam proseslerine zarar verme kapasitesine sahiptir (Hu 2000). Sucul ortamdaki derişimi artan ağır metaller suda yaşayan organizmalar tarafından alınarak besin zinciri aracılığı ile üst trofik düzeylere taşınmaktadır. Sucul organizmalarda ağır metal birikiminin incelenmesi, ağır metallere karşı duyarlılığı yüksek türlerin belirlenmesinin yanı sıra organizmada meydana gelen yapısal ve işlevsel bozuklukların belirlenmesi bakımından da önem taşımaktadır. Balıklarda bazı ağır metallerin letal olmayan ortam derişimlerinde öncelikle solungaçlarda birikmesi, solungaçların, sudaki çözünmüş ağır metallerle doğrudan etkileşim halinde olmasından kaynaklanmaktadır. Solungaçlardaki ağır metal birikim düzeyi mortaliteye neden olacak düzeyde değil ise derişimi zaman içinde azalmaktadır. Ağır metaller subletal ortam derişimlerinin etkisinde balıkların karaciğer, böbrek ve dalak gibi metal metabolizması ve metal detoksifikasyonu ile ilgili organlarında yüksek düzeyde birirmektedir. Balıklarda karaciğer, ağır metalleri bağlayarak toksik etkilerinin yok edilmesinde işlev gören metallothionein ve glutatyon gibi metal bağlayıcı proteinlerin başlıca sentez yerlerinden biridir. Balıklarda kas dokusu ağır metal bağlamada etkili değildir (Kayhan 2006).

Su ürünlerinin ve özellikle de Gökkuşığı alabalığının ağır metallere maruz kalması sonucu enzim aktiviteleri ve gen ekspresyonları üzerine etkilerine ilişkin yapılmış çalışmalar oldukça sınırlıdır.

Yapılan çalışmalarda kirli alanlarda yaşayan, çeşitli kimyasallara maruz kalan farklı balık türlerinde SOD ve CAT enzim aktivitesinin değiştiği çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir.

Bu çalışmada, Cu, Zn, Ni ve Cd ağır metallerinin subletal dozlarına maruz kalmış Gökkuşığı alabalıklarında CAT, SOD ve GSH-Px antioksidan enzimlerinin aktivitelerindeki ve gen ekspresyonlarındaki değişimler incelenmiştir. Bu amaçla %

enzim aktiviteleri için spektrofotometre'ye başvururken, mRNA gen ekspresyonu için real time PCR uygulanmıştır. Genel olarak kontrol grubu ve kimyasal uygulanan gruplar kıyaslandığında istatistiksel açıdan farklı olduğu gözlemlenmiştir.

Enzim aktivite çalışmasında Gökkuşığı alabalığının karaciğer, böbrek ve kas dokusu kullanılmıştır. Çalışma sonrası elde edilen istatistiksel değerlendirmeler şu şekildedir;

Bakırın 0,16 mg/lt ve 0,32 mg/lt uygulanan dozları için Gökkuşığı alabalığının karaciğer, böbrek ve kas dokusunun CAT enzim aktivitesi önemsiz bulunmuştur. Yani uygulanan bakır ağır metalinin bu enzim üzerine bir etkisi görülmemiştir. Aynı şekilde Gökkuşığı alabalığının karaciğer ve kas dokusunun SOD enzim aktivitesi önemsiz bulunmuştur. Böbrek dokusunda ise 0,32 mg/lt bakır uygulaması sonucundaki SOD aktivitesinin kontrole göre düşük çıktığı, metalin enzimi inhibe ettiği belirlenmiştir. GSH-Px enzim aktivitesinin karaciğer dokusunda kontrole göre bakırın her iki dozunda da özellikle de 0,16 mg/lt dozunda baskılandığı, böbrek ve kas dokularında ise bakır ağır metalinin GSH-Px enzimi üzerine etki etmediği gözlenmiştir.

Çinkonun 0,94 mg/lt ve 1,89 mg/lt uygulanan dozları için Gökkuşığı alabalığının karaciğer dokusunun CAT enziminin farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca 0,94 mg/lt çinkonun CAT enzim aktivitesinin, kontrolünkinden daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Böbrek dokusunda çinkonun subletal dozlarının herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Kas dokusunda ise her iki subletal dozun CAT enzim aktivitesi üzerine olumsuz yönde etki ettiği ve enzimi inhibe ettikleri görülmüştür. Gökkuşığı alabalığına 0,94 mg/lt ve 1,89 mg/lt çinko uygulaması sonrası karaciğer ve kas dokusunun SOD enzim aktivitesi istatistiki olarak kontroldekinden farklı bulunmamıştır. Böbrek dokusunda 0,94 mg/lt çinkonun SOD aktivitesinin hem kontrolünküne hem de 1,89 mg/lt çinkonunkine göre azaldığı tespit edilmiştir. Uygulanan 0,94 mg/lt çinkonun GSH-Px enzim aktivitesinin karaciğer dokusunda kontrole göre düşük olduğu belirlenmiştir. Böbrek ve kas dokularındaki çinko uygulaması sonrası GSH-Px enzim aktivitesi önemsiz bulunmuştur.

Gökkuşığı alabalığının karaciğer dokusunda nikelin 3,25 mg/lt ve 6,5 mg/lt dozları CAT enzim aktivitesini kontrolünkine göre artırırken, 3,25 mg/lt dozun en yüksek aktiviteyi gösterdiği belirlenmiştir. Böbrek dokusunda 6,5 mg/lt nikelin olumsuz etkide bulunduğu ve diğer kontrole göre CAT enzim aktivitesini azalttığı gözlenmiştir. Kas dokusunda ise nikelin subletal dozlarının istatistiksel açıdan bir etkilerinin olmadığı belirlenmiştir. Nikelin subletal dozlarının uygulanması sonrası karaciğer, böbrek ve kas dokularının SOD enzim aktivitelerinde istatistiksel olarak bir önem görülmemiştir. Yani uygulanan nikel ağır metalinin dokulardaki SOD enzimi üzerine etkisi gözlenmemiştir. Karaciğer dokusuna nikelin her iki dozunun uygulanması sonrası GSH-Px enzim aktivitelerinin kontrole göre azaldığı, en çok indüklenme ise 3,25 mg/lt nikel uygulaması ile gözlenmiştir. Böbrekte de GSH-Px aktivitesinde kontrole göre indüklenmenin olduğu belirlenmiş, en çok azalma uygulanan 6,5 mg/lt doz sonrası istatistiksel olarak saptanmıştır. Kas dokusunda ise kontrol ve subletal dozlar arasında GSH-Px aktivitesinde istatistiksel bir önem bulunmamıştır.

Kadmiyumun 2,25 µg/lt ve 4,5 µg/lt dozları için Gökkuşığı alabalığının karaciğer dokusunda CAT enzim aktivitesi önemli bulunmuştur. CAT enzim aktivitesini kadmiyum ağır metalinin 2,25 µg/lt dozunun kontrole göre artırdığı, 4,5 µg/lt dozunun da olumsuz etkileyip kontrole göre baskıladığı saptanmıştır. Böbrek dokusunda her iki subletal dozun CAT aktivitesini kontrole göre baskıladığı belirlenmiştir. Kas dokusunda ise kadmiyumun subletal dozlarınının CAT enzim aktivitelerinin kontrole göre hiçbir farklılığı olmadığı bulunmuştur. Kadmiyum subletal dozları ve kontrolün arasında SOD enzim aktivitesi açısından bir farklılık istatistiksel açıdan bulunamamıştır. GSH-Px enzim aktivitesi açısından karaciğer dokusunda hem kontrol hem de kadmiyumun uygulanan 2,25 µg/lt ve 4,5 µg/lt dozları arasında istatistiksel önemlilik saptanmıştır. Kadmiyumun her iki dozunda da GSH-Px enziminin kontrole göre baskılandığı belirlenmiştir. Böbrek ve kas dokularında ise farklılık gözlenememiştir.

mRNA gen ekspresyon çalışmasında Gökkuşığı alabalığının kas dokusu kullanılmıştır. Çalışmadan elde edilen istatistiksel değerlendirmeleri ise şu şekilde özetleyebiliriz;

Bakırın 0,16 mg/lt ve 0,32 mg/lt dozlarının uygulanması sonrası GAPDH'a bağı CAT mRNA seviyeleri arasında istatistiksel açıdan bir farklılık bulunamamıştır. Aynı şekilde SOD gen ekspresyonları arasında da bir önem saptanamamıştır. Glutatyon peroksidaz gen ekspresyonu kontrole göre bakırın subletal dozlarında indüklenmiştir.

Çinkonun 1,89 mg/lt dozu için GAPDH'a bağı CAT mRNA seviyesi kontrole göre yüksek bulunmuştur. Kontrol ve çinkonun subletal dozlarına maruz kalmış Gökkuşağı alabalıklarının kas dokularındaki GAPDH'a bağı süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gen ekspresyonları istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

Gökkuşağı alabalığının nikelin 3,25 mg/lt ve 6,5 mg/lt dozlarına maruz bırakılması sonrası elde edilen CAT ve SOD gen ekspresyonları önemli bulunmamıştır. GAPDH'a bağı GSH-Px mRNA seviyeleri kontrol ve nikelin subletal dozları arasında farklı bulunmuştur. 3,25 mg/lt nikel uygulaması sonrası GSH-Px gen ekspresyonu kontrole göre indüklenmiş, 6,5 mg/lt nikel uygulaması sonrası GSH-Px gen ekspresyonu ise kontrole göre yüksek bulunmuştur.

Kadmiyumun uygulanan 2,25 µg/lt ve 4,5 µg/lt dozları ve kontrol arasında Gökkuşağı alabalığının kas dokusuna ait CAT, SOD ve GSH-Px mRNA seviyeleri istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur.

Sonuç olarak istatistiksel önemliliği (farklılığı), kontrole göre ağır metal uygulaması sonucu dokudaki enzim aktivitesinin ve gen ekspresyonunun artışı ya da azalışı olarak açıklayabiliriz. Ağır metallerin ve subletal dozlarının dokulardaki enzim aktivitelerini kontrole göre ya indüklediği ya artırdığı ya da etkilemediği saptanmıştır. Genel olarak enzim aktivitesi sonuçlarının, enzimlere, ağır metallere ve kullanılan dozlara bağı olarak değişkenlik gösterdiği gözlenmiştir. Gen ekspresyonunda istatistiksel sonucun önemli çıkması genin modifikasyonu ile ifade edilebilir. Bunun sonucunda ağır metallerin uygulanan dozlarından sonra elde edilen ekspresyonların kontrolden düşük

oluşu genin kodladığı protein oluşumunun baskılandığını, yüksek oluşu ise daha fazla protein oluşumunu belirtmektedir.

Ayrıca enzimler birer proteindir. Antioksidanlar için, CAT, SOD ve GSH-Px gen ekspresyonları sonucu oluşan proteinler sırasıyla CAT, SOD ve GSH-Px antioksidan enzimlerini oluştururlar. Bu bağlamda enzim aktivitesi ile gen ekspresyonları arasında bir ilişki bulunması gerekir. Buna göre değerlendirme yapıldığında bakır, çinko, nikel ve kadmiyum ağır metallerinin subletal dozlarına maruz kalmış ve kalmamış kas dokusunda CAT ve SOD ekspresyonları ile enzim aktiviteleri arasında bir ilişki bulunmuş ve istatistiksel açıdan benzer sonuçlar elde edilmiştir. GSH-Px ekspresyonları ile enzim aktiviteleri arasında çinko ve kadmiyum ağır metallerinde benzer bir ilişki bulunmuşken, bakır ve nikel ağır metallerinde ise farklı sonuçlar gözlenmiştir.

Çevre insan sağlığı üzerinde önemli bir belirleyicidir. İnsan eliyle olan faaliyetler ve doğal etkileşimler insan sağlığı üzerinde genellikle olumsuz etkiler bırakmaktadır. Metaller ve ağır metallere bağlı etkileşimler madencilik ve sanayi faaliyetlerinin artması ile son birkaç yüzyılda giderek daha fazla oranda gündemimizi meşgul etmektedir. Yeraltı kaynaklarından yararlanmanın ve sanayileşmenin insanoğlunun yaşamına getirdiği zenginliğin yadsınması mümkün değildir. Ancak bu faaliyetlerin insan sağlığına olan olası etkilerinin göz ardı edilmeden sürdürülmesi yaşamın gelecek kuşaklara sağlıklı olarak aktarılması için son derece önemlidir (Bakar ve Baba 2009).

Ağır metaller ve bunların bileşikleri başta kimyasal proses atıkları olmak üzere, çeşitli emisyon kaynakların aracılığı ile çevreye yayılmaktadır. Bu emisyonlar su ürünlerinde, bitkilerin yaprak ve köklerinde depolanmakta ayrıca havada da bulunmaktadır.

Endüstri ve teknolojiye ilerlemeler bir takım olumsuzlukları da beraberinde getirmektedir. Endüstriyel ve kentsel atıklarla kirlenmiş iç ve kıyı sularında yaşayan su ürünleri sakıncalı derecelerde metal artıklarıyla kirlenmektedir. Metal kalıntıları



gıdalara arzu edilmeyen yapı ve aroma kazandırmakla birlikte insan sağlığı için de tehlike oluşturmaktadır (Atayeter ve Köksal 1998).

Sucul ortamlardaki metal kirliliğinin yok edilmesinde klasik kimyasal ve fiziksel yöntemler pratik ve ekonomik olmadığı gibi başka çevre sorunlarını da beraberinde getirmektedir. Dolayısıyla doğayla uyumlu biyolojik yöntemlerin esas alınması oldukça önemlidir (İleri vd 1994).

Ayrıca son yıllarda sulardaki metal kirliliğini yok etmek amacıyla kontrollü su bitkisi kültürlerinden de yararlanılmaktadır. Bu amaçla özellikle *Eichhornia crassipes* (Su Sümbülü) kullanılmaktadır. Çünkü su sümbülü, su kadifesi gibi sucul ya da yarı sucul bitkiler kök ve yumrularında metal biriktirebilmekte ve bu özelliği ile yaşadığı ortamı ağır metal bakımından temizlemektedir (Ramacandran and D'souza 1998). Ancak unutulmamalıdır ki doğal çevreyi kirletip ardından da temizlemeye yönelik çalışmalar yapmak yerine, kirliliği en baştan önleyecek tedbirler alınması gerekmektedir. Özellikle hızlı kentleşme, kontrolsüz nüfus artışı vesanayileşmenin yol açtığı problemler bilinçli yaklaşımlarla çözümlenmelidir. Alt yapı yetersizlikleri giderilmeli, kanalizasyonların su kaynaklarına karışması önlenmelidir. Ayrıca sanayi kuruluşlarının atık sularını arıtım yapmadan su kaynaklarına deşarj etmesi engellenmeli, düzenli kontroller yapılmalı ve caydırıcı cezai işlemler uygulanmalıdır (Ağcasulu 2007).

Balık yetiştiriciliği yapılan sulara (tatlısu, tuzlu su, akarsu ve durgun su), içerisinde barındırmış oldukları organizmalara zarar verebilecek her çeşit yabancı maddelerin karıştırılmaması insan sağlığı açısından, ekonomik açıdan ve organizmaların sağlığı açısından büyük önem arz etmektedir. Bu nedenle gerekli ön tedbirler alındıktan ve incelemeler yapıldıktan sonra balık üretim tesisleri planlanmalı, doğal sulardan avlanan balıklardan metal birikimi sonucu olabilecek zehirlenmeler ve ölümlerin önüne geçilebilmesi için ise doğal su kaynaklarımızın her çeşit kirleticilerden korunması zorunludur (Atamanalp ve Yanık 2003).

Özetleyecek olursak tarih boyunca tüm kültürlerde olduğu gibi insan yaşamını ve yerleşimini belirleyici öğelerinden en önemlisi sudur. Yaşamımızda çok önemli bir yeri olan ve yeryüzünün büyük bir bölümünü oluşturan suyun çeşitli nedenlerle kirlendiği bilinmektedir. Nüfus artışı, kentleşme, sanayileşme, tarımsal mücadele ilaçları ve kimyasal gübreler su kirliliğine neden olan unsurlardan başlıcalarıdır. Her çeşit su kirliliği, kirliliğin bulunduğu suyun çevresinde veya içinde yaşayan tüm canlılara zarar verdiği gibi, çeşitli türlerin ve biyolojik toplulukların yok olmasına ortam hazırlar. Kirliliğin en yoğun olduğu sucul kaynaklar, gelecekteki gıda deposu olma özelliğini hızla yitirmektedir. Bu kirlilik, besin zinciri boyunca giderek artmakta ve sonuçta tüm canlı sistemler bu kirlenmeden payına düşeni almaktadır. Su ortamındaki kirliliğin önlenmesi amacıyla arıtma tesisleri kurulmalı, su kaynaklarına yakın yerlerde nüfus artışının önüne geçilmeli, insanlar bilinçlendirilmelidir. Hava ve toprak kirliliğine sebep olan faktörler ortadan kaldırılmalıdır. Su kaynaklarının korunması için yürürlükte bulunan kanun, tüzük ve yönetmelikler etkili bir şekilde uygulanmalı, alınan önlemler genişletilmelidir. Toplum bilinçlendirilmeli, bu amaçla görsel ve yazılı basından da yararlanılmalıdır.

## KAYNAKLAR

- Aberhart, A.R., Larson, G.L., Mathews, J.R., 1984. Heavy metals in surficial sediments of Fontana Lake, North Carolina. 18, (13), 351-354.
- Ağcasulu, Ö., 2007. Sakarya nehri Çeltikçe Çayı'nda yaşayan *Capoeta Tinca* (Heckel, 1843)'nın dokularında ağır metal birikiminin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Ahmad, S., 1995. Oxidative stress and antioxidant defenses in biology. Chapman and Hall, New York, 447 s.
- Ahmad, I., Maria, V.L., Oliveira, M., Pacheco, M., Santos, M.A., 2006a. Oxidative stress and genotoxic effects in gill and kidney of *Anguilla anguilla* L. exposed to chromium with or without pre-exposure to  $\beta$ -naphthoflavone. Mutation Research, 608: 16-28.
- Ahmad, I., Pacheco, M., Santos, M.A., 2006b. *Anguilla anguilla* L. Oxidative stress biomarkers: An in situ study of freshwater wetland ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal)", Chemosphere, 65: 952-962.
- Ahmed, F.E., 2002. Detection of genetically modified organisms in foods. Trends in Biotechnology 5, 215-223.
- Akay, C., 2004. Biyomarkörlerin toksikolojide kullanımı. Gülhane Tıp Dergisi 46 (1) : 73 – 83.
- Alkan, A., 2005. Bazı ağır metal ve selenyum bileşiklerine maruz kalan alabalıklarda antioksidan enzim aktivitelerinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Malatya.
- Amundsen, P., Staldvik, F.J., Lukin, A.A., Kashulin, N.A., Popova, O.A., Reshetnikov, Y.S., 1997. Heavy metal contamination in freshwater fish from the Border Region between Norway and Russia. The Science of the Total Environmental, 201.
- Anonim 1997.  
[www.umweltbundesamt.de/uba-info-daten-t/daten/umweltkatastrophen.htm](http://www.umweltbundesamt.de/uba-info-daten-t/daten/umweltkatastrophen.htm).
- Anonim 2002. Su Ürünleri Kanunu ve Su Ürünleri Yönetmeliği. Tarım ve Köy işleri Bakanlığı, Ankara, 63-78.
- Anonim 2009. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Antioksidan>
- Anonim 2010a.  
[http://tr.wikipedia.org/wiki/G%C3%B6kku%C5%9Fa%C4%9F%C4%B1\\_alabal%C4%B1%C4%9F%C4%B1](http://tr.wikipedia.org/wiki/G%C3%B6kku%C5%9Fa%C4%9F%C4%B1_alabal%C4%B1%C4%9F%C4%B1)
- Anonim 2010b. [http://en.wikipedia.org/wiki/Rainbow\\_trout](http://en.wikipedia.org/wiki/Rainbow_trout)
- Anonim 2010c. [http://en.wikipedia.org/wiki/Copper\(II\)\\_chloride](http://en.wikipedia.org/wiki/Copper(II)_chloride)
- Anonim 2010d. [http://en.wikipedia.org/wiki/Zinc\\_chloride](http://en.wikipedia.org/wiki/Zinc_chloride)
- Anonim 2010e. [http://en.wikipedia.org/wiki/Nickel\(II\)\\_chloride](http://en.wikipedia.org/wiki/Nickel(II)_chloride)
- Anonim 2010g. [http://en.wikipedia.org/wiki/Cadmium\\_chloride](http://en.wikipedia.org/wiki/Cadmium_chloride)
- Anonim 2011a. [http://www.biocat.com/cgi-bin/page/sub1.pl?sub1=real\\_time\\_pcr\\_custom\\_probes\\_and\\_primers&main\\_group=gene\\_analysis](http://www.biocat.com/cgi-bin/page/sub1.pl?sub1=real_time_pcr_custom_probes_and_primers&main_group=gene_analysis)
- Anonim 2011b. <http://www.biyotip.com/images/File/e.pdf>
- Anonim 2011c. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/phs5.html>
- Anonim 2011d.

- <http://duzce.cevreorman.gov.tr/Duzce/AnaSayfa/CYCEDSubeMudurlugu/suKirliligi.aspx?sflang=tr>
- Anonim 2011e. [http://www.ahmettutar.com/all\\_upload/image/humikasit.pdf](http://www.ahmettutar.com/all_upload/image/humikasit.pdf)
- Anonim 2011f. [http://www.gidamo.org.tr/resimler/ekler/7b16ecf8ca53723\\_ek.pdf?dergi=16](http://www.gidamo.org.tr/resimler/ekler/7b16ecf8ca53723_ek.pdf?dergi=16)
- Anonim 2011g. <http://profdrorhancanbolat.com/fckeditor/editor/filemanager/connectors/asp/usefiles/file/Dersler/DNA-RNA-Protein%20Biosentezi.pdf>
- Anonim 2011h. [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Difference\\_DNA\\_RNA-EN.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Difference_DNA_RNA-EN.svg)
- Anonim 2011ı. [www.mustafaaltinisik.org.uk/0809-1-4-07GenIfadesi.ppt](http://www.mustafaaltinisik.org.uk/0809-1-4-07GenIfadesi.ppt)
- Anonim2011i. [http://www.google.com.tr/url?sa=t&source=web&cd=1&ved=0CBYQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.bursagida.gov.tr%2Fyeniweb\\_resimler%2FE-BULTENIMIZ%2FPCR%2520HAZIR.ppt&ei=dsspTcfUOsut8QPvjJnhAg&usg=AFQjCNGNWx\\_xSxCaNLy4y6i99dO8OJGSQA](http://www.google.com.tr/url?sa=t&source=web&cd=1&ved=0CBYQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.bursagida.gov.tr%2Fyeniweb_resimler%2FE-BULTENIMIZ%2FPCR%2520HAZIR.ppt&ei=dsspTcfUOsut8QPvjJnhAg&usg=AFQjCNGNWx_xSxCaNLy4y6i99dO8OJGSQA)
- Anonim 2011j. <http://www.duzen.com.tr/artFiles/molekulermikro.pdf>
- Anonim 2011k. <http://www.refgen.com/multipleks-pcr.asp>
- Anonim 2011m. [http://www.thd.org.tr/doc/kurs\\_pdf/mugeaydinsayitoglu.pdf](http://www.thd.org.tr/doc/kurs_pdf/mugeaydinsayitoglu.pdf)
- Anonim 2011n. [http://www.mikobakteri2009.org/download/Yasemin\\_BULUT.pdf](http://www.mikobakteri2009.org/download/Yasemin_BULUT.pdf)
- Anonim 2011o. <http://www.refgen.com/realtime-pcr.asp>
- Anonim2011ö. [http://www.slidefinder.net/p/pcr\\_real\\_time\\_pcr\\_ara%C5%9F/22790986](http://www.slidefinder.net/p/pcr_real_time_pcr_ara%C5%9F/22790986)
- Anonim 2011p. <http://www.dkfz.de/gpcf/lightcycler480.html>
- Anonim2011r. [http://www.genetiklab.com/altsayfa.php?giris\\_ID=2&tablo=tbl\\_yontemler](http://www.genetiklab.com/altsayfa.php?giris_ID=2&tablo=tbl_yontemler)
- Anonim 2011s. <http://www.biographixmedia.com/biology/trout-fish-anatomy.html>
- Anonim 2011ş. <http://www.bekircol.com/biyokimyalab/labnukleikasit.pdf>
- Anonim 2011t. <http://www.nanodrop.com/Library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf>
- Alkan, A., 2005. Bazı ağır metal ve selenyum bileşiklerine maruz kalan alabalıklarda antioksidan enzim aktivitelerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya.
- Atabeyoğlu, K., 2007. Bölgemizdeki Aras, Karasu ve Çoruh havzalarından yakalanan yerli alabalıkların (*Salmo trutta sp.*) mtdna d-loop F1 ile 12S1-H bölgesi arasındaki genetik farklılığın PCR-RFLP ve mikrosatellit yöntemleriyle belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Atabeyoğlu, K., Atamanalp, M., 2010. Yumuşakçalarda (Molluska) yapılan ağır metal çalışmaları. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg. 5 (1): 35-42.
- Atamanalp, M., Yanık, T., 2003. Salmonidlerde yapılan toksikolojik çalışmalar. Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg. 34 (1), 105-110.
- Atayeter, S., Köksal, G., 1998. Determination of Pb, Cu, Cd and Hg concentrations in water, sediment and some fish species from the Gemlik Bay, Karacaali Region. The proceedings of the First International Symposium on Fisheries and Ecology, Trabzon.
- Bagdonas, E., Vosylienė, M.Z., 2006. A study of toxicity and genotoxicity of copper, zinc and their mixture to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Biologija. Nr. 1. P. 8–13.

- Bainy, A.C.D., Saito, E., Carvalho, P.S.M., Jungueria, V.B.C., 1996. Oxidative stres in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from poluted site. *Aquatic Toxicology*, 34: 151-156.
- Bakar, Ç., Baba, A., 2009. Metaller ve insan sağlığı: yirminci yüzyıldan bugüne ve geleceğe miras kalan çevre sağlığı sorunu. 1.Tıbbi Jeoloji Çalıştayı, 30 Ekim–1 Kasım 2009, Nevşehir.
- Balkıs, N., Algan, O., 2005. Marmara Denizi yüzey sedimentlerinde metallerin birikimi ve denetleyen mekanizmalar. *Deniz Kirliliği*, 21, TÜDAV Yayınları, İstanbul.
- Baş, L., Demet, Ö., 1992. Çevresel toksikoloji yönünden bazı ağır metaller. *Ekoloji. Çevre dergisi*. Sayı 5, 42-46.
- Bayır, A., 2005. “Hınıs çayı (Murat havzası)’nda yaşayan siraz balığı (*Capoeta capoeta umbra*)’nın antioksidan enzim aktiviteleri, serum lipitleri, lipoproteinleri ve hematolojik parametrelerin mevsimsel değişimlerinin incelenmesi”, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Anabilim Dalı, Erzurum.
- Beutler, E., 1984. Red cell metabolism. Grune&Stratton, Inc. Orlando, 3<sup>rd</sup>ed, USA.
- Bhattacharya, A., Bhattacharya, S., 2007. Induction of oxidative stres by arsenic in *Clarias batrachus*: Involvement of peroxisomes. *Ecotoxicology and Environmental Saftey*, 66: 178-187.
- Bigersson, B., Sterner, O., Zimerson, E., *Chemie und Gesundheit*, 1988. Eine verstärkliche Einführung in die Toxikologie, VCHVerlagsgesellschaft, ISBN3-527-26455-8.
- Bilir, N., Yıldız, A.N., 2004. İş sağlığı ve güvenliği, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara.
- Blakely, W.F., 1990. Hydrogen peroxide induced base damage in DNA. *Radiat Res.* 121: 338-343.
- Brix, K.V., Keithly, J., Deforest, D.K. Laughlin, J., 2004. Acute and chronic toxicity of nickel to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 23, No. 9, pp. 2221–2228.
- Bryan, G., 1976. Heavy metal contamination in the sea in: R.Johnston. *Mar. Poll.* Academic Press mc., London, 185-302.
- Bryan, G.W., Uysal, H., 1978. Heavy metal the burowing Bivalve Scropicularya Plana from the Tomar Estuary in relation to environmental levels. *J. Marine Biol. Ass. U. K.*, 58 (1), 89-108.
- Bustin, S.A., 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 29, 23–39.
- Bustin, S.A., 2005. Real-time reverse transcription PCR. *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics*
- Chan, H.M., Cherian, M.G., 1992. Protective roles of MT and glutathione in hepatotoxicity of Cd. *Toxicology*. 72:281-290.
- Cheeseman, K.H., Slater, T.F., 1993. An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.* 49(3): 479-80.
- Cho, S.Y., Choi, B.N., Kim, K.H., Kim, S.K., Kim, D.S., Bang, I.C., Nam, Y.K., 2006. Differential expression of Cu/Zn superoxide dismutase Mrna during exposures to heavy metals in rockbream (*Oplegnathus fasciatus*). *Aquaculture* 253, 667–679.

- Choi, C. Y., An, K. W., Nelson, E. R., Habibi, H. R., 2007. Cadmium affects the expression of metallothionein (MT) and glutathione peroxidase (GPX) mRNA in goldfish, *Carassius auratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 145, 595–600.
- Choi, C.Y., An, K.W., An, M.I., 2008. Molecular characterization and mRNA expression of glutathione peroxidase and glutathione S-transferase during osmotic stress in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 149, 330–337.
- Chuang, H.Y., 2005. Reversible neurobehavioral performance with reductions in blood lead levels—A prospective study on lead workers. *Neurotoxicology and Teratology* 27, pp 497–504.
- Clark, R.B., 2003. *Marine Pollution*. Oxford University Press. 5th. Ed. London, England.
- D'Souza, S.H., Menezes, G., Venkatesh, T., 2003. Role of essential trace minerals on the absorption of heavy metals with special reference to lead. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 18(2):154-160.
- De Conto Cinier, C., Ramel, M.P., Faure, R., Garin, D., Bouvet, Y., 1999. Kinetics of Cd accumulation and elimination in Carp *Cyprinus carpio* tissues. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 122:345-352.
- De Smet, H., De Wachler, B., Lobinski, R., Blust, R., 2001. Dynamics of (Cd-Zn)-Metallothionein in gills, liver and kidney of Common carp *Cyprinus carpio* during Cd exposure. *Aquatic Toxicol.* 52:269-281.
- Diplock, A., 1998. Healthy life styles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. ILSI Europe concise monograph series, 59 p., Belgium.
- Dökmeci, İ., 1988. Toksikoloji. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 56-60, 488-489.
- Duffus, J.H., Worth, H.G.J., 1996. "Fundamental toxicology for chemists", Cambridge, UK : Royal Society of Chemistry Information Services.
- Dural, M., Göksu M.Z., Özak, A.A., 2007. Investigation of heavy metal levels in economically important fish species captured from the Tuzla lagoon , *Food Chemistry*, 102: 415-421.
- Edułjee, G., Badsha, K., Price, L., 1985. Environmental monitoring and heavy metals in the vicinity of a chemical waste disposal facility-1. *Chemosphere.* 14, (9), 1371-1382.
- Egemen, Ö., Sunlu, U., 2003. Su kalitesi. E.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, No:14, E.Ü. Basımevi, 148 p.
- Ekici, H., Yarsan, E., 2009. Akuakültür canlılarında zehirli etki oluşturabilecek maddeler. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi.* 26(3): 229-233.
- Elliot, J.G., 1999. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Tech.* 53(2); 46-48.
- Emre, Y., 2004. Alabalık yetiştiriciliği. T.C Başbakanlık Güneydoğu Anadolu projesi. Bölge kalkınma idaresi başkanlığı.
- Erden, M., Bor, N.M., 1984. Changes of reduced glutathione, glutathione peroxidase after radiation in guinea pigs. *Biochemical Med.* 31: 217-227.
- Erdoğan, Ö., Covaci, A., Kurtul, N., Schepens, P., 2004. Levels of organohalogenated persistent pollutants in human milk from Kahramanmaraş region, Turkey, *Environmental International*, 30, 659-666.

- Erdoğrul, Ö., Ateş, A., Kara, C., 2005. Sır ve Menzelet Baraj göllerindeki bazı balık türlerinde kadmiyum (Cd) ve bakır (Cu) düzeylerinin belirlenmesi. Ulusal Su Günleri, 28-30 Eylül 2005, Trabzon.
- Erdoğrul, Ö., Covaci, A., Schepens, P., 2005. Levels of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in fish species from Kahramanmaraş, Turkey, *Environment International*, 31, 703- 711.
- Erdoğrul, Ö., Ateş, A.D., 2006. Determination of cadmium and copper in fish samples from Sır and Menzelet Dam Lake Kahramanmaraş, Turkey, *Environmental Monitoring and Assessment*, 117, 281-290.
- Eto, K., 2000. Minamata disease, *Neuropathology*, 20, S14-S19.
- Fergusson, F.E., 1990. The heavy elements in: *Chemistry, Environmental Impact and Health Effect* Pergamon Pres, 614.
- Flos, R., Caritat, A., Balasch, J., 1979. Zinc content in organs of dogfish subjected to sublethal experimental aquatic zinc pollution. *Comp. Biochem. Physiol.* 63C:77-81.
- Forster, T., 1948. Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Ann Phys (Leipzig)* 2, 55-75.
- Förstner, G., Wittmann, T., 1981. *Metal pollution in the aquatic environment*, Berlin Heidelberg, Newyork Springer Verlag, 3, 21, 271-318.
- Fridovich, I., 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 64, 97-112.
- Gerhardt, A., 1998. Whole effluent toxicity testing with *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792): survival and behavioral responses to a dilution series of a mining effluent in South Africa. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35: 309-316.
- Giordano, R., Arata, P., Rinaldi, S., Ciaralli, L., Giani, M., Rubbiani, M., Costantini, S., 1989. Mercury, cadmium and lead levels in marine organisms (*Mytilus galloprovincialis*) collected along the Italian coasts. *Ann. Ist. Super. Sanita*, 25(3): 511-516.
- Görmez, K., 1997. Çevre Sorunları ve Türkiye, Gazi Kitabevi Yayınları, 2. Baskı, Ankara, 17, 53-56.
- Gül, Ş., Belge Karataş, E., Yıldız, E., Şahan, A., Doran, F., 2004. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (*Cyprinidae*) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. *Environmental International*, 30: 605-609.
- Güney M., 2007. Çevresel metal kirliliğinin belirlenmesinde biyo-indikatör olarak biyokollektörlerin etkinliğinin araştırılması. Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Cumhuriyet Üniversitesi.
- Gürdal, F., Ademoğlu, E., 2005. *Biyokimya*. Nobel Kitap Evi. 746-747.
- Güven, K.C., Öztürk, B., 2005. *Deniz kirliliği*. Türkiye Deniz Araştırmaları Vakfı Yayınları. No.21, İstanbul, 504 p.
- Hansen, B.H., Rømme, S., Garmo, Ø.A., Olsvik, P.A., Andersen, R.A., 2006. Antioxidative stress proteins and their gene expression in brown trout (*Salmo trutta*) from three rivers with different heavy metal levels. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 143 (2006) 263–274.
- Hapke, J., 1991. *Effects of metal on domestic animals*. VCH Verlagsgesellschaft mbH.
- Heath, A.G., 1987. *Water pollution and fish physiology*. CRP Press Inc., Florida, 245.

- Hogstrand, O., Haux, C., 1991. Mini review binding and detoxification of heavy metals in lower vertebrates with reference to metallothionein. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100C (1/2), 137-141.
- Hollis, L., McGeer, J.C., McDonald, G.D., Wood, C.M., 1999. Cadmium accumulation, gill cadmium binding, acclimation and physiological effects during sublethal Cd exposure in Rainbow Trout. *Aquatic Toxicol.* 46:101-119.
- Hu, 2000. Exposure to metals. *Occup. Environ. Med.* 27(4):983-996.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., Zumla, A., 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity*, 1-6.
- İkuta, K., Morikava, A., 1991. Estimates for depuration periods of Cu, Cd and Zn in Pacific oyster under field conditions. *Bull.Fac.Agric.* 38:1-12.
- İleri, R., Sümer, B., Sengörür, B., 1994. Atıksulardaki bakır (II) iyonlarının biyosorpsiyon ile uzaklaştırılması. *Ekoloji*, 11, 16-21.
- İsbir, T., 1994. Antioksidan sistemler . Endotel. İzmir Tabib Odası Tıpta Temel Bilimler Kolu Sonbahar Okulu. 92-98.
- Jin, Y.,Zhang, X., Shu, L., Chen, L., Sun, L. and Qian, H., 2010. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebra fish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 78, 846-852.
- Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S., 2009. Metallerin çevresel etkileri-I, *Metalurji*, 136.Sayı, [http://www.metalurji.org.tr/dergi/dergi136/d136\\_4753.pdf](http://www.metalurji.org.tr/dergi/dergi136/d136_4753.pdf).
- Kalay, M., Koyuncu, C.E., Dönmez, A.E., 2004. Comparison of Cd levels in the muscle and liver tissues of *Mullus barbatus* and *Sparus aurata* caught from the Mersin Gulf. (in Turkish). *Ekoloji Dergisi.* 13(52):23-27.
- Kandil, M., 1988. Balık hastalıkları. Ankara Üniversitesi Basımevi,99, Ankara.
- Kargın, E., Erdem, C., 1989. Farklı bakır konsantrasyonlarının *Tilapia nilotica* (L.) 1758'de birikimi ve mortalite üzerine etkileri. Çukurova Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 3(2): 53-66.
- Kargın, E., Erdem, C., 1991. Accumulation of copper in liver, spleen, stomach, intestine, gill and muscle of *Cyprinus carpio* , *Doga Tr. J. of Zoology*, 15: 306-314.
- Kasap, Y., Dilbirliği, M., 1995. Hava kirliliğinin bitkiler üzerine etkisi. II. Hava kirlenmesi, modellenmesi ve kontrolü sempozyumu, İstanbul.
- Katalay, S., Parlak, H., 2004. The effects of cadmium on erythrocyte structure of Black goby (*Gobius niger* L. 1758). (in Turkish). *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi.* 21(1-2):99-102.
- Kay, J., Thomas, D. G., Brown, M. W., Cryer, A., Shurben, D., John F. deL. G. Solbe, Garvey, J. S., 1986. Cadmium accumulation and protein binding patterns in tissues of the *Rainbow Trout, Salmo gairdneri*. *Environmental Health Perspectives* Vol. 65, pp. 133-139.
- Kaya, S., Piriñçi, i., Bilgili, A., 1998. Çevre bilimi ve çevre toksikolojisi. Medison Yayın Serisi, Yayın No: 36.
- Kaya, S., Piriñçi, İ., Bilgili, A., 2002. Veteriner hekimliğinde toksikoloji. Medisan Yayınevi, 212-221, 224-233, 235-239, Ankara.
- Kayhan, F.E., 2006. Su ürünlerinde kadmiyumun birikimi ve toksisitesi. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi, Cilt 23, Sayı (1-2): 215-220.*



- Kayhan, F.E., Muşlu, M.N., Koç, N.D., 2009. Bazı ağır metallerin sucul organizmalar üzerinde yarattığı stres ve biyolojik yanıtlar. *Journal of Fisheries Science*, 3(2), 153-162.
- Kılbaş, S., 2006. L-Name hipertansif ratlarda lisinoprilin beyinde lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıpta Uzmanlık Tezi.
- Kim, K.Y., Lee, S.Y., Cho, S.Y., Bang, I.C., Kim, K.H., Kim, D.S., Nam, Y.K., 2007. Molecular characterization and mRNA expression during metal exposure and thermal stress of copper/zinc- and manganese superoxide dismutases in disk abalone, *Haliotis discus discus*. *Fish & Shellfish Immunology* 23, 1043-1059.
- Kim, J.H., Rhee, J.S., Lee, J.S., Dahms, H.U., Lee, J., Han, K.N., Lee, J.S., 2010. Effect of cadmium exposure on expression of antioxidant gene transcripts in the river pufferfish, *Takifugu obscurus (Tetraodontiformes)*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 152,473-479.
- Kolayli, S. ve Keha, E., 1999. A Comparative study of antioxidant enzyme activities in fresh water and seawater-adapted Rainbow Trout. *J Biochem Molecular Toxicology*. Volume 13, Number 6.
- Kurt , P.B., 2000. Karadeniz-Samsun kıyı şeridinde çeşitli organik kirleticilerin midye ve deniz suyunda incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun.
- Lakowicz, J.R., 1983. Principles of fluorescence spectroscopy, Plenum Press, New York, chapter 2.
- Levesque, H.M., Moon, T.W., Campbell, P.C.G., Hontela, A., 2002. Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of Yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field. *Aquatic Toxicol.* 60:257-267.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25:402-408.
- Lowe-Jinde, L., Nimi, A.J., 1986. Heamotological characteristics of Rainbow trout *Salmo gairdneri* in response to cadmium exposure. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 37:375-381.
- Löffert, D., Karger, S., Twieling, G., Ulber, V., Kang, J., 1999. Optimization of multiplex PCR. Qiagen GmbH, Issue No:2, Germany.
- Luoma, S.N., 1983. Bioavailability of trace metals to aquatic organisms-A Review. *The Science of the Total Environment*, Vol. 28, p.p.1-22.
- Martínez-Álvarez, R.M., Morales, A.E., Sanz, A., 2005. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Rev. Fish Biol. Fish.* 15, 75-88.
- Mason, R.P., 1990. Free radical reactions with DNA and its nucleotids. *Basic Life Sci.* 52:119.
- Massoud, A.K.S., Ezzat, A.A., El-Rayis, O.A., Hayez, H., 1981. Occurrence and distribution of chemical pollutants in Lake Maruit, Egypt. II. Heavy metals. *Water, A.R. and soil pollution.* 16, 401-407.
- Mitchell, J.B., Russo, A., 1987. The role of glutathione in radiation and drug induced cytotoxicity. *Br J Cancer.* 55: 96-104.
- Nawar, W.W., 1996. Lipids. In "Food Chemistry", O.R. Fennema (Ed), pp: 225-319. Marcel Dekker, New York.
- Olsvik, P.A., Gundersen, P., Andersen, R.A., Zachariassen, K.E., 2001. Metal accumulation and MT in Brown Trout *Salmo trutta*, from two Norwegian rivers

- differently contaminated with Cd, Cu, and Zn. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 128:381-385.
- Olsvik, P.A., Kristensen, T., Waagbø, R., Rosseland, B.O., Tollefsen, K.E., Baeverfjord, G., Berntssen, M.H.G., 2005. mRNA expression of antioxidant enzymes (SOD, CAT and GSH-Px) and lipid peroxidative stress in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to hyperoxic water during smoltification. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 141, 314 – 323.
- Onat, T., Emerk, K., Sönmez, E.Y., 2002. İnsan biyokimyası. Palma yayıncılık Ankara 487-488.
- Özcan, S., Gürel, E., Babaoğlu, M., 2001. Bitki biyoteknolojisi genetik mühendisliği ve uygulamaları. Selçuk Üniversitesi. Konya.
- Querci, M., Jermini, M., Van den Eede, G., 2010. Gıda örneklerinde genetiği değiştirilmiş organizma analizleri. Avrupa Birliği Resmi Yayınlar Dairesi, Lüksemburg
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29 (9): 2003-2007.
- Rainbow, P.S., 1995. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, Vol.31, pp.183-192.
- Rainbow, P.S., 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: Why and so What? *Environmental Pollution*, Vol 120, pp.497-507.
- Ramacandran, V., D'souza, T.J., 1998. Uptake and transport of cadmium, chromium and mercury by water hyacinth *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. *J. Nuci. Agric. Biol.*, 27: (2), 73-78.
- Rether A., 2002. Entwicklung und Charakterisierung wasserlöslicher Benzoylthioharnstoff-funktionalisierter Polymere zur selektiven Abtrennung von Schwermetallionen aus Abwässern und Prozesslösungen. Doktora Tezi, Münih Teknik Üniveritesi.
- Rudneva, I.I., 1997. Blood antioxidant system of Black Sea elasmobranchs and teleosts. *Comp. Biochem. Physiol.* 118C, 255–260.
- Sağlamtimur, B., Cıçık, B., Erdem, C., 2003. Effects of different concentrations of copper alone and copper+cadmium mixture on the accumulation of copper in the gill, liver, kidney and muscle tissues of *Oreochromis niloticus*. (in Turkish). *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 27:813-820.
- Saltes, J.G., Bailey, G.C., 1984. Use of fish gill and liver tissue to monitoring zinc pollution. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 32,233-237.
- Sarıyüpoğlu, M., Say, H., 1991. Elazığ şehir kanalizasyonunun baraj gölüne döküldüğü bölgeden yakalanan *Barbus capito pectoralis*'te ağır metal birikimlerinin araştırılması, *Su Ürünleri Sempozyumu*, 121-130 .
- Selinus, O., Alloway, B., Centeno, J.A., Finkelman, R.B., Fuge, R., Lindh, U., Smedley, P., 2005. Essentials of medical geology, Impacts of natural environment on public health, Elsevier Academic Pres.
- Serafim M.A., Bebianno, R.M., Langstone, W.J., 2002. Effects of temperature and size on metallothionein synthesis and gill of *Mytilus galloprovincialis* exposed to Cd. *Marine Environmental Research.* 54:361-365.
- Serfor-Armah, Y., Nyarko, B.J.B., Osae, E.K., Carboo, D., Anim-Sampong, Seku, F., 2001. Rhodophyta sea weed species as bioindicators for monitoring toxic

- element pollutants in the marine ecosystem of Ghana. *Water, Air, and Soil Pollution*, Vol. 127, p.p.243-253.
- Sonal, S., 1994. Hayvansal besinlere yansıyan metal kalıntıları ve yaratabileceği sağlık sorunları. *Türk-Toksikol. Der. ve Visad*.
- Şanlı, Y., Kaya, S., 1995. Veteriner klinik toksikoloji. *Medisan Yayın Serisi*. Ankara. Yayın No:21.
- Taylan, Z.S., Özkoç, H.B., 2007. Potansiyel ağır metal kirliliğinin belirlenmesinde akuatik organizmaların biokullanılabilirliği. *BAÜ FBE Dergisi*, Cilt:9, Sayı:2, 17-33.
- TC Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı, 1985. İşçi sağlığı ve iş güvenliği enstitüsü, Akü ve matbaa işçilerinde kurşun zehirlenmesi taraması, İSGÜM, Ankara.
- Tekman, B., 2007. Gökkuşluğu alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) karaciğer dokusundan glutatyon redüktaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı metallerin enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Trenzado, C., Hidalgo, M.C., García-Gallego, M., Morales, A.E., Furné, M., Domezain, A., Domezain, J., Sanz, A., 2006. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccarii* and trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture* 254, 758–767.
- Tumantozlu, H., 2010. Karacaören II Baraj Gölü'ndeki su, sediment ve sazan (*Cyprinus carpio L.*, 1758) örneklerinde bazı ağır metal birikiminin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Süleyman Demirel Üniversitesi.
- Vallae, B.L., 1959. Zinc metabolism in hepatic dysfunction. *An. Int. Med.*50,1077-1091.
- Vural, N., 2005. Toksikoloji. Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi yayınları no: 73. 506, 508- 509
- Webb, D., Gagnon, M.M., 2002. Biomarkers of exposure in fish inhabiting the swan-canning estuary weatern Australia-apreliminary study. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, p.p. 259-269.
- Wong, C.K.C., Wong, M.H., 2000. Morphological and biochemical changes in the gills of *Tilapia toambient* cadmium exposure. *Aquatic Toxicol.* 48:517-527.
- Woo, S., Yum, S., Park, H.S., Lee, T.K., Ryu, J.C., 2009, Effects of heavy metals on antioxidants and stress-responsive gene expression in Javanese medaka (*Oryzias javanicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 149, 289–299.
- Wu, S.M., Weng, C.F., Yu, M.J., Lin, C.C., Chen, S.T., Hwang, J.C., Hang, P.P., 1999. Cadmium-inducible metallothionein in *Tilapia (Oreochromis mossambicus)*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62:758-768.
- Yanık, T., Atamanalp, M., 2001, Balık Yetiştiriciliğinde Su Kirliliğine Giriş. Atatürk Üniv., Ziraat Fakültesi Ders Yay. No: 226.
- Yazkan, M., Özdemir, F., Gölükçü, M., 2004. Cu, Zn, Pb and Cd contents in some molluscs and crustacea caught in the Gulf of Antalya. (in Turkish). *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 28:95-100.
- Yıldız N., 1994. Araştırma ve Deneme Metotları, Atatürk Üni. Yayınları 697, Ziraat Fak. No: 305, Ders Kitabı No: 57, Erzurum.
- Yılmaz, M., 2010. Bazı pestisitlerin sıçan dokularındaki asetilkolinesteraz ve antioksidan enzim aktiviteleri ile malondialdehit düzeyine etkileri. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

Zagal, A., 2008. tekstil atık suyunun *Oreochromis niloticus*'da toksik etkisinin bazı antioksidan enzimler kullanılarak araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin.

## EKLER



### **ÖZGEÇMİŞ**

1982 Yılında Erzurum'da doğan Kübra ATABEYOĞLU aslen Ordu nüfusuna kayıtlıdır. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum'da tamamladıktan sonra, 1998 yılında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü'nü kazandı. 2002 yılında bu bölümden mezun oldu. Aynı bölümde 2004-2007 yılında yüksek lisans, 2007-2011 doktora eğitimini tamamladı.