

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus mykiss*) BEYİN
DOKUSUNDA CİVA KLORÜR TOKSİSİTESİNİN OLUŞTURDUĞU
OKSİDATİF STRES VE DNA HASARININ BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

MEHMET REŞİT TAYSI

ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Bünyamin SÖĞÜT

BİNGÖL-2019

ÖNSÖZ

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmada her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen saygıdeğer hocalarım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Muammer KIRICI, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Can Ali AĞCA, Sayın Prof. Dr. Viktor NEDZVETSKYI'e minnetlerimi sunarım.

Doktora eğitimim boyunca bana yol gösteren her türlü desteğini gördüğüm, saygıdeğer danışmanım, sayın hocam Prof. Dr. Bünyamin SÖĞÜT'e sonsuz teşekkür ve minnetlerimi sunarım.

Çalışmamın her aşamasında maddi ve manevi desteğini esirgemeyen değerli eşime minnettarlığımı bildiririm.

Mehmet Reşit TAYSI

Bingöl 2019

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Gökkuşuğu Alabalığı (Oncorhynchus mykiss).....	1
1.2. Civa	4
1.3. Oksidatif Stres	5
1.4. PARP-1 ((Poli (ADP-riboz) Polimeraz-1).....	7
1.5. Heme Oxygenase-1 (HO-1).....	9
1.6. 4-Hidroksinonenal (4-HNE).....	10
1.7. Sitokrom c (Cyt c).....	10
1.8. 8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin (8-OHdG).....	11
1.9. Malondialdehit (MDA).....	11
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	21
3.1. Materyal	21
3.1.1. Araştırma Yeri	21
3.1.2. Su Materyali	21
3.1.3. Deneme Ünitesi	21
3.1.4. Balık Materyali	22
3.1.5. Uygulanan Ağır Metal	23

3.1.6. Deneme Kurgusu	24
3.2. Yöntem.....	24
3.2.1. Western Blotlama Çalışması için Doku Homojenizasyonu	24
3.2.2. Western Blotlama Tekniği ile Proteinlerin Analizi	25
3.2.2.1. SDS-PAGE İçin Jellerin Hazırlanması ve Yüklenmesi.....	26
3.2.2.2. SDS-PAGE ile Proteinlerin Ayrılması.....	27
3.2.2.3. Proteinlerin Jelden Membrana Aktarılması.....	28
3.2.2.4. Antibody İnkübasyonu.....	28
3.2.2.5. Görüntüleme ve Veri Analizi.....	29
3.2.2.6. Stripping.....	30
3.2.3. 8-OHdG Ölçümü Yapılacak Örneklerin Hazırlanması.....	30
3.2.3.1. 8-OHdG Düzeyinin Ölçümü.....	30
3.2.4. MDA Ölçümleri.....	31
3.2.5. İstatistiksel Analizler.....	31
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	32
4.1. PARP, Cyt-c, 4HNE, HO1 Proteinlerinin Ekspresyon Düzeyleri.....	32
4.2. ROS Ölçüm Sonuçları.....	37
4.3. MDA Ölçüm Sonuçları.....	38
4.4. 8-OHdG Ölçüm Sonuçları.....	39
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	46
KAYNAKLAR.....	47
ÖZGEÇMİŞ.....	60

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Hg	: Civa
HgCl ₂	: Civa Klorür
PARP-1	: Poli (ADP-riboz) Polimeraz-1
HO-1	: Heme Oxygenase-1
4-HNE	: 4-Hidroksinonenal
Cyt c	: Sitokrom c
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
MDA	: Malondialdehit
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
GST	: Glutasyon S- transferaz
GSH	: İndirgenmiş glutasyon
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
kDa	: Kilodalton
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
8-OHdG	: 8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin
PMSF	: Fenil metil sülfonil florid
PBS	: Fosfat tamponu
TBS	: Trisle tamponlanmış tuz solüsyonu
TBS-T	: Tween-20 içeren ve trisle tamponlanmış tuz solüsyonu

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	PARP-1 proteininin genel yapısı.....	8
Şekil 3.1.	Araştırmada kullanılan fiberglas tanklar.....	22
Şekil 3.2.	Araştırmada kullanılan balıkların temin edildiği yer.....	23
Şekil 3.3.	Araştırmanın yürütüldüğü deneme akvaryumları.....	24
Şekil 3.4.	Otopsi işlemi.....	25
Şekil 3.5.	SDS-PAGE.....	26
Şekil 4.1.	HgCl ₂ uygulanan balıklarda beyin dokusunda Parp (soluble) ekspresyon düzeyleri.....	32
Şekil 4.2.	HgCl ₂ uygulanan balıklarda beyin dokusunda Parp (insoluble) ekspresyon düzeyleri.....	33
Şekil 4.3.	HgCl ₂ uygulanan balıklarda beyin dokusunda Cty-c (soluble) ekspresyon düzeyleri.....	34
Şekil 4.4.	HgCl ₂ uygulanan balıklarda beyin dokusunda Cty-c (insoluble) ekspresyon düzeyleri.....	35
Şekil 4.5.	HgCl ₂ uygulanan balıklarda beyin dokusunda 4HNE ekspresyon düzeyleri.....	36
Şekil 4.6.	HgCl ₂ uygulanan balıklarda beyin dokusunda HO1 ekspresyon düzeyleri.....	37
Şekil 4.7.	HgCl ₂ uygulanan balıklarda beyin dokusunda ROS düzeyleri.....	38
Şekil 4.8.	HgCl ₂ uygulanan balıklarda beyin dokusunda MDA düzeyleri.....	39
Şekil 4.9.	8-OHdG standart eğrisi.....	40
Şekil 4.10.	HgCl ₂ uygulanan balıklarda beyin dokusunda 8-OHdG düzeyleri.....	40

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.1.	Gökkuşağı alabalığı (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)'nın sistematikteki yeri.....	2
Tablo 3.1.	Poliakrilamid jelde protein ayırımının etkin aralığı.....	26
Tablo 3.2.	SDS jel elektroforezi için kullanılan ayırma jelinin hazırlanması (ml)....	27
Tablo 3.3.	SDS jel elektroforezi için kullanılan yükleme jelinin hazırlanması.....	27
Tablo 3.4.	Western blot analizinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar.....	29
Tablo 4.1.	Çalışma gruplarından elde edilen beyin dokusu ROS düzeyleri.....	37
Tablo 4.2.	Çalışma gruplarından elde edilen beyin dokusu MDA düzeyleri.....	38
Tablo 4.3.	Çalışma gruplarından elde edilen beyin dokusu 8-OHdG düzeyleri.....	39

GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus mykiss*) BEYİN DOKUSUNDA CİVA KLORÜR TOKSİSİTESİNİN OLUŞTURDUĞU OKSİDATİF STRES VE DNA HASARININ BELİRLENMESİ

ÖZET

Bu çalışmada son yıllarda sucul ortamlarda önemli bir problem oluşturan civa klorürün ($HgCl_2$) gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nda beyin dokusu üzerindeki toksikolojisi ve bunun neden olduğu oksidatif stres ile DNA hasarı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla her grupta 10 balık ($n=10$) olacak şekilde dört grupta toplam 40 adet balık 2 ve 7 gün süreyle $HgCl_2$ 'ün iki subletal dozu olan LC_{50} 'nin %25'ine ve %50'sine (137,75 ve 275,5 $\mu g/L$) maruz bırakıldı. DNA hasarının tespiti için western blotlama tekniği kullanılarak PARP-1 ((Poli (ADP-riboz) Polimeraz-1) ve Elisa kullanılarak 8-Hidroksideoksiguanozin (8-OHdG)'e bakıldı. Oksidatif stresin göstergeleri olarak da Heme Oxygenase-1 (HO-1), 4-Hidroksinonenal (4-HNE) ve Sitokrom c (Cyt c) proteinlerin ekspresyon düzeylerine western blotlama tekniği ile, MDA tayini spektrofotometre ile ve reaktif oksijen türleri (ROS)'nin tespiti ise Elisa yöntemi kullanılarak yapıldı. Sonuç olarak, $HgCl_2$ 'e maruz bırakılan balıklarda kontrol grubuna göre diğer gruplarda PARP-1, HO-1, 4-HNE, Cyt c ekspresyon düzeylerinde artış; ROS, MDA ve 8-OHdG seviyelerinde yükselme gözlemlendi. Sunulan çalışmanın sonuçları inorganik civanın alt dozlarının bile balıklar için son derece nörotoksik olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Gökkuşığı alabalığı, beyin, civa klorür, DNA hasarı, PARP-1.

DETERMINATION OF OXIDATIVE STRESS AND DNA DAMAGE CAUSED BY MERCURY CHLORIDE TOXICITY IN BRAIN TISSUE RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*)

ABSTRACT

In this study, the toxicology of mercury chloride (HgCl₂), which is an important problem in aquatic environments, on brain tissue in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and its effects on oxidative stress and DNA damage have been investigated in recent years. For this purpose, 40 fish in four groups with 10 fish (n = 10) in each group were divided into 25% and 50% (137.75 and 275.5 µg / L) of LC₅₀, two sublethal doses of HgCl₂ for 2 and 7 days. For the detection of DNA damage, PARP-1 ((Poli (ADP-riboz) Polimeraz-1) using western blotting technique and 8-OHdG (8-Hidroksideoksiguanozin) using Elisa were examined. As indicators of oxidative stress, HO-1, 4-HNE and Cyt c proteins were measured by western blotting, MDA determination by spectrophotometer and reactive oxygen species (ROS) were determined by Elisa method. As a result, the expression levels of PARP-1, HO-1, 4-HNE, Cyt c were increased in HgCl₂ exposed fish compared to the control group; ROS, MDA and 8-OHdG levels were increased. The results of the present study show that even lower doses of inorganic mercury are highly neurotoxic for fish.

Keywords: Rainbow trout, brain, mercury chloride, DNA damage, PARP-1.

1. GİRİŞ

1.1. Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)

Hayvansal protein kaynağı olarak, hem ucuz hem de kolay sağlanabilen besinlerin ilk sırasında su ürünleri gelmektedir. İnsan gıdası olarak, balık etinin her geçen gün önemi daha da iyi anlaşılmaktadır. Bu nedenle, tüketimi gittikçe artan alabalığın, daha sağlıklı ve uygun ortamlarda yetiştirilmesi gerek ekonomi ve gerekse gıda güvenliği açısından oldukça önemlidir.

Ülkemizdeki su ürünleri yetiştiricilik uygulamaları başta alabalık üretimi olmak üzere, birçok alanda ilerleme göstermiştir. Her ne kadar birkaç deniz türünün yetiştiriciliği yaygın olarak yapılıyorsa da alabalık yetiştiriciliği kapasite ve üretim miktarı olarak, su ürünleri yetiştiriciliğinde en büyük yeri tutmaktadır. Başlangıçta havuzlarda yapılan alabalık yetiştiriciliği; bugün göl, gölet, baraj gölleri ve denizlerde kurulan ağ kafeslerde de yapılmaktadır. Ekonomik pazarı iyi ve yetiştiriciliği kolay olan alabalık üretimi, ülkemizde yetiştiriciliğe uygun türlerin de bulunması nedeniyle tesis sayısı ve üretim miktarı bakımından ilk sırada gelmektedir (Geldiay ve Balık 1999).

Salmonid türleri içerisinde yaygın yetiştiriciliği yapılan en önemli tür Salmonidae familyasına ait olan gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'dır (Tablo 1.1). Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de gökkuşığı alabalığı, yetiştiriciliği en fazla yapılan balık türüdür (Geldiay ve Balık 1996; Uçar ve Atamanalp 2010). Gökkuşığı alabalığı, adaptasyon özelliğinin yüksek olması, kirleticilere karşı direnç göstermesi, biyoakümülyasyon ve biyotransformasyon özelliğine sahip olması, kolay temin edilebilmesi, laboratuvar koşullarında yaşayabilmesi ve analizleri yapılacak kadar gerekli doku veya organa sahip olabilmesinden dolayı çalışma materyali olarak seçilmiştir.

Tablo 1.1. Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nin sistematikteki yeri

Filum	Chordata (Kordalılar)
Alt Filum	Vertebrate (Omurgalılar)
Üst Sınıf	Osteichthyes (Kemikli Balıklar)
Sınıf	Actinopterygii (Işınsal Yüzgeçliler)
Takım	Salmoniformes (Alabalıkgiller)
Familya	Salmonidae (Alabalıkgiller)
Alt Familya	Salmonidae (Alabalıkgiller)
Cins	<i>Oncorhynchus</i> (Suckley, 1861– Pacific salmon)
Tür	<i>O. mykiss</i> (Walbaum, 1792) Kamchatkan rainbow trout

Amerika kökenli bir balık türü olan gökkuşığı alabalığında vücut, tıknaz ve az basık olup, sırt yüzgeci 10, anal yüzgeci ise 8-12 adet yumuşak ışına sahiptir. Pulları, yuvarlak şekilli ve küçüktür. Yanal çizgi tam, az öne doğru 135 ile 150 adet pulla kaplanmıştır. Kafanın üst kısmı ve arkası çelik mavisi, mavi yeşil, sarı-yeşil ve kahverengine çok yakındır. Vücut kenarları gümüşü, beyaz veya soluk sarı-yeşilden griye eğilimlidir. Karın kısmı gümüşe yakın beyazdır (Çelikkale 1988).

Ülkemizde, su ürünleri yetiştiriciliğine uygun pek çok su kaynağı bulunmaktadır. Ancak artan nüfus ile birlikte düzensiz yapılaşma, arazi kullanımındaki yanlışlıklar doğayı hızla tahrip etmekte ve çevre kirliliğine neden olmaktadır. Bu nedenle biyolojik zenginliklerimiz tehlike altına girmekte, bazı türlerin de nesli tükenme aşamasına gelmektedir. Çevre kirliliğinin önemli bir bölümünü su kirliliği oluşturmaktadır (Atay ve Pulatsü 2000).

Yeryüzünün büyük bir kısmı su kaynaklarından oluşmaktadır. Bu su kütesinin kendi kendini kolayca temizleyebileceği düşünülerek, neredeyse tüm dünyada sanayi atıkları, evsel atıklar ve diğer kirletici maddeler su kaynaklarına geliş güzel akıtılmaktadır. Gün

geçtikçe bu atıklar sucul ortamı olumsuz bir şekilde etkilemekte ve bazı kirleticilerin biyolojik olarak birikmesi sonucunda canlılar zarar görmektedir (Koç ve Yılmaz 2019).

Sanayi ve kanalizasyon atıklarının akarsu yataklarına bırakılması sonucunda bu kirleticiler su havzalarında birikmekte ve sucul canlılar için risk oluşturmaktadır. Dicle nehrinden toplanan *Capoeta trutta*'da ki yüksek bakır, nikel ve çinko birikim nedeni, nehrin zengin maden yataklarının bulunduğu bir bölgeden doğması ve Ergani Bakır fabrikasının flotasyon artıklarının Dicle nehrine boşaltmasıyla, nehrin ağır metal bakımından kirletilmesinden kaynaklandığı ifade edilmektedir (Ünlü vd 1995).

Ortamda uzun süre kalan ve organizmalar tarafından oradan alınıp biriktirilebilen metallere bazıları (Co, Cu, Fe, Zn, Hg, Mn vb.) düşük konsantrasyonlarda canlıların metabolizmaları için gerekli olmasına karşın yüksek konsantrasyonlarda bu canlılar için öldürücü etkiye sahip olabilirler. Toprakta bulunan bu kirleticiler sulama ve yağışlar yoluyla deniz, göl gibi durgun su ortamlarına ulaşmakta ve bu ortamlarda yaşayan canlılar üzerinde kısa ya da uzun süreler sonunda ortaya çıkabilen zararlı etkiler meydana getirmektedirler (Ünsal 1998).

En önemli besin kaynaklarımızdan birini oluşturan balıklar ve diğer deniz ürünleri teknolojik gelişmeye paralel olarak artan su kirliliğinden (deniz, akarsu, göl vb.) çok fazla etkilenmektedir. Herhangi bir arıtım işlemi uygulanmadan atılan endüstriyel atıklar ve aşırı nüfus artışı sonucu oluşan düzensiz kentleşme; hava, kara ve su kirliliğinin büyük boyutlara ulaşmasına neden olmaktadır. Akarsular ve diğer su kaynakları, atmosfer ve karasal ortamlardan daha fazla kirliliğin etkisinde kalmaktadır. Geçen zamanla birlikte giderek artan oranda karaların çeşitli kaynaklarından ve atmosferden kaynaklanan atıkların içerdiği ağır metaller, hidrokarbonlar, pestisitler, evsel atıklarla atılan organik maddeler ve benzeri kirleticiler akarsulara, akarsularla birlikte de göl ve denizlere ulaşmaktadır. Organik atıklar zamanla çürüyüp doğaya dönmekte, ancak çağdaş teknolojinin yoğun olarak ürettiği kalıcı toksik maddeler ve ağır metaller çevrede her gün biraz daha birikmektedir. Bu kimyasal maddeler suda eriyerek sudaki canlılar tarafından metabolik ve fizyolojik faaliyetleri sırasında alınarak çeşitli organ ve dokularında birikmektedir (Öztürk 1994; Öztürk vd 1995). Bu doğrultuda son yıllarda yapılan toksikoloji çalışmalarında ağır metallerin neden olduğu kirliliğe ilgi artmaktadır. Bu konu ile ilgili çalışmalarda pek çok ağır metallerin belirli konsantrasyonlarda organizmalara

zarar verici bir etki gösterdiği ve ekolojik tahribe neden olduğu bildirilmektedir (Koç ve Yılmaz 2019; Akobundu 2012; Aktar vd 2010). Özellikle endüstri atıklarının yoğun olduğu bölgelerdeki balıklarda ve diğer deniz ürünlerinde yapılan metal analizlerinin sonuçlarıyla metal birikim düzeylerinin oldukça yüksek olduğu ifade edilmektedir (Uysal ve Tuncer 1984; Güven ve Topcuoğlu 1991). Besin zincirinde yer alan bu sucul canlıların insanlar tarafından tüketilmesi sonucunda, akut zehirlenmelere neden olduğu bilinmektedir. (Karahana 1991).

Genellikle metaller balıkların vücuduna, çözünen iyon olarak solungaçlar aracılığı ile sudan, metallerin balık besininde birikmesi ile besinlerden, sulara serbest sürüklenen organik madde ve canlılardan, metal taşıyan ve balık ile ortak yaşayan diğer organizmalardan geçmektedir (Geldiay ve Kocataş 1988). Metallerin canlılardaki birikim düzeyleri; türlere, tür bireylerinin boylarına (Uysal vd 1986), doku ve organlara göre değişim gösterdiği gibi metalin cinsine göre de değiştiği ifade edilmektedir (Öztürk 1991; Lloyd 1992; Canlı vd 1998).

1.2. Civa

Çok eski çağlardan beri insanlık tarafından keşfedilen civa oda sıcaklığında sıvı halde bulunan bir metaldir. Periyodik cetvelin 2B grubunda bulunan bir geçiş elementi olan civa 14,06 g/cm³ yoğunluğu ile ağır metaller grubunun bir üyesidir. Civa gerek metalik olarak gerekse organik ve inorganik civa bileşikleri halinde endüstride bazı metallerin üretim aşamalarında, termometrelerde, ilaç sanayisinde, diş tedavileri için dolgu malzemesi olarak laboratuvarlarda, kâğıt ve boya sanayisinde kullanılmaktadır (Habashi 1997; Hammond 1971).

Civa en toksik ağır metallerden birisidir. Düşük konsantrasyonlarda bile sucul canlılar için son derece zararlı etkilere sahiptir. Civanın özellikle çevre kirliliği görülen denizlerdeki su canlılarında birikim gösterdiği ve farklı seviyelerde toksik etkilere neden olduğu yapılan birçok çalışmada kanıtlanmıştır (Sağlamtimur vd 2003; Kayhan 2007). Balıklarda kas dokusunun ağır metal bağlama konusunda fazla bir etkiye sahip olmadığı bilinmekle birlikte, insanlar tarafından tercih edilip tüketildiği ve sağlık riski oluşturduğu için kas dokusuna bağlı analizlerin de yapılması önem kazanmaktadır (Flos et al 1979). Civanın farklı ortam derişimlerinin etkisine maruz bırakılan Sazan balığının (*Cyprinus*

carpio) karaciğer ve böbrek dokularındaki civa birikimi çok kısa sürede en yüksek seviyelere ulaşmasına rağmen kas dokusunda meydana gelen birikim ancak 106 günlük bir etki süresinden sonra ortaya çıktığı belirtilmiştir. Belirtilen bu çalışmada, civa birikiminin kas dokusuna oranla diğer doku ve organlarda daha az olmasının kas dokusunun ağır metalleri bağlamada fazla aktif bir doku olmadığına ispatı niteliğindedir. Bu nedenle ağır metal birikimlerinin incelendiği çalışmalarda kas dokusunun kullanılması yanıltıcı sonuçlar doğurabilmektedir (De Conto et al 1999). Sucul ortamlarda ağır metaller birbirleri ile etkileşim halinde bulduklarından ağır metal karışımlarının su canlıları üzerine yaptığı etkilerin araştırıldığı çalışmaların sayısı da gün geçtikçe artmaktadır (Berg et al 1997; De Conto et al 1999; Sağlamtimur vd 2003; Guevara et al 2004; Argese et al 2005). Ağır metaller gibi strese neden olan etmenlerin etkisinde kalan çeşitli balık türlerinde plazma kortizol, glikoz ve laktat düzeylerinde artışların gözlemlendiği bazı araştırmalarda belirtilmiştir (Malhilakath et al 1997; Acerete et al 2004; Small 2004; Biswas et al 2005; Dönmez vd 2006).

Sucul organizmalarda ağır metal birikimlerinin neden olduğu hasarların araştırıldığı çalışmaların yapılması, bu metallere karşı yüksek duyarlılık gösteren türlerin belirlenmesine ek olarak organizmada oluşabilecek fizyolojik, biyokimyasal, işlevsel ve yapısal bozuklukların belirlenmesi açısından da önem arz etmektedir. Çevre kirliliğinin bir göstergesi niteliğinde canlılarda ölçülen metalik kirlleticiler özellikle sucul canlılarda yoğun olarak yüksek seviyelere ulaşabilir. Neticede besinlerle birlikte düşük düzeylerde bile olsa sürekli olarak tüketilen civa, kadmiyum ve kurşun gibi metal kalıntıları çevre ve insan sağlığını önemli ölçüde etkilemektedir.

1.3. Oksidatif Stres

Stres kavramı bir canlı için onun normal yaşamını tehlikeye sokan, kapasitesinin tümünü kullanmaya engel olarak değerlendirilen, canlı ve bulunduğu çevre arasındaki bir çeşit etkileşim olarak tanımlanabilir. Stresin meydana gelmesi için, canlının içinde bulunduğu ya da yaşamını devam ettirdiği ortam ve çevrede oluşan değişimlerin, canlıyı belli düzeyde etkilemesi şarttır. Birçok canlıda stres yanıtları, stres etkenlerine karşı koymak ve onunla başa çıkmaya çalışmak amacıyla doku ve organ fonksiyonlarında değişimlerle başlar ve hücre dışı gerçekleşen olaylar karşısında hücrenin kendi metabolizmasını

koruma eğilimi olan homeostasis sürecinden uzaklaşma ile sonlanır. Bahsedilen bu değişimler bireyler arasında farklılık gösterdiği halde benzer karakteristiğe sahip fizyolojik cevaplardır (Dönmez vd 2006; Schreck et al 2001). Normal koşullar altında, oksidatif stresin zarar verici etkileri, ilk hat savunmasını sağlayan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidan enzimlerle telafi edilir (Livingstone 2001). Membran lipidlerine hasar, lipid peroksidasyonu, ağır metal toksisitesinde rol oynayan moleküler mekanizmalardan biri olarak kabul edilir ve oksidatif stres için bir biyobelirteç olarak öngörücü önemi farklı araştırmalarda belirtilmiştir (Kavitha ve Rao 2008; Ballesteros et al 2009) Pek çok stres etkeni balıklarda “Genel Adaptasyon Sendromu” olarak adlandırılan stres yanıtına sebep olabilir. Ağır metaller su canlılarında hücresel ve moleküler düzeyde yapısal işlev bozukluklarına ve DNA kırılmaları frekanslarında artışa sebep olmaktadır (Kalay ve Karataş 1999; Levesque et al 2002; Giordano et al 1989).

Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif nitrojen türleri (RNS) gibi oksitleyici özelliğe sahip ajanların hücre içerisindeki artış göstermesi veya antioksidatif savunma mekanizmalarıyla oksidanlar arasındaki dengenin kaybolması şeklinde ifade edilir. İnsan yaşamı boyunca hem ekzojen hemde metabolik sürecin bir parçası olarak endojen radikal ve reaktif oksijen türlerine maruz kalabiliyor. Canlı vücudu bu serbest radikaller ve reaktif oksijen türlerinin etkilerini nötralize eden bir antioksidan sisteme sahiptir. Bu sistem oksidanlar ile denge halinde durur. Bu dengenin oksidanlar lehine eğilim göstermesi sonucu oksidatif stres başlar ve bu dengesizlik, önemli hücre bölümlerinde geri dönüşümsüz hasara sebep olabilir. Ağır metaller ve bunların toksik düzeyleri ROS’un ortaya çıkmasına neden olup fizyolojik ve biyokimyasal süreçleri etkileyebilmektedir. ROS, serbest radikallerin dış orbital yörüngesinde paylaşılmamış bir elektron ile bir oksijen atomu bulunması ile karakterizedir. Oksijenin indirgenmesi ya da oksijene iyonize radyasyonun etkimesi ile meydana gelirler. En önemli ROS türleri; Süperoksit radikali, hidrojen peroksit, hidroksil radikali, fehidroksil radikali, hipokloröz asit, alkil radikali, hidroperoksil radikali ve alkoksil radikalidir (Halliwell ve Gutteridge 1989).

Malondialdehit (MDA), tüm yüksek omurgalı canlılarda olduğu gibi balıklarda da lipid peroksidasyonun bir ürünüdür ve doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu neticesinde ortaya

çıkar ve bu sebeple hücre bileşenlerinde meydana gelen oksidatif stresin en önemli göstergelerinden biri olarak kabul edilmektedir (Morales et al 2004). Balıklarda da oksidatif stresi ve bu stresin meydana getirdiği hasarı engellemek için bütün aerobik organizmalardakine benzer şekilde vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bu mekanizmalar antioksidan savunma sistemleri olarak bilinir ve enzim karakterli süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon-S-transferaz (GST) ile enzimatik karakterde olmayan redükte glutatyon (GSH) ile A, E ve C vitaminlerinden oluşurlar (Dautremepuits et al 2003; Trenzado et al 2006).

1.4. PARP-1 (Poli (ADP-Riboz) Polimeraz - 1

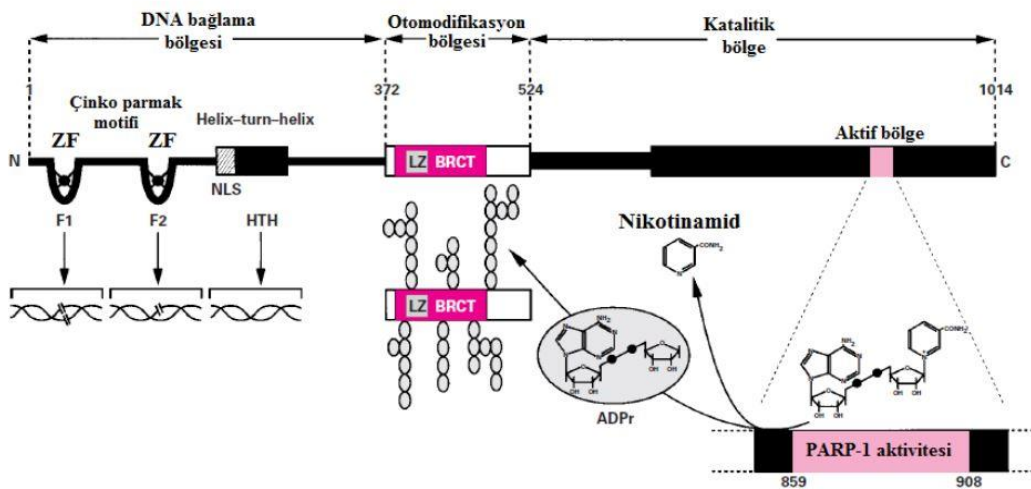
ADPRT (ADP-ribosyltransferase) geninin ürünü olan PARP-1 ((Poli (ADP-riboz) Polimeraz-1) enzimi, DNA'daki tek iplik kırıklarını tanıyarak bu bölgeye bağlanmakta ve PARP'lar tarafından katalizlenen ve DNA zincir kırıklarıyla aktif hale gelen hücrel bir cevap olan Poli ADP-ribozilasyon (PARlasyon) işlemini başlatmaktadır. Bu özelliği sayesinde, mensup olduğu protein ailesinin en iyi bilinen üyesidir. 1960'larda poli (ADP-riboz) sentezinin ilk tanımından bu yana PARP biyolojisi yoğun bir şekilde çalışılmıştır. PARP1, Nikotinamiddinükleotid (NAD⁺)'nın protein substratlarının mono veya poli (ADP-riboz) aksiyonu sırasında bağlandığı ve ayrıldığı, aktif bölgelerinde homoloji sergileyen bir enzim ailesinin kurucu üyesidir. PARP familyası üyeleri, sadece memeli hücrelerinde tanımlanmış olmasına rağmen altısı, poli (ADP-riboz)'ü sentezler ve sadece üçü (PARP1, PARP2 ve PARP3) DNA onarımında tanımlanmış rolleri oynar. PARP familyası, insan vücudunda 18 farklı üyeden meydana gelmektedir. PARP proteinleri, nikotinamid (NAD)'i bir substrat olarak kullanırlar (Alano et al 2004). PARP'lar ayrıca mono (ADP-ribozil) transferazların farklı gruplarını da içine alır. Mono (ADP ribozil) transferaz tek ADP-riboz ünitelerini transfer ederken PARP proteinleri çoklu ADP-riboz ünitelerini proteinlere transfer edebilme kabiliyetine sahiptir (Ahmad et al 2010; Hageman ve Stierum 2001; Malanga ve Althaus 2005). PARP-1, DNA onarımı başta olmakla birlikte, transkripsiyonel düzenlenme, replikasyon ve değişimin düzenlenmesi, genotoksik strese dirençlilik, genomik kararlılığın düzenlenmesi, BER (Baz Kesip-Çıkarma Onarımı) yolağının enerji ihtiyacının karşılanması, hücre eliminasyonu, telomeraz aktivitesinin yürütülmesi, nükleer proteozomal görevlerin düzene koyulması, sitoiskelet elemanlarının organizesi, protein yıkımı, yaşlanma gibi birçok sayıda

fizyolojik olaylarda rol alır (Ji ve Tulin 2010; Laudisi 2010, Dantzer et al 1999; Bouchard et al 2003; Koh et al 2005; Wang et al 2009; Aguilar-Quesada et al 2007). PARP-1 enziminin yapısı; Enzim-DNA bağlama bölgesi, Otomodifikasyon bölgesi, Katalitik bölge (aktif bölge) olmak üzere üç bölgeden oluşur (Şekil 1.1).

-DNA bağlama bölgesi: N terminal uçta bulunur. İki tane çinko parmak modeli ve bu modellere bitişik bir nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) barındırmaktadır. Çinko parmak modellerinin vazifesi, PARP-1'in DNA üzerindeki hasarlı bölgeyi bulmasını temin etmektir (Burkle 2001). Birinci çinko parmak modeli tek ve çift iplik DNA kırıklarına bağlanırken ikinci çinko parmak modeli ise sadece tek iplik DNA kırıklarını tanımaktadır (Chol Ha et al 2002).

-Otomodifikasyon bölgesi: Merkezi otomodifikasyon bölgesi Poli ADP-ribozilasyon (PARlasyon) işlemi yürüten kısımdır. PARP-1'in DNA ile bağlanmasını düzene koyar. Ek olarak, DNA hasar tamiri ve hücre siklusu kontrol noktası proteinlerinin çoğunluğunda C-terminal modelini de sağlamaktadır (Burkle 2001).

-Katalitik bölge (aktif bölge): C-terminal bölgede konumlanan katalitik bölge NAD'ın bağlandığı, 55kDa'lık 526-1014 rezidüleri arasındaki kısımdan oluşur (Dantzer et al 1999). Katalitik bölge, C-terminal bölge aktif bölge olarak isimlendirilir ve PARP-1 enziminin aktivitesini düzene koyar (Wang et al 2007; Masutani et al 1999).



Şekil 1.1. PARP-1 proteininin genel yapısı (D'amours et al 1999)

PARP-1 enfeksiyon hastalıklarında hücrede meydana gelen ROS'un neden olduğu tek iplik DNA kırıklarını tanıyarak bağlanır ve Poli ADP-ribozilasyon (PARlasyon) işlemini başlatır (Dantzer et al 1999). DNA'da her hangi bir hasar olmadığı zamanlarda Poli ADP-ribozilasyon (PARlasyon) aktivitesi düşük seviyelerdedir. Fakat DNA'da hasar söz konusu olması durumunda PARP-1, DNA kırıklarına bağlanarak aktivitesini artırır ve bu yükseliş 500 kat seviyelerine kadar çıkabilir (Peralta Leal et al 2009; Hageman ve Stierum 2001). DNA kırıklarına bağlanan PARP-1, ya DNA tamirini başlatarak hücreyi kurtarma yoluna gider veya BER mekanizmasını inhibe ederek hücrenin ölümüne (apoptoz) neden olur (Ame et al 2004).

PARP-1 proteinin hücrede meydana gelen DNA hasar şiddetine bağlı olmak üzere ikili etkisi söz konusudur. PARP-1, orta şiddette DNA hasarlarında devreye girerek DNA tamirini yapabilirken, yüksek miktardaki hasar söz konusu olması durumunda ise, PARP-1 aktivasyonu başlar ve bu olay PARP-1'in substratı olan NAD'ın hücrede bitmesine neden olur. Bu durumda NAD'ın yeniden sentezlenmesi için ATP kaybı oluşur. Nihayetinde hücredeki bu geri dönüşümsüz enerji kaybı hücrenin ölümüne sebebiyet verir (Burkle 2001; Soldani ve Scovassi 2002; Malanga ve Althaus 2005).

1.5. Heme Oxygenase-1 (HO-1)

Strese karşı hücre adaptasyonunun çok önemli bir mekanizması olarak kabul edilen ve 1968'de Tenhunen ve arkadaşları tarafından keşfedilen Heme oxygenase-1 (HO-1); biliverdin, serbest demir ve karbon monoksit seviyelerini düşüren 32 kDa fraksiyonunda olan bir stres proteinidir. Çoğu canlı dokusunda düşük seviyelerde bulunur ve antioksidan ve antienflamatuar tepkiler veren bir dizi oksidatif uyarıcı ile vücutta artış gösterir. Sağlıklı beyin dokusunda, HO-1 protein ekspresyonu düşüktür ve küçük nöron ve nöroglia grupları ile sınırlıdır. Aksine, HO-1 transkript hücrel rezervinin varlığı hipokampus ve serebellumda protein sentezi için yüksek düzeylerde fizyolojik olarak saptanabilir (Barañano ve Snyder 2001). Pek çok stres koşulunun, özellikle oksidatif streslerin, hücre adaptasyon mekanizması olarak Bach1'e bağlı HO-1 aktivasyonunu indükleyen miyoglobin, sitokromlar, peroksidazlar gibi farklı proteinlerden heme gruplarının salınımını desteklediği bilinmektedir. HO-1 yukarı regülasyonu strese karşı güçlü bir hücre adaptasyon mekanizmasını temsil eder ve HO-1'in antioksidan, anti-

apoptotik ve anti-enflamatuar özellikleri temel olarak metabolik ürünlerinin biyolojik aktivitesinden kaynaklanır (Schipper et al 2009).

1.6. 4-Hidroksinonenal (4-HNE)

4-Hidroksinonenal (4-HNE), çoklu doymamış yağ asitlerinin lipid peroksidasyonunun ana son ürünü ve oksidatif stres indükleyicisidir. Lipit peroksidasyon ürünleri arasında 4-HNE, en biyoaktif ve iyi çalışılmış lipit alkenallerinden birini temsil eder. 4-HNE, DNA, RNA sentezinin hasar görmesinde veya inhibisyonunda, hücre apoptoz veya nekrozuda, mitokondriyal fonksiyon bozukluğunda ve lipid peroksidasyonunda rol oynar (Esterbauer et al 1991). 4-HNE, esas olarak proteinler, nükleik asitler ve membran lipidlerinde nükleofilik fonksiyonel gruplar ile kovalent eklentiler oluşturarak çeşitli sinyal işlemlerini düzenleyebilir (Shoeb et al 2014).

1.7. Sitokrom c (Cyt c)

Sitokrom c (Cyt c), suda çözünen, çeşitli hayvanlarda mitokondrinin iç ve dış zarları arasında bulunan, hücre apoptozisinde önemli bir rol oynayan bir redoks proteindir (Wang et al 2002). Cyt c, sitozolde bir apoprotein olarak sentezlenir. Cyt c elektron taşınmasına katılır, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu inhibe eder ve oksidatif stresi önler (Kagan et al 2004).

Balıklar, yalnızca potansiyel olarak zararlı ksenobiyotiklerin ekotoksikolojik sonuçlarıyla ilgili bilgiler sağlamanın yanı sıra insanlara ekstrapolasyon sonuçlarıyla ilgili bilgi sağlamadaki faydalarından dolayı kirletici etkilerin biyoindikatörleri olarak tercih edilmektedir. Sinir sistemi toksik ajanlar için ortak bir hedefdir. Özellikle beyin dokusu yüksek miktarda çoklu doymamış yağ asitleri ve düşük antioksidan kapasitesi, mitokondri bakımından zengin olması ve oksidatif strese daha duyarlı olmasından dolayı oldukça daha hassastır (Timbrell 2002). Gökkuşluğu alabalığı, iyi oksijenli, temiz ve soğuk suyu tercih eden bir tatlı su balığıdır. Balıkçılık ve gıda endüstrisindeki önemi nedeniyle, fizyolojik problemler ortaya çıkmadan önce kirleticilerin neden olduğu biyolojik değişikliklerin erken uyarısı olarak yaygın bir şekilde kullanılan hassas test organizmalarından biridir. Ayrıca, akut ve kronik toksisite çalışmalarında biyoindikatör olarak kullanılması önerilmektedir (OECD 1992). Civa güçlü bir nörotoksidan olarak

kabul edilmesine rağmen, balık beyni ve altta yatan mekanizmalar üzerindeki tehdidi ile ilgili bilgiler halen yeterli düzeylerde değildir. Dolayısıyla toksikoloji ile ilgili yapılan çalışmalarda kirletici ve kimyasalların sucul organizmalara olan etkisinin oksidatif stres ve DNA hasarına bağlı olarak belirlenmesi büyük önem arz etmektedir. Bu çalışmada da civa klorür (HgCl₂)'ün gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nin beyin dokusunda oksidatif stres ve DNA hasarını indükleyici potansiyelini değerlendirmek ve yorumlamak amaç edinilmiştir.

1.8. 8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin (8-OHdG)

Modifiye bir baz olan 8-OHdG, reaktif oksijen türlerinin DNA'da meydana getirdiği yirmiden fazla oksidatif baz hasar ürünlerinden biri olup guaninin 8. karbon atomuna hidroksil radikali atakları sonucu oluşan, oksidatif DNA hasarının duyarlı bir belirteçidir. 8-OHdG, kolayca ölçülebilen birden fazla DNA oksidasyon ürününden biridir ve oksidatif DNA hasarını değerlendirmek için yaygın olarak bir biyobelirteç olarak kullanılır. Oksijen radikal oluşturan kimyasallar ve kanserojenler, in vitro ve in vivo 8-OHdG oluşum seviyesini artırabilir (Kasai 1997; Valavanidis et al 2009).

1.9. Malondialdehit (MDA)

Malondialdehit (MDA), çoklu doymamış yağ asitlerinin radikal olarak başlatılan oksidatif ayrışmasının bir ürünüdür ve bu nedenle, oksidatif stresin sıklıkla ölçülen bir biyobelirteçidir (Grune ve Berger2007). Lipid peroksidasyonun en önemli ürünlerinden olan MDA, hücre membranlarından iyon alış-verişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar, iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir (Mercan 2004).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Atlantik Salmonu ile yapılan bir çalışmada, balıklar dört ay süreyle civa kloride maruz bırakılması sonucunda metal civa özellikle beyinde birikim göstermiş fakat balığın ölümüne veya gelişiminde gözlemlenebilir bir azalmaya neden olmamıştır. Buna karşılık yüksek miktarda lipid peroksidasyonunu arttırmışken, SOD ve glutatyon peroksidaz aktivitesini azaltmıştır. Diğer organlarla karşılaştırıldığında beyin dokusu civadan en çok etkilenen organdır. Bu nedenle, düşük konsantrasyonlarda diyet ile alınan civa, beyinde antioksidan enzim SOD'ın indüklenmesiyle oluşan koruyucu redoks savunmaya neden olmuştur (Berntssen vd 2003). Başka bir çalışmada, civaya maruz bırakılan Altınbaş Kefal'de (*Liza aurata*) antioksidan enzim aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir (Mieiro vd 2010).

Diyet arginininin, genç ot sazı (*Ctenopharyngodon idella*) solungaçlarındaki bakır (Cu) kaynaklı mRNA ekspresyon değişiklikleri, apoptoz ve antioksidan tepkiler üzerindeki olası önleyici etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada (Wang vd 2015), 96 saat boyunca 0,7 mg / L (11,01 µmol / L) Cu'ya maruz kalmanın ROS'un üretimini indüklediğini, böylece balıkların solungaçlarında protein oksidasyonu, lipid peroksidasyonu ve DNA hasarının arttırdığını göstermiştir. Bununla birlikte, bu oksidatif etkilerin arginin takviyesi ile önlediği belirtilmiştir. Arginin ayrıca Cu'nun bakır / çinko SOD, GST, GPx, GR ve GSH içeriğinin aktiviteleri üzerindeki toksik etkilerini de önlemiştir. Ayrıca, Cu, SOD, CAT, GPx, GST, kaspaz-3, kaspaz-9, NF-E2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2), aktivitesinde de artışa neden olmuştur.

HepG2 hücrelerinin, çoklu koşullar altında bakır ile muamele edildiği ve bakırın strese cevap veren genlerin transkripsiyonunu etkileyen mekanizmalarının incelendiği bir çalışmada (McElwee vd 2009), mikrodizin verilerinin analizinde, bakırın, NF-kB'nin aracılık ettiği alanlar da dahil olmak üzere çoklu sinyal iletim yollarını modüle ettiğini göstermiştir. Sonuç olarak, NF-kB'nin aktivasyonunun, yüksek bakır konsantrasyonları altında hayatta kalmak için önemli olabileceğini göstermiştir.

Zebra balığının (*Danio rerio*) beyin, karaciğer ve yumurtalıklarında Kadmiyum (Cd) tarafından indüklenen oksidatif stres ve enflamatuar tepkilerin değerlendirildiği bir çalışmada (Zheng vd 2016), balıklar 24 ve 96 saat boyunca 1mgL-1 Cd'ye maruz bırakılmış ve sonuçta beyindeki ve karaciğerdeki ROS, NO ve MDA, zamana bağlı bir şekilde artmıştır. ROS, NO ve MDA yumurtalıkta Cd'den anlamlı bir şekilde etkilenmemiş olmasına rağmen, Cu / Zn-SOD, CAT, iNOS ve COX-2'nin yukarı regülasyonu gözlemlendiği bildirilmiştir. Kadmiyuma maruz kalmak beyindeki, karaciğerdeki ve yumurtalıktaki tümör nekroz faktörü alfa (TNF-a) protein seviyelerinde keskin bir artışa neden olduğu da belirtilmiştir. Ayrıca, karaciğerde ve yumurtalıkta 24 saatte NF-E2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2) ve nükleer transkripsiyon faktörü κB (NF-κB) mRNA seviyelerinde de çarpıcı bir artış tespit edilmiştir.

Zebra balığı beyinde, oksidatif stresin ve enflamatuar yanıtların zamansal duyarlılığını değerlendirmek için kadmiyuma 12 saat boyunca 0,97mgL-1 maruz bırakılan bir çalışmada (Zheng vd 2017), bazı genlerin, protein ve aktivite seviyelerindeki tepki profilleri, normal suda ZT0 (ışık yoğunluğu maksimum seviyede) ve ZT12 (ışık yoğunluğu minimum seviyede) arasında farklı olduğu, Cd'ye maruz kalındığında ise, ZT0 ve ZT12 arasında ters antioksidan tepkilerinin indüklendiği, bununla birlikte, yukarı regüle edilen enflamatuar genlerin sayısı, ZT12'de ZT0'dan anlamlı olarak daha yüksek olduğu bildirilmiştir. ROS seviyeleri ile nRK nükleer transkripsiyon faktörü κB (NF-κB) ve mRNA seviyeleri arasında ve NF-κB'nin mRNA seviyeleri ile hedef genleri arasında pozitif korelasyonlar gözlemlendiği tespit edilmiştir.

Beynin morfolojik değişikliklerinin (beyin hacmi ve toplam nöron sayısı artı beyin belirli bölgelerindeki gliyal hücrelerin hacmi ve toplam sayısı) bir arada değerlendirilmesiyle balıklarda inorganik civa (iHg)'nin nörotoksitesisi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada (Pereira vd 2016), Beyaz deniz kuşu balığı (*Diplodus sargus*), 7 (E7) ve 14 gün (E14) boyunca sudaki (2µgL (-1)) iHg seviyelerine maruz bırakılmış. Bundan sonra, beyin yenilenmesini ve davranışsal sendromların tersine çevrilebilirliğini değerlendirmek için balıklar 28 gün (PE28) iyileşmeye bırakılmış. Yüzme davranışı ile ilgili değişiklikler eşliğinde E7'de hipotalamus, optik tektum ve serebellumdaki hücrelerin sayısında önemli bir azalma bulunduğu, ayrıca beyinciklerin moleküler katmanındaki nöron ve glia sayısındaki azalma ile birlikte beyinciklerin hacminin de daraldığı ifade edilmiştir.

Mieiro vd (2010) tarafından yapılmış bir çalışmada Laranjo havzasında klor alkaliye maruz kalmış Avrupa levreklerinden (*Dicentrarchus labrax*) alınan beyin dokusunda proksidan durumunu değerlendirerek balıkların civa nörotoksitesine karşı kırılgenlikleri değerlendirilmiştir. CAT, GPx, GR, GST aktiviteleri ve toplam glutatyon (GSHT) içerikleri ölçülmüş ve lipid peroksidasyon seviyesi belirlenmiştir. Yaz döneminde, civa ile kirlenmiş bölgelerden gelen balıkların beyin dokusunda, kararsız antioksidan tepkileri sergilediği, ezici bir ROS üretiminin riski göz ardı edilemese de, beynin telafi edici mekanizmalara sahip olduğu görülmüş, yaz dönemi kış dönemine göre oksidatif stres için daha kritik olduğu belirtilmiştir.

Civa birikiminin beyindeki antioksidan savunmaları ve peroksidatif hasarı tahmin etmek için yabani balıkta (*Liza aurata*) civa tehdidinin değerlendirildiği bir çalışmada (Mieiro vd 2010) beyindeki toplam civanın (T-Hg) kontaminasyon kaynağına doğru arttığı, civa ile kirlenmiş istasyonlarda toplanan balıkların beyin dokusunda genel bir antioksidan azalışı tespit edilmiştir. Glutatyon içeriği ve çalışılan antioksidan enzim (CAT, GPx, GST ve GRT) seviyelerinde düşüş belirlenmiştir.

Diyet metil-merkürünün (MeHg) zebra balığı (*Danio rerio*)'nun üç organında (karaciğer, iskelet kası ve beyin) gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada (Gonzalez vd 2005), yetişkin erkek balıklar 7, 21 ve 63 gün boyunca biri kontrol diyeti diğerleri MeHg ile kontamine olmuş iki diyet olmak üzere üç farklı diyetle beslenen balıklarda maruz kalma süresinden sonra üç organda toplam Hg ve MeHg konsantrasyonları belirlendiği ve sadece karaciğerde bir demetilasyon işlemi kanıtlandığı ispat edilmiştir. Antioksidan savunma, organik bileşiklerin aktif akışı, mitokondriyal metabolizma, DNA onarımı ve apoptozide rol oynadığı bilinen on üç gen, kantitatif real-time RT-PCR ile araştırılmış ve bu genlerin ekspresyon seviyelerinde herhangi bir değişiklik gözlenmediği, sitoplazmik ve mitokondriyal sod gen ekspresyonu, iskelet kasının erken döneminde ve daha sonra karaciğerde indüklendiği ifade edilmiştir.

İnorganik civanın biyo-birikimi ve tropikal balıklarda, *Trichomycterus zonatus* ve *Salvelinus alpinus*'daki solungaç hasarlarında radyoizotop ²⁰³Hg tekniklerini kullanarak ve elektron mikroskopisi taramasıyla ilgili karşılaştırmalı sonuçlar sunulduğu bir çalışmada (Oliveira vd 2000), sudan inorganik Hg'nin alımı *T. zonatus*'ta *S. alpinus*'tan çok daha fazla olduğu ve *S. alpinus*'taki Hg konsantrasyonu maruz kalmanın ilk 24 saati

boyunca tüm dokularda daha yavaş bir oranda artış gösterdiği, 96 saat sonra, Hg konsantrasyonu böbreklerde 70 kat, karaciğerde, bağırsakta, deride ve beyinde 10 kat, solungaçlarda, kaslarda ve *T. zonatus*'un vücudunun geri kalan kısmında *S. alpinus* ile karşılaştırıldığında 3 kat daha yüksek seyrettiği ifade edilmiştir. *T. zonatus*'taki solungaç hasarları daha belirgin olduğu ve *S. alpinus* için olduğundan çok daha erken meydana geldiği belirtilmiştir. Sonuç olarak inorganik civa alımında, biyolojik birikimde ve solungaç hasarlarında gözlenen yüksek farklılıklar, *T. zonatus*'un inorganik civa kirliliğine *S. alpinus*'tan daha duyarlı olduğu tespiti yapılmıştır.

Subletal metil civa (MeHg)'nın gökkuşuğu alabalığı ve zebra balığı gelişimi üzerindeki etkilerini araştırmak için yapılan bir çalışmada (Liu vd 2013), yavru gökkuşuğu alabalığı ve genç erişkin zebra balığı, 0;0,5;5 ve 50 ppm'de MeHg eklenmiş diyetlerle beslenmeye tabi tutulmuş ve tüm vücut toplam Hg seviyelerini ölçmek için atomik absorpsiyon spektrometrisi uygulanmış ve MeHg'nin neden olduğu toksisiteyi tanımlamak için patolojik analiz yapılmış, MeHg'e maruz kalan alabalık ve zebra balıklarının, belirgin toksisite veya patoloji belirtileri göstermediği ve mortalite, uzunluk, kütle veya durum faktöründe de önemli farklılıkların gözlenmediği ifade edilmiştir. Zebra balığının, gökkuşuğu alabalığından daha fazla toplam Hg asimilasyonu sergilediği, MeHg ile muamele edilmiş balıklardaki düzensiz genler, demir iyonu homeostazi, glutatyon transferaz aktivitesi, kas kasılmasının düzenlenmesi ve kalsiyum bağımlı protein bağlanması gibi çoklu fonksiyonel sonuçlar gözlenmiştir. Sonuç olarak, su toksisite değerlendirmeleri için kullanan balıkların biyobelirteç olarak kullanımı analizinin dokuya, cinsiyete ve türe özgü değerlendirmeye dayanması gerektiği ifade edilmiştir.

Balık yetiştiriciliğinde diyet arsenik, kadmiyum, kurşun, civa ve selenyumun dağılımı ve potansiyel biyo-birikimi incelendiği bir çalışmada (Ciardullo vd 2008) (balıkların standart bir balık yemi ile beslendiği ve ihmal edilebilir düzeyde su bazlı iz elementlere maruz bırakıldığı ortamda) her bir iz elementin solungaç, böbrek, karaciğer, kas ve derideki içeriğinde yaşa bağlı değişikliklerin parametrik olmayan regresyon analizi ile incelendiği ifade edilmiştir. Tüm dokularda ve organlarda bütün elementlerin biriktiğinin gözlendiği, ancak büyüme ile seyreltme nedeniyle, karaciğer ve böbrekte kadmiyum ve civa gibi birkaç element dışında konsantrasyonların artmadığı belirtilmiş, civa kütle denge modelinin uygulanması, ölçülenler ile uyum içinde öngörülen konsantrasyonları

vermiş ve çiftlikteki alabalıkta yem ve balıktaki civa konsantrasyonlarının oranının yaklaşık 1:1 olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, gökkuşacağı alabalığı, izin verilen maksimum seviyede yemle beslendiğinde bile insan tüketimi için belirlenen sınırlara yaklaşmamaktadır. Diyet maruziyetinden sonra gökkuşacağı alabalıklarında kadmiyum, kurşun ve civa gibi toksik eser elementlerin düşük biyolojik birikim potansiyelini vurguladığı belirtilmiştir.

Sucul ekosistemler için en toksik kirleticilerden biri olan Civa-II klorürün, tatlı su kefali (*Alburnoides bipunctatus*) ve gökkuşacağı alabalığındaki (*Oncorhynchus mykiss*) akut toksisitesinin araştırıldığı bir çalışmada (Verep vd 2007), gerçek HgCl₂ konsantrasyonu, 0,10 ila 8,00 mg L arasında değiştiği, 96 saat (96 saat LC₅₀) içinde tatlı su kefali ve gökkuşacağı alabalığındaki %50'sini öldüren HgCl₂ konsantrasyonlarının sırasıyla 0,205 ve 0,814 mg/L olduğu tahmin edilmiştir. Akut toksisite testleri, Finney'nin Probit Analizi ile değerlendirilmiş ve tatlı su kefalinin (*Alburnoides bipunctatus*), alabalıklardan (*Oncorhynchus mykiss*) HgCl₂'ye karşı daha duyarlı olduğu görülmüştür.

Gökkuşacağı alabalığı hepatositlerinin, 15 ° C'de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 ve 35 saat boyunca civa konsantrasyonuna (Hg) (100 nM) maruz bırakıldığı bir çalışmada (Gagné vd 1990), hepatositlerin, önemli miktarda Hg biriktirdiği gözlenmiştir. Hg'nin varlığı, hücrelerde Ca, Cu ve Zn seviyelerinin yükselmesine neden olmuştur. Hg, esas olarak düşük moleküler ağırlıklı bileşenlere bağlanmış olmasına rağmen, metalotiyonin (MT) sentezini uyarmıştır. Sonuç olarak, hepatositler düşük Hg seviyelerine maruz kaldığında, MT'nin metalin sekestrasyonunda önemli bir rol oynamadığını, yüksek hücresel Cu ve Zn seviyeleri, MT indüksiyonu ile ilişkilendirilebileceği ifade edilmiştir.

Hazar Denizi, Anzali sulak alanından temin edilen kızılöz sazan (*Rutilus rutilus*), yaban sazani (*Hemiculter leucisculus*) ve tırsi (*Alosa caspia caspia*) balıklarında kas, böbrek, yumurtalık ve bağırsaklarındaki civa konsantrasyonu ile, ot sazani (*Ctenopharyngodon idella*), aynalı sazan (*Cyprinus carpio*), anjak (*Schizocypris altidorsalis*) balıklarının kaslarında ise civa ve kurşun konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla yapılan bir araştırmada (Zolfaghari 2018), çalışmanın sonuçları küresel standartlarla karşılaştırılmış ve çok bölgeli izlemenin yanı sıra, EPA / WHO talimatları ile tüketicilerin sağlık riski değerlendirmesi yapılmıştır. Tüketici kontamine metal (civa ve kurşun) alımından sağlık risk değerlendirmesi, Tehlike Katsayısı (HQ) hesaplamaları kullanılarak değerlendirilmiş,

insan sağlığı tehlikesi bölümü (endeks), kümülatif riskin artan balık tüketim hızı ile büyük ölçüde arttığını, böylece tüketicinin sağlığı için endişe verici olduğu ifade edilmiştir.

Aynalı sazan (*Cyprinus carpio*)'ın çeşitli dokularında Hg'nin neden olduğu oksidatif stres ile genotoksisite arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amaçlı yürütölen bir çalışmada (García--Medina 2017), balıkların 0.01mgHg / L'ye (suda yaşayan yaşamı koruma için izin verilen maksimum sınır) 12, 24, 48, 72 ve 96 saat maruz bırakıldığı ve lipid peroksidasyonu, protein karbonil içeriği ve antioksidan enzimlerin aktivitesi değerlendirildiğinde mikronökleus frekansı ve tek hücre jel elektroforezi ile DNA hasarı 12, 24, 48, 72 ve 96 saatlerde belirlenmiştir, antioksidan enzimlerin aktivitesinin inhibisyonu ve lipid peroksidasyonunda artış, DNA hasarı ve mikronökleus sıklığı meydana geldiğinden, maruz kalan balıklarda Hg'nin oksidatif stres ve genotoksisite indüklemesi görölmüştür, kan, solungaç ve karaciğer dokularının oksidatif strese karşı daha duyarlı olduğu, genotoksisiteye ise kanın duyarlı olduğu belirtilmiştir. Neticede, sudaki yaşamı koruma için izin verilen maksimum sınır değerine eşit konsantrasyonlarda bile Hg, *C. carpio* üzerinde oksidatif stres ve genotoksisiteye neden olduğu ifade edilmiştir.

Brezilya Amazon'undaki Madeira Nehri'nden temin edilen jaraqui (*Semapro chilodus*)'ın kas ve karaciğer dokularında civa ile bağlantılı proteinlerin çıkarılması ve karakterizasyonu için yürütölen bir çalışmada (Vieira vd 2018), protein fraksiyonu iki boyutlu elektroforez (2D-PAGE) ile yapıldığı, dokularda, granüllerde ve protein lekelerinde civa tayini, grafit fırınlı atomik absorpsiyon spektrometrisi (GFAAS) ile yapıldığı ifade edilmiştir. En yüksek civa konsantrasyonları karaciğer dokularında ve granüllerinde (426 ± 6 ve $277 \pm 4 \mu\text{g kg}^{-1}$), ardından kas dokularında ve granüllerinde (sırasıyla 132 ± 4 ve $86 \pm 1 \mu\text{g kg}^{-1}$) bulunduğu belirtilmiştir. ESI-MS / MS ile analizde karakterize edilen proteinlerin keratin, tip II sitoskeletal 8, parvalbümin beta, parvalbümin-2, ubikuitin-40S ribozomal S27a, 39S ribozomal protein L36 mitokondriyal, hemoglobin alt birimi beta ve hemoglobin altunit beta olduğu tespit edilmiştir.

Büyük sarı şarlatan (*Pseudosciaena crocea*)'ın karaciğerinde akut inorganik Hg'nin (0,32 ve $64 \mu\text{g Hg L}^{-1}$) farklı maruziyet sürelerinde (6 saat, 12 saat, 24 saat, 48 saat ve 96 saat) lipid peroksidasyonu aktiviteleri, antioksidan enzimlerin (Cu/Zn-SOD, CAT, GPx, GR ve GST) ekspresyonu ve Keap1-Nrf2 sinyal moleküllerinin mRNA seviyeleri

üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla yapılan bir çalışmada (Zeng vd 2016), lipid peroksidasyonunun kontrol seviyelerine dönmeden önce 6-12 saat boyunca keskin bir şekilde azaldığı, ardından 64 µg Hg L(-1) grubundaki maruz kalmanın sonuna doğru keskin bir artış gösterdiği, lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim aktiviteleri ile negatif bir ilişkinin olduğu ve antioksidan enzimlerin aktiviteleri ve gen ekspresyonu arasındaki pozitif ilişki, moleküler seviyedeki değişikliklerin enzimatik seviyenin altında kaldığı ve dolayısıyla hepatik lipid peroksidasyonunu etkilediği ifade edilmiştir. Ayrıca, Nrf2 ve Keap1'in mRNA seviyeleri arasındaki negatif bir ilişki, Keap1'in Nrf2 yanıtının kapatılmasında önemli bir rol oynayabileceği belirtilmiştir.

Sıcak iklim tatlı su balığı olan *Brycon amazonicus*'un civa klorürün subletal dozlarına 96 saat boyunca muamelesi neticesinde SOD, CAT, GPx, GST ve GSSG-R aktivitelerinin yukarı doğru seyrettiği rapor edilmiştir. Civa, balıkta karaciğer ve solungaçlarda indirgenmiş glutatyon miktarını artırırken, beyaz kas hücrelerinde indirgenmiş glutatyon seviyesini düşürmüştür. Bu bulgulara ek olarak, diğer bazı dokulardaki zarar görme neticesinde lipid peroksidasyonun ile protein karbonil içeriğinin artış gösterdiği belirtilmiştir (Monteiro vd 2010).

Propiconazole (PCZ) uygulaması yapılan bir çalışmada, gökkuşığı alabalıkları (*O. mykiss*) farklı süre (7, 20 ve 30 gün) ve subletal konsantrasyonlarda (0,2, 50 ve 500 µg/l) bir fungusit olan PCZ'ye maruz bırakılarak, oksidatif stres göstergeleri (LPO ve ROS) ve antioksidan (SOD, CAT, GR ve GPx) enzim aktiviteleri belirlenmiştir, 7 günlük denemenin sonucunda antioksidan savunma sistemi bu etkiye adaptasyonla cevap vermişken 20 ve 30 günlük sürelerde oksidatif stresin göstergeleri olan LPO ve ROS seviyelerinde ciddi bir artış ile antioksidan enzimlerde inhibisyon tespit edilmiş ve sonuç olarak uzun süreli muamelelerin belirgin bir şekilde oksidatif hasara yol açtığı bildirilmiştir (Li vd 2010).

Dorval ve Hontela (2003) bir çalışmalarında, organoklorlu bir pestisit olan endosülfanın farklı düzeylerdeki uygulama dozlarının gökkuşığı alabalığında enzim aktivitelerine olan etkilerine bakmışlar, çalışmanın sonucunda vardıkları kanaat bu pestisit CAT, GST ve GPx aktiviteleri ile MDA seviyesini yükselttiği yönünde olmuştur.

Curcuminin gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) üzerinde bazı antioksidan göstergelere olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada (Yonar vd 2014), curcuminin 10, 20 ve 40 mg/kg yem miktarlarıyla birlikte 21 gün süreyle verildiği balıklarda MDA seviyesinin indiği, GPx, GR ve GST aktivitelerinin ve GSH miktarının ise yükseldiği belirlenmiştir.

Cyfluthrin'in subletal dozlarına (10 µg/L) 48 saat süresince maruz bırakılan sazan yavruları (*C. carpio*) ile yürütülen bir çalışmada (Sepici vd 2009), *C. carpio*'nun beyin dokusunda MDA seviyesinin yükseldiği bildirilmiştir.

S-deltametrinin subletal konsantrasyonlarına maruz bırakılan gökkuşığı alabalıklarının (*O. mykiss*) oksijen tüketimi ve yüzme performansının araştırılmasına yönelik bir çalışmada (Hughes ve Biro 1993), piretroid yapılı bir pestisit olan bu kimyasala maruz bırakılan balıklarda oksijen tüketiminin arttığı, yüzme hızlarında ise önemli derecede azalma görüldüğü rapor edilmiştir.

Kızıl benekli gökkuşığı alabalığı (*Melanotaenia duboulayi*) ile yürütülen bir araştırmada, iki farklı organofosfat bileşik (Temephos ve Pirimiphos-metil), iki farklı mikrobiyal larvisit (*Bacillus thuringiensis* ve *B. sphaericus*) ve böcek büyüme düzenleyici (s-methopiren) içeren larvisitlerin balıkların kritik yüzme hızına olan etkileri incelenmiştir. İnceleme sonucunda kontrollü şartlar altında kızıl benekli gökkuşığı alabalığının kritik yüzme hızında önemli derecede düşüş olduğu bildirilmiştir (Hurst vd 2007).

Maneb ve karbaril aktif maddelerini içeren pestisitlerin yetişkin olmayan gökkuşığı alabalıkları (*O. mykiss*) üzerine olan akut toksisitesinin araştırıldığı bir çalışmada, bu kimyasallar ile muamele edilen balıkların epitelyum hücrelerinde nekroz, ödem ve şişlik meydana geldiği, solungaçlarında ise hiperplazi olduğu bildirilmiştir. Aynı şekilde pestisitlere maruz kalan balıkların karaciğer, böbrek ve dalak dokularında odaklanmış şekilde nekroz ve iltihaplanmaların görüldüğü belirtilmiş, maneb ve karbarilin histopatolojik lezyonlarının birbirine benzediği ve en çok zarar gören organların solungaç, böbrek ve karaciğer olduğu tespit edilmiştir (Boran vd 2010).

Çapkın vd (2009) üç farklı gübrenin sub-kronik toksisitesinin gökkuşığı alabalığı juvenillerinde bazı dokularına (deri, böbrek, karaciğer, pankreas, solungaç) olan etkilerini

çalıştıkları bir araştırmada, iki haftalık deneme müddeti neticesinde deri, solungaç, karaciğer ve böbrek yüzeyinde histolojik lezyonların tespit edildiğini, epidermis hücrelerinde dejenerasyon ve mukus hücrelerinde ise ödemlerin meydana geldiğini bildirmiştir.

21 gün boyunca endosülfan ve metiokarb maddelerinin gökkuşuğu alabalığının (*O. mykiss*) karaciğer, dalak, böbrek ve solungaçlarında meydana gelen histolojik etkilerin belirlenmesine yönelik kimyasal uygulamasının ardından sonra aynı balıklar 30 gün süresince tatlı su sisteminde bekletilmiştir. Araştırma sonunda metiokarba maruz kalan balıkların karaciğer, böbrek ve dalaklarında belirgin şekilde lezyonların meydana gelmemesine karşın endosülfana maruz kalan balıklarda lezyonların oluştuğu tespit edilmiştir (Altınok ve Çapkın 2007).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırma Yeri

Deneme, Bingöl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümüne ait Deneme Ünitesinde kuruldu. Laboratuvar çalışmaları ise Bingöl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarlarında yapıldı.

3.1.2. Su Materyali

Bingöl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü laboratuvarında şehir şebeke suyu kullanıldı. Her tanka havalandırma sistemi kuruldu ve suyun özellikleri; çözünmüş oksijen $8,02\pm 0,4$ mg/L, pH $7,2\pm 0,9$, sıcaklık $15\pm 7^{\circ}\text{C}$, alkalinite 154 ± 17 mg/L ve toplam sertlik 109 ± 43 mg/L CaCO_3 olarak ölçüldü.

3.1.3. Deneme Ünitesi

Araştırmada 600 litrelik fiberglas tanklar ve 60 litrelik cam akvaryumlar kullanıldı. Deneylerde kullanılan gökkuşuğı alabalığı bireyleri biyodeneden önce dinlendirilmiş 600 litre su ile dolu tanklara konuldu. Balıklar deney öncesi 10 gün süre ile ortama uyum sağlaması için bu tanklarda tutuldu. Aklimasyon süresince balıklar günde üç kez vücut ağırlıklarının %2'si kadar ticari pelet yemle beslendi. Deneyler başlamadan 48 saat önce yemlemeye son verildi, bu süreç içerisinde balıkların hastalanma ve ölüm oranının %5'ten fazla olmamasına dikkat edildi. Deney akvaryumlarında aynı uyum periyodundaki tanklar gibi dinlendirilmiş şehir suyu kullanıldı. Deneme 60 litrelik su kapasitesine sahip akvaryumlara 30 litre su konularak oluşturuldu ve akvaryumlara havalandırma sistemi takıldı.



Şekil 3.1. Araştırmada kullanılan fiberglas tanklar

3.1.4. Balık Materyali

Çalışmada $59,43 \pm 7,21$ g ve $17,24 \pm 1,57$ cm uzunluğunda dişi erkek rastgele seçilerek 85 adet Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) kullanıldı. Balıklar Elazığ ilinde bulunan Keban Alabalık Üretim tesisinden temin edildi. 10 günlük alıştırma döneminde balıklar günde üç kez vücut ağırlıklarının %2'si kadar ticari pelet yemle beslendi.



Şekil 3.2. Araştırmada kullanılan balıkların temin edildiği yer (Keban barajı, Keban/Elazığ)

3.1.5. Uygulanan Ağır Metal

HgCl₂'nin doza bağlı toksik etkisini belirlemek için 35 adet balık; 30 litrelik akvaryumlarda HgCl₂'nin 300, 400, 500, 600 ve 700 µg/L'lik (Nwani et al 2010) konsantrasyonlarına 96 saat (Henle 1981) süresince maruz bırakıldı. Bu süre içerisinde ölen balıklar akvaryumdan uzaklaştırıldı. Deneyde 96 saat sonunda her akvaryumda ölen ve canlı kalan balık adedi tespit edildi. Bu yöntem sonucunda, deney canlılarının %50'sini öldüren konsantrasyon (LC₅₀) değeri belirlendi. EPA Finney Probit Analiz Metodu (USEPA 1999) ile LC₅₀ değeri 551 µg/L olarak hesaplandı.

Probit analizi, binom yanıt değişkenlerini analiz etmek için kullanılan bir regresyon türüdür. Toksikolojide kimyasalların canlılara göreceli toksisitesini belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. $Y = a + b X$ şeklinde formülize edilmektedir.

$5 = -8,13372 + 4,750147X$ eşitliğinden $X=2,76$ bulundu. 2,76 değerinin antilogaritması alındığında 551 olan LC₅₀ değeri tespit edildi.

3.1.6. Deneme Kurgusu

Gökkuşığı alabalıkları 2 ve 7 gün süreyle civa (Hg) ağır metalinin tuz formu civa klorürün (HgCl_2) iki tane subletal dozu olan LC_{50} 'nin %25'ine ve %50'sine (137,75 ve 275,5 $\mu\text{g/L}$) maruz bırakıldı. Gruplar kontrol grubu; K, %25/48 saat; A, %25/168 saat; B, %50/48 saat; C, %50/168 saat; D olarak dizayn edildi. Her grupta 10 balık ($n = 10$) olacak şekilde toplam 50 adet balık kullanıldı.



Şekil 3.3. Araştırmanın yürütüldüğü deneme akvaryumları

3.2. Yöntem

3.2.1. Western Blotlama Çalışması İçin Doku Homojenizasyonu

Deneme sonunda benzokain ile anestezi yapıp solungaçların üstten bittiği yerden kafatası yarılarak otopsi yapılan (Arda vd 2002) (Şekil 3.4) balıklardan alınan beyin doku örnekleri oksidatif stres göstergeleri olan ROS ve MDA konsantrasyonlarının belirlenmesi için örnekler serum fizyolojik (%0,09 NaCl) ile yıkandı. İki filtre kâğıdı

arasında suyu süzildükten sonra %1,15'lik KCl içinde 1:10 oranında tekrar sulandırılarak homojenizasyon edildi. Elde edilen homojenatlar 50 ml'lik propilen tüplerin içinde soğutmalı santrifüjde 3200 rpm'de +4 °C'de 10 dakika santrifüje edildikten sonra süpernatantlar alındı ve lipid peroksidasyonun bir göstergesi olan MDA konsantrasyonu ve ROS düzeyi belirlendi. DNA hasar göstergesi olan PARP proteinin hasarlı ve normal dokulardaki ekspresyon seviyeleri ise özel antikorlar kullanılarak SDS-PAGE ve Western blotlama tekniği ile belirlendi. Bunun için ise dokular homojenizatörde lizis tamponu (0,5 M Tris (pH: 8), EDTA, β -Merkaptoetanol, Fenil metil sülfonil florid (PMSF) içerisinde parçalara ayrıldı. Parçalanan doku örnekleri 15000 rpm'de 45 dakika santrifüjlendi. Süpernatantlar kullanılıncaya kadar -80 C' de muhafaza edildi.



Şekil 3.4. Otopsi işlemi

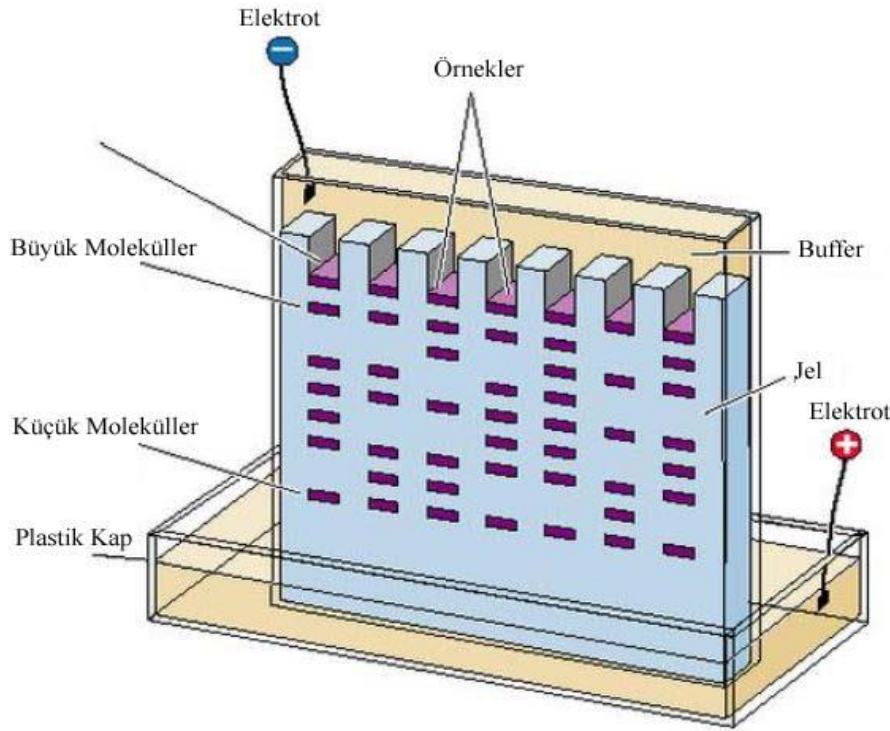
3.2.2. Western Blotlama Tekniği ile Proteinlerin Analizi

Western blot, bir örnekteki proteinlerin belirlenmesi ve karakterizasyonu için hızlı ve hassas bir yöntemdir. Bu yöntemde, protein örneğinin SDS-PAGE ile jel üzerine elektrotransferi gerçekleştirilir. Jeldeki görüntü daha sonra PVDF membrana aktarılır.

Membran ise spesifik primer ve sekonder antikolar kullanılarak görüntüleme işlemine uygun hale getirilir. Veriler analiz edilerek değerlendirilir.

Tablo 3.1. Poliakrilamid jelde protein ayırımının etkin aralığı

Jel (%)	Protein büyüklüğü (kDa)
5-15	20-200
5-20	10-200
8-15	10-100
8-20	8-150
10-20	6-150



Şekil 3.5. SDS-PAGE

3.2.2.1. SDS-PAGE için Jellerin Hazırlanması ve Yüklenmesi

1. Elektroforez için kullanılan iki cam levha karşılıklı olacak şekilde birleştirilip kısıkaçlı bir sistemle sabitlendi. İki cam levha arasında kalan boşluğa, üst seviyenin yaklaşık 1 cm altında olacak şekilde, Tablo 3.2'ye göre hazırlanan ayırma jeli otomatik pipet yardımıyla ilave edildi.

2. Jel yaklaşık 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. Jelde polimerleşmenin olduktan sonra iki cam levhanın arasında kalan boşluğun üst kısmına tarak yerleştirildi.

Tablo 3.2. SDS jel elektroforezi için kullanılan ayırma jelinin hazırlanması (ml)*

Jel Yüzdesi	%6	%8	%10	%12	%15
dH₂O	10,6	9,3	7,9	6,6	4,6
%30 Akril amid	4,0	5,3	6,7	8,0	10,0
1.5M Tris pH 8,8	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
%10 SDS	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
%10 APS	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
TEMED	0,016	0,0012	0,008	0,008	0,008
Toplam	20	20	20	20	20

*Dokulara ait protein örnekleri için %12'lik ayırma jeli kullanıldı.

3. Tablo 3.3'e göre hazırlanan yükleme jeli, otomatik pipet ile tarak dişlerinin arasında kalan boşluğa en üst seviyeye gelecek kadar dolduruldu.

Tablo 3.3. SDS jel elektroforezi için kullanılan yükleme jelinin hazırlanması*

Bileşen	10 ml	8 ml	6 ml	5 ml	4 ml	3 ml	2 ml	1 ml
dH₂O	6,8	5,5	4,1	3,4	2,7	2,1	1,4	0,68
%30 Akril amid	1,7	1,3	1,0	0,83	0,67	0,5	0,33	0,17
1.5M Tris pH 8,8	1,25	1,0	0,75	0,63	0,5	0,38	0,25	0,13
%10 SDS	0,1	0,08	0,06	0,05	0,04	0,03	0,02	0,01
%10 APS	0,1	0,08	0,06	0,05	0,04	0,03	0,02	0,01
TEMED	0,01	0,008	0,006	0,005	0,004	0,003	0,002	0,001

*Dokulara ait protein örnekleri için 4 ml'lik yükleme jeli kullanıldı.

4. 30 dk oda sıcaklığında bekletilerek yükleme jelinin polimerizasyonu sağlandı.

3.2.2.2. SDS-PAGE İle Proteinlerin Ayrılması

1. Bradford yöntemi sonucunda okunan absorbans değerlerine göre proteinler eşit miktarda olacak şekilde her bir kuyucuğa yüklendi.

2. Kaset sistemi elektroforez tankına yerleştirildi ve tankın içerisine yeterli miktarda SDS-PAGE 1X Running tamponu ilave edildi. Güç kaynağı çalıştırıldı.
3. Elektroforez cihazının güç kaynağı yaklaşık 30 dk süresince 50 volta çalıştırıldı.
4. Protein örnekleri ayırma jelini geçince yürüme hızı 100 volta yükseltildi ve 90 dk sonra koşturma işlemi sonlandırıldı.
5. Elektroforez işlemi bittikten sonra iki cam levha birbirinden ayrılır ve aradaki jel çıkarılır. Jelin yüklemeye jeli kısmı kesilerek atıldı ve ayırma jeli kısmı ise 1X transfer tamponu içerisinde 15 dk bekletildi.

3.2.2.3. Proteinlerin Jelden Membrana Aktarılması

1. PVDF membran jelin boyutlarında kesilerek 15 saniye kadar metanolde bekletildi. 1X transfer tamponu ile durulandı.
2. Transfer kasetini oluşturmak üzere sünger üzerine hepsi 1X transfer tamponu ile ıslatılmış olan sırasıyla iki parça filtre kağıdı, PVDF membran, jel ve tekrar iki parça filtre kağıdı kondu. Bunların üstü ıslak süngerle örtüldü.
3. Transfer kaseti kapatıldı ve içinde hava kabarcığı kalmadığından emin olunduktan sonra kaset, içinde buz bloğu bulunan transfer tankına yerleştirildi.
4. 190 mA'de 2 saat süresince transfer gerçekleştirildi. Bu süre sonunda proteinlerin jelden membrana aktarıldığı görüldü.

3.2.2.4. Antibody İnkübasyonu

1. Transfer kalitesini kontrol etmek için membran saf su ile durulandı ve Ponceau solüsyonu ile boyandı.
2. Ponceau solüsyonu uzaklaştırıldı ve membran üç kez TBST ile yıkandı.
3. Membran %5'lik tampon çözeltisinde oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.

4. Daha sonra membran, dilüsyon oranları Tablo 3.4'te gösterilen primer antikor solüsyonlarından herhangi birisinde +4°C'de bir gece bekletildi.

Tablo 3.4. Western blot analizinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar

Primer antikor	Dilüsyon oranı	Sekonder antikor	Dilüsyon oranı
Parp	1:2000	Goat anti rabbit IG-g HRP	1:20000
HO1	1:1000	Goat anti rabbit IG-g HRP	1:20000
4HNE	1:1000	Goat anti rabbit IG-g HRP	1:20000
Cyt-c	1:750	Goat anti mouse IG-g HRP	1:20000
β-aktin	1:1000	Goat anti mouse IG-g HRP	1:1000

5. Ertesi gün membran, ilki 10 dk, sonrakiler 5'er dakika olmak üzere 5 kez TBST ile yıkandı.

6. Daha sonra HRP-konjugat sekonder antikor solüsyonunda (Tablo 3.5) 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

7. Membran ilki 10 dk, sonrakiler 5'er dakika olmak üzere 5 kez TBST ile yıkandı.

3.2.2.5. Görüntüleme ve Veri Analizi

1. Membran, içinde 4'er ml ECL stok solüsyonu 1 ve ECL stok solüsyonu 2 olan kaba kondu ve 15 saniye kadar bu solüsyonların içinde çalkalandı. Bu solüsyonlar antikorun kemilüminesans sinyal oluşturmasını sağlar.

2. Membran kasete yerleştirildi ve kaset de cihaza (Carestream Medical XRay Processor) yerleştirildi.

3. Hedef proteinin bant yoğunluğunu okumak için Image J (Image J, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) görüntüleme analizi programı kullanıldı.

4. Hedef protein seviyesini normalize etmek için yüklenmiş olan kontrol proteininin (β -aktin) seviyesi kullanıldı.

3.2.2.6. Stripping

Stripping, görüntüleme işlemi bitmiş olan bir membran tekrar kullanılmak istenirse yapılır. Stripping için uygun olan bir kap içerisinde membranın üzerine stripping tamponu eklendi. 50°C’de 45 dk boyunca çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Membran saf su ile durulandı. Daha sonra membran temiz bir kaba konularak 5 defa TBST ile yıkandı. Oda sıcaklığında 1 saat süreyle %5’lik tampon çözeltisi içerisinde bloklama işlemi yapıldı. +4°C’de primer antikor solüsyonu içerisinde bir gece bekletildi. Bundan sonraki basamaklar yukarıda anlatıldığı şekilde uygulandı (sekonder antikor inkübasyonu, yıkama ve görüntüleme).

3.2.3. 8-OHdG Ölçümü Yapılacak Örneklerin Hazırlanması

Alınan balık dokuları tartılıp fosfat tamponu (pH:7,4) içerisinde homojenize edildi. Örnekler 2000-3000 rpm’de 20 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatant çalışmada kullanıldı.

3.2.3.1. 8-OHdG Düzeyinin Ölçümü

Beyin dokusu 8-Hidroksi-2’-Deoksiguanozin (8-OHdG) düzeylerinin belirlenmesi için SunRed marka Fish(8-OHdG) ELISA kit (Catalogue No:201-00-0041) kullanıldı. Bu kitin kataloğunda belirtilen aşağıdaki prosedürler uygulandı:

1. Çalışmaya başlamadan yarım saat kadar önce kit malzemeleri oda sıcaklığına bekletildi.
2. 8-OHdG standardı standart diluent ile hazırlanarak standartlar Microelisa Strip Plate içine 50 µl olarak eklendi.
3. Her bir kuyucuğa 50 µl Str-HRP-Conjugate Reagent eklenerek sadece numune örnekleri üzerine 10 µl Biotin-(8-OHdG) Ab eklenerek pleytin üzeri kapatıldı.
4. Pleyt, 37°C sıcaklığında Plate Shaker’da bir saat müddetle inkübe edildi.
5. Pleyt kuyucukları, distile saf su ile 30 kez dilue edilen 30X Wash Buffer ile (300 µl /kuyucuk olacak şekilde) 1-2 dakika bekletilerek beş defa yıkandı.

6. Yıkama sonrası her tüpe 50 µl Chromogen Solution A ve takiben 50 µl Chromogen Solution B eklendi.

7. Karanlıkta 37°C sıcaklıkta Plate Shaker'da 10 dakika müddetle inkübe edildi.

8. İnkubasyon sonucu plate kuyucuklarına 50 µl Stop Solution eklenerek 10 dakika içinde absorbansı 450 nm olan ELISA (Plate Reader) cihazında ölçüm yapıldı.

9. 8-OHdG standartlarının optik dansitelerine ve konsantrasyonlarına uygun standart grafiği çizilerek oluşturulan formüle göre örneklerdeki 8-OHdG düzeyi hesaplandı.

3.2.4. MDA Ölçümleri

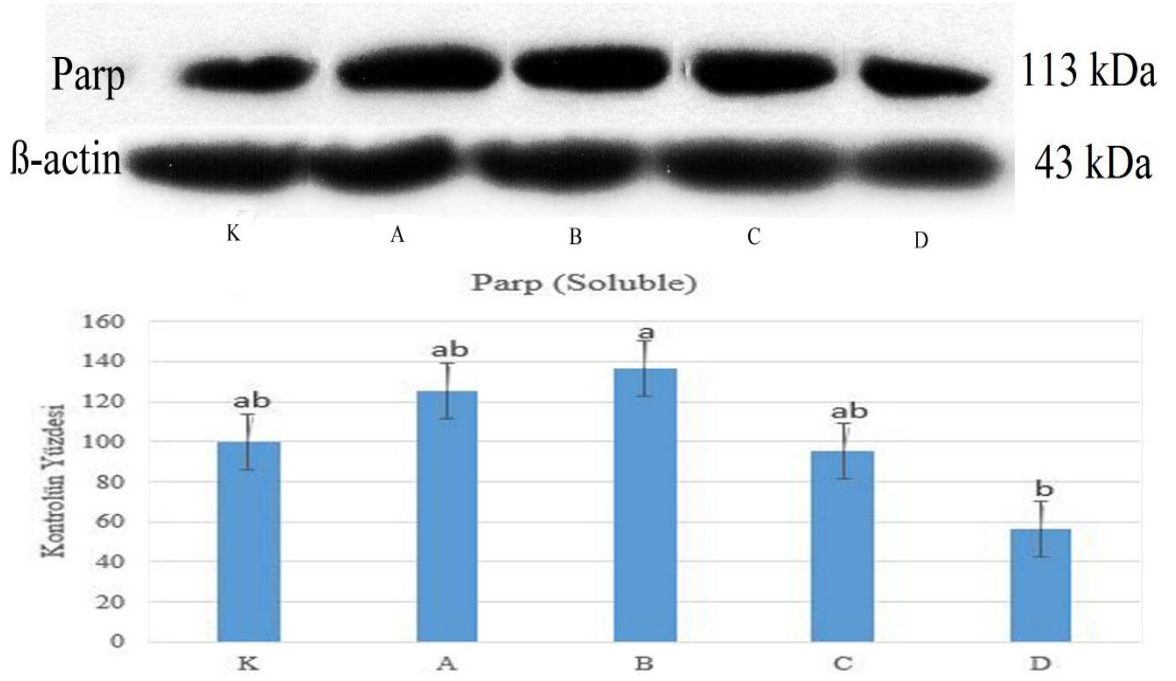
Doku örneklerinin MDA tayini Ohkawa vd. (1979)'nin yöntemine göre yapıldı. Her bir gruptan 200 µl örnek alınarak %8,1 SDS'den 200 µl ilave edildi. %20'lik asetik asitten (pH: 3,5) 1,5 ml ve %0,8'lik (pH: 3,5) TBA'dan 1,5 ml eklenerek son hacim 4 ml olacak şekilde distile su eklendi. Ardından 95 °C sıcaklıkta kaynar su banyosunda bir saat bekletilip daha sonra soğutularak 1 ml distile su ve 15:1 (v/v) oranında 5 ml n-butanol-piridin karışımından eklenerek vorteksledi. 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki organik tabaka alınıp 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülerek sonuçlar nmol/ml olarak kaydedildi.

3.2.5. İstatistiksel Analizler

Elde edilen tüm veriler SPSS 20 paket programında tek yönlü varyans analizi kullanılarak değerlendirildi. Çalışma sonunda gruplara ait elde edilen veriler ANOVA testine tabi tutulmuştur. Farklı bulunan ortalama gruplarının kontrolünde DUNCAN çoklu karşılaştırma testi kullanıldı (Yıldız ve Bircan 1991). Yapılan istatistiklerin güvenilirliği açısından, ölçümler üç tekrar olacak şekilde yapılarak, sonuçlar kaydedildi.

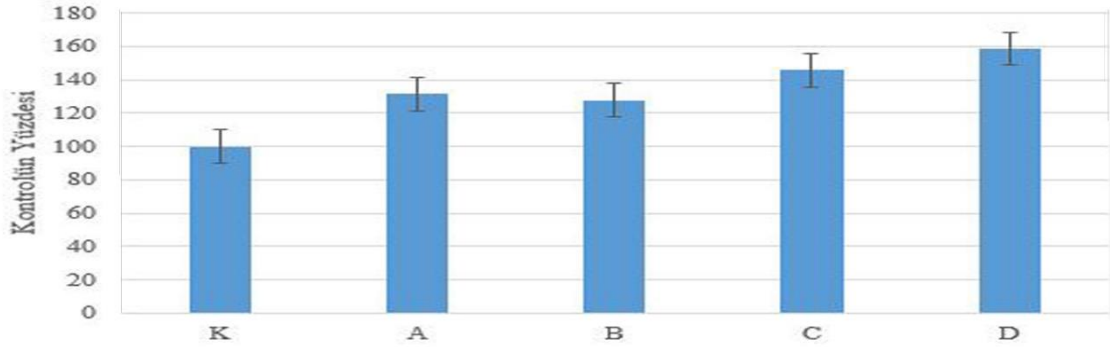
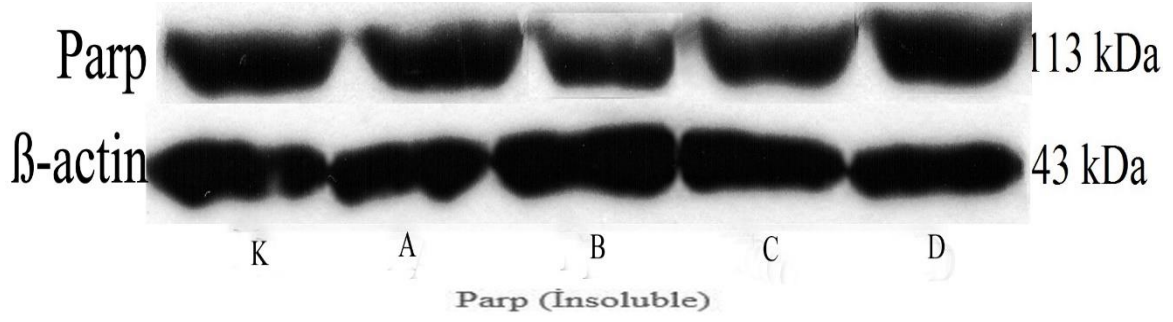
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. PARP, Cyt-c, 4HNE, HO1 Proteinlerinin Ekspresyon Düzeyleri



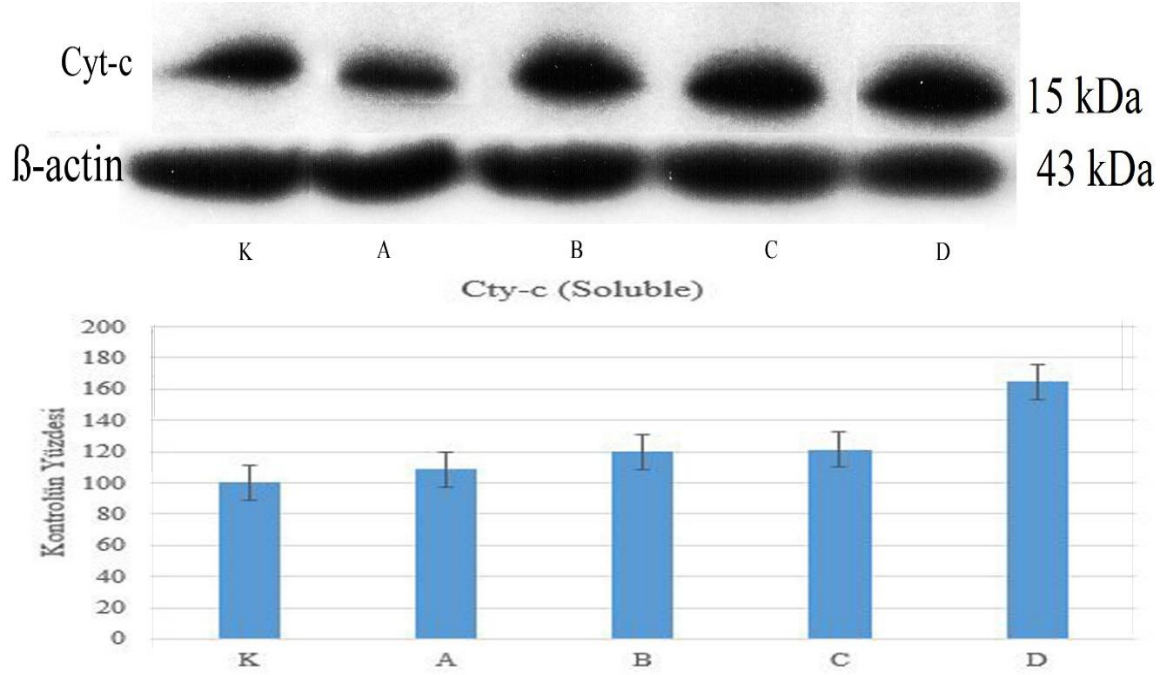
Şekil 4.1. HgCl₂ uygulanan balıklarda beyin dokusunda Parp (soluble) ekspresyon düzeyleri. a-b: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir (P<0,05) (Kontrol; K, %25/48 saat; A, %25/168 saat; B, %50/48 saat; C, %50/168 saat; D)

Şekil 4.1 incelendiğinde, PARP (soluble) proteinin ekspresyonu kontrol grubuna nazaran iki günlük muamele sürecinde subletal dozun her iki düzeyinde de doza bağlı olarak artış gösterirken, muamele süresi yedi güne çıktıkça kontrol grubuna göre artan doz miktarıyla orantılı olarak azalma göstermiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark sadece B ve D grupları arasında meydana gelmiştir.



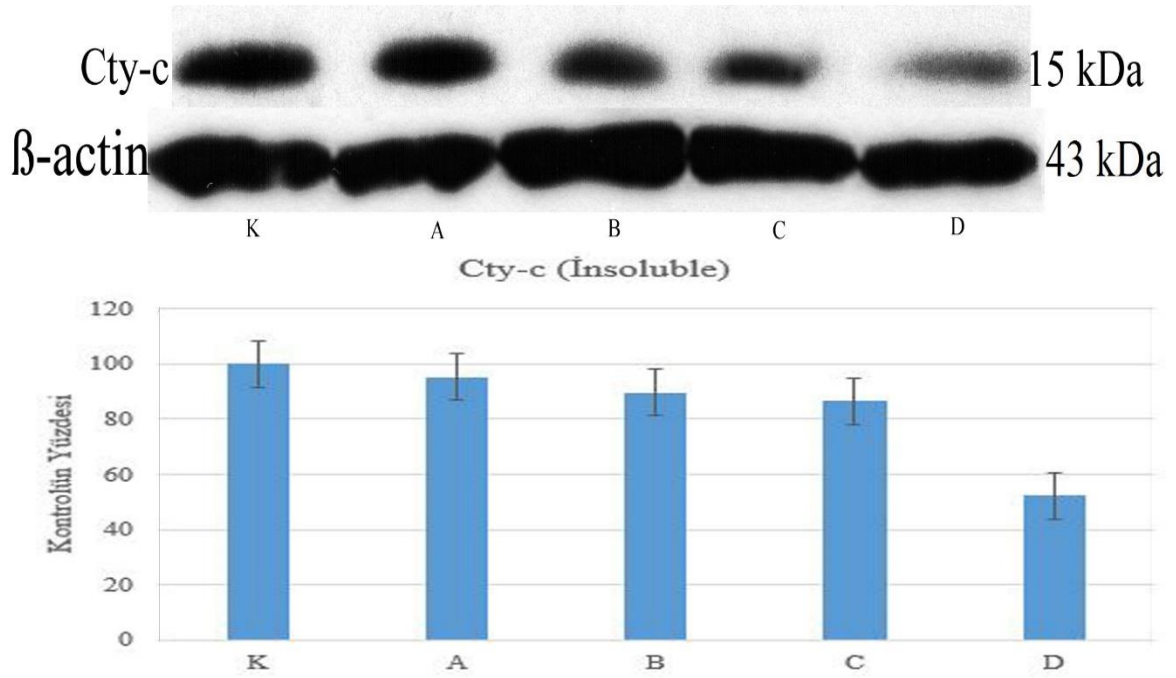
Şekil 4.2. HgCl₂ uygulanan balıklarda beyin dokusunda Parp (insoluble) ekspresyon düzeyleri (Kontrol; K, %25/48 saat; A, %25/168 saat; B, %50/48 saat; C, %50/168 saat; D)

Şekil 4.2’de PARP (insoluble) proteinin ekspresyon düzeyi incelendiğinde kontrol grubuna göre yedi günlük muamele sürecinde verilen dozla orantılı olarak bir artış gözlenirken, iki günlük muamele sürecinde de kontrol grubuna göre ekspresyon seviyesinde artış olmasına rağmen B grubunda A grubuna göre aşağı yönde meyil görülmüştür. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz çıkmıştır ($P>0,05$).



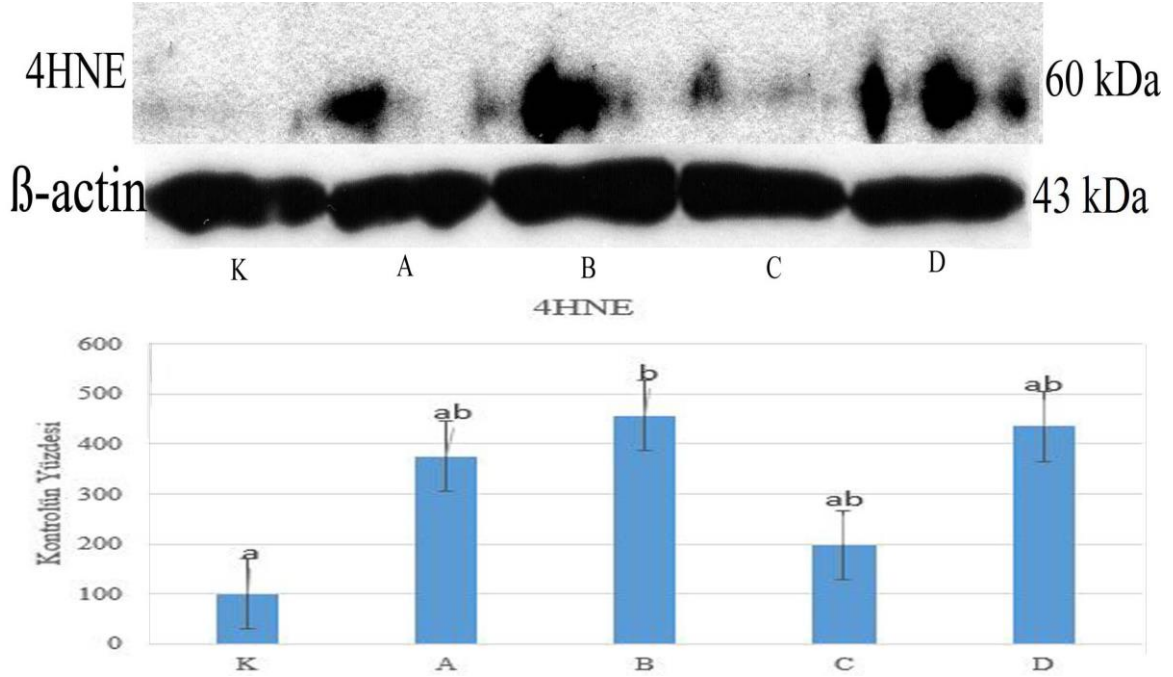
Şekil 4.3. HgCl₂ uygulanan balıklarda beyin dokusunda Cty-c (soluble) ekspresyon düzeyleri (Kontrol; K, %25/48 saat; A, %25/168 saat; B, %50/48 saat; C, %50/168 saat; D)

Şekil 4.3'te oksidatif stresin göstergelerinden olan Cty-c (soluble) proteinin ekspresyonu incelendiğinde kontrol grubuna göre doza ve muamele süresine bağlı olarak yukarı yönde bir eğilim görülmüştür. En fazla artış ise D grubunda gözlenmiştir. Fakat bu artış istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($P>0,05$).



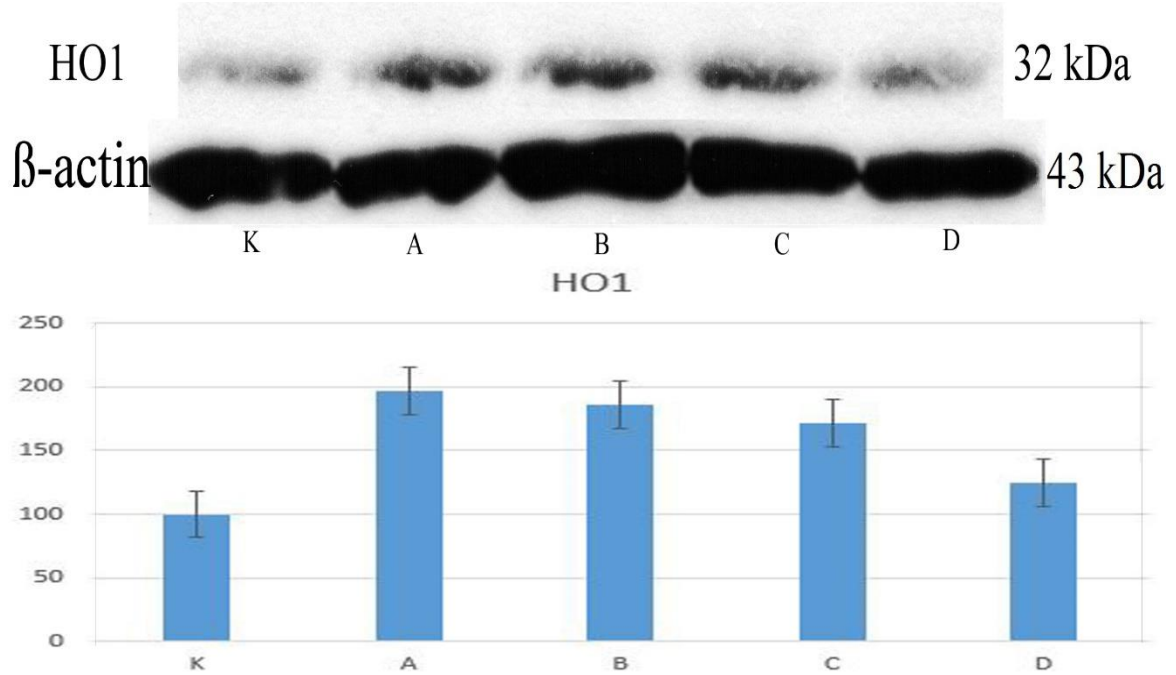
Şekil 4.4. HgCl₂ uygulanan balıklarda beyin dokusunda CtY-c (insoluble) ekspresyon düzeyleri (Kontrol; K, %25/48 saat; A, %25/168 saat; B, %50/48 saat; C, %50/168 saat; D)

CtY-c (insoluble) proteinin ekspresyon düzeyinin verildiği Şekil 4.4'e bakıldığında, HgCl₂ ile muamele edilen dört grupta doza ve güne bağlı olarak kontrol grubuna göre bir azalma trendi izlenmiştir. Diğer gruplardan farklı olarak biraz daha fazla düşüş gösteren D grubundaki bu aşağı yönde azalma istatistiksel olarak önemsiz çıkmıştır ($P > 0,05$).



Şekil 4.5. HgCl₂ uygulanan balıklarda beyin dokusunda 4HNE ekspresyon düzeyleri. a-b: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($P < 0,05$) (Kontrol; K, %25/48 saat; A, %25/168 saat; B, %50/48 saat; C, %50/168 saat; D)

Şekil 4.5'te 4HNE proteinin ekspresyonu incelendiğinde kontrol grubuna göre doza ve muamele süresine bağlı olarak yukarı yönde bir artış görülmüştür. K grubu ile B grubu arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0,05$). İki günlük muamele edilen gruplar arasında doza bağlı olarak oluşan fark yedi günlük muamele edilen gruplar arasındaki oluşana farktan daha az olmasına karşın bu gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz çıkmıştır ($P > 0,05$).



Şekil 4.6. HgCl₂ uygulanan balıklarda beyin dokusunda HO1 ekspresyon düzeyleri (Kontrol; K, %25/48 saat; A, %25/168 saat; B, %50/48 saat; C, %50/168 saat; D)

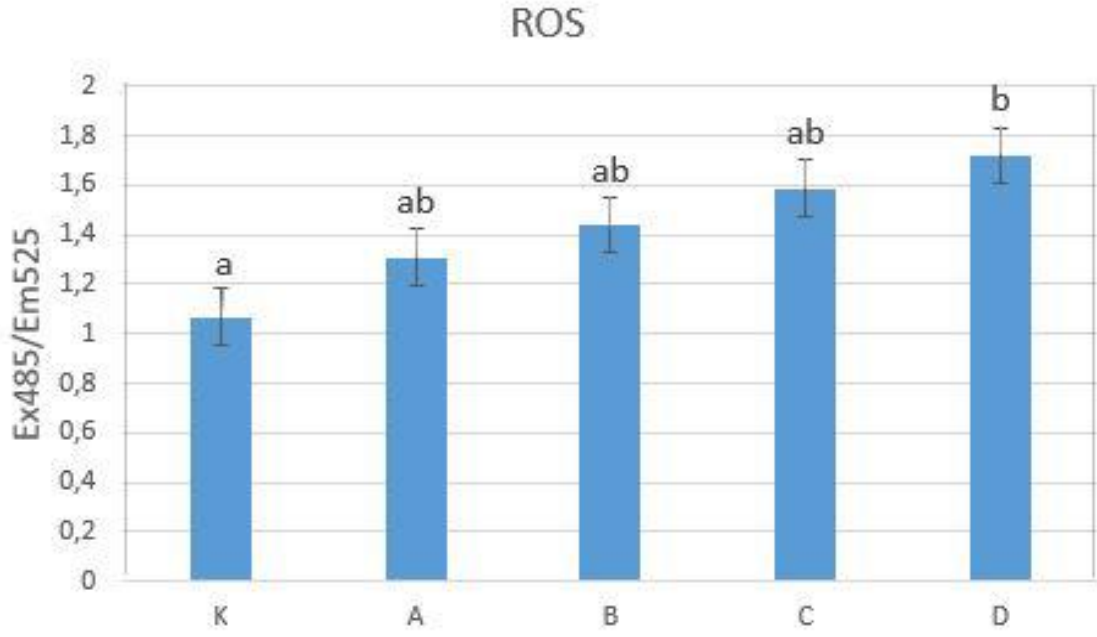
HgCl₂ uygulanan balıklarda HO1 proteinin ekspresyonunu gösteren Şekil 4.6 incelendiğinde kontrol grubundan daha yüksek seviyelerde ekspresyon gerçekleştiği görülmektedir. Ancak istatistiksel olarak önemsiz ($P > 0,05$) olmasına rağmen yedi günlük muamele edilen gruplardaki ekspresyon düzeyi iki günlük muamele edilen gruplara oranla daha düşük seviyelerde çıkmıştır. İki ve yedi günlük olarak kıyaslandığında B grubunun ekspresyon seviyesi A grubuna göre; D grubunun ise C grubuna göre daha düşük olmuştur.

4.2. ROS Ölçüm Sonuçları

Tablo 4.1. Çalışma gruplarından elde edilen beyin dokusu ROS düzeyleri

K	A	B	C	D
1,0693 ^a	1,3106 ^{ab}	1,4388 ^{ab}	1,5896 ^{ab}	1,7227 ^b

a-b: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($p < 0,05$) (Kontrol; K, %25/48 saat; A, %25/168 saat; B, %50/48 saat; C, %50/168 saat; D).



Şekil 4.7. HgCl₂ uygulanan balıklarda beyin dokusunda ROS düzeyleri. a-b: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($P < 0,05$) (Kontrol; K, %25/48 saat; A, %25/168 saat; B, %50/48 saat; C, %50/168 saat; D)

Tablo 4.1 (Şekil 4.7)'de beyin dokusundaki ROS seviyeleri incelendiğinde, kontrol grubuna göre doza ve uygulama süresine bağlı olarak yukarı yönde bir artış gözlenmiştir. K grubu ile D grubu arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0,05$). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark oluşmamıştır ($P > 0,05$).

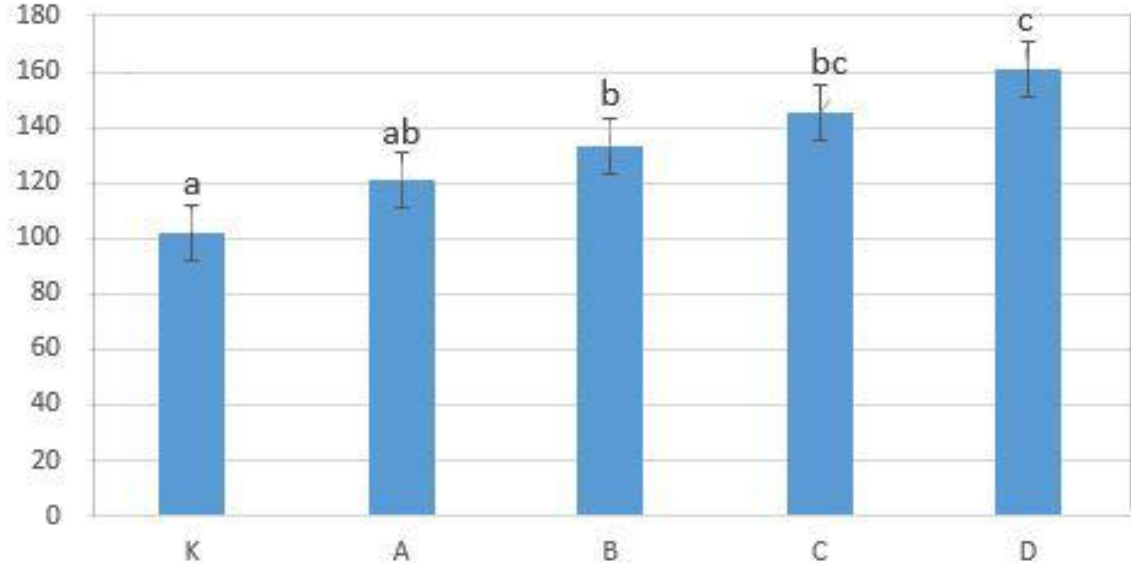
4.3. MDA Ölçüm Sonuçları

Tablo 4.2. Çalışma gruplarından elde edilen beyin dokusu MDA düzeyleri

K	A	B	C	D
102 ^a	121 ^{ab}	133 ^b	145 ^{bc}	161 ^c

a,b,c: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($p < 0,05$) (Kontrol; K, %25/48 saat; A, %25/168 saat; B, %50/48 saat; C, %50/168 saat; D).

MDA Seviyeleri (nmol/mg prot)



Şekil 4.8. HgCl₂ uygulanan balıklarda beyin dokusunda MDA düzeyleri. a-b-c: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir (P< 0,05) (Kontrol; K, %25/48 saat; A, %25/168 saat; B, %50/48 saat; C, %50/168 saat; D)

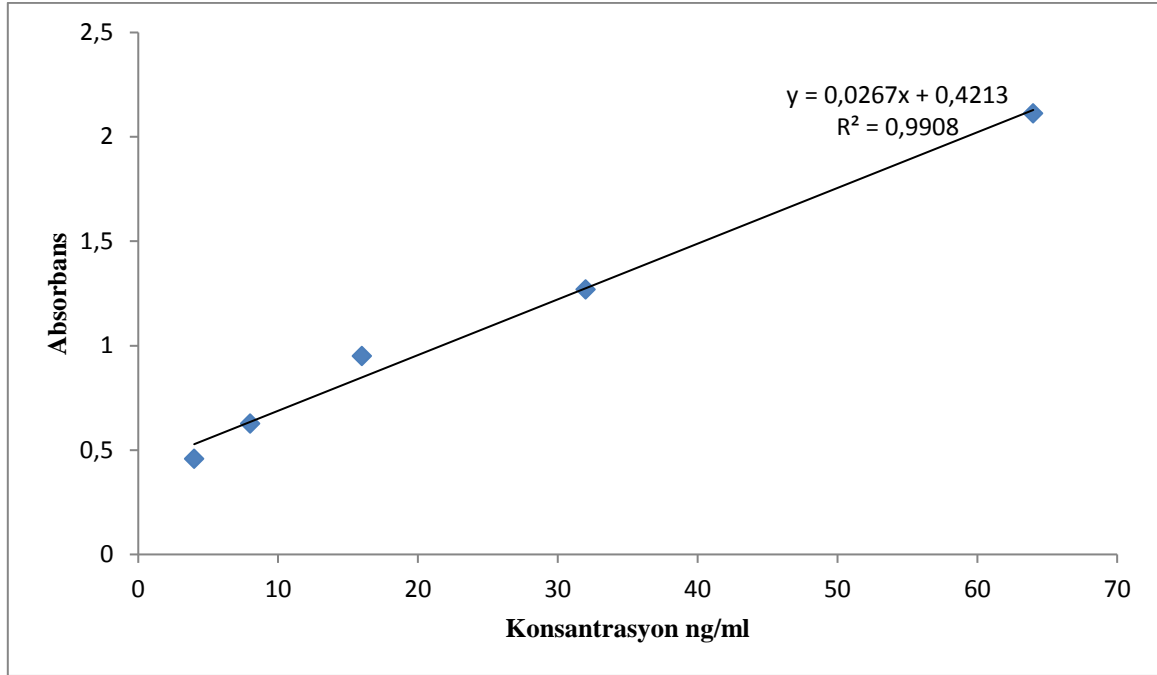
Tablo 4.2 (Şekil 4.8)'de beyin dokusundaki MDA seviyeleri incelendiğinde, kontrol grubuna göre doza ve uygulama süresiyle orantılı olarak bir artış gözlenmiştir. K grubu ile B, C, D grupları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P<0,05). Aynı şekilde B ve D grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark çıkmıştır (P<0,05).

4.4. 8-OHdG Ölçüm Sonuçları

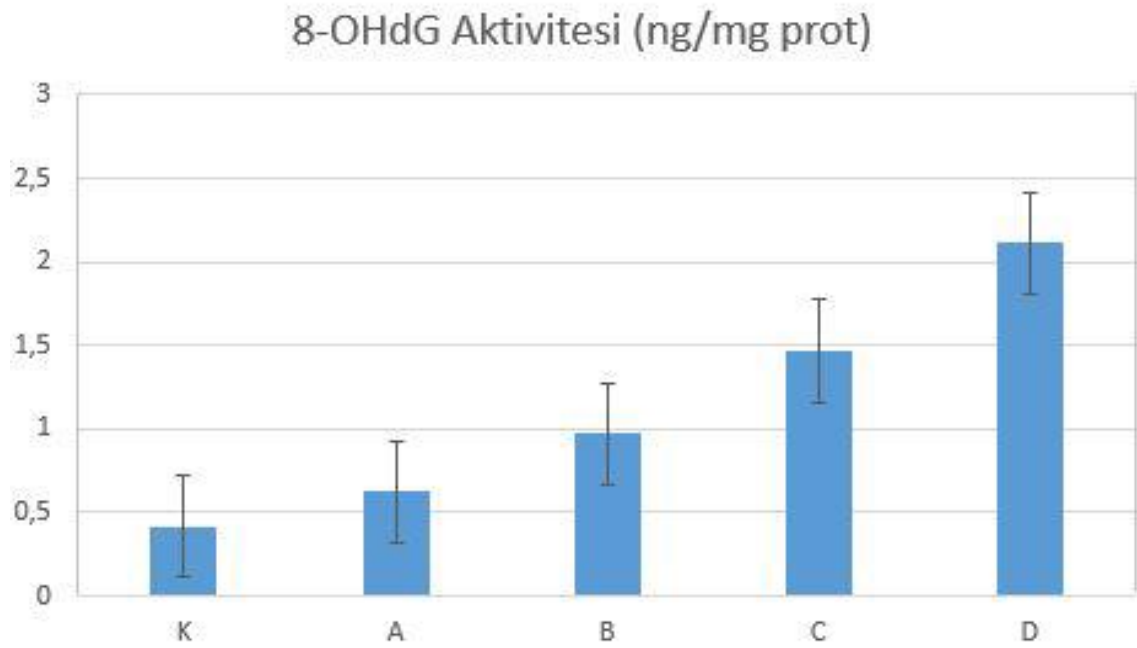
Tablo 4.3. Çalışma gruplarından elde edilen beyin dokusu 8-OHdG düzeyleri

	K	A	B	C	D
Absorpsiyon (nm)	0,418	0,626	0,972	1,469	2,112
Konsantrasyon (ng/ml)	4	8	16	32	64

(Kontrol; K, %25/48 saat; A, %25/168 saat; B, %50/48 saat; C, %50/168 saat; D).



Şekil 4.9. 8-OHdG standart eğrisi



Şekil 4.10. HgCl₂ uygulanan balıklarda beyin dokusunda 8-OHdG düzeyleri) (Kontrol; K, %25/48 saat; A, %25/168 saat; B, %50/48 saat; C, %50/168 saat; D)

Tablo 4.3 (Şekil 4.10)'de beyin dokusundaki 8-OHdG seviyeleri incelendiğinde, kontrol grubuna göre hem iki günlük hem de yedi günlük gruplarda uygulama süresi ve dozuna

bağlı olarak yukarı yönde bir artış gözlenmiştir. İki günlük muamele sonucunda doza bağlı olarak yukarı yöndeki artış yedi günlük muamele sonrasında doza bağlı yukarı yöndeki artışa nispeten az olmuştur. Ancak gruplar arasında meydana gelen bu fark istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır ($P>0,05$).

Doğada bulunan ağır metal kirliliği toksik etkilerinden dolayı, tüm canlı organizmalarda toksik etkilerden kaynaklanan çok sayıda rahatsızlığa neden olur. Son yıllarda, ağır metallerin zararlı etkilerinin yanı sıra etki mekanizmaları da yoğun bir şekilde incelenmiştir. Çok sayıda araştırma yapılmasına rağmen, sinir dokusu sitotoksitesisi dahil Hg toksisitesinin somut moleküler mekanizmaları hala belirsizliğini korumaktadır. Hg, insan ve hayvan sağlığı için olağanüstü tehlikeli olarak kabul edilen en nörotoksik kirleticilerden biridir (Carocci et al 2014). Hg türlerinin organik ve inorganik iki ana formu kritik çevresel kirleticiler olarak kabul edilir. Metil civa ana organik formdur ve zararlı etkisi inorganik civanın sitotoksitesisinden önemli ölçüde daha iyi bilinmektedir. Yaptığımız bu tez çalışmasında ise inorganik civanın sitotoksitesisini araştırdık. Son yıllarda yapılan araştırmalar, çeşitli Hg türlerinin toksisitesinin farklı görüldüğünü ortaya koymuştur (Simmons et al 2011). Özellikle, çeşitli balık türlerinde gözlenen metil civanın nörotoksitesisi, kan-beyin bariyeri hasarlarını başlatma kabiliyetine bağlı olabilir (Takahashi et al 2017). Bu çalışmada da görüldü ki inorganik civa dokularda hasara ve oksidatif strese neden olmaktadır. Modern dünyada, doğal civa emisyonları küresel emisyonların ortalama %40'ını geçmemektedir (Pirrone and Mason 2009). Hg ile çevre kirliliği, metil civa ile insan zehirlenmesi için potansiyel risk olarak kabul edilir. Bu sonuç, inorganik civayı sucul ortamda metil civaya dönüştürebilen mikroorganizmaların keşfedilmesine dayandırılmıştır (Jensen and Jernelöv 1969). Literatürde yer alan Hg'nin hücrelerdeki toksik etkisi, sucul ekosistemlerdeki kirlilik riskini tahmin etmek için yeterli biyomarker olarak kullanılabilmesi sonucu çalışmamızın neticesi ile de örtüşmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar Hg kirliliği ve balık ağırlığı arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermiştir (Łuczyńska et al 2018). Çeşitli Hg dozlarının etkisini incelemek için balık modelinin kullanılması dokuya özgü Hg sitotoksitesisinin moleküler mekanizmalarının keşfinde yardımcı rol oynayabileceğinden ortaya çıkan sonuçlarımız literatüre bu manada bir katkı sağlayabilir. Balıklarda Hg toksisitesinin mekanizmaları en çok hepatik, kas, solungaç ve beyindeki antioksidan enzimlerin gen ekspresyonu ve lipid peroksidasyonu ile ilgili çalışılmıştır (Sevcikova et al 2015; Zeng et al 2016; Naija et al

2018). Bu çalışmada beyin dokusundaki HgCl₂ maruziyetinin oluşturacağı DNA hasarı ve oksidatif stresi araştırılmıştır. Beyin hücreleri yüksek oranda oksijen tüketimi ve eksikliğine neden olan antioksidan güce sahip oldukları için diğer hücre tiplerine göre oksidatif hasarlara karşı daha hassastır, bütünüyle Hg iyonlarına maruz kalmak, beynin hayati fonksiyonlarının geri dönüşümü olmayan rahatsızlıklarına sebep olabilir. Hg iyonlarının nörotoksik etkisine oksidatif stresin katılımı halen ayrıntılı olarak araştırılmaktadır. Metil civaya maruz bırakılan insan astrosit kültürü, anormal astrosit reaktivitesini ve hücre iskeleti ve filamentli ağ proteinlerinin yeniden düzenlenmesi sorununa neden olmuştur (Malfa et al 2014). Bu çalışmayla paralel olarak bizim uyguladığımız HgCl₂ dozları sonucunda da beyin dokusundaki proteinlerin ekspresyon düzeylerinde değişiklik gözlemlendi. Ek olarak Hg, astrositlerde sülfhidril grubu bağlanması yoluyla mitokondriyal membran stresi indükleyebilir. Ayrıca, astrositler redoks aktif geçiş metallerini biriktirir ve sonuç olarak serbest radikalleri oluşturur. İnorganik Hg maruziyeti, mitokondride hem Hg hem de demir birikimini başlatır (Brawer et al 1998). Bu nedenle ROS üretiminin artışı, beyin hücrelerinde Hg'nin neden olduğu patojenik bozukluklarla yakından ilgilidir. Bu çalışmada gözlemlenen sonuçlarda, HgCl₂'ün subletal (%25 LC₅₀ ve %50 LC₅₀) dozlarıyla muamele edilen balıkların beyinde doza bağımlı ROS üretiminin artış göstermesi beyin hücrelerinde civanın bir takım bozukluklara neden olduğu anlaşılmaktadır. Beyaz deniz kuşunun beyindeki inorganik Hg'nin zararlı etkisi hakkında çalışmalar var. Çalışmacılar, 7 gün boyunca düşük doz (2 µg/L) ile muamele edilen balıklardaki nöronal ve glial hücre sayısında azalma olduğunu tespit etmişler. Ayrıca Hg'nin, beyin fonksiyonlarında, özellikle de yüzme davranışında değişikliklere neden olduğunu ifade etmişlerdir (Pereira et al 2016). Bizim çalışmamızda da HgCl₂ maruz kalma beyin dokusunda DNA hasarına ve oksidatif strese neden olmuştur.

PARP-1, bir DNA hasar sensörü ve hem tek hem de çift sarmallı DNA kopmalarına bağlanan sinyal molekülünü oluşturur. Oksidatif stres, DNA tek iplikçikli kopmalara neden olabilir. DNA sarmalının kırılması PARP'ı aktive eder. PARP-1 inflamatuvar hastalıklarda hücrede oluşan ROS'un yol açtığı tek iplik DNA kırıklarını tanır ve bağlanarak Poli ADP-ribozilasyon işlemini başlatır (Dantzer et al 1999). DNA'da bir hasar olmadığı zaman poli ADP-ribozilasyon aktivitesi düşük miktardadır. RNA bağlayıcı alanlar içeren PARP'ler, hedef mRNA'nın stabilitesini modüle ederek

proteinlerin ekspresyon seviyelerini düzenleyebilir. PARP1'in aktive edildiği bir ana mekanizma, normal hücrel metabolik aktiviteler, hücrel açlık ve sitotoksik tedaviler de dahil olmak üzere birçok mekanizma tarafından üretilen reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından tetiklenen DNA hasarıdır. Bu çalışmada ise PARP-1 proteinin ekspresyonu kontrol grubuna nazaran iki günlük muamele sürecinde subletal dozun her iki düzeyinde de doza bağlı olarak artış gösterirken, muamele süresi yedi güne çıktıkça kontrol grubuna göre artan doz miktarıyla orantılı olarak azalma göstermiştir. Denemenin ilk günlerinde DNA da meydana gelen hasarın bu artışa neden olduğu düşünülebilir. Çevre faktörleri DNA kırılmalarına ve bunun sonucunda hücrelerde genotoksik strese neden olabilir. Diğer yandan, DNA hasarları, DNA kırılmalarını onarmak için yönlendirilen hücrel tepkileri aktive etmek için sinyalleri başlatır ki bunlardan biri bu çalışmamızda da görüldüğü gibi PARP-1 proteinin ekspresyonunun artmasıdır.

Chen vd (2011), göre MDA, ROS üretimi ile iyi bir korelasyon gösterir ve oksidatif stres seviyesinin önemli bir göstergesi olarak kabul edilir. Bu nedenle MDA, akutik toksikolojideki oksidatif stresin bir belirteci olarak için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Rat beyin bölgelerinde propoxur kaynaklı toksisite ve oksidatif streste *Nigella sativa* yağının koruyucu etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada serebellum, korteks ve hipokampüste propoxur kaynaklı MDA seviyesi diğer gruplara oranla istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturacak şekilde yüksek ($p < 0,05$) çıkmıştır (Mohamadin et al 2010). Hiperoksi kaynaklı akciğer hasarında *Nigella sativa*'nın koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, ratları kontrol, hiperoksi ve hiperoksi + çörek otu olarak üç gruba ayrılmış ve hiperoksi grubundaki yavru ratlar %95 oranında O_2 'ye maruz bırakılmıştır. Lipit peroksidasyonunun belirteci olan MDA seviyesi incelemelerinin sonucunda hiperoksi + çörek otu grubunda, hiperoksi grubuna oranla çok daha düşük MDA seviyesi ($p < 0,05$) olduğu belirtilmiştir (Tayman et al 2013). Bizim bulgularımızda, beyin dokusundaki MDA seviyeleri karşılaştırıldığında, kontrol grubu ve 2 ile 7 gün boyunca $HgCl_2$ 'nin subletal dozlarına maruz bırakılan gruplar arasında istatistiksel açıdan bir fark olduğu ($p > 0,05$) görülmüştür. Uygulanan $HgCl_2$ 'nin dozu ve süresi arttıkça MDA seviyesinde de artış meydana geldiği görülmektedir.

Bütün pürin ve piridin bazları arasında, oksidasyona en yatkın baz guanindir. Bundan dolayı baz hasarı tespiti için yaygın olarak 8-OHdG ölçülür ve oksidatif DNA hasarının

belirteci olarak kabul edilir. Modifiye bir baz olan 8-OHdG, reaktif oksijen türlerinin DNA'da meydana getirdiği yirmiden fazla oksidatif baz hasar ürünlerinden biri olup guaninin 8. karbon atomuna hidroksil radikali atakları sonucu oluşan, oksidatif DNA hasarının duyarlı bir belirtecidir. Oksijen radikal oluşturan kimyasallar ve kanserojenler, *in vitro* ve *in vivo* 8-OHdG oluşum seviyesini artırabilir (Kasai 1997). Bazı antioksidanların ve diyet flavonoidlerinin 8-OHdG oluşumunu azalttığı bildirilmiştir (Lee et al 2008). Çalışmamızda, HgCl₂'nin genel olarak 8-OHdG seviyelerini istatistiksel anlamda önemli çıkmasa dahi arttırdığı görülmüştür. Gökkuşluğu alabalığı beyin dokusunda 8-OHdG seviyelerindeki bu artış, HgCl₂'nin oksidatif strese ve 8-OHdG oluşumuna neden olabileceğini göstermiştir. Ayrıca, HgCl₂'ye 2 gün maruz kalan balıklara nazaran 7 gün muamele görenlerde 8-OHdG'deki artış yerini azalmaya bırakmıştır. Çeşitli serbest radikal üreten ajanlar, DNA'da hidroksile deoksiguanozin kalıntıları ile 8-OHdG birikimini teşvik eder (Toyokuni et al 1999). Bu çalışmada, 8-OHdG seviyelerinin önce artış göstermesi ve sonrasında azalması, HgCl₂'nin balık metabolizmasında serbest radikalleri oluşturan faktörler üzerindeki etkisinin azaltılması veya bağışıklık sistemi üzerindeki teşvik edici etkisi ile ilişkilendirilebilir (Toyokuni et al 1999). DNA glikosilaz enzimi, DNA zincirindeki hasarlı guaninin yanlış eşleştirilmesinden ve farklı bir açıdan 8-OHdG olarak çıkarılmasından sorumludur (Obulesu and Rao 2010). DNA glikosilaz enzimi HgCl₂'den etkilenirse, 8-OHdG konsantrasyonu daha düşük olabilir. Öte yandan, Onouchi vd (2012), süperoksit anyon(O₂) üretiminin 8-OHdG seviyelerindeki artıştan kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Elde ettiğimiz sonuçlar Fang vd (2015), tarafından elde edilenler ile ters düşerken, Chen ve Tang (2011), Katayama vd (2014), ve Micillo vd (2016), tarafından elde edilen verilerle paralellik göstermektedir. Eksojen kaynakların (iyonize edici ve UV radyasyon, doğal olarak oluşan radyoizotoplar, çok sayıda genotoksik fitokimyasal, ilaç, toksin, hava ve suyu kirletici maddeler) DNA hasarına katkıda buldukları bildirilmiştir (Valavanidis et al 2009; Dai et al 2014).

HO-1 yukarı regülasyonu strese karşı güçlü bir hücre adaptasyon mekanizmasını temsil eder ve bunun antioksidan, anti-apoptotik ve anti-enflamatuar özellikleri temel olarak metabolik ürünlerinin biyolojik aktivitesinden kaynaklanır. Zhou vd (2006), HO-1'in preeklampsideki şiddetli oksidatif stresde koruyucu rol oynadığını ve HO-1'in yukarı yönde artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Buna paralel olarak bizim çalışmamızda da HO-1

kontrol grubuna göre yukarı yönde bir eğilim göstermesine rağmen doza ve süreye bağlı olarak HO-1 ekspresyonunda bir azalma görülmüştür. HO-1 ekspresyonundaki bu azalma yakın tarihli bir araştırma ile tutarlıydı (Ma et al 2018). Buradan HO-1'in oksidatif stresdeki sıkı bağlantı proteinlerini düzenleyerek beyin hücrelerinde iyileştirici etkiye sahip oldukları sonucuna varılmıştır.

Lipid peroksidasyonunun ürünü olan 4-HNE, virüslerde, bakterilerde ve memeli hücrelerinde mutajenik ve genotoksiktir. DNA, proteinler ve membran lipitler, 4-HNE saldırısı için birincil hedeflerdir. 4-HNE'nin lipid peroksidasyonunun mutajenik ve kanserojen etkilerine katkıda bulunan önemli bir oyuncu olduğuna inanılmaktadır. Böbrek ve kolon kanseri dokularında 4-HNE protein eklentilerinin oluşumu, böbrek ve kolon kanserinin büyümesi ve ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir (Shoeb et al 2014). Bu çalışmaya paralel olarak bizim bulgularımızda da 4-HNE seviyesi kontrol grubuna göre diğer dört grupta da anlamlı bir şekilde artmıştır. Bu da balıklar üzerinde HgCl₂'ün oksidatif hasara neden olduğunun bir kanıtı olarak düşünülmekte ve 4-HNE seviyeleri, beyin hücrelerinin oksidatif hasara karşı korunmasında adaptif tepkiye katkıda bulunabilir.

Cyt c, neredeyse sadece mitokondrinin iç zarında bulunan ve DNA tarafından kodlanan spesifik bir fosfolipid olan kardiolipin (CL) ile etkileşerek mitokondrinin iç zarına bağlanır (Buratta et al 2008; Ott et al 2002). Sakaida vd (2005), serum Cyt c testinin karaciğer hasarının ve beyin ödemi komplikasyonunun tespiti için çok duyarlı olduğunu göstermiştir. Anti-solunum zehirlerinin hassasiyetinin tespiti için Cyt c aktivitesindeki azalma da bir gösterge olarak kullanılmıştır (Fuku et al 2012). Pasdois vd (2011), yaptıkları bir çalışmada Cyt c'nin kaspaz aktivasyonunu ve apoptoz indüksiyonunu tetiklemede önemli bir rol oynadığını tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise hücre zarında çözülebilen Cyt c'nin ekspresyonu kontrol grubuna göre dozlar ve uygulanan saatler arttıkça sürekli artış göstermişken, çözülemeyen Cyt c'nin ekspresyonu ise kontrol grubuna göre dozlar ve uygulanan saatler arttıkça sürekli azalma göstermiştir. Bu da bize HgCl₂'nin beyin dokusunda mitokondriyal ve sitosolik kompartmanlarda lipotoksik etkilere neden olduğunu göstermektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın sonuçları, HgCl₂'nin balıklarda biyokimyasal ve fizyolojik etkilere sahip olduğunu ve HgCl₂ muamelesinin balıklarda antioksidan parametreleri, 8-OHdG, PARP-1, HO-1, 4-HNE, Cyt c aktivitesini değiştirdiğini göstermektedir. Bu bulgulardan, HgCl₂'nin balıklar üzerinde toksik bir etkiye sahip olduğu görülebilir. Balıklarda HgCl₂'nin toksisite mekanizmasının anlaşılmasında bu çalışmanın yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, bu çalışmada kullanılan belirteçlerin (8-OHdG, ROS, MDA, PARP-1, HO-1, 4-HNE, Cyt c) balıklarda toksisitenin neden olduğu nörofizyolojik tepkilerin belirlenmesinde güvenilir göstergeler olarak kullanılabilmesi de görülmektedir. Oksidatif stres ile biyokimyasal-genotoksik tepkiler arasındaki olası ilişkinin ileriki çalışmalarda farklı su organizmalarıyla araştırılması da üzerinde durulması gereken konulardan biridir.

KAYNAKLAR

Acerete L, Balasch JC, Espinosa E, Josa A, Tort L (2004) Physiological responses in Eurasian perh (*Perca fluviatialis*, L.) subjected to stress by transport and handling. *Aquaculture* 237: 167-178

Aguilar-Quesada R, Muñoz-Gómez JA, Martín-Oliva D (2007) Modulation of transcription by PARP-1: Consequences in carcinogenesis and inflammation. *Current Medicinal Chemistry* 14: 1179-1187

Ahmad M, Torky A, Glahn F (2010) PARP-1 expression and activity in primary human lung cells. *Archives of Toxicology* 85(6): 669-679

Akobundu A (2012) Quality Assessment of Aba River Using Heavy Metal Pollution. *American Journal of Environmental Engineering* 21: 45-49

Aktar MW, Paramasivam M, Gangul M, Purkait, S, Sengupta, D (2010) Assessment and occurrence of various heavy metals in surface water of Ganga river around Kolkata: a study for toxicity and ecological impact. *Environ Monit Assess* 160: 207-213

Alano CC, Ying W, Swanson RA (2004) Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1- mediated cell death in astrocytes requires NAD⁺ depletion and mitochondrial permeability transition. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 18895-18902

Altınok İ, Çapkın E (2007) Histopathology of rainbow trout exposed to sublethal concentrations of methiocarb or endosulfan. *Toxicologic Pathology* 35: 405-410

Ame, JC. Spenlehauer C, Murcia, G. (2004) The PARP superfamily. *Bioessays* 26: 882-893

Arda M, Seçer S, Sarıeyyüpoğlu M (2002) Balık Hastalıkları, Medisan Yayın Serisi 56, Ankara s-42

Argese EC, Bettiol C, Rigo S, Bertini S, Colomban P, Ghetti F (2005) Distribution of arsenic compound in *Mytilus galloprovincialis* of the Venice Lagoon, *Science of the Total Environment* 15: 267-277

Atay D, Pulatsü S (2000) Su Kirlenmesi ve Kontrolü. AÜ. Ziraat Fakültesi Yayın No: 1513, Ankara, s-292

Ballesteros ML, Durando PE, Nores ML, Díaz MP, Bistoni MA, Wunderlin DA (2009) Endosulfan induces changes in spontaneous swimming activity and acetylcholinesterase activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Environmental Pollution* 157: 1573-1580

Barañano DE, Snyder SH (2001) Neural roles for heme oxygenase: Contrasts to nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 10996-11002

Berg V, Erikson GS, Iverson PE (1997) Strategies for monitoring of contaminants in marine organisms in Norwegian harbours and fjords. *Norwegian State Food Control Reports* 94: 300-321

Berntssen MHG, Aatland A, Handy RD (2003) Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behaviour in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicology* 65: 55-72

Biswas AK, Seoka M, Takii K, Maita M, Kumai H (2005) Stress response of red sea bream *Pagrus major* to acute handling and chronic photoperiod manipulation. *Aquaculture* 252: 566-572

Boran H, Altınok İ, Çapkin E (2010) Histopathological changes induced by maneb and carbaryl on some tissues of rainbow trout (*O. mykiss*). *Tissue and Cell* 42: 158-164

Bouchard VJ, Rouleau M, Poirier GG (2003) PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Experimental Hematology* 31: 446-454

Brawer JR, McCarthy GF, Gornitsky M, Frankel D, Mehindate K, Schipper HM (1998) Mercuric chloride induces a stress response in cultured astrocytes characterized by mitochondrial uptake of iron. *Neurotoxicology* 19: 767-76

Buratta M, Castigli E, Sciacaluga M, Pellegrino RM, Spinozzi F, Roberti R, Corazzi L (2008) Loss of cardiolipin in palmitate-treated GL15 glioblastoma cells favors cytochrome c release from mitochondria leading to apoptosis. *Journal of Neurochemistry* 105: 1019-1031

Burkle A (2006) Poly(ADP-Ribosyl)ation, Landes Bioscience, Georgetown, TX, USA

Canlı M, Ay Ö, Kalay M (1998) Levels of heavy metals (Cd, Pb, Cu, Cr and Ni) in tissue of *Cyprinus carpio*, *Barbus capta* and *Chondrotoma regium* from the Seyhan river. Turkey. Turkish Journal of Zoology 22: 149-157

Carocci A, Stefania M, Giuseppe S (2014) GenchiMercury Toxicity and Neurodegenerative Effects. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 229: 1-18

Chen B, Tang L (2011) Protective effects of catalase on retinal ischemia/reperfusion injury in rats. Experimental Eye Research 93: 5

Chen C, Zhou Q, Liu S, Xiu Z (2011) Acute toxicity, biochemical and gene expression responses of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to polycyclic musks. Chemosphere 83(8): 1147-1154

Chol Ha H, Lynda D, Solomon H (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 dependence of stress-induced transcription factors and associated gene expression in glia. Proceedings of the National Academy of Sciences 99: 3270-3275

Ciardullo S, Aureli F, Coni E, Guandalini E, Iosi F, Raggi A, Rufo G, Cubadda F (2008) Bioaccumulation potential of dietary arsenic, cadmium, lead, mercury, and selenium in organs and tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a function of fish growth. Journal of Agricultural and Food Chemistry 9: 2442-2451

Çapkin E, Birincioğlu S, Altınok, İ (2009) Histopathological changes in rainbow trout (*O. mykiss*) after exposure to sublethal composite nitrogen fertilizers. Ecotoxicology and Environmental Safety 72: 1999-2004

Çelikkale MS (1988) İç Su Balıkları ve Yetiştiriciliği. Cilt 1, K. T. Ü. Yayın No:124: 419, Trabzon

Dai CL, Tang S, Li J, Xiao X (2014) Colistin-induced nephrotoxicity in mice involves the mitochondrial, death receptor, and endoplasmic reticulum pathways. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 58: 7

D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I (1999) Poly(ADP-Ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. Biochemical Society 342: 249-268

Dantzer F, Valérie Schreiber, Claude Niedergang (1999) Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair. Biochimie 81: 69-75

Dautremepuits C, Betoulle S, Vernet G (2003) Stimulation of antioxidant enzymes levels in carp (*Cyprinus carpio* L.) infected by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). *Fish and Shellfish Immunology* 15: 467-471

De Conto Cinier C, Ramel, MP, Faure R, Garin D, Bouvet Y (1999) Kinetics of Cd accumulation and elimination in Carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology* 122: 345-352

Dorval J, Hontela A (2003) Role of Glutathione Redox Cycle and Catalase in Defense Against Oxidative Stress Induced by Endosulfan in Adrenocortical Cells Of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology And Applied Pharmacology* 192: 191-200

Dönmez AE, Kalay M, Özkan F, Koyuncu CE (2006) FMC ve malahat yeşili sağaltım dozlarının *Oreochromis niloticus*'un bazı kan parametrelerinde meydana getirdiği değişimler. *Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Dergisi* 23: 61-64

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology & Medicine* 11: 81-128

Fang Q, Shi X, Zhang L, Wang Q, Wang X, Guo Y, Zhou B (2015) Effect of titaniumdioxide nano particles on the bioavailability, metabolism, and toxicity of pentachlorophenol in zebrafish larvae. *Journal of Hazardous Materials* 4: 283

Flos RA, Caritat A, Balasch J (1979) Zinc content in organs of dogfish subjected to sublethal experimental aquatic zinc pollution. *Comparative Biochemistry and Physiology* 63: 77-81

Fuku X, Iftikar F, Hess E, Iwuoha E, Baker P (2012) Cytochrome c biosensor for determination of trace levels of cyanide and arsenic compounds. *Analytica Chimica Acta* 730: 49-59

Gagné F, Marion M, Denizeau F (1990) Metallothionein induction and metal homeostasis in rainbow trout hepatocytes exposed to mercury. *Toxicology Letters* 51: 99-107

García-Medina S, Galar-Martínez M, Gómez-Oliván LM, Ruiz-Lara K, Islas-Flores H, Gasca-Pérez E (2017) Relationship between genotoxicity and oxidative stress induced by mercury on common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *Aquatic Toxicology* 192: 207-215

Geldiay R, Balık S (1999) Türkiye Tatlı Su Balıklar. *Ege Ü. Su Ürünleri Fakültesi, Yay. No: 46, Der. Kit. Diz. No: 16. İzmir, s 532*

Geldiay R, Balık, S (1996) Türkiye Tatlısu Balıkları Ders Kitabı. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi. Ders Kitabı No: 16, İzmir, s 49

Geldiay SL, Kocataş, A (1988) Deniz Biyolojisine Giriş. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi kitaplar serisi No:31, İzmir, s 459

Giordano R, Arata P, Rinaldi S, Ciaralli L, Giani M, Rubbiani M, Costantini S (1989) Mercury, cadmium and lead levels in marine organisms (*Mytilus galloprovincialis*) collected along the Italian coasts. *Annali Dell Istituto Superiore Di Sanita* 25: 511-516

Gonzalez P, Dominique Y, Massabuau JC, Boudou A, Bourdineaud JP (2005) Comparative effects of dietary methylmercury on gene expression in liver, skeletal muscle, and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science & Technology* 39: 3972-3980

Guevara SR, Bubach D, Vigliano P, Lippolt G, Arribere M (2004) Heavy metal and other trace elements in native mussel *Diplodon chilensis* from Northern Patagonia Lakes, Argentina. *Biological Trace Element Research* 102: 245-263

Güven KC, Topcnoğlu S (1991) Pollution monitoring of the black sea by marine organism, the black sea symposium, proceedings of the ecological problems and economical prospects. *The Black Sea* 16: 109 -120

Grune T, Berger MM (2007) Markers of oxidative stress in ICU clinical settings: present and future. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 10: 712-717

Habashi F (1997) "Handbook of Extractive Metallurgy", Volume II, WILEY-VCH, Germany, pp 142-145

Hageman GJ, Stierum RH (2001) Niacin, poly(ADP-ribose) polymerase-1 and genomic stability. *Mutation Research* 475: 45-56

Halliwell B, Gutteridge JMC (1989) *Free radicals in biology and medicine*. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press pp 188-196

Hammond AL (1971) Mercury in the environment: Natural and human factory. *Science* 171: 788-789

Henle K (1981) A unique case of malformations in a natural population of the green toad (*Bufo viridis*) and its meaning for environmental politics. *British Herpetological Society Bulletin* 4: 48-49

Hughes GM, Biro P (1993) Swimming performance of rainbow trout following exposure and recovery from the pyrethroid S-deltamethrin. *Acta Biologica Hungarica* 44: 231-241

Hurst TP, Kay BH, Ryan P.A, Brown MD (2007) Sublethal effects of mosquito larvicides on swimming performance of larvivorous fish *Melanotaenia duboulayi* (Atheriniformes: *Melanotaeniidae*). *Journal of Economic Entomology* 100: 61-65

Jensen S, Jernelöv A (1969) Biological methylation of mercury in aquatic organisms. *Nature* 6: 753-754

Ji Y, Tulin AV (2010) The roles of PARP1 in gene control and cell differentiation. *Current Opinion in Genetics & Development* 20: 512-518

Kagan VE, Borisenko GG, Tyurina YY, Tyurin VA, Jiang J, Potapovich AI, Kini V, Amoscato AA, Fujii Y (2004) Oxidative lipidomics of apoptosis: redox catalytic interactions of cytochrome c with cardiolipin and phosphatidylserine. *Free Radical Biology and Medicine* 37: 1963-1985

Kalay M, Karataş S (1999) Kadmiyumun *Tilapia nilotica*'da kas, beyin ve kemik (omurga kemiği) dokularındaki birikimi. *Turkish Journal of Zoology* 23: 985-991

Karahan B (1991) Rasyonla Alınan Bakımı (Cu) Sazanların (*Cyprinus carpio* L.) Dokularda Birikimi, Büyüme ve Üreme Özelliklerine Etkisi Üzerine Bir Araştırma. Doktora Tezi, Ank.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, s 127

Kasai H (1997) Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutation Research* 387: 147-163

Katayama Y, Inaba T, Nito C, Ueda M, Katsura K (2014) Neuroprotective effects of erythromycin on cerebral ischemia reperfusion-injury and cell viability after oxygen-glucose deprivation in cultured neuronal cells. *Brain Research* 1588: 159-167

Kavitha P, Rao JV (2008) Toxic effects of chlorpyrifos on antioxidant enzymes and target enzyme acetylcholinesterase interaction in mosquito fish, *Gambusia affinis*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 26: 192-198

Kayhan FE (2007) Mercury levels of Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). Bosphorus, İstanbul, Turkey. *Journal of Biological Sciences* 7: 369-373

Koh DW, Dawson TM, Dawson VL (2005) Mediation of cell death by Poly(ADPRibose) Polymerase-1. *Pharmacological Research* 52: 5-14

Koç C, Yılmaz E (2019) Türkiye’de Büyük Menderes Nehri’nde Ağır Metal Kirliliği Üzerine Bir Çalışma. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi* 15: 571-578

Laudisi F (2010) New Insights into Immune Regulation: PARP-1 Controls the Development of Regulatory T Cells. University of Rome, Yüksek Lisans Tezi.

Lee CY, Hsu YC, Wang JY, Chen CC, Chiu JH (2008) Chemopreventive effect of selenium and Chinese medicinal herbs on N-nitrosobis(2-oxopropyl) amine-induced hepatocellular carcinoma in Syrian hamsters. *Liver International* 28: 841-855

Levesque HM, Moon TW, Campbell PCG, Hontela A (2002) Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of Yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field. *Aquatic Toxicology* 60: 257-267

Li Z, Velisek J, Grabic R, Li P, Kolarova J, Randak T (2011) Use of hematological and plasma biochemical parameters to assess the chronic effects of a fungicide propiconazole on a freshwater teleost. *Chemosphere* 83: 572-578

Li Z, Zlabeka V, Grabica R, Lia P, Machovaa J, Veliseka J, Randak T (2010) Effects of exposure to sublethal propiconazole on the antioxidant defense system and Na⁺-K⁺-ATPase activity in brain of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology* 98: 297-303

Liu Q, Basu N, Goetz G, Jiang N, Hutz RJ, Tonellato PJ, Carvan MJ (2013) Differential gene expression associated with dietary methylmercury (MeHg) exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology* 22: 740-751

Livingstone DR (2001) Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin* 42: 656-666

Lloyd R (1992) *Pollution and Freshwater Fish*. Fishmg News Books Sci. Pul. Ltd. Londra

Łuczyńska J, Paszczyk B, Łuczyński MJ. (2018) Fish as a bioindicator of heavy metals pollution in aquatic ecosystem of Pluszne Lake, Poland, and risk assessment for consumer's health. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 153: 60-67

Ma J, Li S, Zhu L, Guo S, Yi X, Cui T, He Y, Chang Y, Liu B, Li C, Jian Z (2018) Baicalein protects human vitiligo melanocytes from oxidative stress through

activation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2) signaling pathway *Free Radic. Biology and Medicine* 129: 492-503

Malanga M, Althaus FR (2005) The role of poly(ADP-ribose) in the DNA damage signaling network. *Biochemistry and Cell Biolog* 83: 354-364

Malfa GA, Tomasello B, Sinatra F, Villaggio G, Amenta F, Avola R, Renis M (2014) "Reactive" response evaluation of primary human astrocytes after methylmercury exposure. *Journal of Neuroscience Research* 92: 95-103

Malhilakath MV, Pereira C, Grau EG, Iwama GK (1997) Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comparative Biochemistry and Physiology* 1: 89-95

Mance G (1987) Pollution threat of heavy metals in aquatic environment. Elsevier. London

Masutani C, Kusumoto R, Yamada A, Dohmae N, Yokoi M, Yuasa M, Araki M, Iwai S, Takio K, Hanaoka F (1999) The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta. *Nature* 399: 700-704

Mercan U (2004) Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 15: 91-96

McElwee MK, Song MO, Freedman JH (2009) Copper activation of NF-kappaB signaling in HepG2 cells. *Journal of Molecular Biology* 393: 1013-1021

Micillo A, Vassallo MRC, Cordeschi G, D'Andrea S, Necozone S, Francavilla F, Francavilla S, Barbonetti A (2016) Semen leukocytes and oxidativedependent DNA damage of spermatozoa in male partners of subfertile couples with no symptoms of genital tract infection. *Andrology* 4: 808-815

Mieiro CL1, Ahmad I, Pereira ME, Duarte AC, Pacheco M (2010) Antioxidant system breakdown in brain of feral golden grey mullet (*Liza aurata*) as an effect of mercury exposure. *Ecotoxicology* 19: 1034-1045

Mitchelmore CL, Chipman JK (1998) DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research* 399: 135-147

Mohamadin AM, Sheikh B, Abd El-Aal AA, Elberry AA, Al-Abbasi FA, (2010) Protective Effects of *Nigella sativa* Oil on Propoxur-Induced Toxicity and Oxidative Stress in Rat Brain Regions. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 98: 128-134

Monteiro DA, Rantin FT, Kalinin AL (2010) Inorganic mercury exposure: toxicological effects, oxidative stress biomarkers and bioaccumulation in the tropical freshwater fish *Brycon amazonicus* (Spix and Agassiz, 1829). *Ecotoxicology* 19 (1): 105-123

Moore JW, Ramamoorthy S (1984) *Heavy Metals in Natural Waters. Applied Monitoring and Impact Assessment*. Springer-Verlag, New York, p 261

Morales AE, Pèrez-Jimènez A, Hidalgo MC, Abellán E, Gabriel CG (2004) Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. *Comparative Biochemistry and Physiology* 139: 153-161

Naija A, Kestemont P, Chénais B, Haouas Z, Blust R, Helal AN, Marchand J (2018) Effects of Hg sublethal exposure in the brain of peacock blennies *Salaria pavo*: Molecular, physiological and histopathological analysis. *Chemosphere* 193: 1094-1104

Nwani CD, Lakra WS, Nagpure NS, Kumar R, Kushwaha B, Srivastava SK (2010) Toxicity of the Herbicide Atrazine: Effects on Lipid Peroxidation and Activities of Antioxidant Enzymes in the Freshwater Fish *Channa Punctatus* (Bloch). *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7: 3298-3312

Obulesu M, Rao DM (2010) DNA damage and impairment of dna repair in alzheimer's disease. *International Journal of Neuroscience* 120: 397-403

OECD (1992) *Guideline for the testing of chemicals: (Part 203) Organisation for Economic Co-operation and Development*. Adopted by the Council

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Analyses of Biochemichal* 95: 351-358

Oliveira Ribeiro CA, Pelletier E, Pfeiffer WC, Rouleau C (2000) Comparative uptake, bioaccumulation, and gill damages of inorganic mercury in tropical and nordic freshwater fish. *Environmental Research* 83(3): 286-92

Onouchi H, Ishii T, Miyazawa M, Uchino Y, Yasuda K, Hartman PS, Kawai K, Tsubota K, Ishii N (2012) Mitochondrial superoxide anion overproduction in tet-mev-1 transgenic mice accelerates age- dependent corneal cell dysfunctions. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53 (9): 5780-5787

Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S (2002) Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 1259-1263

Öztürk M (1991) Sinop İli İç ve Dış Koy ve Limanlarında Yayılım Gösteren İki Omurgasız ve İki Alg Türünde Bazı Ağır Metallerin Birikim Düzeyleri Üzerine Bir Araştırma. Dotor Tezi, Ond. May. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, s 84

Öztürk M (1994) Sinop'un koy ve limanlarında yayılım gösteren *Patella coerulea* L. ve *Enteromorpha linza* (L.) J. agardh türlerindeki ağır metal düzeyleri. *Turkish Journal of Biology* 18: 195-211

Öztürk M, Bat L, Öztürk M (1995) Altmkaya Barajında (Samsun) yaşayan *Cyprinus Carpio* L., 1758 türünün çeşitli organ ve dokularındaki bazı ağır metallerin birikimi. II. Ulus. EkoL ve Çev. Kong, 650-667, Ankara

Pasdois P, Parker JE, Griffiths EJ, Halestrap AP (2011) The role of oxidized cytochrome c in regulating mitochondrial reactive oxygen species production and its perturbation in ischaemia. *Biochemical Journal* 436: 493-505

Peralta-Leal A, Rodríguez-Vargas JM, Aguilar-Quesada R (2009) PARP inhibitors: New partners in the therapy of cancer and inflammatory diseases. *Free Radical Biology & Medicine* 47: 13-26

Pereira P, Puga S, Cardoso V, Pinto-Ribeiro F, Raimundo J, Barata M, Pousro-Ferreira P, Pacheco M., Almeida A (2016) Inorganic mercury accumulation in brain following waterborne exposure elicits a deficit on the number of brain cells and impairs swimming behavior in fish (white seabream-*Diplodus sargus*). *Aquatic Toxicology* 170: 400-412

Pirrone N, Mason R (2009) Mercury fate and transport in the global atmosphere. Emission, measurements and models. Elsevier p 637

Sağlamtimur B, Cicik B, Erdem, C (2003) Effects of different concentrations of Cu alone and Cu+Cd mixture on the accumulation of Cu in the gill, liver, kidney and muscle tissues of *Oreochromis niloticus*. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 27: 813-820

Sakaida T, Kimura T, Yamasaki Y, Fukumoto K, Watanabe M, Aoyama K (2005) Cytochrome c is a possible new marker for fulminant hepatitis in humans *Journal of Gastroenterology* 40: 179-185

Schipper HM, Song W, Zukor H, Hascalovici JR, Zeligman D (2009) Heme oxygenase-1 and neurodegeneration: Expanding frontiers of engagement. *Journal of Neurochemistry* 110: 469-485

Schreck CB, Conteras-Sanchez W, Fitzpatrick MS (2001) Effects of stress on fish reproduction, gamete quality and progeny. *Aquaculture* 197: 3-24

Sepici DA, Benli AC, Selvi M, Sarıkaya R, Sahin D, Ozkul A, Erkoç F (2009) Sublethal Cyfluthrin Toxicity to Carp 66 (*Cyprinus Carpio* L.) Fingerlings: Biochemical, Hematological, Histopathological Alterations. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 1433-1439

Sevcikova M, Modra H, Blahova J, Dobsikova R, Kalina J, Zitka O, Kizek R, Svobodova Z (2015) Factors Affecting Antioxidant Response in Fish from a Long-term Mercury-Contaminated Reservoir. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 69(4): 431-439

Shoeb M, Ansari NH, Srivastava SK, Ramana KV (2014) 4-hydroxynonenal in the pathogenesis and progression of human diseases. *Current Medicinal Chemistry* 21(2): 230-237

Simmons SO, Fan CY, Yeoman K, Wakefield J, Ramabhadran R (2011) NRF2 Oxidative Stress Induced by Heavy Metals is Cell Type Dependent. *Current Chemical Genomics and Translational Medicine* 5: 1-12

Small BC (2004) Effect of isoeugenol sedation on plasma cortisol, glucose and lactate dynamics in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) exposed to three stressors. *Aquaculture* 238: 469-481

Soldani C, Scovassi AI (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: An update. *Apoptosis* 7: 321-328

Takahashi T, Fujimura M, Koyama M, Kanazawa M, Usuki F, Nishizawa M, Shimohata T (2017) Methylmercury Causes Blood-Brain Barrier Damage in Rats via Upregulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression. *PLoS ONE* 12(1): e0170623

Tayman C, Çekmez F, Kafa ĞM, Canpolat FE, Çetinkaya M, Tonbul A, Uysal S, Tunç T, Sarıcı SÜ (2013) Protective Effects of *Nigella sativa* Oil in Hyperoxia-Induced Lung Injury. *Archivos De Bronconeumologia* 49 (1): 15-21

Tenhunen R, Marver HS, Schmid R (1968) The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. Proceedings of the National Academy of Sciences 61: 748-755

Timbrell JA (2002) Introduction to Toxicology, third ed. Taylor and Francis, London

Toyokuni S, Iwasa Y, Kondo S, Tanaka T, Ochi H, Hiai H (1999) Intranuclear distribution of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: an immunocytochemical study. Journal of Histochemistry and Cytochemistry 47(6): 833-836

Trenzado C, Carmen HM, Gallego MG, Morales AE, Furne M, Domezain A, Domezain J, Sanz A (2006) Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccarii* and trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. Aquaculture 254: 758-767

Uçar A, Atamanalp M (2010) Kıyusal kirlenmenin balıklar üzerine etkileri. Türkiye Kıyı Sempozyumu, Trabzon, s 489-469

USEPA (1999) LC50 software program, version 1.00. Center for Exposure Assessment Modeling (CEAM) Distribution Center

Uysal H, Tuncer S (1984) A comparative study on the heavy metal concentrations in some fish species and in the sediments from İzmir bay. VII Joun. E'tud. Environmental Pollution, 275-284

Uysal H, Tuncer S, Yaramaz Ö (1986) Ege kıyılarındaki yenebilen organizmalarda ağır metallerin karşılaştırmalı olarak araştırılması. Çev. 86 Sempozy, 2-5 Haz, İzmir

Ünlü E, Cengiz Eİ, Akba O (1995) Dicle nehrindeki Capoeta trutta Heckel, 1843'da ağır metal birikimi. II. Ulus. Ekol, ve Çev. Kong, Ankara s 639-649

Ünsal M (1998) Kirlilik Deneyleri (Yöntem ve Sonuçların değerlendirilmesi). T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, seri A, yayın No: 11, Bodrum s 168

Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakisa C (2009) 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. Journal of Environmental Science and Health 27(2): 120-139

Verep B, Bešli ES, Altinok I, Mutlu C (2007) Assessment of mercuric chloride toxicity on rainbow trouts (*Oncorhynchus mykiss*) and chubs (*Alburnoides bipunctatus*). Pakistan Journal of Biological Sciences 10(7): 1098-1102

Vieira JCS, Braga CP, Oliveira G, Padilha CDCF, Moraes PM, Zara LF, Leite AL, Buzalaf MAR, Padilha PM (2018) Mercury Exposure: Protein Biomarkers of Mercury Exposure in Jaraqui Fish from the Amazon Region. Biological Trace Element Research 183(1): 164-171

Wang B, Feng L, Jiang WD, Wu P, Kuang SY, Jiang J, Tang L, Tang WN, Zhang YA, Liu Y, Zhou XQ (2015) Copper-induced tight junction mRNA expression changes, apoptosis and antioxidant responses via NF- κ B, TOR and Nrf2 signaling molecules in the gills of fish: preventive role of arginine. Aquatic Toxicology 158: 125-137

Wang J, Li M, Shi Z, Li N, Gu Z (2002) Direct electrochemistry of cytochrome c at a glassy carbon electrode modified with single-wall carbon nanotubes. Analytical Chemistry 74: 1993-1997

Wang XG, Wang ZQ, Tong WM (2007) PARP1 Val762Ala polymorphism reduces enzymatic activity. Biochemical and Biophysical Research Communications 354(1): 122-126

Wang Y, Dawson VL, Dawson TM (2009) Poly(ADP-ribose) Signals to Mitochondrial AIF: A Key Event in Parthanatos. Experimental Neurology 218(2): 193-202

Yıldız N, Bircan H (1991) Araştırma ve Deneme Metodları. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları. No:305

Yonar SM, Yonar ME, Yöntürk Y (2014) Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792)'nda Curcuminin Bazı Antioksidan Parametreler Üzerine Etkisi. Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi 26(1): 53-57

Zeng L, Zheng JL, Wang YH, Xu MY, Zhu AY, Wu CW (2016) The role of Nrf2/Keap1 signaling in inorganic mercury induced oxidative stress in the liver of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. Ecotoxicology and Environmental Safety 132: 345-352

Zheng JL, Yuan SS, Wu CW, Lu ZM (2016) Acute exposure to waterborne cadmium induced oxidative stress and immunotoxicity in the brain, ovary and liver of zebrafish (*Danio rerio*). Aquatic Toxicology 180: 36-44

Zheng JL, Yuan SS, Wu CW, Lu ZM, Zhu AY (2017) Circadian time-dependent antioxidant and inflammatory responses to acute cadmium exposure in the brain of zebrafish. *Aquatic Toxicology* 182: 113-119

Zolfaghari G (2018) Risk assessment of mercury and lead in fish species from Iranian international wetlands. *MethodsX* 5(5): 438-447

Zhou B, Wu LJ, Tashiro S, Onodera S, Uchiumi F, Ikejima T (2006) Silibinin Protects Rat Cardiac Myocyte from Isoproterenol-Induced DNA Damage Independent on Regulation of Cell Cycle. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(9): 1900-1905

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Van'ın Çaldıran ilçesinde doğdu. İlkokulu Çaldıran Atatürk ilkokulunda, ortaokul ve lise öğrenimini de Van İmam Hatip Lisesinde tamamladı. 2001 yılında kazandığı Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesinden 2005 yılında mezun oldu. 2006-2010 yılları arasında Olur İlçe Tarım Müdürlüğü'nde Ziraat Mühendisi olarak görev yaptıktan sonra 2010 yılında Bingöl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü'ne Araştırma Görevlisi olarak atandı. Halen bu görevinde çalışmaya devam etmektedir. Evli ve üç çocuk babasıdır.