T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ZEBRA BALIĞINDA *(Danio rerio)* PEROKSİREDOKSİN 6 GENİ rs41055489 POLİMORFİZMİNİN ANTİOKSİDATİF GÖSTERGELER VE AĞIR METAL DÜZEYLERİ İLE İLİŞKİSİ

Zeynep ATASAYAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Figen Esin KAYHAN

İSTANBUL 2011

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ZEBRA BALIĞINDA *(Danio rerio)* PEROKSİREDOKSİN 6 GENİ rs41055489 POLİMORFİZMİNİN ANTİOKSİDATİF GÖSTERGELER VE AĞIR METAL DÜZEYLERİ İLE İLİŞKİSİ

Zeynep ATASAYAR
(520108015)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Figen Esin KAYHAN

İSTANBUL 2011

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana büyük emek ve katkısı bulunan, her konuda yardımlarını, ilgisini benden esirgemeyen, bilimsel katkı ve önerileri ile hep yanımda olan sevgili danışman hocam Sayın Yrd. Doç.Dr. Figen Esin KAYHAN' a teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca proje konumun belirlenmesinde ve yazılmasında, laboratuvar çalışmalarımın her basamağında, tez yazımı aşamasında kıymetli vaktini ayıran, engin bilgi birikimi ve deneyimleri ile bana destek olan Sayın Doç.Dr. Belgin SÜSLEYİ DUMAN'a sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Yüksek Lisans eğitimim süresinde yardımlarını esirgemeyen FBE Müdürü ve Biyoloji Bölüm başkanımız Sn. Prof. Dr. Meral ÜNAL'a, çalışma gruplarına ait qPZR genetik analiz sistemlerini temin eden Sn. Aykut BAYKUT'a, gerekli malzemelerin teminini ivedilikle gerçekleştiren Sn. Hatice ATLI DALLAR'a, genotipleme analizleri sırasındaki desteklerinden dolayı Sn. Mükerrem AKAYDIN'a, çalışma verilerinin istatistiksel analizini yapan Sn. Yrd. Doç. Dr. Penbe ÇAĞATAY'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince bazı ölçümlerimi laboratuarlarında yaptığım Sn. Prof. Dr. Adnan AYDIN, moleküler çalışmalarımı laboratuarında yaptığım Sayın Doç. Dr. Belgin SÜSLEYİCİ DUMAN, Sayın Yrd. Doç. Dr. Şener AKINCI, Sayın Dr. Nüzhet Cenk SESAL ve teknik desteklerinden dolayı Sn. Dr. Sebahattin DENİZ'e şükranlarımı sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımda optimizasyon çalışmaları ve çok yoğun deneysel aşamalarda gerek bilimsel yardımlarını gerekse dostluklarını esirgemeyen arkadaşlarım Sn.Uzm. Bio. Meliha KOLDEMİR ve Sn.Uzm. Bio. Güllü KAYMAK'a teşekürlerimi sunarım.

Manevi desteklerini her zaman hissettiğim sevgili arkadaşım Uzm. Bio. Öğrt. Çiğdem KAHVECİ'ye teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Benim bugünlere gelmemi sağlayan, destek ve güveniyle her zaman yanımda olan, en büyük fikir danışmanım çok sevgili annem Asuman Soydan ATASAYAR' a, sevgili babam Mustafa ATASAYAR'a ve sevgili kardeşlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2011 **Zeynep ATASAYAR**

İÇİNDEKİLER

SAYFA

TEŞEKKÜR……..……..…...i

İÇİNDEKİLER…….....…….....ii

ÖZET……..…….....vii

ABSTRACT…….....……...ix

SEMBOLLER…….....x

KISALTMALAR…….....xii

ŞEKİLLER…….....xiv

TABLOLAR……..…….....xvii

BÖLÜM I. GİRİŞ VE AMAÇ……...…….……...1

I.1 GİRİŞ VE AMAÇ…….....1

BÖLÜM II. GENEL BİLGİLER…….....3

II.1 AĞIR METALLER…….…3

II.1.1 Kadmiyum**……6**

II.1.2 Bakır**…….……7**

II.1.3 Çinko**……8**

II.2 OKSİDATİF STRES VE OKSİJEN RADİKALLERİ……...….10

II.2.1. Metabolizmada Serbest Radikal Kaynakları**……..14**

II.2.2 Serbest Radikallerin DNA üzerine etkileri**……16**

II.2.3 Serbest Radikallerin Proteinler üzerine etkileri**…….……16**

II.3 ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ……...…17

II.3.1 Antioksidan etki tipleri**……...……18**

II.3.2 Katalaz (CAT)**……18**

II.3.3 Glutatyon (GSH)**……...…19**

II.3.4 Lipit Peroksidasyonu**…….21**

II.3.5 Antioksidan Moleküllerin Metal İyonları ile Etkileşimi**……...,22**

II.3.5.1. Kadmiyum ve Oksidatif Stres**……...22**

II.4 AĞIRMETALLERİN ANTİOKSİDATİF METOBOLİZMADAKİ ETKİLERİ……..……..……...23

II.4.1 Kadmiyum /Çinko /Bakır Ağır Metalleri - Glutatyon Metobolizması İlişkisi**……...…23**

II.5 ZEBRA BALIĞININ GENEL ÖZELLİKLERİ…….25

II.5.1 Zebra Balıklarının Sistematikteki Yeri**……...…25**

II.5.2 Zebra Balığı (*Danio rerio*) **……26**

II.5.3 Zebra Balığının Üremesi**……26**

II.5.4 Zebra Balığı ile Çalışmanın Avantajları**……27**

II.5.5 Solungaçların Yapı ve İşlevleri**…….28**

II.6 GENETİK POLİMORFİZM……...….31

II.6.1 Polimorfizm Çeşitleri**…….32**

II.6.1.1 Tek Nükleotid Değişimi (Single Nucleotide Polymorphism: SNP)**…….32**

II.6.1.2 İnsersiyon**……..33**

II.6.1.3 Delesyonlar**……33**

II.6.2 SNP'lerin Proteinlerin Yapı ve Fonksiyonlarına Etkileri**……..35**

II.7 KANTİTATİF POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU……35

II.7.1 Erime Eğrisi Analizi**……..….36**

II.7.2 Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonun Kullanım Alanları**…….36**

II.7.3 Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyon Sisteminin Avantajları**……..37**

II.7.4 Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyon Sisteminin Dezavantajları**….37**

II.8 KANTİTATİF POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONUNDA KULLANILAN BOYA VE PROB SİSTEMLERİ……..…..37

II.8.1 SYBR Green I Boyası**……37**

II.8.2 Diziye Özel Floresans İşaretli Problar**……40**

II.8.2.1 *TaqMan*® Probu**……...40**

II.8.2.2 Moleküler Boncuk Yöntemi**…….42**

II.8.2.3 Scorpiyon Primerler…….....**43**

II.8.2.4 *Simple* Prob……..**44**

II.8.2.5 Florosans Rezonan Enerji Transferi (FRET analizi, Hibridizasyon Prob Yöntemi)……..…**44**

II.9 PEROKSİREDOKSİN 6 GENi YAPI VE ÖNEMİ……..…46

II.9.1 Zebra Balığında Prx 6 Geninin Yapısı…….……**48**

II.9.2 rs41055489 Polimorfizmi……..…**49**

BÖLÜM III. ÇALIŞMALAR……50

III.1 MATERYAL…….……...….50

III.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler……..…….**50**

III.1.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler…….…..……..**50**

III.1.1.2 Çalışmada Kullanılan Çözeltiler……..…**51**

III.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar…….**52**

III.1.3 Çalışma Grubu……. **53**

III.1.3.1 Çalışmada Kullanılan Balıklarının Akvaryum Ortamına Uyumu ……..……**53**

III.1.3.2 Çalışma Materyali……..…**53**

III.1.3.3 Çalışmada Kullanılan Akvaryum Sistemleri Yem ve Yemleme Düzenleri……...……**53**

III.1.3.4 Çalışmada oluşturulan deney grupları……...**54**

III.2 KULLANILAN İNCELEME YÖNTEMLERİ……..…55

III.2.1 Balık Dokularından Genomik DNA İzolasyonu……..…**55**

III.2.2 DNA Miktarının Ölçülmesi……..…**57**

III.2.3 Prx-6 Geni Çoğaltılması ve rs41055489 Polimorfizminin Tespiti İle İlgili Yöntemler……**58**

III.2.3.1 Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile rs41055489 Genotiplerinin Belirlenmesi……**59**

III.2.3.2 Prx6 Geni rs41055489 Genotiplerinin Belirlenmesinde Kullanılan Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyon Protokolü.**62**

III.2.5 LİPİT PEROKSİDASYONU VE ANTİOKSİDANLARIN TAYİNİ……66

III.2.5.1 %10 Gramlık Doku Homojenatının Hazırlanması**……66**

III.2.5.2 Solungaç Dokusunda Protein Tayini**……67**

III.2.5.3 Solungaç Dokusunda Malondialdehit (MDA)Tayini**……69**

III.2.5.4 Solungaç Dokusunda İndirgenmiş Glutatyon Tayini**……70**

III.2.5.5 Solungaç Dokusunda Katalaz Aktivitesi Tayini**……...72**

III.2.6 İstatistiksel Analiz**……73**

BÖLÜM IV. SONUÇLAR VE TARTIŞMA…….…....74

IV.1 SONUÇLAR…….....74

IV.2 TARTIŞMA……..……79

KAYNAKLAR……...……85

ÖZGEÇMİŞ

ÖZET

ZEBRA BALIĞINDA *(Danio rerio)* PEROKSİREDOKSİN 6 GENİ rs41055489 POLİMORFİZMİNİN ANTİOKSİDATİF GÖSTERGELER VE AĞIR METAL DÜZEYLERİ İLE İLİŞKİSİ

Bu çalışma, ağır metallere karşı antioksidatif savunma mekanizmalarının göstergesi olan antioksidan enzim seviyeleri ile Peroksiredoksin6 (Prx6) rs41055489 gen polimorfizmi arasındaki ilişkilerin incelendiği ilk araştırmadır. Peroksiredoksinler (Prx), aktif redoks sistein kalıntılarının hidrojen peroksidi indirgemesinde kullanılan peroksidaz tipinde enzimlerdir. Çalışmamızda farklı subletal dozlarda ağır metaller (bakır, çinko, kadmiyum) uygulanmış zebra balıklarının solungaç dokularında Lipit peroksidasyon (LPO) Malondialdehit (MDA), antioksidatif enzimler olan Glutatyon (GSH), Katalaz (CAT) ve total protein seviyeleri incelendi. Bu çalışma, bakır, çinko ve kadmiyumun 0.1 ppm, 0.5 ppm, 1 ppm ve 5 ppm'lik subletal dozlarına maruz bırakılan zebra balıklarında *(Danio rerio)* yapıldı. Bu ağır metallere maruz bırakılan zebra balıklarında GSH, MDA, CAT ve total protein seviyeleri ölçüldü ve Prx6 geni rs41055489 genotipleri qPZR yöntemiyle saptandı. Sonuç olarak, ağır metallerin en düşük subletal dozlarının bile hücredeki antioksidan savunma mekanizmalarını aktive ettiği belirlenmiştir. Prx6 rs41055489 gen polimorfizminin heterozigot formunun, mevcut savunma mekanizmalarının çalışmasını engellediği gözlenmiştir.

HAZİRAN 2011 **Zeynep ATASAYAR**

ABSTRACT

THE RELATIONSHIP OF PEROXIREDOXIN 6 rs41055489 GENE POLYMORFISM WITH ANTIOXIDATIVE INDICATORS AND HEAVY METAL LEVELS IN ZEBRA FISH *(Danio rerio)*

This is the first study examining the antioxidative defence mechanisms against heavy metals, searching for relationship between enzyme levels and Peroxiredoxin 6 (Prx6) rs41055489 gene polymorphism. Peroxiredoxins (Prx) are peroxine type enzymes which use redox active cysteine residues. In our study, Lipid peroxidation (LPO) Malondialdehyde (MDA), antioxidant enzymes such as Glutathione (GSH), Catalase (CAT) and the total protein levels in the gill tissues of zebrafish have been analysed as a response to sublethal doses of heavy metals (Cu, Zn, Cd). The study was performed on zebrafish exposed to 0.1 ppm, 0.5 ppm, 1 ppm and 5 ppm doses of copper, zinc and cadmium. The GSH, MDA, CAT and total protein levels have been measured and the Prx6 gene rs41055489 genotypes were determined with qPCR method in heavy metal exposed zebrafish. In conclusion, the lowest sublethal doses of heavy metals have been found activate cellular antioxidative defence mechanisms. Prx6 rs41055489 heterozygous gene polymorphism have been observed to inhibite present defence mechanisms.

JUNE 2011 **Zeynep ATASAYAR**

SEMBOLLER

Al : Alüminyum

°C : Derece Celcius

Ca : Kalsiyum

Cd : Kadmiyum

cm : Santimetre

Cu : Bakır

dk : Dakika

dl : Desilitre

Fe : Demir

g : Gram

Hg : Cıva

H_2O_2 : Hidrojen Peroksit

kb : Kilobaz (1000 nükleotid)

KCl : Potasyum klorür

kg : Kilogram

$KHCO_3$:Potasyum bi karbonat

l : Litre

M : Molar

m^2 : Metre kare

mg : Miligram

ml : Mililitre

mm : Milimetre

mM : Milimolar

µM : Mikromolar

µg : Mikrogram

µl : Mikrolitre

$MgCl_2$: Magnezyum klorür

NaCl : Sodyum klorür

NaOH : Sodyum hidroksit

NH_4Cl : Amonyum klorür

ng : Nanogram

nm : Nanometre (Gram'ın milyarda biri)

NO^- : Nitrik Oksit Radikali

$O_2^{\cdot -}$: Süper Oksit Radikali

Pb : Kurşun

ppm : mg/l

rpm : Dakikada dönme sayısı

ROO^- : Peroksil Radikali

Zn : Çinko

KISALTMALAR

BSA : Sığır Serum Albümin
CAT : Katalaz
DTNB : Ellman Reaktifi (5-5'- Ditiyobis-(2-Nitrobenzoik Asit))
EDTA : Etilendiamin Tetraasetikasit
EU : Enzim Ünitesi
GSH : İndirgenmiş Glutatyon
GSH-Px : Glutatyon Peroksidaz
GSH-Rd : Glutatyon Redüktaz
GST : Glutatyon-S-Transferaz
MDA : Malondialdehit
MT : Metallotiyonein
ROS : Reaktif Oksijen Türleri
SF : Serum Fizyolojik
SOD : Süperoksit Dismutaz
TBA : Tiyobarbitürik Asit
TCA : Trikloroasetik Asit
C : Sitazin
G : Guanin
PRX-6 : Peroksiredoksin 6 geni
PZR : Polimeraz zincir reaksiyonu
qPZR : Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
OD : Optik Dansite
SNP :Tek nükleotit polimorfizmi
T :Timin

ŞEKİLLER

Şekil II.1 Doğada Elementlerin Taşınma Yolları……...….**4**
Şekil II.2 Ağır Metallerin Balıklarda Vücuda Alınımı ve Dağılımı……**6**
Şekil II.3 Endojen Serbest Radikal Kaynakları……...…….**14**
Şekil II.4 Eksojen Serbest Radikal Kaynakları……...…….**15**
Şekil II.5 Glutatyon Yapısı…….....**20**
Şekil II.6 Oksidatif Stres'de Kadmiyumun Rolü……..**23**
Şekil II.7 Zebra Balıklarının Genel Morfoloji…….……..**26**
Şekil II.8 Solungaçların Yapısı…….……**28**
Şekil II.9 Solungaçlardan Amonyak Atılımının Mekanizması……..…**29**
Şekil II.10 Balıklarda İyon Değişiminin Mekanizması…….**30**
Şekil II. 11 Solungaçlardan Kalsiyum Absorbsiyonu ……...…**31**
Şekil.II.12 Transisyonla Tek Nükleotid Değişimin Gösterilmesi…….…..…**33**
Şekil II.13 Transisyon ve Transversiyonla Tek Nükleotid Değişimi……....**34**
Şekil II.14 İnsersiyonla (nükleotid eklenmesi) Çerçeve Kayması……...……**34**
Şekil.II.15 Delesyon ile Çerçeve Kayması……...**34**
Şekil II.16 SYBR Green'in Kimyasal Yapısı…….....**38**
Şekil II.17 Sybr Green I Floresansının Çift İplikli DNA Molekülüyle Birleşmiş Hali……...…..**38**
Şekil II.18 SYBR Green Yöntemi……..……...**39**
Şekil II.19 Sybr Green I Yöntemi Kullanılarak Elde Edilmiş Çift İplikli Hedef DNA'nın Termal Denatürasyon Eğrisi….……**40**
Şekil II.20 *Taq Man* Prob Yöntemi……...……**41**
Şekil II.21 Moleküler Boncuk yöntemi……..**43**
Şekil II.22 Scorpiyon Primerlerle qPZR……....**44**
Şekil II.23 Hibridizasyon prob yöntemi ……....**45**
Şekil II.23 Hibridizasyon prob yöntemi ……...….**45**
Şekil II.25 Zebra balığı*'* na (*Danio rerio)* ait Prx6 geni FASTA'sı…….….**48**
Şekil II.26 Zebra balığına ait Prx6 geni rs41055489 polimorfizmi FASTA dizisi…**49**
Şekil III.1 Dokudan genomik DNA izalasyonu……....**56**
Şekil III.2 Zebra balıklarından solungaç dokularının ayırılması……..**56**

Şekil III.3 Kullanılan *High Pure PCR Template Preparation*……..…56
Şekil III.4 Solungaç dokularının tartımı ve homojenize edilişi…….……...57
Şekil III.5 DNA'nın miktar ve saflığının spektrofotometrik olarak…….…58
Şekil III.6 *LightCycler*® 2.0 kapiller sistemi, Roche……62
Şekil III.7 *LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe* kiti……..…62
Şekil III.8 *LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe* kiti, kapillerler ve soğuk blok……63
Şekil III.9 Cam kapillerlere qPZR reaksiyon karışımının dağıtılması……..…63
Şekil III.10 Cam kapillerlerin qPZR cihazına yerleştirilme işlemi……....64
Şekil III.11 Tm: 59.35 ve 63.65^{0}C. rs41055489 heterozigot tip genotip (A/C)…....64
Şekil III.12 Tm: 57.09^{0}C. r41055489 yabanıl tip genotip (A/A) ……..65
Şekil III.13 Tm: 0^{0}C. Negatif kontrole ait erime eğrisi……..65
Şekil III.14 Solungaç Dokularının Dismembratörde Parçalanması ……67
Şekil III.15 Doku Homojenizasyon işlemleri……67
Şekil III.16 Standartların Renk Göstergesi……68
Şekil III.17 MDA Tayinindeki Su Banyosu ve Santrifüj İşlemleri……..…70
Şekil III.18 GSH Tayinindeki Bazı Deneysel İşlemler……..71
Şekil III.19 Spektrofotometrik Ölçümler……...…73

TABLOLAR

Tablo II.1 Serbest Radikaller ve Yol Açtıkları Reaksiyonlar…….....**12**

Tablo II.2 Biyolojik Önemi Olan Reaktif Oksijen Türleri…….…..**13**

Tablo III. 1 Deney Grupları……...…**54**

Tablo III.2 Peroksiredoksin-6 geni rs41055489 polimorfizmi qPCR reaksiyon karışımı içeriği……**60**

Tablo III.3 LightCycler® Programı…….….**60**

Tablo III.4 Prx-6 geni rs41055489 polimorfizmine ait standart erime grafiği…….**61**

Tablo IV.1 Kontrol Grupta ve Farklı Bakır Konsantrasyonları Uygulanmış Zebra Balıklarının Solungaç Dokularında Ölçülen Antioksidatif, Lipit peroksidasyon ve Total Protein Miktarları…….**75**

Tablo IV.2 Kontrol Grupta ve Farklı Çinko Konsantrasyonları Uygulanmış Zebra Balıklarının Solungaç Dokularında Ölçülen Antioksidatif, Lipit peroksidasyon ve Total Protein Miktarları……**76**

Tablo IV.3 Kontrol Grupta ve Farklı Kadmiyum Konsantrasyonları Uygulanmış Zebra Balıklarının Solungaç Dokularında Ölçülen Antioksidatif, Lipit peroksidasyon ve Total Protein Miktarları……...**77**

Tablo IV.4 Çalışma Gruplarına Ait Prx6 Geni rs41055489 Genotip Sıklıkları…..**78**

BÖLÜM I

GİRİŞ VE AMAÇ

I.1 GİRİŞ VE AMAÇ

Yeryüzündeki tüm doğal sular ağır metal içermektedir. Ancak günümüzde endüstriyel gelişme, kentleşme ve modern tarımın yaygınlaşması doğadaki ağır metal yükünü önemli oranda arttırmıştır. Deniz, göl ve akarsular gibi su kaynaklarının atıklar için alıcı ortam olarak kullanılması sonucu, derişimleri sürekli artan ağır metaller sucul organizmalar tarafından bünyelerine alınmaktadır. Bu da besin zinciri aracılığıyla tüm canlılara ulaşmaktadır. Ağır metaller besin zinciri boyunca metabolik bakımdan aktif doku ve organlarda birikmektedir. Bu birikim de hücresel ve moleküler düzeyde işlevsel ve yapısal bozukluklara sebep olmaktadır.

Peroksiredoksinler (Prx) aktif redoks sistein kalıntılarının hidrojen peroksidi indirgemesinde kullanılan peroksidaz tipinde enzimlerdir [1]. Prx'lerin en önemli görevi organik hidroperoksit (ROOH), peroksinitrit ($ONOO^-$) ve hidrojen peroksitlerin (H_2O_2) zehir etkisini azaltmak veya yok ederek antioksidatif etki göstermeleridir [2].

Lipit peroksidasyon düzeyi, malondialdehit (MDA) gibi lipit peroksidasyonu sırasında oluşan ara ürünler aracılığı ile tayin edilebilmektedir. Katalaz (CAT), ve glutatyon (GSH), artmış oksidatif stresle başa çıkacak birincil antioksidan koruyuculardır. CAT, ortamda oluşan H_2O_2' yi okside edici enzimlerin etkisiyle

direkt olarak suya dönüştürür. GSH ise, H_2O_2 ve organik peroksitlerin GPx etkisi ile indirgenmesinde ve ksenobiyotiklerin merkaptürat yolu ile detoksifikasyonunda yer almaktadır. Ayrıca, GSH serbest sülfidril grubu aracılığıyla H_2O_2, O_2-., HO. ve alkoksil radikalleri (RO.) ile etkileşime girebilmekte, böylece hücreyi oksidanların, elektrofilik maddelerin, serbest radikallerin hasarına karşı korumada önemli bir rol üstlenmektedir .

Sanayi atıkları, eksoz dumanları, maden ocakları, çeşitli metal ve kağıt endüstrilerinin atık suları, gübreler, fosil yakıtlar, pestisitler, çeşitli kimyasallar ve evsel atıklar aracılığıyla sürekli maruz kalınan ağır metallere karşı insan genomu ile yakın benzerlik gösteren bir model organizma olan zebra balığının gösterdiği antioksidatif savunma mekanizmalarının göstergesi olan enzim ve yan ürün seviyelerinin, antioksidatif etki gösteren temel genlerden Prx-6 rs41055489 polimorfizmi ile ilişkilerinin incelendiği ülkemizdeki ilk çalışma olma niteliğini taşımaktadır. Çinko (Zn), kadmiyum (Cd) ve bakır (Cu) gibi ağır metallerin farklı subletal düzeydeki seviyelerine maruz bırakılan zebra balıklarının bu ağır metaller ile ilk temas kuran solungaçlarında meydana gelen antioksidatif savunma mekanizmaları ile ilişkili GSH, CAT ve MDA düzeylerinin belirlenmesi çalışmamızın amaçlarından biridir. Ayrıca, zebra balıklarının solungaçlarında ölçülen antioksidatif göstergelerin Prx6 geni rs41055489 genotipleri ile ilişkilerinin belirlenmesi çalışmamızın bir diğer amacıdır.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

II.1 AĞIR METALLER

Endüstri ve uygarlığın temelini oluşturan metaller organizmalar için hayati öneme sahiptir [4,5]. Metaller, toksik özellikte maddelerdir. Metallerin diğer toksik maddelerden ayırıcı özelliği sadece doğal halde bulunmalarıdır. Metallerin organizmaya giriş yolları; çevresel taşınım sonucu besinler ve içme suları ile, insanlar tarafından ya da antropojenik olarak hava, su, toprak, besinler yolu ile gerçekleşebilir. Periyodik tabloda bulunan 105 elementten 80 kadarını metaller oluşturur. Kadmiyum (Cd), alüminyum (Al), kurşun (Pb), civa (Hg), ve manganez (Mn) gibi ağır metaller biyolojik sistemlerle etkileşerek ciddi sağlık sorunlarına yol açabilir [6].

Metaller biyolojik olarak 3 grupta incelenebilir [7]:

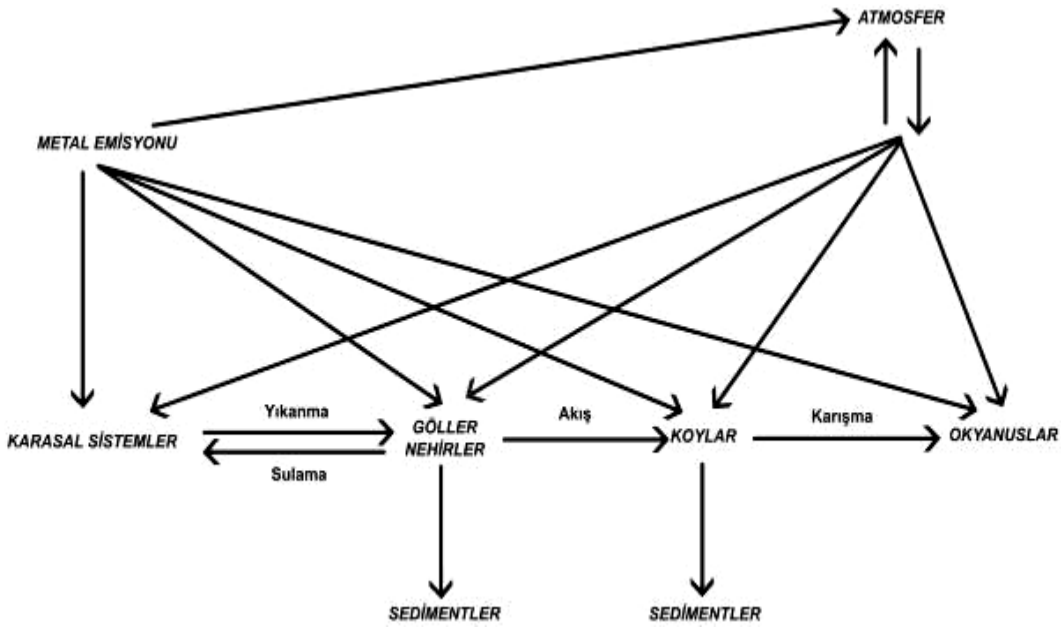
1. Esas elementler (Hafif metaller): Sodyum, potasyum, kalsiyum gibi sıvı ortamlarda hareketli katyonlar olarak taşınırlar.

2. Yan elementler (Geçiş elementleri): Demir, bakır, kobalt, mangan gibi düşük konsantrasyonlarda esansiyel olan, yüksek konsantrasyonlarda ise toksik etki gösteren metallerdir.

3. İz elementler (Metalloitler): Civa, kurşun, kadmiyum, kalay, arsenik gibi metabolik aktiviteler için sıklıkla ya da hiç kullanılmayan fakat çok düşük konsantrasyonlarda hücrede toksik etki gösteren metallerdir.

Yan elementler ve iz elementler literatürde ağır metal olarak adlandırılırlar. Maden ocakları, çeşitli metal ve kağıt endüstrilerinin atık suları, gübreler, fosil yakıtlar, pestisitler, çeşitli kimyasallar ve evsel atıklar, ağır metallerin doğaya karışmasına sebep olan başlıca kaynaklardır [8].

Ekosistemin büyük bölümünü oluşturan su ortamı, pek çok atığın bulunduğu bölgedir. Ekosistem kirliliğinin en büyük kaynağı ağır metallerdir. Doğal sular, toksik etki oluşturmayacak şekilde ağır metal içermektedir. Ancak günümüzde endüstriyel gelişme, kentleşme ve modern tarımın yaygınlaşması, doğadaki ağır metal yükünü önemli derecede arttırmaktadır [9].



Şekil II.1: Doğada Elementlerin Taşınma Yolları [10].

Deniz, göl ve akarsular gibi su kaynakları atıkların yoğun olarak bulunması sonucu derişimleri sürekli artan ağır metaller, sucul organizmalar tarafından alınmaktadır. Böylece ağır metaller besin zinciri aracılığıyla tüm canlılara ulaşmakta ve aktif doku ve organlarında birikmektedir. Organizmalarda metal birikimi hücresel ve moleküler düzeyde işlev ve yapı bozukluklarına sebep olmaktadır [11].

Bazı metaller çok yüksek derişimlere ulaştıklarında organizmada depolanmaya başlarlar. Canlının ağır metale maruz kalma süresi ve ortamın derişimi organizmada birikme sınırını etkileyen faktörlerdendir. Literatür araştırmaları, balıkların metabolik olarak aktif organlarında öldürücü olmayan derişimlerde daha fazla birikmesinin, en yüksek düzeyde karaciğerde, en düşük düzeyde ise kas dokusunda depolandığını rapor etmektedir [9].

Sucul organizmalardaki ağır metal birikimi canlının türüne, metalin özelliklerine, derişimine, canlıya etki süresine, canlının hangi gelişme evresinde

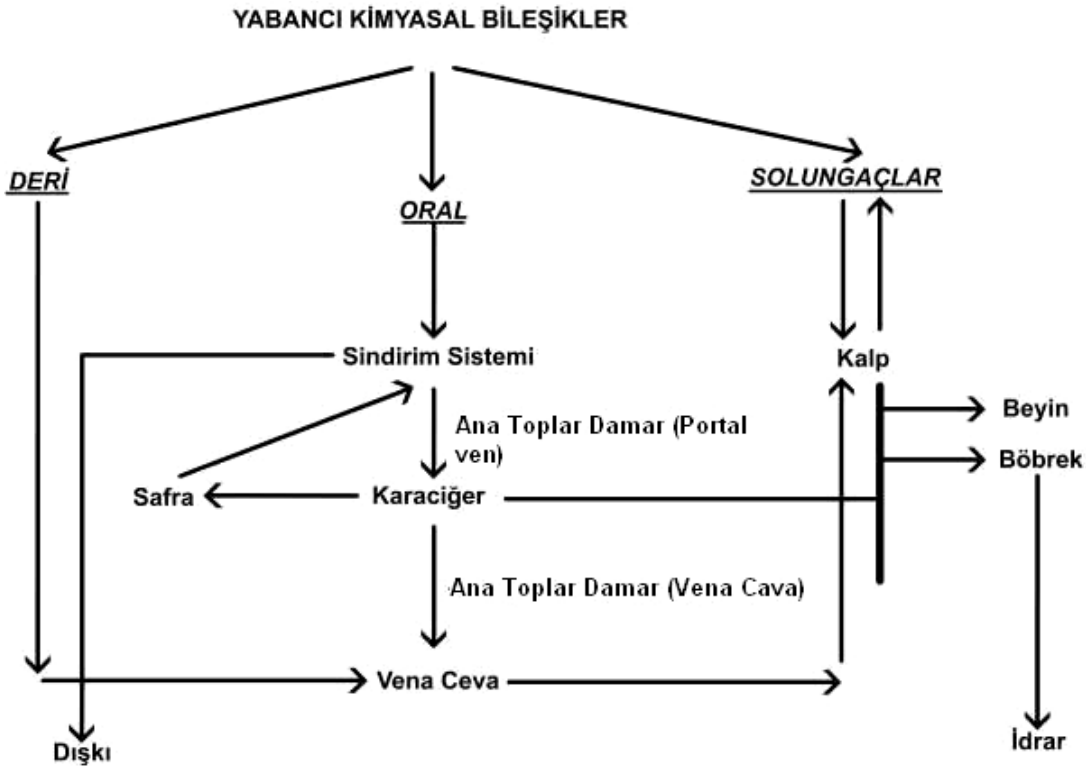
olduğuna ve ortamın fiziksel/ kimyasal özelliklerine bağlı olarak değişebilmektedir [11].

Karnivor balıkların vücutlarındaki ağır metal konsantrasyonu, herbivor balıklara kıyasla daha yüksektir. Besin zincirinin üst basamaklarında bulunan balıklar besin yoluyla diğer canlılarda bulunan metalleri de aldıklarından fazla biriken metaller akut veya kronik zehirlenmelere yol açarlar [7]. Metaller doğal su ortamlarında serbest iyonlar, inorganik veya organik bileşikler ya da partikül maddelerle absorbe şekilde bulunabilirler. Doğal su ortamlarının sedimenti içinde, çökmüş veya absorbe olmuş metaller, fiziksel ve kimyasal yollarla iyonik forma dönüşerek toksik etki gösterebilirler.

Sucul ortamda farklı formlarda bulunabilen metaller su canlılarının vücutlarında birikirler. Birikim aşağıda belirtildiği gibi gerçekleşir [9]:

1. Su bulunan çözünmüş veya organik moleküllere bağlı iyonların su ile beraber alınmasıyla,
2. İçinde metalleri biriktirmiş besin maddelerinin alınmasıyla,
3. Yüzeylerinde ağır metalleri adsorbe etmiş sestonlar ile,
4. Toksik metal iyonları ile organizmaların ürettiği bazı maddeler arasındaki çekim nedeni ile ortaya çıkan absorbsiyon yoluyla.

Ağır metaller, balıkların solungaç dokularındaki epitel hücreleri üzerine hipertrofi (organ büyümesi), hiperplazi (organ küçülmesi) ve proliferasyon (hücre sayısının artışı) şeklinde etki etmektedir [9].



Şekil II.2: Ağır Metallerin Balıklarda Vücuda Alınımı ve Dağılımı [10].

II.1.1 Kadmiyum

Kadmiyum (Cd) sucul organizmalarda biyolojik etkisi olmayan, antropojenik ve endüstriyel aktivitelere (kömür üretimi, madensel atıklar, çinko rafinerisi, demir ve çelik ürünleri, pestisit ürünleri) bağlı olarak doğal ortamda seviyeleri artan toksik bir elementtir. Tatlı sularda, Cd^{+2} 0.1 µg/L'den küçük derişimlerinde bulunurken, insan kaynaklı atıkların karışabildiği su ortamlarında ise bu değer birkaç µg/L veya daha yüksek düzeylere çıkabilmektedir [12,13]. Kısa süreli Cd^{+2} etkisi sonrasında sucul canlılarda hemotolojik etkiler, Ca^{+2} homeostazisinde bozulmalar, iyonların düzenlenmesinde görev alan böbrek, solungaç ve bağırsak dokularında histolojik ve morfolojik değişiklikler, hücre dışı sıvılarda iyon derişiminde değişiklikler ve ozmo-düzenlenim kapasitesinde değişimler gözlenebilmektedir [13]. Cd^{+2}'un, çevre çalışmalarında sıklıkla kullanılmasının sebepleri arasında, toksik etki göstermesi, çevrede yaygın dağılımı ve çok düşük düzeylerinin organizmalarda yan etkilere yol açmasıdır. Balıklarda Cd^{+2}, karaciğer, beyin, sinir sistemi, böbrek, dalak ve kemikte patolojik lezyonlar, büyümede gerilik, solungaçlarda Ca^{+2} alımında inhibisyon ve karaciğer fonksiyonlarında değişikliğe neden olmaktadır. Cd^{+2} balıkların çeşitli

enzim sistemlerini etkileyerek, nörotransmisyon, transepitelyal taşınma, bağışıklık sistemi, oksidazlar gibi temel fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmalarını bozabilmektedir. Bununla birlikte Cd^{+2}, solungaçlarda iyon taşınmasında görevli olan Na^{+} / K^{+} - ATPaz'ı inhibe ederek iyon geçirgenliğinde artışa neden olmaktadır [14,15]. Cd^{+2} alınımı çoğunlukla yüksek affiniteli Cd^{+2} kanallarıyla gerçekleşmektedir. Solungaç filament yapısının Cd^{+2} ile değiştiği bildirilmiştir [16]. Cd^{+2}'nin hücrelerdeki enzim havuzlarından Zn^{+2} ve Cu^{+2} ile yer değiştirerek bakır ve çinko dengesini bozduğu bilinmektedir [17]. Cd^{+2} karaciğerde metallothionein'e (MT) bağlanarak kompleks şeklinde böbreklere taşınmaktadır.

II.1.2 Bakır

Doğada çok yaygın olarak bulunan bakır (Cu^{+2}), organizmalar için eser miktarlarda gereksinim duyulan bir elementtir. Sulardaki doğal derişimi ≤5 μg/L olan Cu^{+2}'nin endüstride ve tarımdaki yaygın kullanımı, su ortamlarında Cu^{+2} derişiminin istenilmeyen düzeylere çıkmasına neden olmaktadır. Önemli bir metalloenzim bileşeni olan Cu^{+2}, süperoksit dismutaz, lizil oksidaz, askorbik asit oksidaz, sitokrom oksidaz, monoamin oksidaz gibi enzimlerin prostetik grubudur [18]. Omurgalıların plazmasında bulunan seruloplazmin, beyinde bulunan serebrokuprein, karaciğerde hepatokuprein ve arthropodlarda solunum pigmenti olan hemosiyanin bakır içeren proteinlerdir [19]. Hücrelerdeki fazla miktarda Cu^{+2} bulunması, genotoksik ve sitotoksik etkilere neden olmaktadır. Cu^{+2} toksik etkisini, lipit peroksidasyonu yaparak, DNA'ya zarar vererek ve Ca dengesini bozarak gerçekleştirmektedir. Cu^{+2}'ın normal fonksiyonlarının MT ve GSH'lar tarafından düzenlendiği ve aşırı Cu^{+2} alımında hücrelerde bakır birikimi gerçekleştiği saptanmıştır. Balık hücrelerine Na^{+}'ya duyarlı yollar aracılığıyla giren Cu^{+2}, mide ve bağırsak çeperinden plazmaya geçerek albumin ve aminoasitlerle bağlanır ve karaciğer yada böbreklere taşınır. Karaciğerde MT'lere bağlanarak depo edilen Cu^{+2}, seruloplazmin aracılığıyla diğer dokulara taşınır [20]. Tatlı su balıklarında Cu^{+2}'nin toksik etkisinin gözlendiği birincil bölgenin solungaçlar olduğu belirtilirken karaciğer, solungaç ve bağırsakların Cu^{+2} birikimini düzenleyen organlar olduğu bilinmektedir [21,22]. Su kaynaklı Cu^{+2} etkisinin besin kaynaklı Cu^{+2} etkisinden daha toksik olduğu bilinmektedir. Cu^{+2}, hücre membranlarından Cu veya Cu^{+2} iyonu şeklinde geçmektedir ve bu yüklü iyonlar membran potansiyelindeki değişikliklerden etkilenmektedir [23,24]. Sucul organizmalarda Cu^{+2}, Na^{+} dengesinde bozukluklara, indirgenmiş plazma osmolaritesi

ile düşük Na^{+} ve Cl^{-} derişimlerine neden olması da bu metalin osmoregülatör toksikant olarak kabul edilmesine yol açmıştır [25]. Bu etki, solungaç epitelinin bazolateral membranında bulunan Na^{+}/ K^{+}-ATPaz aktivitesinin inhibisyonuna bağlı olarak solungaç düzeyinde iyon alımının azalması ile ilişkilidir [26]. Atlı ve Canlı (2007), Cu^{+2} etkisinde kalan *O. niloticus*'un solungaç Na^{+}/ K^{+}- ATPaz aktivitesinin önemli ölçüde engellendiğini, buna karşılık alkalen fosfataz aktivitesinin ise arttığını göstermişlerdir [27].

Hücreler yüksek konsantrasyonlarda Cu^{+2}'a maruz kaldıklarında MT, Cu^{+2} şelatörü olarak antioksidan fonksiyon gösterir. Zn-tarafından indüklenen MT de, hücre içinde bulunan Cu^{+2}'ı bağlama kapasitesine sahiptir ve bakırın redoks döngüye girme yolundaki aktivitesini durdurur, membran fosfolipitlerinde Cu-bağımlı olarak ortaya çıkan oksidatif hasarı engeller ve HL- 60 hücrelerinde Cu-nedeniyle ortaya çıkabilecek olan programlı hücre ölümünü engeller [28]. Ancak Cu-MT doygunluğa ulaştığında, MT'ye bağlanamayan veya serbest kalan Cu iyonlarının, oksidatif hasara yol açtığı düşünülmektedir [29].

Böbrek glomerüllerinden Cu^{+2}' taşıyıcı metellotiyoneinler ile böbrek korteks hücrelerine taşınan Cu, metal bağlanmamış MT'ler olan apo-MT'ler ile birleşir. Yapısına Cu veya Zn metalini bağlamış olan metallotiyoneinler (Cu-MT veya Zn-MT), yaklaşık 30 dakika içinde parçalanmak üzere lizozomlara taşınır. MT'ler parçalandıktan sonra serbest kalan Cu ve Zn metalleri DNA'yı tekrar MT sentezlenmesi için indükler, böylelikle MT'lerin böbrek korteks hücrelerindeki lizozomal döngüsü devam eder. MT'lerin lizozomlardaki parçalanması yeni MT'lerin sentezlenmesine neden olmaktadır [28].

II.1.3 Çinko

İnsan ve hayvanlarda hızlı bölünen dokularda; nükleik asit metabolizması, protein sentezi, diğer metabolik işlemler, büyüme, immün fonksiyonlar, hormon aktivasyonu, hormon sentezi ve taşınması, tüm organ sistemlerinin gelişmesi ve üreme için gerekli olan bir elementtir. 300'den fazla enzim katalitik görevlerini yapabilmek ve birçok protein, yapılarını koruyabilmek için çinkoya (Zn) ihtiyaç duymaktadır .Zn^{+2} içeren enzimlerin tüm türlerde genetik materyalin replikasyonu, transkripsiyonu ve translasyonunda görev aldığını vurgulamıştır. Zn^{+2}, doğrudan kataliz reaksiyonlarında görev alarak transformasyona uğrayan substrat ile

etkileşebilmekte veya protein konformasyonunun stabilizasyonunda gerekli olabilmektedir. Superoksid dismutaz, DNA polimeraz ve karbonik anhidraz gibi enzimlerin kofaktörü olan Zn, birçok biyokimyasal olayda rol oynar. Zn dengesindeki herhangi bir değişiklik, yapılarında bulundukları enzim ve proteinlerin aktivitelerini etkiler.

Zn^{+2} iyonları eritrositlere pasif taşıma ile girebilmekte ve aynı zamanda amino asitlerle bileşik oluşturarak veya Zn^{+2}/ Ca^{+2} antiportu ile taşınabilmektedir. Balık kanında toplam Zn^{+2} derişiminin 0.013-1.15 mM değerleri arasında olduğu; Zn^{+2}'nin yaklaşık % 99'unun protein bağlayıcı bileşik formunda gözlendiği, bunların yaklaşık % 5'inin zayıf olarak albumine ve % 15'inin de kuvvetli bir şekilde α2-makroglobuline bağlandığı belirtilmiştir. Balıkta letal Zn^{+2}düzeyleri yapılan çalışmalara göre çeşitlilik göstermekle birlikte, bu çeşitliliğin suyun sertliğinin bir sonucu olarak gözlendiği belirtilmiştir [30]. Birçok organizma için gerekli bir element olan Zn^{+2}'nin, subletal derişimlerinde balıkta büyümeyi inhibe ettiği, yüzme hareketlerini, davranış ve kan kimyasını değiştirdiği ve doğurganlık ile ozmodüzenleyici kapasiteyi bozduğu belrtilmiştir [31]. Zn^{+2}'nin Cd^{+2} gibi Ca^{+2} alımında görev ören Ca^{+2} bağlayan bölgelerde doğrudan Ca^{+2} ile yarıştığı belirtilmiştir. Bu durumun da hipokalsemi ve balık ölümlerine neden olduğu gösterilmiştir[32]. Zn^{+2} membran taşıyıcıları ve membran bağlama bölgeleri için kadmiyum ile yarışarak dokularda kadmiyum birikimini önlemektedir. *Cyprinus carpio* L. Eritrositlerinde artan Zn^{+2} derişiminin, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerinde azalmaya, hücre içi glikoz düzeyinde değişikliklere neden olduğu ve ayrıca kırmızı kan hücrelerinde taşıma sistemlerini ve dolayısıyla membran geçirgenliğini artırarak hemolizlerine yol açtığı belirtilmiştir [30]. Zn^{+2} birikimi en sıklıkla solungaç ve bağırsaklarda gözlenmektedir. Doğal sularda Zn^{+2}, bağırsaklardan emilir. Su kaynaklı Zn^{+2} düzeyi arttıkça, solungaçlardan Zn emilimi barsaklara oranla daha fazla gerçekleşir. Hücresel Zn^{+2} alımı ve metabolizmasında metallothioneinlerin rolüne ek olarak glutatyon da Zn^{+2} alımında görev görmekte ve hücre içi serbest Zn^{+2} düzeylerini düzenlemektedir. Histidin ve sistein gibi amino asitlerin Zn^{+2} ile şelat oluşturması, Zn^{+2} dağılımını değiştirebilmektedir. Yapılan çalışmalar, Ca^{+2}'un solungaçlarda Zn^{+2} alımını engellediği görülmüştür [31,32].

II.2. OKSİDATİF STRES VE OKSİJEN RADİKALLERİ

Oksidatif stres, antioksidan savunma sistemi ile hücrelerin lipit tabakasının peroksidasyonuna neden olan serbest radikal üretimi arasındaki dengesizlik olarak tanımlanabilir.

Oksijen metabolizması sonucu oluşan bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, düşük molekül ağırlıklı, aktif ara bileşikler, serbest radikaller olarak adlandırılmaktadır [33]. Serbest radikaller, besinlerin oksijenli ortamda enerjiye dönüştürülmesi sırasında oluşan kararsız ve reaktif moleküllerdir. Serbest radikal hasarına karşı koymak üzere mevcut antioksidanlar kullanılabilecek durumda değilse veya radikal oluşumu engellenemeyecek kadar fazla ise, oksidan-antioksidan dengesi oksidanlar lehine bozulur ve oksidatif stres ortaya çıkar [34]. Moleküler oksijen tetravalent ya da univalent indirgenebilir ve O_2'nin univalent indirgenmesi sırasında serbest radikal ara ürünleri ya da yüksek reaktif substratlar meydana gelebilmektedir. O_2'e bir elektron transferi ile süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$) meydana gelmektedir. $O_2^{\cdot -}$'ne ikinci bir elektronun eklenmesi ile peroksit radikallerinin oluşumunu başlatan hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşmaktadır. O_2'e üçüncü elektronun transferi, oldukça toksik ve reaktif bir bileşik olan hidroksil radikalinin ($HO^{\cdot}$) oluşumu ile sonuçlanmaktadır [35]. Reaktif oksijen türleri DNA, protein gibi makromoleküllerin yapısına katılarak hücresel bileşenlere ve dokulara zarar verir. Serbest radikaller hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipit peroksit radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiptir (Tablo II.1) [34].

Süperoksit	$^{\cdot}O\text{-}O^{-}$	Fe^{+2} ve Cu^{+} iyonlarını geri kazanım yoluyla Haber-Weiss reaksiyonunu katalizleme,hidrojen peroksit veya peroksinitrit oluşumu
Hidrojen peroksit	HO-OH	Hidroksil radikali oluşumu, enzim inaktivasyonu, biyomoleküllerin oksidasyonu
Hidroksil radikali	$OH^{\cdot}$	Hidrojen çıkarılması, serbest radikallerin ve lipit peroksidlerin üretimi, tiyol oksidasyonu
Ozon	$O{=}O^{+}\text{-}\ O^{-}$	Bütün biyomoleküllerin özellikle çift bağ içerenlerin oksidasyonu, sitotoksik aldehit ve ozonit oluşumu
Oksijen	O = O	Çifte bağlarla reaksiyon, peroksitlerin oluşumu, aminoasidlerin ve nükleotidlerin oluşumu
Nitrik oksit	$^{\cdot}N = O$	Peroksinitrit oluşumu, diğer radikallerle reaksiyon
Peroksinitrit	$O = N – O\text{ - }O^{-}$	Hidroksil radikali oluşumu, tiyollerin ve aromatik grupların oksidasyonu,ksantin dehidrojenazın ksantin oksidaza dönüşümü,biyomoleküllerin oksidasyonu
Hipoklorit	ClO^{-}	Amino ve kükürt içeren grupların oksidasyonu, klorin oluşması
Radikal	$R^{\cdot}$	Hidrojen çıkarılması; peroksil radikalleri ve diğer radikallerin oluşumu, lipitlerin ve diğer biyomoleküllerin bozulması

Peroksil radikali	R - O - $O^{\cdot}$	Hidrojen çıkarılması, radikallerin oluşumu; lipitlerin ve diğer biyomoleküllerin bozulması
Hidroperoksit	R - O - OH	Biyomoleküllerin oksidasyonu, biyolojik membranların bozulması
Bakır ve demir iyonları	Cu2+ Fe3+	Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarıyla hidroksil radikali oluşumu

Tablo II.1: Serbest Radikaller ve Yol Açtıkları Reaksiyonlar [36].

Doymamış yağ asitleri ile reaksiyonları sonucunda alkoksil radikal (RO), peroksil radikal ($ROO^{\cdot}$) ve organik hidroperoksitler (ROOH) gibi diğer reaktif oksijen türleri oluşur. Bu olay lipit peroksidasyonuna ve membran hasarına neden olur. Proteinler ile reaksiyonları enzim hasarına, DNA ile reaksiyonu ise baz modifikasyonlarına ya da iplik kırıklarına neden olarak mutajenite ve karsinojenite ile sonuçlanır. Reaktif metabolitler nükleik asit, kofaktör, lipit ve polisakkaritlerle kovalent olarak bağlanarak biyolojik özelliklerinin değişimi nedeniyle enerji kaybı, makromolekül sentezinde azalma ve membran geçirgenliğinde değişime neden olabilirler [37].

Normalde hücrelerde en büyük serbest radikal kaynağı, elektron transport zincirinden elektron sızıntısıdır. Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgendiği zaman mitokondrial süperoksit radikali üretimi artar. İnsan hücrelerine giren oksijenin %90'ından fazlası, mitokondrial sitokrom oksidaz tarafından enerji üretimi için kullanılır; iki su molekülünün oluşumu ile sonuçlanan bu işlemler süresinde, her bir oksijen molekülü 4 e^{-} ilavesiyle indirgenir.

$$O_2 + 4\,H^{+} + 4\,e^{-} \longrightarrow 2\,H_2O$$

Ancak, hücre içine alınan oksijenin tahminen %1-4'ünün kısmen indirgenmiş oksijen türlerine yani reaktif oksijen türlerine dönüştüğü bilinmektedir (Tablo II.2) [38].

Radikaller	Non-radikaller
Süperoksit, $\mathbf{O_2^{\bullet -}}$	Hidrojen peroksit, $\mathbf{H_2O_2}$
Hidroksil, $\mathbf{OH^{\bullet}}$	Hipokloröz asit, **HOCl**
Peroksil, $\mathbf{RO^{\bullet}_2}$	Ozon, $\mathbf{O_3}$
Alkoksil, $\mathbf{RO^{\bullet}}$	Singlet oksijen, $\mathbf{O^{\bullet}}$
Hidroperoksil, $\mathbf{HO^{\bullet}_2}$	Peroksinitrit, $\mathbf{ONOO^{-}}$
Nitrik oksit, $\mathbf{NO^{\bullet}}$	Hidroperoksit, **L(R)OOH**

Tablo II.2: Biyolojik Önemi Olan Reaktif Oksijen Türleri [36]

Hücrenin normal metabolik fonksiyonları sırasında veya patolojik bir durumda, oksijenin bir elektron alarak indirgenmesiyle süperoksit radikali oluşur.(O_2+e- → $O_2^{\cdot -}$) Moleküler oksijenin metabolizmasının ilk ara ürünüdür. Vücuda alınan oksijenin % 2'si hücrelerde $O_2^{\cdot -}$'e dönüşür. $O_2^{\cdot -}$, bütün oksidasyon reaksiyonları sırasında ve fagositik etkinlik sırasında oluşur, ancak asıl olarak mitokondrideki enerji metabolizması sırasında NADH dehidrojenaz ve koenzim-Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçağı ile oluşur. $O_2^{\cdot -}$, $OH^{\cdot}$ Radikaline oranla daha az reaktif olmasına rağmen DNA'ya zarar verebilmektedir. NO ile reaksiyona girerek peroksinitrit radikallerinin oluşmasını ve Haber-Weiss reaksiyonu aracılığı ile $OH^{\cdot}$'nin oluşmasını sağlar. $O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^{\cdot} + OH^{-}$ (Haber-Weiss reaksiyonu) $O_2^{\cdot -}$, Süperoksit dismutaz enzimi (SOD) tarafından H_2O_2'e dönüştürülerek ya da hafif asidik ortamda kendiliğinden dismutasyonla da detoksifiye edilir.

Hidrojen peroksit, hücre içindeki birçok reaksiyon tarafından oksijen molekülünün iki elektron alarak indirgenmesiyle ya da $O_2^{\cdot -}$'in dismutasyonu sırasında oluşur. Makrofajların aktiviteleri ve tiroit hormonunun biyosentezi gibi birçok hücresel metabolik fonksiyonda rol oynayan H_2O_2, özellikle mitokondride oksidatif elektron taşınması sırasında üretilir, ayrıca hücrelerde çok düşük miktarlarda da bulunur. H_2O_2, radikal olmamasına karşın okside edici özelliktedir. NO ile reaksiyona girerek $OH^{\cdot}$ ve peroksinitritlerin oluşmasını sağlar. Hidrojen peroksit, katalaz ve peroksidazlar tarafından suya dönüştürülerek detoksifiye edilir [39].

II.2.1. Metabolizmada Serbest Radikal Kaynakları

Serbest oksijen radikallerinin iki önemli kaynağı bulunmaktadır:

A) Endojen Kaynaklar

•Yaşlanma

•Peroksizomlarda var olan enzimler

•Nukleus membran ve endoplazmik retikulumda bulunan elektron transport sistemleri (sitokrom p-450)

•Mitokondride bulunan elektron transport sistemi

•İskemi, travma, intoksikasyon sonucu oluşan oksidatif stres

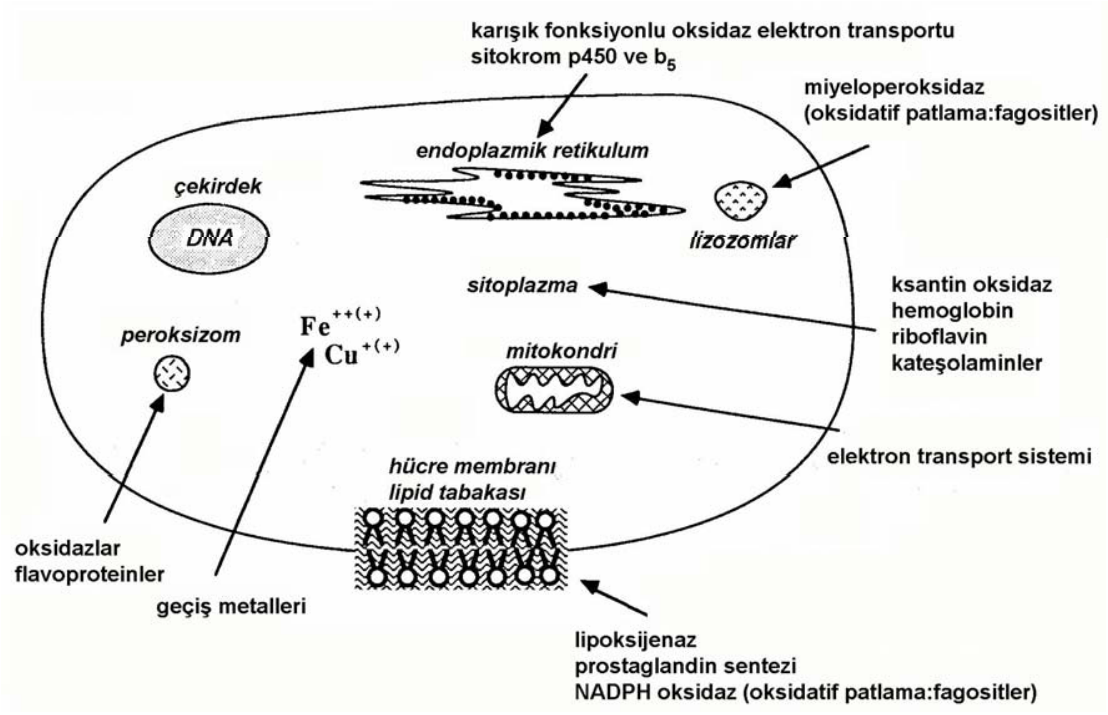
•Ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, adenozin deaminaz, hemoglobin gibi enzim ve proteinler

•Katekolaminler, tioller, tetrahidroproteinler, hidrokinonlar gibi küçük moleküllerin otooksidasyonu

• Geçiş metallerine afinitesi olan antibiyotikler

•Makrofaj ve diğer fagositik hücrelerin aktivasyonu ile meydana gelen solunumsal patlama

•NADPH oksidaz, lipooksijenaz, prostaglandin sentetaz içeren plazma membran enzimleri ve lipid peroksidasyonu [38,40]



Şekil II.3: Endojen Serbest Radikal Kaynakları [41].

B) Ekzojen Kaynaklar

• İyonize ve non-iyonize radyasyon

• Metal iyonları

• Ksenobiyotikler: hiperoksi, hava kirliliği, anestezik maddeler, pestisitler, solventler, aromatik hidrokarbonlar ve sigara dumanı

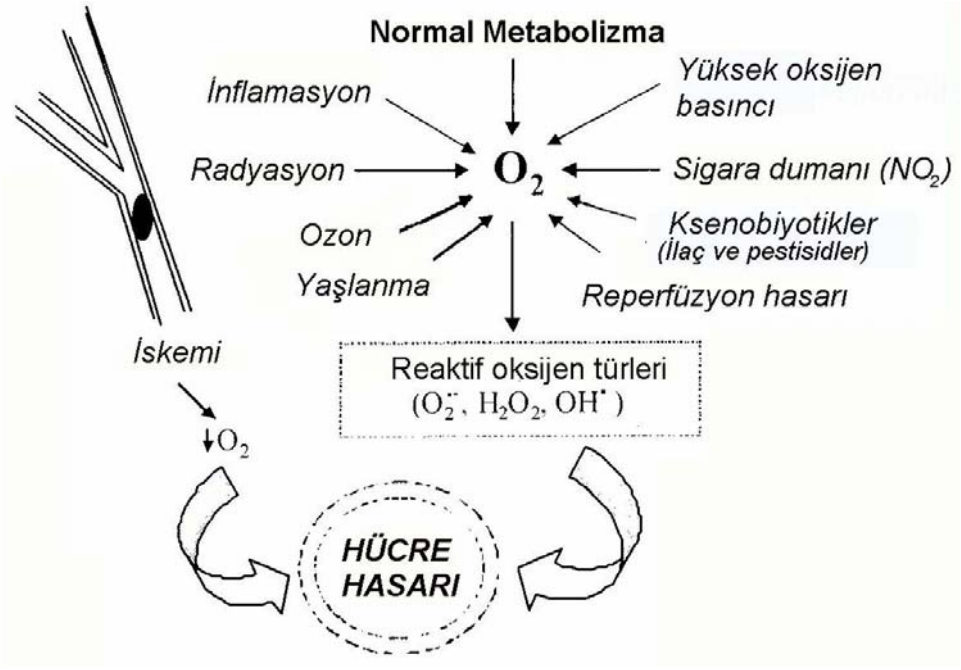
• Bağışıklık yapan maddeler: alkol, uyuşturucu maddeler

• Stres; stres durumunda vücutta katekolamin düzeyi artar ve oksidasyon ile radikal üretimi de artar

• Yiyeceklerde bulunan çeşitli katkı maddeleri

• Egzersiz

• Sisplatin, doksorubisin, metotreksat, bleomisin, siklosporin gibi antineoplastik ilaçlar [41-42].



Şekil II.4: Eksojen Serbest Radikal Kaynakları [41].

II.2.2 Serbest Radikallerin DNA üzerine etkileri

İyonize edici radyasyondan kaynaklanan hücre ölümünün başlıca nedeni olarak nükleik asitlerin reaktif oksijen türleri (ROS) ile reaksiyona girmesi ve bu reaksiyon sonucunda DNA'da mutasyona ve hücre ölümüne yol açtığı düşünülmektedir. Ayrıca lipid peroksidasyonu sonucu oluşan melanoaldehit (MDA)'in nadirde olsa DNA'da mutasyona sebep olduğu, beslenme ve yaşam şekli gibi faktörlerinde etkisiyle kanser ve genetik bazı hastalıklara neden olduğu düşünülmektedir [43,44].

Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlar ile reaksiyona girerek DNA yapı değişikliklerine yol açar. Hidroksil radikali, DNA'nın yakınında bulunduğu taktirde mutasyonlara neden olabilir. Süperoksit anyonu güçlü bir oksitleyici olduğundan, guanin gibi yüksek elektron yoğunluklu bölgeler içeren moleküllerle daha kolay tepkimeye girer [45,46].

Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre fonksiyon bozukluklarına ve hücre ölümüne yol açabilir. ROS, DNA'nın oksidatif hasarı sonucu karsinogenez ve çeşitli hastalıklar görülebilir [44,47,48,49]

II.2.3 Serbest Radikallerin Proteinler üzerine etkileri

Proteinler, lipitlere göre serbest radikallerden daha az etkilenirler. Proteinlerin serbest radikallerden etkilenme dereceleri içerdikleri amino asit kompozisyonuna bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür içeren amino asitlerce (triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin, sistein gibi) zengin proteinler serbest radikallerden daha çabuk etkilenirler. Proteinlerin radikaller ile reaksiyona girmesi sonucu karbon merkezli radikaller ve sülfür radikalleri meydana gelir. Bu karbon merkezli radikallerden karboniller (PCO) proteinlerde meydana gelen oksidatif hasar ölçülmesinde kullanılabilirler. Serbest radikallerin oluşturduğu hasar sonucunda proteinlerde parçalanma, çapraz bağlanmalar ve proteinlerin agregasyonu meydana gelebilir. Birçok biyokimyasal yapının ve özellikle enzimlerin yapısında bulunan proteinlerin hasar görmesi sonucu hücrenin normal fonksiyonlarında bozukluklar ve

enzim aktivitelerinde aksaklılar meydana gelir [50,51]. Proteinlerin oksidasyonunu belirleyen pek çok gösterge bulunmaktadır. Bazı oksidatif protein değişiklikleri, hem oksidasyona uğrayan amino asit miktarı, hem de oluşturulan ürünler bakımından farklılık gösterir. Bazı oksidatif protein değişiklikleri geniş bir yelpazede çok fazla özellik taşır ve çok sayıda amino asitte değişikliğe yol açarak, fazla sayıda ürün oluşturabilir [52,53].

II.3 ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve meydana getirdikleri hasarı önlemek için vücutta geliştirilen savunma mekanizmalarına 'antioksidan savunma sistemleri' ya da 'antioksidanlar' denir. Bu moleküller, serbest oksijen radikallerine bir hidrojen iyonu vererek, bu radikalleri kendilerine bağlayarak ya da onları daha zayıf bir moleküle çevirerek radikal hasarını önlerler.

En önemli antioksidan enzimler; [SOD, CAT, MPx, GST, GR ve GPx] süperoksit anyonunu H_2O_2'ye dönüştüren süperoksit dismutaz (SOD), organik peroksitleri detoksifiye eden glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve H_2O_2'yi suya indirgeyen katalaz (CAT)'dır. Antioksidantlar ile serbest radikal zincir reaksiyonlarının başlama veya ilerleme aşamaları önlenebilir. Son korunma şekli ise oksidatif zarara uğrayan lipit, protein veya DNA moleküllerinin fosfolipazlar, proteazlar gibi enzimler aracılığıyla uzaklaştırılmasıdır.

A, E, C vitaminleri, β-karoten, indirgenmiş glutatyon (GSH) gibi bazı vitamin ve kimyasal maddeler enzimatik olmayan antioksidan sistemler gibi fonksiyon görürler. E vitamini (α- tokoferol), C vitamini (askorbik asit) ve ürik asit gibi antioksidan maddeler zayıf oksidan özellik gösterirler ancak reaktif oksijen türleri ile etkileştiklerinde antioksidan türevi radikaller oluşur. E vitamini, yapısındaki fenolik hidroksil grubundan dolayı güçlü bir antioksidandır [54].

Diğer enzimatik olmayan antioksidanlar ise; melatonin, ürik asit, albümin, sistein, bilirübin, seruplazmin, ferritin, mannitol, oksipurinol, lipoik asit ve flavinoidlerdir.

II.3.1 Antioksidan etki tipleri

Antioksidanlar etkilerini dört farklı şekilde gerçekleştirmektedir [55,56]:

1. *Toplayıcı etki (scavenging)***:** Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya reaktif olmayan yeni bir moleküle çevirme işlemine toplayıcı etki denir.
2. *Bastırıcı etki (quencher)***:** Serbest oksijen radikalleri ile etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya inaktif şekle dönüştüren etkiye bastırıcı etki denir.
3. *Onarıcı etki (repair):* DNA'daki hasarların tamir edilmesinde bu etki geçerlidir.
4. *Zincir kırıcı etki (chain breaking)***:** Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak zincirlerini kırarak fonksiyonlarını engelleyici etkiye zincir kırıcı etki denir.

II.3.2 Katalaz (CAT)

Katalaz tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan bir enzimdir. Özellikle eritrositlerde ve karaciğer dokusunda bol bulunur. Enzim; %20 oranında sitoplazmada, %80 oranında da peroksizomlarda lokalizedir. Molekül alt birimlerinin ayrılması ise; enzimin inaktive olmasına yol açar. Enzimler arasında en yüksek katalitik dönüşüm hızına sahip olan katalazın aktivitesi için demir gerekmektedir [57]. CAT tüm enzimler içinde, en büyük reaksiyon hızına sahip olanıdır. Bir molekül CAT bir dakikada 6 milyon hidrojen peroksit molekülünü su ve oksijene dönüştürebilir [42].

Dokularda enzimin aktivitesi büyük farklılık gösterir. Karaciğer ve böbrekte en yüksek aktivite, destek dokuda ise en düşük aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Katal1az, metil hidroperoksit ve etil hidroperoksit gibi küçük moleküllerin indirgenmesini de sağlar, ancak büyük molekül ağırlıklı lipit hidroperoksitlere karşı etki göstermez.

H_2O_2'in yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu ortamlarda oldukça etkilidir. Ortamda oluşan H_2O_2'i okside edici enzimlerin etkisiyle direkt olarak suya dönüştürür. Katalazın bu reaksiyonu iki basamakta gerçekleşir.

Birinci basamakta, kompleks-I olarak ifade edilen ara ürün oluşur. Bu ara ürün, hidrojen peroksidin enzime bağlanması ile oluşur. Kompleks-I'in ikinci hidrojen peroksit molekülüyle reaksiyonu, su ve moleküler oksijen oluşumuyla sonuçlanır.

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

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

$$2\ H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2\ H_2O + O_2$$

Eğer, metanol, etanol gibi bir hidrojen verici kompleks-I ile reaksiyona girerse, oluşan ürün su ve bir aldehittir [38].

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

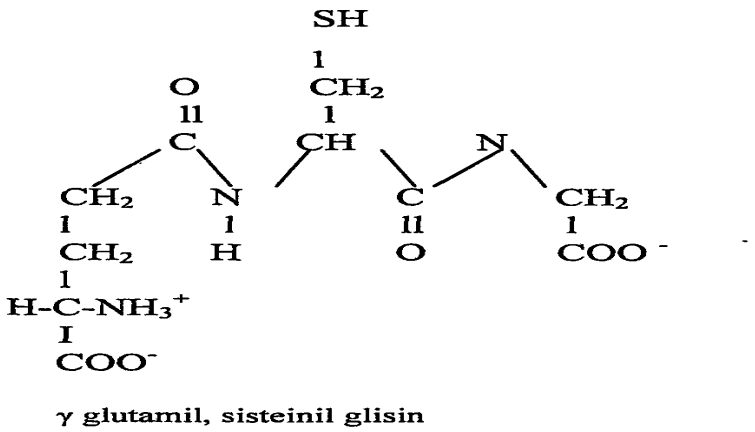
Ortamdaki H_2O_2 konsantrasyonu düşük olduğu durumlarda hidrojen peroksiti substrat olarak kullanan diğer antioksidan enzimler (GSH-Px gibi) devreye girerek hidrojen peroksiti ortamdan uzaklaştırırlar. CAT ve GSH-Px enzimlerinin benzer etkisi olduğu halde hücre içindeki yerleşim ve etki yerleri bakımından farklılık vardır. GSH-Px enzimi başlıca sitozol ve mitokondride bulunurken, CAT enzimi peroksizomlarda mevcuttur [40].

GPx'in, CAT'a oranla daha başarılı kabul edilmesinin nedeni; hidrojen peroksit dışındaki peroksitleri de detoksifiye edebilmesi ve enzimin hücrelerde, oksidatif stresin yoğun olarak gerçekleştiği bölgelere lokalize olmasıdır.

II.3.3 Glutatyon (GSH)

Glutatyon (GSH); başta karaciğer olmak üzere organizmada tüm hücrelerde bulunan, hücrenin protein yapısı dışındaki sülfidril grubu içeriğinin %90 kadarını oluşturan, glutamik asid, sistein ve glisinden, γ-glutamil sistein sentetaz ve glutatyon sentetaz enzimleri aracılığı ile oluşturulan bir tripeptitdir [35].

Bir tripeptid olan GSH γ-glutamil, sisteinil ve glisinden oluşmaktadır (Şekil II.5).



Şekil II.5 Glutatyon yapısı [58]

Normal koşullarda indirgenmiş glutatyon hücrelere göre değişmekle beraber 0.5 ile 10 mM düzeyinde bulunur [59, 60,61].

Glutatyon; dokularda birbiriyle dengede olan, indirgenmiş glutatyon (GSH) ve okside glutatyon (GSSG) olmak üzere iki şekilde bulunur. Önemli bir indirgeyici ajan ve antioksidan olan glutatyon, hücrenin oksido-redüksiyon dengesini sürdürüp, hücreleri endojen ve eksojen kaynaklı oksidanların zararlı ve toksik etkilerinden korumaktadır.

GSH serbest sülfidril (–SH) grubu aracılığıyla H_2O_2, O_2 -., HO. ve alkoksil radikalleri (RO.) ile etkileşime girebilmekte, böylece hücreyi oksidanların, elektrofilik maddelerin, serbest radikallerin hasarına karşı korumaktadır [62,63]. Ayrıca doku için GSH derişiminin düştüğü durumlarda glikolitik enzim olan gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz aktivitesinin ve doku ATP içeriğinin azaldığı gösterilmiş ve GSH'ın hücrenin enerji durumunu etkileyebileceği ileri sürülmüştür[64]. Glutatyon peroksidaz enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonla GSH, H_2O_2 veya lipit peroksitlerle reaksiyona girerek bu moleküllerin detoksifikasyonunda görev yaparken kendisi başka bir glutatyon molekülüyle disülfit köprüsü oluşturarak okside glutatyon (GSSG) formuna dönüşür. Hücre içerisinde serbest radikallerin detoksifikasyonunun sürdürülmesi için okside glutatyonun indirgenmiş formuna geri dönüştürülmesi gerekir. NADPH'nın kullanıldığı bir reaksiyonla okside glutatyon glutatyon redüktaz enzimi ile tekrar indirgenmiş glutatyon formuna çevrilir [65].

Düşük glutatyon konsantrasyonlarında metabolik bazı olumsuzluklar meydana gelebilir. Glutatyonun görevlerinden bazıları şunlardır:

• Eritrositlerde, hemoglobinin sistein gruplarını ve diğer hücre proteinlerinin tiol gruplarını indirgenmiş halde tutarak hemoglobini peroksitlerin neden olacağı hasardan koruyarak hücrenin bütünlüğünü sağlar [57].

Nükleofilik bir yapıya sahip olan indirgenmiş glutatyon, elektrofilik karakterdeki karbon atomları ve ağır metallerin vücuttan atılmasına yardımcı olur [57].

• Serbest radikallerin ve reaktif oksijen ürünlerinin inaktivasyonunu sağlar.

• Ksenobiyotiklerin, bazı antineoplastik ilaçların ve metabolik son ürünlerin konjugasyonla detoksifikasyonunu sağlar.

• DNA ve protein sentezine katkıda bulunur.

• Aminoasit transportuna aracılık eder.

• İnsülin gibi bazı proteinlerin disülfür bağlarının koparılması ve böylece proteinlerin

konformasyonlarının değişmesini sağlar.

• Hücre içerisinde sistein deposu olarak bulunur.

• Bazı enzimlerin reaksiyonlarında rol oynar [66].

İndirgenmiş glutatyon (GSH) ölçümü oksidatif stres ve antioksidan savunma sisteminin durumu hakkında önemli bilgiler sağlar [67].

II.3.4 Lipit Peroksidasyonu

Lipit peroksidasyonu (LPO) membranda bulunan fosfolipit, glikolipit, gliserit ve sterol yapısında yer alan çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlerle yıkılması reaksiyonudur. Lipit peroksitlerin yıkımı ile oluşan ve biyolojik olarak aktif olan aldehitler metabolize edilirler. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda tiyobarbitürik asit kullanımı ile malondialdehit (MDA) meydana gelir. Lipit peroksit düzeylerinin ölçülmesinde bu yöntem sıklıkla kullanılır. MDA, yağ asit oksidasyonunun spesifik yada kantitatif bir belirteci değildir, fakat lipit peroksidasyonunun derecesiyle pozitif ilişki gösterir. Lipit peroksidasyonu, biyolojik zarlarda önemli hücre hasarlarına yol açarak hastalık patogenezinde etkin bir role sahiptir [41]. Süperoksit ($O_2^{\cdot -}$), hidroksil ($OH^{\cdot}$), peroksil ($ROO^{\cdot}$) ve alkoksil radikalleri ($RO^{\cdot}$) LPO' yu başlatırlar. Lipit peroksidasyonu hücrede en çok hasara neden olan reaksiyonlardandır.

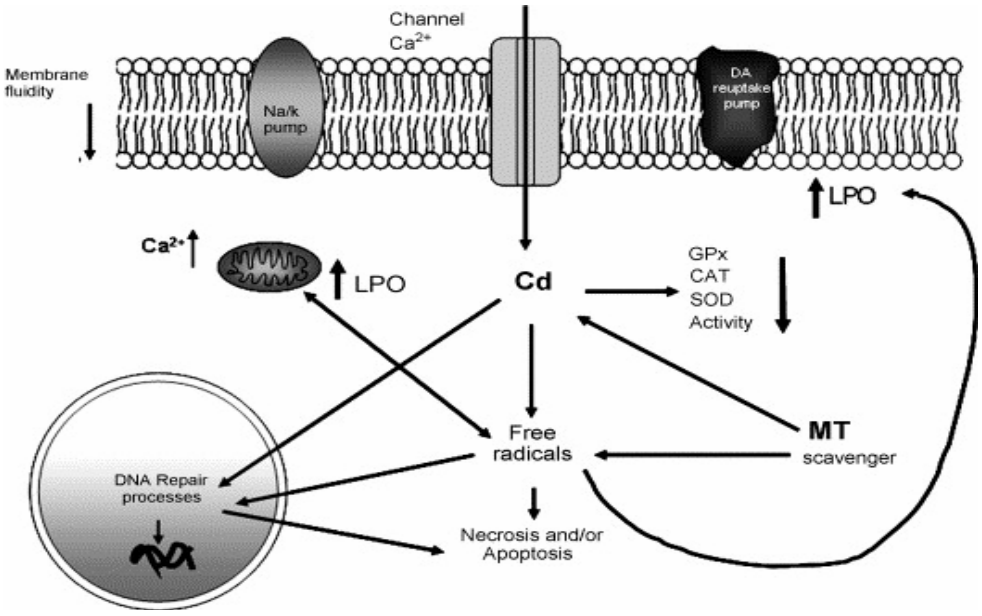
Biyojik sistemde MDA, sadece lipit peroksidasyon mekanizmasında üretilir. Lipit peroksidasyonunun belirlenmesinde kullanılan MDA, lipit peroksidasyonundaki bir ana ürün değil, parçalanma ürünüdür. Ksenobiyotikler hücrenin peroksidasyon reaksiyonlarına karşı savunma kapasitesini azaltarak ya da serbest radikal oluşumunu hızlandırarak lipit peroksidasyonunu arttırırlar. Lipit peroksidasyonun artması sonucu GSH'ın konjuge bileşiklerinin oluşması ve glutatyon redüktaz aktivitesinin engellenmesi, dokularda GSH düzeylerinin azalmasına neden olur. Diğer yandan ksenobiyotikler ve diğer toksik maddelerin oluşturdukları oksidatif hasarlarda oluşan doku spesifik GSH seviyeleri ve antioksidan enzim aktivitelerindeki değişiklikler halen tartışılmaktadır [57].

Lipit peroksidasyona karşı oluşan korunma mekanizmasında GSH-Px ve CAT birincil antioksidan enzimler olarak bilinir [34].

II.3.5 Antioksidan Moleküllerin Metal İyonları ile Etkileşimi

II.3.5.1. Kadmiyum ve Oksidatif Stres

Kadmiyum (Cd), metalloenzimlerdeki çinko, kalsiyum, bakır ve demirin yerine geçerek bu metallerin serbest formlarının seviyelerini yükseltir, glutatyon gibi serbest radikal temizleyicilerinin tiyol gruplarına bağlanır ve katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimleri inhibe eder. Kadmiyumun, süperoksit ve nitrik oksidinde içinde olduğu birçok serbest radikalin üretimine neden olduğu ve böylece hücre membran lipitlerinin peroksidasyonuna, DNA hasarına ve protein oksidasyonuna yol açtığı düşünülmektedir. Mitokondri membranındaki hasar, kalsiyumun mitokondriden hücre içine salınmasını sağlar. Bu da DNA hasarına, apoptoza ve nekroza yol açan kaspaz-3 aktivasyonuna neden olur [42].



Şekil II.6: Oksidatif Stres'de Kadmiyumun Rolü [42].

II.4 AĞIR METALLERİN ANTİOKSİDATİF METOBOLİZMADAKİ ETKİLERİ

II.4.1 Kadmiyum /Çinko /Bakır Ağır Metalleri - Glutatyon Metobolizması İlişkisi

Kadmiyum akuatik sistemlerde yer alan en zararlı ağır metal kirleticisidir. Literatürde Cd toksitesinin reaktif oksijen türleri ile birlikte gelişen oksidatif hasar ile ilişkisi çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [68,69]. GSH sistemi balıklarda oksidatif hasara karşı farklı yollardan kofaktör gibi davranarak çalışır. Hücrelerde glutatyonun anti-oksidatif fonksiyonu konsantrasyon, reaksiyon hızı ve sentez hızına bağlı olarak meydana gelir. Balıklarda Cd' un glutatyon metabolizmansına etkilerini inceleyen sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Balıklarda Cd birikimin hedef organı karaciğer olduğundan çalışmalar bu yönde yoğunlaşmıştır [70] .

Cu ve Cd direk yada indirekt olarak hücresel demir düzeylerinin yükselmesine neden olarak antioksidan aktiviteyi engellerler, hücresel glutatyon kullanımına neden olur yada glutatyon ilişki enzimleri inhibe eder [71,72]. Pek çok enzimatik ve non-enzimatik detoksifikasyon reaksiyonlarının substratı olan

glutatyon, kirleticilere maruz kalan balıklarda etkin bir biyobelirteç olarak ele alınmaktadır. GSH yapısında bulunan yüksek oranda reaktif sülfidril gruplarına metalleri bağlayarak metal biyoeliminasyonuna doğrudan katılır [73,74]. Metal iyonlarını bağlamış formdaki GSH detoksifikasyon yolakları ile ortadan kaldırılır.

Balıkların karaciğer ve böbrek dokuları, metaller tarafından oluşan oksidatif stresden korunmak amacıyla CAT ve SOD gibi antioksidan savunma sistemlerince zengindir [75]. Radikal olmayan reaktif oksijen türlerinden CAT, hidrojenperoksidi ortadan kaldıran temel bir antioksidan suvunma komponenti olup, tüm biyolojik membranlardan geçip, bazı enzimleri inaktivite eder. Metalik ya da organik kirleticilere maruz kalan balıklarda doza bağlı olarak katalaz aktivite yanıtlarının indüklenme ya da inhibe olma yönünde farklılık gösterdiği bilinmektedir [76,77]. Bu nedenle balıklarda zararlı etkiler oluşmadan hemen önce belirlenen CAT aktivitesinin oksidatif stres için hassas bir biyobelirteç olduğu kabul edilmektedir [78,77].

Stres şartları altında ve bazı hastalıklarda, Cu iyonları GSH ile etkileşime girerek redoks aktif bakır formunda dokulardan salınır. Glutatyon L-askorbik asitin suda çözülebilir antioksidanlar olarak çeşitli reaktif oksijen türlerini (Hidrojen peroksit ile etkileşen Cu, hidroksil radikali oluşturarak hücrede lipit, protein ve nükleik asitleri hasarlayan reaktif oksijen türleri gibi davranırlar) ortadan kaldırdığı gösterilmiştir [79].

Oksidatif stresin pek çok biyolojik hedefleri arasında yer alan lipitler okside olarak birçok ikincil ürün oluştururlar. Bu ikincil ürünler arasında yer alan MDA çoklu doymamış peroksidasyon ürünü olarak oluşur. MDA, DNA ve proteinler ile etkileşime girebildiğinden potansiyel bir mutajendir. MDA' nın nükleik asit ve proteinler ile etkileşimi, hücrenin fonksiyonel kapasitesini belirleyen mekanizmaların geri dönüşümsüz olarak bozulmasına neden olur [80].

MDA'nın, DNA iplikleri arasında çapraz bağlar oluşturarak biyolojik etkiler gösterdiği rapor edilmiştir [81]. MDA' nın ayrıca DNA ve proteinler arasında da çapraz bağlar oluşturma yeteneğinin olduğu saptanmıştır [82]. MDA'nın bahsedilen genetoksik aktivitelerinin hücrelerde yol açtığı sonuçlar henüz tam bilinmemekle birlikte mutasyonlara sebep olduğu düşünülmektedir.

Cu lipit peroksidasyonunu hızlandıran bir metaldir. LPO' nunu başlatıcı ajan olarak görev yapan Cu, aynı zamanda sonraki reaksiyon basamaklarında katalizor olarak rol alır.

LPO'nun primer ürünleri olarak meydana gelen lipit hidroperoksitler Cu ve Fe gibi metaller ile reaksiyona girerek alkoksil ya da peroksil radikallerini oluştururlar. Böylece indirgenmiş metallerin, okside metallere kıyasla LPO'nun uyarım miktarları daha fazladır [83]. Cu tarafından okside olan alifatik aldehitler DNA'da tek ya da çift iplik kırıklarına neden olarak hücreye zarar verirler [84].

Cu'nun DNA hasarlayıcı etkisi MDA ile etkileşim sonucu meydana gelir. Hücreye giren bakırın %95'i ilk 20 dakika içinde indirgenerek ya da okside olarak bahsi geçen etkileri yapmak üzere aktifleştirilir. Oluşturulan DNA iplik kırıklarının artan katalaz aktivitesi ile tamamen ortadan kaldırılmaya çalışıldığı hücre kültürleri deneyi ile gösterilmiştir. Tamir edilemeyen DNA kırıklarının bulunduğu hücreler programlı olarak ölüme yönlendirilirken DNA transkripsiyon aktivitesi tamamen durdurulur [85].

II.5 ZEBRA BALIĞININ GENEL ÖZELLİKLERİ

II.5.1 Zebra Balıklarının Sistematikteki Yeri

Regnum: Eucaryota
Subregnum: Animalia
Superfilum: Metazoa
Filum: Chordata
Subfilum: Vertebrata
Superklasis: Gnathostomata
Klassis Pisces
Subklasis: Osteichthyes
Superordo: Actinopterygii
Ordo: Teleostei
Familya: Cyprinidae
Cins: Danio
Tür: *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1882) [86].

II.5.2 Zebra Balığı (*Danio rerio*)

Tropikal bir tür olan zebra balığı, *Danio rerio* [86] Cyprinidae familyasına aittir. Anavatanı Güneydoğu Asya olan zebra balıkları yoğun olarak da Pakistan ve Hindistanda da bulunmaktadır. Balığın gövdesi ışığa bağlı olarak koyu mavi, gümüş beyazı veya altın sarısı çizgilerle örtülüdür [87]. Zebra balığının bakımının kolay olması, çok sayıda yumurta vermesi ve yumurtalarının şeffaf olması, 1930'lu yıllardan beri yaygın olarak üzerinde araştırmalar yapılan bir tür olmasının nedenidir. Genç bireylerin boyları 4.5-5 cm uzunluktadır (Şekil II.7). Morfolojik olarak erkek bireyler dişi bireylerden farklılık göstermektedir. Erkek bireylerin anal yüzgeçleri dişi bireylere göre daha büyük ve genital papillaya sahiptir.



Şekil II.7 Zebra balıklarının genel morfoloji

II.5.3 Zebra Balığının Üremesi

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

II.5.4 Zebra Balığı ile Çalışmanın Avantajları

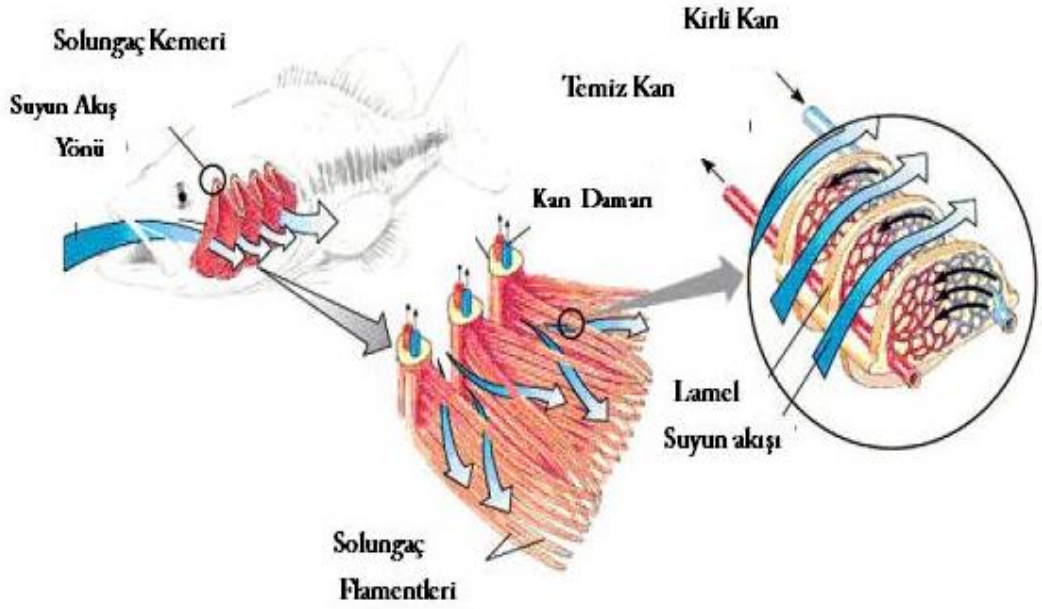
Sucul omurgalılar çevreden yayılan çeşitli stres faktörlerine diğer canlılardan daha fazla maruz kalmalarından dolayı balıklarla ilgili yapılan ekotoksikolojik araştırmalar oldukça önemlidir.

Son yıllarda ekotoksikoloji çalışmalarında *Danio rerio* (Zebra balığı) yumurtaları ve embriyoları sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Zebra balıkları, dayanıklı bir tür olmaları, kolay bulunmaları, laboratuvar ortamında kolay beslenebilmeleri ve çoğalmaları, ergin dişilerin haftalık aralıklarla yüzlerce yumurta bırakabilmeleri, dış döllenmeyle üremeleri, yumurta ve embriyoların saydam oluşu, yumurta ve larva gelişimlerinin kolay izlenebilmesi, jenerasyon zamanının kısa olması ve embriyolarının toksik ajanlara duyarlı oluşu nedenleriyle toksikoloji çalışmalarında en sıklıkla kullanılan model organizmalardan biridir [88]. Zebra balığı insan ve diğer omurgalıların hastalıklarının araştırılmasında mükemmel bir model organizma olarak kullanılmaktadır. Zebra balığı ile insan ve diğer omurgalıların genom yapılarının benzer oluşu, metabolizmalarının ve embriyonik gelişimlerinin hemen hemen aynı olması, en önemlisi insanlarda bulunan tümör baskılayıcı genin (sitokrom P450 grubu) Zebra balığında da keşfedilmiş olması, Zebra balığının model organizma olarak kullanılmasının başlıca nedenleri arasındadır. İlaveten ksenobiyotik metabolizmanın faz I ve faz II enzim sistemi bu balık türünde de bulunmaktadır [89]. Zebra balıklarının hayat döngüsünün laboratuvar farelerine göre daha kısa sürede tamamlanması, farelerle yapılan deneylerin aynılarının bu balık türüyle de yapılabilmesi ve hatta daha fazla neslin takip edilebilmesi (özellikle teratojenik testlerde) diğer bir tercih nedeni olmuştur. Keza farelerde embriyo gelişimi anne vücudu içinde olduğu için araştırıcıya embriyoyu en başından takip etme şansını vermemektedir. Oysa Zebra balığı embriyoları anne vücudu dışında gelişmekte ve böylece döllenmeden itibaren zigotun gelişimi takip edilebilmektedir. Toksikoloji araştırmalarında Zebra balığının tercih edilmesinin diğer bir nedeni uygulanan testin kısa oluşu ve sonuçların tartışmasız net oluşudur[90].

Yurdumuzda da Zebra balığı yumurtaları kullanılarak su kalitesi hakkında önemli bilgiler elde edilmektedir.

II.5.6 Solungaç Yapı ve İşlevleri

Solungaçlar, yutak bölgesinde, her iki yanda uzanan yarıklar içinde bulunurlar. Teleost balıklar her bir tarafta 4 solungaç kemerine sahiptirler. Her bir kemer, solungaç filamentinin iki dizisine sahiptir. Bu dizilerin her birine, hemibranş adı verilir. Her bir hemibranş, tarak benzeri dizilmiş, primer lamel olarak adlandırılan solungaç filamentlerinin bir dizisinden ibarettir. Her filamentin alt ve üst her iki yüzünde, filament eksenine dikey olarak oluşmuş ve filamentintin enine ikincil katları olan, çok sayıda sekonder solungaç lameli bulunur. Solungaç lamellerinin erbest kenarları, çok ince tek tabakalı bir epitel ile örtülüdür [91].



Şekil II.8: Solungaçların Yapısı [92].

Su ve kan arasındaki gaz değişimi, solungaçlar ve genel vücut yüzeyi yapılmaktadır. Ancak solungaçların yüzey alanı, vücudun artakalan yüzeyinden daha büyük olduğu için gaz değişiminde önemli bir yerdir.

Solungaçların başlıca işlevi, solunum yani gaz değişimi yapmaktır. Solungaçlar ayrıca, elektrolitlerin aktif transportunda, osmo-düzenlenimde, asit-baz dengesinin kurulmasında hayati öneme sahiptir [93,94].

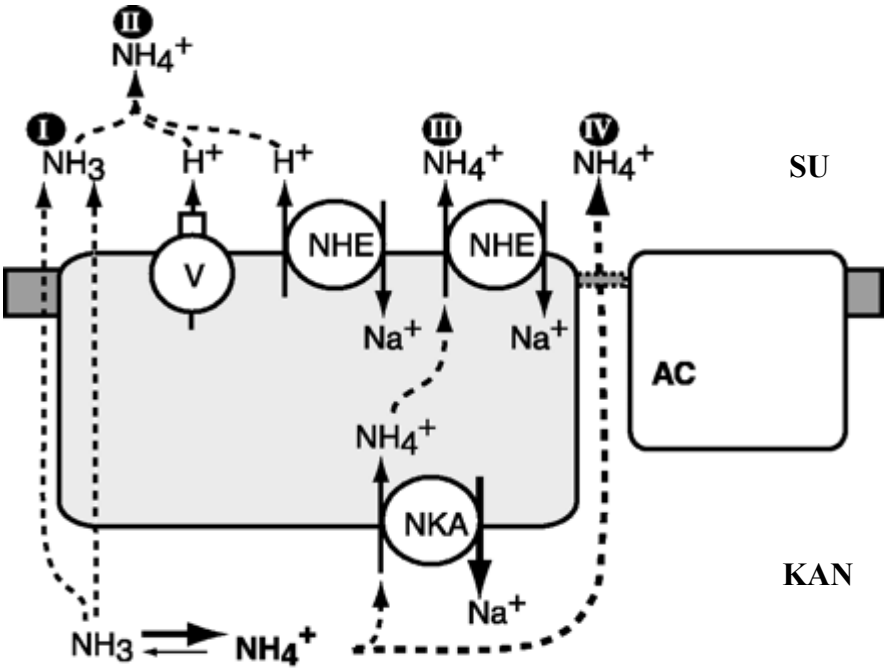
Balıklarda solunum suyu, genellikle ağız yolu ile girer ve solungaç açıklıklarından çıkar. Ağız boşluğu ile solungaç boşlukları arasında sürekli var olan basınç farkı nedeniyle, su solungaçların üzerinden tek yönlü olarak akar.

Solungaçlara gelen suyun hacmi balığın tür, büyüklük ve aktivitesi ile suyun sıcaklık, oksijen ve karbondioksit içeriği gibi birçok etkene göre değişir.

Oksijen, suda çözünmüş halde bulunur. Oksijenin çözünürlüğü, ortam suyunun sıcaklığıyla ters orantılı olarak değişir. Oksijenin bir sıvıdan diğerine difüzyonu çok yavaş olduğundan, diğer omurgalılarda olduğu gibi, balıklarda da genellikle eritrositlerde gaz taşıyıcı özelliği olan hemoglobin bulunur.

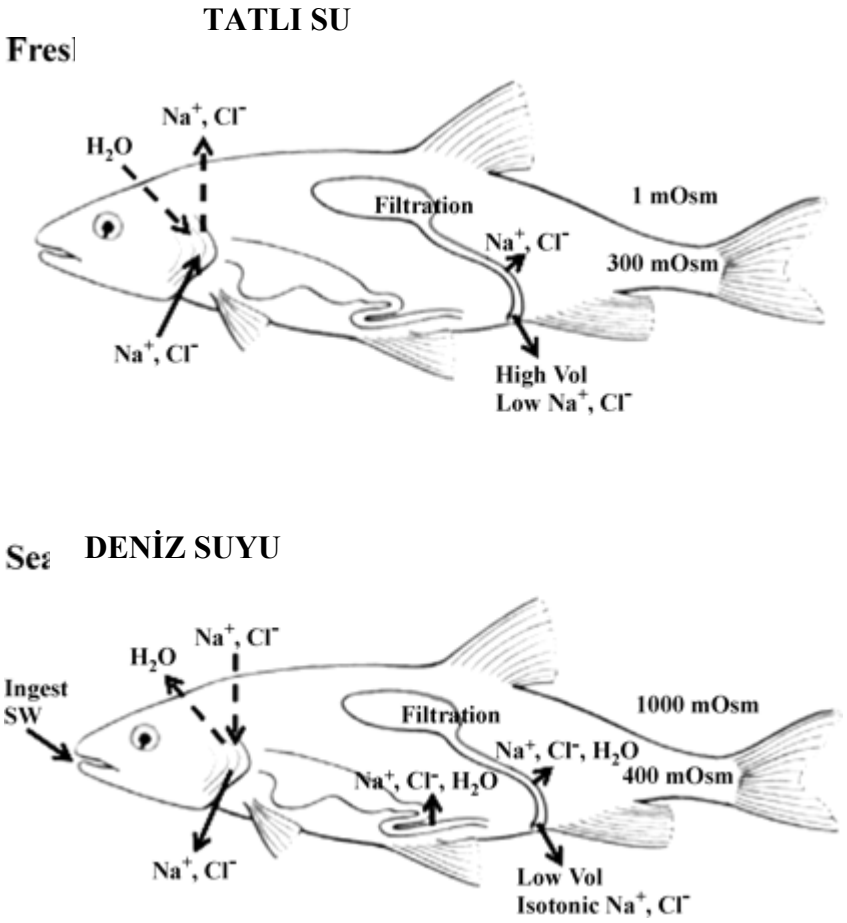
Balıklarda protein metabolizmasının son ürünü amonyak ve üredir. Karaciğerde parçalanan amonyak, kan yoluyla solungaçlara taşınır. Amonyak ve üre % 80-90 oranında solungaçlardan atılır. Suyun amonyak konsantrasyonu ve pH'sı balığın vücut sıvısından düşükse, amonyak solungaçlardan suya hızlı ve kolayca verilebilir [95].

Teleostei'de solungaç epitelinde difüzyonla iyon değişimi mekanizması vardır. Bu balıkların tatlı su formlarında, solungaç epitelinden klorür iyonları girerken, bikarbonat iyonları kandan suya geçer; sodyum iyonları girerken de amonyum iyonları çıkar [96].



Şekil II.9: Solungaçlardan Amonyak Atılımının Mekanizması [97].

Suyun vücuda alınması deniz ve tatlısu balıklarında farklı olduğu gibi, türler arasında da değişiklikler gösterir. Tatlısu balıkları genelde ihtiyaçları olan suyu ağız yolu 1ile almazlar. Bu balıklarda su, solungaçlardan girer. Deniz balıkları ise ihtiyaçları olan suyu ağızları ile alırlar. Tatlısu balıklarında kanda bulunan iyon miktarı, yaşadıkları su ortamındaki iyon miktarına göre zengindir. Bu nedenle tatlı su balıklarında su, vücuda solungaçlardan geçebilme özelliği gösterebilmekte ve bu nedenle de suyun ağız yoluyla alınmasına ihtiyaç duyulmamaktadır. Deniz balıklarında ise durum tam tersinedir. Deniz balıklarının kanı, iyon yönünden oldukça fakirdir. Bu nedenle de tatlısu balıklarında olduğu gibi su, solungaçlardan vücuda geçme özelliği göstermez (Şekil II.10) [98].

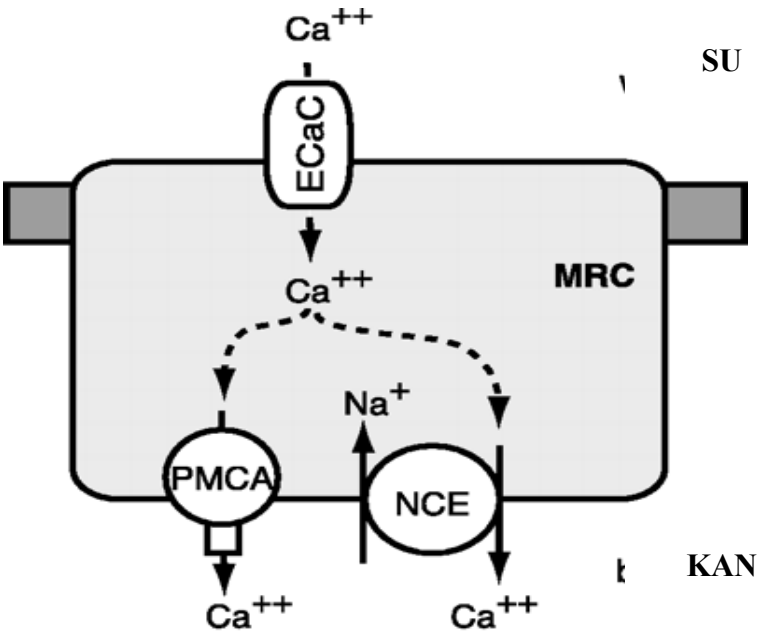


Şekil II.10 Balıklarda İyon Değişiminin Mekanizması [99].

Balıklarda solungaçlar çevre kirliliğinden ilk etkilenen organlardır. Geniş yüzey alanları toksik maddelerin geçişini kolaylaştırmaktadır.

Solungaç hasarının derecesi toksik bileşiğin etki gücü ile doğru orantılıdır. Bilinen solungaç lezyonları iki ana gruba ayrılabilir; bunlardan ilki; bileşiğin yıkıcı etkileri,

ikincisi ise savunma sonucu oluşanlardır [100]. Sulardaki kadmiyum genellikle endüstriyel kaynaklıdır. Uzun süreli Cd'a maruz kalmanın (20 günden fazla), balıklarda karaciğer enzimlerini, karaciğer büyüklüğünü ve glikojen içeriğini etkilediği, büyümeyi durdurduğu ve Ca^{2+} ATPaz'ı inhibe ederek hipokalsemiye sebep olduğu bilinmektedir. Kalsiyum (Ca^{2+}) ve kadmiyum (Cd^{2+}) solungaçlarda aynı transport reseptörlerini paylaşırlar ve çoğunlukla Ca^{2+} iyon miktarının sularda azalmasıyla Cd^{2+} alımı ile birlikte toksisitesi artar [101].



Şekil II. 11 Solungaçlardan Kalsiyum Absorbsiyonu [99].

Tatlısu balıklarında pH'ın Cd akut toksisitesine etkileri tam bilinmemekle birlikte düşük pH da kadmiyumun solungaçlarda birikiminin azaldığından, H^{+} iyonlarının, Ca^{2+} gibi, Cd^{2+} ile aynı reseptörleri kullandığı bilinmektedir [102].

II.6 GENETİK POLİMORFİZM

DNA (Deoksiribonükleik asit) molekülü üzerinde bulunan ve herhangi bir ürünün sentezi için gerekli bilgiyi içeren spesifik nükleotid bölgesine gen adı verilir. İnsan DNA'sı yaklasık $3x10^{9}$ baz çiftinden oluşan, 23 çift kromozom içerisinde 30.000'den fazla gen bulunduran, heliks yapısındadır. DNA'nın %99.9'u kişiler arasında benzerlik gösterir. Kişiler arasında genom boyutunda izlenen farklılıklar DNA zincirindeki tek nükleotid değişimlerinden kaynaklanmaktadır.

Normal bir populasyonda bir karakter için iki veya daha fazla fenotip bulunuyorsa ve fenotiplerden her biri populasyonda %1'den daha büyük sıklıkla görülüyorsa bu duruma "genetik polimorfizm", bulunma sıklığı %1'den daha az olursa "genetik mutasyon" adı verilir. Polimorfizmler, zararsız ya da ılımlı mutasyonlar olarak tanımlanabilirler, genetik bir hastalığa sebep olmayıp, canlıların üreme kapasitelerini etkilemezler, dolayısı ile nesilden nesile aktarılabildiklerinden görülme sıklıkları fazladır. Mutasyonlarda ise canlıların üreme kapasiteleri ve canlılıklarını sürdürebilme özellikleri doğrudan etkilendiğinden toplumdaki görülme sıklıkları fazla değildir [103] .

Gen polimorfizmleri bir populasyonun normal bireyleri arasında genomik DNA'nın farklılık gösterdiği tek baz çifti değişiklikleridir [104]. Popülasyonlarda yaygın görülen gen polimorfizmleri, etnik ve coğrafi farklılıklar gösterirler. Birçok durumda, hücre metabolizması için önemli olan yolaklarda (DNA tamiri, hücre döngüsü kontrolü, sinyal iletimi vb.) rol alan genlerin kritik bölgelerinde yer alırlar. Bazı durumda genin kodladığı proteinin fonksiyonu ya da enzim aktivitesi bu değişikliklerden önemli ölçüde etkilenebilir. Hücre metabolizması için kritik önem taşıyan proteinlerin fonksiyonunun bozulması çeşitli hastalıklara yol açmakta veya bazı hastalıklar için riski artırmaktadır [105].

Genetik çeşitlilik, türlerin farklılaşmasından ve bir türün üyeleri arasındaki farklılıklardan sorumludur. Genomda çoğunluğu tek nükleotit düzeyinde olmak üzere (insanda on milyon kadar), ikili, üçlü nükleotit tekrar sayılarında değişiklikler ve daha azı kromozom düzeyinde bazı yapısal düzenlemeler şeklinde genetik polimorfizmler bulunmaktadır [106].

II.6.1 Polimorfizm Çeşitleri

Popülasyon içerisindeki polimorfizmler oluş nedenlerine göre; tek nükleotid değişim (Single Nucleotide Polymorphism-SNP), insersiyon ve delesyon olmak üzere üç başlık altında gruplandırılabilirler.

II.6.1.1 Tek Nükleotid Değişimi (Single Nucleotide Polymorphism:SNP):

DNA dizisinde her 2000-2500 bazda bir tek baz farklılığı gözlenir. Bu da aynı tür içerisinde genom farklılığının bir göstergesidir. Tek nükleotid değişim polimorfizminin bazı alt grupları vardır.

Transisyon: Dizi içindeki bir pürin bazının (A, G) diger bir pürin bazına veya bir primidin bazının (T, C) diger bir pirimidin bazına dönüşmesine transisyon denir.

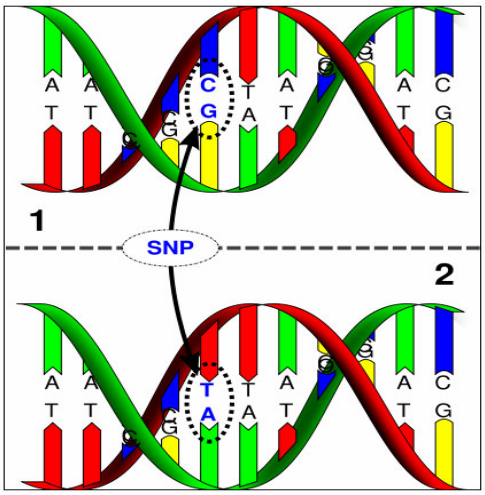
A, G_G, A

C, T _T, C

Transversiyon: Dizi içindeki bir pürin bazının (A,G) bir primidin bazına (T,C) veya bir primidin bazının bir pürin bazına dönüşmesine transversiyon denir.

A, G _T, C

T, C _G, A



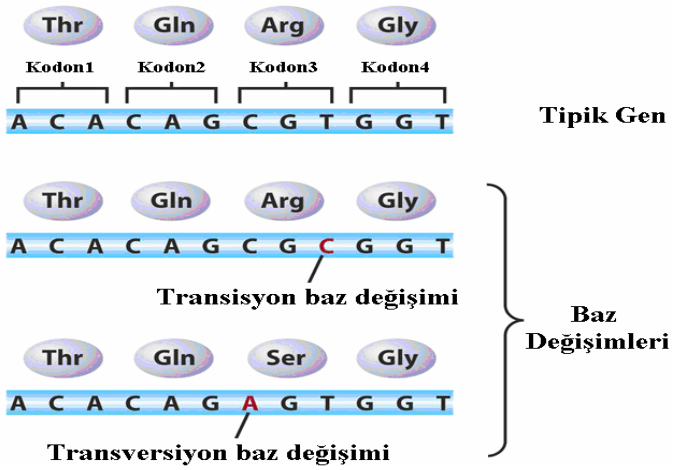
Şekil.II.12 Transisyonla tek nükleotid değişimin gösterilmesi [107].

II.6.1.2 İnsersiyon

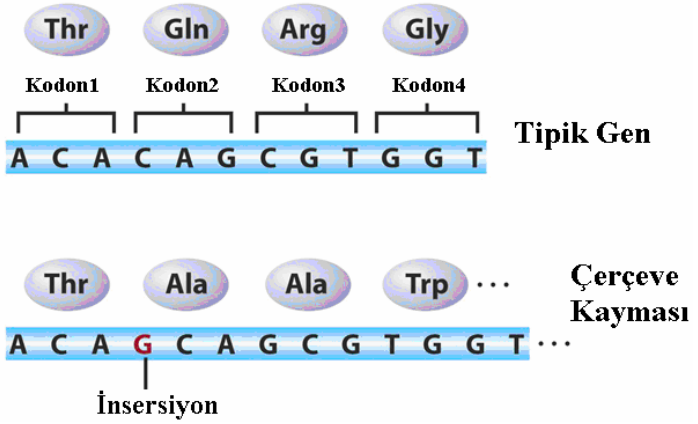
DNA içerisine tek bir nükleotid ya da nükleotidlerin eklenmesine insersiyon denilmektedir. Nükleotidlerin eklenmesi, genin normal uzunluğundan daha uzun olmasına neden olur. Bu protein kodlayan bir gen ise, proteinin amino asit dizisinde artma olur. İnsersiyonla tek bi nükleotid eklendiğinde bile çerçeve kayması oluşarak tüm proteinin amino asit dizilimi değişebilir dolayısı ile sentezlenecek olan proteinin tamamen yapısı bozulabilir.

II.6.1.3 Delesyonlar

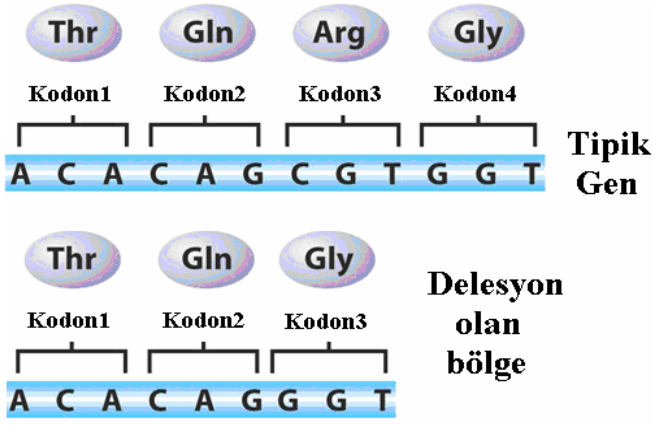
DNA dizisi içerisinden tek bir nükleotidin ya da nükleotidlerin kırılıp ayrılması delesyon olarak adlandırılmaktadır. DNA üzerindeki bir delesyon, genin normal uzunluğundan daha kısa olmasına neden olur [108].



Şekil II.13 Transisyon ve transversiyonla tek nükleotid değişimi



Şekil II.14 İnsersiyonla (nükleotid eklenmesi) çerçeve kayması



Şekil.II.15 Delesyon ile çerçeve kayması

II.6.2 SNP'lerin Proteinlerin Yapı ve Fonksiyonlarına Etkileri

Tek nükleotid polimorfizmi; DNA üzerindeki yeri ve tipine göre, proteinin yapı ve fonksiyonunu etkileyebilir. Şöyleki:

- Kodlanan bölgede oluşan sessiz (silent) bir SNP, amino asit farklılığı oluşturmuyorsa, sentezlenen proteinin yapı ve fonksiyonunda herhangi bir değişikliğe neden olmaz.
- DNA üzerinde meydana gelen bir SNP, tesadüfen "Dur" kodonunu (TAA, TAG, TGA) oluşturuyorsa, SNP'nin bulunduğu noktadan itibaren protein sentezi durur ve yarım kalan protein aktif bir şekilde fonksiyonlarını yerine getiremez.
- SNP, bir genin sentezi ile ilgili düzenlemeleri içeren promotor bölgede ise; transkripsiyonla oluşan mRNA düzeyi ve stabilitesi, dolayısı ile gen ekspresyon düzeyi değişir [109].

II.7 KANTİTATİF POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

Günümüzde en yaygın olarak kullanılan ve kesin sonuçlar veren nicel PCR metodu, eş zamanlı PCR'dır. (RT-PCR). Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPZR, kinetik PZR, homojen PZR, gerçek zamanlı PZR), gelişmiş sıcaklık döngü cihazi kullanarak DNA ve RNA örneklerinin kalitatif ve kantitatif olarak miktarlarının ölçülebildiği bir yöntemdir. qPZR yöntemi sayesinde kısa sürede çok sayıda örnek, geleneksel PZR'a göre çok daha az kontaminasyon riski ile çalışılmaktadır [110].

qPZR'da ürün analizi reaksiyon sırasında bilgisayar ekranına aktarılmaktadır. Böylece geleneksel PZR tekniğinde kullanılan agaroz jel elektroforezi, poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE), ultraviyole (UV) görüntüleme gibi uzun zaman alan işlemler uygulanmamaktadır. qPZR ürünlerinin analizleri normal PZR'da kullanılan primerlere ek olarak, diziye özgü olmayan floresans boyalar veya diziye özgü problar ile yapılmaktadır [110, 111]. Bu sistemlerdeki PZR reaksiyonunda, ardı ardına gerçekleşen döngülerde üretilen PZR ürününün miktarı orantılı biçimde yayılan bir florasan sinyali ile ilişkilendirilmiştir. Her bir reaksiyon döngüsünde, üretilen PZR ürünün miktari ile orantılı olarak sinyal artar. Her bir döngü florasan sinyal miktarı kayıt edilir ve logaritmik faz boyunca PZR reaksiyonu

görüntülenir. Florasan sinyalinin ilk önemli artışı, hedef DNA'nın başlangıçtaki miktarı ile ilşkilidir [112].

II.7.1 Erime Eğrisi Analizi

Polimeraz Zincir Reaksiyonunun bağlanma *(annealing)* aşamasında primerler ile birlikte problar da tek iplikli DNA'ya bağlanır. Problar yan yana gelir ve enerji transferi gerçekleştiğinden floresans miktarı artar. PZR bittikten sonra erime eğrisi analizi yapılarak sonuçlar belirlenir. Hibridizasyon probları erime sıcaklıklarına (Tm) geldiklerinde bağlı oldukları DNA dizisinden ayrılırlar. Birbirleri üzerindeki enerji transferi ortadan kalktığı için daha az ışıma yaparlar.

Prob' un tasarlandığı genotipe göre erime sıcaklığı değişmektedir. Probun tasarımı yabanıl tip *(wild type)* genotipe göre yapılmış ise tek iplikli DNA dizisi ile prob bire bir örtüşerek sağlam bağlanma gerçekleşeceğinden probun erimesi ve DNA dizisinden ayrılması zor olacaktır ve erime sıcaklığı yüksek olacaktır. DNA dizisinde mutasyon varsa prob DNA ile tam bir örtüşme gerçekleştiremeyeceğinden bağlanma zayıf, erime sıcaklığı da daha düşük olacaktır. Eğer probun tasarımı mutant tipe göre ise mutant genotipin erime sıcaklığı daha yüksek, yabanil tip genotipin erime sıcaklığı daha düşük olacaktır.

Baz kompozisyonundaki nükleotid pozisyonu ve komşu nokta mutasyonları Tm sıcaklığını etkilemektedir.

II.7.2 Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonun Kullanım Alanları

1. Biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve mRNA düzeyinin sayısal olarak belirlenmesi (Gen anlatım kantitasyonu),
2. Viral kantitasyon,
3. Patojenlerin tespiti,
4. DNA hasarı (mikrosatellit instabilitesi) tespiti,
5. Metilasyon tespiti,
6. Erime eğrisi analizi ile genotip belirlenmesi,
7. Amniyotik sıvıdan elde edilen çocuğa ait tek hücrede prenatal tanı,
8. Hemoglobinopatilerin prenatal tanısında kullanılmaktadır [111, 113].

II.7.3 Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyon Sisteminin Avantajları

1. Reaksiyon sırasında floresans ışıma ile eş zamanlı olarak veri toplanarak aynı anda analiz yapılabilmektedir.

2. Diziyi tanıyan ya da diziye özgü mutasyonu tanıyan problar kullanıldığından spesifik olmayan çoğaltımlardan etkilenmez.

3. Sonuç almak için ikinci bir tekniğe gerek yoktur. Bu sayede yüksek verimilik sağlamaktadır.

4. Kapalı bir sistem olduğu için kontaminasyon riski çok azdır.

5. Reaksiyon bittikten sonra başka işlemlere ihtiyaç duyulmadığından qPZR işlemi yaklaşık 45 dakika sürmektedir.

6. Özel eğri analizleri ile spesifik çoğaltımlar tanımlanmaktadır.

7. Reaksiyonun duyarlılığı, özgüllüğü ve tekrarlanabilirliği yüksektir [113,114].

II.7.4 Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyon Sisteminin Dezavantajları

1. Reaksiyon sırasında kullanılan malzemelerin çok pahalı olması,

2. Teknik donanım, alt yapı, beceri, tecrübe ve yüksek ekipmana ihtiyaç olması,

3. Sadece bilinen mutasyonların taranabilmesi,

4. Laboratuarlar arasında sonuçların farklı çıkması ve standardizasyon problemlerinin varlığı bilinen dezavantajlardandır [114, 115].

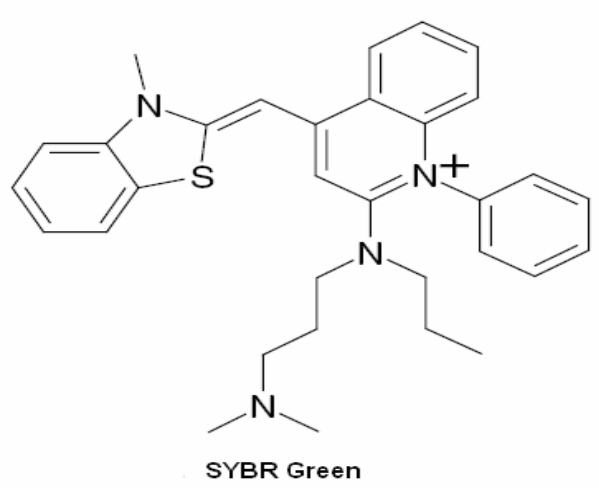
II.8 KANTİTATİF POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONUNDA KULLANILAN BOYA VE PROB SİSTEMLERİ

Kantitatif PZR tekniği, DNA çoğaltımının eş zamanlı olarak özel boyalarla gözlenmesidir. Sıklıkla kullanılan kimyasallar özel floresan prob ve boyalardan oluşmaktadır [116, 117].

II.8.1 SYBR Green I Boyası

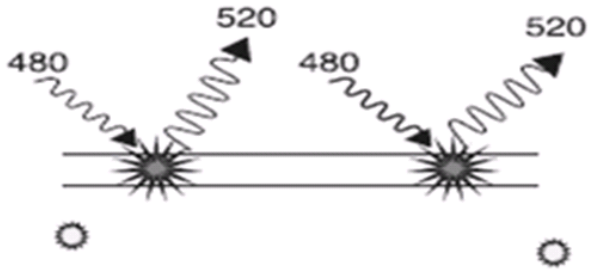
SYBR Green I boyası özgün olmayan çift iplikli DNA'nın çoğaltımında kullanılmaktadır**.** Bu yöntemde kullanılan floresan boya çift zincirli DNA'ya bağlanmakta ve çoğalan DNA miktarı arttıkça qPCR cihazında okunan floresansın

miktarı da eş zamanlı olarak artmaktadır. Diziye özgün olmayan DNA'ya bağlanan boyalar arasında en fazla kullanılan boya çeşidi SYBR Green I'dir (Şekil II.16). SYBR Green I 497 nm dalga boyunda yükseltgenir ve 520 nm dalga boyunda indirgenir [111].



Şekil II.16 SYBR Green'in kimyasal yapısı [111].

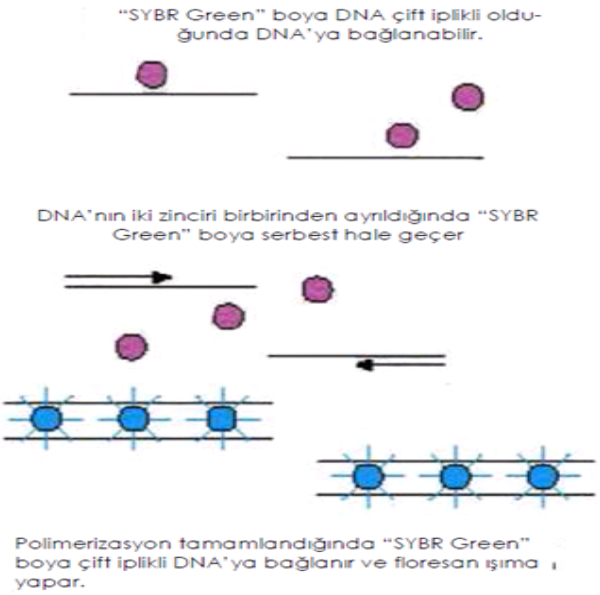
Sybr Green I çift iplikli DNA'nın küçük oluğuna bağlandığında serbest halinden 1000 kat daha kuvvetli floresans ışıma yapar (Şekil II.17) [118] ve 30 çoğaltım döngüsünden sonra aktivitesinin yalnızca % 6'sını kaybeder [111].



Şekil II.17 Sybr Green I floresansının çift iplikli DNA molekülüyle birleşmiş hali [118].

Çoğaltım başlangıcında reaksiyon tüpü içersinde çift iplikli DNA molekülü, primerler ve "SYBR Green I" boyası bulunmaktadır. Serbest DNA moleküllerinin floresans ışıma miktarı çok azdır. Bu yüzden reaksiyon başında floresans yok denecek kadar azdır. Primerlerin bağlanmasıyla uzama başlar ve boya molekülü çift iplikli DNA'nın arasına girerek ışımayı başlatır (Şekil II.18). Başlangıç döngülerinde

sinyal zayıftır. Ürün miktarının artışına bağlı olarak floresans miktarı artmakta ve bu artış cihaz monitöründen izlenebilmektedir [111,119].

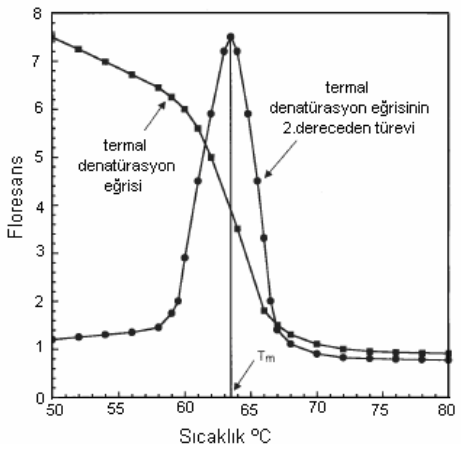


Şekil II.18 SYBR Green yöntemi [120].

Sybr Green tüm çift iplikli DNA moleküllerine bağlandığı için DNA probları kadar özgül değildir. Ancak PZR'dan sonra ürünün uzunluğu ve baz dizisine özgül erime sıcaklığı değerlerinin hesaplanması ile DNA erime eğrilerinin çizilmesine olanak sağlayan avantajlı bir yöntemdir. SYBR Green I yöntemi, optimize edilmiş PZR koşullarında ve iyi dizayn edilmiş primerler ile çok fazla sayıda hedef genin çoğaltımını sağlamaktadır. SYBR Green I yönteminde floresans işaretli problara ihtiyaç duyulmadığından maliyeti düşük ve pratiktir.

SYBR Green I yönteminde, istenmeyen PZR ürünlerinin çoğaltılmasıyla meydana gelen floresan ışımalar oluşacağından, elde edilen sinyaller her zaman hedef DNA'nın çoğaltıldığını göstermeyebileceğinden hatalı sonuçlar alınabilir. Reaksiyon karışımında hedef DNA dizisi olmadığı zaman primerlerin birbirine bağlanması ile primer dimerleri olarak adlandırlan çift iplikli DNA bölgeleri ve özgül olmayan PZR ürünleri floresans ışıma oluşturmaktadır [119, 121]. Çoğaltılan DNA'nın istenilen hedef bölge olup olmadığının belirlenmesi amacıyla DNA'ların erime eğrisi analizleri ("*melting curve*", "*dissociation*") yapılmalıdır. qPZR cihazı, DNA'ların erime eğri analizlerini yapmak için PZR kapillerlerini yavaşça ısıtmaya

başlar. Isıtma işlemi ile çift iplikli DNA birbirinden ayrılmaya başladığında (erime sıcaklığı= *melting temperature*= Tm), floresans boya serbest kalmakta ve okunan floresan ışıma miktarı düşmektedir. Her DNA'nın kendine özgü bir erime sıcaklığı (Tm) derecesi vardır ve bu erime sıcaklığı çoğalan DNA parçalarının uzunluğuna ve içerdiği GC/AT oranına bağlı olarak değişmektedir. Spesifik olmayan PZR ürünleri ve hedef DNA parçalarının erime sıcaklıkları farklıdır. Bu farklılık her ürünün uzunluk ve gen dizisi içeriğinin özgüllüğünden kaynaklanmaktadır. Bilinmeyen iki DNA dizisi karşılaştırılmak istendiği zaman erime eğrisi yöntemi güvenle kullanılmaktadır. (Şekil II. 19) [116, 117, 120, 122]**.**



Şekil II.19 Sybr Green I yöntemi kullanılarak elde edilmiş çift iplikli hedef DNA'nın termal denatürasyon eğrisi [111].

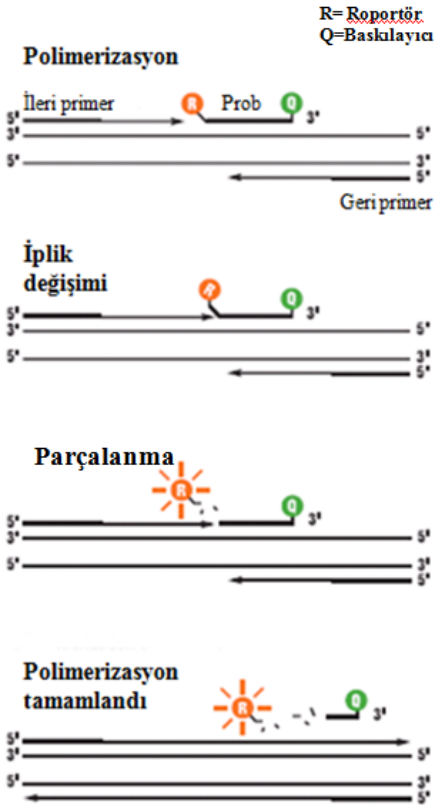
II.8.2 Diziye Özel Floresans İşaretli Problar

DNA parçasına ait özel bir bölge çoğlatılmak istendiğinde hedefe özgü floresan işaretli problar kullanılmaktadır [111]. İyi dizayn edilmiş bir prob serbest halde zayıf floresan verirken istenilen hedefe bağlandığında kuvvetli floresan vermelidir ve özgüllüğü yüksek olmalıdır. qPZR yönteminde kullanılan en yaygın floresan işaretli problar: "*TaqMan*" prob, "Molecular boncuk", "*FRET* - Hibridizasyon Probları" ve "*Scorpion*" 'dur [110, 116, 117].

II.8.2.1 *TaqMan*® Probu

TaqMan® prob yöntemi çift-boyalı oligonükleotid (*Double-Dye Oligonucleotide)*, çift işaretli prob (*dual labeled probe)* veya *5′* nükleaz probu (*5′ nuclease probe)* olarak adlandırılmaktadır. *TaqMan*® prob yönteminde çoğaltılmak istenilen DNA'ya tamamlayıcı olan ve floresans işaretlenmiş tek zincirli bir prob bulunmaktadır.

Floresan işaretli probun 5' ucunda yüksek enerjili florofor (6-karboksifloresin= 6-FAM) ve 3' ucunda düşük enerjili baskılayıcı (*quencher*) (6-karboksitetrametil-rodamin= TAMRA) boya yer almaktadır [153]. Probun 3' ucundaki baskılayıcı TAMRA boyası probun 5' ucundaki FAM boyasının sinyal oluşturmasını engellemektedir. Prob hedef DNA'ya bağlandığında ölçülen floresans sinyali düşüktür. PZR da çoğaltılma sırasında hedef nükleik asit dizisi üzerinde primerlerin bağlanma bölgeleri arasında *TaqMan* problar bağlanarak primer bağlanmasının ardından yeni zincir oluşturmaya başlarlar. Taq DNA polimeraz enzimi probun bağlandığı bölgeye gelindiği zaman 5'→3' nükleaz aktivitesi ile 5' ucundan florofor FAM'ı probdan ayrılmakta ve serbest hale geçen FAM sinyal oluşturmaktadır. Her döngüde ürün miktarı arttıkça floresans ona bağlı olarak artmaya devam eder (Şekil II.20) [123]. Bu yöntem ile mutasyon tespiti sayısal verilere ulaşabilmektedir. TaqMan prob yöntemi standart protokolü ve kolay dizaynı ile çok az bir optimizasyonla gerçekleştiği için hem allellerin belirlenmesi hem de gen anlatım profilinin çıkartılmasında sıklıkla kullanılmaktadır [124, 125].

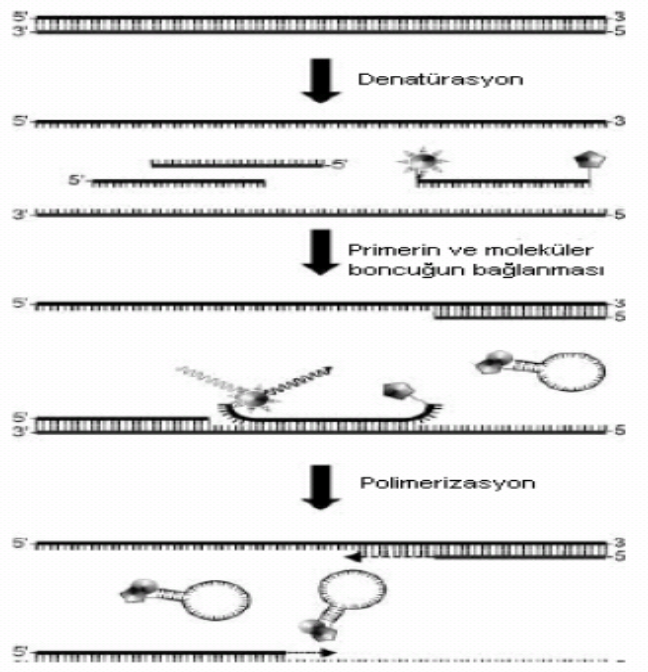


Şekil II.20 *Taq Man* Prob yöntemi [126]

TaqMan® real-time PCR kuantifikasyonu. PCR aşamasında üç çift primer kullanılır. 1. ve 2. primerler her bir DNA iplikciği üzerinden replikasyonu başlatır.3. (prob) ise aralarından bir zincire bağlanır. Prob, iki modifiye edilmiş baz içerir; 5' ucunda bulunan floresan reporter (R) ve 3'ucundaki floresan quencer (Q). Replikasyon esnasında 1. primer yönünde uzayan DNA iplikciği, probun 5'ucunu zincirden ayırır ve polimerazın eksonükleaz aktivitesi floresan reporter molekülünü probdan ayırır. Qencerden ayrılan reporter molekülü floresan ışıma yapar. Oluşan floresan ışınımın başlangış miktarına göre oranı, her bir PCR döngüsünde ölçülür.

II.8.2.2 Moleküler Boncuk Yöntemi

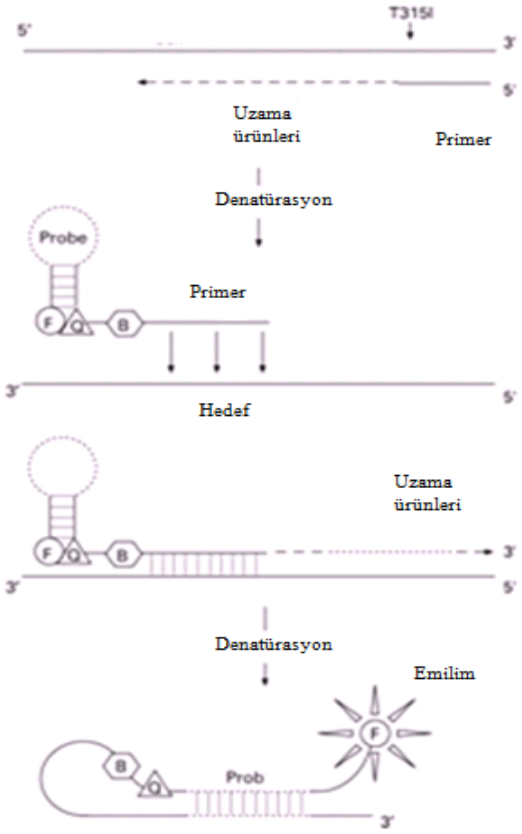
Moleküler Boncuk yöntemi çalışma prensibi ile *TaqMan* Prob ve SYBR Green yöntemlerinden farklılık göstermektedir [110, 120, 127, 128]. Moleküler boncuk yönteminde, saç tokası (*hairpin*) şeklindeki yapının yuvarlak uç kısmı çoğatılacak olan hedef DNA ile komplementer tek iplikli DNA dizisi içermektedir. Şaç tokası şeklindeki yapının düz olan uç kısımları 2 adet florofor boya içermektedir. Baskılayıcı florofor boya diğer boyanın ışımasını engellediği için moleküler boncuk probu solüsyon içinde serbest haldeyken ışıma yapamaz. Çoğaltılmak istenen hedef DNA bölgesi PZR ile çoğaltılmaya başladığı zaman prob hedef DNA dizisine göre dizyn edildiğinden birbirleri ile karşılaştıklarında konformasyonu değişmekte ve düz, çift iplikli hale geçmektedir. Bu yapı termodinamik olarak saç tokası şeklinden daha kararlıdır. Moleküler boncuk yapısı hedef nükleik asit dizisi ile hibridize olur olmaz molekülün yapısı değişmekte ve boyalar birbirlerinden uzaklaştığı için floresans miktarı artmaktadır (Şekil II.21) [128]. Moleküler boncuk yönteminde prob dizaynı ve optimal şartlar çok önemlidir. Uygun sıcaklığın elde edilemediği şartlarda ortamda hedef DNA dizisi bulunsa bile probun saç tokası şeklindeki yapısı değişmeyeceğinden ışıma elde edilemeyebilir [127, 128]. Moleküler boncuk yöntemi genetik tarama, tek nükleotid polimorfizm çalışmaları ve farmakogenetik çalışmalarda kullanılmaktadır [120, 129].



Şekil II.21 Moleküler Boncuk yöntemi [128]

II.8.2.3 Scorpiyon Primerler

Scorpion prob tekniği, saç tokası şeklinde uçları birbirine yapışık olarak işaretlenmiş prob-primerler ile birleştirilmektedir. PZR sürecinde primerler replikasyonu gerçekleştirirken, problar açılarak yeni sentezlenen PZR ürünlerine hibridize olur ve floresans baskılayıcı boyadan ayrılarak sinyal üretirler (Şekil II.22) [110].



Şekil II.22 Scorpiyon Primerlerle qPZR [130]

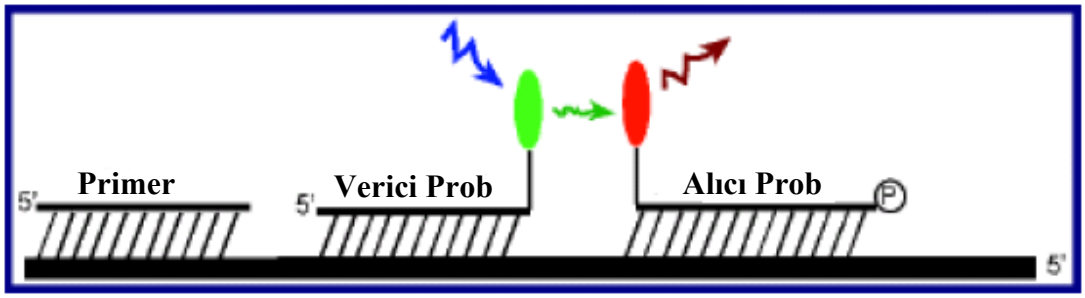
II.8.2.4 *Simple* Prob

Simple Prob testlerde, mutasyonu bilinen gen içindeki çoğaltılmak istenen bölge primerler tarafından çoğaltılmaktadır. *Simple* probların tasarımları yabanil tip ya da mutant tip dizisinin tamamlayıcısı olarak yapılmaktadır. Yabanil tip ve mutant tip genotip arasındaki farklılık erime sıcaklığı ile belirlenmektedir [131].

II.8.2.5 Florosans Rezonan Enerji Transferi (FRET analizi, Hibridizasyon Prob Yöntemi)

Hibridizasyon prob yöntemi (*FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer*) *Roche* firması tarafından *LightCycler*® PZR cihazında kullanılması amacıyla geliştirilmiştir [132, 133]. Bu teknik amplifikasyon primerlerinin iç tarafına göre tasarlanan iki farklı probdan oluşmaktadır. Problardan birinin 3' ucunda floresans işaretli verici boya (*donor*), diğerinin 5' ucunda ise alıcı boya (*acceptor*) bulunmaktadır. PZR reaksiyonu sırasında iki prob hedef nükleik asit dizisine bağlanıp birbirlerine yaklaşır ve enerji yayılımı oluşur. Enerji "verici" boyadan

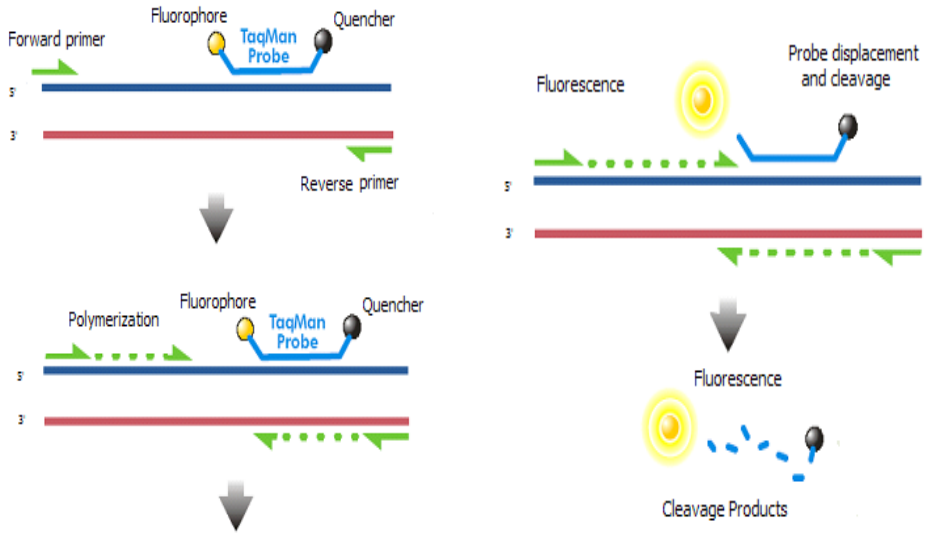
"alıcı" boyaya transfer olmaktadır. Enerji transferiyle oluşan floresans miktarı PZR süresince oluşan ürün miktarına bağlı olarak artmaktadır [116, 117, 119, 122, 132].



Şekil II.23 Hibridizasyon prob yöntemi [132]

HybProbe hibridizasyon probları, amplifikasyon döngüsünün ilk fazı sırasında amplifiye fragmanlarının iç dizisine bağlanan 2 farklı işaretli oligonükleotit içerir. LightCycler® sistemde Real Time PCR sırasında, HybProb' larla SNP tesbitinin temel basamakları aşağıdaki gibidir.

1. Verici boya probu, 3' ucunda floresan işaret ve alıcı boya probu 5' ucunda LightCycler kırmızı işaret içerir. PCR'ın denaturasyon fazı sırasında hibridizasyon gerçekleşmez. Bağımsız boyalar arasındaki mesafeden itibaren enerji transferi engellenir ve bu faz süresinde kırmızı alıcı boyadan hiç floresans saptanmaz.
2. Problar baş kuyruk düzenlemesinde amplifiye DNA fragmanına hibridizedir, böylece en yakın 2 floresan boya floresin, yeşil flerosan ışık yaymaya sebep olan LightCycler malzemelerinin ışık kaynağıyla uyarılır. Yayılan enerji florasan rezonans enerji transferiyle LightCycleri uyarır. İkinci probla yayılan kırmızı florasan, florasan yoğunluğu en fazla olduğunda, her basamağın sonunda ölçülür.
3. Bu aşamadan sonra, sıcaklıkta artışı (uzama basamağı); probların bağlandığı bölgeden ayrılmasına öncülük eder
4. Bu aşamanın sonunda PCR ürünü çift ipliklidir, kantitatif çoğalım (Aplifikasyon) sırasında kullanılan Hybprobe lar, solüsyona ve bozulmadan serbest halde geri döner.



Şekil. II.24 Hibridizasyon prob yöntemi

II.9 PEROKSİREDOKSİN 6 GENi YAPI VE ÖNEMİ

Oksidatif stres birçok hastalığın oluşum ve gelişiminde rol almaktadır. Antioksidan enzimler, süperoksit ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerini uzaklaştırarak oksidatif strese karşı hücresel savunma sağlamaktadırlar. Antioksidan enzim düzeylerinin yükselmesiyle sonuçlanan sinyal yolaklarının aktivitelerindeki değişiklikler aynı zamanda artan oksidatif stres direncine ve yaşam süresinin uzamasına neden olur [134,135].

Peroksiredoksinler (Prx) ökaryot ve prokaryotlarda geniş bir yayılım gösteren peroksidazların bir üyesidir . Peroksiredoksinler aktif redoks sistein kalıntılarının hidrojen peroksidi indirgemesinde kullanılan peroksidaz enzimleridir [136]. Prx'in en önemli görevi organik hidroperoksit (ROOH), peroksinitrit ve hidrojen peroksitlerin zehir etkisini azaltmak veya yok ederek antioksidatif etki göstermektir [137]. Prx selenyumsuz peroksidazın üst ailesidir [138,139]. Birçok bulguya göre, Prx reaktif oksijen türlerinin (ROS) enzimatik taşınmasında fizyolojik olarak önemli rol oynamakta ve vücut hücrelerini yüksek reaktif oksidatif strese karşı korumaktadır [140]. Peroksiredoksin enzimleri katalitik mekanizmalarına göre üç sınıfta incelenirler. Şöyleki; tipik 2-Cys, atipik 2-Cys , 1-Cys. Tipik 2-Cys Prx iki adet katalitik sistein kalıntısı içermektedir [141,142]. Prx1-Prx4 izoformları 2-Cys altgrubuna aittir. Prx-5 hem 2-Cys ve hemde atipik 2-Cys alt grubuna aittir. Prx-6

ise Prx ailesinin 1-Cys alt grubunda sınıflandırılmaktadır [140,143-145]. 1-Cys Prx proteinleri katalitik aktiviteleri için N-terminal kalıntıya ihtiyaç duymaktadır [146]. Peroksidatik sistein hidrojen peroksit tarafından doğrudan okside edilerek diğer sisteini çözündüren sülfanik bir türev meydana getirir.

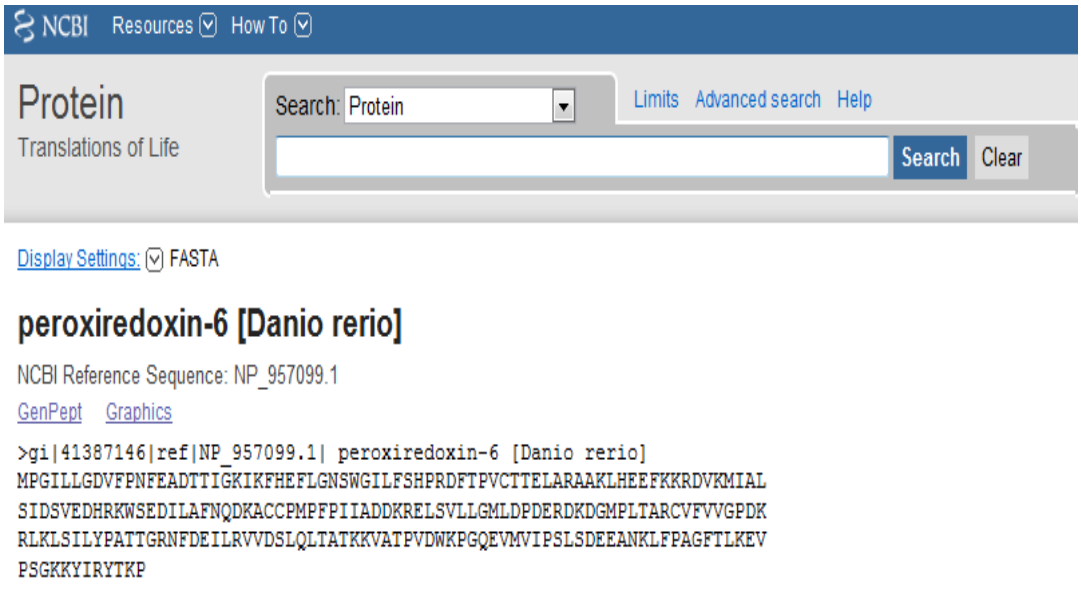
Tipik 2-Cys Prx ise tiyoredoksin peroksidazlarıdır. Tipik 2-Cys Prx tiyoredoksin peroksidaz aktivitesi hidrojen peroksidin toksin etkilerinden korunmada öngem taşımaktadır. Ancak tipik 2-Cys Prx'in tiyoredoksin peroksidaza bağımlı olmayan aktivitelerinden sinyal iletimi [147-149] ve şaperon [150,151] bulunmaktadır. Genetik çalışmalar tipik 2-Cys Prx'lerin DNA hasarı, oksidatif stres ve kansere karşı koruyucu rolleri olduğunu göstermiştir [152-154]. Prx-6 1-Cys sınıfına ait olup antioksidatif olaylarda görevlidir.

Peroksiredoksin geni rs41055489 polimorfizmi 20'inci kromozomun 1719953'inci pozisyonda bulunmaktadır. rs41055489 polimorfizmi A-C nükleotid değişimi sonucunda oluşmaktadır. Literatür taramamızda Prx-6 genine ait 100 adet tek nükleotid polimorfizmine (SNP) rastlanmıştır. Çalışmamızda genotip sıklıklarını belirleyeceğimiz rs41055489 polimorfizmi referans SNP'lerden biridir.

Ağır metaller besin zinciri boyunca metabolik bakımdan aktif doku ve organlarda birikmektedir. Bu birikim de hücresel ve moleküler düzeyde işlevsel ve yapısal bozukluklara sebep olmaktadır. Yapılması planlanan çalışma model organizma olan *Danio rerio*'da antioksidatif etkileri bulunan Prx6 genindeki rs41055489 varyantının allelik dağılımını ve ağır metale karşı doğal formun ne ölçüde koruyucu yönde önlemler geliştirebildiğini gösteren niteliğe sahip Türkiye'de ilk çalışma olma özelliğindedir.

II.9.1 Zebra balığında Prx 6 geninin yapısı

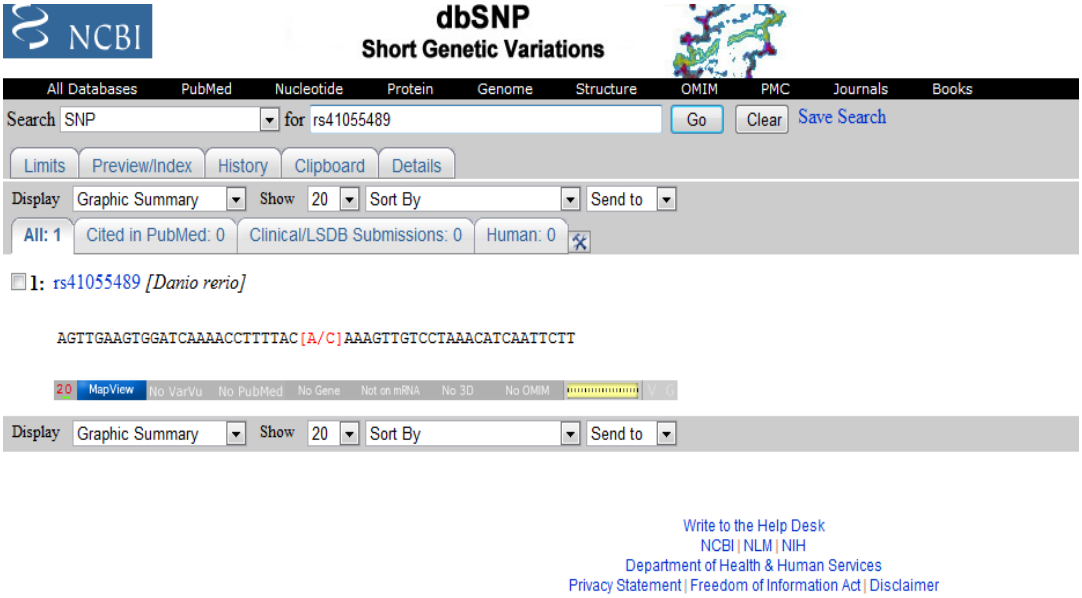
Prx6 geni, *Laternula elliptica* [155], *Chinese shrimp Fenneropenaeus chinensis* [156], *Haliotis discusdiscus* [157], *Crassostrea giga* [158], ve *Arenicola marin*a [159] gibi bazı deniz türlerinde tanımlanmıştır. Prx6 geni *Salmo salar* (GenBank kodu. ACI67571), *Oncorhynchus mykiss* (GenBank kodu. NP_001158604), *Ictalurus punctatus* (GenBank kodu. ABG77029), ve *Danio rerio* (GenBank kodu. NP_957099) olmak üzere sadece dört balık türünde dizilenmiştir. Çalışmamızda kullandığımız *Danio rerio'ya* ait gen bankasından alınmış olan prx6 geni FASTA dizisi Şekil II.24'de verilmiştir.

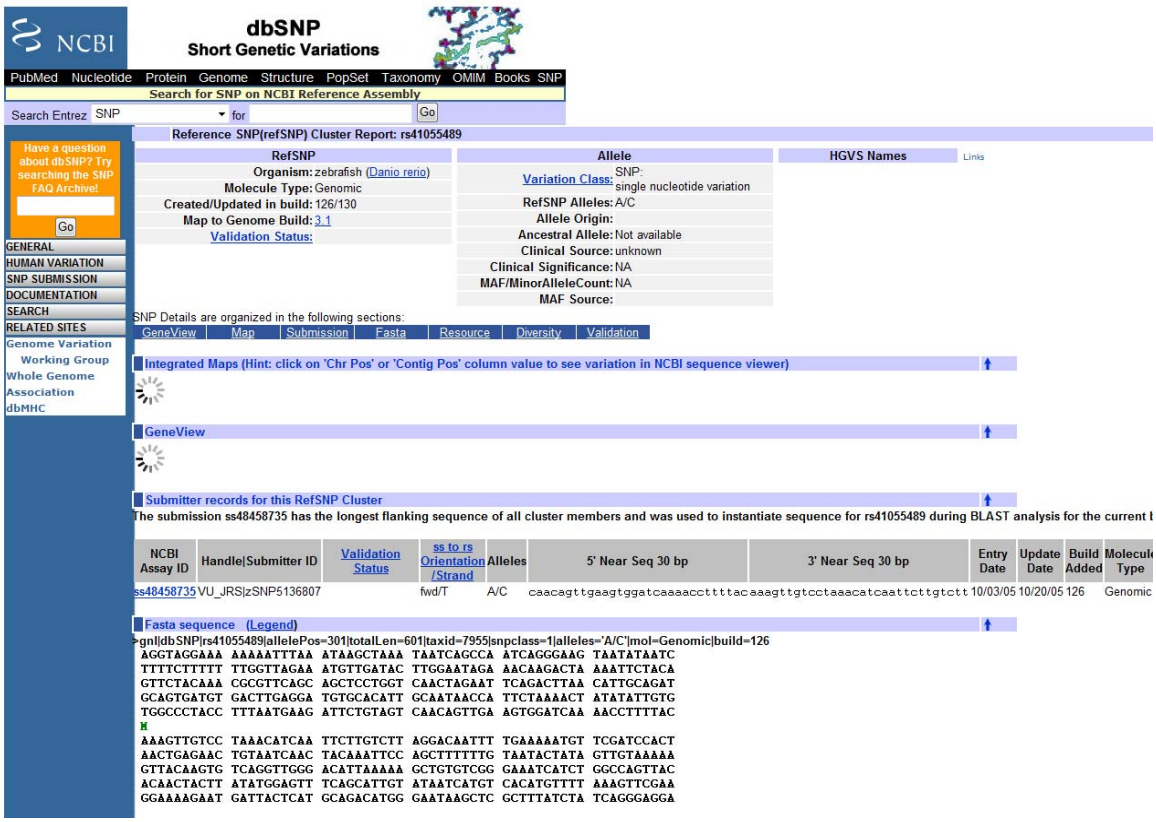


Şekil II.25 Zebra balığı' na (*Danio rerio)* ait Prx6 geni FASTA'sı

II.9.2 rs41055489 polimorfizmi

Çalışmamızda kullandığımız *Danio rerio'ya* ait gen bankasından alınmış olan Prx6 geni rs41055489 polimorfizmi FASTA dizisi Şekil II.25' de verilmiştir.





Şekil II.26 Zebra balığına ait Prx6 geni rs41055489 polimorfizmi FASTA dizisi

BÖLÜM III ÇALIŞMALAR

MATERYAL VE YÖNTEM

III.1 MATERYAL

III.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

III.1.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

1) High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) (11814770001)
2) Zebra balığı prob seti: 1nM
3) LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe, 96 rxn (3003248001)
4) Primer, 100 nmol, PCR Grade, 300 Mer (OG130-IDT)
5) Triklorasetik asit (TCA) (CCI_3COOH) (PANREAC)
6) Tiyobarbitürik asit (TBA) ($C_4H_4N_2O_2S$) (MOLYCHEM)
7) Albumin (Sigma A-2153)
8) n-butanol ($CH_3(CH_2)_3OH$) (MERCK)
9) Sodyum sitrat
10) 5-5'ditiyobis 1-2 nitrobenzoik asit (DTNB) (Sigma D8130)
11) EDTA-Na tuzu % 35 (MULTICELL)
12) Disodyum fosfat (Anhydrous, Na_2HPO_4) (MOLYCHEM)
13) Sodyum Klorür (NaCl) (MERCK)
14) Bradford reaktifi (SIGMA)
15) Hidroklorik asit %37 (HCl) (MERCK)
16) Hidrojen peroksit % 35 (H_2O_2) (MERCK)
17) Sodyum hidroksit (NaOH) (MERCK)
18) Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) (MERCK)
19) Metafosforik asit (MERCK)

20) Magnezyum Klorür (MgCl), (Merck)

21) Proteinaz K (Roche, 03 115 879)

22) Fenol/Kloroform/İzoamil alkol (25:24:1), (SİGMA,25:24:1)

23) Ethanol, (MBG, A-3678)

24) Bovine Serum Albumine (BSA) (SIGMA)

25) Sitrik Asit (Trisodyum Dihydrate) (BIOMATIK)

III.1.1.2 Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

1. TBA Çözeltisi (0,047 M)
   TBA 500 mg
   NaOH 1M 6 ml
   H_2O 69 ml
2. NaOH Çözeltisi
   NaOH 1 M 4 g
   H_2O 100 ml
3. Triklorasetik asit (TCA) Çözeltisi
   TCA 20 ml (%100 g' lık)
   HCl 5 ml (% 37 g lık , d=1,19 g/dl lik HCl)
   H_2O 100 ml
4. Sodyum sitrat Çözeltisi
   Sodyum sitrat 1 g
   H_2O 100 ml
5. Elman Ayıracı (% 40 mg DTNB)
   DTNB 40 mg
   Sodyum sitrat (%1g lik)
   H_2O 100 ml
6. Proteinsizleştirme Çözeltisi
   Metafosforik asit 1,67 g
   EDTA-Na 0,2 g
   NaCl 30 g
   H_2O 100 ml

7. Disodyum fosfat Çözeltisi (0,3 M)

   $Na_2HPO_4 . 2H_2O$ 5,34 g

   H_2O 100 ml

8. Fosfat tamponu (50 mM, pH=7.0)

   a) KH_2PO_4 6.81 g

      H_2O 1000 ml

   b) $Na_2HPO_4 . 2H_2O$ 8.90 g

      H_2O 1000 ml

9. H_2O_2 çözeltisi (30 mM) + Fosfat tamponu

   H_2O_2 0,31 ml d=1.11 g/ml % 30 g lık

   Fosfat tanponu 100 ml 50 mM pH= 7.0

III.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

CİHAZ ADI	**MARKA**
Spektrofotometre	BECKMAN COULTER DU® 730 Life Science UV/Vis
Mikrosantrifüj	BECKMANCOULTER Microfuge®18
Vortex	BIOSAN V-1 Plus
Manyetik Çalkalayıcı	VELP Scientifica
Su Banyosu	Nüve NB 9
Hassas Terazi	Precia XT 320M
Mikro-DisMembrator U	Sartorius
Santrifüj	Nüve CN 180
Soğutmalı Santrifüj	SIGMA 3-18K
Derin Dondurucu (-80)	Thermo Scientific Forma 700 Series
Derin Dondurucu (-20)	Arçelik No Frost
Otomatik Pipet Seti	RAININ Pipet-lite
Otoklav	
Etüv	BİNDER
Çeker ocak	
UV kabin	
Eş Zamanlı Termal Döngü Cihazı (qPZR sistemi)	ROCHE

III.1.3 Çalışma Grubu

III.1.3.1 Çalışmada Kullanılan Balıklarının Akvaryum Ortamına Uyumu

Çalışmada kullanılacak olan zebra balıkları Marmara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Zooloji Araştırma Laboratuvarı'na getirildi. Zebra balıklarının akvaryum ortamına uyumları sağlandı.

III.1.3.2 Çalışma Materyali

Piyasadan temin edilen 109 adet zebra balığı (*Danio rerio*) Marmara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Zooloji Araştırma Laboratuvarına iç içe geçirilmiş siyah iki naylon torba içerisine 2/3 oranında su konularak taşınmıştır.

III.1.3.3 Çalışmada Kullanılan Akvaryum Sistemleri Yem ve Yemleme Düzenleri

Zebra balıkları büyüklükleri 70x30x45 cm olan 7 adet cam deney akvaryumlarına gruplara ayrılarak nakledildi. Balıkların bulunduğu akvaryumlardaki su sıcaklığı 26-28°C arasında ve pH 7 olacak şekilde sabitlenerek, akvaryumlara bir hava motoru yardımı ile yeterli düzeyde (9-12 mg/l) oksijen verildi. Denemede balıkların beslenmesi için toz balık yemi kullanılmıştır. Yemleme, doyana kadar sabah ve akşam olmak üzere günde 2 öğün tekrarlanmıştır.

III.1.3.4 Çalışmada oluşturulan deney grupları

Tablo III. 1 Deney Grupları

	DENEY GRUPLARI	BALIK SAYISI
1. grup :	Hiçbir stres faktörü olmayan ve doğal yaşam sıcaklığında (28 C^0) yetişrilen erişkin zebra balıklar	10
2. grup :	28 C^0 sabit sıcaklıkta 0.1 ppm bakır (Cu) konsantrasyonu içeren akvaryumlarda 24 saat bekletilmiş zebra balıkları	10
3. grup :	28 C^0 sabit sıcaklıkta 0.1 ppm çinko (Zn) konsantrasyonu içeren akvaryumlarda 24 saat bekletilmiş zebra balıkları	10
4. grup :	28 C^0sabit sıcaklıkta 0.1 ppm kadmiyum (Cd) konsantrasyonu akvaryumlarda 24 saat bekletilmiş zebra balıkları	10
5. grup :	28 C^0 sabit sıcaklıkta 0.5 ppm bakır (Cu) konsantrasyonu içeren akvaryumlarda 24 saat bekletilmiş zebra balıkları	10
6. grup :	28 C^0 sabit sıcaklıkta 0.5 ppm çinko (Zn) konsantrasyonu içeren akvaryumlarda 24 saat bekletilmiş zebra balıkları	11
7. grup :	28C^0 sabit sıcaklıkta 0.5 ppm kadmiyum(Cd) konsantrasyonu içeren akvaryumlarda 24 saat bekletilmiş zebra balıkları	14
8.grup :	28C^0 sabit sıcaklıkta 1 ppm kadmiyum Cd) konsantrasyonu içeren akvaryumlarda 24 saat bekletilmiş zebra balıkları	4
9. grup :	28 C^0 sabit sıcaklıkta 1 ppm çinko (Zn) konsantrasyonu içeren akvaryumlarda 24 saat bekletilmiş zebra balıkları	4
10.grup :	28 C^0 sabit sıcaklıkta 1 ppm bakır (Cu)konsantrasyonu içeren akvaryumlarda 24 saat bekletilmiş zebra balıkları	4
11.grup :	28C^0sabit sıcaklıkta 5 ppm kadmiyum (Cd) konsantrasyonu içeren akvaryumlarda 24 saat bekletilmiş zebra balıkları	4
12.grup :	28C^0 sabit sıcaklıkta 5 ppm çinko (Zn) konsantrasyonu içeren akvaryumlarda 24 saat bekletilmiş zebra balıkları	4
13.grup :	28C^0 sabit sıcaklıkta 5 ppm bakır (Cu) konsantrasyonu içeren akvaryumlarda 24 saat bekletilmiş zebra balıkları	4

III.2 KULLANILAN İNCELEME YÖNTEMLERİ

III.2.1 Balık Dokularından Genomik DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu, *High Pure PCR Template Preparation* Kiti' ndeki kılavuza uygun olarak yapılmıştır**.**

1. Ağır metal ve kontrol grublarına ait balıklardan alınan solungaç dokuları steril koşullarda tartıldı**.**
2. 1.5 µl' lık eppendorf tüpe doku örneği tartılarak aktarıldı.
3. Üzerine 200 µl doku parçalama tamponu (*Lysis Buffer*) eklendi.
4. Homojenize edildi.
5. Üzerine 40 µl proteinaz K eklendi.
6. Çok hızlıca elle karıştırıldı.
7. 1 saat 55 ^{0}C'de inkübe edildi.
8. Üzerine 200 µl bağlayıcı tampon (*Binding Buffer*) eklendi.
9. İyice karıştırdı.
10. 70 ^{0}C' de 15 dakika inkübe edildi.
11. Her bir tüpün üstüne 100 µl izopropanol eklendi ve iyice karıştırıldı.
12. Bu aşamada homojenize olmamış doku parçacıkları atıldı.
13. Fitreli tüp, toplatıcı tüpün üzerine konuldu.
14. Eppendorf tüpteki sıvı, filtreli tüpe aktarıldı.
15. 8000 g' de 1 dakika santrufüj edildi.
16. Toplayıcı tüp sıvı ile birlikte atıldı. Filtreli tüp temiz bir toplayıcı tüpün içine konularak üzerine 500 µl inhibitör uzaklaştırıcı tampon (*İnhibitor Removal Buffer*) eklendi.
17. 8000 g' de 1 dakika santrifüj edildi.
18. Alt faz atıldı.
19. Filtreli tüp yeni bir toplama tüpü ile birleştirildi.
20. Filtreli tüpün içine 500 µl yıkama tamponu (*Wash Buffer*) eklendi.
21. 8000 g' de 1 dakika santrifuj edildi.
22. Alt sıvı atıldı. Filtreli tüp yeni bir toplayıcı tüp ile birleştirildi.
23. Filtreli tüpün içine 500 µl yıkama tamponu eklendi.
24. 8000 g' de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atıldı.

25. Filtreli ve toplayıcı tüpler birleştirilerek 10 saniye 18.000 rpm'de santrifüj edildi.
26. DNA içeren filtreli tüp, 1.5 ml'lik eppendorf tüpün içine konuldu.
27. Önceden ısıtılmış 200 µl süzme tamponu (*Elution Buffer*) filtreli tüpe eklendi.
28. 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
29. Eppendorf tüpe süzülmüş olan DNA saflık ve miktar tayinleri yapıldıktan sonra -20^{0}C'de saklandı.



Şekil III.1 Dokudan genomik DNA izalasyonu



Şekil III.2 Zebra balıklarından solungaç dokularının ayırılması



Şekil III.3 Kullanılan *High Pure PCR Template Preparation* Kiti



Şekil III.4 Solungaç dokularının tartımı ve homojenize edilişi

III.2.2 DNA Miktarının ölçülmesi

Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyundaki ışığı maksimum düzeyde absorbe etmektedir. Bu dalga boyundaki absorbsiyon derecesi nükleik asitlerin miktarının ölçüsü göstermektedir. DNA'nın miktar ve saflığını belirlemek amacıyla her bir örnek spektrofotometrede 260 nm (DNA için) ve 280 nm (protein için) dalga boylarında ölçülerek belirlendi [160].

1 optik dansite (OD) çift iplikli DNA için 50 µg/ml tek iplikli DNA veya RNA için 40 µg/ml ve oligonükleotidler için ise 20 µg/ml'ye karsılık gelmektedir. İzole edilen DNA çift iplikli ise, miktarının belirlenmesi için 260 nm'deki absorbsiyon değeri 50 ile çarpılmaktadır [161,162].

DNA(µg/ml) = 260 nm'deki OD x seyreltme oranı x katsayı [163].

260 nm OD ölçümünün 280 nm OD ölçümüne oranı bize DNA'da protein ya da RNA kontaminasyonu olup olmadığı hakkında bilgi vermektedir. Sağlıklı bir PCR analizi için OD 260 / OD 280 oranı 1.8 ile 2.0 arasında olmalıdır. OD'nin 2.0'nin üzerinde olması protein kontaminasyonuna, 1.8'in altında olması da RNA kontaminasyonuna işaret eder.



Şekil III.5 DNA'nın miktar ve saflığının spektrofotometrik olarak belirlenmesi

İzole edilen DNA'ların DNA'ların optik dansitesi Kimya Bölümü Enstrümental Araştırma Laboratuvarındaki Shimadzu/ UV-1800 model spektrofotometrede konsantrasyonlarını ölçmek üzere 2 µl DNA solüsyonu 1698µl suya ilave edilerek 1/850 oranında seyreltildi ve DNA'ların absorbans degerleri 260 ve 280 nm dalga boylarında okundu. Elde edilen değerler için OD 260 / OD 280 değerinin 1.8 ile 2.0 arasında olmasına dikkat edildi.

III.2.3 Prx-6 Geni Çoğaltılması ve rs41055489 Polimorfizminin Tespiti İle İlgili Yöntemler

Çalışmada *LightCycler 2.0* qPZR cihazına uygun *LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe* kiti (Şekil Y.) ve *Hibridizasyon* prob (FRET) (*TıbMolBiol* Kiti) kullanılarak Prx-6 geni rs41055489 polimorfizminin genotip belirlenmesi yapıldı.

Cu, Zn, Cd gibi ağır metallere maruz bırakılan stresli balık grubu ve hiç ağır metale maruz bırakılmayan stressiz kontrol balıkların solungaç doku örneklerinden *High Pure PCR Template Preparation* Kit (ROCHE) kullanılarak genomik DNA'ları izole edildi [164]. Çalışmamızda rs41055489 genotiplerini belirlemek amacıyla *hibridizasyon* prob ve primer dizileri kullanıldı. rs41055489 tek nükleotid polimorfizmine ait *hibridizasyon* prob kullanılarak *LightCycler FastStart DNA Master* kiti ile hedef bölge kantitatif olarak *qPCR LightCycler 2.0* sistemi ile çoğaltıldı. Erime eğrisi (Melting curve) analizi kullanılarak, uygun erime sıcaklıklarının incelenmesiyle genotipler belirlendi.

LightCycler® FastStart DNA Master hibridizasyon prob kiti, hibridizasyon probu belirleme formatı için özel olarak oluşturulmuş kullanıma hazır bir reaksiyon

karışımı olup, LightCycler kapiller sisteminde kullanılmaktadır. Reaksiyonlar 20µl' lik cam kapillerlerde sıcak başlangıçlı (Hot-start) PZR ile gerçekleştirilmektedir. Sıcak başlangıçlı PZR, polimeraz zincir reaksiyonunun başlangıcında spesifik olmayan amplifikasyon ürünlerinin oluşumunu en aza indirerek reaksiyonun hassasiyet ve özgünlüğünü arttırır (1,2,3,4 kit).

FastStart Taq DNA polimeraz, 75^0C'ye kadar aktivite göstermeyen termostabil rekombinant Taq DNA polimerazın modifiye formudur. Enzim sadece yüksek sıcaklıklarda aktive olduğundan, primerler spesifik olmayan bağlanma yapamazlar. Polimeraz zincir reaksiyonu öncesinde uygulanan 95^0 C, 10 dk'lık bir ön muamele ile, enzim tamamen aktive edilir.

III.2.3.1 Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile rs41055489 Genotiplerinin Belirlenmesi

Çalışmada *LightCycler 2.0 (Roche ,Almanya)* qPCR cihazına uygun *LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe* kiti ve *Hibridizasyon* Probe (*TıbMolBiol* Kiti) kullanılarak Prx-6 geni rs41055489 polimorfizminin genotip belirlenmesi yapıldı.

Erime eğrisi (*Melting curve*) analizi kullanılarak, uygun erime sıcaklıklarının incelenmesiyle genotipler belirlendi.

Genotip belirlemek için hazırlanan karışımda ddH_2O, hibridizasyon prob, ileri ve geri primerler, FastStart DNA Master (LightCycler FastStart enzim, FastStart Taq DNA polimeraz, reaksiyon tamponu, dNTP karışımı, 10mM $MgCl_2$), $MgCl_2$ ve DNA örnekleri kullanıldı (Tablo III.2).

Tablo III.2 Peroksiredoksin-6 geni rs41055489 polimorfizmi qPCR reaksiyon karışımı içeriği

Kullanılan Malzemeler	**Kullanılan Miktar (Final konsantrasyon)**
Çift distile su	8.0 µl
Prob I	1.2 µl (0.4 µM)
Prob II	1.2 µl (0.4 µM)
$MgCl_2$ (25mM)	1.6 µl (3.0 µM)
Primer I	2.0 µl (0.5 µM)
Primer II	2.0 µl (0.5 µM)
FastStart DNA Master HybProbe (enzim)	2.0 µl
Kalıp DNA	2.0 µl (50 ng)

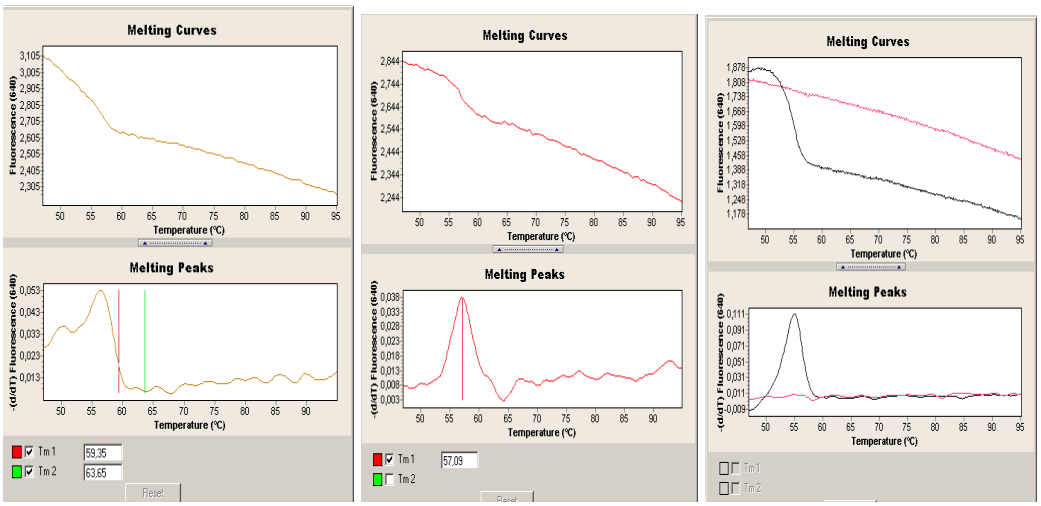
Prx-6 geni rs41055489 genotipleri belirlenecek olan DNA örneklerine ait reaksiyon karışımlarının hacmi 20 µl olacak şekilde hazırlandı.

rs41055489 genotiplerini belirlemek amacıyla hazırlanan karışımlara "*LightCycler 2.0 (Roche Applied Science, Almanya)"* sisteminde Tablo III.3' de belirtilen sıcaklık uygulandı.

Tablo III.3 LightCycler® Programı

Program	**Denaturasyon**	**Döngü**			**Erime**			**Soğutma**
Parametre								
Analiz Modu	Hiçbiri	Ölçme			Erime Eğrisi			Hiçbiri
Döngüler	1	45			1			1
Bölüm	1	1	2	3	1	2	3	1
Sıcaklık [^{0}C]	95	95	60	72	95	40	75	40
Süre [ss:dd:ss]	00:10:00	00:00:10	00:00:10	00:00:15	00:00:30	00:02:00	00:00:00	00:00:30
Cihaz işlem hızı [^{0}C/s]	20	20	20	20	20	2	—	20
Elde Etme Modu	Hiçbiri	Hiçbiri	Tek	Hiçbiri	Hiçbiri	Hiçbiri	Devamlı	Hiçbiri

Kantitatif PZR'nunu takiben erime eğrisi analizi yapılarak, standart erime eğrisi analiz grafiğine göre genotipler belirlendi. Prx geni rs41055489 polimorfizmi 1719953'inci pozisyonundaki A/C nükleotid değişimi sonucunda oluşmaktadır. Prx geni rs41055489 genotiplerini belirlemek amacıyla polimorfizme ait standart eğri grafiği temel alınarak her bir örnek değerlendirildi. Kullandığımız *hibridizasyon prob* (HybProbe) yabanıl tipteki genotipe göre tasarlandığından, yabanıl tip genotipin Tm sıcaklığı mutant tip genotipinin Tm sıcaklığından daha yüksek olacaktır. Standart eğri grafiğinde "A" allelinin sıcaklık derecesindeki (57.09^0C) eğri yabanil tip genotipi, "C" allelinin sıcaklık derecesindeki (63.65^0C) eğri mutant tip genotipi ve her iki sıcaklık derecesindeki eğri heterozigot genotipi göstermektedir (Şekil III.4). Sıcaklık derecelerinde gözlemlenen 2^0C' lik farklar dikkate alınmamıştır. Prx6 geni rs41055489 genotiplerinin belirlenmesindeki tüm uygulamalarda *LightCycler® 4.1* yazılımı kullanıldı.



Hetorozigot Tip Genotip Homozigot Yabanıl Genotip Negatif Kontrol Tip

Tablo III.4 Prx-6 geni rs41055489 polimorfizmine ait standart erime grafiği

III.2.3.2 Prx6 Geni rs41055489 Genotiplerinin Belirlenmesinde Kullanılan Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyon Protokolü

Çalışmada genotipleri belirlenecek olan tüm örneklerin genomik DNA'ları elde edildi.

Kantitatif PZR *LightCycler® 2.0,* (*Roche Applied Science,* Almanya) sistemine sırasıyla SNP çalışma protokolü ve örnekler kaydedildi (Şekil III.6).



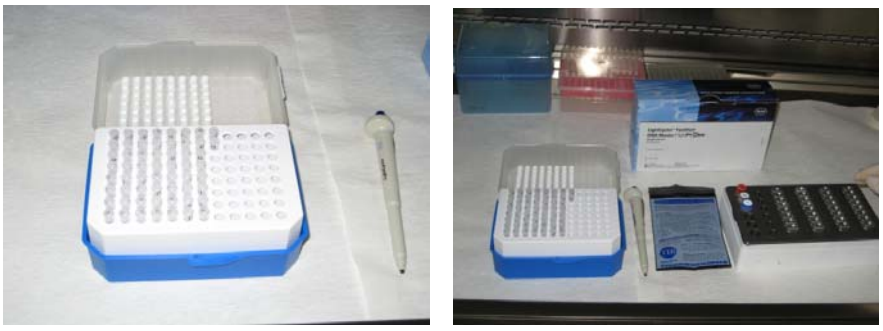
Şekil III.6 *LightCycler®* 2.0 kapiller sistemi, Roche

PZR karışımının tüm basamakları steril kabin içinde buz üstünde gerçekleştirildi. Bütün reaktifler tamamen çözdürüldü ve pipetaj yöntemi ile iyice karıştırıldı. Tüp içeriklerinin dibe toplanması için mikrosantrifüj cihazıyla santrifüj edildi. Reaksiyon karışımı …tablo Y' de belirtilen miktarlarda ışıktan uzak tutularak hazırlandı.

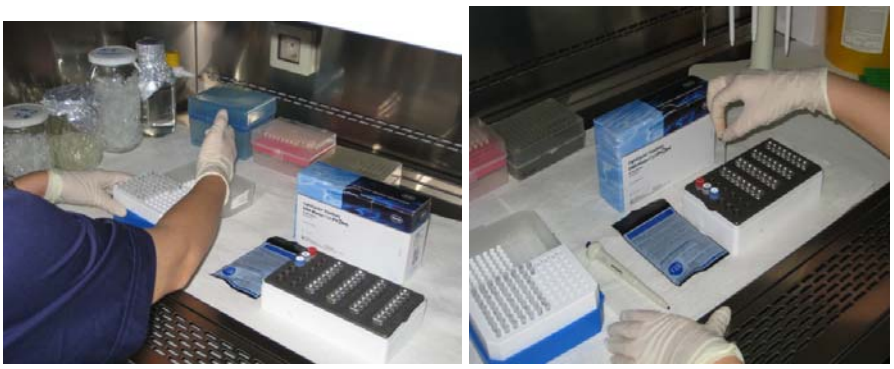


Şekil III.7 *LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe* kiti

Cam kapiller tüpler (20µl) soğuk bloğa yerleştirildi (Şekil III.7) ve her bir kapillere reaksiyon karışımından 18µl dağıtıldı (Şekil III.9). Karışıma DNA örneklerinden 2 µl ilave edildi ve kapillerlerin plastik kapakları kapatıldı. Reaksiyon karışımının kapillerlerin dibinde toplanması için satrifüj edildi.



Şekil III.8 *LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe* kiti, kapillerler ve soğuk blok



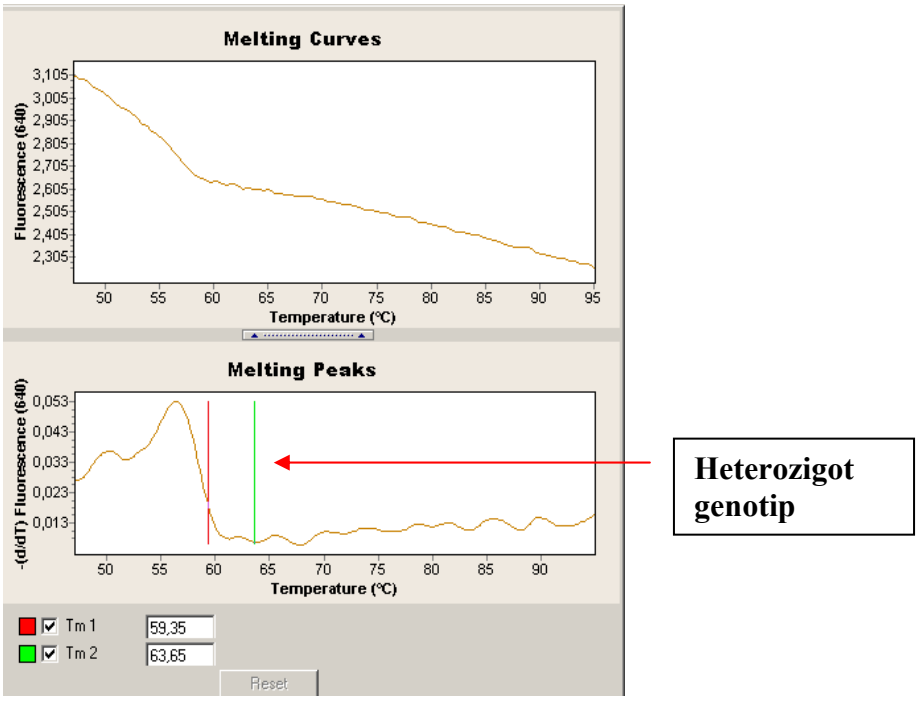
Şekil III.9 Cam kapillerlere qPZR reaksiyon karışımının dağıtılması.

Cam kapillerler dikkatlice LightCycler karuseline yerleştirildikten sonra, "LightCycler 2.0 (Roche Applied Science, Almanya)" cihazında konumlandırılarak sistem çalıştırıldı (Şekil III.10).

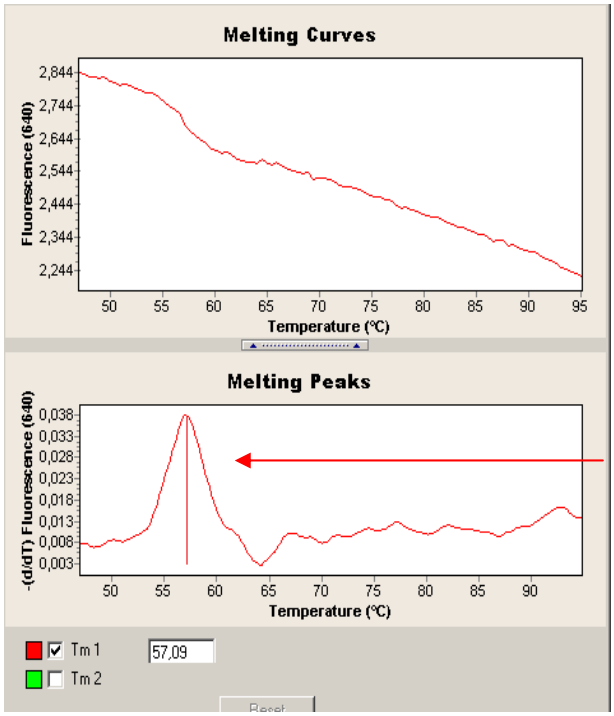


Şekil III.10 Cam kapillerlerin qPZR cihazına yerleştirilme işlemi

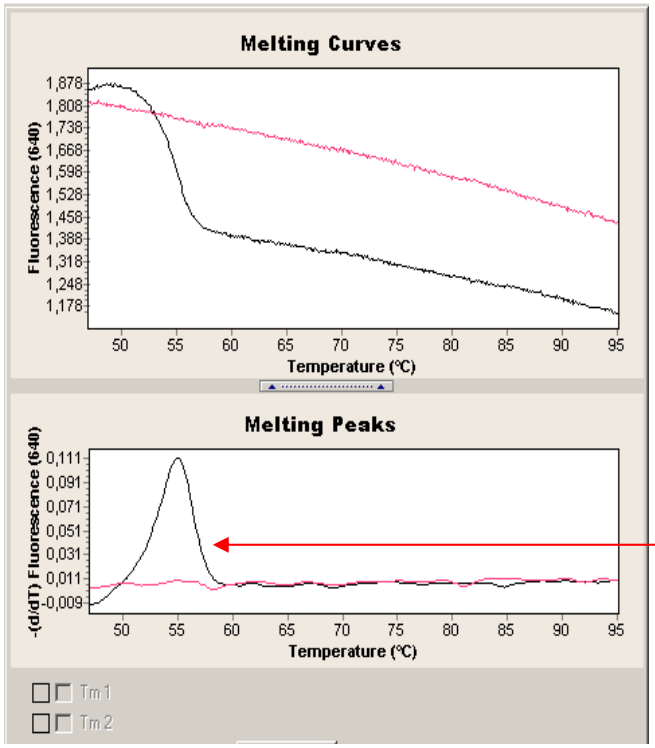
PZR işlemi bittikten sonra genotipleri belirlemek için, PZR ürünlerine erime eğrisi analizi yapılarak sonuçlar aşağıda belirtildiği gibi değerlendirildi (Şekil III.11, Şekil III.12, Şekil III.13).



Şekil III.11 Tm: 59.35 ve 63.65^{0}C. rs41055489 heterozigot tip genotip (A/C)



Şekil III.12 Tm: 57.09^{0}C. r41055489 yabanıl tip genotip (A/A)



Şekil III.13 Tm: 0^{0}C. Negatif kontrole ait erime eğrisi

III.2.5 LİPİT PEROKSİDASYONU VE ANTİOKSİDANLARIN TAYİNİ

III. 2.5.1 % 10 Gramlık Doku Homojenatı Hazırlanması

Solungaç doku örnekleri ayrı ayrı serum fizyolojik ile yıkanıp kanı temizlendikten sonra bir süzgeç kağıdı ile kurutularak tartılır ve kaydedilir. Gerekli miktarda serum fizyolojik ile cam boncuk yardımıyla dismembratörde çok çabuk olarak homojenize edilir. Doku homojenatı ayrı ayrı küçük kısımlara ayrılarak ependorf tüpleri içinde, gerekli bilgiler üzerlerine yazılarak gerekirse derin dondurucuda çalışılacağı güne kadar saklanır. Aynı gün çalışılacaksa +4 buzdolabında bekletilir.

% 10 gramlık doku homojenatı için gerekli olan serum fizyolojik hacmi,

$$\text{Serum fizyolojik hacmi (ml)} = \frac{\text{Nemli doku tartımı (mg)}}{100}$$ formülü ile

hesaplanır.



Şekil III.14 Solungaç Dokularının Dismembratörde Parçalanması



Şekil III.15 Doku Homojenizasyon işlemleri

III.2.5.2 Solungaç Dokusunda Protein Tayini (Bradford Yöntemi) [165].

Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlere bağlanması sonucunda oluşturduğu renkli çözeltilerin 595 nm'de absorbansının ölçülmesi ilkesine dayanır.

Gerekli çözeltiler:

- % 10 mg albümin stok çözeltisi: 10 mg albümin biraz distile suda tamamen çözüldükten sonra hacmi 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

- Protein çalışma standart çözeltileri**:** Stok çözeltiden uygun hacimler alınarak % 20, 40, 60, 80 µg albumin ihtiva edecek şekilde distile su ile seyreltilerek hazırlanır.
- Bradford reaktifi: Stok çözeltiden kullanılır.

Deneyin yapılışı:

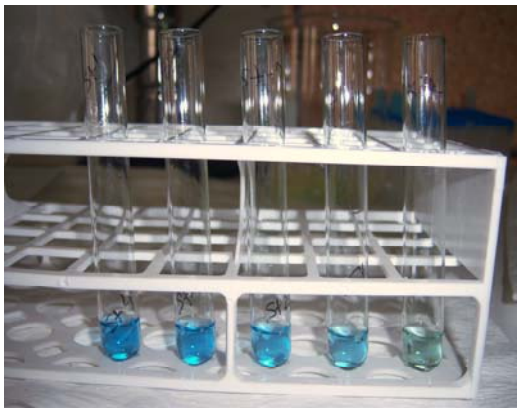
6 deney tüpü alınarak numune (N), standart 1 (St1), standart 2 (St2), standart 3 (St3), standart 4 (St4) ve kör (K) olmak üzere işaretlenir ve aşağıdaki gibi çalışılır.

	Numune	Standart 1	Standart 2	Standart 3	Standart 4	Kör
Albumin (%10mg)	_	20 µl	40 µl	60 µl	80 µl	_
Doku Homojenatı	25 µl	_	_	_	_	_
Distile su	775 µl	780 µl	760 µl	740 µl	720 µl	800 µl
Vortekste karıştırılır.						
Bradford reaktifi	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

Vortekste iyice karıştırılır, oda sıcaklığında 15 dk. bekletilir. 15 dk. sonunda 595 nm'de köre karşı absorbanslar kaydedilir.

Hesaplama :

Standart grafiği yardımıyla protein miktarı hesaplanır.



Şekil III.16 Standartların Renk Göstergesi (En Sağdaki Tüp Kör Tüpüdür).

III.2.5.3 Solungaç Dokusunda Malondialdehit (MDA) Tayini (Ledwozyw Yöntemi) [166].

LPO ürünü olan MDA ile tiyobarbitürik asit (TBA) arasındaki reaksiyon sonucu oluşan pembemsi rengin absorbansı spektrofotometrik olarak değerlendirilir.

Gerekli çözeltiler:

- TBA çözeltisi (0.047 M) : 500 mg TBA ile 6 ml 1 M lık NaOH ile karıştırılır. Üzerine 69 ml distile su ilave edilir.
- NaOH (1 M) : 4 gram NaOH tartılır, biraz distile suda çözülür, hacmi 100 ml' ye distile su ile tamamlanır.
- Triklorasetik asit (TCA) çözeltisi (1.22 M, 0.6 M HCl'deki): 20 ml TCA (%100 g TCA) ile 5 ml HCl (% 37 g lık, d=1.19 g/dl lik HCl) karıştırılır ve hacmi distile su ile 100 ml' ye tamamlanır.
- n-butanol: Stok çözeltiden kullanılır.

Deneyin yapılışı:

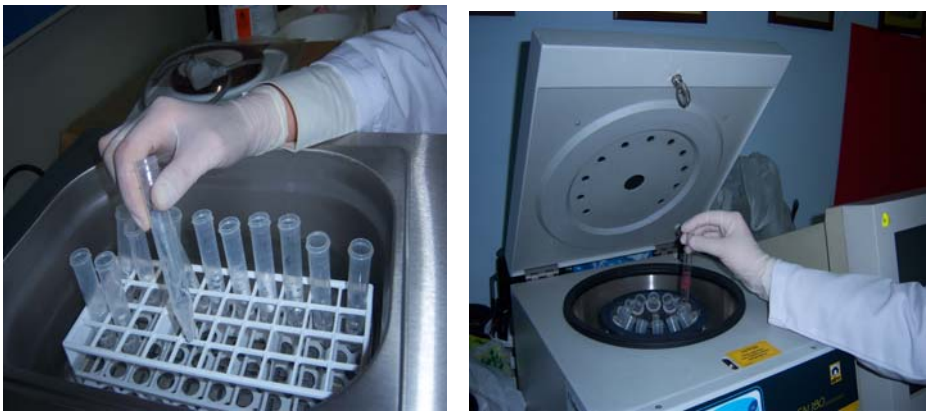
2 tane deney tüpü alınarak numune ve kör olmak üzere işaretlenir ve aşağıdaki gibi çalışılır.

	Numune	Kör
Doku homojenatı	0.25 ml	_
Distile su	_	0.25 ml
TCA	1.25 ml	1.25 ml
Vortekste karıştırılır ve 15 dakika bekletilir.		
TBA	0.75 ml	0.75 ml
Vorteks ile karıştırılır ve 30 dk kaynar su banyosunda inkübe edilir.		
n-Butanol	2 ml	2 ml

İlave edilir. Vortekslenir ve 10 dk. 3000 rpm'de santrifüj edilir. Butanol fazı alınarak 532 nm'de köre karsı absorbanslar kaydedilir.

Hesaplama:

Doku homojenatında LPO düzeyleri MDA için saptanmış ekstinksiyon kat sayısı ($1.56.10^5$ M^{-1} cm^{-1}) kullanılarak nmol MDA/ mg protein cinsinden hesaplanır.



Şekil III.17 MDA Tayinindeki Su Banyosu ve Santrifüj İşlemleri

III.2.5.4 Solungaç dokusunda İndirgenmiş Glutatyon (GSH) Tayini (Beutler Yöntemi) [167]

Elmann ayıracı, 5-5' ditiyobis 1-2 nitro benzoikasid (DTNB) ile sülfidril gruplarının reaksiyonu sonucu oluşan renkli ürün spektrofotometrik olarak değerlendirilir.

Gerekli çözeltiler:

• Sodyum sitrat çözeltisi (% 1 g) : 1 g sodyum sitrat tartılır, biraz distile suda çözülerek hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

• Elmann ayıracı (% 40 mg DTNB) : 40 mg DTNB (5-5' ditiyobis 1-2 nitrobenzoik asit) tartılır, biraz sodyum sitrat çözeltisinde (% 1 g) çözülür. Hacmi %1g'lık sodyum sitrat çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlanır.

• Proteinsizleştirme çözeltisi: 1.67 g metafosforik asit, 0.2 g etilen diamin tetra asetik asit sodyum tuzu (EDTA-Na), 30 g sodyum klorür ayrı ayrı biraz distile suda çözülür. Hepsi birleştirilir ve hacmi 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

• Disodyum fosfat (Na_2HPO_4) çözeltisi (0.3 M) : 4.26 gram Na_2HPO_4 veya (5.34 g Na_2HPO_4. $2H_2O$) biraz distile suda çözülür ve hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Deneyin yapılışı :

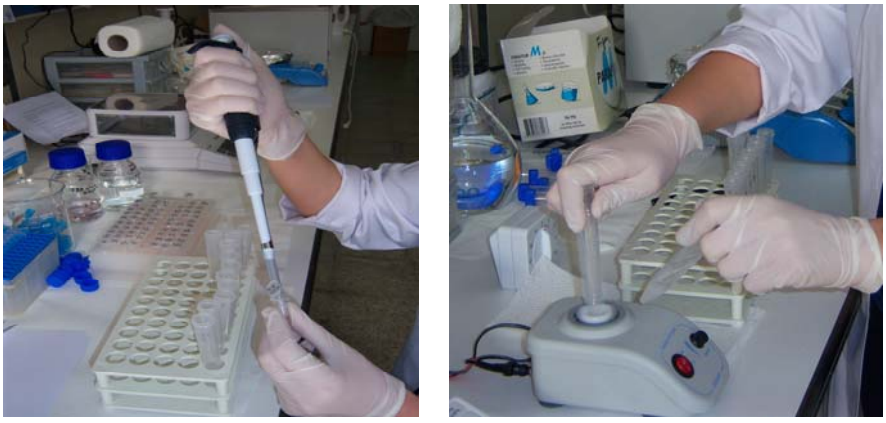
Bir deney tüpüne 0.2 ml doku homojenatı konur. Vorteks ile karıştırılır. Üzerine 0.3 ml proteinsizleştirme çözeltisinden ilave edilir. Vorteksle karıştırılır. 5 dk. oda sıcaklığında bekletilir. 4000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilir. Çökelti atılır. Süpernatant alınır. İki tane deney tüpü alınır. Numune ve kör olarak işaretlenerek aşağıdaki gibi çalışılır.

	Numune	Kör
Distile su	_	0.2 ml
Süpernatant	0.2 ml	_
Na_2HPO_4	0.8 ml	0.8 ml
Elmann ayıracı	0.1 ml	0.1 ml

Tüpler vortekste karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 dakika bekletilir. Köre karşı 412 nm'de absorbanslar kaydedilir.

Hesaplama:

Homojenatta GSH düzeyleri, seyreltme faktörü ve oluşan sarı renkli ürünün 412 nm'de ekstinksiyon katsayısı ($13600/M^{-1}cm^{-1}$) kullanılarak GSH µg /mg protein cinsinden hesaplanır.



Şekil III.18 GSH tayinindeki bazı deneysel işlemler

III.2.5.5 Solungaç Dokusunda Katalaz Aktivitesi (CAT) Tayini (Aebi Yöntemi) [168].

CAT enzimi; H_2O_2'nin, H_2O'ya dönüşüm reaksiyonunu katalizler. Bu dönüşüm 240 nm'de absorbansın azalması ile takip edilebilir. 1 dk.'da absorbanstaki azalma katalaz aktivitesi ile ilgilidir.

Gerekli çözeltiler:

- Fosfat tamponu (50 mM, pH=7.0) : a) 6.81 g KH_2PO_4 ve b) 8.90 g $Na_2HPO_4.2H_2O$ tartılıp ayrı ayrı biraz distile suda çözüldükten sonra hacimleri ayrı ayrı distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Kullanılacağı vakit a'dan 1 hacim b'den 1.5 hacim alınarak karıştırılır (pH=7.0 olmalı) 75 (2ºC de saklanır) (fosfat tamponu bakteriyel kontaminasyon olmadığı sürece stabildir, kullanılabilir)
- H_2O_2 çözeltisi (30 mM) + Fosfat tamponu**:** Yoğunluğu d=1.11 g/ml olan % 30 g lık H2O2 çözeltisinden 0.31 ml alınır ve 50 mM lık fosfat tamponu (pH=7.0) ile 100 ml'ye seyreltilerek taze hazırlanır.
- Doku homojenatı: Doku serum fizyolojik ile homojenize edilip seyreltilir.

Ön denemelerle dokunun ne kadar seyreltileceği önceden tespit edilir.

Deneyin yapılışı:

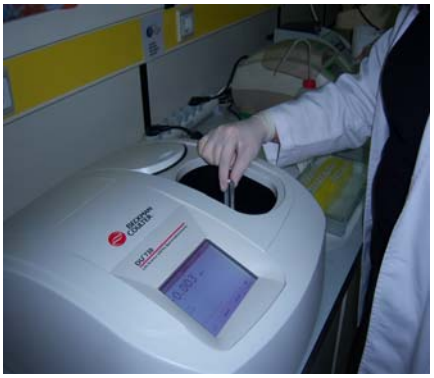
% 10 gramlık doku homojenatı 10 dak. 4000 rpm de santrifüj edilir. Süpernatant alınır ve 1/10, 1/20 veya 1/50 oranında serum fizyolojik ile seyreltilerek çalışılır. Süpernatant seyreltildikten sonra edildikten sonra 5-10 dakika içinde mutlaka çalışılmalıdır. Numune ve kör olarak işaretlenmiş 2 ayrı deney tüpü alınır. Aşağıdaki gibi çalışılır.

	Numune	Kör
Fosfat tamponu	_	0.2 ml
Dilue süpernatant	0.4 ml	0.4 ml
H_2O_2 çözeltisi + fosfat tamponu	0.2 ml	_

1 dk. sonra 240 nm'de absorbansları okunarak kaydedilir.

Hesaplama :

Süpernatantta katalaz aktivitesi bu deney için belirlenmiş ekstinksiyon katsayısı 0.004 (0.00394) mM^{-1}/ mm^{-1} kullanılarak ve yapılan seyreltmeler göz önüne alınarak Ü/mg protein dk cinsinden hesaplanır.





Şekil III.19 Spektrofotometrik Ölçümler

III.2.6. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler SPSS 17.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler sürekli ölçümlü değişkenler için ortalama ± standart hata (SH) ve medyan (minimum-maksimum) olarak verildi. Kategorik değişkenler gözlem sayısı ve (%) değer olarak gösterildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda normal dağılım gösteren değişken için Student's t testi, normal dağılım göstermeyen değişkenler için Mann-Whitney-U testi kullanıldı. Biyokimyasal parametrelerin gruplar arasındaki farklılıkları Varyans analizi ile tespit edildi. Bonferroni testi ile her bir paremetre için gruplar bire bir karşılaştırıldı . $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BÖLÜM IV

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

IV.1 SONUÇLAR

Çalışmamızda farklı subletal dozlarda ağır metaller (bakır, kadmiyum ve çinko) uygulanmış zebra balıklarının solungaç dokularında LPO (MDA), antioksidatif enzimler (GSH, CAT) ve total protein seviyeleri her bir ağır metal için ayrı tablolarda verilerek tek yönlü varyans analizi ile metalin biyokimyasal seviyede etkisi için incelendi.

Hiçbir ağır metal ile muamele edilmemiş Grup 1'deki GSH seviyeleri, 0.1 ppm Cu (Grup-2) ile muamele edilmiş balıkların solungaçlarında ölçülen GSH seviyelerinden istatistiksel anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p< 0.05$). 0.1 ppm Cu (Grup-2) ve 0.5 ppm Cu (Grup-3) uygulanmış balıkların GSH seviyeleri arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p >0.05$). 1 ppm (Grup-4) ve 5 ppm (Grup-5) gibi yüksek dozlarda uygulanan bakırın dokulardaki antioksidatif stres mekanizmalarının çalışmalarını engellediği, kontrol grubu ile benzer glutatyon düzeyleri ölçümlerimizden anlaşıldı. Solungaç dokusunda ölçülen MDA seviyeleri kontrol grubunda, farklı dozlarda uygulanan Cu gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksek bulundu. 0.1-5 ppm arasındaki Cu dozlarının balık solungaç dokusundaki MDA seviyeleri üzerine etkili olmadığı gözlemlendi. 0.5ppm'e kadar olan Cu dozlarının konrol grubuna benzer şekilde katalaz aktivitesine neden olduğu, ancak 1 ppm'den daha yüksek Cu' ın CAT aktivitesini ortadan kaldırdığı gözlemlendi.

Kontrol grubundaki (Grup-1) protein seviyeleri, 0.1 ppm Cu (Grup-2) ve 1 ppm Cu (Grup-4) ile muamele edilmiş balıkların solungaçlarında ölçülen protein seviyelerinden istatistiksel anlamlı olarak yüksek bulundu ($p< 0.05$) (Tablo IV.1).

Tablo IV.1 Kontrol Grupta ve Farklı Bakır Konsantrasyonları Uygulanmış Zebra Balıklarının Solungaç Dokularında Ölçülen Antioksidatif, Lipitperoksidasyon ve Total Protein Miktarları .

	GLUTATYON ***(GSH)*** (µg/ml) *Ort. ± SH; (Medyan)*	***MALONDİALDEHİT (MDA)*** (µg/ml) *Ort. ± SH; (Medyan)*	**KATALAZ (CAT)** (µg/ml) *Ort. ± SH; (Medyan)*	***PROTEİN*** (µg/ml) *Ort. ± SH; (Medyan)*
Grup-1 (Kontrol) n=10	0.0109 ± 0.0025 (0.0098)	0.7112 ± 0.049 (0.548)	6.1543±0.9810 (7.1086)	0.4375 ± 0.0084 (0.4294)
Grup-2 (0.1 ppm Cu) n=10	0.1050 ± 0.0722 (0.0337)	0.1182 ± 0.0438 (0.0696)	6.1338 ± 0.6573 (5.4078)	0.2999 ± 0.0368 (0.2851)
Grup-3 (0.5 ppm Cu) n=10	0.1337 ± 0.1023 (0.0310)	0.2166 ± 0.0384 (0.2282)	8.3627 ± 3.2675 (6.0225)	0.3915 ± 0.0381 (0.3857)
Grup-4 (1 ppm Cu) n=4	0.0280± 0.003 (0.026)	0.292± 0.03 (0.087)	0.1525±0.07 (0.134)	0.299 ±0.07 (0.297)
Grup-5 (5 ppm Cu) n=1	0.035	0.117	0.198	0.311

Değerler ortalama ± standart hata (SH); (medyan) olarak ifade edildi. n: Örnek sayısı. Cu: Bakır.

Hiçbir ağır metal ile muamele edilmemiş Grup 1'deki GSH, CAT ve protein seviyeleri, 0.1 ppm Zn (Grup-6) ve 0.5 ppm Zn (Grup-7) ile muamele edilmiş balıkların solungaçlarında ölçülen seviyelerden istatistiksel anlamlı olarak farklı bulunmadı ($p > 0.05$). Ağır metale maruz kalmamış balıklarda (Grup-1) ölçülen MDA seviyeleri 0.1 ppm ve 0.5 ppm Zn'ya maruz kalan balıkların MDA düzeylerinden yüksek bulundu ($p<0.01$). 0.1 ppm Zn ile muamele edilmiş balıkların solungaç doku MDA düzeyleri 0.5 ppm Zn ile muamele edilen balıklara göre daha yüksek olarak tespit edildi ($p<0.05$). 1 ppm'den daha yüksek Zn' ın CAT aktivitesini ortadan kaldırdığı gözlemlendi. (Tablo IV.2).

Tablo IV.2 Kontrol Grupta ve Farklı Çinko Konsantrasyonları Uygulanmış Zebra Balıklarının Solungaç Dokularında Ölçülen Antioksidatif, Lipit peroksidasyon ve Total Protein Miktarları

	GLUTATYON (GSH) (µg/ml) *Ort. ± SH; (Medyan)*	**MALONDİALDEHİT (MDA)** (µg/ml) *Ort. ± SH; (Medyan)*	**KATALAZ (CAT)** (µg/ml) *Ort. ± SH; (Medyan)*	**PROTEİN** (µg/ml) *Ort. ± SH; (Medyan)*
Grup-1 (Kontrol) n=10	0.0109±0.0025 (0.0098)	0.7112 ± 0.049 (0.548)	6.1543±0.9810 (7,1086)	0.4375 ± 0.0084 (0.4294)
Grup-6 (0.1 ppm Zn) n=10	0.0113±0.0121 (0.0085)	0.5342±0.172 (0.626)	7.9442±1.0526 (7.9488)	0.4243± 0.0327 (0.4286)
Grup-7 (0.5 ppm Zn) n=10	0.0711 ± 0.0453 (0.0326)	0.1711 ± 0.0667 (0.1558)	5.8586 ± 1.5727 (4.7520)	0.4447 ± 0.0314 (0.4452)
Grup-8 (1 ppm Zn) n=4	0.0182± 0.004 (0.017)	0.5455±0.004 (0.566)	0.1800±0.02 (0.09)	0.3165±0.004 (0.296)
Grup-9 (5 ppm Zn) n=1	0.038	0.1516	0.075	0.333

Değerler ortalama ± standart hata (SH); (medyan) olarak ifade edildi. n: Örnek sayısı. Zn: Çinko.

Hiçbir ağır metal ile muamele edilmemiş Grup 1'deki GSH ve CAT seviyeleri 0.1 ppm Cd uygulanmış grup 10 ile farklılık göstermezken, 0.5 ppm Cd uygulanmış grup 11'deki GSH düzeylerine kıyasla daha düşük ($p< 0.05$); CAT düzeyleri ise daha yüksek olarak belirlendi ($p< 0.05$). 0.1 ppm (Grup-10) ve 0.5 ppm Cd (Grup-11) uygulanmış gruplardaki balıklara ait solungaç dokularından ölçülen MDA seviyelerinin kontrol gruba göre istatistiksel anlamlı olarak daha düşük olduğu belirlendi . 0.5 ppm Cd uygulanmış olan balıklardaki MDA seviyelerinin 0.1 ppm Cd uygulanmış balıklardaki MDA düzeylerinden daha fazla olduğu görüldü ($p< 0.05$). Doku total-protein seviyelerinin ise hiç Cd uygulanmamış kontrol grupta, 0.1 ppm Cd uygulanmış gruba göre daha yüksek; 0.1 ppm Cd uygulanmış grupta ise 0.5 ppm Cd'lu gruba kıyasla daha düşük olduğu gözlendi ($p<0.05$). 1 ppm'den daha yüksek Cd' un CAT aktivitesini ortadan kaldırdığı gözlemlendi (Tablo IV.3).

Tablo IV.3 Kontrol Grupta ve Farklı Kadmiyum Konsantrasyonları Uygulanmış Zebra Balıklarının Solungaç Dokularında Ölçülen Antioksidatif, Lipitperoksidasyon ve Total Protein Miktarları

	GLUTATYON (GSH) (µg/ml) *Ort. ± SH; (Medyan)*	**MALONDİALDEHİT (MDA)** (µg/ml) *Ort. ± SH; (Medyan)*	**KATALAZ (CAT)** (µg/ml) *Ort. ± SH; (Medyan)*	**PROTEİN** (µg/ml) *Ort. ± SH; (Medyan)*
Grup-1 (Kontrol) n=10	0.0109 ± 0.0025 (0.0098)	0.7112 ± 0.049 (0.548)	6.1543±0.9810 (7,1086)	0.4375 ± 0.0084 (0.4294)
Grup-10 (0.1 ppm Cd) n=10	0.0143 ± 0.0056 (0.0087)	0.0392 ± 0.0084 (0.0405)	6.2397 ± 1.0498 (6.2479)	0.2724 ± 0.0352 (0.2960)
Grup-11 (0.5 ppm Cd) n=10	0.1930 ± 0.1159 (0.0239)	0.1813 ± 0.0763 (0.0396)	5.9303 ±0.209 (3.7203)	0.4148 ± 0.0535 (0.3389)
Grup-12 (1 ppm Cd) n=4	0.0285±0.02 (0.029)	0.068±0.04 (0.05)	0.2075±0.01 (0.310)	0.323±0.1 (0.29)
Grup-13 (5 ppm Cd) n=1	0.064	0.116	0.316	0.297

Değerler ortalama ± standart hata (SH); (medyan) olarak ifade edildi. n: Örnek sayısı. Cd : Kadmiyum.

Deney gruplarımızdaki 0.5 ppm Cd uygulanan (Grup-11) grup içerisinde sadece bir balığın prx6 rs41055489 genotipi heterozigot olarak respit edilmiş olup, diğer gruplarda yer alan tüm balıklar yabanıl tipte genotipe sahip olduğu bulunmuştur(Tablo IV.4).

Heterozigot genotipte olduğu saptanan balığın GSH düzeyi 0.08804 µg/ml Olup aynı düzeyde Cd uygulanmış gruptaki balıklara kıyasla daha düşük; MDA düzeyi 0.36417 µg/ml)olup, aynı düzeyde Cd uygulanmış gruptaki balıklara kıyasla daha yüksek; CAT düzeyi ölçülebilir sınırların altında olduğundan belirlenememiş; total protein düzeyleri ise 0.58492 µg/ml) olup aynı düzeyde Cd uygulanmış balıklara kıyasla daha yüksek olarak saptanmıştır (Tablo IV.4).

Tablo IV.4 Çalışma Gruplarına Ait Prx6 Geni rs41055489 Genotip Sıklıkları

Prx6 geni rs41055489 genotip sıklıkları		
	Homozigot Yabanıl tip(A/A) n(%)	**Heterozigot tip (A/C) n(%)**
Grup 1 (Kontrol)	7 (100)	0 (0)
Grup2 (0.1 ppm Cu)	10 (100)	0 (0)
Grup 3(0.5 ppm Cu)	9 (100)	0 (0)
Grup 4 (1 ppm Cu)	1 (100)	0 (0)
Grup 5 (5 ppm Cu)	1 (100)	0 (0)
Grup 6(0.1 ppm Zn)	9 (100)	0 (0)
Grup 7(0.5 ppm Zn)	12 (100)	0 (0)
Grup 8 (1 ppm Zn)	1 (100)	0 (0)
Grup 9 (5 ppm Zn)	1 (100)	0 (0)
Grup10(0.1ppm Cd)	10 (100)	0 (0)
Grup11(0.5ppm Cd)	6 (85)	1 (15)
Grup 12 (1 ppm Cd)	1 (100)	0 (0)
Grup 13 (5 ppm Cd)	1 (100)	0 (0)

Sonuçlar sayı (%) değer olarak ifade edilmiştir. n: Örnek sayısı.

IV.2 TARTIŞMA

Genetik toksikoloji, canlıların kalıtım materyali olan DNA üzerinde meydana gelen toksik etkileri inceleyen bilim dalıdır. DNA'da kodlanan genetik bilgiler, kopyalandıktan sonra aslına uygun olacak şekilde sonraki nesillere aktarılırlar. Bu sırada, gerek normal biyolojik süreçler sonucu gerekse doğrudan ya da dolaylı olarak fiziksel, kimyasal ve biyolojik etmenlerle DNA'nın etkileşimi sonucu genetik yapıda çeşitli bozulmalar meydana gelebilir. Bu nedenle, kalıtım materyali olan DNA üzerinde hasarlara yol açan etmenleri tanımlamak için "genotoksik" terimi kullanılmaktadır. Çevresel araştırma ve risk değerlendirme süreçlerinde genetik etkilerin incelenmesine olanak sağlayan ucuz ve hızlı sonuç veren çeşitli testlerin kullanılması gereklidir. Sucul ekosistemlerle ilişkili genotoksik etkilerin çalışılmasında kullanılan çeşitli omurgasız ve omurgalı test organizmaları bulunmakla birlikte, son on yılda model organizma olarak balıkların kullanılması oldukça yaygınlaşmıştır.

Glutatyon (GSH), oksijen radikali yakalayıcısı olarak antioksidant savunmada önemlidir. GSH düzeyindeki değişim, canlının detoksifikasyon yeteneğinin önemli bir indikatörüdür. GSH sistemi balıklarda oksidatif hasara karşı farklı yollardan kofaktör gibi davranarak çalışır. Hücrelerde glutatyonun anti-oksidatif fonksiyonu konsantrasyon, reaksiyon hızı ve sentez hızına bağlı olarak meydana gelir. Metal-GSH konjugasyon işlemi metallerin safra ile atılmasını sağladığından istenen bir durum olmasına karşın GSH'ı tüketmesine bağlı olarak antioksidant savunma kapasitesini azaltmaktadır[169]. Hücresel GSH miktarı hücresel işlevlerin korunmasında önemlidir ve detoksifikasyon ve oksidatif stres durumunda azalabilmektedir. Ancak devam eden stres durumunda GSH/GSSG oranı adaptif mekanizmaların etkisi ile oksidatif strese karşı koyabilmek üzere artmaktadır [170]. Stres şartları altında ve bazı hastalıklarda, Cu iyonları GSH ile etkileşime girerek redoks aktif bakır formunda dokulardan salınır. Glutatyon L-askorbik asitin suda çözülebilir antioksidanlar olarak çeşitli reaktif oksijen türlerini (Hidrojen peroksit ile etkileşen Cu, hidroksil radikali oluşturarak hücrede lipit, protein ve nükleik asitleri

hasarlayan reaktif oksijen türleri gibi davranırlar) ortadan kaldırdığı gösterilmiştir [79]. Kadmiyum sucul ortamlarda yer alan en zararlı ağır metal kirleticidir. Literatürde Cd toksitesinin reaktif oksijen türleri ile birlikte gelişen oksidatif hasar ile ilişkisi çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [68,69]. Balıklarda Cd' un glutatyon metabolizmansına etkilerini inceleyen sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Balıklarda Cd birikimin hedef organı böbrek ve karaciğer olduğundan çalışmalar bu yönde yoğunlaşmıştır [70]. Cu ve Cd doğrudan yada dolaylı olarak hücresel demir düzeylerinin yükselmesine neden olarak antioksidan aktiviteyi engellerler, hücresel glutatyon kullanımına neden olur yada glutatyon ilişki enzimleri inhibe eder [71,72]. Pek çok enzimatik ve non-enzimatik detoksifikasyon reaksiyonlarının substratı olan glutatyon, kirleticilere maruz kalan balıklarda etkin bir biyobelirteç olarak ele alınmaktadır. GSH yapısında bulunan yüksek oranda reaktif sülfidril gruplarına metalleri bağlayarak metal biyoeliminasyonuna doğrudan katılır [73,74]. Çalışmamızda balıklara uygulanan 0.1 ve 0.5 ppm 'lik Cu dozlarının hiç ağır metal uygulanmamış balıklara kıyasla daha yüksek seviyelerde olması, balık solungaçlarında bulunan GSH varlığına bağlı olarak Cu tutulumunu göstermektedir. Cu uygulanan gruptaki balıkların tümü prx6 geni rs41055489 varyasyonu için yabanıl tipte genotipe sahip olarak tesbit edildiğinden herhangi bir gen-protein etkileşiminden bahsetmek mümkün değildir. Metal iyonlarını bağlamış formdaki GSH detoksifikasyon yolakları ile ortadan kaldırılır. Çalışmamızda balıkların solungaç dokuları üzerine 0.5 pmm düzeyine kadar Cu etkisinde kontrole oranla GSH değerlerinin yükseldiği, ancak 1 ppm ve üzerinde benzeri bir etki görülmeyip, kontrol grubu ile benzer sonuçlar elde etmemiz, artan Cu miktarının GSH tarafından tutulması ve muhtemelen böbreklere taşınmasından dolayı solungaçta ölçülen düşük GSH değerlerini açıklayabilir. Çalışmamızda tüm çalışma grupları arasında sadece 0.5 ppm Cd (Grup-11) uygulanmış grupta yükselmiş GSH cevabı bulunmaktadır. Prx6 rs41055489 gen polimorfizmi tüm çalışma gruplarında bulunan balıklardan sadece Grup-11 içinde 1 adet heterozigot formda zebrabalığında bulunmuştur. Gen polimorfizmini heterozigot olarak taşıyan bu balıkta ölçülen GSH düzeyi (0.08804 µg/ml), 0.5 ppm Cd uygulanan ve homozigot yabanıl tipte gen polimorfizmine sahip diğer balıklara (0.1930 µg/ml) göre daha düşük bulunmuştur. GSH düzeyinde belirlen bu azalma prx6 genindeki inaktif durumda olan bir allenin inhibitör etkisinden kaynaklanıyor olabileceği düşüncesindeyiz.

MDA, lipit peroksidasyonu sonucu oluşan ürünlerden biridir ve oksidatif hasarı göstermede yaygın olarak kullanılan bir parametredir. MDA miktarının yüksek bulunması lipit peroksidasyonuna işaret etmektedir. Lipit peroksidasyonu meydana gelmemesi veya düşük düzeylerde olması oksidatif enzimlerin koruyucu etkilerinin göstergesidir. Oksidatif stresin pek çok biyolojik hedefleri arasında yer alan lipitler okside olarak birçok ikincil ürün oluştururlar. Bu ikincil ürünler arasında yer alan MDA çoklu doymamış peroksidasyon ürünü olarak oluşur. MDA, DNA ve proteinler ile etkileşime girebildiğinden potansiyel bir mutajendir. MDA' nın nükleik asit ve proteinler ile etkileşimi, hücrenin fonksiyonel kapasitesini belirleyen mekanizmaların geri dönüşümsüz olarak bozulmasına neden olur [80]. MDA'nın, DNA iplikleri arasında çapraz bağlar oluşturarak biyolojik etkiler gösterdiği rapor edilmiştir [81]. MDA' nın ayrıca DNA ve proteinler arasında da çapraz bağlar oluşturma yeteneğinin olduğu saptanmıştır [82]. MDA'nın bahsedilen genetoksik aktivitelerinin hücrelerde yol açtığı sonuçlar henüz tam bilinmemekle birlikte mutasyonlara sebep olduğu düşünülmektedir. Cu'nun DNA hasarlayıcı etkisi MDA ile etkileşim sonucu meydana gelir. Hücreye giren bakırın %95'i ilk 20 dakika içinde indirgenerek ya da okside olarak bahsi geçen etkileri yapmak üzere aktifleştirilir. Oluşturulan DNA kırıklarının artan katalaz aktivitesi ile tamamen ortadan kaldırılmaya çalışıldığı hücre kültürleri deneyi ile gösterilmiştir. Tamir edilemeyen DNA kırıklarının bulunduğu hücreler programlı olarak ölüme yönlendirilirken DNA transkripsiyon aktivitesi tamamen durdurulur [85]. Cu lipit peroksidasyonunu hızlandıran bir metaldir. LPO' nunu başlatıcı ajan olarak görev yapan Cu, aynı zamanda sonraki reaksiyon basamaklarında katalizor olarak rol alır. LPO'nun primer ürünleri olarak meydana gelen lipit hidroperoksitler Cu ve Fe gibi metaller ile reaksiyona girerek alkoksil ya da peroksil radikallerini oluştururlar. Böylece indirgenmiş metallerin, okside metallere kıyasla LPO'nun uyarım miktarları daha fazladır [83]. Cu tarafından okside olan alifatik aldehitler DNA'da tek ya da çift iplik kırıklarına neden olarak hücreye zarar verirler [84]. Deltametrin ve kadmiyumun, *Channa punctata*'da oksitatif strese etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada lipid peroksidasyonunun önemli ölçüde arttığı, solungaç dokuda en fazla sadece deltametrin verilen gruplarda (%53 kontrole oranla) saptanmıştır [171]. Seyhan Baraj Gölü'nde kirli ve temiz olmak üzere iki ayrı istasyondan toplanan sazangiller ailesine ait tatlı su balıklarında karaciğer dokusunda malondialdehit düzeyleri karşılaştırılmış

kirli alandan toplanan örneklerde önemli düzeyde arttığı bildirilmiştir [172]. Yapılan bir tez çalışmasında, *Xiphophorus hellerii*'nin solungaç dokusu üzerine farklı dozlarda tek-tek ve beraber uygulanan deltametrin ve kadmiyumun oksidatif strese neden olduğu lipit peroksidasyonunun belirteci olan malondialdehit düzeyindeki artışla gösterilmiştir. İndirgenmiş glutatyon miktarının oksidatif strese karşı koyabilmek üzere arttığı ve oksidatif stresle oluşan oksijen radikallerinin katalaz enzim aktivitesini inhibe ettiği belirtilmiştir[173]. Çeşitli ağır metallerin oluşturdukları oksidatif hasarlar sonucu oluşan doku spesik GSH seviyeleri ve antioksidan enzim aktivitelerindeki değişiklikler halen tartışma konusudur. Çalışmamızda prx6 rs41055489 polimorfizmi için homozigot yabanıl tipteki balıklarda tüm metallerin (Cu, Zn, Cd) artan dozları ile beraber MDA seviyelerinde saptanan azalmanın, metallerin solungaç dokusunda meydana getirdiği zararları ortadan kaldırmak üzere LPO aktivitesini ortadan kaldırdığı şeklinde yorumlanabilir. Oysaki, prx6 rs41055489 polimorfizmi için heterozigot balıkda saptanan belirgin düzeydeki MDA seviye artışı (0.36417 μg/ml), mutant allelden dolayı beklenen düşüşün gerçekleşmemesini açıklamaktadır.

Balıkların karaciğer ve böbrek dokuları, metaller tarafından oluşan oksidatif stresden korunmak amacıyla CAT ve SOD gibi antioksidan savunma sistemlerince zengindir [75]. Katalaz (CAT), H_2O_2'i substrat olarak kullanarak oksijen ve suya parçalayan ve böylece H_2O_2 detoksifikasyonunu sağlayan peroksidazlardandır. Katalazın ksenobiyotik etkisinde farklı yanıtlar verdiği saptanmıştır. Aşırı O_2^- üretiminin CAT aktivitesini inhibe edebilme özelliği ile CAT aktivitesini azaltabileceği belirtilmiştir [94]. CAT, tüm biyolojik membranlardan geçip, bazı enzimleri inaktivite eder. Metalik ya da organik kirleticilere maruz kalan balıklarda doza bağlı olarak katalaz aktivite yanıtlarının indüklenme ya da inhibe olma yönünde farklılık gösterdiği bilinmektedir [76,77]. Bu nedenle balıklarda zararlı etkiler oluşmadan hemen önce belirlenen CAT aktivitesinin oksidatif stres için hassas bir biyobelirteç olduğu kabul edilmektedir [78,77]. Metallerin (Cu, Cd, Fe ve Ni) *Channa punctata'nın solungaçlarının* biyokimyasal ve morfolojik özelliklerine etkilerinin incelendiği çalışmada CAT, GST ve SOD gibi antioksidant enzim aktivitelerinde zamana bağlı azalmalar gözlenmiştir (Pandey ve ark., 2008). Bizde çalışmamızda prx6 rs41055489 heterozigot gen varyasyonunun, 0.5ppm Cd uygulanan balıkta, CAT aktivitesini biyokimyasal olarak ölçülebilecek sınırın altına

düşürücü etkisini tespit ettik. Ancak devam eden stres durumunda GSH/GSSG oranı adaptif mekanizmaların etkisi ile oksidatif strese karşı koyabilmek üzere artmaktadır [174]. Kadmiyum ve çinkonun *Oreochromis niloticus*'da eritrosit antioksidan sistemlerine etkisinin araştırıldığı çalışmada 5 mg/l Zn, 1 mg/l Cd ve ikisinin kombinasyonu olmak üzere üç grup oluşturulmuş ve GSH ve CAT aktiviteleri araştırılmış her iki antioksidan sistemin tüm gruplarda arttığı bildirilmiştir [175]. Çalışmamızda 1 ppm'den daha yüksek bakırın CAT aktivitesini inhibe ettiği gözlendi. Katalazın, çeşitli kirleticiler etkisinde farklı yanıtlar verdiği saptanmıştır. Aşırı $O_2^{\cdot}$ üretiminin CAT aktivitesini inhibe edebilme özelliği ile CAT aktivitesini azaltabileceği belirtilmiştir [176]. Bu çalışmada katalaz aktivitesinin kontrole oranla tüm gruplarda azaldığı belirlenmiştir. Hindistan'da Yamuna Nehri'nde ağır metal kirlilik yükü fazla olan Panipat ve Agra bölgelerinden yakalanan *Wallago attu*'da karaciğer, solungaç ve böbrek dokularında CAT, GSH ve lipit peroksidasyon düzeyleri incelenmiş, Panipat bölgesinden yakalanan balıklarda GSH ve lipid peroksidasyonunun daha yüksek olduğu ve CAT aktivitesinin karaciğer ve böbrekte önemli derecede azaldığı solungaçtaki azalmanın önemli olmadığı belirtilmiştir [176]. Benzer sonuçlara pestisitlerle yapılan çalışmalarda da rastlanmaktadır. *Cyprinus carpio* ve *Ictalarus nebulosus*'da organofosforlu dichlorvos etkisinde 24. saatte beyin, böbrek, kalp, karaciğer, solungaç ve kas dokularından en yüksek CAT aktivitesi karaciğer de, en düşük ise beyinde olduğu bildirilmiştir [177].

Oreochromis mossambicus'da kadmiyumun subletal dozlarının 15. güne kadar katalaz enzim aktivitesini artırdığı, 30. günde ise düşürdüğü belirlenmiştir [178]. *Sparus aurata* (Çipura)'da kadmiyumun katalaz enzim aktivitesini uygulamanın altıncı gününe kadar önemli düşüşlere sebep olduğu bildirilmiştir [179]. Yapılan bir çalışmada, subletal (1 ve 5 ppm) kadmiyum uygulanan gökkuşağı alabalığı dokularındaki bazı antioksidan enzim aktivitelerindeki değişim incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda üç grup halindeki balıklara yedi günlük deneme periyodu boyunca 1 ve 5 ppm Cd uygulanmıştır. Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz enzim aktiviteleri denemenin 3. gününe kadar her iki dokuda da önemli derecede ($p<0,05$) artarken 5. günden itibaren aktivitelerde azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlardan, subletal dozlardaki kadmiyumun, gökkuşağı alabalıklarında oksidatif strese sebep olduğu ve çalışmada yer alan antioksidan enzimlerin bu stresin önlenmesinde rol aldıkları düşünülmüştür [180].

Reaktif bileşiklerin proteinin oksidatif degradasyonuna neden olduğu bilinmektedir .Protein tüketiminin değişen metabolik sistemlere adaptasyon için artan enerji gereksinimini karşılamak amacıyla geliştirilen fizyolojik bir strateji olduğu belirtilmiş ve dimethoate etkisinde *Clarias. batrachus'*da kasta çözünebilir proteinlerin işlevsel açıdan etkilenmiş olduğu saptanmıştır [181]. Phosphamidon etkisinde *Puntius conchonius*'da iskelet kası proteinlerinin karbohidrat metabolizmasındaki bozulma nedeniyle glukoneogenez yoluyla enerji sağlamak için kullanıldığı bildirilmiştir [182]. Çalışmamızda Cu ve Zn metallerinin 0.1-5 ppm arasındaki tüm dozlarının hiç metal uygulanmamış balıklardan farklı protein miktarına sahip olmadıkları görülürken, 0.1 ppm Cd uygulanan balıklarda (Grup-10) akut olarak antioksidatif adaptasyon mekanizmaların aktivasyonu sonucunda protein kullanımının artmasına bağlı olarak tespit edilen total-protein seviyelerinin düşük bulunması literatür bilgisiyle uyumludur. Bu nedenle, azalan protein düzeylerinin çevresel strese karşı koymak için gereksinim duyulan enerjinin proteinlerden sağlanması nedeni ile olabileceği düşünülmektedir. 0.5 ppm Cd uygulanan (Grup-11) balıklarda ölçülen total-protein düzeylerinin, 0.1 ppm Cd (Grup-10) uygulanan balıklara oranla daha yüksek bulunması, artan Cd dozuna adapte olabilmek için devreye giren hücre hasarı ile ilişkili metabolik süreçlerdeki artan protein ihtiyacını göstermektedir.

KAYNAKLAR

[1] Chae, HZ.: "Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: Alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes", *Proc Natl Acad Sci USA* 91 **(1994)** 7017–7021

[2] Wood, Z.A.; Schroder, E.; Robin Harris, J.; Poole, L.B.: "Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins", *Trends Biochem. Sci.* 28 **(2003)**32–40.

[4] Vural N.: *Toksikoloji*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No:73 Ankara, **(1996)**.

[5] Özan S.T.: "Beyşehir Gölünde Yaşayan Sazan (*Cyprinus carpio,* L., 1758)'ndaki Parazitlerin ve Ağır Metal Birikiminin Araştırılması", *Doktora Tezi*, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D., Isparta, **(2005)**.

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

[7] Özan S.T.: "Beyşehir Gölünde Yaşayan Sazan (*Cyprinus carpio,* L., 1758)'ndaki Parazitlerin ve Ağır Metal Birikiminin Araştırılması", *Doktora Tezi*, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D., Isparta, **(2005)**.

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

[9] Muşlu M.N.: "İstanbul Boğazı'ndaki Sarıkuyruk İstavrit Balığı (*Trachurus mediterraneus*) 'nın Kas ve Solungaçlarındaki Kurşun Düzeyleri", *Yüksek Lisans*

Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D., İstanbul, **(2008)**.

[10] Aydoğmuş, Ç.: "Ergin Olmayan Gökkuşağı Alabalığı (*Onchorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) 'nin Kas Dokusu ve Derideki Yağ Asidi Bileşenleri Üzerine Öldürücü Olmayan Dozdaki Krom ve Kadmiyum Klorür Tuzlarının Etkileri" , *Yüksek Lisans Tezi* , Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye **(2003)** 1-13.

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

[12] USEPA, "Update of Ambient Water Quality Criteria for Cadmium",. United States Environmental Protection Agency (USEPA).Washington, DC, USA **(2001)** EPA-822-R-01–001

[13] Garcia-Santos, S.; Fontainhas-Fernandes, A.; Wilson, J.M.: "Cadmium Tolerance in the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Following Acute Exposure Assessment of Some Ionoregulatory Parameters" , *Environment Toxicology*, 21 **(2006)** 33-46.

[14] De La Torre, F.R.; Salıblan, A.; Ferrarı, L.:. " Biomarkers Assessment in Juvenile *Cyprinus carpio* Exposed to Waterborne Cadmium*", Enviromental Pollution*, 109 **(2000)** 277-282.

[15] Silvestre, F.; Trauscg, G.; Devos, P.; "Hyper-osmoregulatory Capacity of the Chinese Mitten Crab (*Eriocheir sinensis*) Exposed to Cadmium; Acclimation during Chronic Exposure", *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 140 **(2005)** 29–37.

[16] Torreblanca, A.; Ramo, J.D.; Arnau, J.A.; Dıaz-Mayans, J.: "Cadmium, Mercury, and Lead Effects on Gill Tissue of Freshwater Crayfish *Procambarus clarkii* (Girard)", *Biological Trace Element Research*, 21 **(1989)** 343-

[17] Bay, S.; Greenstein, D.; Szalay, P.; Brown, D.; " Exposure of Scorpionfish (*Scorpaena guttata*) to Cadmium: Biochemical Effects of Chronic Exposure" *Aquatic Toxicology,* 16 **(1990)** 311.

[18] Dameron, C.T.; Harrıson, M.D.: "Mechanisms for protection against copper toxicity", *Am. J. Clin. Nutr.* 67 (5) **(1998)** 1091–97

[19] George, S.G.:. "Cell Biochemistry and Transmembrane Transport of Some Metals (E. MERIAN editör)", *Metals and Their Compounds in the Environment,* New York, s. **(1991)** 511-521.

[20] Cousıns, R.J; Leinart, A.S.: "Tissuespecific regulation of zinc metabolism and metallothionein genes by interleukin",1. *FASEB J.* 2, **(1988)** 2884-2890.

[21] Kamunde, C.; Clayton, C.; Wood, C.M.: "Waterborne vs. Dietary Copper Uptake in Rainbow Trout and the Effects of Previous Waterborne Copper Exposure", *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology***,** 283 **(2002)** 69-78.

[22] Gagnon, A.; Jumarıe, C.; Hontela, A.: "Effects of Cu on Plasma Cortisol and Cortisol Secretion by Adrenocortical Cells of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)", *Aquatic Toxicology*, 78 **(2006)** 59–65.

[23] Mcgeer, J.C.; Szebedınszky, C.; Mcdonald, D.G.; Wood, C.M.: "Effects of Chronic Sublethal Exposure to Waterborne Cu, Cd or Zn in Rainbow Trout", *1: Iono-regulatory Disturbance and Metabolic Costs. Aquatic Toxicology*, 50 **(2000)** 231–243.

[24] Handry, R.D.; Eddy, F.B.; Baines, H.: "Sodium-Dependent Copper Uptake Across Epithelia: A Review of Rationale with Experimental Evidence from Gill and Intestine ", *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1566
(2002) 104-115.

[25] Stagg, R.M.; Shuttleworth, T.J.: "The Effects of Copper on Ionic regulation by the Gills of the Seawater-Adapted Flounder (*Platichthys flesus* L.)", *Journal of Comparative Physio*logy, 149 **(1982)** 83-90.

[26] Lı, J.; Quabıus, E.S.; Wenswlaar Bonga, S.E.; Flik, G.; Lock,R.A.C.: "Effects of Water-borne Copper on Branchial Chloride Cells and Na+-K+-ATPase Activities in Mozambique Tilapia (*Oreochromis mossambicus*)", *Aquatic Toxicology*, 43 **(1998)**1–11.

[27] Atlı, G.; Canlı, M.: "Enzymatic Responses to Metal Exposures in a Freshwater Fish *Oreochromis niloticus", Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 145 **(2007)** 282–287.

[28] Kurasakı, M.; Okabe, M.; Saito, S.; Suzuki-Kurasaki, M:"Copper metabolism in the kidney of rats administered copper and copper-metallothionein", *Am. J. Physiol.* 274 **(1998)** (43) 783–790.

[29] Jıang, J.; St Croıx, C.M.; Sussman, N.; Zhao, Q.; Pıtt, B.R.; Kagan, V.E.: "Contribution of glutathione and metallothioneins to protection against copper toxicity and redox cycling: quantitative analysis using MT+/+ and MT-/- mouse lung fibroblast cells", *Chem Res Toxicol.* 15(8) **(2002**) 1080-7.

[30] Akahorı, A.; Gabryelak, T.; Jowıak, Z.; Gondko, R.: "Zinc-Induced Damage to Carp (*Cyprinus carpio* L.) Erythrocytes *In Vitro*. Biochemistry and Molecular Biology International", 47 (1) **(1999)** 89-98.

[31] Watson, T.A.; Beamısh, F.W.H.: "The Effects of Zinc on Branchial Adenosine Triphosphatase Enzymes *İn vitro* from Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*", *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 68 **(1981)** 167-173.

[32] Rogers, J.T.; Rıchards, J.G.; Wood, C.M.: "Ionoregulatory Disruption as the Acute Toxic Mechanism for Lead in the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)", *Aquatic Toxicology*, 64 **(2003)** 215-234.

[31] Spry, D.J.; Wood, C.M.: "A Kinetic Method for the Measurement of Zinc Influx *İn vivo* the Rainbow Trout, and the Effects of Waterborne Calcium on Flux Rates. Journal of Experimental Biology, 142 **(1989)** 425-446

[32] Hogstrand, C.; Ferguson, E.A.; Galvez, F; Shaw, R.; Webb, N.A.; Wood, C.M.: "Physiology of Acute Silver Toxicity in the Starry Flounder (*Platichthys Stellatus*) in Seawater", *Journal of Comparative Physiology B*, 169 **(1999)** 461-473.

[33] Abdollahi, M.; Bahreini-Moghadam A.; Emmami, B.; Fooladian,F.; Zafariet, K.: "Increasing Intracellular cAMP and cGMP Inhibits Cadmium-Induced Oxidative Stress in Rat Submandibular Salivary Comparative", *Biochemistry and Physiology* , 135 **(2003)** 331-336.

[34] Ören P.: "Malathion'un *Oreochromis niloticus'*ta Oksidatif Stres Kaynaklı Endokrin Bozucu Etkileri", *Yüksek Lisans Tezi*, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D., Adana, **(2009)**.

[35] Piner P.: "Lambda-Cyhalothrinin *Oreochromis niloticus'*ta Karaciğerde Piperonil Bütoksit Modülatörlüğünde Oksidatif Stres Potansiyelinin Belirlenmesi Stres Proteinleri ve Apoptozis Üzerine Etkileri", *Doktora Tezi,* Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D., Adana **(2009)**.

[36] Halliwell B.; Gutteridge JMC,: "Free Radicals in Biology and Medicine", 3rd ed. New York: Oxford. **(1999)**.

[37] Livingstone, D. R.: "Organic Xenobiotic Metabolism in Marine Invertabretes (R. Gilles Ed.)", *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, Germany, 7 **(1991)** 46-162.

[38] Kaya E.: "Klorprifos ve Deltamethrin'in Kan ve Beyin Lipit Peroksidasyon ve Antioksidan Enzim Aktivitelerine Etkileri", *Yüksek lisans Tezi,* Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya A.B.D., Isparta **(2005)**.

[39] Shackelford, R.E.; Kaufmann, W.K.; Paules, R.S.: "Oxidative Stress And Cell Cycle Checkpoint Function", *Free Radical Biology & Medicine* 28, (9) **(2000)** 1387–1404.

[40] Cüce E.: "Ratlarda Demir Yüklenmesi ile Oluşturulan Oksidatif Stresin Önlenmesinde Kafeik Asit Fenetil Ester'in Etkinliğinin Araştırılması", *Uzmanlık Tezi,* Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları A.B.D., Isparta, **(2007)**.

[41] Özden S.: "Bazı Pestisitlerin Oksidatif Stres Oluşturma Potansiyellerinin ve Antioksidan Sistemler Üzerine Etkilerinin Sıçanlarda Araştırılması", *Doktora Tezi*, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji A.B.D. İstanbul, **(2006)**.

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

[43] Marnett LJ.: "Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage", *Toxicol*. 181-182 **(2002)** 219-222.

[44] Epe B.; Ballmaier D.; AdamW.; Grimm GN.; Saha-Möller CR.: "Photolysis of N-hydroxypyridinethiones: a new source of hydroxyl radicals for the direct damage of cell-free and cellular DNA", *Nucleic Acids Res*. 24**(1996)** 1625–1631.

[45] Jornot L.; Petersen H.; Junod AF.: "Hydrogen peroxide-induced DNA damage is independent of nuclear calcium but dependent on redox-active ions", *Biochem*. J. 335 **(1998)** 85-94.

[**46]** Cooke MS.; Evans MD.; Dizdaroğlu M.; Lunec J.: "Oxidative DNA Damage: mechanisms, mutation, and disease", *The FASEB J.* 17**(2003)** 1195-1214.

[47] Marnett LJ.: "Oxyradicals and DNA Damage", *Carcinogenesis*, 21 **(2000)** 361-370.

[48]. Knaapen AM.; Güngör N.; Schins RPF.; Borm PJA.; Schooten FJV.: "Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis", *a review*. *Mutagenesis* ,21 **(2006)** 225–236.

[49]. Knaapen A M.; Schins RPF.; Polat D.; Becker A.; Borm PJA.: "Mechanisms of neutrophil-induced DNA damage in respiratory tract epithelial cells", *Mol. and Cellular Biochem*, 234/235 **(2002)** 143–151.

[50]. Akkuş T.: "Serbest radikaller ve fizyopatoljik etkileri", Konya, Mimoza Yayınları. **(1995)** 1-80.

[51]. Çakatay U.; Kayalı R.: "Protein oksidasyonunun klinik öemi", Cerrah Paşa Tıp Derg. 35**(2004)** 140-149.

[52]. Dalle-Donne İ.; Rossi R.; Giustarini D.; Milzani A.; Colombo R.; "Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stres", *Clin. Chem. Acta*. 329 **(2003)** 23–38.

[53]. Simpson JA.; Narita S.; Gıeseg S.; Gebicki S.; Gebicki JM.; Dean RT.: "Long-lived reactive species on free-radical-damaged proteins", *Biochem. J.* 282 **(1992)** 621-624.

[54] Akkuş, İ.: *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri,* Mimoza Yayınları, Konya, **(1995).**

[55] Odabaşoğlu F.: "Antioksidan vitaminler", Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde verilen konferans kitapçığı, Erzurum**, (8 Mart 1999)**.

[56] Bulucu D.: "Mide ülserlerinde melatonin antioksidan etkileri", Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Farmakoloji ABD, Uzmanlık Tezi, Erzurum, **(1998).**

[57] Yemişen E.: "Termal Deri Yanığında Silmarinin Karaciğer Üzerine Etkisinin İncelenmesi", *Yüksek Lisans Tezi,* Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya A.B.D.*,* İstanbul, **(2008)**.

[58] Kang, Y.J.: "Exogenous Glutathione Decreases Cellular Cadmium Uptake and Toxicity", *Drug Metabolism and Disposition*, 20**(1997)** 714-718.

[59] Arrick, B.A.; Nathan, C.F.; "Glutathione metabolizm as a determinant of therapeütic efficiency", *A review, Cancer Research*, vol **(1984)** 44,4224-4232.

[60] Shahet, S.B. and Beutler, E., 1986. Glutathione metabolizm of the erythrocyte.Williams Hematologie. The Erythrocyte, Part Four.

[61] Ceoper, A.J.L.; "Glutathione in the brain: disorders of glutathione metabolism. In: Rosenberg, R.N., Prusiner, S.B., Dimauro, S.,Barchi, R.L., Kunk, L.M. (Eds),The Molecular and Genetic Basis of Neürological Disease. Burtterworth-Heinemann, Boston, **(1997)** pp.1195-1230.

[62] Meister, A.; Anderson, M.E.: "Glutathione", *Annual Review of Biochemistry*, 52 **(1983)** 711-760.

[63] SIES, H.: "Glutathione and Its Role in Cellular Functions", *Free Radical Biology & Medicine*, 27(9-10) **(1999)** 916-921.

[64] Pullar, J.M.; Winterbourn, C.C.; Vıssers, M.C.; "Loss of GSH and Thiol Enzymes in Endothelial Cells Exposed to Sublethal Concentrations of Hypochlorous Acid", *American Journal of Physiology,* 277 (4Pt2) **(1999)** H1505-1512.

[65] Akkış, İ.: "Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri", 1. Baskı, *Mimoza Yayınları*, Konya, Türkiye **(1995).**

[66] Knapen, M. F.C.M.; Zusterzeel, P.L.M.; Peters, W.H.M; Steegers, E.A.P.: Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction", European *Journal of Obstetrics&Gynecology and Reproductive Biology"*, **(1999)**82, 171-184.

[67] Beütler E.: "Effect of flavin compound on Glutathione Reductase Activity", İn vivo and in vitro studies **(1969)**

[68] Bagchi, D.; Joshi, S.S.; Bagchi, M.; Balmoori, J.; Benner, E.J.; Kuszynski, C.A.; Stohs, S.J.: "Cadmium and chromium-induced oxidative stress, DNA damage, and apoptotic cell death in cultured human chronic myelogenous leukemic K562 cells, promyelocytic leukemic HL-60 cells, and normal human peripheral blood mononuclear cells" *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **(2000)** 14, 33–41.

[69] Shi, H.S.; Sui, Y.X.; Wang, X.R.; Luo, Y.; Ji, L.L.; "Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium and naphthalene in liver of Carassisu auratus" *Comp. Biochem. Physiol.* **(2005)** 140C, 115–121.

[70] Kim, S.G.; Jee, J.H.; Kang, J.C.; "Cadmium accumulation and elimination in tissues of juvenile olive flounder, Paralichthys olivaceus after sub-chronic cadmium exposure" *Environ. Pollut* **(2004)** 127, 117–123.

[71] Kang, Y.J.: "Alteration of antioxidant system", In: Masaro, E. (Ed.), *Handbook of Human Toxicology*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, **(1997)** 275–284.

[72] Lagadic, L.: "Biomarkers in invertebrates. Evaluating the effects of chemicals on populations and communities from biochemical and physiological changes of individuals", In: Peakall, D.B., Walker, C.H., Migula, P. (Eds.), Biomarkers: A Pragmatic Basis for Remediation of Severe Pollution in Eastern Europe. *Kluwer Academic Publisher,* London, United Kingdom, **(1999)** 153–175.

[73] V1iarengo, A.; Canesi, L.; Martinez, P.G.; Peters, L.D.; Livingstone, D.R.: "Pro-oxidant processes and antioxidant defence systems in the tissues of the antarctic scallop (Adamussium codbecki) compared with the Mediterranean scallgo (Pecten jacobaeus)", *Comparative Biochemistry and Physiology* B 111 **(1995)** 119–126.

[74] Diaz-Cruz, M.S.; Mendieta, J.; Tauler, R.; Esteban, M.: "Cadmium-binding properties of glutathione: a chemometrical analysis of voltammetric data", *Journal of Inorganic Biochemistry* (**1997)** 66, 29–36.

[75] Basha, P.S.; Rani, A.U.; (2003) "Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost Oreochromis mossambicus (Tilapia)", *Ecotoxicol. Environ*. 56, 218–221.

[76] Romeo, M.; Bennani, N.; Gnassia-Barelli, M.; Lafaurie, M.; Girard, J.P.; "Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass Dicentrarchus labrax" *Aquat. Toxicol*. **(2000)** 48, 185–194.

[77] Sanchez,W., Palluel, O., Meunier, L., Coquery, M., Porcher, J.M., Ait-Aissa, S., 2005. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. Environ. Toxicol. Pharmacol. 19, 177–183.

[78] Gül, Ş., Belge-Kurutaş, E., Yıldız, E., Şahan, A., Doran, F., 2004. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. Environ. Int. 30, 605–609.

[79] [1] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview, Methods Enzymol. 186 (1990) 1^85

[80] Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. Free Radic Biol Med 2000;28:1685e96.

[81] Niedernhofer LJ, Daniels JS, Rouzer CA, Greene RE, Marnett LJ. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation,is mutagenic in human cells. J Biol Chem 2003; 278:31426e33.

82] Voitkun V, Zhitkovich A. Analysis of DNA-protein crosslinking activity of malondialdehyde in vitro. Mutat Res 1999;424:97e106.

[83] Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1989. Free Radicals in Biology and Medicine, 2nd ed. Oxford University Press, London.

[84] Becker, T.W., Krieger, G., Witte, I., 1996. DNA single and double strand breaks induced by aliphatic and aromatic aldehydes in combination with copper(II). Free Radic. Res. 24 (5), 325–332.

[85] M.-L. Vo¨ hringer.; T.W. Becker.; G. Krieger.; H. Jacobi, I. Witte .: "Synergistic DNA damaging effects of malondialdehyde: Cu(II) in PM2 DNA and in human fibroblasts" *Carl-6on-Ossietzky Uni6ersita¨t Oldenburg*, *ICBM and FB*7, *Postfach* 2503, *D*-26111 Oldenburg, Germany **(1997)**

[86] Hamilton-Buchanan, 1882

[87] Mills, D.: Akvaryum Bakımı. Çevirenler Eshar Kütevin, Ziya Kütevin, (1994) *İnkılap Kitapevi*, İstanbul , **(1986)** 975-10-0641-4.

[88] Lele, Z.;Krone, P.H.: "The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research" *Biotechnology Advences,* **(1996)** 14(1), 57-72.

[89] Stern, H.M.; Zon L.I.: "Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish", *Nature Review Cancer*, **(2003),** 3, 533-539

[90] Din,: "Basisvalidierung genormter Verfahren zur wasse-, Abwasser- und Schlammuntersuchung- Validierungsdokument (38415- T6), **(2002)** 27.

[91] Timur M.: *"Balık Fizyolojisi",* Nobel Yayın Dağıtım No:957 **(2006).**

[92]http://fishbase.org/Summary/SpeciesSummary.php?ID=3231&AT=xip (**23.09.2010**).

[93] Pandey S.; Parvez S.; Ansari R. A.; Ali M.; Kaur M.; Hayat F.; Ahmad F.; Raisuddin S.: "Effects of Exposure to Multiple Trace Metals on Biochemical, Histological and Ultrastructural Features of Gills of a Freshwater Fish, *Channa punctata* Bloch", *Chemico-Biological Interactions,* 174 **(2008)** 183-192.

[94] Suvetha L.; Ramesh M.; Saravanan M.: "Influence of Cypermethrin Toxicity on Ionic Regulation and Gill Na^+/K^+-ATPase Activity of a Freshwater Teleost Fish *Cyprinus carpio*", *Environmental Toxicology and Pharmacology* 29 **(2010)** 44-49.

[95] Doğan, G.; Erdem, M.: "Balıklarda Protein Mekanizması", *Journal of Fisheries Sciences* , 2(1) **(2008)** 30-40.

[96] Cengiz, E.İ.: "Çeşitli pestisitlerin subletal derişimlerinin sivrisinek balığının (*Gambusia affinis)* solongaç, karaciğer ve barsaklarındaki histopatolojisi ve yağ asitleri kompozisyonu üzerine etkileri", *Doktora Tezi* Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D. Diyarbakır **(2002)**.

[97] Evans D. H.: "Teleost Fish Osmoregulation: What have we learned since August Krogh, Homer Smith and Ancel Keys", *AJP-Regul. Intergr. Comp. Physiol.,* 295 **(2008)** R704-R705

[98] http://www.akvaryum.com/xiphophorus_helleri_(kilickuyruk)_tatlisur_5_306.a (**17.06.2010**).

[100] Ba-Omar T. A.; Al-Jardani S.; Victor R.: "Effects of Pesticide Temephos on The Gills of *Aphanius dispar*", *Tissue and Cell* 43 **(2011)** 29-38.

[101] Doğan, G.; Erdem, M.: "Balıklarda Protein Mekanizması", *Journal of Fisheries Sciences* , 2(1) **(2008)** 30-40.

[102] Niyogi S.; Kent R.; Wood C. M.: "Effects of Water Chemistry Variables on Gill Binding and Acute Toxicity of Cadmium in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): A Biotic Ligand Model (BLM) Approach", *Comparative Biochemistry and Physiology,* Part C 148 **(2008)** 305-314.

[103] Gonzalez, F. J.: "Polymorphisms in xenobiotic metabolism. In Molecular and Applied Aspects of Oxidative Drug Metabolizing Enzymes", *Life Sciences Pharmacogenetics*. 303 **(1999)** 91-110.

[104] Mannsmann U,; Herzig M.: "The use of SNP profiles as clinical markers", IMBI, University of Heidelberg.

[105] Deligezer,U.; Akışık, E.E.; Dalay,N.: "Gen Polimorfizm Analizinde LightCycler Floresan PCR Tekniğinin Kullanılması", *Türk Onkoloji Dergisi*, Cilt 19, **(2004)** 4

[106] Ekmekçi,A.; Konaç, E.; Önen, H. İ.: "Gen polimorfizmi ve kansere yatkınlık" *Marmara MedicalJournal* 21(3) **(2008)** 282-295

[107] http://commons.wikimedia.org/

[108] Emir, F.; Özden, A.: "Genetik polimorfizm ve polimorfizm çalısmaları." *Güncel Gastroenteroloji*. 10 (1) **(2006)** 24-28.

[109] Williams S. J.; Hayward N. K.: "The impact of the human genome project on medical genetics", *Trends in Molecular Medicine.* 7(5) **(2001)** 187-231.

[110] Ma,H.; Shieh,K.J.; Chen,G.; Qiao,XT.; Chuang M.Y.: "Application of Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)", *The Journal of American Science,* 2 **(2006)**.

[111] Kubista, M.; Andrade, J.M.; Bengtsson, M.; Forootan, A.; Jonák, J.; Lind, K.; et al.: "The real-time polymerase chain reaction", *Mol Aspects Med*., 27 **(2006)** 95-125.

[112] Ahmed, F.E.: "Detection of genetically modified organisms in foods", *Trends in Biotechnology* 5, **(2002)** 215-23.

[113] Günel, T.: "Gen Anlatımının Kantitatif Analizi 'Real-Time PCR'", *Turkiye Klinikleri J Med Sci*., 27 **(2007)** 763-767.

[114] Kelin, D.: "Quantification using real-tine PCR technology: applications and limitations", *Trends Mol Med.,* 8 **(2002)** 257-260.

[115] Wong, M.L.; Mediano, J.F.: "Real-Time PCR for mRNA Quantitation", *Biotechniques*, 39 **(2005)** 75-85.

[116] Günel, T.: "Gen Anlatımının Kantitatif Analizi 'Real-Time PCR'", *TurkiyeKlinikleri J Med Sci*., 27 **(2007)** 763-767.

[117] Wong, M.L.; Mediano, J.F.: "Real-Time PCR for mRNA Quantitation", *Biotechniques*, 39 **(2005)** 75-85.

[118] Valasek, M. A.; and Repa1, Joyce J.: "The power of real-time PCR", *Adv Physiol Educ*., 29 **(2005)** 151–159.

[119] Levin, R.E.: "The Application of Real-Time PCR to Food and Agricultural Systems", *Food Biotechnology*, 18 **(2004)** 97–133.

[120] Van der Velden, V.H.; Hochhaus, A.; Cazzaniga, G.; Szczepanski, T.; Gabert, J.; van Dongen, J.J.: "Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: Principles, approaches, and laboratory aspects", *Leukemia*, 17 **(2003)** 1013-1034.

[121] Hofmann, K.: "Fundamental problems in identifying the animal species of muscle meat using electrophoretic methods", *Fleishwirts*, 67 **(1987)** 820-826.

[122] Kubista, M.: "Emerging Real-Time PCR Applications", *Molecular Biology,* **(2008)** 57-66

[123] Cacherill, FR.; Uhl, J.R.: "Aplications and challenges of Real-Time PCR for the Clinical Microbiology Laboratory", *Rapid Cycle Real-Time PCR. Methods and Applications,* 1st Edition.; Reischl, U.; Wittwer, C.; Cockerill, FR.; eds., Heidelberg, Germany, **(2001)** 11.

[124] Wolf, C.; Lüthy, J.: "Quantitive compatitive (QC) PCR for quantification of porcine DNA", *Meat Sci*., 57 **(2001)**161-168.

[125] Gut, M.; Leutenegger, C.M.; Huder, J.B.; Pedersen, N.C.; Lutz, H.: "One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses", *J Virol Methods*., 77 **(1999)** 37-46.

[126] http://www.asuragen.com/Services/services/gene_expression/ab_taqman.aspx

[127] Bustin, S.A.: "Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays", *J Mol Endocrinol*., 25 **(2000)** 69-193.

[128] Tyagi, S.; Kramer, FR.: "Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization", *Nat Biotechnol*., 14 **(1996)** 303-308.

[129] Kubista, M.; Stalberg, A.; Bar, T.: "Light-up probe based real-time Q-PCR", *Genomics and Proteomics Technologies,* In: Raghavachari, R.; Tan, W.; eds.. 1st ed. Proceedings of SPIE; **(2001)** 53-58.

[130] jcp.bmj.com/content/61/7/863.full.html

[131] Loveless B.M.; Yermakova A.; Christensen D.R.; Kondig J.P.; Heine III H.S.; Wasieloski L.P.; Kulesh D.A.: "Identification of ciprofloxacin resistance by SimpleProbe™, High Resolution Melt and Pyrosequencing™ nucleic acid analysis in biothreat agents: Bacillus anthracis, Yersinia pestis and Francisella tularensis", *Molecular and Cellular Probes*, 24 **(2010)** 154-160.

[132] Chaplin, B.E.; Rasmussen, R.P.; Bernard, P.S.; Wittwer, C.T.: "LightCyclerTM hybridization probes the most direct way to monitor PCR amplification and mutation detection", *Biochemica*, 1 **(1999)** 5-8.

[133] Wittwer, C.T.; Herrmann, M.G.; Moss, A.A.; Rasmussen, R.P.: "Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification", *Biotechniques*, 22 **(1997)** 130-131, 134-138.

[134] Kenyon C.: "The plasticity of aging: Insights from long-lived mutants", *Cel***(2005)** 120:449–460.

[135] Samuelson AV.; Carr CE.; Ruvkun G.: "Gene activities that mediate increased life span of *C. elegans* insulin-like signaling mutants", *Gene Dev* **(2007)** 21:2976–2994.

[136] Chae HZ.: "Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: Alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes", *Proc Natl Acad Sci USA* 91 **(1994)** 7017–7021.

[137] Wood, Z.A.; Schroder, E.; Robin Harris, J.; Poole, L.B.: "Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins", *Trends Biochem. Sci*. **(2003)**28, 32–40.

[138] Choi, HJ.; Kang, SW.; Yang, CH.; Rhee, SG.; Ryu, SE.: "Crystal structure of a novelhuman peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution", *Nat Struct Biol* 5 **(1998)** 400–6.

[139] Wong, CM.; Siu, KL.; Jin, DY.: "Peroxiredoxin-null yeast cells are hypersensitive to oxidative stress and are genomically unstable" *J Biol Chem* 279 **(2004)** 23207–13

[140] Radyuk, SN.; Klichko, VI.; Spinola, B.; Sohal, RS.; Orr WC.: "The peroxiredoxin gene family in Drosophila melanogaster" *Free Radic Biol Med* 31 **(2001)** 1090–100.

[141] Wood, ZA.; Schro¨der E.; Haris, JR.; Poole, LB.: "Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins" *Trends Biochem Sci,* 28 (**2003)** 32–40.

[142] Chae, HZ.; Robison, K.; Pooleo, LB.; Church, G.; Storz, G.; Rhee, SG.: "Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl

hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes" Proc Natl Acad Sci U S A 91 **(1994)** 7017–21.

[143] David, E.; Tanguy, A.; Moraga, D.: "Peroxiredoxin 6 gene: a new physiological and genetic indicator of multiple environmental stress response in Pacific oyster *Crassostrea gigas". Aquat Toxicol* 84 **(2007)**389–98.

[144] Wang, Q.; Chen, KP.; Yao, Q.; Zhao, Y.; Li, YJ.; Shen, HX.: "Identification and characterization of a novel 1-Cys peroxiredoxin from silkworm", *Bombyx mori. Comp Biochem Physiol* B 149 **(2008)** 176–82.

[145] Kang SW.; Baines IC.; Rhee SG.; "Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine*", J Biol Chem* 273 (1998) 6303–11

[146] Rhee, S.G.; Chae, H.Z.; Kim, K.: Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling", *Free Radic. Biol. Med*. 38, **(2005)** 1543–1552

[147] Wen ST.; Van Etten RA.: "The PAG gene product, a stress-induced protein with antioxidant properties, is an Abl SH3-binding protein and a physiological inhibitor ofc-Abl tyrosine kinase activity", *Gene Dev* 11 **(1997)** 2456–2467.

[148] Veal EA .: "A 2-Cys peroxiredoxin regulates peroxide-induced oxidation and activation of a stress-activated MAP kinase", *Mol Cell* 15**(2004)** 129–139.

[149] Kim,YJ.; "Prx1 suppresses radiation-induced c-Jun NH2-terminal kinase signaling in lung cancer cells through interaction with the glutathione S-transferase Pi/c-Jun NH2-terminal kinase complex", *Cancer Res* 66 **(2006)** 7136–7142.

[150] Jang, HH.: "Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to amolecular chaperone function", *Cell* 117 **(2004)** 625–635.

[151] Moon, JC.: "Oxidative stress-dependent structural and functional switching of a human 2-Cys peroxiredoxin isotype II that enhances HeLa cell resistance toH2O2-induced cell death", *J Biol Chem* 280 **(2005)** 28775–28784.

[152] Huang, ME.: "A genomewide screen in *Saccharomyces cerevisiae* for genes that suppress the accumulation of mutations" *Proc Natl Acad Sci USA* 100 **(2003)** 11529–11534.

[153] Lee, TH.: "Peroxiredoxin II is essential for sustaining life span of erythrocytes in mice", *Blood* 101 **(2003)** 5033–5038.

[154] Neumann, CA.: **"**Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression", *Nature* 424 **(2003)** 561–565

[155] Park H.; Ahn IY.; Kim H.; Cheon J.; Kim M.: "Analysis of ESTs and expression of two peroxiredoxins in the thermally stressed Antarctic bivalve *Laternula elliptica*", *Fish Shellfish Immunol* 25*(***2008)** 550-9.

[156] Zhang, Q.; LiF.; Zhang, J.; Wang, B.; Gao, H.; Huang, B.: "Molecular cloning, expression of a peroxiredoxin gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and the antioxidant activityofitsrecombinantprotein" ,*Mol Immunol* 44 **(2007)** 3501e9.

[157] Nikapitiya, C.; De Zoysa, M.; Whang, I.; Kim, C G.; Lee, Y H.; Kim, S J.; "Molecular cloning, characterization and expression analysis of peroxiredoxin 6 from disk abalone *Haliotis discus discus* and the antioxidant activity of it srecombinant protein", *Fish Shellfish Immunol* 27 **(2009)** 239-49.

[158] David E.; Tanguy A.; Moraga D.: "Peroxiredoxin 6 gene: a new physiological and genetic indicator of multiple environmental stres responsein *Pacific oyster Crassostrea gigas*", *Aquat Toxicol* 84 **(2007)** 389-98.

[159] Loumaye, E.; Andersen, A C,; Clippe, A.; Degand, H.; Dubuisson M.; ZalF.; "Cloning andcharacterizationof Arenicola marina peroxiredoxin 6,anannelid two-

cysteine peroxiredoxin highly homologous to mammalian one-cysteine peroxiredoxins", *Free Radic Biol Med* 45 **(2008)** 482-93.

[160] Wolf, C.; Lüthy, J.: "Quantitive compatitive (QC) PCR for quantification of porcine DNA", *Meat Sci*., 57 **(2001)**161-168.

[161] Heptinstall, J.; Rapley, R.: "Spectrophotometric analysis of nucleic acids", *TheNucleic Acid Protocols Handbook*, **(2002)** 57–60.

[162] Koban, E.: "Tübitak Türkhaygen-1 Projesi Tür ve Irkların DNA işaretleri ile Moleküler Tanımlanması Çalısma Paketi", **(2007)**.

[163] Ayaz, Y.: "Isı İşlem Görmüş Et ve Et Ürünlerinde Tür Ayırımı", *Etlik Vet. Mikrob. Derg*., 9 **(2004)** 183-185.

[164] www.roche-applied-science.com

[165] Bradford, M.M.: "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantitites of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding", *Analytical Biochemistry,* 72 **(1976)** 248-254.

[166] Ledwozyw A.; Michalak D.; Stepien A.; Kadziolka A.: "The Relationship Between Plasma Triglycerides, Cholesterol, Total Lipids and Lipid Peroxidation Products During Human Atherosclerosis", *Clin Chim Acta*, 155(3) **(1986)** 275-283.

[167] Beutler E.: "*Glutathione in Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*", 2nd ed., Grune and Stratton, NY, **(1975)** 112-114.

[168] Aebi H.: "*Catalase Invitro. In: Methods of Enzymatic Analysis*", Ed: Bergmeyer HU, 2nd ed, FL, **(1974)** 121-126.

[169] Fırat Ö.; Çogun H. Y.; Aslanyavrusu S.; Kargın F.: "Antioxidant Responses and Metal Accumulation in Tissues of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* under Zn, Cd and Zn+Cd Exposures", *J. Appl. Toxicol.* 29 **(2009)** 295-301.

[170] Zhang, J. F.; Liu, H.; Sun, Y.Y.; Wang, X.R.; Wu, J.C.; Xue, Y.Q.: " Responses of the Antioxidant Defenses of the Goldfish *Carassius auratus*, Exposed to 2,4-dichlorophenol", *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19 **(2005)** 185-190.

[171] Atıf, F.; Parvez, S.; Ali, M.; Kaur, M.; Rehman, H.; Khan, H.A.; Raisuddin, S.,: "Modulatory Effect of Cadmium Exposure on Deltamethrin-induced Oxidative Stress in Channa punctata Bloch", *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 49 **(2005)** 371-377.

[172] Kamunde C.; MacPhail R.: "Metal-Metal İnteractions of Dietary Cadmium, Copper and Zinc in Rainbow Trout, *Oncorhyncus mykiss*", *Ecotoxicology and Environmental Safety,***(2010)**, doi:10.1016/j. ecoenv.2010.10.016.

[173] Güllü Kaymak.: "Farklı Dozlarda Deltametrin ve Kadmiyum uygulanan Kılıçkuyruğu (*Xiphophorus hellerii*) balıklarında oluşan oksidatif stres tayini" *yüksek lisans tezi*, , Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D., İstanbul, **(2011)**

[174] Zhang, J. F.; Liu, H.; Sun, Y.Y.; Wang, X.R.; Wu, J.C.; Xue, Y.Q.: " Responses of the Antioxidant Defenses of the Goldfish *Carassius auratus*, Exposed to 2,4-dichlorophenol", *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19 **(2005)** 185-190.

[175] Pandey S.; Parvez S.; Sayeed I.; Haque R.; Bin-Hafeez; Raisuddin S.: "Biomarkers of Oxidative Stress: A Comparative Study of River Yamuna Fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.)", *The Science of The Total Environment,* 309 **(2003)** 105-115.

[176] Oruç E.O.; Sevgiler Y.; Uner N.: "Tissue-Spesific Oxidative Stress Responses in Fish Exposed to 2,4-D and Azinphosmethyl", *Comparative Biochemistry and Physiology,* 137 **(2004)** 43-51.

[177] Hai, D.Q.; Varga, Sz.I.; Matkovics, B.: "Organophosphate Effects on Antioxidant System of Carp (*Cyprinus carpio*) and Catfish (*Ictalurus nebulosus*)", *Comparative Biochemistry and Physiology,* 117C **(1997)** 83-88.

[178] Vaglio A.; Landriscina C.: "Changes in Liver Enzyme Activity in The Teleost *Sparus aurata* in Response to Cadmium Intoxication", *Ecotoxicol. Environ. Saf.,* 43 **(1998)** 111-116.

[179] Goel A.; Dani V.; Dhawan D. K.: "Protective effects of zinc on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and hepatic histoarchitecture in chlorpyrifos-induced toxicity", *Chem. Biol. İnteract.,* 156 **(2005)** 131-140.

[180] Alak, G.; Hisar, O.: *"*Kadminyumun Gökkuşağı Alabalığı *(Oncorhynus mykiss)* Karaciğer ve Böbrek Dokularındaki Bazı Antioksidan EnzimAktiviteleri Üzerine Etkisi" *Yüksek Lisans Tezi,* Atatürk Üniversitesi,Su Ürünleri Bölümü, 25240

[181] Begüm, G.; Vijayaraghavan, S.: "Alterations in Protein Metabolism of Muscle Tissue in tge Fish *Clarias batrachus* (Linn) by Commercial Grade Dimethoate" *Toxicol*., 57 **(1996)** 223-228

[182] Gill, T.S.; Tewari, H.; Pande, j.: "Sublethal effects of an organophosphorus insecticide on certain metabolite levels in a freshwater fish, *Puntius conchonius* Hamilton", *Pest. Biochem. Physiol*., 36 **(1990)** 290-299

ÖZGEÇMİŞ

06 Şubat 1985 yılında Elbistan'da doğdum. 1991 yılında A.E.L İlköğretim Okulu'nda başladığı ilköğretimimi 1996 yılında Erenköy Zihni Paşa İlköğretim Okulu'nda tamamladım. Lise öğretimime Çapa Anadolu Öğretmen Lisesinde devam ederek 2003 yılında mezun oldum. 2003 yılında Marmara Üniversitesi Atatürk Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümüne başladım ve 2008 yılında Biyoloji Öğretmeni olarak mezun oldum. 2008 Ekim ayında Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Programında Yüksek Lisans eğitimime başladım. Eğitim hayatı süresinde İstanbul Atatürk Fen Lisesi'nde stajyer öğretmenlik yaptım ve halen özel bir eğitim kurumunda öğretmenlik yapmaktayım.

Bilgilendirme :

FEN-C-YLP_211009-0324 proje numaralı “Zebra balığında *(Danio rerio)* perokoksiredoksin 6 geni rs41055489 polimorfizminin antioksidatif göstergeler ve ağır metal düzeyleri ile ilişkisi ” başlıklı tez Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Destekleme Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

“Zebra balığında *(Danio rerio)* perokoksiredoksin 6 geni rs41055489 polimorfizminin antioksidatif göstergeler ve ağır metal düzeyleri ile ilişkisi ” isimli projemiz “Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (MÜHDEK) Başkanlığı” tarafından incelenerek onaylanmıştır.