

SİVAS KANGAL BALIKLI KAPLICADAKİ
BALIKLARDA (CYPRINIDAE),
ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİ
ÜZERİNE DEĞİŞİK STRES KAYNAKLARININ
ETKİLERİ

MERVE GÖKŞİN KARAASLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
2010

**CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SİVAS KANGAL BALIKLI KAPLICADAKİ BALIKLARDA (CYPRINIDAE),
ANTIOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE DEĞİŞİK STRES
KAYNAKLARININ ETKİLERİ**

MERVE GÖKŞİN KARAASLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Doç.Dr. ŞENAY ÇETİNUŞ

SİVAS

2010

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan Doç. Dr. Yusuf TUTAR

Üye Y. Doç. Dr. Şeker DAĞ

Üye (Danışman) Doç. Dr. Şenay ÇETİNUS

ONAY

Bu tez çalışması, 09/02/2010 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sezai ELAGÖZ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 24.09.2008 tarihli ve 9 sayılı toplantısında kabul edilen ve Fen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

ÖZET

SİVAS KANGAL BALIKLI KAPLICADAKİ BALIKLARDA (CYPRINIDAE), ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE DEĞİŞİK STRES KAYNAKLARININ ETKİLERİ

Merve Gökşin KARAASLAN

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman : Doç.Dr. Şenay ÇETİNUS

2010, 73 sayfa

Bu çalışmada, balıklardaki çeşitli stres kaynaklarının antioksidatif rolünün belirlenmesi amacı ile Sivas balıklı Kaplıca'dan getirilen *Cyprinion macrostomus* ve *Garra rufa obtusa* balıklarının kas dokularındaki bazı biyokimyasal parametreler üzerine stres etkileri incelendi.

Balıklar ağır metal, sıcaklık, oksijen eksikliği, besin eksikliği, pH ve selenyum gibi değişik stres kaynaklarına maruz bırakılarak, kas dokularında glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz enzim aktiviteleri belirlendi. Lipid peroksidasyonu ve çözünür peroksit düzeyindeki değişimler araştırıldı.

Değişik stres kaynaklarına maruz kalmış grupların enzim aktivitelerinde, lipid peroksidasyonu ve çözünür peroksit düzeylerinde kontrol grubuna göre değişimler gözlenmiştir. Glutatyon peroksidaz ve katalaz aktivitesinde en fazla artışın selenyum etkisinde olduğu gözlenirken, lipid peroksidasyon değerlerinde ise en fazla artışın pH etkisinde olduğu saptanmıştır.

Garra rufa obtusa türü balıklarda glutatyon peroksidaz enzim aktivitesinde en yüksek artış oksijen eksikliği etkisinde (%53), en yüksek düşüş pH etkisinde (%33.4) gözlenmiştir. Stres etkileri sonucu metabolizmada artmış olan reaktif oksijen türlerinin etkileri özellikle de çözünür hidroperoksit ve lipid peroksit miktarları artan glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi ile etkisizleştirildiği düşünülmektedir. Oksidatif hasarın artmasıyla glutatyon peroksidaz enzim aktivitesinde azalma olması da beklenen bir durumdur.

Cyprinion macrostomus türü balıklarda, stres etkileri özellikle de selenyum etkisiyle glutatyon peroksidaz ve katalaz enzimlerinin aktivitelerinde artma gözlenmekte

ve bu enzimler ortamda oluşan peroksitlere etki ederek lipid peroksit seviyesini deęiřtirmedięi ve lipid peroksidasyonunda artma gözlenmedięi söylenebilir.

Sivas Balıklı Kaplıcadaki balıklar ile yapılan bu çalışma oksidatif stres kapsamındaki ilk çalışmayı oluşturmaktadır.

Anahtar kelimeler: Serbest radikal, katalaz, glutatyon peroksidaz, lipid peroksidasyon

ABSTRACT

THE EFFECTS OF DIFFERENT STRESS SOURCES ON ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES IN FISHES (CYPRINIDAE) FROM SIVAS KANGAL FISH SPRING

Merve Gökşin KARAASLAN

Master of Science Thesis, Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Şenay ÇETİNUS

2010, 73 pages

In this study, it is aimed that determining the antioxidative role of a variety of stress sources in fishes. Some biochemical parameters were investigated in muscle tissue of *Garra rufa* and *Cyprinion macrostomus* exposed to stress effect from Sivas Fish Spring.

Fish was exposed to different stress sources as heavy metals, temperature, oxygen deficiency, nutrient deficiency, pH and selenium effect. Glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase activities were determined in fish muscle tissue. Lipid peroxidation and soluble peroxide levels were investigated in fish muscle tissue.

Changes were observed in the enzyme activities, lipid peroxidation levels, and soluble peroxide levels of groups that exposed to different stress sources in comparison with control group. The highest increases were observed in selenium effect for glutathione peroxidase and catalase activity. The highest increase in lipid peroxidation values was observed for pH effect.

The highest increase in the activity of glutathione peroxidase was found in hypoxia effect (53 %) and the highest decrease was found in pH effect (33.4 %) for *Garra rufa obtusa species*. Effect of reactive oxygen species that increased in metabolism by the stress effect of especially amount of lipid hydro peroxide and soluble hydro peroxides can be noutralized by increased glutathione peroxidase activity. As the oxidative damage increases, glutathione peroxidase activity decreases.

It was observed that glutathione peroxidise and catalase activities increased for *Cyprinion macrostomus* species exposed to especially selenium effect. This enzymes effected soluble peroxides and lipid peroxides that increased by stress effect and lipid peroxidation was not occur.

This work is the first study about oxidative stress using fish from Sivas Fish Spring.

Key words: Free radicals, catalase, glutathione peroxidase, lipid peroxidation

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, ilgi ve anlayış göstererek her konuda beni destekleyen tez danışmanım sayın Doç. Dr. Şenay ÇETİNUS'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma "Cyprinidae Ailesi Balıklarının Aging (Yaşlanma) ve Nörodejeneratif Hastalıklar İçin Model Olarak Kullanılması" isimli CÜBAP F-253 nolu grup projesinin bir bölümünü oluşturmaktadır. Çalışmalarında yardımlarını eksik etmeyen, laboratuvarındaki tüm imkanları sağlayan ve bu projenin yürütücüsü olan Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Yusuf TUTAR'a çok teşekkür ederim. Ayrıca yardımlarını esirgemeyen C.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Araştırma görevlisi Sayın Sevgi DURNA'ya çok teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde yanımda olan benden maddi manevi desteğini esirgemeyen aileme, yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen dostlarıma ve arkadaşım Nazife YILAN'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
1 GİRİŞ	1
2. SİVAS KANGAL BALIKLI KAPLICA	3
2.1 <i>Garra rufa obtusa</i>	5
2.2 <i>Cyprinion macrastomus</i>	6
3 SERBEST RADİKALLER	7
3.1 Reaktif Oksijen Türleri	10
3.1.1 Süperoksit Radikali	10
3.1.2 Hidrojen Peroksit	12
3.1.3 Hidroksil Radikali	13
3.1.4 Singlet Oksijen	14
3.1.5 Nitrik Oksit	15
3.2 Serbest Radikallerin Kaynakları	16
3.3 Serbest Radikallerin Etkileri	18
3.3.1 Protein Üzerine Etkileri	19
3.3.2 Lipid Üzerine Etkileri	20
3.3.3 Nükleik Asit ve DNA Üzerine Etkileri	22
3.4.4 Karbohidrat Üzerine Etkileri	22
4 ANTİOKSİDAN SAVUNMA MEKANİZMALARI	23
4.1 Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)	25
4.1.1 Glutasyon	26
4.1.2 Glutasyon Sentezi ve Döngüsü	27
4.2 Katalaz (CAT)	29
5 AĞIR METALLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ	30
5.1 Kadmiyum	32
6 ANTİOKSİDAN ESER ELEMENT OLAN SELENYUMUN BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ	33
7 MATERYAL VE METOT	
7.1 Balıkların Kaplıcadan Laboratuara Taşınması	35
7.2 Stres Kaynaklarının Uygulanması	36
7.2.1 Ağır Metal Etkisi	36
7.2.2 pH Etkisi	36
7.2.3 Selenyum Etkisi	36
7.2.4 Sıcaklık Etkisi	37
7.2.5 Oksijen Eksikliği	37
7.2.6 Besin Eksikliği	37

7.3 Balıkların Homojenizasyon İşlemine Hazırlanması	38
7.4 Enzim Aktivite Tayinleri	39
8.4.1 Glutasyon Peroksidaz Aktivite Tayini	39
7.4.2 Katalaz Aktivite Tayini	41
7.4.3 Lipid Peroksidasyonu ve Çözünür Peroksit Tayini	42
7.5 Verilerin İstatistiksel Analizi	43
8 BULGULAR	
8.1 Enzim Aktivite Sonuçları	44
8.1.1 Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi	44
8.1.2 Katalaz Aktivitesi	46
8.2 Lipid Peroksidasyon Düzeyi	49
8.3 Çözünür Peroksid Düzeyi	51
9 TARTIŞMA VE SONUÇLAR	55
KAYNAKLAR	62
EKLER	
EK-1 Valilik izni	71
EK-2 Hayvan Etik Kurul İzni	72
ÖZGEÇMİŞ	73

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 <i>Garra rufa obtusa</i>	5
Şekil 2.2 <i>Cyprinion macrostomus</i>	6
Şekil 3.1 Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve oluşan hasara karşı savunma mekanizmaları	16
Şekil 3.2 Radikallerin yol açtığı hücre hasarı	18
Şekil 4.1 Glutasyon sentezi	27
Şekil 4.2 Yükseltgenmiş glutasyonun indirgenmiş glutatyona dönüşümü	28
Şekil 7.1 Balıkların akvaryumdan görünüşü	35
Şekil 7.2 Homojenizasyon işlemine kullanılan <i>Cyprinion macrostomus</i>	38
Şekil 8.1 Çeşitli stres kaynaklarının uygulanması sonucu <i>Garra rufa obtusa</i> balıklarının kas dokularındaki GSH-Px aktiviteleri	44
Şekil 8.2 Çeşitli stres kaynaklarının uygulanması sonucu <i>Cyprinion macrostomus</i> balıklarının kas dokularındaki GSH-Px aktiviteleri	45
Şekil 8.3 Çeşitli stres kaynaklarının uygulanması sonucu <i>Garra rufa obtusa</i> balıklarının kas dokularındaki katalaz aktiviteleri	47
Şekil 8.4 Çeşitli stres kaynaklarının uygulanması sonucu <i>Cyprinion macrostomus</i> balıklarının kas dokularındaki katalaz aktiviteleri	48
Şekil 8.5 Çeşitli stres kaynakları'nın uygulanması sonucu <i>Garra rufa obtusa</i> balıklarının kas dokularındaki lipid peroksidasyon değerleri	49
Şekil 8.6 Çeşitli stres kaynakları'nın uygulanması sonucu <i>Cyprinion macrostomus</i> balıklarının kas dokularındaki lipid peroksidasyon değerleri	51
Şekil 8.7 Çeşitli stres kaynakları'nın uygulanması sonucu <i>Garra rufa obtusa</i> balıklarının kas dokularındaki çözünür peroksit değerleri	52
Şekil 8.8 Çeşitli stres kaynakları'nın uygulanması sonucu <i>Cyprinion macrostomus</i> balıklarının kas dokularındaki çözünür peroksit değerleri	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Hücrede oluşabilen reaktif oksijen radikalleri ile oksijen içeren bazı reaktif türler	8
Çizelge 4.1 Antioksidan savunma sistem elemanları	23
Çizelge 8.1 <i>Garra rufa obtusa</i> balıklarında GSH-Px enzim aktivite sonuçlar	45
Çizelge 8.2 <i>Cyprinion macrastomus</i> balıklarında GSH-Px enzim aktivite sonuçları	46
Çizelge 8.3 <i>Garra rufa obtusa</i> balıklarında katalaz enzim aktivite sonuçları	47
Çizelge 8.4 <i>Cyprinion macrastomus</i> balıklarında katalaz enzim aktivite sonuçları	48
Çizelge 8.5 <i>Garra rufa obtusa</i> balıklarında lipid peroksidasyon değerleri	50
Çizelge 8.6 <i>Cyprinion macrastomus</i> balıklarında lipid peroksidasyon değerleri	51
Çizelge 8.7 <i>Garra rufa obtusa</i> balıklarında çözünür peroksit değerleri	52
Çizelge 8.8 <i>Cyprinion macrastomus</i> balıklarında çözünür peroksit değerleri	53

SİMGELER VE KISALTMALAR

Cd: Kadmiyum
CAT: Katalaz
CYP: *Cyprinion macrastomus*
EDTA: Etilen diamintetraasetik asit
GR: *Garra rufa obtusa*
GSH : Redükte Glutasyon
GSH-Px : Glutasyon peroksidaz
GSSG: Okside Glutasyon
H₂O₂ : Hidrojen peroksit
HCl : Hidroklorik asit
HO₂[·] : Hidroperoksil radikali
KH₂PO₄ : Potasyum dihidrojenfosfat
K₂HPO₄ : Dipotasyum hidrojenfosfat
MDA: Malondialdehit
N₂O₃ : Dinitrojen trioksit
NADPH : β-Nikotinamid adenin dinükleotid
NaCl : Sodyum klorür
NO[·] : Nitrik oksit
NO₂ : Nitrojen dioksit
NO₂⁺ : Nitril katyonu
¹O₂ : Singlet oksijen
O₂^{·-} : Süperoksit
OH[·] : Hidroksil radikali
ONOO⁻ : Peroksinitrit
ONOO[·] : Peroksinitrit radikali
PMSF: Fenil metilsülfonil florid
ROO[·] : Peroksil radikali
ROOOH : Hidroperoksit
RO[·] : Alkoksil radikali
ROS : Reaktif Oksijen Türevleri
Se : Selenyum
SOD : Süperoksit dismutaz

1.GİRİŞ

Günümüzde sanayi ve teknolojinin gelişmesine bağlı olarak su, hava ve toprağın sağlığa zararlı maddeler ile kirlenmesi çevre üzerinde olumsuz etkilere neden olmakta ve organizmaları farklı stres kaynakları ile başa çıkmak zorunda bırakmaktadır.

Teknolojinin hızlı gelişimine paralel olarak sanayi ve kentsel atıkların bulunduğu kanalizasyon suları, boşaltıldığı nehir ve gölleri kirletmekte ve sucul ortamda yaşayan canlı organizmaların yaşamlarını olumsuz yönde etkilemektedir (Sarıyupoğlu ve Say, 1991).

Suların kirlenmesi oksijen miktarının azalmasına, bakterilerin, organik maddelerin, metal tuzlarının ve toksik etkili maddelerin artmasına neden olduğundan sucul ortamda yaşayan canlı organizmaların yaşamlarını tehdit etmektedir (Arda, 1974). Bu nedenle sucul ortamlarda yaşayan balıklar yaşadıkları dinamik çevreden kaynaklanan değişikliklerle sürekli olarak fizyolojik stres altındadır. Bu stres faktörleri doku ve hücre homeostazı kaybına yol açmakla birlikte serbest radikal oluşumunu da tetiklemektedir.

Serbest radikaller, hücre metabolizması sırasında cereyan eden biyokimyasal reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan, en dış orbitalinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren kısa ömürlü, kararsız, moleküler ağırlığı düşük, çok etkin atom veya moleküller olarak tanımlanır (Abdollahi ve ark, 2003; Van, 1993).

Hücre ve dokular, canlı organizmada normal metabolizma sırasında ya da patolojik yollarla ortaya çıkan bu serbest radikal ürünlerini inhibe eden güçlü bir savunma sistemine sahip olup serbest radikaller ve antioksidan savunma mekanizmalarının arasındaki denge aerobik organizmaların fonksiyonu ve yaşamı için oldukça önemlidir. Serbest radikallerin lehine ve/veya antioksidanlar aleyhine bir dengesizlik, önemli hücre kompartmanlarında geri dönüşümsüz hasara neden olmakta ve bu olay oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır (Meotti ve ark, 2004)

Hem serbest radikaller ve hem de reaktif oksijen türevleri nükleik asitler, serbest amino asitler, proteinler, lipidler, lipoproteinler, karbohidratlar ve bağ dokusu makromolekülleri de dâhil olmak üzere, canlı organizmaların yapısında bulunan hemen hemen bütün sınıflara dâhil bileşiklerle reaksiyona girerek tersinir veya tersinmez hasarlar meydana gelmektedir. (Cross ve ark., 1987).

Sivas ilinin Kangal ilçesinde deri ve romatizmal hastalıkları tedavi etmesiyle ün kazanmış olan kaplıca içerisinde yaşayan *Cyprinion macrostomus* ve *Garra rufa obtusa* balıklarının düşük oksijen miktarı, aşırı sıcaklık, besin kıtlığı, ağır metal gibi stres faktörlerinden sürekli olarak etkilenmesine rağmen hayatta kalmaları bu balık türlerinin iyi bir model olacağını düşündürmektedir.

Bu çalışmada Sivas Kangal Balıklı Kaplıca da bulunan *Cyprinion macrostomus* ve *Garra rufa obtusa* balıklarına, değişik stres etkileri uygulandığında değişen çevreye karşı balıkların bazı biyokimyasal parametrelerindeki değişimin araştırılması amaçlanmıştır.

2. SİVAS KANGAL BALIKLI KAPLICA

Sivas ilinin Kangal ilçesinde bulunan ve tedavi özelliği ile bir benzerini bulmanın mümkün olmadığı kaplıca (çermik), ülkemiz boyutlarında deri ve romatizmal hastalıkları tedavi etmesiyle ün kazanmıştır. Bu kaplıcanın ünü ve önemi özellikle içinde yaşayan Cyprinidae türüne ait olan balıklardan ileri gelmekte olup, kaplıca suyunun yıl boyunca $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ de olması ve kimyasal içeriği nedeniyle de çeşitli hastalıklara iyi geldiği bilinmektedir. Tahriş olmuş veya herhangi bir enfeksiyondan oluşmuş cilt dokusundaki yaralara; egzama, cehatli sivilceler ve hatta tıpta tedavisinin imkânsız olduğu bilinen “sedef hastalığı” gibi deri hastalıklarına iyi geldiği kanısı ise oldukça önem kazanmıştır (Brown, 1957).

Kaplıcada bulunan balıkların türleri üzerine yapılan araştırmalar sonucunda, Cyprinidae türüne ait olan, *Cyprinion macrostomus* (vurucu) ve *Garra rufa obtusa* (yalayıcı) olarak bilinen iki farklı tür tespit edilmiştir. Terminal ağız tipli *Cyprinion macrostomus* ve ventral ağız tipli *Garra rufa obtusa* balıklarının sindirim sistemleri üzerine yapılan araştırmalar sonucunda ise, her iki tip balığın havuzların beton duvarlarında ve taşlar üzerinde bulunan fito ve zooplanktonlarla beslendiği saptanmıştır. Omnivor beslek olan *Cyprinion macrostomus* ve *Garra rufa obtusa* havuzlardaki besin azlığı nedeniyle karnivor beslek haline gelmişlerdir. (Özer ve ark, 1987).

Ayrıca suyun yüksek sıcaklığı ve beslenme ortamının balıklar üzerindeki etkileri biyokimyasal olarak araştırılmıştır. Havuzlardaki suyun sıcaklığı sıcakkanlı bir hayvanın vücut sıcaklığına yakın bir değerde olması poliokterm olan balıklara aktif bir hareketlilik kazandırdığından balıkların daha fazla besine ihtiyaç duymalarına neden olmaktadır. Fakat su ortamındaki besin miktarı azlığı nedeniyle balıkların besin gereksinimlerini karşılayamamakta bu da balıkların gelişimini ve büyümesini geciktirmekte, onların saldırgan ve predatör olmalarına neden olmaktadır. Dolayısıyla balıklar, buldukları havuzlara giren insanların vücudunda yer alan ve suyun etkisi ile yumuşayarak kolaylıkla koparılabilen hastalıklı deri plakalarına doğru yönelmektedir. Bunun sonucunda insan vücudundan kabuklar uzaklaşmakta ve suyun içerisinde yüksek düzeyde bulunan selenyumun etkisiyle de hastalıklı deri iyileşmektedir (Özer ve ark, 1987).

Sıcaklık ve iyonik bileşim açısından mevsimsel bir değişim göstermeyen kaplıca suyunun özellikleri aşağıda belirtilmiştir; (Özer ve ark, 1987)

Renk	: Çok hafif sarı berrak
Tortu	: Yok
pH	: 7.20-7.25
Toplam sertlik	: 32.23
Sıcaklık	: $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$
Çözünmüş oksijen	: 4.41 ± 0.30
Serbest H ₂ S	: Yok
İletkenlik	: 590 (µmho)
Serbest CO ₂	: 8.88 mg / L
Radyoaktivite	:
Toplam alfa aktifliği	: 3.77 ± 0.81 pCi/L
Toplam beta aktifliği	: 5.03 ± 1.57 pCi/L
Radon (Rn-222)	: 180 pCi/L
Radyum (Ra-226)	: 0.59 pCi/L
Uranyum (U-238)	: 0.842 mg/L

2.1 *Garra rufa obtusa*

Garra rufa obtusa, en zengin ve en önemli balık familyalarından biri olan *Cyprinidae* üyesi olup, iki türle temsil edilmektedir (Geldiay ve Balık, 1996). Bunlardan özellikle “doktor balık” olarak adlandırılan *Garra rufa obtusa* Sivas çermiklerinde yüksek sıcaklıkta yaşamakta, deri ve romatizmal hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Dünyanın farklı bölgelerine yayılmış olan *Garra* cinsi özellikle ülkemizin güney bölgelerinde yaygın olarak bulunur (Gözükara ve Çavas, 2001).

Yağlı balık ya da kaya balığı olarak da bilinen *Garra rufa* bireylerinin vücutları nispeten ince uzun, silindirik yapıda ve iri pullarla örtülüdür. Burun ucu küttür ve üzerinde kabarcıklar bulunur. Ağız ventral konumlu ve hilal şeklinde olup etrafında iki çift kısa bıyık bulunur. Alt dudağına bitişik ve gayet iyi gelişmiş tutunma organı (vantuz) sayesinde çok hızlı akan akarsu zonlarında bile kolaylıkla yaşama olanağı bulurlar. Dorsal yüzgeç ventral yüzgeçlerin önünden başlar ve serbest kenarı düzdür (Undar ve ark., 1990).



Şekil 2.1 *Garra rufa obtusa*

Garra rufa obtusa bireylerinin standart boy vücut yüksekliğinin yaklaşık olarak 4,5 -5 katı kadar olup boyu maksimum 19 cm'dir. Renkleri genellikle açık kahverengi olup tüm vücutta aynıdır. Ancak özellikle sonbahar ve kış aylarında vücutlarında düzensiz bir şekilde dağılmış siyah lekelerin bulunduğu belirlenmiştir (Undar ve ark., 1990).

2.2 *Cyprinion macrostomus*

Tatlı sularda en çok yayılış gösteren *Cyprinidae* üyesi olan *Cyprinion macrostomus* bireylerinin esas yayılış sahası Hindistan, Ön Asya, Dicle ve Fırat nehir sistemlerini kapsamaktadır. Doğudan ülkemize girmiştir ve Tarsus (Mersin) civarına kadar uzanabilmiştir (Geldiay ve Balık,1988).

Beni balığı olarak da bilinen bu türün vücudu yanlardan yassılaştırmış olup her tarafı iri pullarla örtülüdür. Terminal ağız tiplidir ve alt dudak üst dudağa nazaran çok kalın ve pürüksüzdür. Ağız etrafında gayet kısa bir çift bıyık bulunur. Dorsal yüzgecin en uzun basit ışını gayet kuvvetli kemikleşmiş olup arka kenarı testere dişi gibi tırtıklıdır. Kuyruk yüzgeci derin girintili ve loplarnın ucu sivridir. Boyu 15–17 cm civarındadır (Geldiay ve Balık, 1988).



Şekil 2.2 *Cyprinion macrostomus*

Vücut rengi genellikle her tarafta homojen olup, peritoneum siyah renklidir. Vücudun yan taraflarında düzensiz şekilli ve sayıları 6-8 arasında değişen siyah renkli benekler vardır. Ayrıca solungaç kapakları üzerinde de gri-esmer küçük lekeler bulunur. Bu balıklar, akarsuların zemini kumlu ve çakıllı olan zonlarına yakın yerlerinde yaşarlar. Biyolojileri hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır (Geldiay ve Balık, 1988).

3. SERBEST RADİKALLER

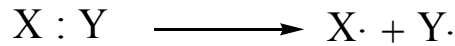
Serbest radikaller, hücre metabolizması sırasında cereyan eden biyokimyasal reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan, en dış orbitalinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren kısa ömürlü, kararsız, moleküler ağırlığı düşük, çok etkin atom veya moleküller olarak tanımlanır (Abdollahi ve ark, 2003; Van, 1993).

Bir serbest radikaldeki ortaklanmamış elektron, başka atom veya moleküler ile elektron alış verişi yapıncaya kadar reaktiftir ve tek elektronlarını çiftlemek üzere diğer atom ya da moleküllerle hızla reaksiyona girmeye dolayısıyla onların yapılarını değiştirmeye eğilimlidir (Del Maestro, 1980; Slater, 1984). Serbest radikaller; pozitif yüklü (katyon), negatif yüklü (anyon) veya elektriksel olarak nötral durumda bulunabilir (Cheeseman ve Slater, 1993). Kimyasal sembollerinin üst taraflarına en dış orbitallerindeki çiftlenmemiş elektron sayısı kadar konulan nokta ile gösterilir.

Serbest radikaller başlıca üç temel mekanizma ile oluşur (Cheeseman ve Slater, 1993) .

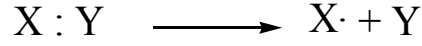
1- Kovalent bağlı normal bir molekülünün, her bir parçasında ortak elektronlardan biri kalacak şekilde homolitik bölünmesi,

Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık kimyasal bağların kırılmasına neden olduğundan bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalmakta ve iki adet yüksek reaktiviteli serbest radikal oluşmaktadır (Wu ve Cederbaum, 2003) .



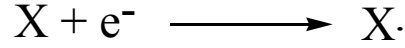
2- Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi,

Radikal özelliği bulunmayan bir molekülün elektron kaybetmesi sonucu dış orbitalindeki eşleşmemiş elektron serbest radikalleri oluştururken, heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektronun atomlardan birinde kalmasıyla serbest radikaller değil iyonlar oluşmaktadır.



3- Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi,

Radikal özelliği bulunmayan bir moleküle tek elektron transferi sonucu dış orbitalinde eşleşmemiş elektron oluşması ile serbest radikaller meydana gelebilir. Örneğin moleküler oksijenin radikal formu olan süperoksitin oluşumu, moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi sonucu gözlenmektedir (Cheeseman ve Slater, 1993).



Vücudun gereksinim duyduğu başlıca eser elementler olan Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} ve Mo^{5+} gibi geçiş metalleri de dış orbitallerinde bir veya daha fazla sayıda ortaklanmamış elektron taşımalarına rağmen serbest radikal olarak kabul edilmemektedir. Serbest radikal kabul edilen atom ve moleküller elektron dağılımlarının yanı sıra termodinamik yapıları ve lokal kinetik reaktiviteleri ile değerlendirilir (Aslan ve ark., 1995; Byung, 1994; Aust ve ark., 1985). Ancak serbest radikal özelliği göstermeyen bu geçiş metalleri serbest radikal oluşumunda önemli rol oynar.

Serbest radikaller başlıca oksijen molekülünden türemektedir. Ancak organizmada oksijen türevi serbest radikallerin dışında karbon ve kükürt merkezli radikallerde oluşmaktadır (Haliwell ve ark., 1992; Uysal, 1999).

Çizelge 3.1 Hücrede oluşabilen reaktif oksijen radikalleri ile oksijen içeren bazı reaktif türler;

Tür Adı		Tür Adı	
1O_2	Singlet oksijen	$HO_2\cdot$	Hidroperoksil radikali
$O_2^{\cdot-}$	Süperoksit	$NO\cdot$	Nitrik oksit
$OH\cdot$	Hidroksil radikali	NO_2	Nitrojen dioksit
H_2O_2	Hidrojen peroksit	NO_2^+	Nitril katyonu
$ROO\cdot$	Peroksil radikali	$ONOO^-$	Peroksinitrit
$ROOOH$	Hidroperoksit	$ONOO\cdot$	Peroksinitrit radikali
$RO\cdot$	Alkoksil radikali	N_2O_3	Dinitrojen trioksit

Canlılar için büyük öneme sahip olan ve biyolojik sistemlerdeki varlığı ilk olarak 1954 yılında Gerschman ve arkadaşları tarafından tespit edilen serbest oksijen radikalleri oksijenin belirli koşullarda kısmen indirgenmesi sonucu oluşan, çok kısa ömürlü ve güçlü oksidan nitelikli metabolitlerdir. Hücre ve dokular, canlı organizmada normal metabolizma sırasında ya da patolojik yollarla ortaya çıkan bu serbest radikal ürünlerini inhibe eden güçlü bir savunma sistemine sahip olup, reaktif oksijen türevleri serbest radikaller ve antioksidan savunma mekanizmalarının arasındaki denge aerobik organizmaların fonksiyonu ve yaşamı için oldukça önemlidir. Serbest radikallerin lehine ve/veya antioksidanlar aleyhine bir dengesizlik, önemli hücre kompartmanlarında geri dönüşümsüz hasara neden olmakta ve bu olay oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır (Meotti ve ark., 2004).

Bir başka deyişle oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin derişimi ile vücudun antioksidatif savunma mekanizmalarının derişimi arasındaki dengesizliği göstermekte kullanılan bir terimdir.

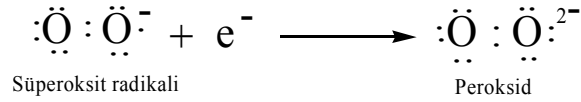
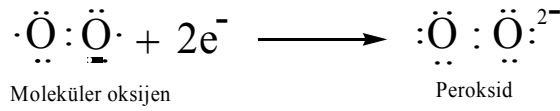
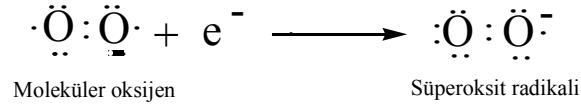
Hem serbest radikaller ve hem de reaktif oksijen türleri nükleik asitler, serbest amino asitler, proteinler, lipidler, lipoproteinler, karbohidratlar ve bağ dokusu makro molekülleri de dâhil olmak üzere, canlı organizmaların yapısında bulunan hemen hemen bütün sınıflara dâhil bileşiklerle reaksiyona girerek tersinir veya tersinmez hasarlar meydana getirilebilmektedirler (Cross ve ark., 1987). Bu hasarların bazıları şöyle sıralanabilir.

- ✓ Membran hidrofiliğine etki ederek membran bütünlüğünün bozulması
- ✓ Eritrositlerde demirin değerliğine etki ederek methemoglobin oluşturması ve oksijen bağlanmasının engellenmesi
- ✓ Akciğer de alveolleri harap ederek solunumun ortadan kaldırılması
- ✓ Proteinlerdeki SH gruplarını değiştirerek normal fonksiyonunun bozulmasına sebep olurlar (Masuda ve ark., 1993; Peden ve ark.,1994).

3.1 Reaktif Oksijen Türleri

3.1.1 Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot -}$)

Moleküler oksijen dış orbitallerinde eşleşmemiş iki elektron içerir. Bu elektronlar paylaşılmadığında, ayrı ayrı orbitallerde bulduklarında ve spinleri aynı yönde olduğu zaman en düşük enerji seviyesine sahiptir. Bu dış orbitallerden her biri elektron alabilmekte ve tek elektron alması ile süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$), iki elektron alması ile de peroksi anyonu oluşmaktadır.



Hem çevresel etkenler, hem de organizmalardaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle en çok ve en kolay oluşan oksijen radikali süperoksit radikali (Yiğit ve Yurdakök, 1996).

Canlılarda oluştuğu ilk gösterilen radikal olan süperoksit, başlıca şu mekanizmalarla meydana gelmektedir.

➤ Görünür bölge ışınları da dâhil olmak üzere bütün yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar her oksijenli ortamda süperoksit radikali oluşturabilir (Yiğit ve Yurdakök, 1996).

➤ Çeşitli enzimatik tepkimelerde süperoksit radikali oluşabilmektedir. Hücre zarındaki siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimleri sitoplazmadaki ksantin oksidaz ve triptofan dehidrogenaz enzimleri aracılığıyla da $O_2^{\cdot -}$ oluşumu gözlenmektedir. Kullanılan oksijenin %2'si süperoksit haline dönüşmektedir (Zimmerman ve Granger, 1994; Kontos ve ark., 1985; Mcintyre ve ark., 1999; Köse, 1997).

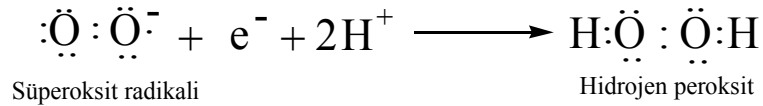
➤ İndirgeyici özellikteki biyomoleküller oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken süperoksit radikali oluşturabilirler. Hidrokinonlar, flavinler (flavin mononükleotidler, flavadoksin, riboflavin gibi) tiyoller (glutatyon), indirgenmiş

nükleotidler, ferrodoksinler, tetrahidropteridin ve hemoproteinlerin otooksidasyon tepkimelerinde süperoksit radikali meydana getirebilirler. Bu reaksiyonlarla oluşan süperoksit radikalının iyon transportunda, primidin biyosentezinde, oksihemoglobin-methemoglobin oranlarının düzenlenmesinde görev aldığı bilinmektedir (Petkau, 1986).

- Canlılarda süperoksit radikalının en fazla üretildiği sistem, hücrelerin enerji sağladıkları, moleküler oksijenin suya indirgendiği mitokondri elektron taşıma sistemidir. Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken, tüketilen oksijenin % 1 ile % 4 oranında süperoksit yapımı ile sonlanmaktadır. Mitokondri elektron taşıma sisteminde süperoksit üretimi, bir flavoprotein olan NADH dehidrogenaz ve koenzim Q gibi elektron taşıyıcılarından oksijene elektron kaçağı nedeniyle gerçekleşmektedir (Traş, 1997; Perez ve ark., 1993; Aslan, 1997; Akkuş, 1995).
- Aktifleşen fagositik hücreler (nötrofil, eozinofil, makrofajlar) mitokondri dışı oksijen kullanımında ani artış ile oluşan solunum patlaması sonucu süperoksit radikali oluşturabilmektedir (Steinman, 1982).

Antibakteriyel etki için gerekli olan bu radikal yapımı, daha reaktif türlerin oluşumunu da başlatmaktadır (Hampton, 1998).

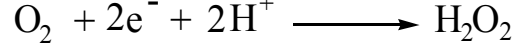
Süperoksit, bir serbest radikal olmakla birlikte, kendisi doğrudan fazla hasara neden olmaz. Süperoksit'in asıl önemi, H₂O₂'e kaynaklık etmesi ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasından kaynaklanmaktadır. Uzun bir yarı ömre ve lipofilik özelliğe sahip olduğundan, olduğu yerden uzak bölgelere difüzyonla yayılabilmekte bunun sonucunda ise oluştukları ortamdan hemen uzaklaştırılması gerekmektedir. Aksi takdirde kendisinden çok daha reaktif ve toksik etkili radikallerin oluşumuna neden olmaktadır (Yiğit ve Yurdakök, 1996).



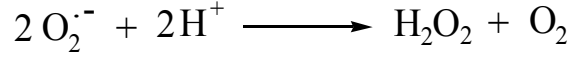
Süperoksit radikallerinin ortamdan uzaklaştırıldığı reaksiyonlara, dismutasyon tepkimesi adı verilmekte ve bu tepkimeler ya doğal olarak ya da süperoksit dismutasyon (SOD) katalizi ile gerçekleşebilir.

3.1.2 Hidrojen Peroksit

Doğal oksijen molekülünün başka bir molekülden iki elektron almasıyla veya süperoksit radikalinin bir elektron almasıyla peroksit oluşumu gözlenir. Oluşan peroksit molekülü ise iki hidrojen ile birleşerek H₂O₂'i meydana getirir.



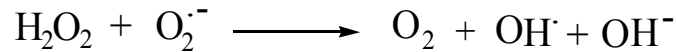
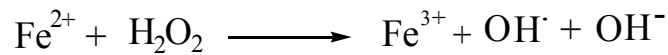
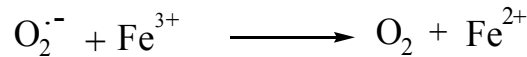
H₂O₂, süperoksit dismutaz tarafından katalizlenen dismutasyon reaksiyonu sonucu veya spontan olarak da üretilebilir. İki O₂^{•-} molekülü iki proton alarak H₂O₂ ve moleküler oksijeni oluşturmakta ve reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler meydana gelir. Bu reaksiyon dismutasyon reaksiyonu olarak adlandırılır (Özdemir, 1993).



H₂O₂, kendisi radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli rol oynar. Üretildiği bölgede kalan süperoksidin aksine membranları geçen, sitozole diffüze olan ve uzun ömürlü bir oksidan olarak bilinir. Bu nedenle süperoksidin ulaşamadığı membranla korunan yapılara kolaylıkla ulaşabilir.

H₂O₂, süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici radikal olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir.

Haber-weiss reaksiyonu olarak bilinen bu reaksiyon, katalizörlü veya katalizörsüz olarak gerçekleşebilmektedir. Katalizörsüz reaksiyon yavaş ilerlerken demir gibi geçiş metal iyonları varlığında katalizlenen reaksiyon çok daha hızlı gerçekleşir. Katalizörsüz ortamda H₂O₂ ve O₂^{•-} antioksidanlar tarafından kolaylıkla yok edildiğinden bu reaksiyon gerçekleşmeyebilir (Sies, 1991; Kozumbo ve ark, 1985; Ünal, 1999a).

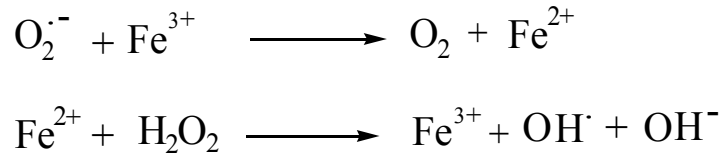


Bu reaksiyonlardan da anlaşılacağı gibi süperoksit hem hidrojen peroksit kaynağı hem de geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisidir. İndirgenmiş geçiş metalleri de okside formlara göre hidrojen peroksit ile daha reaktiftirler (Cheeseman ve Slater, 1993).

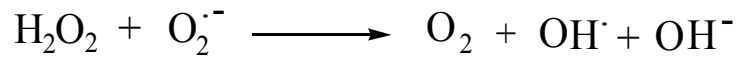
H₂O₂ üretimi, tiroid hücreleri, birçok bakteri türü, fagositik hücreler ve spermatozoa gibi hücrelerde olduğu gibi mitokondri, mikrozoamlar ve peroksizomlarda da oluşmaktadır. H₂O₂ hücre zarlarını kolaylıkla geçerken O₂^{•-} geçemez. Bu nedenle DNA hasarı yapma riski fazladır ve sitoplazmadaki katalaz enziminin inhibisyonu hasarının artmasına neden olmaktadır (Akkuş, 1995).

3.1.3 Hidroksil Radikali

Hidroksil radikali biyolojik sistemde bulunan en güçlü radikal olup, H₂O₂ 'in geçiş metalleri varlığında indirgenmesi (Haber-Weiss reaksiyonu) sonucu oluşan reaktif bir radikaldir (Cheeseman ve Slater, 1993).

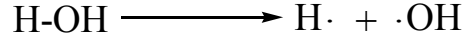


Katalizörlü ve katalizörsüz gerçekleşen bu reaksiyon katalizörsüz çok yavaş olduğu halde Fe⁺³ katalizörlüğünde çok hızlı gerçekleşmektedir.



Vücutta oluşacak olan OH⁻ radikalinin derişimi vücutta üretilen H₂O₂ derişimi ve serbest metal iyonunun varlığına bağlı olup hem H₂O₂ oluşumuna kaynaklık eden hem de metalleri indirgeyici bir tür olan süperoksit radikalinin biyolojik koşullarda vücuttaki üretiminin artması ortamda hidroksil radikalinin de artmasına neden olacaktır.

Haber-weiss reaksiyonunun yanı sıra gama radyasyona maruz kalan dokularda da hidroksil radikali oluşabilir. Alınan enerji hücre suyu tarafından absorbe edilmekte ve sudaki oksijen-hidrojen kovalent bağının parçalanmasına neden olmaktadır. Sonuç olarak dış orbitalinde ortaklanmamış elektron bulunan hidrojen ve hidroksil radikallerin oluşumu gözlenir.



Biyolojik sistemlerin tanıdığı en aktif tür olan hidroksil radikali yüksek reaktivitesinden ötürü istenmeyen toksik etkilere sahip olmasına rağmen üretilmesi normal biyolojik sistemler için gereklidir. Üretildiği yerde hemen her tür molekül ile tepkimeye girebilmekte ve radikal tepkimelerini başlatabilmektedir (Yiğit ve Yurdakök, 1996; Lunec ve Blake, 1990). Hidroksil radikalının katıldığı başlıca tepkimeler;

- ❖ Elektron transfer reaksiyonları
- ❖ Hidrojen çıkarma tepkimeleri
- ❖ Katılma tepkimeleri

Hidroksil radikali hemen hemen tüm hücrel moleküllele reaksiyon verebilir, fakat başlıca ve en önemli etkileri lipidler, proteinler, sitokromlar ve nükleik asitler üzerine olan etkileridir (Akkuş, 1995).

3.1.4 Singlet Oksijen

Ortaklanmamış elektronu olmadığı için serbest radikal olmayan ancak serbest radikallerin reaksiyonları sonucu oluşan veya serbest radikal reaksiyonlarını başlatabilen tek atom halinde bulunan reaktif bir moleküldür (Gutteridge, 1995).

Moleküler oksijende paylaşılmamış iki dış elektron aynı yönde, aynı yörüngelerde bulunurken singlet oksijende ise iki dış elektron ayrı ayrı veya aynı orbitali işgal edebilmektedir.

İki elektron aynı orbitalde bulunur ve spinleri birbirine zıt ise biyolojik olarak daha uzun ömre sahip olan delta singlet oksijen formu oluşurken, iki elektron ayrı ayrı orbitallerde ise çok kısa ömürlü olan sigma singlet oksijen formu oluşmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1989; Ünal, 1999b).

Singlet oksijen, süperoksidin doğal dismutasyonu ve hidroksil radikalının oluşumuna neden olan Haber-weiss reaksiyonu ile meydana gelir.

Oluşan singlet oksijenin kimyasal bir bileşik ile etkileşimi sonucu kemiluminesas oluşmakta ve kemiluminesas ölçülmesi sonucunda da reaktif oksijen türlerinin direkt tayini yapılabilmektedir.

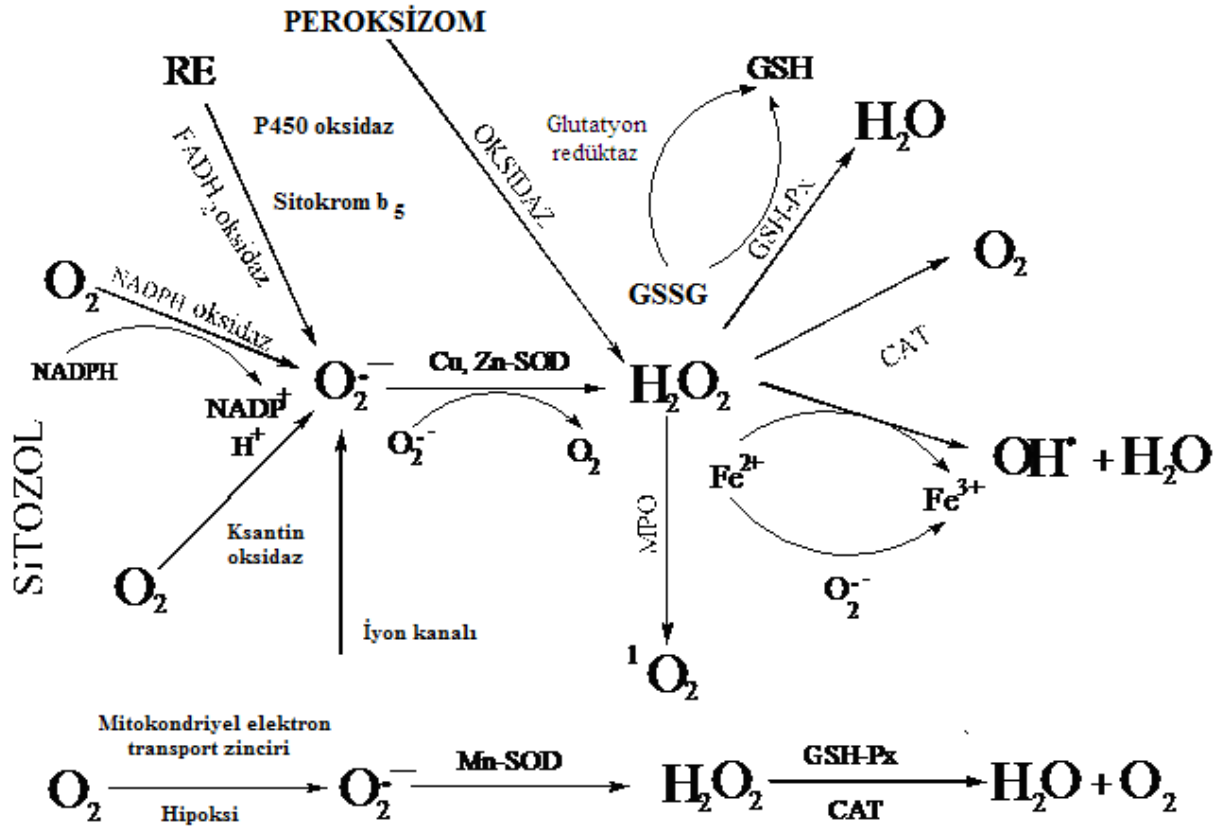
Ayrıca karotenler, bilirubin, histidin, metiyonin ve bazı kimyasal bileşikler singlet oksijeni temizleyerek, singlet oksijen bağımlı tepkimeleri inhibe etmektedir.

3.1.5 Nitrik Oksit (NO)

Canlılarda çok önemli biyolojik fonksiyonları yerine getirebilen nitrik oksit, kolaylıkla nitrit (NO_2^-) ve nitrata (NO_3^-) okside olabildiği azot merkezli bir radikaldir. Vücuda giren nitro bileşiklerinin metabolize edilmesi sırasında oluşan NO dışında hücrede NO oluşturan tek kaynak nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimi olup yarı esansiyel amino asit olan L-arjininden oksidatif deminasyon sonucunda nitrik oksit sentezlenmesine neden olmaktadır (Richard, 1994).

Radikal olarak aktivitesi düşük olan NO radikali, metal içeren merkezler ve radikaller ile reaksiyona girerek dokularda serbest radikallerin aşırı birikimini önlemektedir. Özellikle lipid radikallerle tepkimeye girmesi NO'ye antioksidan bir etki kazandırmaktadır. NO radikalinin reaktif oksijen türevi olan süperoksit ile tepkimeye girmesi sonucu yüksek aktiviteli peroksinitrit (ONOO^-) oksidantı oluşmaktadır. Yüksek aktiviteye sahip olan peroksinitrit, radikal tepkimeleri başlatmakta ve biyomoleküllerin nitrasyonuna neden olmaktadır (Butler ve ark., 1995).

Azot oksitler; NO, NO_2^- , NO_2 , NO_3^- , N_2O olmak üzere beş farklı molekül şeklinde hücre içinde oluşabilmektedir. Bu reaktif türler NO'nin dolaylı etkilerinden sorumlu olup hücre proteinlerin, enzimlerin inaktivasyonuna neden olabilirler (Murph, 1999).



Şekil 3.1 Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve oluşan hasara karşı savunma mekanizmaları (Mates ve ark., 1999)

3.2 Serbest Radikallerin Kaynakları

Biyolojik sistemlerde serbest radikal oluşumu, normal metabolik olayların seyri sırasında olabildiği gibi, organizmada yabancı maddelerin metabolize edilmesi sırasında ve organizmanın dış etkenlere maruz kalması sonucunda da oluşabilmektedir.

Bu nedenle normal yaşam süresi içerisinde oksidan moleküllerin artması olarak değerlendirilen serbest radikal oluşumu endojen ve ekzojen kaynaklar olmak üzere iki kısımda incelenmektedir.

Endojen kaynaklar

- Mitokondri elektron taşıma zinciri
- Mikromozomal zar elektron taşıma zinciri
- Kloroplast elektron taşıma sistemi
- Oksidan enzimler;
 - ✓ Ksantin Oksidaz
 - ✓ Galaktoz Oksidaz
 - ✓ Siklooksijenaz
 - ✓ Lipooksijenaz
 - ✓ Monoamin Oksidaz
- Fagositik hücreler;
 - ✓ Nötrofil
 - ✓ Makrofaj
 - ✓ Monosit
 - ✓ Endotelyal Hücreler vb (Halliwell ve ark., 1987)
- Otooksidasyon reaksiyonları (Fe⁺², Epinefrin)
- Oksidatif stres yapıcı durumlar (iskemi, travma) (Özkan ve Fıfşkın, 2004)

Ekzojen kaynaklar

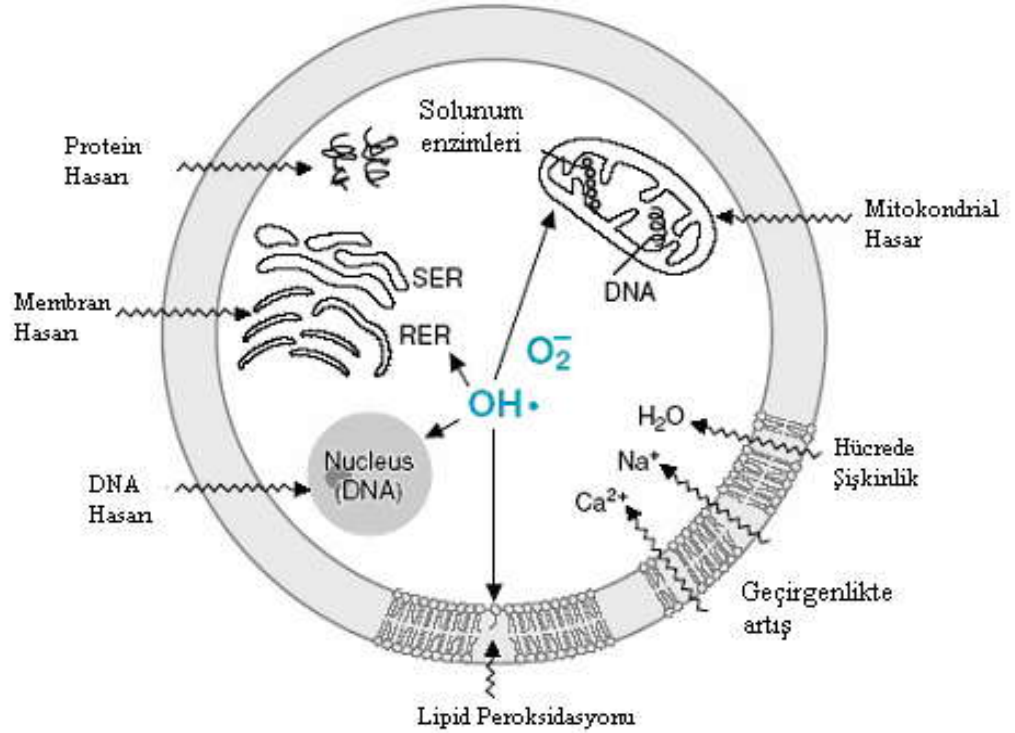
- İlaçlar (parasetamol, CCl₄)
- İyonize radyasyon
- Güneş ışığı
- X ışınları, UV ışınları
- Isı şoku
- Ozon
- Glutasyonu okside eden maddeler
- Sigara dumanı, egzoz gazları vb.
- Antineoplastik ajanlar (nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin ve adriamisin gibi)
- Alkol ve uyuşturucular gibi alışkanlık yapıcı maddeler
- Stres

3.3 Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller, savunma mekanizmasının kapasitesini aşacak miktarlarda oluştuğları zaman hücrelerin lipid, protein, karbonhidrat ve DNA gibi tüm bileşenlerine etki ederek yapısal ve metabolik değişikliklere neden olurlar.

Serbest oksijen radikalleri,

- (i) Hücre membranı proteinlerini yıkarak hücreleri öldürür.
- (ii) Membran lipid ve proteinlerini yok ederek hücre membranını sertleştirip hücre fonksiyonunu engeller.
- (iii) Çekirdek membranını yararak çekirdekdeki genetik materyale etki edip DNA'yı kırılma ve mutasyonlara açık hale getirir.
- (iv) İmmün sistemdeki hücreleri yok ederek immün sistemi bozar.



Şekil 3.2 Radikallerin yol açtığı hücre hasarı (Antmen, 2005)

3.3.1 Protein Üzerine Etkileri

Oksidatif stresin bir sonucu olarak serbest radikallerin artışı proteinler de dahil olmak üzere hücresel moleküllerdeki oksidatif modifikasyonların artışına yol açmaktadır (Usmar ve Halliwell, 1996; Shacter, 2000).

Serbest radikallere karşı lipitlere oranla daha az hassas olan proteinler özellikle aminoasit dizilişlerine bağlı olarak etkilenmektedir. Aminoasit dizilişinin yanısıra proteinlerin serbest radikallere duyarlılığı; proteinin tamir edilip edilmemesi, proteinin hücre içindeki lokalizasyonuna ve serbest radikallerin özelliklerine bağlıdır (Sinclair ve ark., 1990; Freeman ve Crapo, 1982).

Yapısında doymamış bağ ve tiyol (-SH) gurubu içeren aminoasitlerden oluşan proteinler (triptofan, tirozin, histidin, metiyonin, sistein) serbest radikallerden kolaylıkla etkilenmekte ve proteinlerin peptid omurgasında meydana getirdiği oksidatif hasara bağlı olarak sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşturabilmektedir. Sülfidril gruplarının değişik mekanizmalarla disüfitlere ve oksiasitler gibi diğer oksitlenmiş türevlere dönüşümü, serbest radikal etkisiyle meydana gelen protein oksidasyonunun ilk gözlenen belirtilerindendir. Karbon merkezli radikaller ise karbonil proteinlerin oluşumuna neden olmakta ve hücrede oluşan oksidatif protein hasarı bu proteinlerin ölçülmesi ile değerlendirilmektedir. Protein oksidasyonunu belirlemede protein karbonil düzeylerinin saptanması duyarlı ve genel olarak kabul görmüş bir yöntemdir (Dalle-Donne ve ark., 2003; Standman ve Levine, 2003; Rangan ve Bulkey, 1993).

Protein oksidasyonunun biyokimyasal sonuçları; enzim aktivitesindeki azalma, protein fonksiyonlarının kaybı, proteaz inhibitör aktivitenin kaybı, protein agregasyonu, proteolize artmış/azalmış yatkınlık, reseptör aracılı endositozun bozulması, gen transkripsiyonundaki değişimler, immünojen aktivitedeki artış olarak sıralanabilir (Shacter, 2000).

Serbest radikaller tarafından proteinlerin oksidatif modifikasyonu, bir dizi bozukluk ve hastalığın ilerlemesinde rol oynar. Bu hastalıkların başlıcaları; alzheimer, amiyotrofik lateral skleroz, katarakt oluşumu, kronik böbrek yetmezliği, kistik fibroz, diyabet, iskemi ve reperfüzyon hasarı, parkinson, romatoid artrit ve sepsis olarak sıralanabilmektedir.

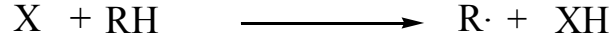
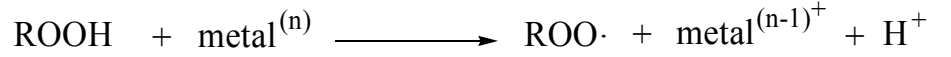
3.3.2 Lipid Üzerine Etkileri

Reaktif oksijen türlerinin derişimi ile vücudun antioksidatif savunma mekanizmalarının derişimi arasındaki dengesizliğı göstermekte kullanılan oksidatif stres durumunda serbest radikal oluşumunun artması organizmada başta lipidler olmak üzere biyomoleküllerin tüm sınıflarını etkilemektedir. Serbest radikallerin biyolojik dokulardaki doymamış yağ asitleri üzerindeki etkileri lipid peroksidasyonu olarak bilinmekte ve oksidatif stresin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Canoruç ve ark., 2001).

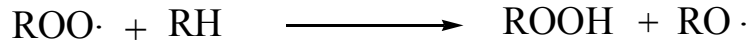
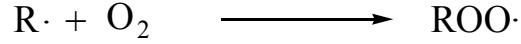
Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı olarak bilinen lipid peroksidasyonu bir zincir tepkimesi şeklinde başlamakta, daha ileri peroksidasyonu başlatacak serbest radikaller için kesintisiz bir kaynak oluşturmaktadır (Murray ve ark, 1996). Kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerleyen bu reaksiyonlar sonrasında açığa çıkan ürünler ise membran geçirgenliğini ve akışkanlığını ciddi şekilde etkilemekte ve membran üzerinde geri dönüşümü olmayan hasarlar meydana getirmektedir (Arda, 1974; Özkan ve Fışkın, 2004).

Lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin, çoklu doymamış yağ asiti zincirinin metilen gruplarından bir hidrojen atomu koparmasıyla başlar. Koparılan hidrojen atomu karbon atomunun eşleşmemiş elektron içermesine neden olduğundan karbon merkezli radikal oluşur ve bunun sonucu yağ asidi zinciri bir lipid radikali özelliğı kazanır. Molekül içi çift bağların pozisyonlarını düzenleyen lipid radikali konjuge dien yapısına dönüşmekte ve moleküler oksijenle reaksiyona girerek lipid peroksi radikalini (LOO[•]) oluşturmaktadır. Bu peroksi radikali membran yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açmakta ve kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlere dönüşmektedir. İlerleme reaksiyonu olarak adlandırılan bu reaksiyon sonucunda lipid peroksidasyonunun ilk ürünü olan lipid hidroperoksitleri oluşmaktadır (Hassun, 1983; Deby ve Pincemail, 1988; Yagi, 1987).

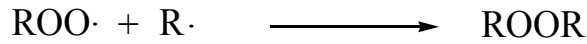
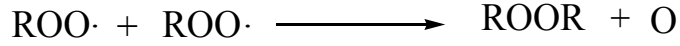
(1) Başlama reaksiyonu



(2) İlerleme Reaksiyonu



(3) Sonlanma Reaksiyonu



Lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonları (Murray ve ark., 1996).

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ürünlerin başlıcaları; Malondialdehit, 4-hidroksinonenal, 4-hidroksi-2,3-transnonenal olup oluşan bu aldehit türevlerinin diğer karbonil bileşikler ile etan, pentan gibi uçucu gazlara dönüşmesi şeklinde sonlanmaktadır (Guttridge, 1995; Thomas, 1999). Oluşan tüm bu ürünler kantitatif olarak belirlenebilir.

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid hidroperositleri yüksek sıcaklık veya demir, bakır gibi geçiş metalleri katalizi ile yıkıldığında çoğu zararlı olan aldehitler oluşmaktadır (Soderger, 2000).

Aldehitler membran bileşenlerinin çapraz bağlanmasına ve polimerizasyona neden olmakla beraber membran reseptör ve enzimlerini inaktive ederek membran proteinlerinde de ciddi hasarlar meydana getirebilmektedir (Slater, 1984; Canoruç ve ark., 2001).

Dokularda bir aldehit olan MDA seviyesinin artması koroner arter hastalığına, akciğer kanseri ile diğer akciğer hastalıklarına, DNA'ya bağlanarak mutasyonlara ve iltihaplanmalara yol açtığı da bildirilmektedir (El-Yassin ve ark., 2005).

3.3.3 Nükleik Asit ve DNA Üzerine Etkileri

Hücre içerisinde çeşitli etkilerden dolayı meydana gelen serbest radikaller, başta hidroksil radikali olmak üzere nükleik asitler ve DNA üzerinde toksik etkiye sahiptir. Hidroksil radikali deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girerek nükleik asit bazlarının modifikasyonuna ve DNA şeridi kırılmasına neden olurken aktif fagositlerden kaynaklanan hidrojen peroksit, hücre membranından kolayca geçerek hücre çekirdeğine ulaşmakta ve DNA hasarına, hücre fonksiyon kaybına, hatta hücre ölümüne neden olmaktadır. Güçlü bir oksitleyici olan süperoksit anyonu ise guanin gibi yüksek elektron yoğunluklu bölgeler içeren moleküllerle tepkimeye girerek etki göstermektedir (Lunec ve Blake, 1990; Winrow ve ark., 1993; Cheeseman ve Slater, 1993; Halliwell, 1994) .

Tüm bu reaksiyonlar sonucunda oluşan oksidatif DNA hasarı kanser oluşumuna, hücre yaşlanmasına ve hücre ölümüne kadar gidebilen süreç içinde ana faktör olarak rol oynar (Del Maestro, 1980; Freeman ve Crapo, 1982; Halliwell ve ark., 1987).

3.3.4 Karbonhidrat Üzerine Etkileri

Serbest oksijen radikallerine karşı en dayanıklı hücresel yapı olan karbonhidratlar, fizyolojik şartlarda otooksidasyona uğrayarak hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler meydana getirir. Okzoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden ötürü antimitotik etki göstermekte, kanser ve yaşlanmaya neden olmaktadır (Ceballos-Picot ve ark, 1992).

Ayrıca monosakkaritlerin otooksidasyonu protein çapraz bağlanmalarının sonucu olarak agregasyona sebep olduğu gibi bazal zar kalınlaşmasına da neden olur. Serbest radikaller bu etkilerden dolayı diabet, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, psöriasis, romatoid gibi birçok hastalığın patogenezinde rol oynarlar (Ames, 1993).

4 ANTIOKSİDAN SAVUNMA MEKANİZMALARI

Hücre ve dokular, canlı organizmada normal metabolizma sırasında ya da patolojik yolla ortaya çıkan radikal ürünleri ve reaksiyonlarını inhibe eden güçlü bir savunma sistemine sahiptir. Radikallerle hızla reaksiyona girerek zararlı etkilerini önleyen maddelerin tümüne birden genel olarak "**antioksidan savunma sistemleri**" veya kısaca "**antioksidanlar**" denir (Mccord ve Fridowich, 1969).

Antioksidan savunma sistemleri, '**enzimatik antioksidan savunma**' ve '**enzimatik olmayan antioksidan savunma**' olarak iki grupta incelenir. Diğer yandan antioksidanlar spesifik rollerinin ortaya çıkmasıyla hücresel zara ait '**endojen kaynaklı**' ve hücre dışı '**eksojen kaynaklı**' antioksidanlar olarak sınıflandırılabilirler.

Çizelge 4.1. Antioksidan Savunma Sistem Elemanları

Enzimatik	Enzimatik Olmayan	
Süperoksit dismutaz	Vitamin E (α - tokoferol)	Bilirubin
Katalaz	Vitamin C (askorbat)	Haptoglobin
Glutasyon peroksidaz	β -karoten	Transferrin
Glutasyon redüktaz	Albumin	Melatonin
Glutasyon S-transferaz	Seruloplazmin	Sistein
Sitokrom oksidaz	Flavonoidler	Ferritin
	Ürat	Laktoferrin

Antioksidanlar birbirinden bağımsız veya bir arada fonksiyon gösteren altı değişik mekanizma ile etkilerini gösterirler (Akkuş, 1995).

Bu mekanizmalar;

1. Oksijen ile reaksiyona girerek ya da yerini alarak lokal oksijen derişimini azaltabilirler.
2. OH[·] radikali yapısında yer alan hidrojen atomları bağ oluşturabilecek yapıdaki ürünleri temizleyerek peroksidasyonun başlamasını önleyebilirler.
3. Zar lipidlerine direkt etki yaparak peroksit oluşturabilen singlet oksijeni baskılayabilir veya temizleyebilirler.
4. Metal iyonlarını bağlamak yoluyla reaktif grupların veya lipid peroksitlerden peroksil ve alkoksil radikallerinin oluşumunu önleyebilirler.
5. Peroksitleri, alkol gibi radikal olmayan ürünlere çevirebilirler.
6. Zincir oluşumuna yol açabilen serbest radikallerle reaksiyona girebilir ve yağ asidi zincirlerinden sürekli hidrojen iyonu salınışını önleyebilirler.

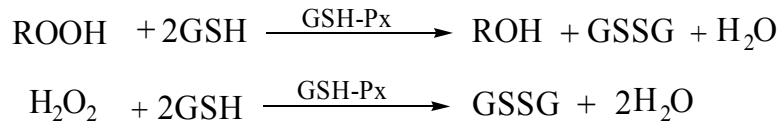
Serbest radikallerin oluşum hızı ile etkisizleştirme hızı antioksidan savunma mekanizması dengede olduğu sürece, organizma bu bileşiklerden etkilenmez. Ancak serbest radikallerin oluşum hızı sistemin savunma gücünü aşarsa veya savunma azalırsa, denge bozulur ve serbest radikallere bağlı zararlı etkiler ortaya çıkabilir (Akkuş, 1995) .

Bu mekanizmalarla normal biyokimyasal olaylar sırasında az miktarda oluşan radikaller etkisiz hale getirilebilir. Hiperoksi, iskemi sonrası reperfüzyon, dokularda reaktif oksijen radikalleri oluşturan ksenobiyotiklere maruz kalma ve bu radikalleri bol miktarda oluşturan aktive edilmiş nötrofillerle diğer fagositlerin dokularda toplanması oksidan/antioksidan dengenin bozulmasına, antioksidan mekanizmaların tükenmesine ve sonuçta sitotoksik radikal etkinliğinin artmasına bağlı olarak hücre zedelenmesine ve ölümüne neden olur (Akkuş, 1995)

4.1 Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon peroksidaz 1957'de Mills tarafından keşfedilen bir antioksidandır (Knapen ve ark, 1999). Glutasyon peroksidaz enzimi hücre içi bir enzim olup her biri birbirinden ayrı dört alt üniteden oluşur. Tetramerik yapıdaki enzim aktif merkezinde enzime kovalent bağlı selenosistein formunda selenyum atomu içermektedir. Mitokondri, sitozol ve hücre membranlarında bulunan glutasyon peroksidazın molekül ağırlığı yaklaşık olarak 85000 dalton'dur (Deaton ve Marlin, 2003; Akkuş, 1995) .

Glutasyon peroksidaz, elektron kaynağı olarak glutasyonu kullanarak hidrojen peroksit ve organik hidroperoksitlerin redüksiyonunu katalize etmekte ve oksidatif stresden hücrenin korunmasında önemli bir rol oynamaktadır (Deaton ve Marlin, 2003). Glutasyon peroksidaz aşağıdaki reaksiyonları katalizler.



GSH-Px iki adet tiyol grubu ihtiva eden glutasyonu, glutasyon disülfite yükseltgerken organik hidroperoksitleri (lipit hidroperoksitler, DNA hidroperoksitler) ve H₂O₂ 'yi indirgemektedir.

GSH-Px enziminin selenyuma bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki formu bulunmakta olup selenyum bağımlı enzim hem H₂O₂ hem de lipid hidroperoksitlere etki ederken selenyuma bağımlı olmayan lipid hidroperoksitlerin yıkımında görev almaktadır (Kutsky, 1981; Halliwell, 1994).

GSH-Px'in substratlara özgü ve farklı doku dağılımlı sitozolik GSH-Px, fosfolipit hidroperoksit GSH -Px, plazma GSH-Px ile mide ve bağırsaklarla ilgili dört farklı izoformu bulunmaktadır (Brigelius-Flohe, 1999).

GSH-Px eritrositlerde oksidan strese karşı en etkili antioksidan olup, fagositik hücrelerde solunum patlaması sırasında oluşan serbest radikal peroksidasyonundan fagositik hücrelerin zarar görmesini engellemede önemli fonksiyonlara sahiptir (Mayes, 1993).

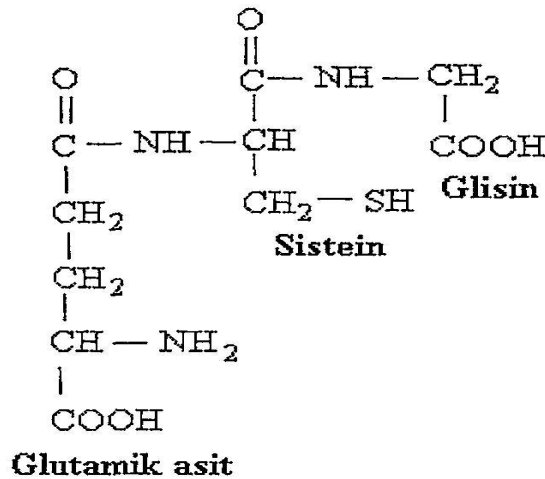
4.1.1 Glutasyon

Glutasyon peroksidaz enziminin substrat olarak kullandığı glutasyon (GSH) hemen hemen bütün canlılarda mevcut olduğu bilinen, glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan düşük molekül ağırlıklı ve serbest sülfhidril grubuna sahip önemli bir tripeptittir (Meister ve Anderson, 1983; Meister, 1994).

Maya, bakteri, bitki ve hayvan hücrelerinde çok yaygın olarak bulunan glutasyon kaslarda, karaciğerde, eritrositlerde, beyin ve böbreklerde bol miktarda bulunmaktadır (Emerk ve Onat, 1997; Champe ve Harvey, 1997).

Hücrenin yükseltgenme indirgenme dengesini koruyan önemli bir indirgen olan glutasyon proteinlerin sülfidril grubunun korunmasında, disülfüt değişim tepkimelerinde, membran boyunca aminoasit taşınmasında ayrıca eritrositlerde hemoglobinin dönüşümsüz oksidasyonunu engellemede ve bağırsaklardan demir emilimini kontrol etmede görev almaktadır (Deneke ve Fanburg, 1989; Ambrosia ve ark., 1992; Meister ve Anderson, 1983).

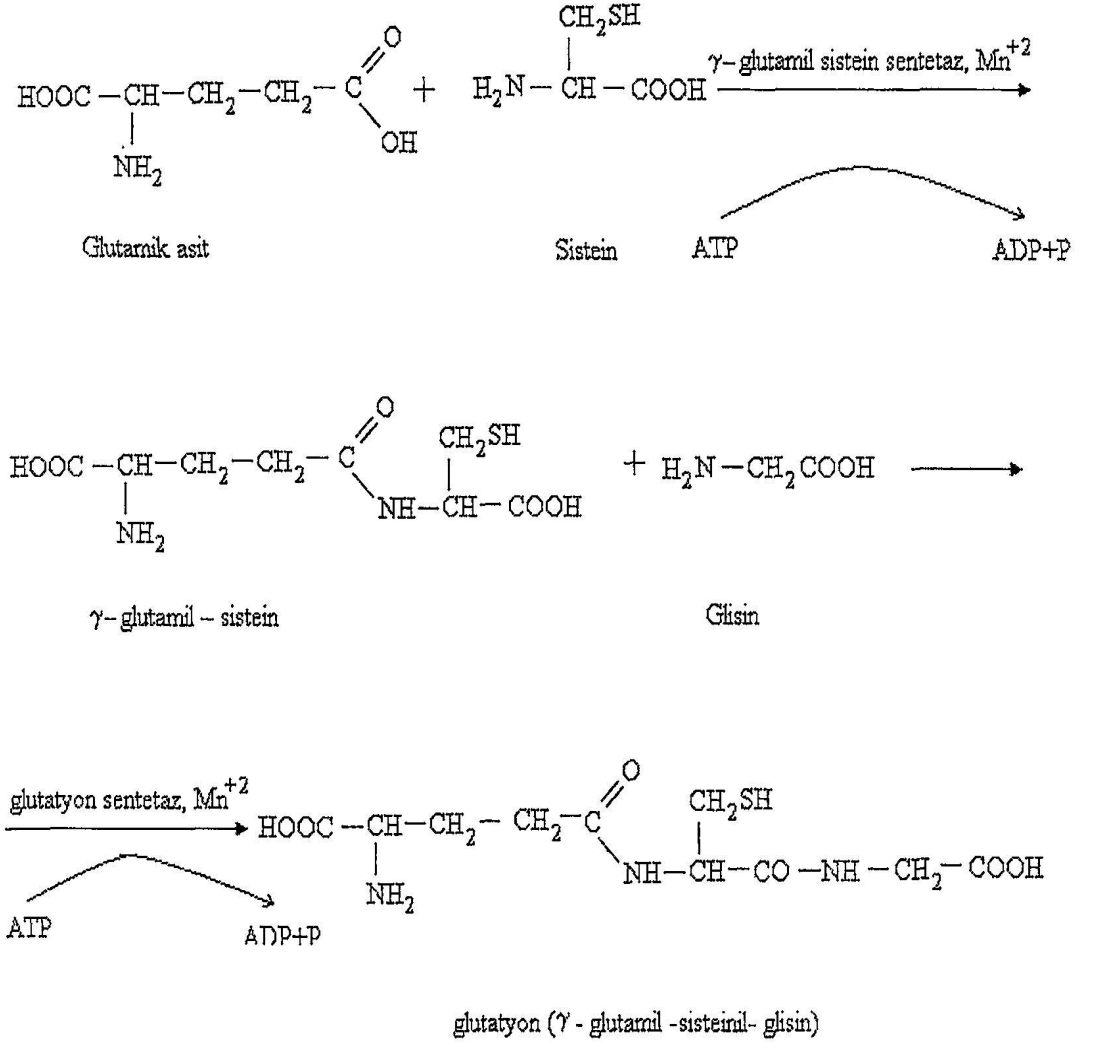
Glutasyon tüm bu hücrel fonksiyonları dışında, GSH-Px enzimi katalizörlüğünde hidrojen peroksit ve organik peroksitleri metabolize etmesiyle antioksidan olarak hücre savunmasında da önemli bir göreve sahiptir (Deneke ve Fanburg, 1989; Ambrosia ve ark, 1992; Meister ve Anderson, 1983).



Glutasyonun Yapısı

4.1.2 Glutasyon Sentezi ve Döngüsü

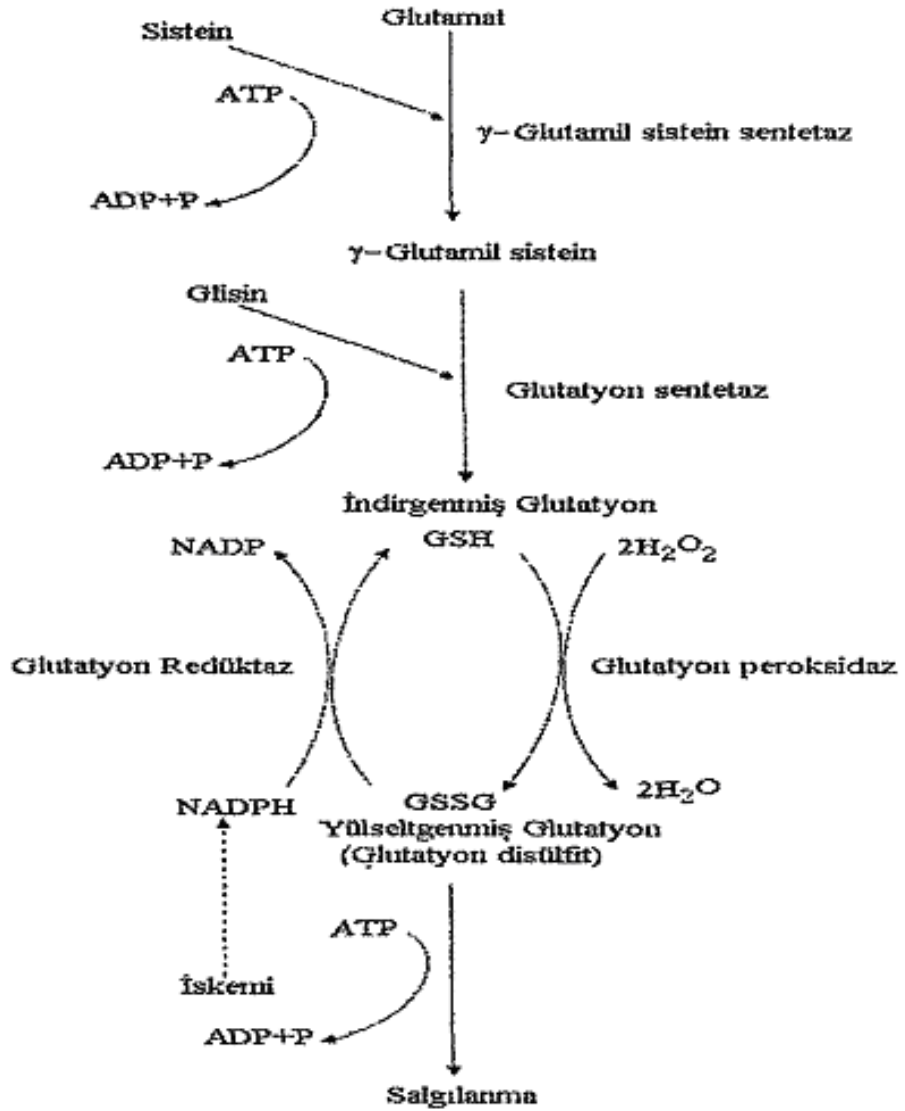
Glutasyon hayvan hücrelerinin hemen hemen hepsinde yüksek miktarda sentezlenmektedir. Bu sentez γ -glutamil sistein sentetaz enziminin GSH 'ın öncül aminoasitleri olan L-glutamat ve L-sisteinden γ -glutamil sistein oluşumunu katalizlemesi ile başlar ve glutasyon sentetaz enzimi aracılığıyla, γ -glutamil sistein ve L-glisinden glutasyon oluşumu ile sonlanır. Gerçekleşen reaksiyonlar sırasında kofaktör olarak Mn kullanılmakta ve bir molekül GSH sentezi için iki molekül ATP'nin hidrolizi gerekmektedir (Cochrane, 1991; Champe, 1997; Nural, 2005) (Şekil 4.1)



Şekil 4.1 Glutasyon sentezi

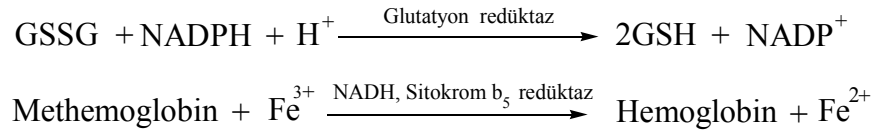
Sentezlenen glutatyon, oksidatif stres sonucu oluşan reaktif oksijen ürünlerinin hücre üzerindeki etkilerini önlemek amacıyla, glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimi katalizörlüğünde, yükseltgenmiş dimer formu GSSG'ye dönüşmektedir.

Serbest radikallerinin etkisi azaltabilmek için sürekli olarak GSH ihtiyaç duyulduğundan GSH ve GSSG arasındaki dinamik dengenin korunabilmesi gerekmektedir. Bu yüzden glutatyonun yükseltgenmiş formu (GSSG) glutatyon redüktaz enzimi aracılığıyla geri dönen bir döngü ile tekrardan glutatyon indirgenmektedir (Ambrosia ve ark., 1992; Mutah, 1990; Luberda, 2005; Zhao, 2001) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Yükseltgenmiş glutatyonun indirgenmiş glutatyona dönüşümü

Glutatyon'un yükseltgenmiş formunun indirgenmiş formuna dönüşümü, pentoz fosfat yolundan sentezlenen NADPH-H⁺ ve glutatyon redüktaz enzimi ile gerçekleşmektedir. Eritrositlerde NADPH'in tek kaynağı olan pentoz fosfat yolunun meydana gelmemesi veya yetersiz olması durumunda ise glutatyon indirgenmesi azalır. Bunun sonucunda hemoglobindeki Fe²⁺ den Fe³⁺ e yükseltgenmekte ve eritrositlerin ömrünün kısalmasına neden olan methemoglobin birikimine sebep olmaktadır (Pamuk, 2000).

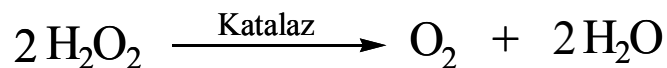


Glutatyon hücrede oluşan hidrojen peroksit ve organik peroksitleri metabolize etmede, protein yapısındaki sülfidril gruplarının korunmasında ve hemoglobin, membran proteinleri ile enzimlerde meydana gelebilecek hasarı önlemede önemli bir role sahip olduğundan, hücre içindeki varlığı ve yeniden elde edinimi büyük önem taşımaktadır (Gözükara, 2001).

4.2 Katalaz (CAT)

Bir hem protein olan (protoporfirin IX halkası içeren) katalaz, hidrojen akseptörü olan hidrojen peroksiti substrat olarak kullanır. Katalazın mikroorganizmalarda ve hemen bütün hayvan hücrelerinde katalitik aktivitesi mevcuttur ve mol kütlesi 250000 dalton olup, dört eşit büyüklükte alt birimi bulunmaktadır. Aminoasit sırası tayin edilmiş olup, optimum pH'ı 7, izoelektrik noktası 5.4 'tür. Aktivatör ve kofaktöre ihtiyacı bulunmamaktadır (Valentina, 1964)

Katalaz, hücrede oluşan süperoksit radikalinin süperoksit dismutaz enzimi yıkımı ile ortaya çıkan hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene dismutasyonunu katalizler.



Katalaz esas olarak peroksizomlarda olmak üzere endoplazmik retikulum ve sitozolde yoğun olarak bulunmaktadır. Özellikle karaciğer, böbrek, miyokard, çizgili kaslar ve eritrositlerde yüksek aktiviteye rastlanır (Akkuş, 1995).

Ayrıca katalaz'ın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit ve metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşı olup büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine etki etmemektedir (Jenkins ve Tengi, 1981).

5 AĞIR METALLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Metaller içerisinde özgül ağırlığı 5 g/cm 'den büyük ve atom numarası 22'den 92'ye kadar olan elementler ağır metal olarak tanımlanır. Bazı ağır metallerin belirli derişim aralıklarında alınımı organizmanın sağlıklı büyümesi ve gelişmesi için gerekli iken bazı ağır metaller ise metabolizma için gerekli olmadığı gibi hücrede toksik etkiye neden olabilir (Förstner ve Wittmann, 1981).

Canlılarda ağır metaller 3 ana gruba ayrılabilir.

1. Organizma için gerekli olan ağır metaller,
Co, Cr, Cu, F, Fe, I, Mn, Se ve Zn.
2. Tedavi amaçlı olarak kullanılabilen ancak gerekli olmayan ağır metaller,
Al, Au, Bi, Li, Ga ve Pt.
3. Organizma için toksik elementler,
Pb, Cd, Ag, Ni, As, Hg, Sb, Te ve Ti' dir.

Son yıllarda tarımsal üretim ve endüstrideki gelişmeler (çimento üretimi, demir çelik sanayi, termik santraller, cam üretimi, çöp ve atık çamur yakma tesisleri gibi) sonucu büyük ölçüde çevre kirliliğine neden olan ağır metaller, özellikle alıcı ve uzaklaştırıcı ortamlar olarak görülen tatlı su sistemlerine bırakılmaktadır. Bu ise sulardaki inorganik kirlenmenin en önemli kaynağını oluşturmaktadır. Ağır metallerin sudaki birikimi; erozyonla taşınan kaya parçalarından, rüzgarın taşıdığı tozdan, volkanik aktivitelerden, ormanların yanmasından, bitki örtüsünden, kentsel bölgelerde insan atıklarından kaynaklanabildiği gibi atmosferde bulunan kimyasal kirleticilerin rüzgar ve yağışlarla su ortamına geçmesinden de oluşabilmektedir (Fergusson, 1990).

Suların kirlenmesi oksijen miktarının azalmasına, bakterilerin, organik maddelerin, metal tuzlarının ve toksik etkili maddelerin artmasına neden olduğundan sucul ortamda yaşayan canlı organizmaların yaşamlarını tehdit etmektedir (Arda, 1974).

Su içinde yaşayan organizmaların yaşamlarını sürdürebilmeleri için düşük derişimlerde dahi Fe, Mn, Cu, Zn, Co, Cr, Ni, Se ve V gibi eser elementlerden mutlaka almaları gerekmektedir. Bu elementler organizmada organik moleküllerle ve proteinlerle birleşerek metal–protein komplekslerini oluşturmakta ayrıca birçok enzimin de yapısına katılmaktadır. Ancak özellikle Hg, Cd, Pb, Au ve Ag gibi ağır metaller su içinde yaşayan canlıların metabolizması için gerekli olmamakla birlikte doğal fizyolojik mekanizmalarla atılamadıkları için birikmekte ve toksik etki göstermektedirler (Rainbow, 1985).

Ağır metallerin, su içinde yaşayan canlı organizmalara toksik etkisi ve birikimi metalin türü ve derişimine, suyun; sıcaklığı, oksijen miktarı, sertliği, organik bileşimi, pH değerine, maruz kalan canlının; genel fizyolojik davranışına, yaşına, spesifik ve mevsimsel değişebilirliğine ve beslenme alışkanlığına bağlı olarak değişebilmektedir (Çalta ve Girgin, 1998; Förstner ve Wittmann, 1981).

Ağır metaller beslenme zinciriyle, ya doğrudan planktonlarla ya da su ortamındaki diğer tüketici organizmalarla balıklara geçmekte ve her bir tür aynı zamanda bir alt kademeden aldığı ağır metali biriktirmektedir (Merlini, 1971). Bu ağır metallerin organizmalara toksik etkileri, metabolik döngü için gerekli olan metallere benzer kimyasal özellik göstermesi nedeniyle bu metallerin yerine geçmesi ve metabolik döngüyü engellemesinden kaynaklanmaktadır (Rainbow, 1985).

Balıklar vücutları içerisine ağır metal alımını üç şekilde gerçekleştirirler. Ağır metallere karşı geçirgen olmayan ve en az ağır metal absorpsiyonunun gözlendiği vücut yüzeyinden, alımın şekli nedeniyle en fazla zehirlenmelerin görüldüğü sindirim sisteminden ve en fazla ağır metal absorpsiyonunun gözlendiği solungaçlarından vücut içerisine iz elementler absorbe olmaktadır. Absorbe olan bu iz elementler solungaçlardan ve bağırsaklardan kana transfer edilip vücutun tüm bölgelerine dağılmaktadır (Heath, 1987; Dökmeci, 1988).

Sonuç olarak ağır metale maruz kalan balıklarda; yüzme bozuklukları, anemi, iç organlarda fonksiyon bozuklukları, kısırılık, solunum güçlüğü, iyon dengesinde bozulma, omurgada deformasyonlar, yüksek derişimlerde yoğun balık ölümleri, düşük derişimlerde ise yavaş büyüme gibi etkiler gözlenebilir (Çalta ve Girgin, 1998).

5.1 Kadmiyum

İlk defa 1817 yılında Friedrich Stromeyer tarafından keşfedilen kadmiyum, çinko ve kurşun üretimi sırasında ara madde olarak elde edilmektedir. Doğada serbest olarak çok az bulunan kadmiyum genellikle sarı renkli kadmiyum sülfür (CdS) şeklinde çinko filizi ile birlikte bulunmaktadır (Dökmeci, 2001).

Kadmiyum günümüzde pek çok alanda kullanılmaktadır. Endüstride nikel/kadmiyum pillerde, elektrikli kaplama işlerinde, çeşitli metallere (nikel, gümüş, bakır) alaşım oluşturulmasında, cam sanayisinde boya ve pigmentlerin üretiminde (CdS sarı pigment olarak kullanılır), nükleer reaktörlerde nötron tutucu olarak, kuru bataryalarda katot olarak, korozyona karşı özellikle denizel koşullara dayanıklı olması nedeniyle gemi sanayinde ve uçak sanayinin çeşitli kollarında kullanılmaktadır (Sastry ve Subhadra, 1985).

Kadmiyum ağır metaller içerisinde suda çözünme özelliği en yüksek element olup bu özelliğinden ötürü bitki ve hayvanlar tarafından biyolojik sistemlere alınmaktadır. Organizmalar için herhangi bir işlevi bulunmayan kadmiyum su ve besin yoluyla balıklar tarafından alınmakta ve dokularında birikime neden olmaktadır. Balık dokularında kadmiyum birikimi ile ilgili yapılan araştırmalar sonucunda birikimin böbrek karaciğer ve solungaç dokusunda daha fazla olduğu ve birikimin alınan kaynağa göre değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir (Kargın, 1996; Cinier ve ark., 1999; Mcgeer ve ark., 2000). Kalsiyuma benzer özellik gösteren kadmiyum balıklarda genellikle solungaçlarla vücut içerisine alınmaktadır.

Kadmiyum, balıklarda genellikle solungaçlarla alındığı (Woo ve ark., 1993) ve solungaçlardaki kalsiyum taşıyıcı klor hücrelerinin kadmiyum için önemli alım yerleri oldukları belirtilmiştir (Verbost ve ark., 1987, 1989).

Kadmiyumun vücutta serbest radikallere karşı koruma sağlayan tiyoller ya da enzimlerle reaksiyona girerek serbest radikal toksisitesine neden olduğu bilinmektedir (Kakkar ve Jaffery, 2005).

Kadmiyum düşük derişimlerde dahi balıklar üzerinde toksik etkili olabilmekte ve solunumda aksaklıklara, (De Smet ve Blust., 2001) doku harabiyetine, iyon düzeyinde bozukluklara (Torre ve ark., 2000) endokrin sisteminde çeşitli aksaklıklara (Suresh ve ark., 1993) neden olabilmektedir. Ayrıca balıklarda stresin göstergesi olarak kabul edilen kortizol ve glukoz gibi kan parametrelerinde de değişiklikler gözlenmektedir (Chowdhury ve ark., 2004).

6. ANTIOKSİDAN ESER ELEMENT OLAN SELENYUMUN BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ

İlk kez 1818 yılında İsveç'li kimyacı Berzelius tarafından sülfürik artıklarında keşfedilen selenyum, insan ve hayvan organizmalarının normal gelişmesi için düşük derişimlerde bile olsa gerekli olan esansiyel iz elementlerinden biridir (Raymond, 1986; Oldfield, 1987; Diken ve ark., 1994). Periyodik çizelgede VI A grubunda bulunan selenyum, sülfür ile tellurium arasında ve periyodik tablonun 4. periyodunda arsenik ve brom arasında yer almaktadır. Atom numarası 34, Atom ağırlığı 78.96 gr/mol, erime sıcaklığı 217 °C, kaynama sıcaklığı 684,9 °C ve yoğunluğu 4,79 g cm⁻³ olan selenyum doğada 74, 76, 78, 80 ve 82 kütle numaralı izotopları halinde bulunmakta ve yerkabuğunun % 10⁻⁷ sini (milyarda birini) oluşturmaktadır (Özer ve ark., 1987).

Önemli bir antioksidan olan selenyumun, düşük miktarlardaki varlığı hücreleri ve dokuları oksidatif stres sonucu oluşabilecek hasarlara karşı korurken, yüksek miktarlarda alındığında toksik etkilere neden olmaktadır (Rayman, 2000). 1957 yılında Fortz tarafından karaciğer dejenerasyonunun oluşmasında selenyum eksikliğinin rol oynadığının keşfedilmesi, uzun süre toksik madde olarak kabul edilen selenyumun canlı organizması için gerekli bir element olduğunun kabul edilmesini sağlamıştır (Combs, 1986).

Selenyum; selenosistein, selenometiyonin, dimetilselenit gibi aminoasitlere bağlı metile formları şeklinde organik yapıda bulunurken sodyum selenat ve sodyum selenit gibi inorganik formda da bulunmaktadır (Sasakura ve Suzuki, 1998; Suzuki ve Ogra, 1999). İnsanda ortalama vücut selenyum düzeyi 14.6 mg olup karaciğer, böbrek ve dalakta yüksek derişimlerde mevcuttur (Dökmeci, 2001). Normal yetişkin bir insanda selenyum derişimleri kanda 57-340 µg/L; serum ya da plazmada 78-320 µg/L; idrarda 5-100 µg/L; saçta 0,6-2,6 µg/g olduğu belirlenmiştir (Özer ve ark., 1987).

İnsanlar ve hayvanlar için gerekli temel eser bir element olan selenyumun önemi glutatyon peroksidaz enzimidaki rolünden kaynaklanmaktadır. GSH-Px karaciğer, iskelet ve kalp kasları, alyuvarlar, böbrekler, damar endoteli ve hücre zar metabolizmasında önemli görevlere sahip olup enzimin en önemli fizyolojik görevi hidrojenperoksit ve organik hidroperoksitlerin redüksiyonunu katalize

ederek oksidatif stres sonucu oluşan radikallerin yıkıcı etkisinden hücreyi korumaktır (Deaton ve Marlin, 2003; Karakılıçık ve Aksakal, 1993).

Ayrıca selenoproteinlerin keşfi ile selenyumun sadece bir antioksidan olarak görev almadığı memeli metabolizmasının birçok kısmında önemli görevlere sahip olduğu bulunmuştur. Selenyumun, mide bağırsak kanalından lipitlerin ve tokoferollerin normal absorpsiyonunun sağlanmasından sorumlu olan pankreas lipazının üretiminde etkili olduğu bilinmektedir. Bunun yanısıra selenyum pankreasın normal yapısı için gerekli olduğu ve antioksidan bir etken olan E vitamini taşıyıcısı görevi yaparak tokoferollerin bozulmasının önlenmesinde, emiliminde ve dolayısıyla E vitamininin biyolojik aktivitesinin artmasında etkilidir. Ayrıca E vitamini ile birlikte bağışıklık sistemini güçlendirdiği de bilinir (Church ve Pond, 1982; Körner ve Völm, 1976; Desai ve Scott, 1965; Oldfield, 1987).

Selenyumun kanser ile ilişkisinin araştırılması sonucunda ise, belirli bazı kanserojen aktif metabolitlerin detoksifikasyonunu sağladığı yani antikanserojenik özelliği olduğu öne sürülmüştür. Hayvanlarla yapılan çalışmalarda 1-4 ppm selenyumun besinlere eklenmesiyle kanser oranlarında düşme gözlenmiştir. Ayrıca besinlerine selenyum ilave edilmiş olan insanların %63 daha az prostat kanseri, %58 daha az bağırsak kanseri, %46 daha az akciğer kanseri ve %37 daha az bütün kanserlere yakalandığı tespit edilmiştir (Higdon, 2001)

Metabolizma içerisinde bir çok önemli göreve sahip olan selenyumun eksikliğinde, türe, yaşa ve beslenme alışkanlığına bağlı olarak büyüme geriliği, kas ve özellikle kalp kası bozukluğu, karaciğer bozuklukları, pankreas liflenmesi ve tiroid hormon fonksiyonunda zayıflama gibi etkilere sahipken, fazla miktarda alınması ise toksik etkilere neden olmakta ve saç tırnak ve deride olumsuz etkileri olduğu bildirilmektedir (Özer ve ark., 1987).

Ayrıca biyokimyasal özellikleri açısından sülfüre çok benzeyen selenyumun fazla miktarlarda alınması, hücrelerin protein sentezi sırasında sülfür ve selenyum arasında ayırım yapamamasına ve sülfürün yerine selenyumun geçmesine neden olmaktadır. Bu oluşum, proteinlerin üç'lü (heliks) yapılarını oluşturmaları için gerekli olan sülfür-sülfür bağlarının meydana gelmesini engellemekte ve sonuçta uygunsuz ve fonksiyonsuz protein ya da enzimler oluşmaktadır (Lemly, 1997)

7 MATERYAL VE METOT

7.1 Balıkların Kaplıcadan Laboratuvara Taşınması

Araştırma materyali olarak kullanılan *Cyprinion macrastomus* ve *Garra rufa obtusa* Sivas ilinin Kangal ilçesinde bulunan kaplıca havuzlarından temin edildi. Kaplıca havuzlarından büyük kepçeler kullanılarak yakalanan balıklar, içerisinde kaplıca suyu bulunan ve sürekli hava motoru ile havalandırılan ağzı açık kaplar içerisine yerleştirildi. Yaklaşık bir buçuk saatlik seyahat süresinde hava oksijeni yeterli olmadığı için bu sürede balıklara oksijen tüpü kullanılarak saf oksijen verildi ve sağlıklı bir şekilde laboratuvara ulaştırılması sağlandı. Ayrıca balıklarla birlikte bol miktarda kaplıca suyu da getirildi. Balıklar kaplıca suyu ile doldurulan ve termostat ile sıcaklığı yaklaşık 32-34°C ye ayarlanan, içerisinde hava motoru, kum, filtre ve termometre olan 50 litre hacmindeki (65x33x23cm) akvaryumlara yerleştirildi. Balıklar günde bir kez Has ordövr balık yemi ile beslendi. Balıkların ortama adaptasyonunu sağlamak amacıyla bir hafta herhangi bir stres faktörü uygulanmadı. Bir haftalık süre sonrasında balıklara ağır metal etkisi, pH etkisi, selenyum etkisi, sıcaklık etkisi, oksijen eksikliği, açlık etkisi, gibi stres faktörleri uygulandı. Stres uygulanmayan balıklar ise kontrol grubu olarak kullanıldı. Deneyde kullanılan balıklar yaklaşık 4-8 cm uzunluğunda küçük balıklar oldukları için çalışılırken her boyda balıkların kullanılmasına dikkat edildi ve her bir çalışmada iki tür balıktan yaklaşık onbeş adet kullanıldı.



Şekil 7.1 Balıkların akvaryumdan görünüşü

7.2 Stres Kaynaklarının Uygulanması

7.2.1 Ağır Metal Etkisi

Stres verebilmek için 24 litre hacimli (50x18,5x26cm) küçük akvaryum kullanıldı. Akvaryumun hava motoru, kumu, filtresi ve termometresi tam olarak kurulduktan sonra kaplıca suyu ile doldurularak sıcaklık 32°C sıcaklığa geldiğinde balıklar bu akvaryuma alındı. Balıkların akvaryum suyuna ağır metal katıldı. Bu amaçla ağır metal olarak Cd(NO₃) çözeltisi kullanıldı. Toplam 6,0 ppm Cd(NO₃) olacak şekilde kademeli bir şekilde ağır metal çözeltisi akvaryuma eklendi ve karıştırıldı. Bir hafta boyunca bu balıklar günde bir kez beslendi. Dayanıksız olanlar öldüler. Bir hafta sonunda kalan balıklar 100 mg/L MS222 (Tricaine Methane Sulfonate) kullanılarak anesteziyle öldürüldü. Balıklar daha sonra homojenizasyon işleminde kullanılmak üzere -20 °C sıcaklıkta saklandı.

7.2.2 pH etkisi:

Küçük akvaryum tek distile su ile dolduruldu. Akvaryumun hava motoru, kumu, filtresi ve termometresi tam olarak kurulduktan sonra sıcaklık 32°C sıcaklığa geldiğinde balıklar bu akvaryuma alındı. Suyun pH'ı 1.0 M HCl ile yavaş yavaş 4,0'e düşürüldü. Zamanla pH 6,0'ya çıktığı gözlemlendi. Günde dört kez yükselen pH'ın düşürülme işlemi yinelenildi. Bazı balıkların hareketlerinde yavaşlama gözlemlendi, bazıları öldüler. Beş gün sonra kalan balıklar anestezi ile öldürüldü. Balıklar daha sonra homojenizasyon işleminde kullanılmak üzere -20 °C sıcaklıkta saklandı.

7.2.3 Selenyum Etkisi:

Küçük akvaryum tek distile su ile dolduruldu. Akvaryumun hava motoru, kumu, filtresi ve termometresi tam olarak kurulduktan sonra sıcaklık 32°C sıcaklığa geldiğinde balıklar bu akvaryuma alındı. 500 ppm sodyum selenit (Na₂SeO₃) stok çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltilerden akvaryum suyuna her gün artan miktarda günde bir defa son derişim 100 ppm olacak şekilde (1, 2, 3, 5, 20 ve 100 ppm) sodyum selenit çözeltisi eklendi. Altıncı günde toplam 100 ppm sodyum selenit derişiminde balıkların sersemledikleri gözlemlendi. Altıncı günün sonunda kalan balıklar anestezi ile öldürüldü. Balıklar daha sonra homojenizasyon işleminde kullanılmak üzere -20 °C sıcaklıkta saklandı.

7.2.4 Sıcaklık Etkisi:

Küçük akvaryum kaplıca suyu ile dolduruldu. Akvaryumun hava motoru, kumu, filtresi ve termometresi tam olarak kurulduktan sonra termostat çalıştırılmadı. Akvaryum sıcaklığı 18°C olarak ölçüldü. Daha sonra balıklar akvaryuma alındı ve bir gün 18°C sıcaklıkta bırakıldıktan sonra termostat çalıştırılıp sıcaklık her gün iki derece santigrat artırıldı. On günde sıcaklık 38–40 °C'a kadar çıkarıldı. Bu sıcaklıktan sonra balıkların hareketlerinde yavaşlama gözlenirken, bazılarının ise öldüğü görüldü. Onuncu günün sonunda kalan balıklar anestezi ile öldürüldü. Balıklar daha sonra homojenizasyon işleminde kullanılmak üzere -20 °C sıcaklıkta saklandı.

7.2.5 Oksijen Eksikliği:

Küçük akvaryum kaplıca suyu ile dolduruldu. Akvaryuma kum, filtre, termometre ve termostat yerleştirildi. Hava motoru kurulmadı. Sıcaklık 32°C sıcaklığa geldiğinde balıklar bu akvaryuma alındı ve beslendiler. Akvaryumun kapağı sıkı kapatılarak hava girişi önlendi. Akşama doğru oksijen yetersizliğinden hareketleri yavaşladı. Balıklar ölmek üzereyken aynı gün anestezi ile öldürüldü ve homojenizasyon işleminde kullanılmak üzere -20 °C sıcaklıkta saklandı.

7.2.6 Besin Eksikliği:

Akvaryumun hava motoru, kumu, filtresi ve termometresi tam olarak kurulduktan sonra kaplıca suyu ile doldurulup sıcaklık 32°C sıcaklığa geldiğinde balıklar bu akvaryuma alındı. Balıklar beslenmedi. Filtreleri haftada iki kere temizlendi. Balıkların açlığa dayanıklı olduğu gözlemlendi. Bir ay balıklar beslenmeden yaşadılar, daha da yaşayabilecek gözükmekteydiler. Bu süreç içerisinde farklı günlerde gece ölen iki balığı yedikleri gözlemlendi. Diğer ölen birkaç balık ise yememeleri için hemen akvaryumdan çıkarıldı. Bir ay sonra herhangi bir olumsuzluk olmamasına rağmen balıklar anestezi ile öldürülüp işlem sonlandırıldı. Balıklar homojenizasyon işleminde kullanılmak üzere -20 °C sıcaklıkta saklandı.

7.3 Balıkların Homojenizasyon İşlemine Hazırlanması

Ağır metal, pH, selenyum, sıcaklık, oksijen eksikliği, besin eksikliği etkilerinin sonucunda -20 °C sıcaklıkta saklanan balıklar çözündürüldükten sonra buz üzerinde steril bir bisturi kullanılarak yüzgeç, kuyruk ve baş kısımları ayrıldı. Karınları açılarak iç organları çıkarılıp, kasları küçük parçacıklar haline getirildi ve örnekler tartıldı. Herhangi bir aktivite kaybına sebebiyet vermemek için bütün işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi.

Balık kaslarının homojenize edilmesi;

Küçük parçalara ayrılan balıkların kasları önce 1/1 (w/v) oranında serum fizyolojik (% 0,9 NaCl) ile üç kez yıkandı. Yıkanan balık kasları üzerine 1/1 (w/v) oranında Tris tamponu (10 mmolL⁻¹ Tris-HCl, pH =7,5, 10 mmolL⁻¹ NaCl, 0,1 mmol L⁻¹ EDTA, 1mmolL⁻¹ PMSF) eklenerek bir kez daha yıkama işlemi gerçekleştirildi (Sean ve Gretchen, 2001). Üzerine tekrar 1/1 (w/v) oranında Tris tamponu eklenerek buz üzerinde Ultra Turrax homojenizatörü kullanılarak 9500-13500 (devir dk⁻¹) aralığında 5 dakika homojenize edilmesi ile hücrelerin parçalanması sağlandı. Homojenize edilen örnekler Eppendorf –Cantrifüj 5810R soğutmalı santrifüj cihazında 4 °C sıcaklıkta 12000 rpm’de, 30 dakika santrifürüj edildi ve elde edilen süpernatantlar dekantasyonla ayrılıp steril edilmiş hacmi 1.5 ml olan eppendorf tüpler içerisine paylaştırıldı. Enzim aktivitelerinin araştırılması amacıyla süpernatantlar -20 °C sıcaklıkta derin dondurucuda saklandı.



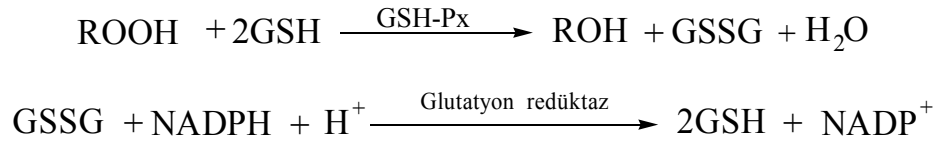
Şekil 7.2 Homojenizasyon işlemine kullanılan *Cyprinion macrastomus*

7.4 Enzim Aktivite Tayinleri

7.4.1 Glutasyon peroksidaz aktivitesinin tayini

Elektron kaynağı olarak glutasyonu kullanarak hidrojen peroksit ve organik hidroperoksitlerin redüksiyonunu katalizleyen glutasyon peroksidaz aktivitesi “GSH-Px Assay Kit (Cayman)” kullanılarak belirlendi.

Glutasyon peroksidaz aktivitesinin saptanmasında kullanılan yöntem, GSH-Px enziminin iki adet tiyol grubu ihtiva eden glutasyonu, glutasyon disülfite yükseltgerken organik hidroperoksitleri ve H₂O₂ ‘i indirgemesi ve oluşan okside glutasyonun nikotin adenin dinükleotid fosfat hidrojen (NADPH) ve glutasyon redüktaz enzimi ile yeniden indirgen forma dönüştürülmesi ilkesine dayanır.



NADPH’ın NADP⁺’ya oksidasyonu spektrofotometrede 340 nm’deki absorbans düşüşü ile belirlenmektedir. Asidik koşullar altında GSH-Px aktivitesi hız sınırlayıcı basamağı oluşturmakta ve 340 nm’deki absorbans düşmesi doğrudan örnekteki GSH-Px aktivitesi ile orantılı olarak değişmektedir. GSH-Px Assay Kit’i (Cayman) kullanılarak plazma, eritrosit, doku ve hücrelerdeki tüm glutasyon bağımlı peroksidazların aktivitesi ölçülebilmektedir (Ursini ve ark.1985; Forstrom ve ark. 1978, Paglia ve Valentine, 1967).

Kullanılan kit çözeltileri :

- 5 mM EDTA içeren 50 mM Tris-HCl (pH: 7,0) tamponu,
- Kontrol için glutasyon peroksidaz enzimi,
- NADPH, glutasyon ve glutasyon redüktaz içeren kosubstrat karışımı,
- Kümen hidroperoksit çözeltisi

	<u>Kör</u>	<u>Pozitif Kontrol</u>	<u>Örnek</u>
Tampon	600µL	500µL	550µL
Co-substrat	250 µL	250 µL	250 µL
GSH-Px	---	100 µL	50 µL homojenat
Kümen-peroksit	100 µL	100 µL	100 µL

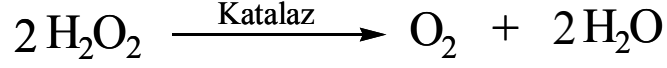
Kör, pozitif kontrol ve örnek tüpleri yukarıda belirtildiği gibi hazırlandı. Kümen hidroperoksit çözeltisi eklenir eklenmez Shimadzu UV/VIS-1201 spektrofotometrede 340 nm'de dakikadaki soğurumları ölçülerek glutatyon peroksidaz aktivitesi belirlendi. Glutatyon peroksidaz enzim aktivite ölçüm işlemi her bir örnek için üç kez tekrarlandı. Zamana karşı absorbans grafiğinin doğrusal kısmından $\Delta A/\Delta T$ değeri belirlenip aşağıdaki formülden aktivite hesaplandı.

GSH-Px aktivitesi ($\mu\text{mol} / \text{mg protein.dk}$)

$$= \frac{\Delta A_{340} / dk \times 0,950mL}{0,00622M^{-1} \times 0.1 mL (\text{örnek hacmi}) \times C \text{ protein } (mgml^{-1})} \times \text{seyrelme faktörü}$$

7.4.2 Katalaz (CAT) aktivitesinin tayini

Serbest katalaz aktivitesinin saptanmasında kullanılan yöntem hidrojen peroksitin aşağıdaki tepkimeye göre parçalanmasının 240 nm dalga boyunda spektrofotometrede izleme ilkesine dayanır.



Başlangıç hızının doğrusal kesiminden dakikadaki soğurum değişimi ΔA bulunarak aşağıdaki formülden özgül aktivite hesaplanır.

$$\text{Özgül aktivite} = \frac{V_{\text{toplaml}} \cdot \Delta A}{\varepsilon \cdot d \cdot C_p \cdot V_e \cdot \Delta T}$$

Fosfat tamponunda (50mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH:7) hazırlanan 10 mM H_2O_2 çözeltisinden 2.9 mL alınarak içerisine tris tamponunda hazırlanmış homojenatdan 0.1 mL katılarak tepkime başlatıldı. Shimadzu UV spektrofotometre de 240 nm' deki soğurum değeri 10 saniye aralıkla okundu. Tepkime 2 dakika izlenerek zamana karşı optik dansite (soğurum) grafiğinin doğrusal kısmından $\Delta A/\Delta T$ değerleri belirlenip özgül aktivite hesaplandı. İşlemler üç kez tekrarlandı (Aebi, 1981).

V_t : Toplam hacim (3 mL)

V_e : Enzim hacmi (0.1 mL)

d : Küvet kalınlığı (1 cm)

C_p : Protein derişimi (mg protein mL^{-1})

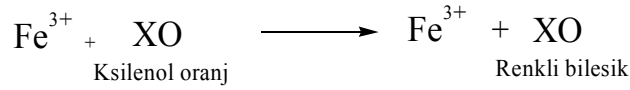
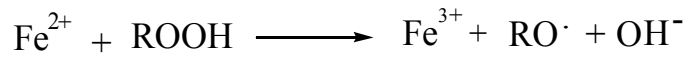
ε : Molar soğurum katsayısı ($0.040 \text{ cm}^2 \mu \text{mol}^{-1}$)(Tijssen,1985)

Protein tayini: Protein miktarı Bradford metoduna göre hazır reaktif çözelti (Bioguant) kullanılarak belirlendi. Örnek çözetisinden 50 μL alınarak üzerine 2.5 mL bioguant reaktif çözeltisi eklenerek iki dakika beklenip köre karşı 595 nm' de soğurum ölçüldü. Protein standart eğrisi bir seri albümin çözeltisi kullanılarak çizildi ve protein derişimleri saptandı (Bradford, 1976).

7.4.3 Lipit Peroksidasyonu ve Çözünür Peroksit Tayini

Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı olarak bilinen ve oksidatif stresin bir göstergesi olarak kabul edilen lipid peroksidasyonu ve çözünür peroksit miktarı “peroksi tayin kiti (Sigma)” kullanılarak gerçekleştirildi.

Lipid peroksidasyonu ve çözünür peroksit miktarının saptamasında kullanılan yöntem, peroksitlerin asidik ortamda Fe^{2+} iyonunu Fe^{3+} iyonuna yükseltgenmesine, oluşan Fe^{3+} iyonunun ksilenol oranj tepkimeye girmesi ve meydana gelen renkli bileşiğin 560 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmesi ilkesine dayanır (Nouroozzadeh ve ark, 1994).



Standart eğri çizebilmek için 200 μ M t-butil hidroperoksit standart çözeltisinden artan derişimlerde çözeltiler aşağıdaki gibi hazırlandı.

<u>200 μM t-BuOOH (μL)</u>	<u>Methonal (μL)</u>
0	100
5	95
10	90
20	80
40	60
60	40
80	20

Hazırlanan standart çözeltilerinden 100 μ L alınarak üzerine 1,0 mL çalışma reaktifinden eklenip karıştırıldı. Renkli kompleks oluşması için 30 dk oda sıcaklığında bekletilip Shimadzu UV spektrofotometre de 560 nm'deki soğurumlar ölçüldü. Ölçülen soğurum değerlerinden çizilen standart eğriden [A_{560} (1 nmol peroksit)] değeri belirlendi.

100 µL örnek çözeltileri üzerine 1,0 mL çalışma reaktifinden eklenerek 30 dk oda sıcaklığında bekletilip Shimadzu UV spektrofotometre de 560 nm'deki soğurumlar ölçüldü. İşlemler üç kez tekrarlandı ve aşağıdaki formül kullanılarak mililitredeki nmol peroksit miktarı hesaplandı.

$$\text{nmol peroksit / mL} = \frac{[(A_{560}(\text{Örnek}) - A_{560}(\text{kör})) \times \text{seyrelme faktörü}]}{[A_{560}(1 \text{ nmol peroksit})] \times \text{örnekhacmi}}$$

7.5 Verilerin İstatistiksel Analizi

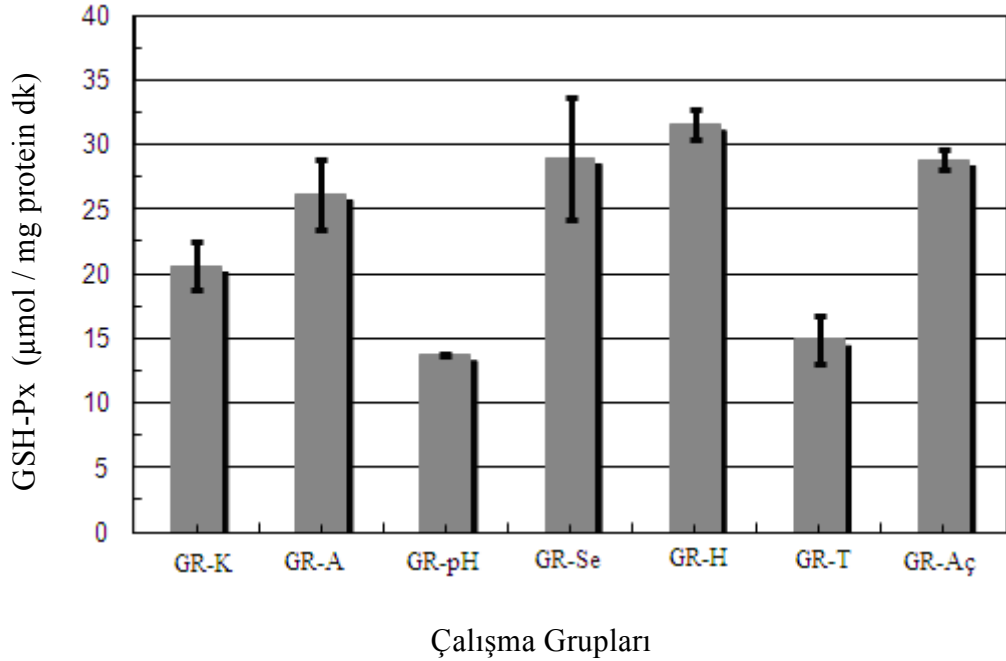
Kas dokusunda glutatyon peroksidaz, katalaz enzim aktiviteleri ve lipid peroksidasyonu düzeyinin istatistiksel olarak belirlenmesi amacıyla verilerin değerlendirilmesinde Kruskal Wallis Testi ve Mann Whitney U Testi uygulandı. Çalışmanın verileri SPSS (Ver:14) programı ile incelendi. Elde edilen veriler tabloda aritmetik ortalama \pm standart sapma şeklinde belirtilip yanılma düzeyi 0,05 olarak alındı.

8 BULGULAR

8.1 Enzim Aktivite Sonuçları

8.1.1 Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesi

Hücrede hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu olan glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enziminin aktivitesindeki değişiklikleri araştırmak üzere, *Cyprinion macrotomus* ve *Garra rufa obtusa* balıklarına farklı stres kaynakları (pH, ağır metal, selenyum, sıcaklık, oksijen eksikliği, besin eksikliği) uygulanarak kas dokusundaki enzim aktivite değerleri belirlendi ve elde edilen veriler grafiğe geçirildi.

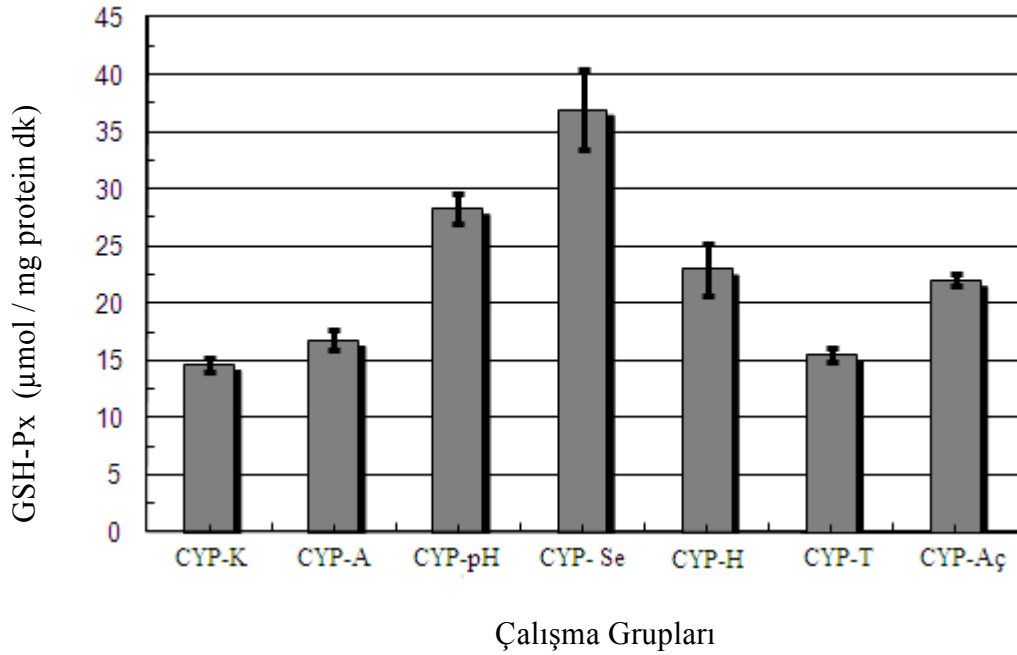


Şekil 8.1 Çeşitli stres kaynaklarının uygulanması sonucu *Garra rufa obtusa* balıklarının kas dokularındaki GSH-Px aktiviteleri

Şekil 8.1’de farklı stres kaynaklarına maruz kalan *Garra rufa obtusa* balıklarının glutasyon peroksidaz aktivitesindeki değişiklikler kontrol grubu ile birlikte verilmiştir. Şekil 8.1’e göre çalışma grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; ağır metal grubunda % 27.0, selenyum grubunda %40.0, hipoksi grubunda %53, besin eksikliği grubunda %39.8 artma gözlenirken, pH grubunda %33.4, sıcaklık grubunda %27.7 azalma gözlenmiştir. Çalışma grupları aktivite sonuçları ile kontrol grubu tek tek karşılaştırıldığında GSH-Px enziminin aktivitesindeki değişimlerin hepsinin istatistiksel açıdan önemli olduğu gözlenmiştir ($p < 0.05$).

Çizelge 8.1 *Garra rufa obtusa* balıklarında GSH-Px enzim aktivite sonuçları

	Çalışma Grupları	GSH-Px $\bar{X} \pm \text{SDS}$ ($\mu\text{mol} / \text{mg protein.dk}$)	
GR-K	GR-Kontrol	20.61 ± 1.90	$K_W: 17.53$ $P: 0.008$ $P < 0.05$
GR-A	GR-Ağır metal	26.17 ± 2.71	
GR-pH	GR- pH	13.72 ± 0.06	
GR-Se	GR-Selenyum	28.95 ± 4.75	
GR-H	GR-Hipoksi	31.53 ± 1.21	
GR-T	GR-Sıcaklık	14.90 ± 1.89	
GR-Aç	GR-Açlık	28.82 ± 0.74	



Şekil 8.2 Çeşitli stres kaynaklarının uygulanması sonucu *Cyprinion macrastomus* balıklarının kas dokularındaki GSH-Px aktiviteleri

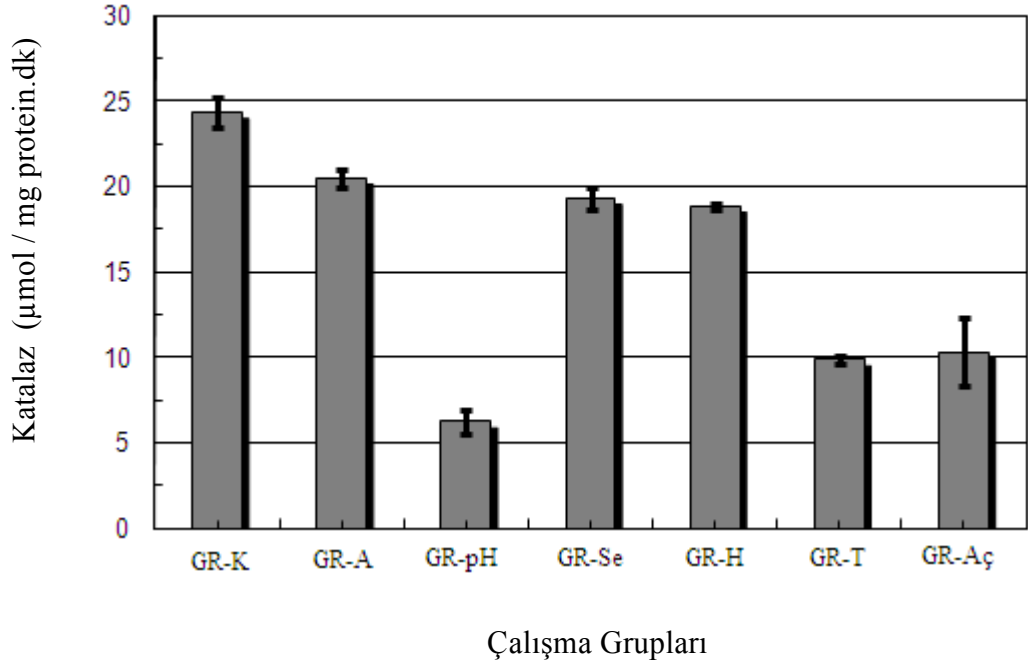
Çizelge 8.2 *Cyprinion macrastomus* balıklarında GSH-Px enzim aktivite sonuçları

	Çalışma Grupları	GSH-Px $\bar{X} \pm \text{SDS}$ ($\mu\text{mol} / \text{mg}$ protein.dk)	
CYP-K	CYP-Kontrol	14.67 ± 0.58	$K_w: 19.030$ $P: 0.04$ $P < 0.05$
CYP-A	CYP-Ağır metal	16.76 ± 0.85	
CYP- pH	CYP – pH	28.28 ± 1.24	
CYP-Se	CYP -Selenyum	36.93 ± 3.49	
CYP-H	CYP -Hipoksi	23.00 ± 2.27	
CYP-T	CYP -Sıcaklık	15.45 ± 0.64	
CYP-Aç	CYP –Açlık	22.00 ± 0.55	

Şekil 8.2’de farklı stres kaynaklarına maruz bırakılan *Cyprinion macrotomus* balıklarının glutatyon peroksidaz aktivitesindeki değişiklikler kontrol grubu ile birlikte verilmiştir. Şekil 8.2’ye göre çalışma grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; ağır metal grubunda %14.2, pH grubunda %92.7, selenyum grubunda %152, hipoksi grubunda %56.8, sıcaklık %5.3, besin eksikliğinde %50 artma gözlenmiştir. Ağır metal, pH, selenyum, oksijen eksikliği ve besin eksikliği uygulanan grupların GSH-Px enzim aktivite sonuçları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında değişikliklerin istatistiksel olarak önemli olduğu gözlenirken ($p < 0.05$), sıcaklık uygulanmış grupta bu değişimin önemli olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0.05$).

8.1.2 Katalaz (CAT) aktivitesi

Hücrede hidrojen peroksidin (H_2O_2) suya ve oksijene dismutasyonunu katalizleyen katalaz enzim aktivitesindeki değişiklikleri araştırmak üzere, *Cyprinion macrotomus* ve *Garra rufa obtusa* balıklarına farklı stres kaynakları (pH, ağır metal, selenyum, sıcaklık, oksijen eksikliği, besin eksikliği) uygulanarak kas dokusundaki enzim aktivite değerleri belirlendi ve elde edilen veriler grafiğe geçirilmiştir.



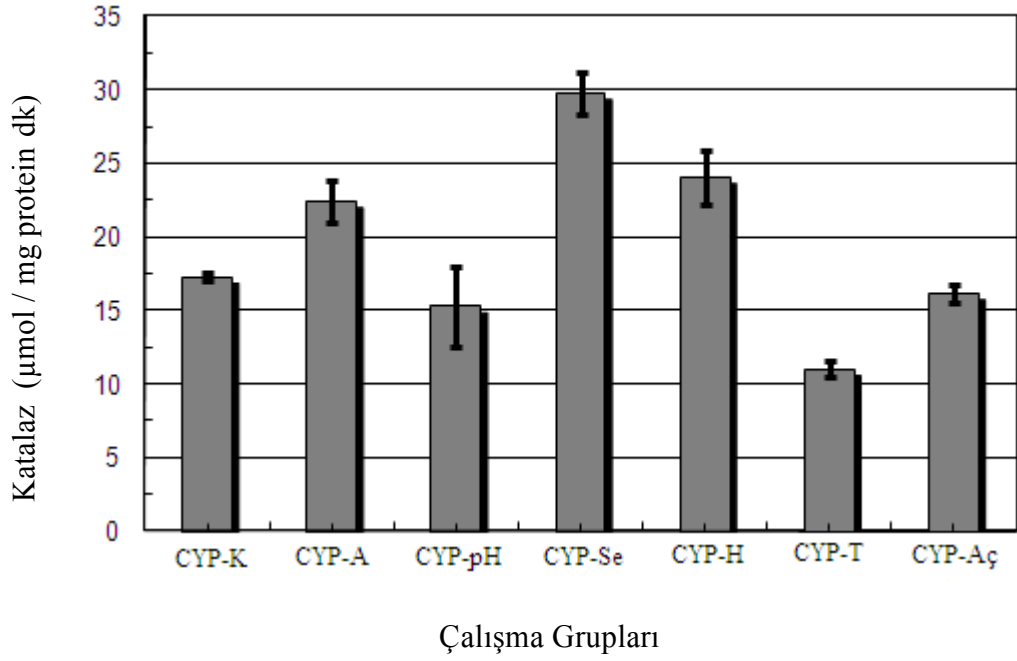
Şekil 8.3 Çeşitli stres kaynaklarının uygulanması sonucu *Garra rufa obtusa* balıklarının kas dokularındaki katalaz aktiviteleri.

Çizelge 8.3 *Garra rufa obtusa* balıklarında katalaz enzim aktivite sonuçları

	Çalışma Grupları	Katalaz $\bar{X} \pm \text{SDS}$ (µmol / mg protein.dk)	
GR-K	GR-Kontrol	24.32 ± 0.88	$K_w: 19.050$ $P: 0.004$ $P < 0.05$
GR-A	GR-Ağır metal	20.47 ± 0.55	
GR-Ph	GR- pH	6.23 ± 0.69	
GR-Se	GR-Selenyum	19.30 ± 0.63	
GR-H	GR-Hipoksi	18.85 ± 0.17	
GR-T	GR-Sıcaklık	9.85 ± 0.24	
GR-Aç	GR-Açlık	10.28 ± 1.98	

Şekil 8.3’de farklı stres kaynaklarına maruz kalan *Garra rufa obtusa* balıklarının katalaz aktivitesindeki değişiklikler kontrol grubu ile birlikte verilmiştir. Şekil 8.3’e göre çalışma grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; ağır metal grubunda % 15.8, pH grubunda %74.3, selenyum grubunda %20.6, hipoksi grubunda %22.5, sıcaklık grubunda %59.5, besin eksikliği grubunda %57.7

azalma gözlenmiştir. Çalışma grupları aktivite sonuçları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında katalaz enziminin aktivitesinde ki değişikliklerin istatistiksel açıdan önemli olduğu gözlenmiştir ($p < 0.05$).



Şekil 8.4 Çeşitli stres kaynaklarının uygulanması sonucu *Cyprinion macrastomus* balıklarının kas dokularındaki katalaz aktiviteleri.

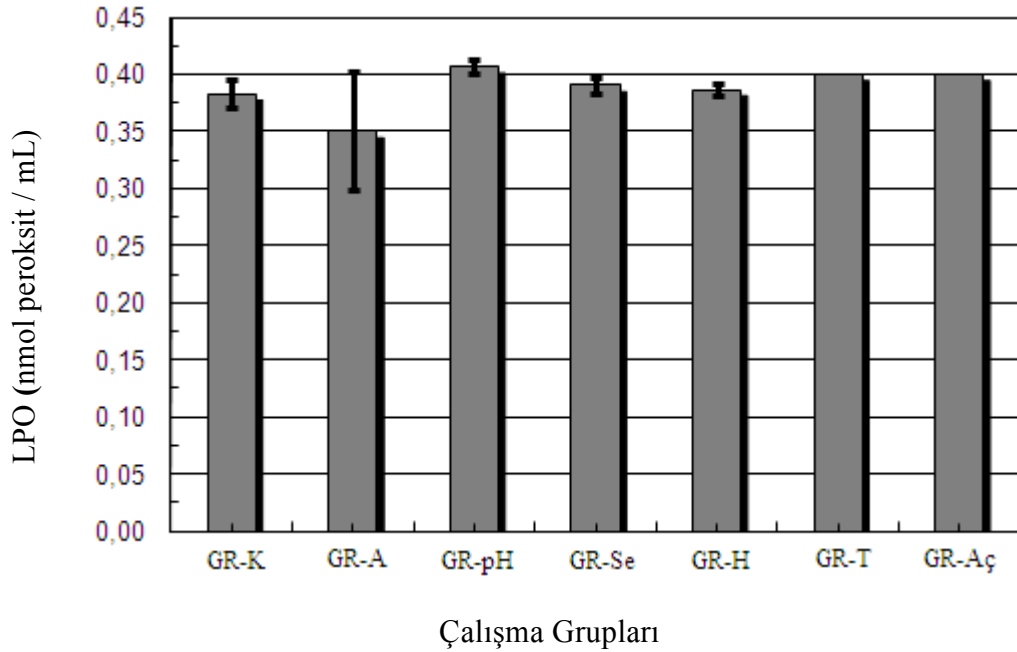
Çizelge 8.4 *Cyprinion macrastomus* balıklarında katalaz enzim aktivite sonuçları

	Çalışma Grupları	Katalaz $\bar{X} \pm \text{SDS}$ (µmol / mgprotein.dk)	
CYP-K	CYP-Kontrol	17.28 ± 0.31	$K_w: 18.507$ $P: 0.005$ $P < 0.05$
CYP-A	CYP-Ağır metal	22.40 ± 1.38	
CYP- pH	CYP – pH	15.27 ± 2.73	
CYP-Se	CYP -Selenyum	29.76 ± 1.47	
CYP-H	CYP -Hipoksi	24.05 ± 1.86	
CYP-T	CYP -Sıcaklık	11.00 ± 0.57	
CYP-Aç	CYP –Açlık	16.15 ± 0.61	

Şekil 8.4’de farklı stres kaynaklarına maruz kalan *Cyprinion macrostomus* balıklarının katalaz aktivitesindeki değişiklikler kontrol grubu ile birlikte verilmiştir. Şekil 8.4’e göre çalışma grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; ağır metal grubunda %29.6, selenyum grubunda %72.2, hipoksi grubunda %39.2, besin eksikliği grubunda % 27.3 artma gözlenirken, pH grubunda %11.6, sıcaklık grubunda %36.3 azalma gözlenmiştir. Ağır metal, sıcaklık, selenyum, oksijen eksikliği ve besin eksikliği uygulanan grupların katalaz enzim aktivite sonuçları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak önemli bir fark olduğu gözlenirken ($p < 0.05$), pH uygulanmış grupta bu farkın önemli olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0.05$).

8.2 Lipid Peroksidasyon Düzeyi

Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı olarak bilinen lipid peroksidasyonun miktar tayini araştırılmak üzere, *Cyprinion macrotomus* ve *Garra rufa obtusa* balıklarına farklı stres kaynakları (pH, ağır metal, selenyum, sıcaklık, oksijen eksikliği, besin eksikliği) uygulanarak kas dokusundaki lipid peroksidasyon düzeyleri belirlendi ve elde edilen veriler grafiğe geçirildi.



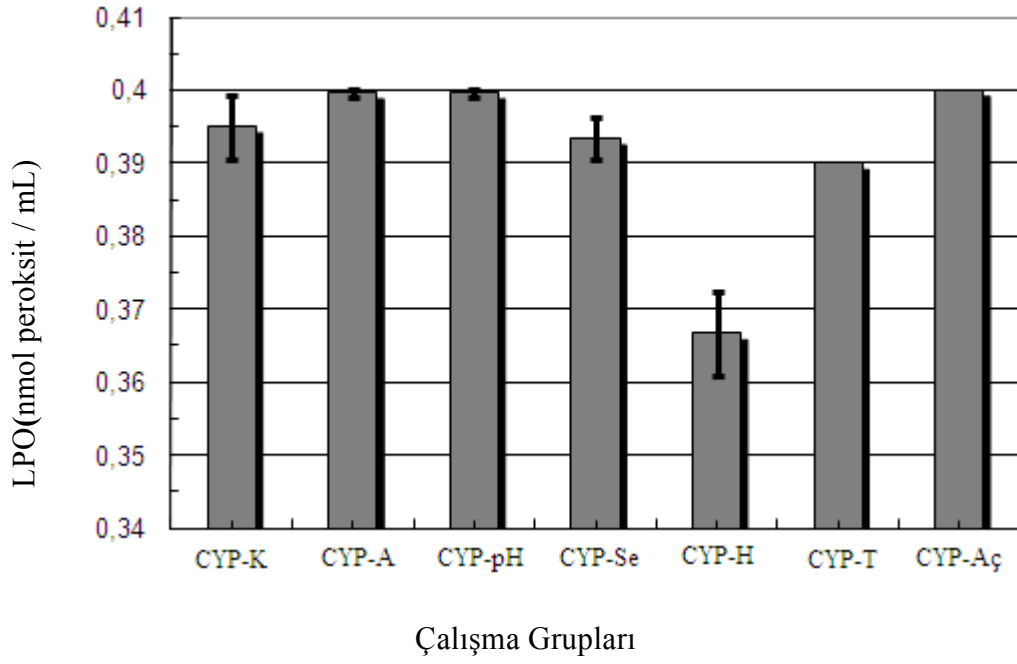
Şekil 8.5 Çeşitli stres kaynaklarının uygulanması sonucu *Garra rufa obtusa* balıklarının kas dokularındaki lipid peroksidasyon değerleri.

Şekil 8.5 'de farklı stres kaynaklarına maruz kalan *Garra rufa obtusa* balıklarının lipid peroksidasyon değerindeki değişiklikler kontrol grubu ile birlikte verilmiştir. Şekil 8.5'e göre çalışma grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; pH grubunda % 8, seleyum grubunda %2.6, hipoksi grubunda %2.6, sıcaklık grubunda %5.3, besin eksikliği grubunda %5.3 artma gözlenirken, ağır metal grubunda %13.2 azalma gözlenmiştir. pH, sıcaklık ve besin eksikliği uygulanan grupların lipid peroksidasyon düzeyi sonuçları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında değişimlerin istatistiksel olarak önemli olduğu gözlenirken ($p < 0.05$), ağır metal, selenyum ve oksijen eksikliği uygulanmış gruplarda bu değişimin önemli olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0.05$).

Çizelge 8.5 *Garra rufa obtusa* balıklarında lipid peroksidasyon değerleri

	Çalışma Grupları	Lipid peroksit $\bar{X} \pm \text{SDS}$ (nmol peroksit / mL)	
GR-K	GR-Kontrol	0.38 ± 0.01	$K_w: 17.501$ $P: 0.008$ $P < 0.05$
GR-A	GR-Ağır metal	0.35 ± 0.05	
GR-pH	GR- pH	0.41 ± 0.005	
GR-Se	GR-Selenyum	0.39 ± 0.007	
GR-H	GR-Hipoksi	0.39 ± 0.005	
GR-T	GR-Sıcaklık	0.40 ± 0.00	
GR-Aç	GR-Açlık	0.40 ± 0.00	

Şekil 8.6'de farklı stres kaynaklarına maruz kalan *Cyprinion macrostomus* balıklarının lipid peroksidasyon değerindeki değişiklikler kontrol grubu ile birlikte verilmiştir. Şekil 8.6'e göre çalışma grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; ağır metal grubunda % 1.3, pH grubunda % 1.3, besin eksikliği grubunda %1.3 artma gözlenirken, selenyum grubunda % 0.5, hipoksi grubunda %7.3, sıcaklık grubunda %1.2 azalma gözlenmiştir. Çalışma grupları lipid peroksidasyon düzeyi sonuçları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0.05$).



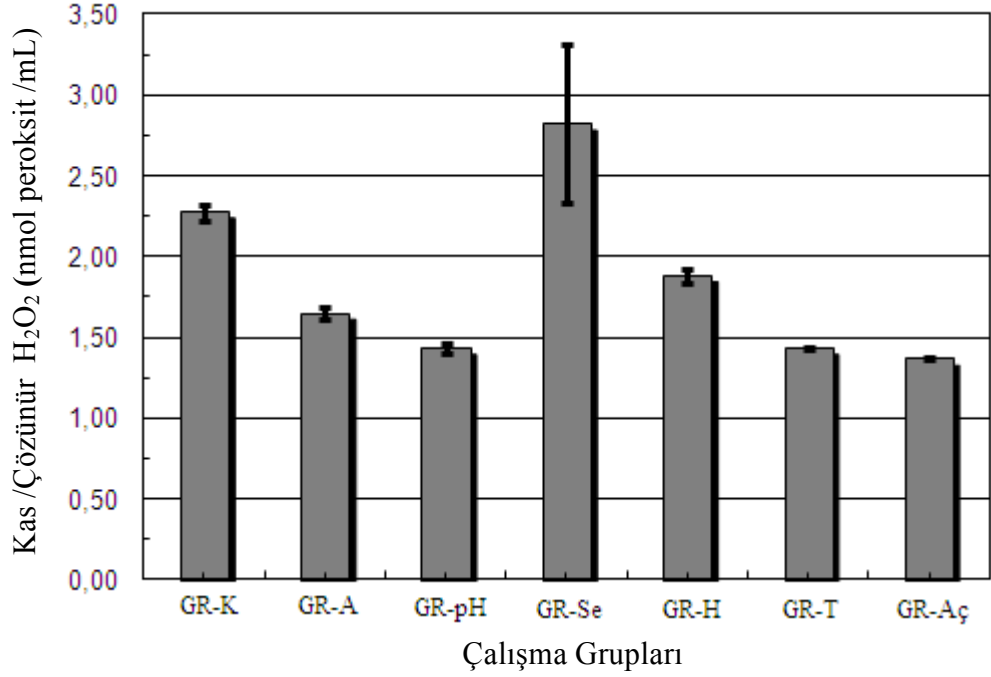
Şekil 8.6 Çeşitli stres kaynaklarının uygulanması sonucu *Cyprinion macrastomus* balıklarının kas dokularındaki lipid peroksidasyon değerleri

Çizelge 8.6 *Cyprinion macrastomus* balıklarında lipid peroksidasyon değerleri

	Çalışma Grupları	Lipid peroksit $\bar{X} \pm \text{SDS}$ (nmol peroksit / mL)	
CYP-K	CYP-Kontrol	0.395 ± 0.00	$K_w: 17.062$ $P: 0.009$ $P < 0.05$
CYP-A	CYP-Ağır metal	0.40 ± 0.00	
CYP- pH	CYP - pH	0.40 ± 0.00	
CYP-Se	CYP -Selenyum	0.393 ± 0.00	
CYP-H	CYP -Hipoksi	0.366± 0.01	
CYP-T	CYP -Sıcaklık	0.39 ± 0.00	
CYP-Aç	CYP -Açlık	0.40± 0.00	

8.3 Çözünür Peroksit Düzeyi

Cyprinion macrotomus ve *Garra rufa obtusa* balıklarına farklı stres kaynakları (pH, ağır metal, selenyum, sıcaklık, oksijen eksikliği, besin eksikliği) uygulanarak kas dokusundaki enzim aktivite değerleri belirlendi ve elde edilen veriler grafiğe geçirildi.



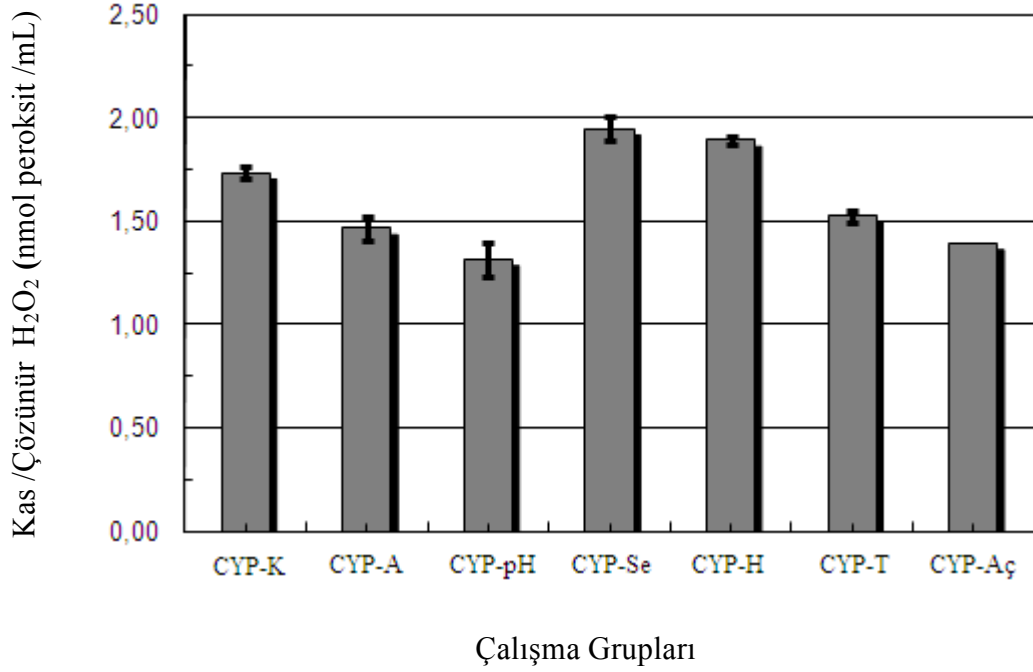
Şekil 8.7 Çeşitli stres kaynaklarının uygulanması sonucu *Garra rufa obtusa* balıklarının kas dokularındaki çözünür peroksit değerleri.

Çizelge 8.7 *Garra rufa obtusa* balıklarında çözünür peroksit değerleri

	Çalışma Grupları	Çözünür peroksit $\bar{X} \pm \text{SDS}$ (nmol peroksit / mL)	
GR-K	GR-Kontrol	2.28 ± 0.05	$K_w: 19.226$ $P: 0.004$ $P < 0.05$
GR-A	GR-Ağır metal	1.65 ± 0.04	
GR-pH	GR- pH	1.43 ± 0.03	
GR-Se	GR-Selenyum	2.82 ± 0.49	
GR-H	GR-Hipoksi	1.88 ± 0.05	
GR-T	GR-Sıcaklık	1.43 ± 0.005	
GR-Aç	GR-Açlık	1.37 ± 0.005	

Şekil 8.7’de farklı stres kaynaklarına maruz kalan *Garra rufa obtomus* balıklarının çözünür peroksit değerindeki değişiklikler kontrol grubu ile birlikte verilmiştir. Şekil 8.7’ye göre çalışma grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; selenyum grubunda %23.7 artma gözlenirken, ağır metal grubunda % 27.6, pH grubunda % 37.2, hipoksi grubunda %17.5, sıcaklık grubunda %37.2, besin eksikliği grubunda %40 azalma gözlenmiştir. Ağır metal, pH, sıcaklık, oksijen

eksikliği ve besin eksikliği uygulanan grupların çözünür peroksit düzeyi sonuçları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak önemli bir fark olduğu gözlenirken ($p < 0.05$), selenyum uygulanmış grupta bu farkın önemli olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0.05$).



Şekil 8.8 Çeşitli stres kaynaklarının uygulanması sonucu *Cyprinion macrastomus* balıklarının kas dokularındaki çözünür peroksit değerleri.

Çizelge 8.8 *Cyprinion macrastomus* balıklarında çözünür peroksit değerleri

	Çalışma Grupları	Çözünür peroksit $\bar{X} \pm \text{SDS}$ (nmol peroksit / mL)	
CYP-K	CYP-Kontrol	1.73 ± 0.03	$K_W: 19.350$ $P: 0.004$ $P < 0.05$
CYP-A	CYP-Ağır metal	1.46 ± 0.06	
CYP- pH	CYP – pH	1.31 ± 0.08	
CYP-Se	CYP -Selenyum	1.95 ± 0.06	
CYP-H	CYP –Hipoksi	1.89± 0.02	
CYP-T	CYP –Sıcaklık	1.52 ± 0.03	
CYP-Aç	CYP –Açlık	1.39± 0.00	

Şekil 8.8'de farklı stres kaynaklarına maruz kalan *Cyprinion macrostomus* balıklarının çözünür peroksit değerindeki değişiklikler kontrol grubu ile birlikte verilmiştir. Şekil 8.8'e göre çalışma grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; selenyum grubunda %12.7, hipoksi grubunda % 9.2 artma gözlenirken, ağır metal grubunda %27.6, pH grubunda %24.3, sıcaklık grubunda % 12.1, besin eksikliği grubunda % 19.6 azalma gözlenmiştir. Çalışma grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında çözünür peroksit düzeylerindeki değişimlerin istatistiksel açıdan önemli olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$).

9 TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bu çalışmada, Sivas Kangal balıklı kaplıcadaki *Cyprinion macrastomus* ve *Garra rufa obtusa* balıklarına değişik stres kaynaklarının uygulanması sonucu kas dokusunda antioksidan enzim aktiviteleri ile lipid peroksidasyon düzeylerindeki değişimler incelenmiştir.

Garra rufa obtusa balıklarının glutatyon peroksidaz enzim aktivitesindeki değişiklikler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Şekil 8.1) ağır metal, selenyum, oksijen eksikliği ve besin eksikliği etkilerinin enzim aktivitesinde artışa sebep olduğu gözlenirken, pH ve sıcaklık etkilerinde enzim aktivitelerinde azalma olduğu gözlenmiştir. En yüksek artış oksijen eksikliği etkisinde gözlenirken (%53), en yüksek düşüş pH etkisinde (%33.4) görülmüştür. Stres etkileri sonucu metabolizmada artmış olan reaktif oksijen türlerinin etkileri özellikle de çözünür hidroperoksit ve lipid peroksit miktarları artan glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi ile etkisizleştirildiği düşünülebilir. Bu nedenle glutatyon peroksidaz enziminin arttığını söyleyenebilir. Ayrıca pH ve sıcaklık etkilerinde oksidatif hasarın oluştuğu düşünülerek glutatyon peroksidaz enzim aktivitesinde azalma olması da beklenen bir durumdur.

Cyprinion marostomus balıklarının glutatyon peroksidaz enzim aktivitesinde elde edilen sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Şekil 8.2) bütün stres etkilerinde glutatyon peroksidaz enzim aktivitesinin artmış olduğu gözlenirken en yüksek artışın selenyum etkisinde (%152) olduğu saptanmıştır. Yine burada da metabolizmada artmış olan reaktif oksijen türlerinin etkileri özellikle de çözünür hidroperoksit ve lipid peroksit miktarları artan glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi ile etkisizleştirildiği düşünülebilir. Oksidatif stres etkisine karşı enzim aktivitesi artarak hücre ve dokuların daha az hasar görmesi sağlanmış olabilir. Ayrıca selenyum glutatyon peroksidaz enziminin sentezini artırmış ve aktivasyonunu sağlamış olabileceği de düşünülebilir.

Garra rufa obtusa balığının katalaz enzim aktivitelerine ait sonuçlar incelendiğinde, uygulanan streslerin verileri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Şekil 8.3) çalışma gruplarının enzim aktivitesinde azalma gözlenirken en fazla düşüş pH etkisinde (%74.3) bulunmuştur. Bu balıkların katalaz enzimi aktivitesinde azalma gözlenmesinin sebebi metabolizmada stres etkileri sonucu oluşabilen oksidatif hasar olarak düşünülebilir.

Cyprinion marostomus balıklarının katalaz enzim aktivite değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Şekil 8.4) ağır metal, selenyum, besin eksikliği ve oksijen eksikliğinde enzim aktivitesinde artış gözlenmekte ve oksidatif strese karşı koyarak enzimin sentezi artmaktadır. pH ve sıcaklık etkilerinde ise enzim aktivitesinde azalma olduğu oksidatif hasarın arttığı söylenebilir. En yüksek artışın selenyum etkisinde (%72.2), en fazla azalmanın sıcaklık etkisinde (%36.3) olduğu bulunmuştur. Reaktif oksijen türlerinden kaynaklanan hidrojen peroksitin uzaklaştırılmamasından dolayı oksidatif hasar meydana gelmiş olabileceğinden enzim aktivitesinde azalma gözlenebilir. Selenyum etkisinde ise katalaz enzimi aktivitesinin artması oksidatif strese karşı koymak için enzim sentezinin artmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Garra rufa obtusa balıklarının lipid peroksidasyonu sonuçları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Şekil 8.5) büyük değişimler gözlenmemiştir. Lipit peroksidasyonunda en fazla artış pH etkisinde (%7.9) görülürken, en fazla azalma ağır metal etkisinde (%13.2) gözlenmiştir. Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesinin artmasıyla peroksitler etkisizleştirildiğinden lipit peroksidasyonu düşük çıkmıştır.

Cyprinion macrostomus balıklarının lipit peroksidasyon sonuçları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Şekil 8.6) selenyum, oksijen eksikliği ve sıcaklık etkilerinin lipit peroksidasyonunda azalma gözlenirken, ağır metal, besin eksikliği ve pH etkilerinde ise artış gözlenmiştir. Elde edilen veriler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında lipit peroksidasyon düzeyindeki en fazla azalmanın oksijen eksikliği etkisinde olduğu (%7.3) görülmüştür. Stres etkileri özellikle de selenyum etkisiyle glutasyon peroksidaz veya katalaz enzimlerinin aktivitelerindeki artma sonucunda bu enzimler ortamda oluşan peroksitlere etki ederek lipit peroksit seviyesini çok büyük oranlarda deüişmesini engellemişlerdir.

Garra rufa obtusa balıklarının çözünür peroksit miktarları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Şekil 8.7) selenyum etkisinde artma olduğu diğer stres etkilerinde ise azalma olduğu gözlenmiştir. En fazla artma selenyum etkisinde (%23.7) gözlenirken, en fazla azalma besin eksikliği etkisinde (%40) gözlenmiştir. Selenyum etkisi sonucu çözünür peroksit miktarındaki artma glutasyon peroksidaz enziminin selenyuma bağlı olmadığını yalnızca lipit peroksitlere etki ederken çözünür peroksitlere etkili olmadığı düşüncesini uyandırmaktadır.

Yada selenyumun glutasyon peroksidaz enzimine belli bir derişimden sonra inhibitör etki göstermesi çözüner peroksit miktarının ortamda artmasına neden olduğu düşünülebilir. Katalazın aktivitesindeki düşmeye paralel olarak çözüner peroksit miktarı da artabilir.

Cyprinion macrostomus balıklarının çözüner peroksit miktarları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Şekil 8.8) selenyum ve oksijen eksikliğinde artma, ağır metal, pH, besin eksikliği ve sıcaklık etkilerinde azalma olduğu gözlenmiştir. En fazla artma selenyum etkisinde (%12.7) gözlenirken en fazla azalma ağır metal etkisinde (%27.6) gözlenmiştir. Burada da glutasyon peroksidazın selenyuma bağlı olmadığı için çözüner peroksitlere etki göstermediği ve oksidatif hasarın arttığı söylenebilir veya yukarıda söylediğimiz gibi selenyumun glutasyon peroksidaz enzimine belli bir derişimden sonra inhibitör etki göstermesi çözüner peroksit miktarının artmasına neden olduğu düşünülebilir.

Elde edilen verilere istatistik değerlendirmeler yapılmış ve çalışma gruplarının kontrol ile karşılaştırılması sonucunda değişimlerin anlamlı olduğu ($p<0.05$) bulunmuştur.

Bu çalışmada uygulanan stresler daha sonraki çalışmalarda ayrıntılı olarak incelenip daha kesin sonuçlar elde edilebilir. Örneğin artan ağır metal etkisi, artan selenyum etkisi incelenerek, oksidatif stresi artıran ya da azaltan, inhibisyon veya aktivasyona sebep olan ağır metal derişimleri belirlenebilir. Bu çalışma kapsamında diğer antioksidan enzim aktiviteleri ve protein karbonil düzeyleri araştırılarak çalışmanın genişletilmesi planlanmaktadır.

Literatür çalışmaları incelendiğinde, daha önce balıklar üzerine yapılan bir çalışmada somon alabalığına (*Salmo salar* L.) yüksek düzeylerde besinsel bakır ve kadmiyum uygulanması sonucunda selenyum bağımlı glutasyon peroksidaz aktivitesini ve doku lipid peroksidatif yanıtların düzeyini ölçmüşlerdir. Araştırma sonucunda oksidatif savunma sistemini hasara uğratan kadmiyumun doku lipid peroksidasyonunu arttırdığı, GSH-Px enzim aktivitesini ise azalttığı gözlenmiştir. (Berntssen ve ark., 2000).

Akpınar, (1998) Kangal balıklı kaplıcasında (Sivas) bulunan *Cyprinion Macrostomus* Heckel üzerinde yaptığı çalışmada, farklı sıcaklıklarda beslenmesi ve aç bırakılması suretiyle yağ asidi bileşiminde meydana gelen değişimler incelenmiştir. Araştırma sonucunda farklı sıcaklıklarda beslenen ve aç bırakılan

balıklarda en fazla değişime uğrayan yağ asitlerinin uzun zincirli aşırı doymamış yağ asitleri olduğunu saptamıştır.

Almedia ve arkadaşları (2002) tatlı su çipurası (*Oreochromis niloticus*) ile yaptıkları çalışmada ise, farklı dozlarda kadmiyuma maruz bırakılan balıkların karaciğer ve kas dokularında oluşan oksidatif stres ve metabolik değişikliklerin değerleri ölçülmüştür. Çalışma sonucunda balığın karaciğeri ile kırmızı ve beyaz kaslarında SOD ve GSH-Px aktivite değerleri belirlenmiş ve ölçümlere dayanılarak, balıkta kadmiyum toksisitesinin bir göstergesi olarak serbest oksijen radikallerinin varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca kadmiyumun toksik etki gösterdiği ve balıklarda geri dönüşümü olmayan hasarlar meydana getirdiği ve balık ölümlerine yol açtığı saptanmıştır.

Mates ve arkadaşları (1999) yaptıkları çalışmada toksik etkili oksijen türlerine karşı insan hücreleriyle birlikte çalışan antioksidan enzimlerin, süperoksit dismutazın, glutatyon peroksidazın ve katalazın önemini, bunların birtakım patohistolojik süreçlerle ve trapatik implikasyonlarıyla ilişkilerini incelemiştir. Çalışma sonucunda patolojik bir olayın oksidatif etki ile birlikte, koruma sistemi enzimlerinin regülasyonunu arttırdığı saptanmıştır.

Jamba ve arkadaşları ise (1997) fareler üzerine yaptıkları çalışmada kadmiyumun toksitesi üzerine selenyum etkisini incelemiştir. Çalışma sonucunda farelerin böbrek ve karaciğer dokularında önemli ölçüde kadmiyum biriktiğini ve böbrek proksimal kıvrık tübüllerin (PCT) içinde belirgin patolojik değişiklikler olduğunu ve antioksidan enzimlerin önemli kısmının inhibe olduğunu saptamışlardır. Ancak farelere kadmiyum ile birlikte selenyum uygulanmasıyla bu olumsuz etkilerin giderildiği belirtilmiştir.

Vaglio ve ark.(1999) antioksidatif savunma sistemi üzerine kadmiyumun etkisini izlemek üzere yapılan çalışmada ise, CdCl₂'ün kemikli balık *Sparus aurata*'ya 3 ve 6 günlük uygulanmasının sonucunda karaciğerindeki enzim aktivite değişimleri incelenmiştir. İnceleme sonucunda karaciğerde antioksidan enzim olarak görev yapan glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve katalaz aktivitesinin önemli derecede düştüğü gözlenmiştir.

Jamba ve arkadaşlarının (2000) fareler üzerine yaptıkları diğer bir çalışmada ise kadmiyumun karaciğer dokusundaki etkilerini incelemiştir. Çalışma sonucuda Cd'a maruz kalmış grubun karaciğerinde önemli derecede kadmiyum birikimi gözlenirken, Cd + Se 'a maruz kalmış grubun karaciğerinde kadmiyum

birikiminin %18 azaltığı saptanmıştır. Ayrıca Cd uygulanmış grubun GSH-Px aktivitesinde azalma gözlenirken, Cd+Se uygulanmış grubun GSH-Px aktivitesinde artma olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Finley ve arkadaşları (2001) ise iki farklı sıçan türü (Sparague-Dawley, F-344) üzerine yaptıkları çalışmada, yüksek selenyum içerikli brokoli ve brokoli tohumlarının koruyucu etkisini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda yüksek selenyum içerikli brokolinin meme ve bağırsak kanserlerine karşı koruyucu bir rolünün olduğu tespit edilmiştir.

Diğer bir araştırmada ise, *Channa punctata* (bloch) tatlı su balığı üzerine uçan kül sızıntısı uygulayarak (FAL) meydana gelen oksidatif stresin belirteci olarak lipid katalaz, glutatyon S-transferaz ve lipid peroksidasyon değerleri incelenmiş ve araştırma sonucunda uçan kül bileşenlerinin balıkta oksidatif strese neden olduğu ve solungaçların en hassas organ olduğu belirlenmiştir (Ali ve ark., 2004).

Chowdhury ve arkadaşları (2004) ise yaptıkları çalışmada, gökkuşağı alabalıklarına kadmiyum uygulanması sonucunda solunum, iyon regülasyonu ve stres parametrelerinde meydana gelebilecek değişiklikleri incelemişlerdir. Araştırma sonucunda kontrol grubuna göre hematokrit ve hemoglobinde sırasıyla %49 ve %74 oranında bir artış gözlenirken, plazma total amonyum ve glukoz düzeylerinde sırasıyla %43 ve %49 oranında bir azalma olduğu saptanmıştır. Bu olaylar 72 saatlik bir uygulama sonucunda meydana gelmiş, 45 günlük uygulama sonucunda ise, uygulamanın artık kronikleştiği ve alabalıkların suda çözünmüş Cd tarafından yaratılan fizyolojik streslerden korunduğu saptanmıştır.

Örün ve arkadaşları (2005) yaptıkları araştırmada gökkuşağı alabalığına (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) farklı dozlarda sodyum selenit uygulamış ve çalışma sonucunda sodyum selenit'in antioksidatif savunma sistemine katkıda bulunduğu tespit edilmiştir.

Alkan (2005), selenyumun balıklarda antioksidatif rolünü belirlemek amacıyla yaptığı çalışma sonucunda, Cd, Cr, Cd+Se ve Cr+Se'a maruz kalmış grupların enzim aktivitelerinde kontrole göre istatistiksel açıdan önemli oranda düşüşlerin olduğu ($p<0.05$) gözlemiştir. Ayrıca Cd, Cr, Cd+Se ve Cr+Se'a maruz kalmış grupların MDA düzeylerinde kontrole göre istatistiksel olarak önemli artışların olduğunu ($p<0.05$) belirlemiştir.

Heise ve ark (2006) yaptıkları araştırma sonucunda *Zoarces viviparus* türü balıklar 1-5 °C sıcaklıklarda strese maruz bırakıldıklarında 12 °C sıcaklıkta bulunan balıklara göre oksidatif stres parametrelerinde artış gözlemiştir. Aynı balıklara yüksek sıcaklık stresi uygulandığında (18, 22, 26 °C) oksidatif hasar değerlerinde artışın süperoksit dismutaz enzim aktivitesindeki azalma ile birlikte gerçekleştiği gözlenmiştir (Heise ve ark., 2006).

Başka bir çalışmada farklı tipteki çevresel kirliliklere maruz bırakılan balıklar incelenmiş, karaciğer glutatyon-S-transferaz aktiviteleri, karaciğer ısı şok protein Hsp70 miktarı ve plazma steroidleri miktarları ile kirlilik arasındaki ilişki araştırılmıştır (Mayon ve ark., 2006).

Diğer bir çalışmada ise evde beslenen balıklarda çinkonun toksik etkisinin stres proteinleri ve antioksidan sistemler üzerine etkileri araştırılmış, antioksidan enzim aktivitelerinde önemli düşüşler olduğu gözlenmiştir (Franco ve ark., 2006).

Atencio ve arkadaşları (2008) ise oksidatif stres üzerine selenyumun etkisini araştırdıkları çalışmada, tilapi balığında (*Oreochromis niloticus*) mikrokistin (MCs) içeren siyonobakteriyel hücreler tarafından histopatolojik değişiklikleri incelemişlerdir. Tilapi balığının böbrek ve karaciğerinde, lipid peroksidasyon seviyelerindeki değişiklikleri, redükte glutatyon/okside glutatyon (GSH/GSSG) oranını ve katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon-S-transferaz (GST) aktivitelerini incelemek üzere balıkları farklı tozlarda sodyum selenit ile beslemişlerdir (1.5, 3.0, ve 6.0 mg Se/g). Çalışma sonucunda farklı dokularda farklı dozlarda selenyumun koruyucu etkisi olduğu saptanmıştır. Bu nedenle selenyumun hücre ve dokularında neden olabileceği negatif sonuçlardan kaçınmak ve yararlı etkileri sağlamak için miktarının özenle belirlenmesi gerektiği belirlenmiştir.

Hayvanların özellikle de balıkların kullanıldığı bütün bu çalışmalar sonucunda, hayvanların çeşitli stres kaynaklarına maruz bırakılmasıyla ölçülen biyokimyasal değerleri, kullanılan hayvanın özelliklerine, uygulanan strese, stresin uygulanma şekline ve bunun gibi birçok etkene göre farklılıklar gösterdiği bilinmektedir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar ile literatür sonuçları karşılaştırıldığında kimi durumda benzer sonuçlar elde edilirken kimi durumda farklılıklar görülmüştür. Bu ise her bir organizmanın stres etkilerine karşı savunmasının da farklılıklar içerebileceğini göstermektedir.

Oksidatif stres konusunda model olarak hayvanların kullanıldığı yukarıda belirtilen çalışmaların yanı sıra çok daha fazla çalışma bulunmaktadır (Su ve ark., 2008; Sturve ve ark., 2008). Ancak oksidatif stres kapsamında Sivas Balıklı Kaplıca'daki balıklar ile ilgili bu çalışma alanında yapılmış ilk çalışma olup bundan sonraki çalışmalara yön vereceği için önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Abdollahi, M., Bahreini-Moghadam, A., Emmami, B., Fooladian, F., Zafarlet, K. (2003). Increasing Intracellular cAMP and cGMP Inhibits cadmium-induced Oxidative Stress in Rat Submandibular Saliva, *Comp. Biochem. Physiol., C*, 135, 331-336.
- Aebi, H. (1981). Catalase, in Bergmayer Hu (ed). *Methods of Enzymatic Analysis* 2nd Edition Derfield Beach, Verlag Chemie International, 673-684.
- Ali, M., Parvez, S., Pandey S., Atif, F., Kaur M., Rehman H., Raisuddin S. (2004). Fly Ash Leachate Induces Oxidative Stress in Freshwater Fish *Channa Punctata* (Bloch), *Environment International*, 30, 933-938.
- Akkuş, İ. (1995). Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Basım, Yayın ve Dağıtım A.Ş., Konya.
- Akpınar, M. (1998). Besinsel Yağ Asitlerinin ve Açlığın *Cyprinion Macrostomus* Heckel, 1843'un Kas Dokusu Yağ Asidi Bileşimine Etkisi Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Sivas.
- Almeida J.A., Diniz Y.S., Marques S.F.G., Faine L.A., Ribas B.O., Burneiko R.C., Novelli E.L.B. (2002). The Use of the Oxidative Stress Responses as Biomarkers in Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) Exposed to In-vivo Cadmium Contamination, *Environ. Int.*, 27, 673-679.
- Antmen, E.Ş. (2005). Beta Talasemide Oksidatif Stres, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, 82.
- Ambrosia, G., Santora, G., Tritto, I. (1992). Effects of Ischemia and Reperfusion on Cardiac Tolerance to Oxidative Stress, *Am J. Physiol* 262, 23-30.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. (1993). Oxidants, Antioxidants and the Degenerative Diseases of Aging, *Proc Natl Acad Sci Usa*. 90, 7915-7922.
- Arda M. (1974). Balıklarda Bakteriyel, Mantar, Viral ve Ekolojik Nedenlerden İleri Gelen Hastalıklar ve Tedavileri, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, Ankara, 300, 212.
- Aslan, R., Şekeroğlu, M.R., Bayiroğlu, F. (1995). Serbest Radikal Türlerin Membran Lipid Peroksidasyonuna Etkileri ve Antioksidan Savunma, *Y.Y.Ü. Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2/1, 137-142.
- Aslan, R. (1997). Sedanterlerde Akut ve Programlı Submaksimal Ekzersizin Eritrosit Membranı Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Savunma Sistemi Üzerine Etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Y.Y.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Alkan, A. (2005). Bazı Ağır Metal ve Selenyum Bileşiklerine Maruz Kalan Alabalıklarda Antioksidan Enzim Aktivitelerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya.
- Aust, S.D., Morehouse, L.A., Thomas, C. (1985). Role of Metals in Oxygen Radical Reactions, *Free Rad. Biol. Med.*, 1, 3-25.
- Atencio, L., Moreno, I., Jos, A., Prieto, A.I., Moyano, R., Blanco, A., Camea, A.M. (2008). Effects of Dietary Selenium on the Oxidative Stress and Pathological

- Changes in Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) Exposed to a Microcystin-Producing Cyanobacterial Water Bloom, Elsevier, 53, 269-282.
- Berntssen, M.H.G., Lundebye A.K. and Hamre K. (2000). Tissue Lipid Peroxidative Responses in Atlantic Salmon (*Salmo Salar* L.) Parr Fed High Levels of Dietary Copper and Cadmium, *Fish Physiol. Biochem.*, 23, 35-48.
- Bradford, M.M. (1976). A Apid and Sensitive Method for the Quantation of Microgramquantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72-248.
- Brigelius- Flohe, R. (1999). Tissue-specific Functions Individual Glutathione Perexidoses, *Free Radical Biology and Medicine*, 27, 951-965.
- Brown, M.E. (1957). the Physiology of Fishes, Vol: 1 Academic Press, New York and London.
- Butler, A.R., Flitney, F.W., Williams, D.L.H. (1995) Nitrosonium Ions, Nitroxide Ions, Nitrosothiols and Iron-Nitrols in Biology, *A Chemist's Perspective*, 16, 18-22.
- Byung, P.Y. (1994). Cellular Defenses Against Damage from Reactive Species, *Physiological Review*, 74(1), 139-172.
- Çalta, M. ve Girgin, A. (1998). Ağır Metallerin Balıklar Üzerindeki Etkileri, T.C. Tarım Orman ve Köy işleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü Su Kirliliği Hizmet İçi Eğitim Semineri Elazığ, 151-157.
- Canoruç, N., Çiçek, R., Atamer, A., Dursun, M., Turgut, C., Güneli, E., Canoruç, F. (2001). Protective Effects of Vitamin E Selenium and Allopurinol Against Stress-Induced Ulcer Formation in Rats. *Turk J Med Sci*, 31, 199-203.
- Ceballos, P. I., Trivier, J.M., Nicole, A. (1992). Age-Related Modifications of Copper-zinc Superoxide and Glutathione-Related Enzyme Activities in Human Erythrocytes, *Clin Chem*, 38, 66-70.
- Champe, P.C., Harvey, R.A. (1997). *Biyokimya Lippincotts Illustrated Reviews Serisinden*, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti., Çapa-İstanbul
- Cheeseman, K.H., Slater, T.F. (1993). An Intraduction to Free Radical Biochemistry. *Br Med Bull*, 49, 479-493.
- Chowdhury, M.J., Pane, E.F., Wood, C.M. (2004). Physiological Effects of Dietary Cadmium Acclimation and Waterborne Cadmium Challenge in Rainbow Trout: Respiratory, İonoregulatory, and Stress Parameters, *Comp. Biochem. Physiol.*, Part C, 139,163-173.
- Church, D.C. ve Pond, W.G. (1982). *Basic Animal Nutrition and Feding*, Second Ed. John Wiley and Sons Inc., Canada, 174-177.
- Cinier, C., Petit-Ramel, Faure, R., Garin, D. ve Bouvet, Y. (1999). Kinetics of Cadmium Accumulation and Elimination in Carp *Cyprinus carpio* Tissues, *Comp. Biocehem. and Physiol.*, Part C., 122, 345-352.
- Cochrane, C.G. (1991). Cellular İnjury by Oxidants, *Am J. Med.*, 3C23S-3C30S
- Combs, G.F. and Combs, B.S. (1986). *The Role of Selenium Nutrition*, Academic Press, Inc Ltd., London, 206-312.
- Cross, C.E., Halliwell, B. ve Borish, ET. (1987). Oxygen Radicals and Human Disease. *Ann Intern Med.* ,107, 526-545.

- Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A. (2003). Protein Carbonylation in Human Diseases, *Trends Mol Med.* ,9, 169-176.
- Deaton, C.M. and Marlin, D.J. (2003). Exercise-Associated Oxidative Stress, *Clinical Techniques in Equine Practice*, 278-291.
- De Smet, H. ve Blust, R. (2001). Stress Responses and Changes in Protein Metabolism in Carp *Cyprinus Caprio* During Cadmium Exposure, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 48, 255-262.
- Deby, C. ve Pincemail, J. (1988). Oxygen Toxicity, Free Radicals and Defence Mechanisms, in Fünfgeld EW, Rokan, *Recent Result in Pharmacology and Clinic*, Newyork, 56-70.
- Del Maestro, R. (1980). An Approach to Free Radicals in Medicine and Biology, *Acta Phsiol Scand Suppl*, 492, 68-153.
- Deneke, S.M., Fanburg, B.L. (1989). Regulation of Cellular Glutathione. *Am J., Physiol*, 257, 163-173.
- Desai, I.D. ve Scott, M.L. (1965). Mode of Action of Selenium in Relation to Biological Activity of Tocopherols, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 110, 309-315
- Diken, H., Şermet, A., Kelle, M., Denli, O. ve Aybak, M. (1994). Periton ve Alveol Makrofajlarının Fagositik Aktivitesine Vitamin C'nin Etkisi, *Dicle Tıp Dergisi, J. Medical School*, 21/2, 91-97.
- Dökmeci, İ. (1988). Toksikoloji, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 56-60, 488-489.
- Dökmeci, İ. (2001). Toksikolojik Zehirlenmelerde Tanı ve Tedavi, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul ISBN, 975-420.
- El-Yassin, H.D., Hasso, N.M.A., Al-Rubayi, H.A. (2005). Lipid Profile and Lipid Peroxidation Pattern Pre and Post Exercise in Coronary Artery Disease. *Türk J Med Sci*, 35, 223-228.
- Emerk, K. ve Onat, T. (1997). *Temel Biyokimya*, Saray Medikal Yayıncılık ve Tic. Şti., İzmir.
- Gözükara, S. ve Çavas, T. (2001). Cytogenetic Analysis of *Garra Rufa* (Heckel, 1843) From Eastern Mediterranean River Systems, *Third European Cytogenetics Conference 1(73)*, 43.
- Fergusson, F. E. (1990). *The Heavy Elements In: Chemistry, Environmental Impact and Health Effect* Pergamon Pres, 614.
- Finley, J.W., Clement, I.PÇ, Donald, J.L., Davis, C.D., Hintze, K.J. and Whanger, P.D. (2001). Cancer-Protective Properties of High-Selenium Broccoli, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2679-2683.
- Forstrom J.W., Zakowski J.J., Tappel A.L. (1978). Identification of Catalytic Site of Rat Liver Glutathione Peroxidase as Selenocysteine *Biochemistry*, 17, 2639-2644.
- Förstner, G. ve Wittmann. T. (1981). *Metal Pollution in the Aquatic Environment*, Newyork Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 3, 21, 271-318.
- Franco J. L., Trivella D. B.B., Trevisan R., Dinslaken D. F., Marques M. R.F., Bainy A.C.D., Dafre A.L. (2006). Antioxidant Status and Stress Proteins in the Gills of the Brown Mussel *Perna Perna* Exposed to Zinc. *Chem-Biol Interact.* 160, 232–240.

- Freeman, B.A ve Crapo, J.D. (1982) Biology of Disease, Free Radicals and Tissue Injury. Lab. Invest, 47(5), 412.
- Geldiay, R. ve Balık, S. (1988) Türkiye Tatlı Su Balıkları, Ege Üniversitesi Basım Evi, Bornova – İzmir.
- Geldiay, R. ve Balık, S. (1996) Türkiye Tatlı Su Balıkları, Ege Üniversitesi Basım Evi, Bornova - İzmir, 532.
- Gutteridge, J.M.C. (1995). Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. Clin Chemistry, 41, 1819-1828.
- Halliwell, B., Borish E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Saul, R.L, Mccord, J.M., Harman D. (1987). Oxygen Radicals and Human Disease, Annals of Internal Medicine, 107, 45-526.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1989). Free Radicals in Biology and Medicine, 2th Ed. Oxford: Clarendon Pres, 125.
- Haliwell, B., Gutteridge J.M., Cross, C.E. (1992). Free Radicals Antioxidants and Human Disease, J. Lab. Clin Med, 119/6, 598-620.
- Halliwell, B. (1994). Free Radicals, Antioxidans And Human Disease: Curiosity, Cause, Or Consequence, the Lancet, 344, 721-724.
- Hampton, M.B., Kettle, A.J. ve Winterbourn, C.C. (1998). Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase and Bacterial Killing, Blood, 92, 3000-3017.
- Hassun, H.M. (1983). Oxygen Toxicity and Mutagenesis in Prokaryotes in: Cohen G, Greenworld Ra, Oxy Radicals and Their Scavenger Systems, Elsevier Biomedical, 198-206.
- Heath, A.G. (1987). Water Pollution and Fish Physiology, CRP Press Inc., Florida, 245.
- Heise K., Puntarulo S., Nikinmaa M., Abele D., Pörtner H. (2006). Oxidative Stress During Stressful Heat Exposure and Recovery in the North Sea Eelpout *Zoarces Viviparus* L. *J. Exp Biol.* 209, 353-363.
- Higdon, J. (2001). [http:// Ipi.oregonstate.edu/infocenter/minerals/selenium](http://Ipi.oregonstate.edu/infocenter/minerals/selenium).
- Jamba, L., Nehru, B. and Bansal, M.P. (1997). Selenium Supplementantion during Cadmiumexposure: Changes in Antioxidant Enzymes and the Ultrastructure of the Kidney, J. Traceelements Exp. Med., 10, 233-242.
- Jamba, L., Nehru, B. ve Bansal, M.P. (2000). Effect of Selenium Supplementantion on the Influence of Cadmium on Glutathione and Glutathione Peroxidase System in Mouse Liver, J. Trace Elements Exp. Med., 13, 299-304.
- Jenkins, R.R. ve Tengji, J. (1981). Catalase Activity in Sceletal Muscle of Varying Fiber Types, Experimentia; 37, 67-68
- Kakkar, P. ve Jaffery, F.N. (2005). Biological Markers for Metal Toxicity, Environ. Toxicol. Pharm., 19, 335-349.
- Karakılıçık, A.Z. ve Aksakal, M. (1993). Selenyumun Bazı Fizyolojik İşlevleri, Metabolizma ve E Vitamini ile Arasındaki İlişkiler, G.Ü. Tıp Fak. Dergisi, 4, 283 – 291

- Kargin, F. (1996). Seasonal Changes in Levels of Heavy Metals in Tissues of *Mullus barbatus* and *Sparus aurata* Collected from İskenderun Gulf (Turkey), Water, Air and Soil Pollution, 89, 1-6.
- Knapen, M.F.C.M, Zusterzeel, P.L.M., Peters, W.H.M., Steegers, E.A.P. (1999) Glutathione and Glutathione-Related Enzymes in Reproduction, European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 82, 171-184
- Kontos, H.A., Wei, E.P., Ellis, E.F., Jenkins, L.W, Povlishock, J.T., Rowe, G.T. ve Hess, M.L. (1985). Appearance of Superoxideanion Radical in Cerebral Extracellular Space During Increased Prostaglandin Synthesis in Cats, Circ. Res, 57, 142–151.
- Kozumbo, W.J, Trush, M.A. ve Kensler, T.W. (1985). Are Free Radicals Involved in Tumor Promotion, Chem.Biol., 199-207.
- Körner, W.F. ve Völm, J. (1976). Vitamins Roche Urban and Schwarzenberg, München, 76.
- Köse, M. (1997). Tip II. Diabetes Mellituslu Hastalarda Eritrosit İçi Süperoksit Dismutaz, Katalaz ve Glutatyon Peroksidaz Düzeyleri, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya.
- Kutsky , R.J. (1981). Hand Book of Vitamins, Mineral and Hormones, 2th Ed. VMR, New York, 157-207.
- Lemly, A.D. (1997). A Teratogenic Deformity Index for Evaluating Impacts of Selenium on Fish Populations, Ecotox. Environ. Safety, 37, 259-266.
- Lunec, J., Blake, D. (1990). Oxygen Free Radicals: Their Relevance to Disease Processes, the Metabolic and Molecular Basis of Acquired Diseases, Balliere Tindall, 189-206.
- Luberda, Z. (2005). the Role of Glutathione in Mammalian Gametes. Reproductive Biology, 5(1), 5-17.
- Masuda, H., Kaneko, M., Hong, R.B., Ikegaya, T., Hayashi, H., Kobashi, A., Yamazaki, N. (1993). Effects of Hydrogen Peroxide on Simulatory Guanine-Nucleotide Binding Protein in Rat Heart, Japan. Circ. Jour. Eng. Edition, 57, 10, 1007 -1015.
- Mates, J.M, Gomez-Perez, C., Castro, I.N. (1999). Antioxidant Enzymes and Human Diseases, Clinical Biochemistry, Vol.32, No.8, 595- 603.
- Mayes, P.A. (1993) Structure and Function of the Water-soluble vitamins. İn: Murray, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W., Harper's Biochemistry, Lange Medical Puplication, London, 573-587
- Mayon, N., Bertrand, A., Leroy, D., Malbrouck, C., Mandiki, S.N.M., Silvestre, F., Goffart, A., Thomé, J.P., Kestemont, P. (2006). Multiscale Approach of Fish Responses to Different Types of Environmental Contaminations: A Case Study. *SCI. Total Environ*, 367, 715-731.
- Mccord, J.M., Fridowich, I. (1969). Superoxide Dismutase, an Enzymic Function of Erythrocuprein, J. Biopl.Chem. 244, 6049-6055
- Mcgeer, J.C., Szebedinszky, C., Mcdonald D.G. ve Wood, C.M. (2000). Effect of Chronic Sublethal Exposure to Waterborne Cu, Cd or Zn in Rainbow Trout 2: Tissue Specific Metal Accumulation. *Aquatic Toxicology*, 50, 245-256.

- Mcintyre, M., Bohr, D.F. ve Dominiczak, A.F. (1999) Endothelial Function in Hypertension, 34, 539-545.
- Meister, A. ve Anderson, M.E. (1983). Glutathione, Ann Rev. Biochem 52, 711-760.
- Meister, A. (1994). Glutathione, Ascorbate and Cellular Protection, Cancer Res. Suppl., 954, 1969-1975.
- Meotti, F.C., Stangherlin, E.C., Zeni, G., Nogueira, C.W. ve Rocha, J.B.T. (2004). Protective Role of Arly and Alkly Diselenides on Lipid Peroxidation, Environ. Res., 94, 276-282.
- Merlini, M. (1971). Heavy Metal Contamination, in Impengement of Man on the Oceans, London and Newyork, 461 -468.
- Murph, M.P. (1999). Nitric Oxide and Cell Death, Biochim Bioph Acta ,1411, 401-414
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, R.A., Rodwell, V.W. (1996). Fizyolojik Öneme Sahip Lipidler. N. Dikmen, T. Özgünen. Harper'ın Biyokimyası, Barış Kitabevi, İstanbul, 24.
- Mutah, H., Hiraishi, H. (1990) Protective Role of İntracelluler Glutathione against Ethonal-induced Damage in Cultered Rat Gastric Mucasal Cells, Gastroenterology, 98, 1452-1459.
- Nural, N. (2005) Sigaranın Serum Malondialdehit, Eritrosit Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesi ile Yükseltgenmiş ve İndirgenmiş Glutasyon Miktarına Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Nouroozzadeh J., Tajaddinisarmadi J., Wolff S. P. (1994). Measurement of Plasma Hydroperoxide Concentrations by the Ferrous Oxidation-Xylenol Orange Assay in Conjunction with Triphenylphosphine Anal. Biochem., 220, 403-409.
- Oldfield, J.E. (1987). The Two Faces of Selenium J. Nutr.,117/12, 2002 -2008.
- Örün, İ., Ateş, B., Selamoğlu, Z., Yazlak, H., Öztürk, E., Yılmaz İ. (2005). Effect of Varioussodiu Selenite Concentrations on Some Biochemical and Haematological Parameters Ofrainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), Fresen. Environ. Bull., 14, 1, 18-22.
- Özdemir,G. (1993). Reaktif Oksijen Partikülleri, Roche Bilimsel Eserler Serisi, Eskişehir, 4-13.
- Özer, Z., Akpınar, M., Akçay, M., Ünal, E., Güler, R., Uyanıkoğlu, A., Ergenoğlu, B., Dere, Ş., Savaşçı, Ş. (1987). Kangal Balıklı Kaplıcanın (Sivas) Bazı Kimyasal ve Biyolojik Özelliklerinin Araştırılması, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Dergisi, 5. Cilt, Eksayı, 1-34.
- Özkan A., Fıskın K. (2004). Serbest Oksijen Radikalleri, Karsinogenez ve Antioksidan Enzimler, Turkish J. Hematol. Oncol., 1, 14.
- Paglia D.E., Valentine W.N. (1967). Studies on the Quantitative and Qualitative Charecterization of Erythrocyte Glutathione Peroxidase. J.Lab.Clin. Med. 70, 158-169.
- Pamuk, F. (2000). Biyokimya, 203-204.

- Peden, D. B., Dailey, L., Degraff, W., Mitchell, J. B., Lee, J. G., Kaliner, M. A., Hohman, R. J. (1994). Hydrogen Peroxide Effects on Rat Mast Cell Function, *Americ. Jour. of Phys.*, 267, 1, 85-93.
- Perez – Campo, R., Torres, M.L., Rojas, C., Cadenas, S. ve Barja, G. (1993). A Comparative Study of Free Radicals in Vertebrates –I. Antioxidant Enzymes, *Comp Biochem Physiol*, 105, 749-755.
- Petkau, A. (1986). Scientific Basis for the Clinical Use of Superoxide Dismutase, *Canser Treatment Reviews*, 13, 17-44 .
- Rangan, U. ve Bulkey, G.B. (1993). Prospect for Treatment of Free Radical-Mediated Tissue İnjury, *Br Med Bull*, 49(3), 700-718.
- Rainbow, P. S. (1985). the Biology of Heavy Metals in the Sea, *Intern. J. Environmental Studies*, 25, 195-211.
- Rayman, M.P. (2000). The İmportance of Selenium to Human Health, *the Lancet*, 356 233-241.
- Raymond, J.S. (1986). Selenium Metabolism and Function, 4, 42-49.
- Richard, K. (1994). Nitric Oxide Synthases, *the Biochemist*, 16, 3-6
- 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.
- Sastry, K.V. ve Subhadra, K.M. (1985). In-vivo Effects of Cadmium on Some Enzyme Activities in Tissues of the Freshwater Catfish *Heteropneustes fossilis*, *Environmental Research*, 36, 32-45.
- Sasakura, C. ve Suzuki, K.T. (1998) *Inorganic Biochemistry*, 71-159.
- Sean, P., Place ve Gretchen, E. (2001). Temperature Interactions the Molecular Chaperone Hsc70 From the Eurytherml Marine Goby *Gillichthys mirabilis*, Department Biology, Arizona State Universty, Tempe, AZ, USA 85287-1501.
- Shacter, E. (2000) Protein Oxidative Damage. *Methods Enzymol*, 319, 428-436.
- Slater, T.F. (1984). Overview of Methods Used for Detecting Lipid Peroxidation, *Methods in Enzymology*, 105, 283-293.
- Sies, H. (1991). Oxidative Stres: From Basic Research to Clinical Application. *Am J. Med.*, 91, 331-338.
- Sinclair, A.J., Barnett A.H. ve Lunec, J., (1990). Free Radicals and Antioxidant Systems in Health and Disease, *British Journal of Hospital Medicine*, 3, 334-344.
- Sodergen, E. (2000). Lipid Peroxidation İn-vivo, Uppsala University, Uppsala, 61 (Yayımlanmamış).
- Su L., Wang M., Yin S., Wang H., Chen L., Sun L., Ruan D. (2008). The Interaction of Selenium and Mercury in the Accumulations and Oxidative Stress of Rat Tissues *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70, 483-489.
- Suresh, A., Sivaramkrishna, B. ve Radhakrishnaiah, K. (1993). Patterns of Cadmium Accumulation in the Organs of Fry and Fingerling of Freshwater Fish *Cyprinus carpio* Following Cadmium Exposure, *Chemosphere*, 26(5), 945-953.
- Suzuki, K.T. ve Ogra, Y. (1999). Trace elements, *Biomed. Res*, 10-95.

- Stadtman, ER., Levine, RL. (2003). Free Radical-Mediated Oxidation of Free Amino Acids and Amino Acid Residues in Proteins. *Amino Acids*, 25, 207-218.
- Steinman H.M. (1982). Superoxide Dismutases: Protein Chemistry Relationship, in LW Oberley, Ed, *Superoxide Dismutase*, Vol 1. CRC Pres, Boca Raton, FL, 11-68.
- Sturve J., Almroth B.C., Förlin L. (2008). Oxidative Stress in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Exposed to Sewage Treatment Plant Effluent, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70, (3), 446-452.
- Thomas, J.A. (1999). Including Glutathione, A Peptide for Cellular Defense Against Oxidative Stres .
- Tijssen, P. (1985). *Loboratomy Techiques in Biochemistry and Molecular Biology*, 15, 203.
- Torre, F. R., Salibian, A. ve Ferrari, L. (2000). Biomarkers Assessment in Juvenile *Cyprinus Carpio* Exposed to Waterborne Cadmium, *Environmental Pollution*, 109, 277-282.
- Tıraş, B. (1997). Solunum Sistemi İlaçları, Veteriner Uygulamalı Farmakoloji, Medisan Yayın Evi, Ankara, 2, 153-169.
- Undar, L., Akarınar, M.A. ve Yanıkoğlu, A.(1990) Where Doctor Fish Lick Disease Hospital Doctor, 10, 19-28.
- Ursini F., Maiorino M., Gregolin C. (1985). The Selenoenzyme Phospholipid Hydroperoxide Glutathione-peroxidase. *Biochim. Biphys. Acta.* 839, 62-70.
- Usmar, V.D. ve Halliwell, B. (1996). Reactive Nitrogen Species, Reactive Oxygen Species, Transition Metal İons and Vascular System, *Pharmaceutical Res*, 13, 649.
- Uysal, M. (1999). Serbest Radikaller ve Lipid Peroksitlerinin Zararları ve Organizmada Prooksidan-Antioksidan Dengeyi Etkileyen Koşullar, İstanbul Üniversitesi II.Ulusal Tıp Sualtı ve Hiperbarik Toplantısı, İstanbul, 44-53.
- Ünal, D. (1999a) Serbest Radikaller. *Sendrom. Mart*, 68-80.
- Ünal, B. (1999b). Beta Talasemi ve Glutatyon-6-Peroksidaz Enzim Eksikliğinde, MDA Düzeyi, Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Adana
- Winrow, V.R., Winyard, P.G., Morris, C.J., Blake, D.R. (1993). Free Radicals İninflammation: Second Messengers and Mediators of Tissue Destruction, *Br Med Bull* 49(3), 506-522
- Woo, P.T.K., Sin, Y.M. ve Wong, M.K. (1993). The Effects of Short-term Accute Cadmium Exposure on Blue Tilapia, *Oreochromis aureus*. *Environ. Biology of Fishes.*, 37, 67-74.
- Wu, D. ve Cederbaum, A.I. (2003). Alcohol, Oksidative Stres and Free Radical Damage. *Alcohol Research & Health*, 27(4), 277-284.
- Van, L.F. (1993). Free Radicals, *Analytical Chemistry*, 65, 12-15.
- Vaglio A. ve Landriscina C. (1999). Changes in Liver Enzyme Activity in the Teleost *Sparus Aurata* in Response to Cadmium İntoxication, *Ecotox. Environ. Safety*, 43, 111-116.

- Valentine, C. (1964). Sub-Units of the Catalase Molecule Seen by Electron Microscopy: Nature, December 26, 204, 1262-1265.
- Verbost, P.M., Flik, G., Lock, R.A.C. ve Wendelaar Bonga, S.E. (1987). Cadmium Inhibition of Ca^{2+} Uptake in Rainbow Trout Gills, Am. J. Physiol., 253, 216-221.
- Verbost, P.M., Flik, G., Lock, R.A.C. ve Wendelaar Bonga, S.E. (1989). The Movement of Cadmium Through Freshwater Trout Branchial Epithelium and Its Interference With Calcium Transport, J. Exp. Biol., 145, 185-197.
- Yagi, K. (1987). Lipid Peroxides and Human Diseases. Chem and Phy of Lipids, 45, 337-351.
- Yiğit, Ş. ve Yurdakök, M. (1996). Yeni Doğanlarda Serbest Radikallere Bağlı Hastalıklar, Çocuk Sağlığı Hastalıkları Dergisi, 39, 749-765.
- Zimmerman, B.J., Granger, D.N. (1994). Mechanisms of Reperfusion Injury, Am.J.Med.Sc., 307, 284-292.
- Zhao, L. (2001). Glutathione, A Ubiquitous Thiol, Iowa University, Free Radical and Radiation Biology Graduate Program, Iowa, 10 (Yayınlanmamış).

EK-1



T.C.
SİVAS İL ÖZEL İDARESİ
İnsan Kaynakları ve Eğitim Müdürlüğü

Sayı : M.58.0.İÖİ.0.71.00.00/ 1565-2814
Konu : Balıklı Kaplıcadaki balıklar.

05/05/2008

VALİLİK MAKAMINA

Cumhuriyet Üniversitesi Rektörlüğünün 02.05.2008 tarih ve B.30.2.CUM.0.70.00.00/658-1618 sayılı yazılılarıyla, Üniversitenin Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr. Yusuf TUTAR'ın "Cyprinidae Ailesi Aging (Yaşlanma) ve Nörodejeneratif Hastalık İçin Model Olarak Kullanılması" başlıklı projesi için Kangal İlçesi Balıklı Kaplıca'daki balıkları kullanarak çalışabilmesi gerektiği bildirilerek, gerekli iznin verilmesi istenilmektedir.

Belirtilen proje için, Kangal İlçesi Balıklı Kaplıca'daki balıkları kullanarak çalışma yapılabilmesi konusunda gerekli iznin verilmesini;

Olurlarınıza arz ederim.


Mahmut KAYHAN
Genel Sekreter

OLUR
05/05/2008

Veysel DALMAZ
Vali

Adres : Akdeğirmen mh M. Akif Ersoy Cad.-58040/SIVAS
Web Adresi : www.sivasilozelidaresi.gov.tr

Tel: 0(346)223 01 16 FAKS: 224 79 80
e-mail : sivas@sivasilozelidaresi.gov.tr

EK-2

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
DENEY HAYVANLARI
ETİK KURULU

Sayı : :B.30.2.CUM.0.01.00.00-50/241
Konu : Hayvan Etik Kurul Hk.

01/05/2008

Sayın Yrd. Doç.Dr. Yusuf TUTAR


FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ
KİMYA BÖLÜMÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA ;

01/05/2008 tarih ve 123 sayılı "Cyprinidae ailesi balıklarının aging (yaşlanma) ve nörodejeneratif hastalıklar için model olarak kullanılması" isimli Grup Araştırma Projesi Etik Kurulumuzca uygun bulunmuştur.

Prof.Dr. Erol SEZER(üye)



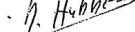
Doç.Dr. Sınan GÜRSOY (üye)



Doç.Dr. Mustafa GÜRELİK (üye)

-Kahlmadı

Yrd.Doç.Dr. İhsan HUBBEZOĞLU (üye)



Doç.Dr. Taner ERSELCAN (üye)

Kahlmadı

Yrd.Doç.Dr. Yavuz SİLİĞ (üye)



Prof.Dr.Eray BULUT (üye)



Uzm. Vet.Dr. Yücel YALMAN(Başkan Yrd.)



Yrd.Doç.Dr.Ersin TUNCER (üye)

İzini

Prof.Dr. M.Kemal YILDIRIM (Başkan)



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Merve Gökşin Karaaslan
Doğum Yeri ve Tarihi	Malatya 21.12.1985
Medeni Hali	Bekar
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi
E-posta Adresi	mgkaraaslan@gmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	20 Mayıs Turgut Özal Lisesi Malatya
Lisans	İnönü Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, 2003-2007
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı, 2007-2010