

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

**ARSENİK TOKSİSİTESİNE MARUZ KALAN YAVRU ALABALIKLARIN
OKSİDATİF STRES DURUMU VE APOPTOTİK MARKIRLARININ
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Hasan SAÇ
DANIŞMAN: Doç. Dr. Aslı ÇİLİNGİR YELTEKİN

VAN-2022

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

**ARSENİK TOKSİSİTESİNE MARUZ KALAN YAVRU ALABALIKLARIN
OKSİDATİF STRES DURUMU VE APOPTOTİK MARKIRLARININ
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Hasan SAÇ

Bu çalışma YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından FYL-2021-9693 No'lu proje olarak desteklenmiştir.

VAN-2022

KABUL VE ONAY SAYFASI

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Doç. Dr. Aslı ÇİLİNGİR YELTEKİN danışmanlığında, Hasan SAÇ tarafından sunulan “Arsenik Toksisitesine Maruz Kalan Yavru Alabalıkların Oksidatif Stres Durumu ve Apoptotik Markırlarının İncelenmesi” isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 04/07/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Leyla MİS

İmza:

Üye: Doç. Dr. Fikret
TÜRKAN

İmza:

Üye: Doç. Dr. Aslı ÇİLİNGİR
YELTEKİN

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../.../..... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır. Enstitü Müdürü

İmza
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Hasan SAÇ



ÖZET

ARSENİK TOKSİSİTESİNE MARUZ KALAN YAVRU ALABALIKLARIN OKSİDATİF STRES DURUMU VE APOPTOTİK MARKIRLARININ İNCELENMESİ

SAÇ, Hasan

Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Aslı ÇİLİNGİR YELTEKİN

Temmuz 2022, 99 Sayfa

Arsenik, Dünya'da en bol bulunan elementlerden biridir. Metaloid olarak adlandırılan arsenik, birçok endüstride hammadde olarak kullanılmaktadır. Arsenikli suların sulama amaçlı kullanılması tarımda ve özellikle gıdada ciddi riskler oluşturmaktadır. Arsenik başta insanlar olmak üzere birçok canlı organizmayı olumsuz yönde etkilemektedir. Özellikle yeraltı sularına karışan arsenik canlı metabolizmasında çok ciddi sağlık sorunlarına neden olabilmektedir. Arsenik, vücuda alındığında öncelikli olarak sinir sistemini etkiler ve uzun süre maruz kalındığında dokularda birikerek toksik etki gösterir. Özellikle sistein içeren protein açısından zengin olan dokularda daha fazla birikim olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada model organizma olarak yavru alabalıklar kullanılarak insan ve diğer omurgalıların arseniğe maruziyeti durumunda ortaya çıkacak etkilerin araştırılması amaçlanmıştır. Arseniğe maruz kalan yavru alabalıkların beyin dokusundaki NK-FB, TNF- α , IL-6, NRF-2, GSH, Kaspaz-3, MDA, AChE, CAT, GSH-Px, SOD, 8OHdG seviyeleri, oksidatif stres sonrası lipid peroksidasyonu ve DNA hasarı incelenmiştir.

Çalışmamızda yavru alabalıklara (*Oncorhynchus mykiss*) 96 saat boyunca 25, 50, 75 mg/L konsantrasyonlarında arsenik (NaAsO₂) uygulaması yapılmıştır. Maruziyet sonrası balıkların beyin dokuları alınıp homojenize edilmiştir. Yavru alabalıkların beyin dokusundan elde edilen süpernatantlarda SOD, GSH-Px, CAT ve MDA düzeyleri spektrofotometrik yöntemler ile belirlenmiştir. NF-kB, TNF- α , IL-6, NRF-2, GSH, Kaspaz-3, AChE ve 8-OHdG düzeyleri ise ELISA kit kullanılarak belirlenmiştir.

Çalışma sonrasında balığın beyin dokusu incelendiğinde NF-kB, TNF- α , IL-6, NRF-2, Kaspaz-3, MDA ve 8-OHdG düzeylerinin arttığı ve GSH, CAT, SOD, AChE ve GSH-Px düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir. Uygulama sonrası balıkların beyin dokularında arsenik birikmesi sonucu oksidatif stresin olduğu gözlemlendi. Bu oksidatif stresin kaynağı olan serbest radikallerin dokuda birikmesi ve lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA düzeylerinin artmasıyla bazı antioksidan belirteçlerin düzeylerinin arttığı ve DNA hasarının bir göstergesi olan 8-OHdG düzeyinin de arttığı görülmüştür.

Anahtar Kelime: Arsenik, Oksidatif stres, NF-KB, TNF- α , IL-6, NRF-2, GSH, Kaspaz-3, MDA, AChE, CAT, GSH-Px, SOD, 8OHdG.



ABSTRACT

INVESTIGATION OF OXIDATIVE STRESS AND APOPTOTIC MARKERS OF CHILD TROUT EXPOSED TO ARSENIC TOXICITY

SAÇ, Hasan

MSc., Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Aslı ÇİLİNGİR YELTEKİN

Arsenic is one of the most abundant elements on Earth. Arsenic, called metalloid, is used as a raw material in many industries. It negatively affects many living organisms, especially humans. Especially arsenic mixed with groundwater can cause very serious health problems. Arsenic accumulates in the hair, nails and skin, which are rich in chronic intake of cysteine-containing protein. Most of this accumulation takes place in the lungs. In this study, NF- κ B, TNF- α , IL-6, NRF-2, GSH, Caspase-3, MDA, AChE, CAT, GSH-Px, SOD, 8OHdG levels, lipid levels after oxidative stress in the brain tissue of fry trout exposed to arsenic. Peroxidation and DNA damage will be examined.

Thirty-two juvenile trout *Oncorhynchus mykiss* were used in our study. The supplied fry trout (80-100 g) were randomly distributed into 8 fiberglass aquariums (300 L). A week was waited for the adaptation of the fish. 25, 50, 75 mg/L concentrations of arsenic-containing NaAsO₂ was added to the aquariums of the arsenic-treated groups, ensuring that their concentrations did not change for 96 hours.

After arsenic application, SOD and GSHPx levels in the brain tissue of fry trout were determined by UV kit, and CAT and MDA levels were determined by spectrophotometric methods. NF- κ B, TNF- α , IL-6, NRF-2, GSH, Caspase-3, AChE and 8-OHdG levels were determined using an ELISA kit prepared for fish.

When the brain tissue of the fish was examined after the study, it was determined that NF- κ B, TNF- α , IL-6, NRF-2, Caspase-3, MDA and 8OHdG levels increased and GSH, CAT, SOD, AChE and GSH-Px levels decreased. It was observed that oxidative stress occurred as a result of arsenic accumulation in the brain tissues of the fish after the application. It has been observed that with the accumulation of free radicals, which are the source of this oxidative stress, in the tissue and the increase in MDA levels, which is an indicator of lipid peroxidation, the levels of some antioxidant markers increase and the level of 8-OHdG, which is an indicator of DNA damage, also increases.

Keywords: Arsenic, Oxidative stress, NF- κ B, TNF- α , IL-6, NRF-2, GSH, Caspase-3, MDA, AChE, CAT, GSH-Px, SOD, 8OHdG.



ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezimi yöneten, tez konumun belirlenmesinden başlayarak çalışmamın her aşamasında yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm, saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Aslı ÇİLİNGİR YELTEKİN'e sonsuz şükranlarımı sunarım.

Balıkların temin edilmesini sağlayan Van ili Çatak ilçesinde bulunan Önem Alabalık üretim tesisi çalışanları ve işletme sahibi Tefik BUDAK Bey'e, balıkların adaptasyonu, yemlenmesi ve uygulama için bize destek sağlayan Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Su Ürünleri Temel Bilimleri Bölümüne, numunelerin hazırlanması ve analizlerin yapılmasında laboratuvarı kullanabilmemizi sağlayan Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümüne ve mali destek sağlayan Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında beni her konuda destekleyen çalışma arkadaşlarım ve değerli hocalarıma çok teşekkür ederim.

2022
Hasan SAÇ

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Türkiye’de Su Ürünleri	4
1.1.1. Alabalık Türleri ve Özellikleri	6
1.2.Arsenik.....	7
1.2.1. Endüstride Arsenik Kullanımı.....	10
1.3.Antioksidanlar.....	11
1.3.1 TNF- α (Tümör Nekroz Faktör Alfa).....	11
1.3.2 IL-6 (İnterlökin-6).....	12
1.3.3. NRF-2 (Nükleer Faktör Eritroid-2).....	13
1.3.4. GSH (Glutasyon)	14
1.3.5. Kaspaz-3.....	15
1.3.6. MDA (Malondialdehit)	16
1.3.7. NF-KB (Nükleer Faktör Kappa-B)	17
1.3.8. Asetilkolinesteraz (AChE)	18
1.3.9. Katalaz (CAT).....	19
1.3.10. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)	20
1.3.11. Süperoksit Dismutaz (SOD).....	20
1.4. DNA Hasarı	21
2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ	24
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	31
3.1. Materyal	31
3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	34
3.3. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler	34
3.4. Yöntem.....	35
3.4.1. Numunelerin Analize Hazırlanması	35

3.4.2. Doku Homojenatının Hazırlanması.....	35
3.4.3. Malondialdehit (MDA) Ölçümü.....	36
3.4.5. TNF- α düzeylerinin ölçümü.....	38
3.4.6. GSH düzeyinin ölçülmesi	39
3.4.7. İnterlökin-6 düzeyinin ölçülmesi	40
3.4.8. NF-kB düzeyinin ölçülmesi	41
3.4.9. NRF-2 düzeyinin ölçülmesi	42
3.4.10. Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi tayini	43
3.4.11. Katalaz (CAT) enzim aktivitesinin tayini	45
3.4.12. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktivitesi tayini.....	46
3.4.13. 8-Hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) düzeyinin belirlenmesi.....	47
3.4.14. Asetilkolinesteraz aktivite analizi	48
4. BULGULAR	50
4.1. NF-kB aktivitesi sonuçları	50
4.2. TNF- α aktivitesi sonuçları	51
4.3. IL-6 aktivitesi sonuçları	51
4.4. NRF-2 aktivitesi sonuçları	52
4.5. GSH aktivitesi sonuçları	53
4.6. Kaspaz-3 aktivitesi sonuçları	53
4.7. MDA aktivitesi sonuçları.....	54
4.8. AChE enzim aktivitesi sonuçları	55
4.9. Katalaz enzim aktivitesi sonuçları	56
4.10. Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi sonuçları	56
4.11. Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi sonuçları.....	57
4.12. 8OHdG düzeyi sonuçları	58
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	79



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Gökkuşığı alabalığı <i>Oncorhynchus mykiss</i>	5
Şekil 3.1. Kontrol grubu yavru alabalıklar.....	32
Şekil 3.2. Arsenik uygulanmış birinci, ikinci ve üçüncü grup yavru alabalıklar.....	33
Şekil 3.3. Anestezi sonrası yavru alabalık görünümü.....	34
Şekil 3.4. Yavru alabalıkların iç organları görünümü.....	34
Şekil 3.5. Doku Lipid Peroksidasyonu Ölçümü	37
Şekil 3.6. Caspaz -3 standart grafiği	39
Şekil 3.7. TNF- α standart grafiği	40
Şekil 3.8. GSH standart grafiği	41
Şekil 3.9. IL-6 standart grafiği	42
Şekil 3.10. NF-kB standart grafiği	43
Şekil 3.11. NRF-2 standart grafiği	44
Şekil 4.1. Gökkuşığı alabalığı beyin dokusundaki NF-kB aktivite düzeylerinin değişimi.....	51
Şekil 4.2. Gökkuşığı alabalığı beyin dokusundaki TNF- α aktivite düzeylerinin değişimi.....	52
Şekil 4.3. Gökkuşığı alabalığı beyin dokusundaki IL-6 aktivite düzeylerinin değişimi.....	53
Şekil 4.4. Gökkuşığı alabalığı beyin dokusundaki NRF-2 aktivite düzeylerinin değişimi.....	54
Şekil 4.5. Gökkuşığı alabalığı beyin dokusundaki GSH aktivite düzeylerinin değişimi.....	55
Şekil 4.6. Gökkuşığı alabalığı beyin dokusundaki Caspaz-3 aktivite düzeylerinin değişimi.....	56
Şekil 4.7. Gökkuşığı alabalığı beyin dokusundaki MDA aktivite düzeylerinin değişimi.....	57

Şekil 4.8. Gökkuşığı alabalığı beyin dokusundaki AChE aktivite düzeylerinin değişimi.....	58
Şekil 4.9. Gökkuşığı alabalığı beyin dokusundaki CAT aktivite düzeylerinin değişimi.....	59
Şekil 4.10. Gökkuşığı alabalığı beyin dokusundaki GSH-Px aktivite düzeylerinin değişimi.....	60
Şekil 4.11. Gökkuşığı alabalığı beyin dokusundaki SOD aktivite düzeylerinin değişimi.....	61
Şekil 4.12. Gökkuşığı alabalığı beyin dokusundaki 8-OHdG aktivite düzeylerinin değişimi.....	62





SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklama
As (III)	Arsenit
As (V)	Arsenat
As	Arsenik
As⁺³	Arsenik
As⁺⁵	Arsenat
As₂S₃	Orpiment
AsS	Realgar
°C	Celsius
CAT	Katalaz
Cd	Kadmiyum
cm	Santimetre
CoAsS	Kobaltit
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
FeAsS	Arsenopirit
g	Gram
GPx	Glutasyon peroksidaz
GST	Glutasyon S-Transferaz
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
Hg	Civa
HgCl₂	Civa Klorür
KH₂PO₄	Mono Potasyum Fosfat
L	Litre
Lt	Litre
mg	Miligram
NiAsS	Nikolit
O²⁻	Süperoksit Anyonu

OH⁻	Hidroksil Anyonu
Pb	Kurşun
PbCl₂	Kurşun (II) Klorür
ppm	Parts per million
-SH	Sülfür grubu

Kısaltmalar

Açıklama

CAT	Katalaz
DMA	Dimetil Arsenik Asit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
GSH	Glutatyon
GSH-Px	Glutatyon Peroksidaz
GSSG	Okside Glutatyon
IL-6	İnterlökin-6
Keap1	Kelk Benzeri ECH ile İlişkili Protein 1
MDA	Malondialdehit
MMA	Monometil Arsenik Asit
NK-FB	Nükleer Faktör Kappa-B
nm	Nanometre
NRF-2	Nükleer Faktör Eritroid 2 İle İlişkili Faktör 2
pH	Power of Hydrohen
RO	Alkoksil Radikali
ROO	Peroksil Radikali
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süper Oksit Dismutaz
TBA	Tiobarbütirik Asit
TNF-α	Tümer Nekroz Faktör Alfa

1. GİRİŞ

Balık oldukça fazla protein içeriği nedeniyle toplum için önemli yiyecek kaynakları içinde üst sıralarda yer almaktadır. Toplumun gelir durumu düşük kesimi için fiyatı uygun olan kaliteli yüksek protein kaynağıdır. Bunun sonucunda balık ve balık ürünlerine olan talep giderek artmaktadır (Aydoğan ve ark., 2020).

Gelişmiş ülkelerde su ürünleri yetiştiriciliği, vatandaşlarının besin ihtiyacını gidermenin yanında istihdam, ticaret ve lokal kalkınmaya büyük katkılar sağladığı için önemli üretim sektörlerinden biridir (Elbek, 1981).

Alabalık yetiştiriciliği 19.yy'da doğadan alınan balıklardan yumurta çıkartılması ve yumurtaların insan eliyle döllmesi ile başlamıştır. Türkiye'de tatlı su balıkları içinde en fazla yeri tutan alabalık hem yetiştirilme hem de insanlar tarafından tercih edilme bakımından tuzlu su balıklarına göre önemli bir alternatif oluşturmaktadır. Döllenen yumurtaların çatlamasıyla ortaya çıkan larvalardan besin amaçlı tatlı su balığı elde etmek hedeflenir. Burada en önemli konu larvaların yüksek yaşama oranına ulaşılmasıdır (Korkmaz ve ark., 2008).

Tatlı su alabalıkları içerisinde en çok yetiştiriciliği yapılan özel bir tür olan gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'dir. Bu yaygın tür olan gökkuşuğu alabalığı buldukları çevre koşullarına son derece uyum sağlayabilir. Yapılan iyi yemleme sonucunda buldukları koşullarda oldukça fazla gelişme gösterir. Bunun yanında sağım, çoğaltma ve yumurtadan çıkan yavruların suni yemle beslenebilmesi ve geliştirilmesi işlemlerinin oldukça kolay olması nedeniyle oldukça ekonomiktir. Yetiştiriciliğinin ise 100 yılı aşkın zamandan beri yapıyor olması bu türün diğer alabalık türlerine göre daha fazla tercih edilmesinin nedenidir (Emre ve Kürüm, 1998).

Gökkuşuğu alabalığı genellikle 'salmonidler' veya alabalıklar olarak adlandırılır ve dünyada kültür üretimi en çok yapılan balıklardır (Yanık, 2009). Dünyada en çok yetiştirilen tatlı su balığı olan gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus Mykiss*) Türkiye'de de deniz ve iç sularda yetiştirilen balıklar arasında ilk sırayı alır (Baki ve ark., 2010). Türkiye'de çok fazla olmamakla birlikte bazı üretim hanelerde gökkuşuğu alabalığı yanında doğal alabalık üretimi de yapılmaktadır. Arz-Talep dengesine göre ortaya çıkan ürün çeşitliliği, işletmelerin buldukları fiziki şartlara

göre yeni türlerin de üretimini teşvik etmiştir. Bu sebeple gökkuşağı alabalıkları gibi doğal balıkların üretim verim özelliklerinin belirlenmesi, var olan türlerin çeşitliliği ve verimleri üzerine yapılan çalışmalara fayda sağlayacaktır (Baki ve ark., 2010).

Toksik özelliği olan Arsenik periyodik cetvelde VA grubunda bulunan metallere tepkimeye girdiğinde ametal, ametaller ile tepkimeye girdiğinde metal gibi davranan bir metalloiddir. Doğada en yaygın bulunan formları (+3) değerlikli arsenit ve (+5) değerlikli arsenattır. Element halindeki arsenik gri ve sarı kristaller halinde bulunmasının yanı sıra oksijen, klor veya kükürt ile bileşik oluşturmuş haline de rastlanır. Adı geçen elementlerle bileşik olan arsenik inorganik arsenik olarak bilinir. Organik halde bulunan arsenik ise karbon ve hidrojen ile bağlanmış halde bulunan arseniktir (Erdoğan, 2005).

Arsenik Dünya üzerinde en fazla bulunan elementlerden biridir. Metaloid olarak adlandırılan arsenik birçok endüstride hammadde olarak kullanılır. Başta insan olmak üzere birçok canlı organizmayı olumsuz yönde etkiler. Özellikler yeraltı sularına karışan arsenik çok ciddi sağlık sorunlarına neden olabilmektedir (Başkan ve Pala, 2009)

Topraktan gelen arsenik genellikle kükürt içeren minarellerde bulunur. Bu minareller orpiment (As_2S_3), realgar (AsS), arsenopirit ($FeAsS$), nikolit ($NiAsS$) ve kobaltit ($CoAsS$)'tir. Bir başka kaynak ise kömürdür. Kömürde ise ortalama 13mg/kg arsenik bulunabilmektedir. Madencilik sektöründe bakır, nikel ve kurşun minarellerinin ergitilmesi esnasında çok ciddi oranda arsenik açığa çıkmaktadır. Bu işlemler sırasında yaklaşık 62 000 ton arsenik yayılımı olduğu düşünülmektedir (Bissen, 2003).

Dünyada çoğu yerde içme sularına arsenik karışması nedeniyle birçok sağlık sorunu ortaya çıkmış ve bu sağlık sorunlarının önüne geçmek amacıyla Amerika Çevre Koruma Ajansı tarafından içilebilen sulardaki arsenik miktarı 0.05mg/L'den 0.01mg/L seviyesine çekilmiştir (Lee ve ark., 2003).

Deney hayvanları ile yapılan çoğu çalışma, serbest radikallerin hayvandaki hücreler üzerindeki toksik etkisini ve antioksidan enzimlerin bu etkiler üzerinde pozitif yöndeki iyileştirici etkilerini göstermiştir (Li ve ark., 2011).

Serbest radikaller ve bunların oluşumuna neden olan toksik maddeler, canlı hücrelerin DNA, protein, enzim, lipid, karbonhidrat ve diğer molekül gruplarıyla

Serbest radikaller ve bunların oluşumuna neden olan toksik maddeler, canlı hücrelerin DNA, protein, enzim, lipid, karbonhidrat ve diğer molekül gruplarıyla etkileşime girerek bunların metabolitik faaliyetlerini olumsuz yönde etkilemektedirler. Organizmada düşük miktarda ortaya çıkan bu negatif etkiler vücutta var olan antioksidan maddeler ve diğer enzimler ile bertaraf edilmektedir (Omata ve ark., 2010; Kumar ve ark., 2013). Programlı hücre ölümü olarak adlandırılan apoptozis dokuların dengesinin korunmasında çok büyük role sahiptir. Apoptozis, organizmanın gelişimi esnasında ve gelişmiş organizmada bazı hücrelerin hasar görmesi sonucu hasar gören hücrelerin kaybolmasından sorumludur. Apoptozis artarken hücre sayısı azalır ve apoptozis azalırken hücre sayısında artış gözlenir (Thompson, 1994; Altunkaynak ve Özbek, 2008; Hugle ve Fulda, 2015).

Apoptoziste önemli rol oynayan enzimlerden biri de sistein proteaz ailesinden olan kaspazlardır (Springer ve ark, 2000). Bunlardan en önemlileri hücre ölümünün düzenleyici enzimleri olan kaspaz-1 ve kaspaz-3'tür. Merkezi sinir sisteminde oluşan hasarlar sonrası başlayan apoptoziste en önemli görev kaspaz-3'e düşmektedir (Hayashi ve ark., 1998).

Sitokinler, hem doğal yolla hem de belirli immün yanıtta, bağışıklık sistem hücrelerinin birbirleri ile olan etkileşimini düzenleyen çözünebilir protein veya glikoproteinlerdir (Manuel ve ark., 1999; Kokuludağ ve ark., 1999).

Adı geçen sitokinlerden biri olan IL-6 (İnterlökin-6) genel olarak fagosit hücrelerden, T lenfositlerden, endotelyal hücrelerden ve fibroblastlardan salgınır (Kishimoto, 1989). TNF- α (Tümör Nekroz Faktör- α) ise genellikle monosit makrofajlar tarafından üretimi gerçekleştirilmektedir (Camussi ve ark., 1991).

Sitokinler T hücrelerinin, B hücrelerinin ve hematopoetik hücrelerin büyümesi ve gelişmesinde, bağışıklık sisteminin uyarılmasında ve baskılanmasında çok ciddi rol oynamaktadırlar. Bazı sitokinler lokal etkide bulunurken bazılarının etki alanı çok genişleyebilir. Bu sitokinlerden biri olan İnterlökin-6 (IL-6) ilk olarak 1986 yılında klonlanmıştır. Son yıllarda IL-6'nın önemi çok daha fazla hissedilmiştir (Heinrich ve ark., 2003; Taga ve ark., 1989).

Toksik maddelere maruz kalındığında organizmada bir oksidatif stres oluşur. Bu stres esnasında antioksidan savunma mekanizmasını harekete geçiren molekül

olarak görev yapan maddelerden biri de NRF-2 (Nükleer Faktör Eritroid 2 ile İlişkili Faktör 2)'dir. NRF-2 antioksidan mekanizmayı harekete geçirirken Nrf2-Keap1-Are kompleksi olarak bu süreçte görev alır (Chan ve ark., 1993).

Glutasyon; glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerinden oluşur ve buna ilaveten hemen hemen tüm hücrelerde oldukça yüksek miktarlarda bulunan önemli bir antioksidandır. Hücreyi, serbest radikallerin ve reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerinden korur (Rose, 1984). Hopkins tarafından ilk defa 1921 yılında bulunmuştur. Başlarda bir dipeptit olduğu zannedilen Glutasyon 1929 yılında kristal halde sentezlendikten sonra bir tripeptit olduğu anlaşılmıştır (Bildik ve ark., 1998). Reaktif oksijen türlerinin fazla üretimi sonucunda oksidatif stres meydana gelir. Bu oksidatif stres lipid peroksidasyonuna neden olur. Lipid peroksidasyonu hücre için son derece yıkıcı olup hücre membran yapısının bozulmasına yol açar. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan malondialdehit (MDA) miktarının belirlenmesi lipid peroksidasyonunun ne derecede olduğunu gösteren önemli bir belirteçtir (Agarwal ve ark., 2005).

1.1. Türkiye’de Su Ürünleri

Tatlı su balıkçılığı; öncelikler balıklar, yumuşakçalar, kabuklular ve diğer su bitkileri dahil olmak üzere sudaki canlı organizmaların kontrollü bir şekilde çoğaltılması, büyütülmesi ve geliştirilmesini ifade etmektedir (FAO, 2013).

Balık protein içeriği açısından çok zengin olduğundan insanlar için önemi çok büyüktür. Toplumun gelir düzeyi düşük kesimleri için uygun fiyatı ve içeriği ile vazgeçilmez besin kaynaklarından (Subasinge, 2003).

Ülkemizde denizde ve karada balık üretimi son yıllarda giderek artma eğilimindedir. Ancak Türkiye’de alabalık üretimi tarihi ancak 40 yıla dayanmaktadır. Alabalık, 1969 yılında ilk defa Zonguldak-Yedi Göller Parkı’na başarılı bir şekilde uygulanmış ve 70’li yılların başlarında tam olarak yetiştiriciliğine başlanmıştır (Uysal ve Alpaz, 2002).

Tatlı su balığı yetiştiriciliği ve endüstrisi beraber değerlendirildiğinde, temiz gıda erişimi, istihdamda görülen artış, altyapının gelişmesi, yoksulluğun azalması ve

ihracatın artışına büyük katkı sağlaması gibi büyük etkileri söz konusudur (Brummett ve ark., 2008).

Türkiye’de yaygın olarak yapılan tatlı su balığı yetiştiriciliğinde Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) ilk sırayı almaktadır. Ülkenin farklı bölgelerinde yaygın olarak yapılan gökkuşığı alabalığı yetiştiriciliği o bölgelerdeki su kalitesi ve sıcaklığına uyum sağlamaktadır.



Şekil 1.1. Gökkuşığı alabalığı *Oncorhynchus mykiss*

Yaşam alanı olarak berrak, soğuk ve çözünmüş oksijen bakımın zengin sularda rahat olarak yetişen alabalık insanlar tarafından etinin lezzetli oluşu ile de tercih edilen besinler arasında ilk sıralarda yer alır. Alabalık türleri *Salmonidae* familyasının üyeleri arasında bulunur. Yapı ve şekil olarak yağ yüzgeci ile belirgin karakterize olurlar. Sofralık alabalık yetiştiriciliğinde uygulanan üretim teknikleri ve çiftliklerin fiziksel özellikleri belirgin olarak birbirlerine benzerlik göstermektedirler (Kayapınar, 2007).

1.1.1. Alabalık Türleri ve Özellikleri

Alabalıklar *Salmonidae* familyasına aittirler. Bu familyadaki alabalıklar ekonomik yetiştiricilik ve ülkedeki tatlı suların balıklandırılması için en önemli üç cinsi barındıran türdür.

Bu Cinsler:

- a- *Salmo*
- b- *Salvelinus*
- c- *Oncorhynchus*

Ayrıca dünya genelinde en çok bulunan ve tanınan alabalık türleri aşağıda sıralanmıştır (Bruno ve Pope, 1996).

- Salmo solar Linnaeus* (Atlantik somonu)
- Salmo trutta f. trutta Linnaeus* (Deniz Alabalığı)
- *Salmo trutta f. fario Linnaeus* (Dere Alabalığı)
- *Oncorhynchus mykiss Walbaum* (Gökkuşluğu Alabalığı)
- *Salvelinus fontinalis Mitchill* (Kaynak Alabalığı)
- *Salvelinus alpinus Linnaeus* (Alp Alabalığı)
- *Salvelinus namaycush Walbaum* (Göl Alabalığı)

Ülkemizde yetişen alabalık türleri ise şöyledir (Çelikkale, 1994).

- Salmo trutta macrostigma Dumeril* (Anadolu Dağ Alabalığı)
- *Salmo trutta abanticus Tortonose* (Abant Alabalığı)
- *Salmo trutta caspius Kessler* (Aras Alabalığı)
- *Salmo trutta labrax Pallas* (Karadeniz Alabalığı)
- *Salmo trutta f. lacustris Linnaeus* (Göl Alabalığı)

Türkiye’de tatlı ve tuzlu su ortamlarında üretimi yapılan su ürünleri yetiştiriciliği sektörü sürekli gelişmektedir. Yetiştirilen balıklar düşünüldüğünde tatlı sularda üretimi yapılan en önemli tür gökkuşacağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)’dır. Ülkemiz sularında gökkuşacağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) üretimi havuzlarda ve ağ kafeslerde yapılmaktadır (Tüfek ve Yalçın, 2007).

Gökkuşacağı alabalıklarının yetişkin olanlarının boyları 35-40 cm civarında olup dış yüzeyinde çok sayıda siyah, yıldız benzer şekilde benekler bulunur. Sırt kısmı mavi renkte olup yanlara doğru açık renklidir. Kırmızımsı renk ağırlıklı olarak gövde boyunca uzanan ve türe adını vermiş belirtilen renkte uzun bir bant bulunur. Üreme zamanında bu renkler belirgin hale gelir. Balığın alt bölgesi sarıya çalan bir renktedir. Gökkuşacağı alabalıkları doğal yetiştirme alanlarında sinek larvaları ve suya düşen sineklerle beslenir (Atay, 1987).

Alabalık yetiştiriciliği yapılan yerlerde balıklara düzenli bir şekilde kalitesi aynı olan su temin edilmelidir. Ayrıca verilen su miktarı da önemlidir. Bunun için su kalitesi ve miktarındaki ani değişimler balıkları olumsuz etkilemektedir. Alabalık yetiştiriciliği yapılan tesislerde su sıcaklığı en fazla 20°C, oksijen miktarı en az 7 ml/lt su ve pH seviyesi 5.5-8.5 arası olmalıdır (Lindhorst-Emme, 1990).

1.2.Arsenik

Arsenik yeryüzünde en çok rastlanan elementlerden biridir. Periyodik cetvelin VA grubunda yer alır. Hem metal hem de ametal özellik gösteren metaloid olarak adlandırılır. Başta tarım ve eczacılık olmak üzere birçok endüstri dalında sıkça kullanılmasına rağmen çoğu canlı organizma üzerinde toksik etkisi vardır. Özellikler

yer altı sularının geçtikleri kayalardaki arseniği çözerek arseniğin suya karışması sonucu su kaynaklarında bir miktar arsenik bulunabilir (Başkan ve Pala, 2009).

Arsenik gümüş-gri renkte olup, kristal formunda bulunur. Atom ağırlığı 74.9, yoğunluğu 5.73 g/ml ve kaynama noktası da 613 °C olan bir yarı metaldir. Doğada arsenoik asit, arsenit, arsenat, metil arsenik asit, dimetil arsenik asit ve arsin molekülleri halinde bulunur. Genellikle (As^{+3}) ve (As^{+5}) değerlikli olmak üzere iki formu bulunur (Mohan ve Pittman, 2007).

Arseniğin (0) değerlikli element hali ve -3 değerlikli arsin formları da mevcuttur. Sulu ortamlarda en yaygın olanları arsenat ve arsenitin asitleri ile tuzlarıdır (Bissen ve Fritz, 2003).

İndirgen ortamlarda As (III) elementinin $H_3AsO_3^-$, $H_2AsO_3^-$, $HAsO_3^{2-}$ ve AsO_3^{3-} iyonları halinde, yükseltgen ortamlarda ise As (V) elementinin $H_3AsO_4^-$, $H_2AsO_4^-$, $HAsO_4^{2-}$ ve AsO_4^{3-} iyonları halinde bulunduğu bilinmektedir (Loukidou ve ark., 2003).

Birçok arsenik bileşeni toksik özellik göstermektedir. En zehirli olanının arsin gazı (AsH_3) olduğu bilinmektedir. Arsin gazı için 30 dk'lık etki süresinde lethal doz 250 mg/m^3 'tür. Diğer bileşiklerinden olan arsenik trioksitin LD_{50} değeri 34.5 mg/kg , sodyum arsenitin 4.5 mg/kg , sodyum arsenatın $14-18 \text{ mg/kg}$, mono etil arsenik asitin (MMA) 1800 mg/kg ve dimetil arsenik asitin (DMA) 1200 mg/kg 'dır (Bissen ve Fritz, 2003).

Arsenik vücuda sindirim ve solunum yolları ile alınabilir. İnorganik arseniğin gastrointestinal alınma hızı oldukça fazla olup, en çok ince bağırsakta gerçekleşir. Nefes yolu ile alınan arsenik %80 sistemik adsorbsiyon ile sonuçlanır (Bissen ve Fritz, 2003).

Arsenik, kronik alımda sistein içeren protein bakımında zengin olan saç, tırnak ve ciltte birikir. Bu birikimin en fazlası ciğerde gerçekleşir. Yapılan çalışmalarda içme sularımızda yüksek miktarda arseniğin bulunmasının ciğer, böbrek, dalak ve cilt kanserine yakalanma riskinin arttığı görülmüştür. Aynı zamanda vücuda alınan arseniğin sinir sistemini etkileyerek vücutta salgılanan hormonların salgılanma düzeyini bozduğu saptanmıştır (Lenoble ve ark., 2002).

Arsenik, toprağın kirlenmesi ve içme sularına karışması ile besin zincirine katılabilir. Suda kolay çözünen bir metaloid olan arsenik, bu özelliğinden dolayı nehir,

akarsu ve göl sularına kolaylıkla karışabilir. Bu sebepten ötürü insanlar arseniği en kolay içme suları aracılığı ile almaktadırlar (Flora, 2015).

Arsenik inorganik formda olduğunda çoğu karasal canlılarda kanser, deride sert görünüş, damar bozuklukları, kangren, şeker, yüksek tansiyon, kalp hastalığı ve kara ayak hastalığı gibi ölümcül olan çeşitli hastalıklara neden olabilir (Yağmur ve Hancı, 2002; Flora, 2015).

Arsenik, element halinde iken suda çok zor çözünür. Ancak diğer elementler ile bileşik oluşturduğunda ortamın asitlik derecesine de bağlı olarak geniş bir çözünme spektrumuna sahip olabilmektedir (Flora, 2015).

Aktif volkanik faaliyetler ve kara parçasındaki minarellerin aşınması olayları sonucunda atmosferde birikmesi ve akarsu, nehir gibi kaynaklar yardımı ile su ortamına taşınabilir. Arsenik ile kirlenmiş su varlıkları canlı organizmalarda birikim yapmakta ve bu canlılarda fiziksel hasar meydana getirmektedir. Gökkuşağı alabalığı ile yapılan bir çalışmada arseniğe maruz kalma sonucunda alabalıkta karaciğer hasarı ve lipit peroksidasyonu olduğu anlaşılmıştır (Minokoshi ve ark., 1988).

Arsenik dünya üzerinde doğal olarak bulunan elementlerden biridir. Yeryüzünde doğal aşınma süreçleri ile yılda yaklaşık olarak 40.000 ton arsenik doğaya salınmaktadır. Bu miktar insan kaynaklı prosesler sonucu salınan arsenik miktarının yaklaşık iki katıdır. Arsenik en çok kaya benzeri yapılarda çokça birikmektedir. Kayaların ruzgar ve su ile aşınması, sıcak su kaynağı jeotermal hareketler ve aktif volkanik hareketler arseniğin açığa çıkmasında öncül durumlardır. İnsanlığın faaliyetleri sonucu; örneğin madencilik, madende yürütülen prosesler, pestisit kullanımı ve fosil yakıtların endüstride çokça kullanılması gibi unsurlar ile arseniğin doğaya salınması ciddi miktarlara ulaşmıştır (Ulu, 2010).

Arseniğin sorunlu bir kirlenici olmasının iki önemli sebebi vardır. Bunlardan birincisi indirgenebilir olması ikincisi ise oksitlenebilir olmasıdır. Uygun indirgenme koşulları altında arsenik konsantrasyonu oldukça yüksek seviyelere çıkabilir. Arsenik ayrıca çok geçirgen yapılarda hızlı bir konsantrasyon farkı oluşturabilir. Yani birbirine yakın iki su kaynağının bulunduğu kuyularda arsenik konsantrasyonu çok farklı düzeylerde olabilir. Arsenik (III) ve arsenik (V) elementleri birbirinden çok farklı adsorbsiyon izotermine sahiptir. Bu sebeple sulu ortamlarda taşınma hızları birbirinden çok farklıdır (Claesson ve Fagerberg, 2003).

2006 yılında yayımlanan Birleşmiş Milletlere ait bir raporda, sularında arsenik miktarı en çok olan ülkeler arasında Türkiye de yer almaktadır. Ülkemizde bazı bölgelerde bulunan içme sularında bulunan arsenik miktarının $10\mu\text{g/L}$ seviyesinin üzerinde olduğu görülmüştür. Son zamanlarda Türkiye’de içme sularında bulunması gereken maksimum arsenik miktarı $50\mu\text{g/L}$ seviyesinden $10\mu\text{g/L}$ seviyesine çekilmiştir. Bununla ilgili yasal çalışmalar yapılmış ve yerel yönetimlere gerekli çalışmaları yapmaları için belirli bir süre verilmiştir (Ulu, 2010).

1.2.1. Endüstride Arsenik Kullanımı

Sularda bulunan arseniğin önemli bir nedeni de antropojenik kaynaklardır. Dünyada arsenik uzun zaman boyunca sağlıktan tarıma birçok endüstride kullanılmıştır. Bu sebeptendir ki penisilin bulunana kadar frengi gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde ilaçların içeriğinde arsenik bulunmaktaydı. Ayrıca metal sanayi, cam ve seramik sanayi, ahşap ve mobilya endüstrisi, oto lastik ve plastik üretim endüstrisi, boya ve vernik sanayi, petrol rafinasyonu ve organik ve inorganik kimya sanayisinde arsenik içerdiği bilinen atıkların çıktığı ve yeterli düzeyde kontrol edilemediği bilinen endüstrilerdir (Baş ve Demet, 1992).

Birinci Dünya Savaşından önceki zamanlarda dünya üzerinde arsenik trioksit üretimi yaklaşık olarak 10.000 ton idi. Böcek ilaçlarına olan talep ve üretiminin artması ile 1920’lerde bu üretim miktarı 25.000 ton/yıl’a çıkmış ve 1931’de 45.000 ton/yıl’ı bulmuştur. Dünyada 2013 yılında ise yılda 50.000 ton arsenik üretilip kullanılmaktadır (Matschullat, 2000).

Adı geçen faaliyetler sonucu ortaya çıkan arsenik atığı su ve toprağın kirlenmesine neden olduğu gibi özellikle tarımsal faaliyetler sonucunda içme sularımıza kadar ulaşabilmektedir. Arsenikle kirlenmiş suların sulama amaçlı olarak kullanılması tarımda ve özellikle gıdalarda ciddi riskler oluşturur (Lee ve ark., 2003).

Elementel arseniğin kullanım alanları genelde çok sınırlıdır. Bunların bazıları; tüfek fişekleri için kurşun ile alaşım yapılması, havai fişek üretimi yapan tesisler ve metal sanayinde dayanıklılığı arttırmak için bazı metaller ile alaşım yapılmasıdır. Orman sanayinde ahşapların koruyucu malzemesi olarak çinko arsenat ile beraber krom

arsenatlar kullanılmaktadır. Dünya üzerinde süregelen savaşlarda zehirli gaz olarak arsenik bileşikleri de kullanılmıştır (Yağmur ve Hancı, 2002).

Dünyamız üzerinde insan etkileri ile açığa çıkan arseniğin başlıca kaynakları; boya sanayi, cam ve metal sanayi, seramik endüstrisi, lastik ve petrokimya sanayi, kimya endüstrisinde kullanılan bazı arsenik içeren atıklar, kimya endüstrisinde son ürün olarak meydana gelen arsenik içeren atıkların yeterince arıtılmamasıdır (Yazıcı ve ark., 2015).

1.3.Antioksidanlar

Reaktif oksijen türlerinin oluşmasını önlemek, reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu hasarları önlemek ve detoksifikasyonu sağlamak için canlı organizmada görev yapan savunma sistemlerine ‘antioksidan savunma sistemleri’ ya da ‘antioksidanlar’ denir (Şener ve Yeğen, 2009).

Antioksidan maddeler, oluşan radikaller ile çok hızlı bir şekilde reaksiyona girerek otooksidasyon peroksidasyonunu önlerler (Dündar ve Aslan, 1999). Antioksidanların işlevleri arasında fazla olan radikallerin etkisizleştirilmesi, oluşan serbest radikallerin zararlı etkilerinden hücreleri korumak ve hastalıkları önlemeye katkı sağlamak sayılabilir (Pham-Huy ve ark., 2008).

Serbest oksijen radikalleri, süper oksit anyonu (O_2^-), hidroksil (OH^-), alkoksil radikali (RO) ve peroksil radikali (ROO) ile hidrojen peroksit (H_2O_2), hipokloröz asit (HOCl) ve siglet oksijen (1O_2) gibi radikal olarak adlandırılmayan çiftleşmemiş elektron ile veya elektronsuz oksijen ara ürün taşıyıcı metabolitler olarak bilinen ROS, diğer bileşikleri okside eder ve onların serbest radikal olmasını sağlayarak sıklıkla yeni serbest radikal oluşturabilen zincir reaksiyonlarını başlatabilirler (Pham-Huy ve ark., 2008).

1.3.1 TNF- α (Tümör Nekroz Faktör Alfa)

1975’te Lloyd Old ve arkadaşları bazı deney hayvanlarında yaptıkları çalışmada ‘Basil Calmette-Guerin’ (BCG) ile retikuloendotelial sistemin aniden

uyarılması ile lipopolisakkarit (LPS) enjeksiyonu sonucunda dolaşım sistemine bir protein türünün salgılandığını fark etmişler ve bu proteine de Tümör Nekrozis Faktör (TNF) adını koymuşlardır (Carswell ve ark., 1975).

157 adet amino asitten sentezlenip oluşan Tümör Nekroz Faktörü özellikle memeli canlılarda bağışıklık ve hücreyel homeostazide önemli görevleri bulunan ve en çok incelenen sitokinlerin başında gelir (Silke ve ark., 2013).

TNF'nin birbirinden farklı iki yapısı vardır. Bunlar alfa ve beta olarak adlandırılır. Alfa olan kısım genellikle monosit/makrofajlardan, beta olan kısım ise genellikle T lenfositler ve öldürücü hücrelerden salınmaktadır (Neta ve ark., 1987).

TNF- α polipeptit yapıda olan biyolojik etki spektrumu geniş yer kaplayan bir hormondur. Başlıca monosit ve makrofajlar tarafından üretilmektedir. TNF- α reseptör kompleksi, belirlenen hedef hücrede fazla sayıda biyolojik aktivitenin başlamasına neden olur (Başaran ve ark., 1993). TNF- α 'nın doğal ya da sonradan edinilmiş immünite, kaşeksi, antitoksik şok, inflamasyon, dokunun yeniden oluşması, enfeksiyon ve immünite, sitotoksiste, apoptozis (hücre ölümü) olaylarında çok önemli rolü vardır (Camussi ve ark., 1991).

TNF- α genellikle iltihabi durumlarda önemli rol oynadığı, etyolojik ajanların varlığında veya doku hasarı oluşması sırasında 8 saat içinde TNF'nin arttığı gözlemlenmiş ve 24 saatte maksimum seviyeye ulaşmış olduğu rapor edilmiştir (Neta ve ark., 1987)

1.3.2 IL-6 (İnterlökin-6)

İnterlökin-6 ilk defa 1986 yılında klonlanmış fakat önemi son yıllarda daha fazla anlaşılan bir sitokin türüdür. Hem doğal veya sonradan kazanılmış bağışıklık sistemleri üzerine olan etkisi hem de sistemik etkisi açısından inflamatuvar hastalıkların patogeneğinde çok önemli rolü vardır. Bu etki sonucunda da çok cazip bir tedavi hedefi konumuna gelmiştir (Heinrich ve ark., 2003; Taga ve ark., 1989).

IL-6, organizmadaki savunma mekanizmalarında merkezi role sahiptir. IL-6'nın hematopoetik üzerinde olumlu etkisi kanıtlanmıştır. İn vivo koşullarda önemli ölçüde spesifik antikor oluşumunu arttırdığı gözlemlenmiştir (Matsuda ve Hirano, 1990).

Enflamasyonda görev alan sitokinler aynı zamanda tümör hücre proliferasyonunda da etkin rol oynamaktadırlar. İnterlökin-6 pro ve anti-enflamatuvar özellikleri bulunan bir sitokin türü olmaktadır. Bununla beraber in vitro ortamda antitümör özellik gösterdiği de belirtilmiştir (Dethlefsen ve ark., 2013).

IL-6 insanda 26 kd molekül ağırlığında olan bir proteindir. Monosit, fibroblast ve endotelial hücreler gibi birçok hücrenin uyarılması sonucu sentez edilerek ortama salınır (Emery ve Luqmani, 1993).

IL-6, sitotoksik T-hücreleri, megakaryositler ve diğer hemopoetik hücrelerde proliferasyon ve farklılaşım sağlayıcı etkileri vardır. Bu etkilerin yanında hepatik akut faz proteinlerinin ve plazma hücreleri tarafından immünglobülinlerin yapımının uyarımını sağladığı bildirilmiştir (Dasgupta ve ark., 1992).

IL-1, IL-6 ve TNF gibi sitokin grupları inflamasyon etki göstererek çeşitli patojenlerin yok edilmesini hızlandırmaya ve inflamatuvar durumun giderilmesine yönelik bağışıklık sistemini harekete geçirmekte görev alırlar (Kronfol ve Remick, 2000).

1.3.3. NRF-2 (Nükleer Faktör Eritroid-2)

Nrf-2 (Nükleer Faktör Eritroid-2), ksenobiyotikler, elektrofiller, radyasyon ve en önemlisi oksidatif stres tarafından aktivasyona uğrayan ve uğradığı bu stres anında stres koşullarına karşı son derece aktif olarak görev yapan hücresel koruma kalkanıdır (Zang, 2006). Nükleer faktör eritroid-2 ile bağıntılı faktör 2, oksidatif stres anında direnç gösterebilen, çeşitli dışsal stres yaratıcılara karşı uygun bir yanıtı oluşturabilen bir transkripsiyon faktörüdür (Hayes ve Dinkova, 2014).

Aynı zamanda Oksidatif stres karşısında sensör vazifesi görüp, oksijen türevi serbest radikallere karşı hücresel direnç oluşmasını sağlayan bir düzenleyicidir (Ma, 2013).

Canlı organizmada, özellikle insan vücudunda karaciğerde, ayrıca sinir sistemi, böbrekler, akciğerler, kalp ve makrofajlar da dahil olmak üzere çeşitli doku ve organlarda bulunur (Chan ve ark., 1993; Chan ve ark., 1995).

Hücrede oluşan oksidatif strese karşı savunma sistemlerinin ana belirleyicisi olan Nrf2/Keap1 sinyal yolağı, hasar görmüş makro moleküllerin hasarının

giderilmesi veya tamamen yok edilmesinde aktif rol oynayan çeşitli hücre koruyan protein ağlarına ait gen ekspresyonlarını düzenleyerek, hücrenin oksidatif stres altında hayatta kalmasını sağlayan en önemli etmenlerden biridir (Dinkova ve Kostov, 2012).

Nrf2, hücre içinde sitoplazmada Keap1 molekülüne bağlı olarak bulunur. Oksidatif stres altında oluşan reaktif oksijen türleri, antioksidan kapasitenin üstüne çıktığında Keap1 molekülü Nrf2'yi serbest bırakır. Nrf2 serbest kaldığında bazı transkripsiyon faktörleri yardımı ile çekirdeğe geçer. Nrf2'nin çekirdeğe geçmesi glutasyon (GSH) oluşumundan sorumlu olan bazı antioksidanların ve sitoprotektif proteinlerin ve enzimlerin hücre içinde aktif olmasına neden olur (Kavian ve ark., 2018).

Normal şartlar altında, Nrf2 hücre içinde sitoplazmaya yerleşir. Burada bir protein türü olan Keap1 ile etkileşime girerek aktive hale gelir. Hücre içinde oksidatif stresin arttığı koşullarda hücre içine geçmiş olan Nrf2'yi aktive eder (Kobayashi ve Yamamoto, 2005).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda sitoprotektif gen ekspresyonunun düzenleyici mekanizmanın önemli bir parçası olarak, Nrf2'nin mitokondrideki mekanizmaları etkilediği anlaşılmıştır. Hücre içindeki artan Nrf2 aktivitesi, reaktif oksijen türlerine karşı koruma sağlar (Holmström ve ark., 2016).

1.3.4. GSH (Glutasyon)

Glutasyon özellikle karaciğerde olmak ile beraber pek çok dokuda yüksek düzeyde bulunur. Glutasyon; glutamat, sistein ve glisinden sentezlenen bir tripeptittir. Serbest radikaller ve peroksitler ile reaksiyona girerek hücreleri Oksidatif hasara karşı korur (Öztürk ve ark., 2001; Yalçın, 1998). Özellikle karaciğerde bulunan ve her hücrede sentezlenebilmesi mümkün olan glutasyon vücutta bulunan en önemli antioksidanlardan biridir. Hücrede bulunan ve bir oksidatif stres kaynağı olan hidrojen peroksit konsantrasyonunu düşürür ve bazı radikalleri ve toksik olan bileşikleri temizler. Nonenzimatik bir antioksidan olan glutasyon hücre içerisinde reaktif oksijen türlerine karşı savunma sisteminin önemli bir parçasıdır. Hastalık anında kullanılan ilaçların pozitif etkisinin yanında antioksidan özelliğinin de olması tedavi başarı

yüzdesini arttırmakta ve oksidatif strese bağlı hastalıkların meydana gelmesini kısmen bloke edebilmektedir (Şenol, 2021).

Glutasyon çoğu aerobik canlılarda en fazla bulunan çok düşük molekül ağırlığına sahip hücre içinde bulunan tiyol bileşiği olmakla beraber tüm canlı organizma hücrelerinde 05-10 mM, plazmalarda ise μM seviyesinde derişimlerde bulunur. Tripeptit yapısına sahip olan glutasyon molekülü iki kısımdan oluşmaktadır. Bunlar gamma-glutamil köprüsü ve sülfidril gruplarıdır (Meister ve Anderson, 1983).

Glutasyon hücre içerisinde en fazla bulunan protein yapısında olmayan önemli bir moleküldür. Hücre içinde oluşan reaktif oksijen türlerinin yarattığı oksidatif stresin giderilmesi ve enzimatik olmayan yollarla hücre koruma görevini yerine getirirler. Bağışıklık sistemi için son derece önem arz eden fibrogenez, hücre proliferasyonu ve apoptotik yollarda son derece önemli görev almaktadır (Kesebir, 2021).

Glutasyon molekülünün redükte ve okside olmak üzere birbirine dönüşebilen iki formu bulunmaktadır. Peroksidaz enzimi tarafından katalizlenen bir reaksiyonda redüklenmiş halde bulunan glutasyon hidrojen peroksit ve lipit peroksit gibi oksidatif stres kaynakları ile reaksiyona girerek bu istenmeyen moleküllerin eliminasyonunda yer alır. Kendisi ise bir diğer glutasyon molekülü ile disülfid köprüsü yaparrak glutasyonun okside formuna dönüşür. Serbest radikallerin eliminasyonunun devam etmesi için okside halde bulunan glutasyonun redükte forma geri dönmesi gerekmektedir. Bunun için bir reaksiyonda NADPH kullanılır ve glutasyon redüktaz enzimi katalizörlüğünde yeniden redükte hali olan glutasyon formuna geri döner (Çöteli ve ark., 2019).



1.3.5. Kaspaz-3

Apoptoz esnasında hücre ölümünü sağlayan multigen ailesinde yer alan sistein-proteaz grubu enzimlerden biri olan kaspazlar ‘Cysteine Aspartate Specific ProteASES- CASPASE’ olarak isimlendirilir. Bu enzimler ilk başta inaktif olarak sentezlenirler. Daha sonra çeşitli yollar ile aktive olup hücre içindeki tetrapeptit motifleri tanıyarak ve bazı hücrede bulunan proteinleri aspartik asit rezidülerinden ayırır. Bu yolla hücreyi kontrollü bir şekilde ölüme götürürler. Bu enzimlerden olan kaspaz-3 apoptozu yürüten ve oldukça önemli olan efektör kaspazlardandır (Nicholson, 1999).

Kaspazlar molekülleri birbirinden farklı yapısal özelliklere sahiptirler. Kaspazlar bu farklılıklara göre sınıflandırılırlar. Memelilerde oluşan apoptos sırasında görev alanlar; kaspaz-3, kaspaz-6, kaspaz-7, kaspaz-8 ve kaspaz-9’dur. Apoptozisteki rollerine göre iki sınıfa ayrılırlar. Bunlar başlatıcı kaspaz kategorisinde yer alan kaspaz-8 ve kaspaz-9’dur. Sonlandırıcı kaspazlar ise kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7’dir. Apoptoz sürecinde çok önemli görevi olan bu türlerin hatalı bir şekilde aktivasyonu ve oluşan yetersiz hücre ölümü canlıdaki tümör oluşumunu artırıp destekleyebilir (Balkan ve ark., 2020).

Çok iyi organize olmuş bir süreç olan apoptozun merkezinde kaspazlar bulunmaktadır. Aktif bölgelerinde sistein proteaz barındıran kaspazlar hedefteki proteinlerin aspartat içeren kalıntılarından sonraki kısımlarından parçalayarak aktif hale gelirler. İnaktif formda bulunan ve prokaspaz olarak adlandırılan bu moleküller proteolitik yolağın etkin hale gelmesiyle aktif hali olan kaspazlara dönüşmektedirler (Molaoğlu, 2021).

1.3.6. MDA (Malondialdehit)

Malondialdehit lipit peroksidasyonunda oluşan son üründür. Lipit peroksidasyonunun en duyarlı belirteçlerinden biri olduğu kabul edilmektedir. Antioksidan özelliğe sahip olduğu bilinen antioksidan markırlardan biridir (Gutteridge, 1995; Esterbauer ve ark., 1991).

Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan reaktif karbon bileşiklerinden biri olan malondialdehit miktarının ölçümü dokularda meydana gelen lipit peroksidasyonunun derecesini göstermektedir (Draper ve Haddly, 1990). Çoğu omurgalı canlılarda olduğu gibi tatlı su balıklarında da lipid peroksidasyonu sonucu oluşan malondialdehit,

doymamış durumdaki yağ asitlerinin yükseltgenmesi sonucu oluşan ve hücre içinde meydana gelen oksidatif stresin belirteçlerinden biridir (Morales ve ark., 2004).

Diğer canlılarda olduğu gibi tatlı su balıkları da oluşan oksidatif stres ve bunun sonucunda meydana gelen olumsuzlukları bertaraf etmek için organizmada birçok savunma mekanizması geliştirilmiştir. Bu mekanizmalar antioksidan savunması olarak bilinir ve enzim yapısındaki SOD, CAT, GSH-Px, GST ile nonenzimatik redükte edilmiş glutasyon ve çeşitli vitaminler (A vitamini, E vitamini, C vitamini) tarafından oluşturulurlar (Dautremepuits ve ark., 2003; Trenzado ve ark., 2006).

Dokularda meydana gelen lipid peroksidasyonu oluşumu ve bununla birlikte malondialdehit miktarının artışı, hücrede membran yapısının bozulmasına, geçirgenliğin artmasına, hücre içerisine iyon geçişinin hızlanması sonrası enerji kaybına, DNA hasarına ve hücre ölümü ile sonuçlanabilen birtakım bozukluklara neden olabilmektedir (Keleştemur ve ark., 2010).

Lipid peroksidasyonu olarak bilinen olayda meydana gelen ürünlerden malondialdehit ve 4-hidroksi-nonenal buldukları yerden çok kolay bir şekilde difüze olarak hücrenin başka bölümlerinde ciddi hasara yol açarlar. Hücrede oluşan oksidatif stres sonucu oluşan malondialdehit, membranı oluşturan etmenlerin çapraz olarak bağlanmasına ve polimerizasyonuna neden olur. Bu olay sonrasında hücrede deformasyon, iyon geçişi, enzim aktivitesi ve hücreyi oluşturan bileşenlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değişmesine neden olur (Yöntürk, 2017).

1.3.7. NF-KB (Nükleer Faktör Kappa-B)

NF-kB (Nükleer Faktör Kappa-B) apoptozis ve inflamasyon sırasında genlerin regülasyonu ile ilgili olan dimerik transkripsiyon faktörüdür (Baeuerle, 1998; Waddick ve Uckun, 1999).

NF-kB 1986 senesinde Baltimore ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışma sonucunda bulunmuştur. Başlarda B lenfositlerinin merkezlerinde 10 baz çifti kadar uzunlukta bir DNA bölgesine bağlı olarak RNA'ya bilgi aktarım faktörü olarak isimlendirilen NF-kB, zaman geçtikçe birçok canlı organizmada ve çoğu hücre tipinde var olup, çoğu gen ekspresyonunun düzenlenmesinde elzem bir yönetici protein türü olduğu anlaşılmıştır. Yapılan bazı çalışmalarda tümörde NF-kB'nin komple veya

devamlı baskılanmasının hücre sayısının artışı önlediği, hücre içi döngüyü engellediği ve apoptozis yolu ile hücre ölümüne neden olduğu görülmüştür (Kalmaz, 2018).

P50 ve p65 proteinlerinin heterodimer bir oluşumu olan NF-kB hücrelerin stoplazmasında sentezlenmektedir. NF-kB hücrenin stoplazmasında inaktif halde bulunur. Hücre büyümesi, diferensiyasyonu, apoptozisin regülasyonu ve sitokin üretiminden sorumlu olan çok sayıda gen ekspresyonunu kontrol eder (Andela ve ark., 2000; Blackwell ve Christman, 1997; Pahl, 1999; Baldwin, 1996).

İnflamasyon ve immün yanıtın düzenlenmesinde önemli rol oynayan NF-kB ile ilgili yapılan çalışmalarda başlıca rolünün onkogeneze olduğu gösterilmiştir. NF-kB birçok kanser türünde aktif rol oynar. Kanser ile ilgili birçok yolda NF-kB'nin aktivasyonundan söz edilmektedir (Fong ve ark., 2009; Karin ve Greten, 2005).

NF-kB, bağışıklık ve yangı ve iltihaplanma yanıtlarını da içeren çoğu gen için regülatör olarak önemli bir rol üstlenir. Bunun için NF-kB'nin doğal ve sonradan kazanılmış immün yanıtlarda çok önemli düzenleyici etmen olabileceği düşünülmektedir (Qiu ve ark., 2020).

1.3.8. Asetilkolinesteraz (AChE)

Asetilkolinesteraz enzimi canlı organizmada esteraz enzim grubunun bir üyesi olarak bulunmaktadır. Asetilkolinesteraz (AChE) enzimi canlı organizmanın dokularında serbest halde veya fosfolipidler ile kompleks yapmış halde bulunan asetilkolinin hidrolizlenmesini sağlayan bir enzimdir. Genellikle canlıların karaciğer ve beyin dokularında meydana gelir. Bu enzimin ana işlevi asetilkolinin kolin ve asetata dönüşmesi işleminin gerçekleşmesini sağlamaktır. Bu enzim türü vücutta hücre yenilenmesi, bazı etmenler nedeniyle oluşan oksidatif strese yanıt oluşturmak gibi durumlarda önemli rol oynamaktadır (Güven, 2000).

Asetilkolinesteraz çok büyük önemi olan bir enzimdir. Bu enzimin birçok görevi vardır. Bu görevler arasında en önemlileri, sinir hücreleri arasındaki iletişimi sağlamak, kas hücrelerinin kasılma anının başlatılması ve kas lifleri boyunca iletişimin sağlanması amacıyla elektriksel akımın oluşmasında ana rol oynamaktır. Görevi sona eren asetilkolin molekülü, Asetilkolinesteraz (AChE) tarafından ikiye parçalanır. Bu gruplar

kolin ve asetat parçalarıdır. AChE enzimi bu görevlerinin yanı sıra, hücrenin kendini yenilemesi, değişmesi ve çeşitli serbest radikal kaynaklarının varlığı ile oluşan oksidatif strese yanıt verilmesi gibi durumlarda da rol oynar (Kuşçuoğlu, 2004).

1.3.9. Katalaz (CAT)

Katalaz enzimi üzerinde en çok çalışılan enzimlerden biridir. Katalaz terimi ilk kez 1901 senesinde bir araştırmacı olan Loew tarafından kullanılmış ve hidrojen peroksiti (H_2O_2) hidroliz eden enzim olarak tanımlanmış ve literatürdeki yerini almıştır. Substratının kolay ulaşılabilen ve maliyeti düşük olması sebebiyle ve aktivitesinin ölçümünün diğer enzimlere göre daha kolay olması nedeniyle birçok bilim insanı bu enzimle çalışmaktadır. Katalaz enzimi hidrojen peroksidin parçalanması reaksiyonunu katalizler (Chelikani ve ark., 2004).



Katalaz enzimleri hücrenin ömrüne etki eden antioksidan enzim grupları içerisinde bulunur. Hücrede oluşan reaktif oksijen türlerinin varlığında meydana gelen oksidatif stresin giderilmesine katkı sağladıklarından dolayı bu önemi kazanmışlardır. Bazı araştırmalarda hücre içerisinde katalaz enzimi üretilmesi içerisinde katalaz enzimi üretilmeyen hücrelere göre hidrojen peroksit varlığında daha uzun süre yaşadıklarını ortaya koymuştur (Volkert ve ark., 1994).

Hidrojen peroksidin hücreden uzaklaştırılması, hücre yaşam süresinin uzatılması ve virüs mikrobunun oluşturduğu patojenliği ortadan kaldırma gibi özelliklerinin yanında etanol ve metanol gibi alkol metabolizmalarında da önemli görev üstlenmektedir. Bu özelliklerini yanında oksidatif stres kaynağı olan hidrojen peroksidin miktarını çok düşük seviyelere çekmesi ile hücreler arası iletişimi tetikleyip sinyal etkileşiminin sağlayıp hücre büyümesini kısmen uyarabildiği yapılan araştırmalar sonucu anlaşılmıştır. Katalazın tüm bu özellikleri göz önüne alındığında katalazın henüz bilinmeyen birçok rolü olduğu düşünülmektedir (Mate ve ark., 2001; Comporti ve ark., 2010; Gough ve Cotter, 2011; Takebe ve ark., 2007).

1.3.10. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutatyon peroksidaz enzimi oksidatif stres kaynağı olan peroksitlerin indirgenmesini sağlayarak hücre içi stresi azaltmaya çalışır. Yapısı tetramerik olup merkezinde 4 selenyum atomu barındıran bu enzim sitozolik bir enzimdir. Glutatyon peroksidaz aşağıda gösterdiğimiz reaksiyonların katalizlenmesini sağlar (Helle ve ark., 1997).



Redükte Glutatyon (GSH) bir tiyol bileşiği olup bazı reaksiyonlarda Glutatyon Peroksidazı substrat olarak kullanır. Glutatyon bir tripeptit olup hücre içinde oluşan serbest oksijen radikallerini kendi başına veya bir enzim aracılığı ile yakalar. Glutatyon peroksidaz enzimi çoğu peroksit moleküllerinin oluşturduğu oksidatif stresi ortadan kaldırdığı gibi hidrojen peroksiti de ortadan kaldırarak hücre zarı lipidlerini ve hemoglobini koruma altına alabilir (Mayers, 1993).

Glutatyon Peroksidaz enziminin iki farklı yapısı bulunmaktadır. Bunlardan birinde selenyum atomu bağlı iken diğerinde selenyum atomu bulunmamaktadır. Selenyum atomunun bağlı olarak bulunduğu glutatyon peroksidaz enziminin Oksidatif stres kaynağı olan hidrojen peroksit ve diğer organik peroksitlerin indirgenmesini sağlayan beş üyesi bulunmaktadır. Selenyum atomu bulundurmayan glutatyon peroksidaz enzimi ise hidrojen peroksit ve çok düşük bir aktifliğe sahip olan diğer organik peroksitlerin eliminasyonunu sağlar (Atalay, 2012).

1.3.11. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz enzimi ilk defa 1968 yılında oksijenli solunum yapan canlı organizmalarda tespit edilmiştir. SOD enzimi, süperoksit molekülünün hidrojen peroksiti ve oksijene parçalanmasını sağlayan reaksiyonun katalizörü olarak görev yapar. Bu reaksiyon sonucunda oluşan hidrojen peroksit molekülü daha sonra farklı iki enzim

aracılığı ile (Glutasyon Peroksidaz ve Katalaz) bertaraf edilir. Süperoksit dismutaz enzimi hücre bölünmesi sırasında oluşan süperoksit radikalinin düzeylerini kontrol altında tutma görevini üstlenir (Fridovich, 1983).



İnsanda Süperoksit dismutazın iki farklı yapısı bulunmaktadır. Bunlardan birincisi sitozolde bulunur ve yapısında bakır ve çinko barındırır (Cu-Zn SOD). İkincisi ise mitokondride bulunur ve yapısında mangan atomu barındırır (Mn SOD). Bu iki türden hücre içerisinde en çok bulunan bakır ve çinko bulunan Cu-Zn SOD molekülüdür (Helle ve ark., 1997).

Süperoksit dismutaz enziminin en önemli özelliği hücre içinde oluşan süperoksit radikallerini bertaraf ederek hücreyi oksidatif stres kaynaklarından korumaktır. Bunun sonucunda lipid peroksidasyonunu bertaraf etmiş olur. Canlı organizmanın oksijen kullanımının çok fazla olduğu dokularında Süperoksit dismutaz enziminin aktivitesi oldukça yüksektir. Metabolik faaliyetler esnasında hücrede çok fazla süperoksit radikali üretimi olsa da bu enzimin varlığı sayesinde hücrede bu miktar oldukça düşük oranlarda tutulmaktadır. SOD enziminin hücre dışında ise etkinliği oldukça az miktardadır. Enzimin süperoksit radikaline karşı etkisi şöyle olmaktadır. Süperoksit radikali bir elektronunu Cu^{+2} iyonuna verirken Cu^+ ve oksijen molekülü meydana gelir. Bu reaksiyon sonrasında bir başka süperoksit anyonu Cu^+ iyonundan bir elektron alır ve sonucunda hidrojen peroksit oluşur (Yalçın, 2007).



1.4. DNA Hasarı

Organizmalarda genetik bilgiyi taşıma rolü üstlenen DNA molekülleri, çevresel etkiler ya da kendiliğinden zarar görebilir. Metabolik işleyiş ve çevresel etkiler sebebiyle her gün canlı organizma hücreleri içerisinde bir milyon civarı hücre

zarar görebilmektedir. Bu dış etkiler DNA'nın yapısını oldukça değiştirebilir. Bunun sonucunda genetik bilginin gelecek nesillere aktarımında ciddi sorunlar yaşanabilir. İç ve dış etkilerin altında molekül yapılarının bütünlüğünde meydana gelen bu değişimlere DNA hasarı denmektedir (Dinant ve ark. 2008).

Balıklar ve insanlar da dahil olmak üzere bütün canlı organizmalar, hücrelerini oluşabilecek DNA hasarından korumak ve evrim süreci boyunca hücrelerdeki genetik materyalin bozulmadan kalmasının sağlamak üzere bazı onarım mekanizmaları geliştirmiştir (Valerie ve Povirk, 2003).

DNA hasarının giderilmesi; canlı organizmadaki hücrenin ölümü, replikasyon sorunları, mutasyon, genomdaki dengesizlikler ve DNA'da oluşabilecek hataların sürekliliğini azaltmak için kullanılan bir süreçtir (Lord ve Ashwort, 2012; Rossetto ve ark., 2012).

Oksidatif stres kaynaklarının çeşitli yollar ile DNA üzerinde çeşitli lezyonlara neden olarak hücre içinde hasara neden olduğu bilinmektedir. DNA üzerinde meydana gelen bu oksidatif stres, mutagenesis ve karsinogenesis gibi bazı durumların oluştuğunun kanıtı olarak gösterilmektedir. DNA'nın bileşenleri arasında bulunan guanin, en düşük iyonizasyon potansiyeli derecesine sahip olduğundan dolayı oksidatif stresi tetikleyen reaktif oksijen türlerinin saldırılarına karşı çok açıktır. Guaninde bulunan karbonlardan sekizincisine yapılan radikallerin saldırıları sonucu oluşan 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8OHdG) DNA hasarının oluştuğunun en büyük kanıtıdır (Valavanidis ve ark., 2009).

8-OHdG, DNA'da tahribat olduğunun ve oksidatif stresin oluştuğunun çok güçlü bir kanıtıdır. DNA sürekli içeriden ve dışarıdan etki eden oksidatif tahribata uğrar. Oksidatif stres sonucu reaktif oksijen türlerinin saldırısı ile DNA hasarının oluştuğu ve bunun sonucunda 8-OHdG konsantrasyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Etil alkol, demir, asbest ve arsenik gibi ağır metallerin canlı organizmaların beyin, karaciğer ve böbrek dokularında 8-OHdG miktarlarını fazla miktarda arttırdığı yapılan çalışmalar sonucunda bilinmektedir (Kasai, 1997).

İyi düzenlenmiş bir yapıya sahip bir baz olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin, reaktif oksijen türlerinin DNA'da meydana getirdiği hasarın bir sonucu olarak meydana gelen bir ürün olup guaninde bulunan karbon atomlarının sekizincisine bir hidroksil radikalinin bağlanması sonucunda oluşan ve DNA hasarının meydana

geldiğinin gösteren en büyük belirteçlerden biridir. Reaktif oksijen türlerinin meydana getirdiği DNA hasarı sonucu oluşan ve en çok karşımıza çıkan bu üründür. Hidroksil radikali guanin yapısındaki sekizinci karbon atomuna eklenmesi sonucu meydana gelen C8-OH yapısından bir elektron ve proton kaybetmesi sonucunda 8-OHdG'ye okside olur (Yokuş ve Çakır, 2002; De Martinis ve De Lourdes, 2002).



2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ

Trivedi ve arkadaşlarının benekli yılanbaşı balığı üzerinde yaptıkları bir çalışmada balıklar 15,30 ve 45 gün boyunca civa klorüre maruz bırakılmış ve uygulama sonunda balıkların karaciğer dokularında GSH düzeyleri incelendiğinde kontrol grubu balıklara göre bu düzeyin belirgin oranda arttığı görülmüştür (Trivedi ve ark., 2022).

Cheng ve arkadaşlarının 2022 yılında çamur yengeci üzerinde yaptıkları bir çalışmada yengeçler farklı konsantrasyonlarda kadmiyuma maruz bırakılmıştır. Yengeçlerin uygulamadan 48 saat sonra pankreas dokuları incelendiğinde oluşan oksidatif stres kaynaklı olarak NRF-2 düzeylerinde önemli ölçüde artış olduğu görülmüştür (Cheng ve ark., 2022).

Wang ve arkadaşlarının orfoz balıkları üzerinde yaptıkları bir çalışmada balıklar farklı konsantrasyonlarda mangan klorür'e 30 gün boyunca maruz bırakılmışlardır. Uygulama sonrası kontrol grubu balıklara göre uygulama yapılan balıkların karaciğer, kas, solungaç ve bağırsak dokuları incelenmiş ve bu dokularda IL-6 düzeylerinin oldukça yükseldiği görülmüştür (Wang ve ark., 2022).

Han ve arkadaşlarının kerevietler üzerinde yaptıkları bir çalışmada, kerevitler farklı miktarlarda arseniğe maruz bırakılmıştır. Bu uygulama sonrası kerevitlerin kas dokularında GSHPx düzeylerinin oluşan oksidatif strese bağlı olarak düştüğü görülmüştür (Han ve ark., 2022).

İran'da bulunan Firoozkooh şehrindeki Arjomant balık çiftliğinden temin edilen yetişkin gökkuşığı alabalıklarına farklı konsantrasyonlarda arseniğe maruz kalmasının sonucunda lipid peroksidasyonunun durumu incelenmiş ve dokulardaki CAT, GPx, SOD ve GST enzim seviyelerinin yüksek konsantrasyonda arsenik uygulanan balıklarda arttığı gözlenmiştir (Milan ve ark., 2021).

Xue ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Yeni Zelanda beyaz tavşanları kullanılmış ve beyaz tavşanlar belirli oranlarda kadmiyuma maruz bırakılmıştır. Bu maruziyet sonrasında beyaz tavşanların beyin dokusu incelenmiş ve uygulama yapılan gruplarda kontrol grubuna göre NRF-2 düzeylerinde belirgin bir artış olduğu görülmüştür (Xue ve ark., 2021).

Li ve arkadaşlarının 2021 yılında yılanbaşı balığı üzerinde yaptıkları bir çalışmada balıklar 28 gün kurşuna maruz bırakılmış ve uygulama sonunda balıkların

karaciğer, solungaç, böbrek, bağırsak ve kas dokularında GSHPx enzim aktivitesi ölçülmüş ve enzim düzeylerinde belirgin bir düşüş olduğu saptanmıştır. Buna karşın adı geçen dokulardaki Kaspaz-3, TNF- α , NF-KB ve IL-6 düzeylerinde ciddi oranda artış olduğu görülmüştür (Li ve ark., 2021).

Ge ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada 100 adet yetişkin tavuk kullanılmış ve bu tavuklar 5 gruba ayrılmıştır. Kadmiyum uygulanan gruptaki tavukların kalp dokusundan alınan örneklerde NF-KB düzeylerinin kontrol grubuna göre oldukça farklılık gösterdiği ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı bulunduğu görülmüştür (Ge ve ark., 2021).

Hu ve arkadaşlarının nil tilapyası balığı üzerinde yaptıkları bir çalışmada balıklar farklı konsantrasyonlarda kadmiyuma maruz bırakılmış ve uygulama sonrası balıkların karaciğer dokusundaki GSHPx enzim aktivitesinin oksidatif strese bağlı olarak düştüğü görülmüştür. Aynı zamanda uygulama sonrası balıkların karaciğer dokusunda DNA hasarının bir göstergesi olan 8-OHdG düzeylerinin önemli oranda arttığı görülmüştür (Hu ve ark., 2021).

Choudhury ve arkadaşlarının 2021 yılında yılan başı balığı ile yaptıkları bir çalışmada, balıklara yedi gün boyunca kadmiyum uygulanmıştır. Bu süre sonunda balıkların karaciğer dokusu incelendiğinde, reaktif oksijen türlerinin varlığı oksidatif stresi tetiklemiş ve bu strese tepki olarak TNF- α , Kaspaz-3 ve NRF-2 düzeylerinde belirgin bir artış olduğu görülmüştür (Choudhury ve ark., 2021).

Hanana ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada yavru alabalıklar 96 saat boyunca terbiyum klorür ve praseodimyum klorüre maruz bırakılmıştır. Çalışma sonucunda terbiyum klorür uygulanan gruptaki balıkların karaciğer dokularında SOD ve CAT enzim aktivitelerinde artış gözlenirken, praseodimyum klorür uygulanan balıkların karaciğer dokularında SOD enzim aktivitesi düşerken CAT enzim aktivitesi artmıştır (Hanana ve ark.,2021).

Mahamood ve arkadaşlarının Rohu balıkları üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada, balıklar ağır metal kirliliği olduğu bilinen Yamuna nehrinden alınmış ve balıkların solungaç ve karaciğer dokularında SOD ile CAT enzim aktiviteleri incelenmiştir. Kirliliğe maruz kalmayan kontrol grubu balıklara göre, ağır metal kirliliği olduğu bilinen bölgeden alınan balıkların solungaç ve karaciğer dokularında

SOD enzim aktivitesinin arttığı, CAT enzim aktivitesinin azaldığı görülmüştür (Mahammod ve ark., 2021).

Nil nehrinin ağır metal kirliliği olduğu bilinen bölgesinden alınan nil tilapyası balığı üzerinde yapılan bir çalışmada balıkların karaciğer, böbrek ve beyin dokuları incelendiğinde kirlilik olmayan bölgesinde yaşayan balıklara göre AChE düzeylerinin belirgin oranda düştüğü görülmüştür. Yine kirlilik olduğu bilinen bölgede balıkların karaciğer, bein ve böbrek dokularında, kirliliğe maruz kalmayan balıklara göre GSH, SOD, CAT ve MDA enzim aktivitelerinin arttığı görülürken; IL-6 ve TNF- α sitokin düzeylerinde de önemli ölçüde artış olduğu görülmüştür. Bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Hossain ve ark., 2021).

Sherif ve arkadaşlarının tilapya balığında yaptıkları bir çalışmada balıklar farklı boyulardaki titanyum dioksit nano partiküllerine maruz bırakılmıştır. Uygulama sonrası balıkların böbrek ve karaciğer dokuları incelendiğinde kontrol grubu balıklara göre IL-6 düzeylerinde maruziyete bağlı olarak önemli artış olduğu gözlenmiştir (Sherif ve ark., 2021).

90 adet Nil Kedi Balığı üzerinde yapılan bir çalışmada balıklar farklı konsantrasyonlarda sodyum arsenata maruz bırakılmış ve sonucunda balıkların karaciğerlerinde MDA aktivitelerinde artış gözlenmiştir. Bunun arseniğe maruz kalan balıkların karaciğerlerinde arsenik kaynaklı oksidasyonun ürettiği serbest radikaller sonucu gerçekleştiği düşünülmektedir (Moneeb ve ark., 2020).

Çin’de japon balıkları üzerinde yapılan bir çalışmada balıklara 10 ve 20 gün boyunca içerisinde As (III) ve As(V) olan yemler verilmiştir. Bu süre sonunda balıkların dalak, böbrek, karaciğer ve kas dokularında As (III) ve As(V) birikimi gözlenmiş ve buna bağlı olarak adı geçen dokularda SOD, CAT, GSH ve MDA enzim aktivitelerinde önemli değişimler olduğu anlaşılmıştır (Cui ve ark., 2020).

Tayland’da 2020 yılında yapılmış bir çalışmada afrika yayın balığı 2, 4 ve 6 ay boyunca kadmiyuma maruziyeti sonucunda balığın karaciğer ve böbrek dokularında AChE aktivitesi değerlendirilmiştir. Uygulama sonucunda kadmiyuma maruz kalmış balıkların dokularında kontrol grubuna göre belirgin bir düşüş görülmüştür (Suwanprasert ve ark., 2020).

Hu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada zebra balıklarına kadmiyun klorür ve gümüş nitrat belli periyotlarla uygulanmış ve balıklardan alınan embriyolardaki

NRF-2 düzeyleri ölçülmüştür. Kontrol grubuna göre uygulama yapılan zebra balık embriyolarında NRF-2 düzeylerinin belirgin oranda arttığı görülmüştür (Hu ve ark., 2019).

Sabullah ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada sazan balıklarının çeşitli ağır metallere (Civa, Gümüş, Bakır, Krom, Arsenik, Kadmiyum, Kurşun) maruz kalması sonucu balıkların beyin dokuları incelenmiştir. Ağır metale maruz kalan balıkların beyin dokularında AChE'nin inhibisyonu sonucunda düzeylerinde önemli miktarda azalma olduğu görülmüştür (Sabullah ve ark., 2019).

Jiao ve arkadaşlarının yetişkin sıçanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada sıçanlar dört gruba ayrılmış ve kontrol grubu hariç diğer üç gruba kadmiyum uygulaması yapılmıştır. Uygulamadan 15 gün sonra sıçanların böbrek dokularında NRF-2 düzeylerinin kontrol grubuna göre belirgin bir şekilde artış olduğu görülmüştür (Jiao ve ark., 2019).

Mısır'da bulunan Zagazig üniversitesinde yapılan bir çalışmada 50 adet beyaz tüylü erkek sıçan kullanılmış ve beş gruba ayrılmıştır. Bu gruplardan üçüncüsüne belli oranda kobalt klorür uygulanmış ve uygulamadan on beş gün sonra üçüncü grup sıçanların korteks dokularında NF-KB düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür (Mohamed ve ark., 2019).

Asya bataklık yılan balığı ile yapılan bir çalışmada balığa belirli oranlarda ağır metaller uygulanmış (Gümüş, Arsenik, Kadmiyum, Krom, Kobalt, Bakır, Civa, Nikel, Çinko, Kurşun) ve uygulama sonrasında yılan balığının beyin dokusu incelenmiştir. İnceleme sonrasında uygulanan tüm metal grupları için beyin dokusunda AChE enzim aktivitesinin inhibe edildiği ve düzeylerinin önemli oranda düştüğü görülmüştür (Khalidi ve ark., 2019).

Özderk ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada, ratlar 28 gün boyunca tuzlu su içinde çözünmüş 50 mg/kg kurşun çözeltisi enjekte edilmiş ve ratların böbrek dokusundaki 8-OHdG düzeyleri ölçülmüştür. Bu süre sonunda ölçülen 8-OHdG düzeylerinde önemli ölçüde artış meydana gelmiştir (Özdek ve ark., 2019).

Taysı ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada rastgele seçilen 85 adet gökkuşağı alabalığından oluşan gruplardan kontrol grubu hariç diğer gruplar 96 saat boyunca Civa Klorüre maruz bırakılmıştır. Maruziyet sonrası balıkların beyin dokusundaki 8-OHdG

düzeyleri ölçülmüştür. Ağır metalin yarattığı oksidatif stres ve DNA hasarı neticesinde 8-OHdG seviyelerinde önemli ölçüde artış olduğu görülmüştür (Taysı, 2019).

Yavru pasifik kırmızı balıklar ile yapılan bir çalışmada balıkların ağır metale maruz kaldıktan sonra buna bağlı olarak gelişen oksidatif stres ve lökositlerinde meydana gelen apoptoz yollarındaki değişim incelenmiştir. Balıklara metilciva, kadmiyum ve arsenik (III) uygulanmış ve bunun sonucunda balıklarda oksidatif stresin arttığı ve apoptoz yollarındaki kaspaz-2, kaspaz-3 ve kaspaz-7 aktivitelerinde değişiklik olduğu gözlenmiştir (Becerril ve ark., 2019).

85 adet gökkuşuğu alabalığı üzerinde yapılan bir çalışmada balıkların bazıları 96 saat boyunca HgCl₂ (Civa (II) Klorür)'e maruz bırakılmış ve neticesinde balıkların beyin dokularında MDA ve 8-OHdG seviyeleri yükselmiş, beyin dokusunda oksidatif stres olduğu anlaşılmıştır (Taysı, 2019).

96 saat boyunca farklı Pb konsantrasyonlarda maruz bırakılan *Gammarus pulex* bireylerinde GPx ve CAT enzim aktivitelerinin önemli derecede azaldığı görülmüştür. Bunun nedeninin enzim moleküllerinin aktif bölgelerindeki -SH gruplarına metal bağlanması olduğu düşünülmektedir (Serdar ve ark., 2019).

Zhao ve arkadaşlarının tavuklar üzerinde yaptıkları bir çalışmada tavuklar 4,8 ve 12 hafta boyunca bakır ve arseniğe maruz bırakılmışlardır. Uygulama sonrası tavukların iskelet kas dokuları incelendiğinde ağır metal maruziyetine bağlı olarak oksidatif stres kaynaklı NF-kB, kaspaz-3 ve TNF- α düzeylerinde belirgin bir artış yaşandığı görülmüştür (Zhao ve ark., 2018).

Sazan balıklarında (*Cyprinus carpio L.*) yapılan bir çalışmada 7,15 ve 30 gün boyunca balıklar krom, kadmiyum ve kurşuna maruz bırakılmışlar ve bu zaman sonunda balıkların kas, solungaç, karaciğer, böbrek ve barsak dokularında MDA, TNF- α ve IL-6 konsantrasyonlarında önemli ölçüde artış gözlenmiştir. Bu artışın ağır metale maruz kalan sazan balıklarının dokularında metal birikimi ve sonrasında oksidatif stresten kaynaklandığı düşünülmektedir (Rajeshkumar ve ark., 2017).

Brovana nehrinden temin edilen 30 adet vahşi gökkuşuğu alabalığı farklı konsantrasyonlarda arseniğe maruz bırakılmış ve sonucunda balıkların yüzgeç, solungaç, karaciğer, böbrek, kas ve gonad dokularında MDA ve SOD enzim aktivitelerinin arttığı gözlemlenmiştir (Greani ve ark., 2017).

Yapılan bir çalışmada beş farklı ağır metal (Al, As, Cd, Co, Cr) iki farklı konsantrasyon serisi ile 5, 10, 20 günlük periyotlar ile yetişkin zebra balığının yaşadığı akvaryuma uygulanmış ve uygulama sonucunda zebra balıkları solungaç dokularında As artışı gözlemlenmiştir. Hesaplanan GST düzeyleri zamana ve doza bağlı olarak azaldığı gözlemlenmiştir (Kanev, 2016).

Kore’de yavru kaya balıkları üzerinde yapılan bir çalışmada balıklar dört farklı dozda arseniğe 10 ve 20 gün boyunca maruz bırakılmış ve bunun sonucunda balıkların kas, solungaç, karaciğer, böbrek ve dalak dokularında SOD ve GST aktiviteleri incelenmiştir. Her iki zaman sonucunda enzim aktivitelerinin dokularda arsenik birikimini ve oluşan oksidatif stres sonucu olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir (Kim ve Kang, 2015).

Farklı subletal dozlarda bir ağır metal olan bakır zebra balıklarına uygulanmış ve 0.1 ppm uygulama yapılan balık solungaç dokularında GSH seviyelerinde artış gözlemlenmiştir (Ünver ve ark, 2014).

Gökkuşuğu alabalığı üzerinde yapılan bir çalışmada 21 gün boyunca balıklara 2 farklı dozda PbCl₂ uygulanmış ve uygulama sonucunda kontrol gruplarından farklı olarak uygulama yapılan balıkların karaciğer, böbrek ve kas dokularında CAT, SOD, GPx aktivitelerinin ve MDA seviyelerinin arttığı gözlemlenmiştir. Bunun sonucunda ağır metal kirliliğine maruz kalmış alabalıkların dokularında kurşun birikiminin canlı sağlığına olumsuz etki yarattığı anlaşılmıştır (Alak ve ark., 2013).

Farklı dozlarda Deltametrin ve Kadmiyum uygulanan kılıçkuyruk balıklarının dokularında lipit peroksidasyonu sonucu oluşan malondialdehit miktarlarında önemli ölçüde artış gözlemlenmiştir. Bu parametrenin değişmesi Deltametrin ve Kadmiyum uygulanan kılıçkuyruk balığının dokularında lipit peroksidasyonu oluştuğunun göstergesidir (Kaymak, 2011).

Ağır metaller vücuttaki miktarları yüksek konsantrasyonlara ulaşınca depolanmakta ve belirli limiti aşmadığı sürece toksik etki belirtisi göstermemektedir (Kar, 2011).

Lagos lagününün ağır metal kirliliği oluşmuş bölgesinden alınan tilapya balığında yapılan incelemede kirlilik olmayan bölgedeki balıklara göre ağır metale maruz kalmış balıkların GSH düzeyleri incelenmiş ve kirliliğin olduğu bölgedeki balıkların GSH düzeylerinin yükseldiği görülmüştür (Doherty ve ark., 2010).

Dışarıdan alınan ağır metaller genellikle proteinlere bağlanarak kan aracılığıyla, transformasyon ve depolama için karaciğere iletilmektedir. Karaciğer iletilen ağır metaller burada depolanmakta veya böbrekler tarafından bertaraf edilmek üzere kana geri yollanmaktadır (Kıvrakdal, 2010).

Yürüyen kedi balıklarında yapılan bir çalışmada balıklar düşük konsantrasyonlarda arseniğe maruz bırakılmış ve balıkların böbreklerinde arseniğe bağlı olarak kaspaz-3 aktivasyonu sonucu apoptoz yolaklarının aktif olduğu anlaşılmıştır (Datta ve ark., 2009).

Ağır metallerin balıkların organlarında veya dokularında birikme düzeyi; ortamda var olan ağır metal miktarına, balığın ağır metale maruz kalma süresine, balığın yaşına, ağır metalin türüne ve miktarına, balığın metabolik olarak aktivitesine, gelişim olarak hangi evrede bulunduğu, doku ve organların yanı sıra içinde bulunduğu suyun kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre farklılık gösterebilir (Köse ve Uysal, 2008).

Karakaya baraj gölünden alınan gökkuşağı alabalıklarına 1 hafta boyunca belli oranlarda bazı ağır metaller suya karıştırılarak uygulanmış ve uygulama sonucunda gökkuşağı alabalıklarının bazı dokularında MDA (Malondialdehit) miktarlarında artış gözlemlenmiştir (Alkan, 2005).

Metabolik aktivite için gerekli olmayan fakat düşük konsantrasyonlarda bile toksik etki yapan metaloidlerin Hg, Pb, Cd ve As olduğu belirtilmiştir. Genelde en fazla depolama karaciğerde olurken en az depolama kas dokularında oluşmaktadır. Bu durum öldürücü olmayan miktarlardaki ağır metallerin, metabolik olarak balıkların genellikle aktif organlarında depolanmasından kaynaklanmaktadır (Kargın ve Erdem, 1992).

Sistein bakımında oldukça zengin bir tripeptit olan glutatyon, ağır metalleri bağlayarak toksik etkilerin giderilmesinde görev yapar (Hodson, 1998; Chan ve Cherian, 1992).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Otuz iki adet yavru alabalık *Oncorhynchus mykiss* ticari olarak satışı yapılan Van-Çatak ilçesinde bulunan tesislerden temin edildi. Temin edilen yavru alabalıklar (80-100 g) 8'er adet fiberglass dört akvaryuma (300 L) rastgele dağıtıldı. Balıkların adaptasyonu için bir hafta beklendi. Balıklar ticari bir yem ile günde iki kez sabah ve akşam olmak üzere beslendi. Balıklar $18,0 \pm 1$ °C sıcaklıkta doğal bir fotoperiyod sürecinde ve sürekli hava taşı ile havalandırıldı. Akvaryumlardan biri kontrol grubu diğer üçüde As konsantrasyon uygulama grupları için kullanıldı.



Şekil 3.1. Kontrol grubu yavru alabalıklar



Şekil 3.2. Arsenik uygulanmış birinci, ikinci ve üçüncü grup yavru alabalıklar

Akvaryumlardan biri kontrol grubu diğerleri de As konsantrasyon uygulamaları için kullanıldı. Arsenik uygulama grupları için her bir akvaryuma 4 adet, kontrol grubu için 4 adet yavru alabalık akvaryuma dağıtıldı. Arsenik uygulanan grupların akvaryumlarına 25, 50, 75 mg/L konsantrasyonlarında arsenik içeren NaAsO_2 eklenilerek 96 saat boyunca konsantrasyonlarının değişmemesi sağlandı. Lethal doz tayini Buhl ve Hamilton (1991), arsenik çalışmasına göre belirlenmiştir. Arsenik uygulaması yapıldıktan 96 saat sonra balıklar MS222 (0.1 g/L) ile anestezi ortamına alınarak balıkların beyin dokuları ayrıldı. Ayrılan dokular homojenize edilerek analize kadar $-24\text{ }^\circ\text{C}$ de donduruldu.



Şekil 3.3. Anestezi sonrası yavru alabalık görünümü



Şekil 3.4. Yavru alabalıkların iç organları görünümü

3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Cam Tüp Vida kapaklı 10 ml
Derin Dondurucu (Samsung)
Eppendorf Tüp 1.5 ml
Etüv (Thermo Scientific)
Hassas Terazı (Shımadzu ATX224R)
Homojenizatör (Isolab)
Manyetik Karıştırıcı (Daihan Scientific MSH-20D)
Mikro Plate Okuyucu (Allsheng AMR-100)
Mikropipet 5000 UL BRAND 704780
Neşter
Parafilm
Pens
pH metre (Milwaukee Mi-150)
Pipet Ucu 1000UL
Pipet ucu 1-5 ml
Pipet ucu 5-50 UL
Plastik Tüp 10 ml
Santrüfuj (Universal 320)
Spektrofotometre (Hitachi U-2900)
Su Banyosu (Wisebath)
Tüplük

3.3. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

1.1.3.3-Tetraetoksiopropan (TEP)(Sigma)
Caspase Elisa Kit (Biolab)
Deiyonize Saf Su (H₂O)
EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit) (Sigma)
GSH Elisa Kit (Biolab)
GSH-Px Randoks Kit
Hidrojen Peroksit (H₂O₂) (Merck)

Hidrojenperoksit (H_2O_2) (Merck)
IL-6 Elisa Kit (Biolab)
NK-FB Elisa Kit (Biolab)
NRF-2 Elisa Kit (Biolab)
Potasyumdihidrojenfosfat (KH_2PO_4) (Merck)
SOD Randoxs Kit
Tiobarbütirik Asit (TBA)(Sigma)
TNF- α Elise Kit (Biolab)
Triklor Asetik Asit (TCA)($C_2HCl_3O_2$) (Merck)

3.4. Yöntem

3.4.1. Numunelerin Analize Hazırlanması

Arsenik uygulaması sonrasında sırayla anestezi altına alınan kontrol ve diğer üç grup yavru alabalıklar laboratuvar ortamına soğutucu küvet ile taşındı. Anestezi altındaki balıkların beyin dokuları alındı.

3.4.2. Doku Homojenatının Hazırlanması

1.46 g EDTA çözeltisi tartılır ve üzerine 3.4 g KH_2PO_4 ilave edilerek saf su ile 500 ml'ye tamamlanır. Doku homojenat çözelti pH'sı 7 olmalıdır. Beyin dokuları tartılıp üzerine homojenat tampon çözeltisi ilave edilip homojenizatör ile parçalanmış karışım 10 ml'lik plastik tüplere alındı. Plastik tüplerdeki çözelti santrüfuj edilerek üstte kalan sıvı kısım 1.5 ml'lik eppendorf tüplere alınarak analize kadar $-24\text{ }^\circ\text{C}$ 'de soğutucuda muhafaza edildi.

3.4.3. Malondialdehit (MDA) Ölçümü

MDA düzeyi tiyobarbiturik asit (TBA) ve MDA reaksiyonu sonucu oluşan pembe renk absorbansının spektrofotometrik ölçümü esasına dayalı Placer ve ark. (1966)'nın yöntem ile ölçülecektir.

Bu yöntem lipid peroksidasyonunun bir sonucu olan malondialdehit ile tiobarbitürik asit reaksiyonuna dayanmaktadır. Oluşan MDA, TBA ile pembe rekte bir kompleks oluşturmaktadır. Pembe renkte kompleks oluşturmuş çözeltinin absorbansı 532 nm'de spektrofotometre cihazında ölçülerek peroksidasyonun derecesi saptanmaktadır.

3.4.3.1. Metodun ayraçları

1. 2-Tiobarbitürik Asit (TBA): 0.67 g TBA 80 ml %10'luk perklorik asitte çözülür ve 100 ml'ye distile su ile dilüe edilir.
2. %10 Trikloroasetik Asit (TCA): Distile su ile hazırlanır, koyu renkli şişede oda sıcaklığında saklanır.
3. Standart: 1,1,3,3 Tetractoxipropan (TEP)
4. Renk Ayracı: üç kısım trikloroasetik asit solüsyonu ve bir kısım TBA solüsyonu reaktif şişeye konularak 1 dakika magnetik karıştırıcıda karıştırılır. Ayıraç günlük hazırlanır.

3.4.3.2. Deneyin Yapılışı

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Örnek	-	-	0.25
Standart	-	0.25	-
Serum Fizyolojik	0.25	-	-
Renk Ayracı	2.25	2.25	2.25

Şekil 3.5. Doku Lipid Peroksidasyonu Ölçümü

Tüpler karıştırıldıktan sonra 100°C sıcaklıkta su banyosunda 20 dakika bekletildi. Soğutma işleminden sonra tüpler 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek üst faz absorbansı 532 nm'de okundu.

3.4.3.3. Dokuda Lipid Peroksidasyon Düzeyinin Hesaplanması

Örneğin Absorbansı

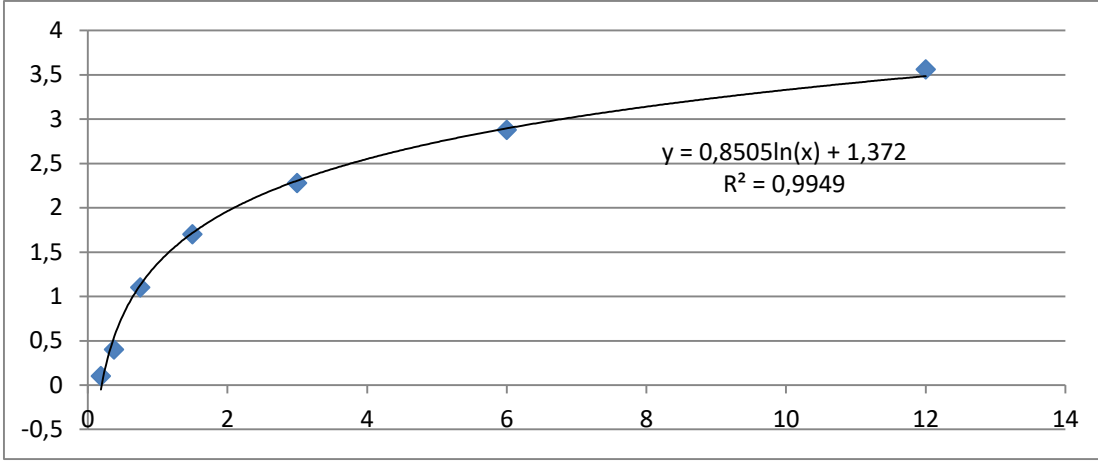
MDA: $\frac{\text{Örneğin Absorbansı}}{\text{Standartın Absorbansı}} \times \text{Standartın Konsantrasyonu}$

Dokudaki MDA nmol/g doku olarak hesaplandı.

3.4.4. Kaspase-3 parametresinin ölçümü

Balık için hazırlanmış olan ELISA kit kullanılmıştır. Analiz esnasında kullanılacak tüm ajanlar, standart solüsyonlar ve numuneler oda sıcaklığına getirilmiştir.

1. BT Lab'dan temin edilen ELISA kit içerisindeki Microelisa Strip Plate kuyucuklarından standart için ayrılmış kuyucuğa standart çözelti eklendi.
2. Plate üzerindeki diğer kuyucuklara numunelerden 40µl ve üzerine 10µl anti-CASP3 antikorunu eklendi. Ardından numune kuyularına ve standart kuyusuna 50µl streptavidin-HRP eklendi. Plate iyice karıştırıldı ve üzeri örtülerek 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.
3. İnkübe edilen numunelerin olduğu plaka 300 ml yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.
4. Her bir kuyucuğa 50µl substrat solüsyonu A ve ardından yine her bir kuyucuğa substrat solüsyonu B eklendi. Plate'in üzeri kapatıldı ve karanlıkta 37°C sıcaklıkta 10 dakika inkübe edildi.
5. Plateteki her bir kuyucuğa 50µl stop solüsyonu eklendi. Stop solüsyonu eklenince kuyucuklardaki çözeltilerin mavi rengi hemen sarıya döndüğü gözlemlendi.
6. Stop solüsyonu eklendikten sonra Microelisa Strip Plate üretici firma protokolü uygulanarak absorbansı 450 nm olan ELISA (Plate Reader) cihazında ölçüm yapıldı.
7. Standartlarının optik dansitelerine ve konsantrasyonlarına uygun aşağıdaki standart grafiği çizilerek oluşturulan formüle göre örneklerdeki düzeyler hesaplandı (Şekil 3.2.).

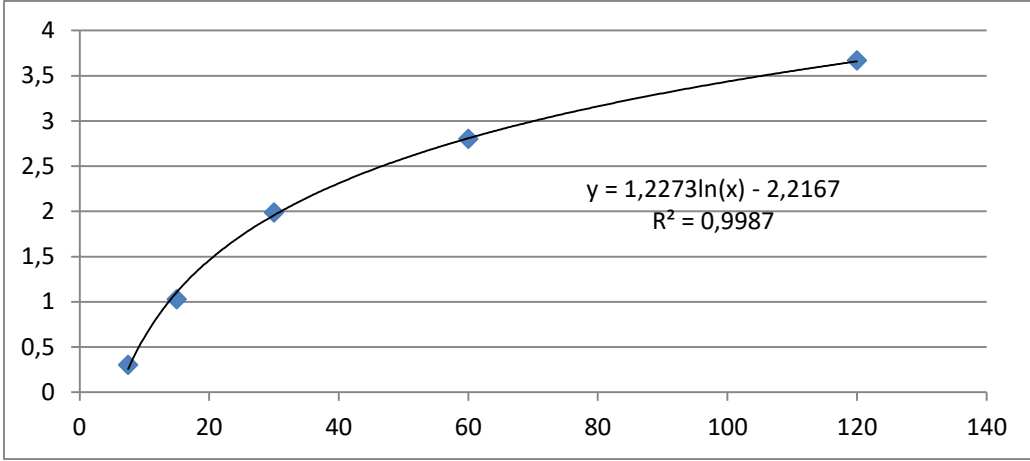


Şekil.3.6. Caspaz -3 standart grafiği

3.4.5. TNF- α düzeylerinin ölçümü

Balık için hazırlanmış olan ELISA kit kullanılmıştır. Analiz esnasında kullanılacak tüm ajanlar, standart solüsyonlar ve numuneler oda sıcaklığına getirilmiştir.

1. BT Lab'dan temin edilen ELISA kit içerisindeki Microelisa Strip Plate kuyucuklarından standart için ayrılmış kuyucuğa standart çözelti eklendi.
2. Plate üzerindeki diğer kuyucuklara numunelerden 40 μ l ve üzerine 10 μ l anti-TNF- α antikoru eklendi. Ardından numune kuyularına ve standart kuyusuna 50 μ l streptavidin-HRP eklendi. Plate iyice karıştırıldı ve üzeri örtülerek 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.
3. İnkübe edilen numunelerin olduğu plaka 300 ml yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.
4. Her bir kuyucuğa 50 μ l substrat solüsyonu A ve ardından yine her bir kuyucuğa substrat solüsyonu B eklendi. Plate'in üzeri kapatıldı ve karanlıkta 37°C sıcaklıkta 10 dakika inkübe edildi.
5. Platedeki her bir kuyucuğa 50 μ l stop solüsyonu eklendi. Stop solüsyonu eklenince kuyucuklardaki çözeltilerin mavi rengi hemen sarıya döndüğü gözlemlendi.
6. Stop solüsyonu eklendikten sonra Microelisa Strip Plate üretici firma protokolü uygulanarak absorbansı 450 nm olan ELISA (Plate Reader) cihazında ölçüm yapılmıştır.
7. Standartlarının optik dansitelerine ve konsantrasyonlarına uygun aşağıdaki standart grafiği çizilerek oluşturulan formüle göre örneklerdeki düzeyler hesaplandı (şekil 3.3.).



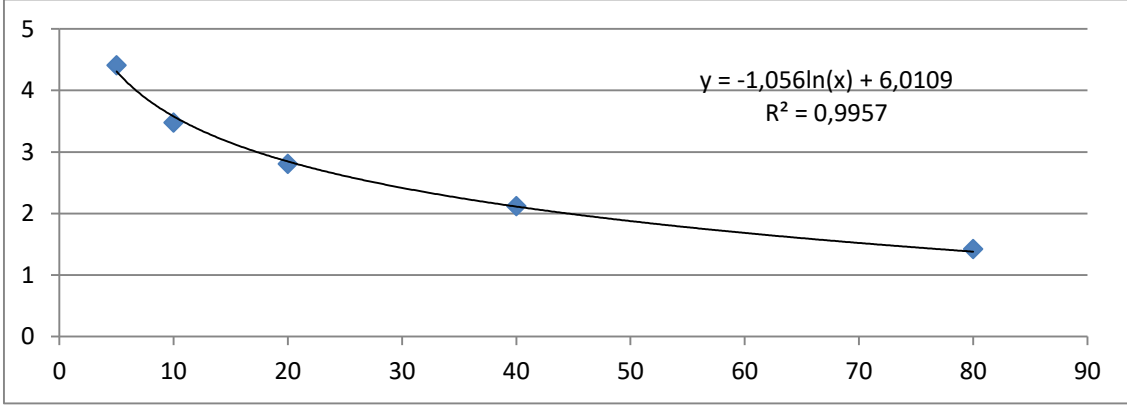
Şekil. 3.7. TNF-α standart grafiği

3.4.6. GSH düzeyinin ölçülmesi

Balık için hazırlanmış olan ELISA kit kullanılmıştır. Analiz esnasında kullanılacak tüm ajanlar, standart solüsyonlar ve numuneler oda sıcaklığına getirilmiştir.

1. BT Lab'dan temin edilen ELISA kit içerisindeki Microelisa Strip Plate kuyucuklarından kör olanlara substrat solüsyonu A, substrat solüsyonu B ve stop solüsyon eklendi.
2. Standart kuyucuklara oda sıcaklığına getirilmiş numunelerden 50µl ilave edilmiş ve üzerine 50µl biotinlenmiş antijen ilave edilip iyice karıştırıldı. Kuyucukların olduğu plakanın üzeri örtülerek 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.
3. İnkübe edilen numunelerin olduğu plaka 300 ml yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.
4. Standart kuyucuğa 50µl avidin eklenerek plaka üzeri kapatılmış 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.
5. Her bir kuyucuğa 50µl substrat solüsyon A ve ardından substrat solüsyon B eklenerek kuyucukların bulunduğu plaka 37°C'de karanlıkta 10 dakika bekletildi.
6. Plaka üzerindeki her bir kuyucuğa 50µl stop solüsyonu eklenerek Microelisa Strip Plate üretici firma protokolü uygulanarak absorbanı 450 nm olan ELISA (Plate Reader) cihazında ölçüm yapıldı.

7. Standartlarının optik dansitelerine ve konsantrasyonlarına uygun aşağıdaki standart grafiği çizilerek oluşturulan formüle göre örneklerdeki düzeyler hesaplandı.



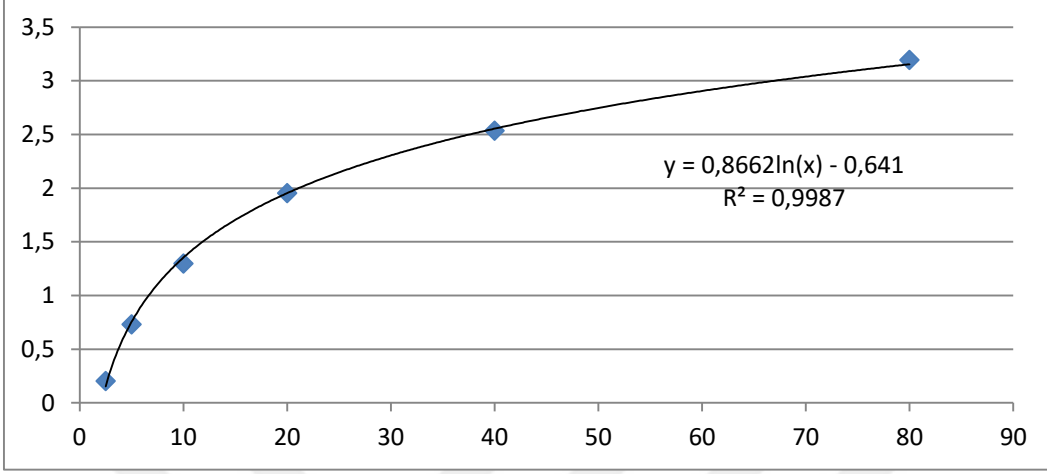
Şekil. 3.8. GSH standart grafiği

3.4.7. İnterlökin-6 düzeyinin ölçülmesi

Balık için hazırlanmış olan ELISA kit kullanılmıştır. Analiz esnasında kullanılacak tüm ajanlar, standart solüsyonlar ve numuneler oda sıcaklığına getirilmiştir.

1. BT Lab'dan temin edilen ELISA kit içerisindeki Microelisa Strip Plate kuyucuklarından kör olanlara substrat solüsyonu A, substrat solüsyonu B ve stop solüsyon eklendi.
2. Plate üzerindeki standart kuyucuğa 50µl standart çözelti eklendi.
3. Plate üzerindeki diğer kuyucuklara 40µl numune çözelti eklendi ve ardından 10µl anti-IL-6 antikorunu eklendi. Ardından numune ve standart kuyucuklara 50µl streptavidin-HRP çözeltisi eklendi. Kuyulardaki çözeltiler karıştırılıp plakanın üzeri örtülerek 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.
4. İnkübe edilen numunelerin olduğu plaka 300 ml yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.
5. Her bir kuyucuğa 50µl substrat solüsyon A ve ardından substrat solüsyon B eklenerek kuyucukların bulunduğu plaka üzeri örtülerek karanlık ortamda 10 dakika boyunca 37°C'de inkübe edildi.
6. Her bir kuyucuğa 50µl stop solüsyonu eklendi ve çözeltideki mavi rengin hemen sarıya döndüğü gözlemlendi.

7. Standartlarının optik dansitelerine ve konsantrasyonlarına uygun aşağıdaki standart grafiği çizilerek oluşturulan formüle göre örneklerdeki düzeyler hesaplandı (Şekil. 3.5.).



Şekil. 3.9. IL-6 standart grafiği

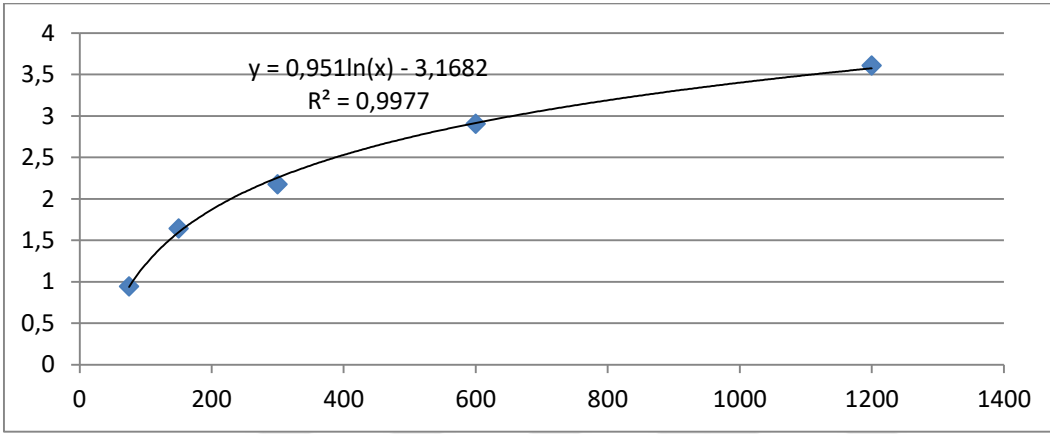
3.4.8. NF-kB düzeyinin ölçülmesi

Balık için hazırlanmış olan ELISA kit kullanılmıştır. Analiz esnasında kullanılacak tüm ajanlar, standart solüsyonlar ve numuneler oda sıcaklığına getirilmiştir.

1. BT Lab'dan temin edilen ELISA kit içerisindeki Microelisa Strip Plate kuyucuklarından kör olanlara substrat solüsyonu A, substrat solüsyonu B ve stop solüsyon eklendi.
2. Plate üzerindeki diğer kuyucuklara 40µl numune çözelti eklendi ve ardından 10µl anti-NF-kB antikoru eklendi. Ardından numune ve standart kuyucuklara 50µl streptavidin-HRP çözeltisi eklendi. Kuyulardaki çözeltiler karıştırılıp plakanın üzeri örtülerek 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.
3. İnkübe edilen numunelerin olduğu plaka 300 ml yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.
4. Her bir kuyucuğa 50µl substrat solüsyon A ve ardından substrat solüsyon B eklenerek kuyucukların bulunduğu plaka 37°C'de karanlıkta 10 dakika bekletildi.
5. Her bir kuyucuğa 50µl stop solüsyonu eklendi ve çözeltideki mavi rengin hemen sarıya döndüğü gözlemlendi.

6. Plaka üzerindeki her bir kuyucuğa 50µl stop solüsyonu eklendikten sonra Microelisa Strip Plate üretici firma protokolü uygulanarak absorbansı 450 nm olan ELISA (Plate Reader) cihazında ölçüm yapıldı.

7. Standartlarının optik dansitelerine ve konsantrasyonlarına uygun aşağıdaki standart grafiği çizilerek oluşturulan formüle göre örneklerdeki düzeyler hesaplandı (Şekil.3.6.).



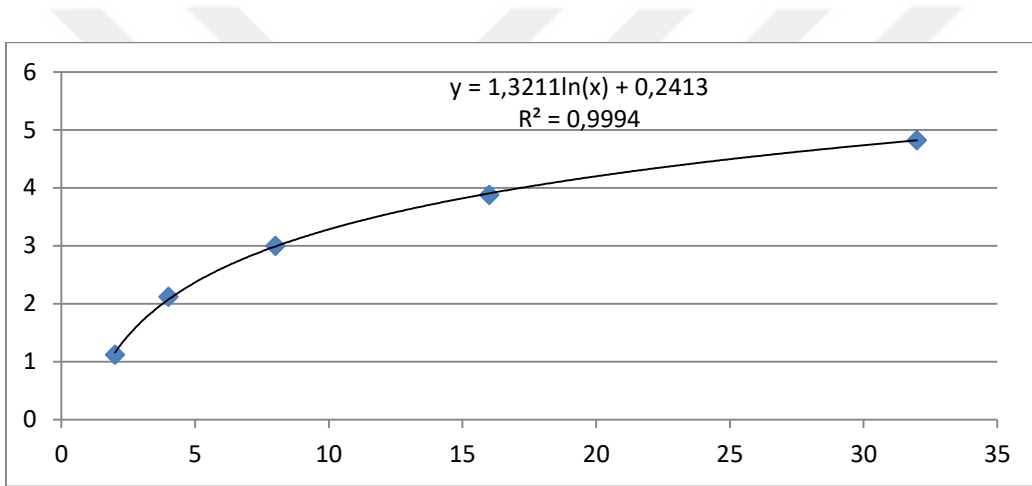
Şekil. 3.10. NF-kB standart grafiği

3.4.9. NRF-2 düzeyinin ölçülmesi

Balık için hazırlanmış olan ELISA kit kullanılmıştır. Analiz esnasında kullanılacak tüm ajanlar, standart solüsyonlar ve numuneler oda sıcaklığına getirilmiştir.

1. BT Lab'dan temin edilen ELISA kit içerisindeki Microelisa Strip Plate kuyucuklarından kör olanlara substrat solüsyonu A, substrat solüsyonu B ve stop solüsyon eklendi.
2. Plate üzerindeki diğer kuyucuklara 40µl numune çözelti eklendi ve ardından 10µl anti-NRF-2 antikoru eklendi. Ardından numune ve standart kuyucuklara 50µl streptavidin-HRP çözeltisi eklendi. Kuyulardaki çözeltiler karıştırılıp plakanın üzeri örtülerek 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.
3. İnkübe edilen numunelerin olduğu plaka 300 ml yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.

4. Her bir kuyucuğa 50µl substrat solüsyon A ve ardından substrat solüsyon B eklenerek kuyucukların bulunduğu plaka 37°C’de karanlıkta 10 dakika bekletildi.
5. Her bir kuyucuğa 50µl stop solüsyonu eklendi ve çözeltildeki mavi rengin hemen sarıya döndüğü gözlemlendi.
6. Plaka üzerindeki her bir kuyucuğa 50µl stop solüsyonu eklendikten sonra Microelisa Strip Plate üretici firma protokolü uygulanarak absorbansı 450 nm olan ELISA (Plate Reader) cihazında ölçüm yapıldı.
7. Standartlarının optik dansitelerine ve konsantrasyonlarına uygun aşağıdaki standart grafiği çizilerek oluşturulan formüle göre örneklerdeki düzeyler hesaplandı (Şekil.3.7.).

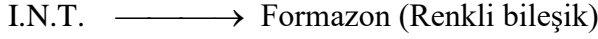


Şekil. 3.11. NRF-2 standart grafiği

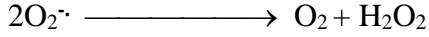
3.4.10. Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi tayini

Prensip: Süperoksit dismutaz enziminin en önemli işlevi, metabolizmada üretilen ya da uyarı sonucu oluşan ve toksik özellik gösteren süperoksit radikalinin hidrojen peroksite ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlamaktır. Bu metotta ksantin ve ksantin oksidaz beraber kullanılarak oluşan süperoksit radikali, 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride (I.N.T.) ile beraber kırmızı renkli bir görüntü alır. Bunun sonunda Süperoksit dismutaz enziminin aktivitesi, bu reaksiyonun inhibisyon derecesi ile ölçüldü (Flohe ve Ötting, 1984; Xia ve ark., 1995).

Ksantin Oksidaz



SOD



Deneyin yapılışı: Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi Randox -Ransod enzim kiti ile beraber 505 nm'de 37°C'de spektrofotometrede absorbans değerleri ölçülerek belirlendi. Analiz için hazırlanan süpernatantlardan her örnek için ependorf tüplere 15 µl ilave edilerek aşağıda ayrıntılı verilen pipetleme işlemleri yapıldı.

	<u>Ayıraç körü</u>	<u>Standartlar</u>	<u>Sulandırılmış örnek</u>
Sulandırılmış örnek	-----	-----	15 µl
Standart	-----	15 µl	-----
Fosfat Tamponu	15 µl	-----	-----
Karışık Substrat	500 µl	500 µl	500 µl
Ksantin oksidaz	75 µl	75 µl	75 µl

İçerik karışması sağlandıktan 30 saniye sonra ilk absorbans değeri A_1 okundu ve eş zamanlı olarak zaman başlatıldı. Birinci okuma işleminden sonra ikinci absorbans ise A_2 3 dakika sonra ölçülerek kaydedildi.

Numuneler için spektrofotometreden aldığımız absorbans değerleri aşağıda gösterilen formülde hesaplanarak SOD enziminin % inhibisyonları hesaplandı.

$$100 - \frac{(\Delta A_{\text{StdDk.}} \times 100)}{(\Delta A_{\text{Blank Dk.}})} = \% \text{ İnhibisyon}$$

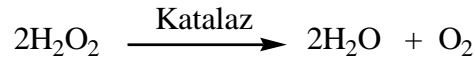
$$100 - \frac{(\Delta A_{\text{Örnek Dk.}} \times 100)}{(\Delta A_{\text{Blank Dk.}})} = \% \text{ İnhibisyon}$$

Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi, yapılan standart çalışması sonucu elde edilen standart konsantrasyon grafiğine göre hesaplandı.

3.4.11. Katalaz (CAT) enzim aktivitesinin tayini

Prensip: Hidrojen peroksitin (H₂O₂) katalaz enzimi tarafından su ve moleküler oksijene parçalanması prensibine dayanmaktadır. Bu işlem Aebi (1984)'nin UV spektrofotometrik metodu kullanılmıştır.

Katalaz hidrojen peroksidi suya ve oksijene parçalar.



Deneyin yapılışı: CAT enzim aktivitesi, Aebi (1984)'nin yöntemine dayanarak otoanalizörde 240 nm'de ölçüldü. Örnekler küvete aşağıdaki ayraçlar pipetlendi:

<u>Numune</u>	<u>Kör</u>
0,500 ml numune	0.250 ml fosfat tamponu (tampon karışımı)
0.250 ml H ₂ O ₂	

Katalaz peroksit reaksiyonu gerçekleşmesi ile zamanın bir fonksiyonu olarak belirgin bir şekilde azalan absorbans değerleri 0 sn ve 15 sn süresince 240 nm'de okundu. Katalaz enzim aktivitesi absorbans değerinin zamanla azalışı aşağıdaki gibidir.

A₁:0 sn

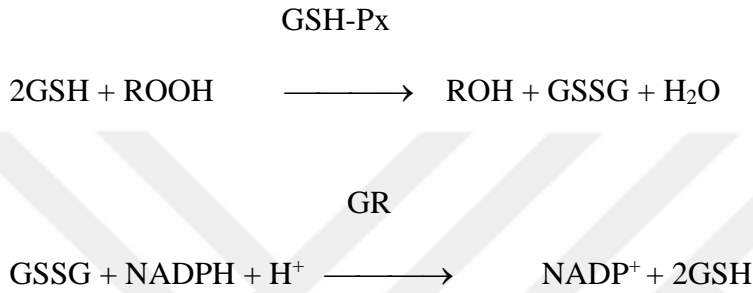
A₂:15 sn

K= (2.3/15) (log A₁ / A₂)

K=0.153(log A₁ / A₂) U/mg

3.4.12. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktivitesi tayini

Prensip: GSH-Px, aşağıda gösterildiği gibi kümen hidroperoksit ile indirgenmiş hale getirilen glutasyon (GSH)'nu oksitleyerek glutatona (GSSG) yükseltger. Ortamda glutasyon redüktaz (GR) enzimi ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat hidrojen (NADPH) bulunuyorsa yükseltgenmiş halde olan glutasyon (GSSG), NADPH'ın NADP'ye yükseltgenmesi ile GSH'a indirgenir (Paglia ve Valentine, 1967; Flohe ve Gunzler, 1984).



Deneyin yapılışı: GSH-Px enzim aktivitesi, Randox-Ransel enzim kitleri ile beraber spektrofotometre cihazında 340 nm'de 37°C'de ölçüldü. Aşağıda görüldüğü gibi küvete aşağıdaki ayıraçlar pipetlendi.

	<u>Ayıraç körü</u>	<u>Sulandırılmış örnek</u>
Sulandırılmış örnek	-----	10 µl
Distile Su	10 µl	-----
Ayıraç	500 µl	500 µl
Kümen	20 µl	20 µl

Küvetler örnekler karıştırıldı, örnek ve körün absorbans değerleri 1 dakika sonra cihazdan okundu. Süre tutularak, 1 ve 2 dakika sonra absorbans değerleri tekrar okundu. Her iki süre arasındaki absorbans değişimi hesaplandı.

$$U/I \text{ Hemolizat} = 8412 \times \Delta A_{340 \text{ nm}} / \text{dakika.}$$

3.4.13. 8-Hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) düzeyinin belirlenmesi

Balığın beyin dokusundaki 8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin (8-OHdG) düzeylerinin belirlenmesi amacıyla Fish(8-OHdG) ELISA kit (Catalogue No:201-00-0041) (SunRed marka) kullanıldı. Ölçümü başlatmadan yarım saat önce kit malzemeleri odada 30 dakika bekletilerek oda sıcaklığına getirildi (Standart, Standard diluent, Microelisa Strip Plate, Str-HRP-Conjugate Reagent, 30X Wash solution, Biotin-(8-OHdG) Ab, Chromogen Solution A, Chromogen Solution B, Stop Solution).

1. 8-OHdG standardı ölçüm yapmak üzere standard diluent ile birlikte hazırlanır. Hazırlanmış olan standartlar Microelisa Strip Plate içerisine 50 µl olarak şekilde eklenir. Boş bir kuyucuk da blank olarak seçildi.
1. Diğer herbir kuyucuklara 40 µl numune örneklerinden ilave edildi.
2. Her bir kuyucuğa 50 µl Str-HRP-Conjugate Reagent ilave edildi ve sadece numune örnekleri bulunduğu kuyucuk üzerine 10 µl Biotin-(8-OHdG) Ab eklenerek pleytin üzeri örtüldü.
3. Pleyt, 37°C sıcaklığında Plate Shaker yardımı ile 1 saat süreyle inkübe edildi.
4. Pleyt kuyucukları, bidistile saf su ile 30 defa dilue edilen 30X Wash Buffer ile (300 µl /kuyucuk olacak şekilde), 1-2dk sürecek şekilde 5 defa yıkandı.
5. Yıkama sonrasında herbir tüpe 50 µl Chromogen Solution A ve daha sonra 50 µl Chromogen Solution B ilave edildi.
6. Karanlıkta ve 37°C sıcaklığında Plate Shaker'ında 10 dk sbekletilerek inkübasyon sağlandı.
7. İnkübe edilen numunelerin bulunduğu plate kuyucuklarına 50 µl Stop Solution ilave edilerek 10 dakika içerisinde absorbansı 450 nm olan ELISA (Plate Reader) cihazında ölçüm yapılarak değerler okundu.
8. 8-OHdG standartlarının optik dansitelerine ve konsantrasyonlarına uygun olacak şekilde standart grafiği çizilerek hazırlanmış formüle göre örneklerdeki 8-OHdG düzeyi hesaplandı.

3.4.14. Asetilkolinesteraz aktivite analizi

Kontrol, DMSO kontrol ve bununla beraber 4.28 mh/L MP uygulaması yapılan balıklardan alınan beyin dokusundaki AChE aktiviteleri, Elman ve ark. (1961)'nın oluşturduğu renk şiddeti değişimi metoduna göre hesaplandı. Aşağıda gösterilen işlemler uygulandı.

a) Herbir beyin dokusundan 1 g örnek alındı, 10 mL tampon çözelti eklenerek (buz üzerinde) ultrasonik homojenizatör cihazı (Ultrasonic processor, Jencons ScientificLtd.) kullanılarak homojenize hale getirildi.

Homojenat tampon çözelti hazırlanışı:

0.356 g sodyum fosfat ((Na₂HPO₄) ve 8.25 g sakkaroz tartılarak 50 ml distile suda çözdüldü. İşlem sonrasında çözelti pH'sı 7.4'e getirildi. Elde edilen solüsyona saf su ilave edilerek çözelti hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

b) Hazırlanan homojenatlar 4 °C sıcaklıkta ve 30 dk boyunca 9000 rpm'de santrifüj (Hettich Zentrifugen Universal 320) edilerek elde edilen süpernatantlar, aktivite tayini ölçümü yapılmak üzere saklandı.

c) Bir tane kör numune ve bir tane de enzim aktivitesinin tayini ölçümü için iki tüp örnek alındı ve örneklerin bulunduğu tüplerin her birisine 100 µl 1 M 5,5'-ditiyobis 2 nitrobenzoik asit (DTNB) ve 100 µl daha önce hazırlanmış süpernatant eklendi

1 M 50 ml DTNB hazırlanışı:

0.4375 g Sodyum Fosfat Dihidrat (NaH₂PO₄.2H₂O) ve 0.075 g Sodyum Bikarbonat (NaHCO₃) tartılarak üzerine 20 ml saf su eklenerek çözdü ve pH'sı 7 de dengede olacak şekilde ayarlandı. Anlatıldığı gibi hazırlanmış solüsyona 0.198 g DTNB ilave edildi ve karışıma saf su ilave edilerek hacmi 50 ml'ye tamamlandı.

d) Kör olarak kullanılacak tüpler 65 °C sıcaklıkta 3 dakika boyunca su banyosunda bekletildi ve enzimin inaktif olması sağlandı.

e) Her iki tüpe de 2.7 ml hacminde sodyum tamponu çözeltisinden (0.05 M, Ph: 8) ilave edilerek karıştırıldı.

Örneklerin inkübe edilmesinden sonra absorbans değerleri, 412 nm dalga boyunda spektrofotometrede kör örnek baz alınarak ayarlama yapıldıktan sonra cihazdaki değerler okundu. Her bir ölçüm iki kez tekrar edildi.

AChE aktivitesi;

$$A = \frac{\Delta OD}{13.6} \times \frac{Vc}{Ve} \times f$$

Formülüne göre hesaplandı. Formül üzerinde yer alan;

A : Aktivite

ΔOD : 412 nm'de optik densitenin her bir dakikadaki değişimi

Vc : Küvetin hacmi

V_E : Küvette bulunan süpernatant hacmi

F : Seyreltme faktörü

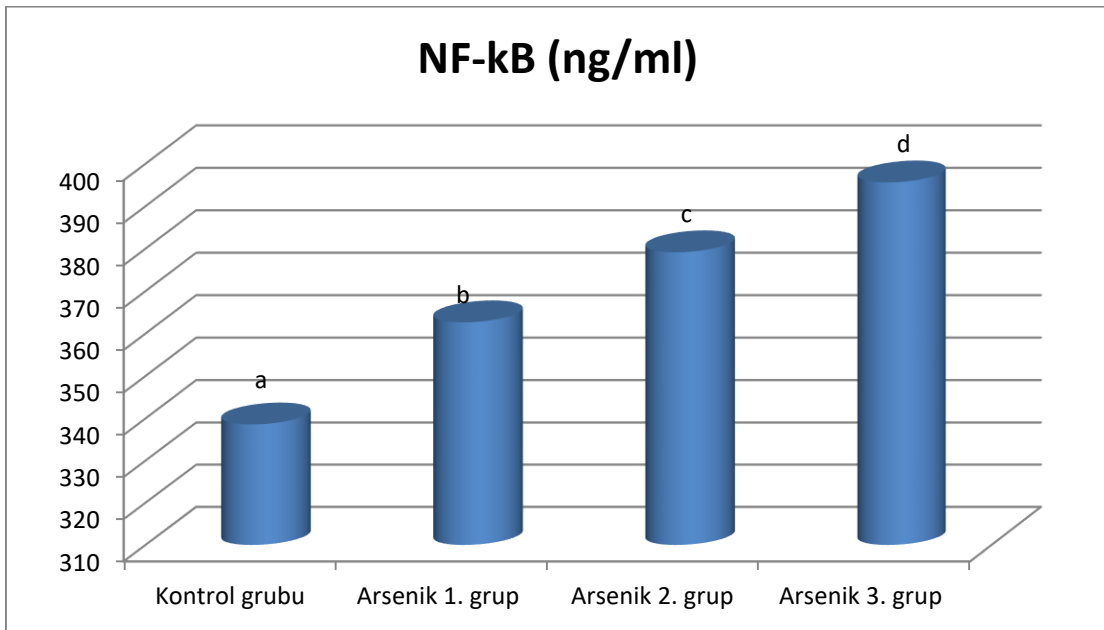
13.6 : 37 °C sıcaklık ve 412 nm'de 3 mM asetilyokolin iyodür ve butiriltiyokolin iyodür'ün indirgenmei ile okunan sabit değerdir. (ekstinksiyon sabiti: 1.36×10^4 mol/cm)

Olarak kullanıldı (Güloğlu ve ark., 2006).

4. BULGULAR

Çalışmada arseniğe maruz kalmış gökkuşığı alabalıklarının (*Onchorhynchus mykiss*) beyin dokusunda NK-FB, TNF- α , IL-6, NRF-2, GSH, Kaspaz-3, MDA, AChE, CAT, GSH-Px, SOD ve 8OHdG düzeyleri tespit edildi.

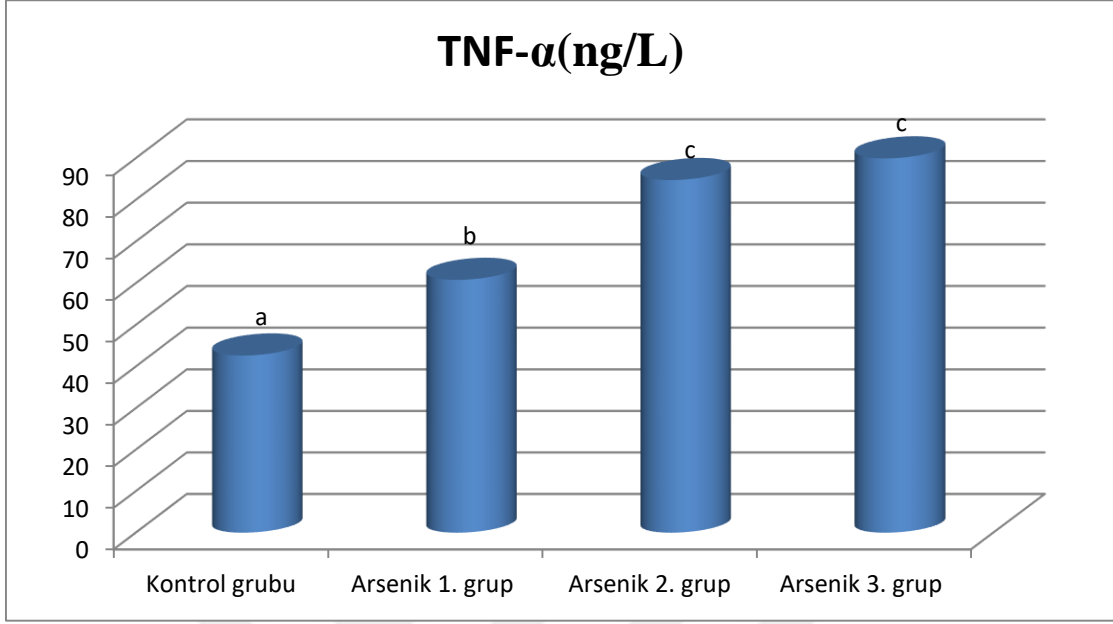
4.1. NF-kB aktivitesi sonuçları



Şekil 4.1. Gökkuşığı alabalığı beyin dokusundaki NF-kB aktivite düzeylerinin değişimi.

Şekil 4.1. incelendiğinde balıkların beyin dokusundaki NF-kB düzeyinin kontrol grubundaki balıklara nazaran arttığı gözlenmiştir. Bu protein türünün düzeyinin artışı tüm grup balıklarda belirgin düzeyde olmuştur. Bu artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur.

4.2. TNF- α aktivitesi sonuçları

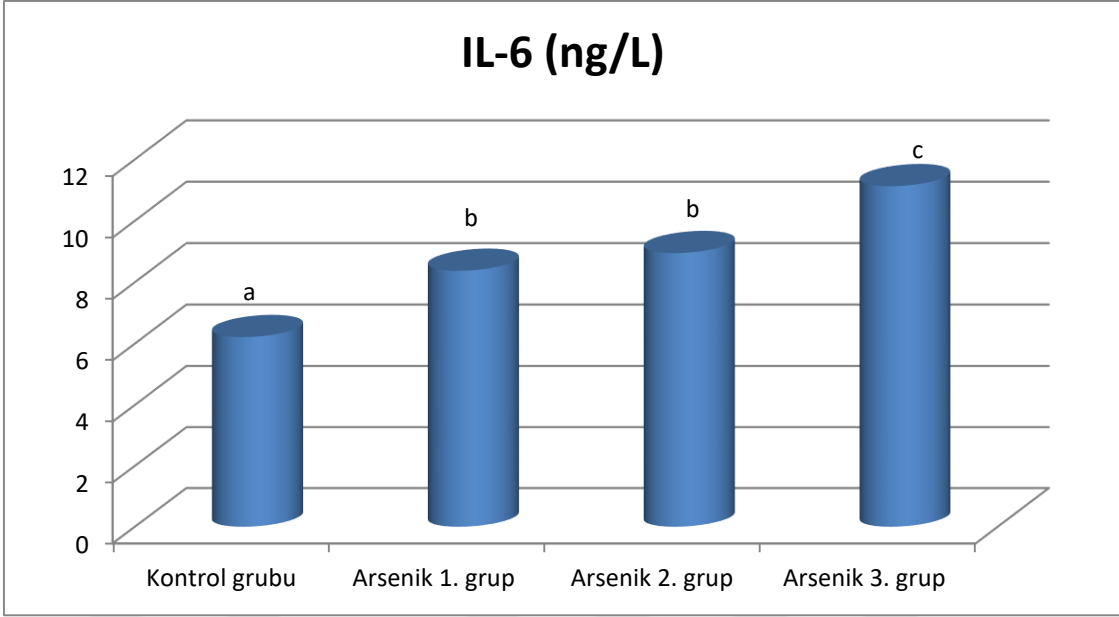


Şekil 4.2. Gökkuşığı alabalığı beyin dokusundaki TNF- α aktivite düzeylerinin değişimi.

Şekil 4.2. incelendiğinde balıkların beyin dokusundaki TNF- α düzeyinin kontrol grubundaki balıklara göre arttığı gözlenmiştir. Beyin dokusundaki bu sitokin türünün birinci ve ikinci gruplardaki artışı belirgin görülürken üçüncü grup balıklarda artış daha az olmuştur. Bu verilerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu anlaşılmıştır.

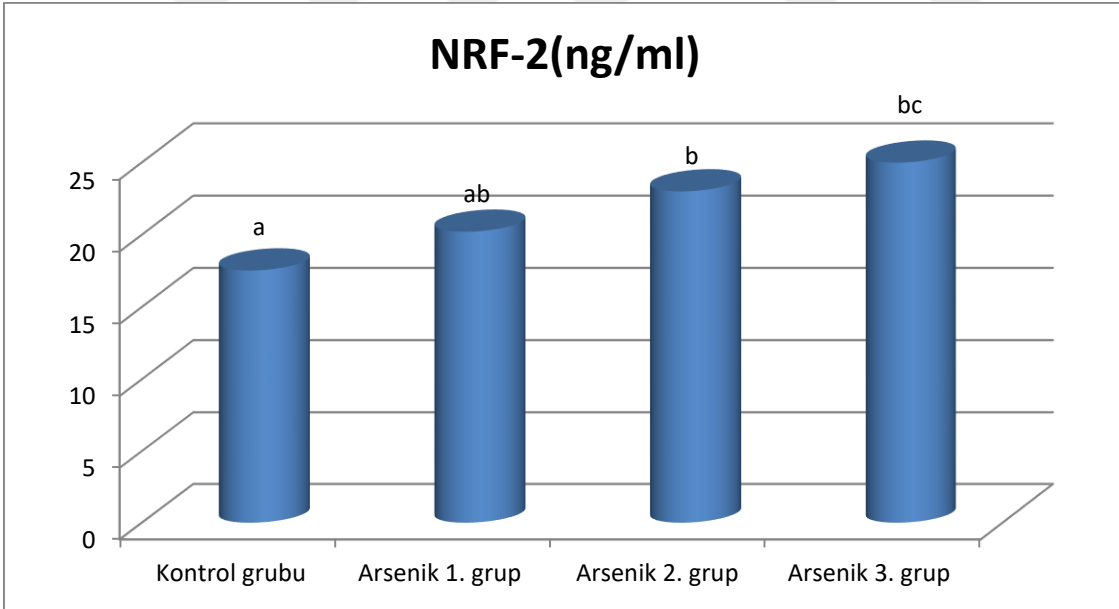
4.3. IL-6 aktivitesi sonuçları

Şekil 4.3. incelendiğinde balıkların beyin dokusundaki IL-6 düzeyinin uygulama gruplarında belirgin bir şekilde arttığı görülmüştür. Alabalıkların beyin dokusundaki IL-6 düzeylerindeki artış uygulama yapılan birinci ve üçüncü grup balıklarda yüksek miktarda olurken ikinci grup balıklarda daha az miktarda olmuştur. Kontrol grubuna göre arsenik uygulaması yapılan balıkların beyin dokusundaki IL-6 düzeylerindeki bu artış istatistiksel olarak uygun görülmektedir.



Şekil 4.3. Gökkuşağı alabalığı beyin dokusundaki IL-6 aktivite düzeylerinin değişimi.

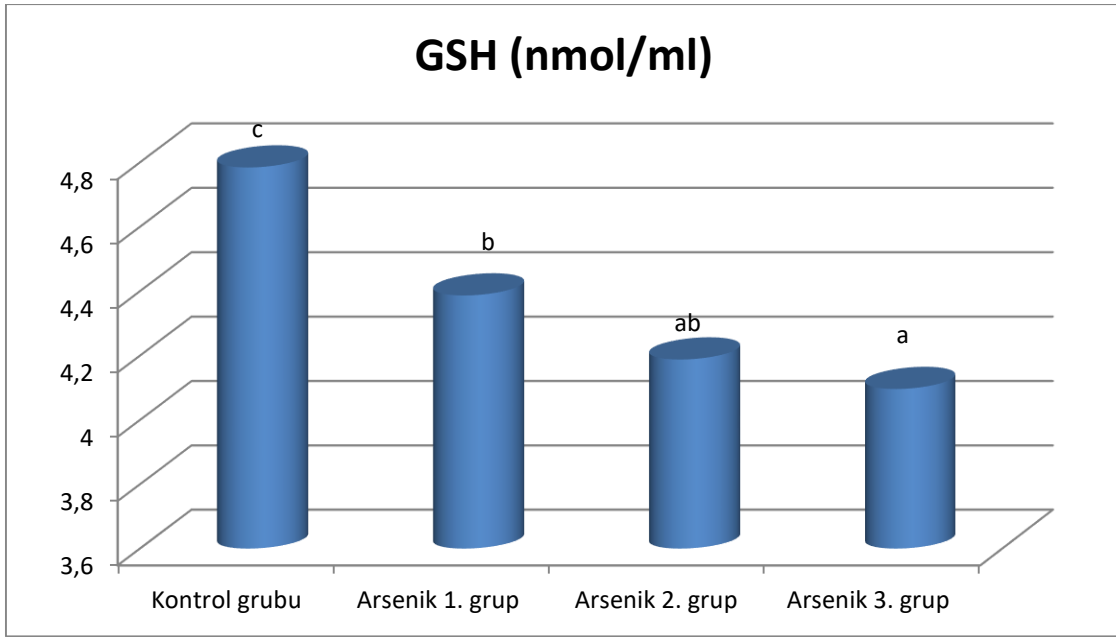
4.4. NRF-2 aktivitesi sonuçları



Şekil 4.4. Gökkuşağı alabalığı beyin dokusundaki NRF-2 aktivite düzeylerinin değişimi.

Şekil 4.4. incelendiğinde balıkların beyin dokusundaki NRF-2 düzeyinin kontrol grubundaki balıklara göre arttığı gözlenmiştir. Uygulama yapılan alabalıkların beyin dokusundaki NRF-2 artışının her üç grupta da belirgin olduğu görüldüğünden bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

4.5. GSH aktivitesi sonuçları



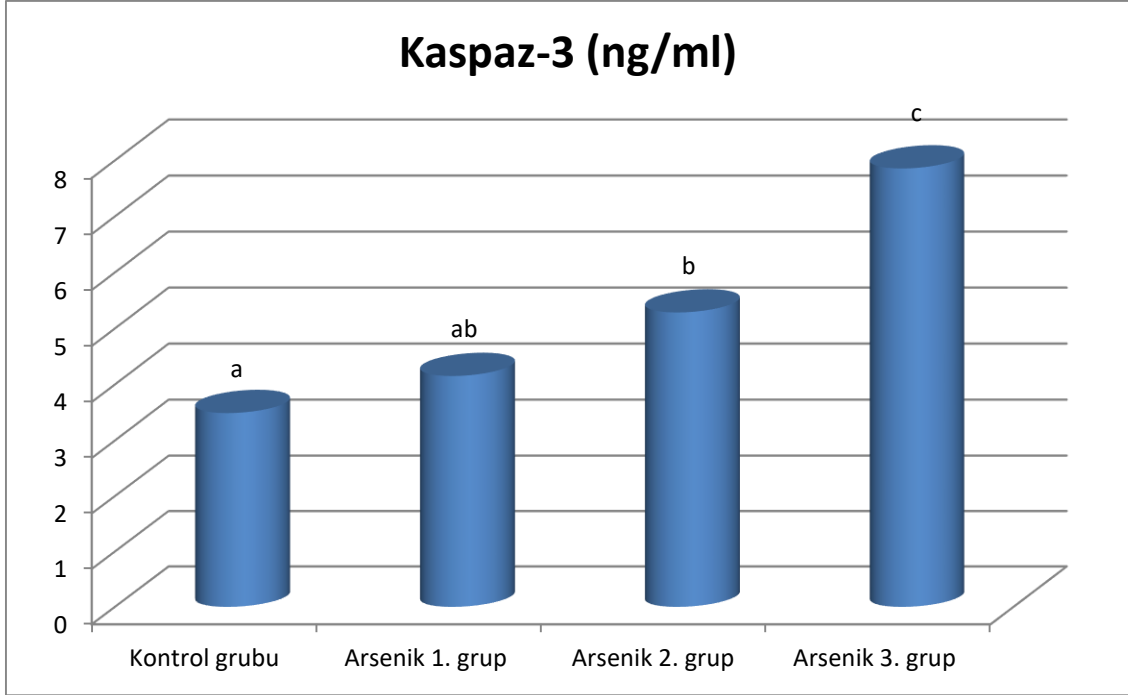
Şekil 4.5. Gökkuşaağı alabalığı beyin dokusundaki GSH aktivite düzeylerinin değişimi.

Şekil 4.5. incelendiğinde balıkların beyin dokusundaki GSH düzeyinin uygulama sonrası düştüğü görülmüştür. Arseniğe maruz kalan çalışma grubu balıkların birinci ve ikinci grubundaki GSH düzeylerindeki düşüş çok belirgin olmasına karşın üçüncü grup balıklarda bu düşüşün ikinci gruba göre daha az olduğu görülmektedir.

4.6. Kaspaz-3 aktivitesi sonuçları

Şekil 4.6. incelendiğinde balıkların beyin dokusundaki Kaspaz-3 düzeyinin kontrol grubundaki balıklara göre artış olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızdaki

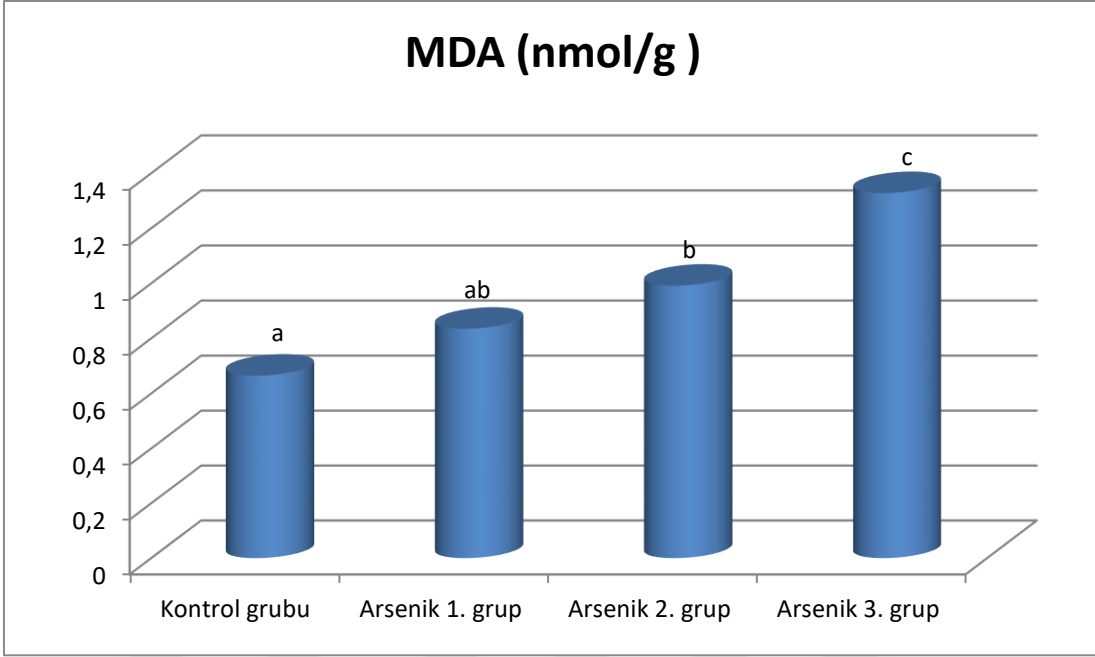
bulgulara arsenik uygulaması sonrası balıkların beyin dokusundaki Kaspaz-3 düzeyindeki artış birinci ve ikinci grup balıklarda az miktarda olduğu görülürken, üçüncü grup balıklarda bu artışın daha yüksek oranda olduğu görülmüştür. Uygulama gruplarındaki bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



Şekil 4.6. Gökkuşığı alabalığı beyin dokusundaki Kaspaz-3 aktivite düzeylerinin değişimi.

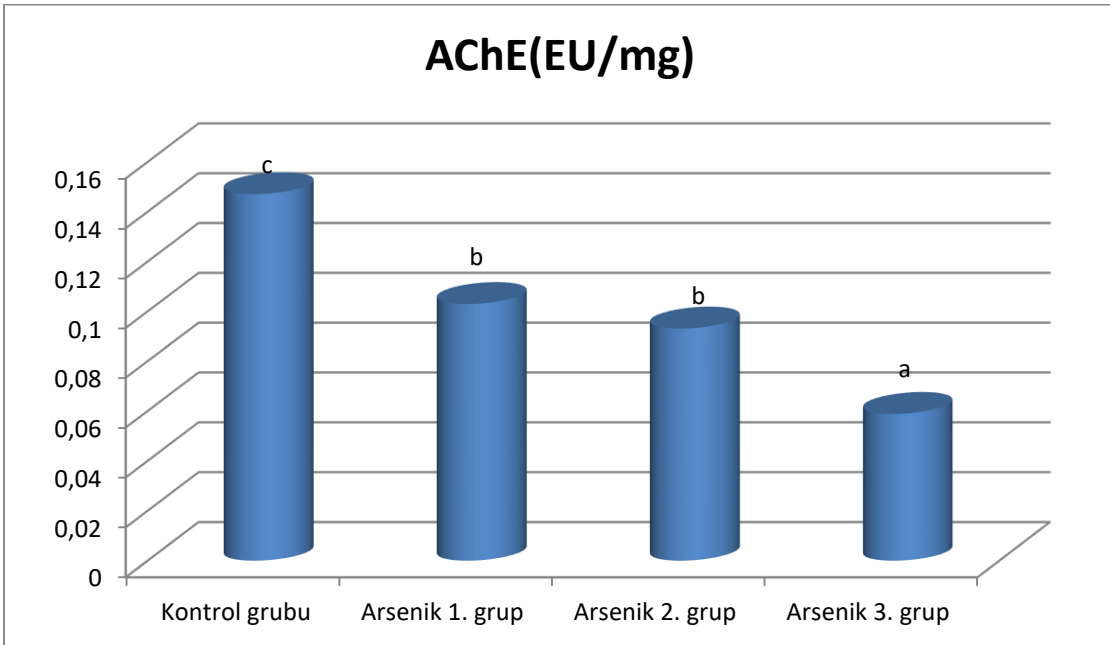
4.7. MDA aktivitesi sonuçları

Şekil 4.7. incelendiğinde balıkların beyin dokusundaki MDA düzeylerinde belirgin bir artış olduğu görülmektedir. Çalışmamızda uygulama yapılan her üç grup balıkların beyin dokusundaki MDA düzeylerinde doğrusal olarak bir artış görüldüğünden elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur



Şekil 4.7. Gökkuşığı alabalığı beyin dokusundaki MDA aktivite düzeylerinin değişimi.

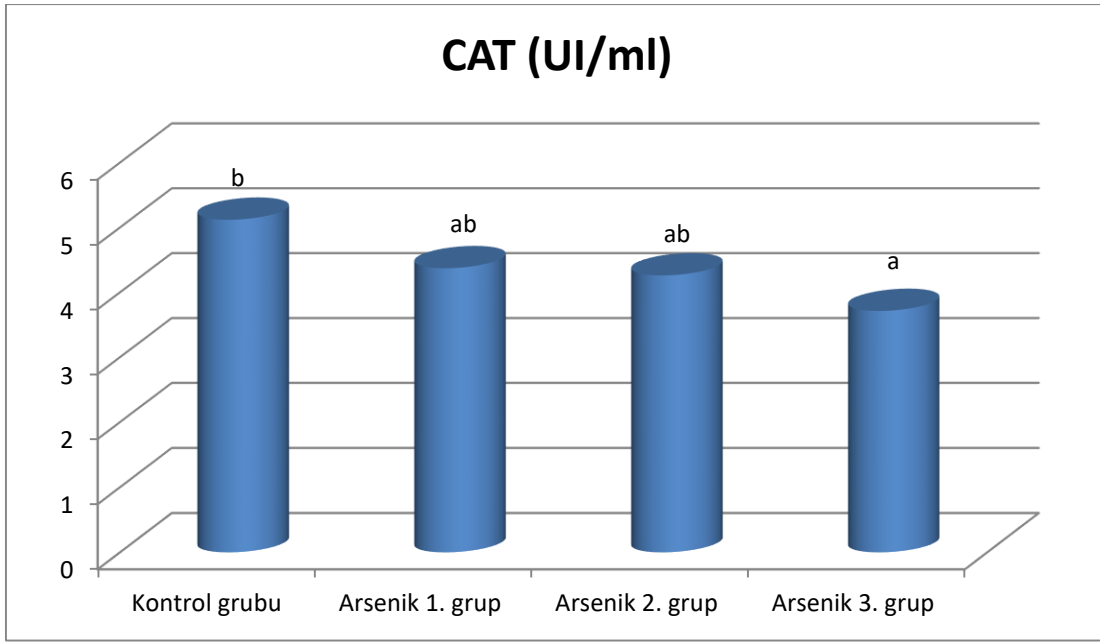
4.8. AChE enzim aktivitesi sonuçları



Şekil 4.8. Gökkuşığı alabalığı beyin dokusundaki AChE aktivite düzeylerinin değişimi.

Şekil 4.8. incelendiğinde balıkların beyin dokusundaki AChE düzeyinde uygulama sonrası birinci ve üçüncü grup balıklarda belirgin bir düşüş gözlenirken ikinci grup balıklardaki düşüş birinci grup balıklara göre daha az olduğu görülmüştür. Beyin dokusundaki AChE düzeylerindeki bu azalma anlamlı bulunmuştur.

4.9. Katalaz enzim aktivitesi sonuçları



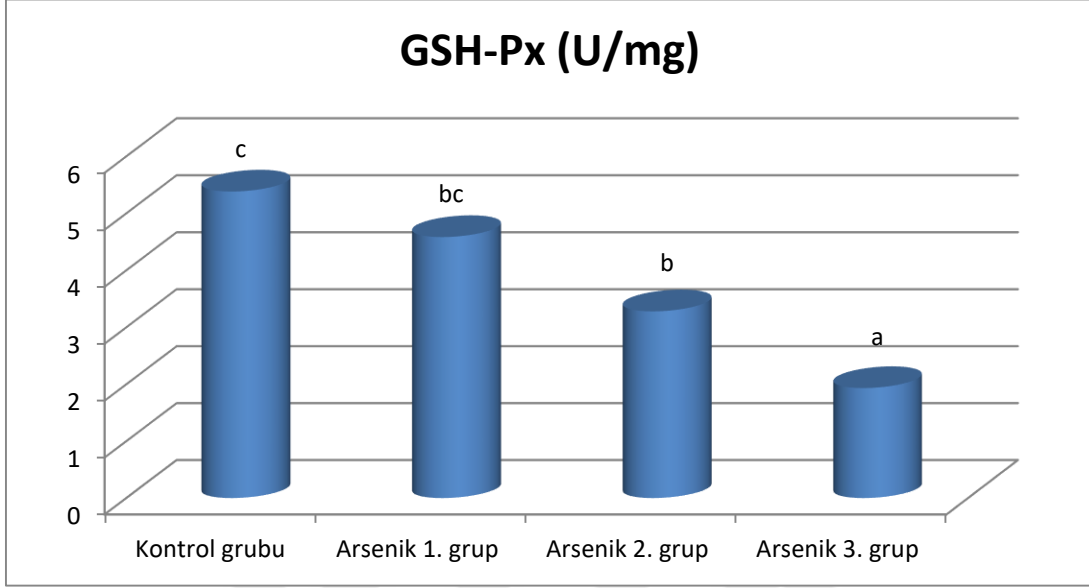
Şekil 4.9. Gökkuşığı alabalığı beyin dokusundaki CAT aktivite düzeylerinin değişimi.

Şekil 4.9. incelendiğinde arseniğe maruz kalan balıkların beyin dokusundaki CAT düzeyinin arseniğe maruz kalmayan gruptaki balıklara göre düşüş olduğu gözlenmiştir. Uygulama yapılan balıkların birinci ve üçüncü grupta bulunanlarda bu düşüş çok belirgin iken ikinci grup balıklarda bu düşüş daha az olmuştur.

4.10. Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi sonuçları

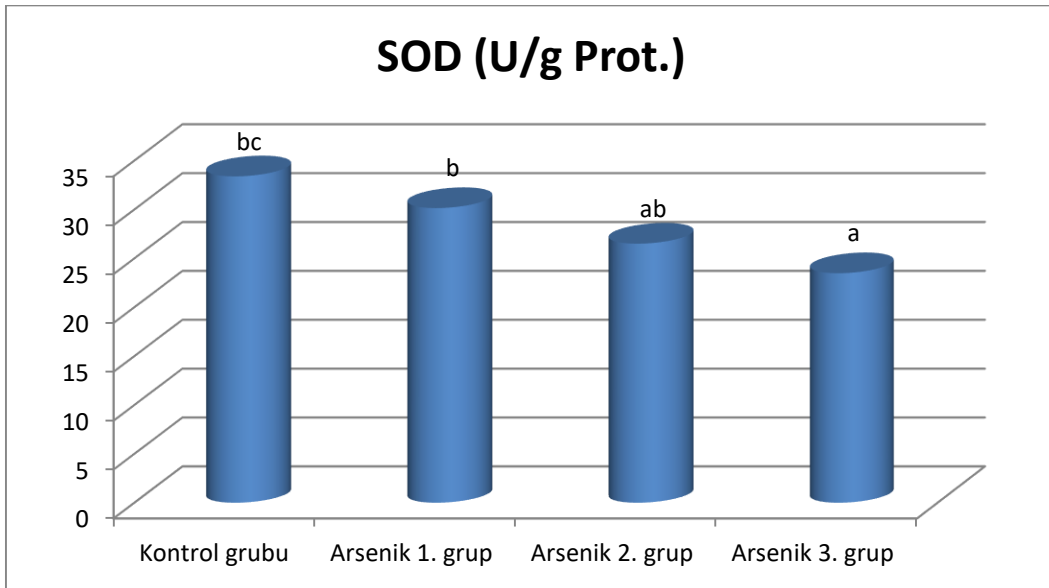
Şekil 4.10. incelendiğinde arsenik uygulanmış balıkların beyin dokusundaki GSH-Px düzeyinin kontrol grubundaki balıklara göre düşüş olduğu gözlenmiştir.

GSH-Px düzeylerinde her üç grupta da çok belirgin olan bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



Şekil 4.10. Gökkuşağı alabalığı beyin dokusundaki GSH-Px aktivite düzeylerinin değişimi.

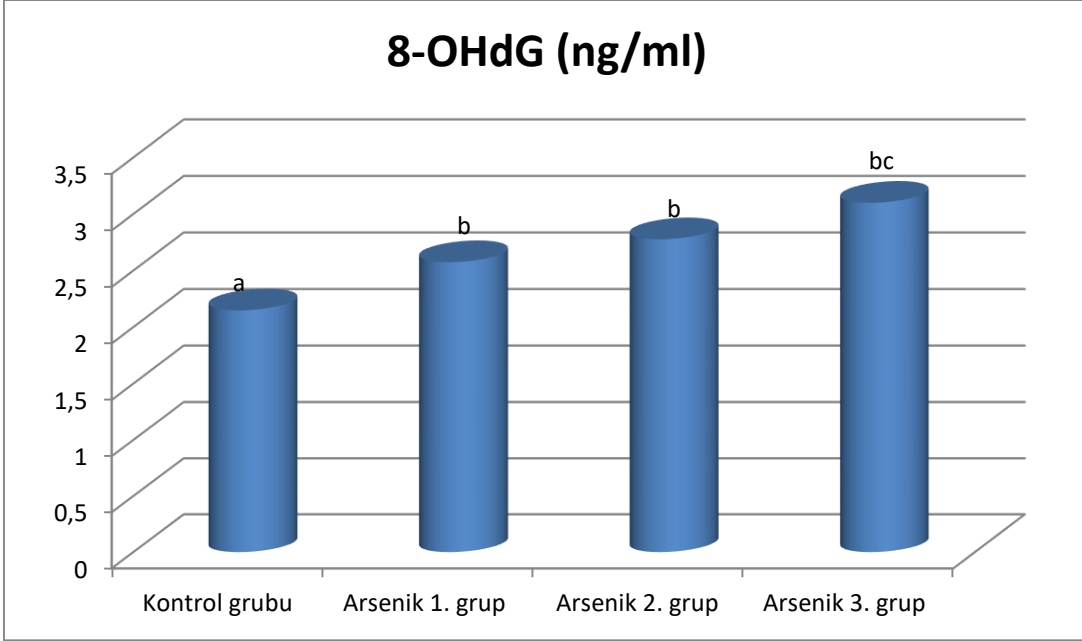
4.11. Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi sonuçları



Şekil 4.11. Gökkuşağı alabalığı beyin dokusundaki SOD aktivite düzeylerinin değişimi.

Şekil 4.11. incelendiğinde arsenik uygulanmış balıkların beyin dokusundaki SOD düzeyinde kontrol grubundaki balıklara göre her üç grupta da belirgin düşüş olduğu saptanmış olup bu düşüş anlamlı bulunmuştur.

4.12. 8OHdG düzeyi sonuçları



Şekil 4.12. Gökkuşuğu alabalığı beyin dokusundaki 8-OHdG aktivite düzeylerinin değişimi.

Şekil 4.12. incelendiğinde arsenik uygulanan balık gruplarının beyin dokularındaki 8-OHdG düzeylerinde kontrol grubuna göre belirgin bir artış görülmektedir. Her uygulama grubunda görülen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışma ile arseniğe maruz kalmış yavru alabalıkların (*Oncorhynchus mykiss*) beyin dokusundaki antioksidan enzimlerin ve bazı parametrelerin değişimleri (NF-kB, TNF- α , IL-6, NRF-2, Kaspaz-3, MDA, GSH, AChE, CAT, GSH-Px, SOD, MDA ve 8-OHdG) incelenerek elde edilen veriler değerlendirilmiştir.

Arsenik, kronik alımda sistein içeren protein bakımında zengin olan saç, tırnak ve ciltte birikir. Bu birikimin en fazlası ciğerde gerçekleşir. Yapılan çalışmalarda içme sularımızda yüksek miktarda arseniğin bulunmasının ciğer, böbrek, dalak ve cilt kanserine yakalanma riskinin arttığı görülmüştür. Aynı zamanda vücuda alınan arseniğin sinir sistemini etkileyerek vücutta salgılanan hormonların salgılanma düzeyini bozduğu saptanmıştır (Lenoble ve ark., 2002). Arsenik Dünya üzerinde en fazla bulunan elementlerden biridir. Metaloid olarak adlandırılan arsenik birçok endüstride hammadde olarak kullanılır. Başta insan olmak üzere birçok canlı organizmayı olumsuz yönde etkiler. Özellikler yeraltı sularına karışan arsenik çok ciddi sağlık sorunlarına neden olabilmektedir (Başkan ve Pala, 2009).

Deney hayvanları ile yapılan çoğu çalışma, serbest radikallerin hayvandaki hücreler üzerindeki toksik etkisini ve antioksidan enzimlerin bu etkiler üzerinde pozitif yöndeki iyileştirici etkilerini göstermiştir (Li ve ark., 2011).

Li ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada yılanbaşı balığına kurşun uygulaması yapılmış ve balıkların karaciğer, solungaç, böbrek, bağırsak ve kas dokularında kaspaz-3, TNF- α , NF-kB ve IL-6 düzeylerinde ciddi oranda artış olduğu görülmüştür (Li ve ark., 2021). Ayrıca Cheng ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada çamur yengeci farklı konsantrasyonlarda kadmiyuma maruz bırakılmıştır. Yengeçlerin uygulamadan 48 saat sonra pankreas dokuları incelendiğinde oluşan oksidatif stres kaynaklı olarak NRF-2 düzeylerinde önemli ölçüde artış olduğu görülmüştür (Cheng ve ark., 2022). Yaptığımız çalışmada arsenik uygulaması yapılan balıkların beyin dokusundaki TNF- α , IL-6, NRF-2 ve NF-kB düzeylerindeki artış bu çalışma ile uyumlu sonuç vermiş olduğunu gördük. TNF- α ve IL-6 gibi sitokinler inflamasyon ve oksidatif stres anında tepki göstererek patojenlerin yok edilmesi amacı ile bağışıklık sistemini harekete geçirdiği bilinmektedir. Hücrede oluşan oksidatif strese karşı savunma sistemlerinin ana belirleyicisi olan Nrf2/Keap1 sinyal yolağı,

hasar görmüş makro moleküllerin hasarının giderilmesi veya tamamen yok edilmesinde aktif rol oynayan çeşitli hücre koruyucu protein ağlarına ait gen ekspresyonlarını düzenleyerek, hücrenin oksidatif stres altında hayatta kalmasını sağlayan en önemli etmenlerden biridir (Dinkova ve Kostov, 2012). NF- κ B, bağışıklık ve yangı ve iltihaplanma yanıtlarını da içeren çoğu gen için regülatör olarak önemli bir rol üstlenir. Bunun için NF- κ B'nin doğal ve sonradan kazanılmış immün yanıtlarda çok önemli düzenleyici etmen olabileceği düşünülmektedir (Qiu ve ark., 2020). Balıkların arseniğe maruz kalması ile oluşan oksidatif strese karşı kalkan olmak ve makro moleküllerin hasarını gidermek veya tamamen yok etmek amacı ile NRF-2 ve NF- κ B düzeylerinin arttığı görülmüştür.

Cıva (II) klorüre maruz kalan gökkuşuğu alabalıklarının beyin dokularında MDA ve 8-OHdG seviyeleri yükselmiş, beyin dokusunda oksidatif stres olduğu anlaşılmıştır (Taysı, 2019). Ayrıca ağır metale maruz kalan pasifik kırmızı balıklarında oksidatif stresin arttığı ve apoptoz yollarındaki kaspaz-2, kaspaz-3 ve kaspaz-7 aktivitelerinde artış olduğu gözlenmiştir (Becerril ve ark., 2019). Arsenik uygulaması yaptığımız çalışmada balıkların beyin dokusunda MDA ve 8-OHdG seviyelerindeki belirgin bir artış görülmüştür. Yaptığımız çalışmanın sonuçlarının yukarıda belirtilen iki çalışma ile uyum içerisinde olduğu görülmektedir. Ayrıca çalışmamızda arsenik uygulaması sonrası balıkların beyin dokularında kaspaz-3 düzeylerinin arttığı da görülmüştür. Apoptoz yolağının başlatıcı kaspazı olan kaspaz-3'ün oluşan oksidatif stres sonucu hasar gören hücrelerde bu hasarı gidermek için düzeylerinin arttığı düşünülmektedir. Çalışmamız Becerril ve arkadaşlarının (2019) yaptığı çalışma ile benzer sonuçlar göstermiştir.

Serdar ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada farklı Pb konsantrasyonlarına (10 μ g, 20 μ g, 30 μ g) maruz bırakılan *Gammarus pulex* bireylerinde tüm konsantrasyonlarda GPx ve CAT enzim aktivitelerinin önemli derecede azalma meydana gelmiştir. SOD enzim aktivitesinde 1. ve 3. grup bireylerde fazla değişim gözlenmezken 2. grup bireylerde enzim aktivitesinde fark edilir bir düşüş olduğu görülmüştür. Bunun nedeninin enzim moleküllerinin aktif bölgelerindeki -SH gruplarına metal bağlanması olduğu düşünülmektedir (Serdar ve ark., 2019). Çalışmamızda her üç enzim aktivitesinin de yukarı çalışmaya benzer şekilde düştüğü

görülmüştür. SOD, CAT ve GPx enzimlerinin aktivitelerinin düşüş sebebi, arsenik maruziyeti sonrası artan serbest radikal oluşumu olabilir.

Suwanprasert ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada afrika yayın balıklarına 2, 4 ve 6 ay boyunca kadmiyum uygulanmış ve uygulama sonucunda balığın karaciğer ve böbrek dokularında AChE aktivitesi değerlendirilmiştir. Uygulama sonucunda kadmiyuma maruz kalmış balıkların dokularında kontrol grubuna göre belirgin bir düşüş olduğu bulunmuştur (Suwanprasert ve ark., 2020). Arsenik uygulaması ile ilgili yaptığımız çalışmada yukarıdaki çalışmaya benzer şekilde balıkların beyin dokularındaki AChE düzeylerinde belirgin bir düşüş olduğu saptanmıştır. Bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Oksidatif stres altında artan süperoksit radikali neticesinde oluşan toksit etki AChE enzim inhibisyonu ile sonuçlanabilir. Arsenik AChE enziminin yapısını bozup katalitik bölgelere bağlanmasını engellemiş olabilir. Enzimin yapısının bozulması da nörotoksisiteye sebebiyet verebilir.

Fatima ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ağır metale maruz kaldığı bilinen balıkların çeşitli dokuları incelendiğinde dokularında GSH düzeylerinin referans balıklara göre belirgin bir düşüş olduğu gözlenmiştir (Fatima ve ark., 2015). Yaptığımız çalışmada yukarıdaki çalışmaya benzer şekilde balıkların beyin dokularındaki GSH düzeylerinin düştüğünü görmekteyiz. Hücre koruma görevini yerine getiren GSH, arsenik kaynaklı olarak oluşan oksidatif strese bağlı olarak seviyesinde düşüş gerçekleşmiş olabilir.

Yapılan bu araştırma sonucuna göre; canlıların yaşam alanlarının ağır metal ile kirlenmesi ve özellikle uzun süre maruziyeti sonucu canlı dokularında arsenik birikimi ve bunun sonucu olarakda oksidatif stres meydana geldiği görülmüştür. Bu oksidatif stresin kaynağı olan serbest radikallerin dokuda birikmesiyle antioksidan enzimlerin ve sitokinlerin bazılarının düzeylerinin arttığı, lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA ve DNA hasarının bir göstergesi olan 8-OHdG düzeylerinin de arttığı gözlenmiştir. Dokularında arsenik birikimi olan ayvru alabalıkların hem gelişimi süreci olumsuz etkilenmekte hem de ağır metal birikimi olan balıkların tüketilmesi, canlıların organizmalarda toksisiteye sebep olmaktadır. Bu sebeple alabalık üretimi yapan çiftliklerin sularının belli periyotlar ile su analizi yaparak suda ağır metallerin giderimi yapılmalıdır. Ayrıca arseniğin model organizma üzerinde olumsuz etkileri gözlenerek tüm canlıların arseniğe maruziyetinin engellenmeye

alışılması gerektiği tespit edilmiştir. Bu tez çalışması, anı zamanda arsenik toksisitesi için daha sonra yapılabilecek ileri düzeydeki araştırma çalışmaları için kaynak teşkil etmektedir.



KAYNAKLAR

- Agarwal, A., Gupta, S., Sharma, R.K., 2005. *Role of oxidative stress in female reproduction*. *Reprod Biol Endocrinol.* **3** (28): 1-21.
- Akkoyun, H.T., Bengu, A.Ş., Akkoyun, M.B., Ulucan, A., Izgi, M.S., Sahin, Ö., Ekin, S., Melek, Ş., 2020. *Investigation of Protecting Effect of Boric Acid against Mercury II Chloride Toxicity in Rat Brain Tissue*. *Turkish Journal of Nature and Science.* **9**(2): 127-133.
- Alak, G., Atamanalp, M., Topal, A., Arslan, H., Kocaman, E.M., Oruç, E., 2013. *Effect of sub-lethal lead toxicity on the histopathological and antioxidant enzyme activity of rainbow trout (oncorhynchus mykiss)*. *Fresenius Environmental Bulletin.* **22** (3): 733-738
- Alkan, A., 2005. *Bazı ağır metal ve Selenyum bileşiklerine maruz kalan alabalıklarda antioksidan enzim aktivitelerin incelenmesi* (Yüksek Lisans Tezi). İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Malatya.
- Altunkaynak, B.Z. ve Özbek, E., 2008. *Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir?* *Tıp Araştırmaları Dergisi.* **6**: 93-104.
- Andela, V.B., Schwarz, E.M., Puzas, J.E., O'Keefe, R.J., Rosier, R.N., 2000. *Tumor metastasis and the reciprocal regulation of prometastatic and antimetastatic factors by nuclear factor kappaB*. *Cancer Res.* **60** (23):6557- 6562.
- Atalay, F., 2012. *Gebelerden alınan amniyon sıvılarının karyotip analizinde normal, down sendromu ve nöral tüp defekti olduğu tespit edilen olguların amniyon sıvılarında oksidatif stres (mda) parametrelerinin, antioksidan (sod, cat, gsh-px) ve eser element (se, zn, cu) düzeylerinin araştırılması* (Yüksek Lisans Tezi). Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Kahramanmaraş.
- Atay, D., 1987. *İç su balıkları üretme tekniği*. A.Ü. Ziraat Fakültesi, Su Ürünleri Bölümü Yayın No: 1035, A.Ü. Zir. Fak. Basımevi, Ankara.

- Aydoğan, M., Uysal, O., Candemir, S., Terzi, Y.E., Taşçı, R., Beşen, T., Öztürk, F.P., Emre, M., Eralp, Ö., Gündüz, O., Ceyhan, V., 2020. Economic Performance of Rainbow Trout Farming in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 8 (9): 1952-1964
- Baeuerle, P.A., 1998. *Pro-inflammatory signaling: last pieces in the NF- κ B puzzle?* Curr Biol. **8**: 19-22.
- Baki, B., Dalkıran, G., Kaya, H., 2010. Kahverengi Alabalık (*Salmo Trutta sp., L., 1766*) Anaçlarının Döl Verim Özellikleri ve Kaynak Suyundaki Yumurta Verimliliği. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*. **4** (1): 1-8
- Baldwin, A.S. Jr., 1996. *The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights*. Annu Rev Immunol. **14**: 649-683.
- Balkan, B.M., Meral, Ö., Kısmalı, G., Turan, D., Sel, T., 2020. *Caspases Activities in TNF- α Applied HepG2 Hepatocellular Carcinoma Cell*. Kocatepe Veterinary Journal. **13** (1): 86-91.
- Baş, Levent., Demet, Ö., 1992. *Çevresel Toksikoloji Yönünden Bazı Ağır Metaller*. Ekoloji, **5**: 42-47.
- Başaran, Y., Başaran, M.M., Babacan, K.F., 1993. *Serum Tumor necrosis factor levels in acute myocardial infarction and unstable angina pectoris*. Angiology. **44**: 332-7.
- Başkan, B.M., Pala, A., 2009. *İçme sularında arsenik kirliliği: Ülkemiz açısından bir değerlendirme*. Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Dergisi. **15** (1): 69-79.
- Becerril, M.R., Angulo, C., Sanchez, V., Cuesta, A., Cruz, A., 2019. *Methylmercury, cadmium and arsenic (III)-induced toxicity, oxidative stress and apoptosis in Pacific red snapper leukocytes*. Aquatic toxicology. **213**: 105223.
- Bildik, A., Yur, F., Çamaş, H., Odabaşoğlu, F., Aslan, M., 1998. *Kuzuların Doğum Ağırlıkları ve Besi Performansı ile Glutasyon Düzeyleri Arasındaki İlişkinin Araştırılması*. Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences. **22**: 521-526
- Bissen, M., Fritz, H.F., 2003. *Arsenic-a review part I: Occurance, Toxicity, Speciation, Mobility, Acta Hidrokim*. Hidrobiol. **31**: 9-18
- Blackwell, T.S., Christman, J.W., 1997. *The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation*. Am J Respir Cell Mol Biol. **17** (1): 3-9.

- Brummett, R.E., Lazard, J, Moehl, J., 2008. *African aquaculture: Realizing the potential*. Food policy, **33** (5): 371–385.
- Bruno, D.W., Poppe, T.T., 1996. *A Colour Atlas of Salmonid Diseases*. Academic Press. 194 p. LONDON.
- Camussi, G., Albano, E., Tetta, C., Bussolino, F., 1991. *The molecular action of tumor necrosis factor-alpha*. Eur J Biochem. **202**: 3-14.
- Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., Williamson, B., 1975. *An endotoxininduced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **72**: 3666-3670.
- Chan, H.M., Cherian, M.G., 1992. *Protective roles of metallothionein and glutathione in hepatotoxicity of cadmium*. Toxicology. **72**: 281 – 290.
- Chan, J.Y., Cheung, M.C., Moi, P., Chan, K., Kan, Y.W., 1995. *Chromosomal localization of the human NF-E2 family of bZIP transcription factors by fluorescence in situ hybridization*. Human Genetics. **95** (3): 265-269.
- Chan, J.Y., Han, X.L., Kan, Y.W., 1993. *Cloning of Nrf1, an NF-E2-related transcription factor, by genetic selection in yeast*. Proc Natl Acad Sci USA. **90**: 11371-11375.
- Chan, J.Y., Han, X.L., Kan, Y.W., 1993. *Isolation of cDNA Encoding the Human NF-E2 Protein*. Proc Natl Acad Sci USA. **90** (23): 11360-11370.
- Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P.C., 2004. *Diversity of structures and properties among catalases*. Cell Mol Life Sci. **61**: 192-208.
- Cheng, C., Ma, H., Liu, G., Fan, S., Guo, Z., 2022. *Mechanism of Cadmium Exposure Induced Hepatotoxicity in the Mud Crab (Scylla paramamosain): Activation of Oxidative Stress and Nrf2 Signaling Pathway*. Antioxydants. **11**: 978.
- Choudhuury, C., Mazumder, R., Kumar, R., Dhar, B., Sengupta, M., 2021. *Cadmium induced oxystress alters Nrf2-Keap1 signaling and triggers apoptosis in piscine head kidney macrophages*. Aquatic Toxicology. **231**: 105739.
- Claesson, M., Fagerberg, J. 2003. *Arsenic in Groundwater of Santiago Del Estero, Argentina: a Minor field study.*, Royal Ins. of Tech. Inter. Office, TRITA-LWR-EX-03-5, 59.

- Comporti, M., Signorini, C., Leoncini, S., Gardi, C., Ciccoli, L., Giardini, A., Vecchio, D., Arezzini, B., 2010. *Ethanol-induced oxidative stress: basic knowledge*. *Genes Nutr.* **5**: 101-109.
- Cui, D., Zhang, P., Li, H., Zhang, Z., Luo, W., Yang, Z., 2020. *Biotransformation of dietary inorganic arsenic in a freshwater fish *Carassius auratus* and the unique association between arsenic dimethylation and oxidative damage*. *Journal of Hazardous Materials.* **391**: 122153
- Çelikkale, M.S., 1994. *İç su Balıkları ve Yetiştiriciliği*. Cilt, I. K.T.Ü. Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi. Trabzon. **2**: 419
- Çöteli, E., Alataş, M., Batan, N., Hazer, Y., 2018. *Bazı bryaceae (bryophyta) türlerinin glutasyon içeriklerinin karşılaştırılması*. *Anadolu Briyoloji Dergisi.* **5** (1): 15-21.
- Dasgupta, B., Corkill, M., Kirkham, B., 1992. *Serial estimation of IL-6 as a measure of systemic disease in rheumatoid arthritis*. *J Rheumatol.* **19**: 22-25.
- Datta, S., Mazumder, S., Ghosh, D., Dey, S., Bhattacharya, S., 2009. *Low concentration of arsenic could induce caspase-3 mediated head kidney macrophage apoptosis with JNK-p38 activation in *Clarias batrachus**. *Toxicology and Pharmacology.* **241**: 329-338.
- 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 Martinis, B.S., De Lourdes Pires Bianchi, M., 2002. *Methodology for urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine analysis by hplc with electrochemical detection*. *Pharmacol Res.* **46** (2): 129-31.
- Dethlefsen, C., Hojfeldt, G., Hojman, P., 2013. *The role of intratumoral and systemic IL-6 in breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat.* **138**: 657-664.
- Dinant, C., Houtsmuller, A.B., Vermeulen, W. 2008. *Chromatin structure and DNA damage repair*. *Epigenetics & Chromatin.* **1**(1): 9.
- Dinkova-Kostova, A.T., Holtklaw, V.D., Wakabayashi, N., 2005. *Keap1, the sensor for electrophiles and oxidants that regulates the phase 2 response, is a zinc metalloprotein*. *Biochemistry.* **44**: 6889-6899.

- Doherty, V.F., Ogunkuade, O.O., Kanife, U.C., 2010. *Biomarkers of Oxidative Stress and Heavy Metal Levels as Indicators of Environmental Pollution in Some Selected Fishes in Lagos, Nigeria*. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci. **7** (3): 359-365.
- Draper, H.H., Haddy, M., 1990. *Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation*. Methods in Enzymology. **186**: 421-431.
- Dündar, Y., Aslan, R., 1999. *Hücre Moleküler Statüsünün Anlaşılması ve Fizyolojik Önem Açısından Radikaller, Antioksidanlar*. İnsizyon Cerrahi Tıp Bilim Dergisi. **2** (2): 134-142.
- Elbek, A.G., 1981. *Ege bölgesinde tatlı su ürünleri üreten işletmelerin yapısal ve ekonomik analizi* (doktora tezi). EÜ Ziraat Fakültesi Ziraat Ekonomisi ve İşletmeciliği Bölümü, İzmir.
- Emery, P., Luqmani, R., 1993. *The validity of surrogate markers in rheumatic disease*. Br J Rheumatol. **32**: 3-8.
- Emre, Y., Kürüm, V., 1998. *Havuz ve Ağ Kafeslerde Alabalık Yetiştiriciliği Teknikleri*. Minpa Matbağacılık. Ankara, 232 s.
- Erdoğan, Y.A., 2005. *Atık Sulardan Çeşitli Adsorbanlarla Arsenik Giderimi* (Yüksek Lisans Tezi). İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Esterbauer, H., Schaur, R.J., Zollner, H., 1991. *Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes*. Free Radic Biol Med. **11** :81-128.
- Fatima, M., Usmani, N., Firdaus, F., Zafeer, M.F., Ahmad, S., Akhtar, K., Husain, S.M.D., Ahmad, M.H., Anis, E., Hossain, M.M., 2015. *In vivo induction of antioxidant response and oxidative stress associated with genotoxicity and histopathological alteration in two commercial fish species due to heavy metals exposure in northern India (Kali) river*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C. **176-177**: 17-30.
- FAO, 2013. *Food and Agriculture Organization of the United Nations. Global Aquaculture Production Statistics for the year 2011*. <http://www.fao.org/3/i3507t/i3507t.pdf>. Erişim Tarihi: 23.08.2021.
- Flora, S.J.S., 2015. *Arsenic: Chemistry, Occurrence, and Exposure, in Handbook of Arsenic Toxicology*. Academic Press: Oxford. **1**:49.

- Fong, Y.C., Liu, S.C., Huang, C.Y., Li, T.M., Hsu, S.F., Kao, S.T., Tsai, F.J., Chen, W.C., Chen, C.Y., Tang, C.H., 2009. *Osteopontin increases lung cancer cells migration via activation of the alphavbeta3 integrin/FAK/Akt and NF-kappaB-dependent pathway*. Lung Cancer. **64** (3): 263-270.
- Fridovich, I., 1983. *Superoksit Radical: An Endogenous Toxicant*. Ann Rev Pharmacol Toxicol. **23**: 239-257.
- Ge, J., Guo, K., Zhang, C., Talukder, M., Lv, M., Li, J., Li, J.L., 2021. *Comparison of nanoparticle-selenium, selenium-enriched yeast and sodium selenite on the alleviation of cadmium-induced inflammation via NF-kB/IκB pathway in heart*. Science of the Total Environment. **773**: 145442.
- Gough, D.R., Cotter, T.G., 2011. *Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signaling molecule*. Cell Death Dis. **2**: 213-215.
- Greani, S., Lourkisti, R., Berti, L., Marchand, B., Giannettini, J., Santini, J., Quilichini, Y., 2017. *Effect of chronic arsenic exposure under environmental conditions on bioaccumulation, oxidative stress, and antioxidant enzymatic defenses in wild trout Salmo trutta*. Ecotoxicology. **26**: 930-941.
- Gutteridge, J.M., 1995. *Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage*. Clin Chem. **41**: 1819-28.
- Güven, A., 2000. *‘İmprotance of acetylcholinesterase and its inhibitors’*, Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi. **6**: 145-151.
- Han, R., Khan, A., Ling, Z., Wu, Y., Feng, P., Zhou, T., Salama, E.S., El-Dalatony, M.M., Tian, X., Liu, P., Li, X., 2022. *Feed-additive Limosilactobacillus fermentum GR-3 reduces arsenic accumulation in Procambarus clarkii*. Ecotoxicology and Environmental Safety. **231**: 113216.
- Hanana, H., Taranu, Z.E., Turcotte, P., Gagnon, C., Kowalczyk, J., Gagne, F., 2021. *Sublethal effects of terbium and praseodymium in juvenile rainbow trout*. Science of the Total Environment. **777**: 146042.
- Hayashi, T., Sakurai, M., Abe, K., Sadahiro, M., Tabayashi, K., Itoyama, Y., 1998. *Apoptosis of Motor Neurons With Induction of Caspases in the Spinal Cord After Ischemia*. American Heart Association, Inc. **29** (5): 1007-1013.

- Hayes, J.D., Dinkova-Kostova, A.T., 2014. *The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism*. Trends in Biochemical Sciences. **39** (4): 199-217.
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., MüllerNewen, G., Schaper, F., 2003. *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation*. BiochemJ. **374** :1-20.
- Helle, R.A., Jesper, B.N., Fleming, N., 1997. *Antioxidative Enzyme Activities In Human Erythrocytes*. Clin Chem. **43**(4): 562-568.
- Hodson, P.V., 1988. *The effects of metal metabolism on uptake, disposition and toxicity in fish*. Aquat Toxicol. **11**: 3 – 18.
- Holmström, K.M., Kostov, R.V., Dinkova-Kostova, A.T., 2016. *The multifaceted role of Nrf2 in mitochondrial function*. Current Opinion in Toxicology. **1**: 80-91.
- Hossain, Z., Hossain, M.S., Ema, N.S., Omri, A., 2021. *Heavy metal toxicity in Buriganga river alters the immunology of Nile tilapia (Oreochromis niloticus L)*. Heliyon. **7**: e08285.
- Hu, F., Yin, L., Dong, F., Zheng, M., Zhao, Y., Fu, S., Zhang, W., Chen, X., 2021. *Effects of long-term cadmium exposure on growth, antioxidant defense and DNA methylation in juvenile Nile tilapia (Oreochromis niloticus)*. Aquatic Toxicology. **241**: 106014.
- Hu, J., Tian, J., Zhang, F., Wang, H., Yin, J., 2019. *Pxr- and Nrf2- mediated induction of ABC transporters by heavy metal ions in zebrafish embryos*. Environmental Pollution. **255**: 113329.
- Hugle, M., Fulda, S., 2015. *Dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235 synergizes with chloroquine to induce apoptosis in embryonal rhabdomyosarcoma*. Cancer Letters. **360**: 1-9
- Jiao, D., Jiang, Q., Liu, Y., Ji, L., 2019. *Nephroprotective effect of wogonin against cadmium-induced nephrotoxicity via inhibition of oxidative stress-induced MAPK and NF-κB pathway in Sprague Dawley rats*. Human and Experimental tecnology. **38**(9): 1082-1091.
- Kalmaz, G.G., 2018. *Karbon tetra klorür ile karaciğer hasarı oluşturulan sıçanlarda epigallo kateşin-3-gallat'ın kaspaz-3, bcl-2, nrf-2 ve NF-κB protein*

- ekspresyonuna etkisi.* (Yüksek Lisans Tezi). Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Kanev, M.O., 2016. *Beş farklı metal karışımının ergin zebra balığı (Danio Rerio, Hamilton 1822) solungaç dokusunda oksidatif stres cevabı* (Yüksek Lisans Tezi). Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ.
- Kar, M., 2011. *Yamula Barajı (Kayseri) su, sediment ve tatlı su kefalı (Squalus cephalus) örneklerinde ağır metal düzeylerinin mevsimsel değişiminin incelenmesi* (Yüksek Lisans Tezi). Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.
- Karaca, Ö., Sunay, F.B., Kuş, M.A., Gülcen, B., Özcan, E., Ögetürk, M., Kuş, İ., 2014. *Kadmiyum İle Oluşturulan Deneysel Karaciğer Hasarına Karşı Melatoninin Etkilerinin Biyokimyasal ve Histopatolojik Düzeylerde İncelenmesi.* Fırat Tıp Derg. **19**(3): 110-115.
- Kargın, E., Erdem, C., 1992. *Bakır-çinko etkileşiminde Tilapia nilotica (L.)'nın karaciğer, solungaç ve kas dokularındaki metal birikimi.* Doğa Turkish Journal of Zoology. **16**: 343-348.
- Karin, M., Greten, F.R., 2005. *NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression.* Nat Rev Immunol. **5** (10): 749-759.
- Kasai, H., 1997. *Analysis of a form of oxidative dna damage 8-hydroxy- 20-deoxyguanosine as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis.* Mutat Res. **387**: 146–163.
- Kavian, N., Mehlal, S., Jeljeli, M., Saidu, N.E.B., Nicco, C., Olivier, C., Chouzenoux, S., Cauvet, A., Camus, C., Ait-Djoudi, M., Chéreau, C., Kerdine-Römer, S., Allanore, Y. & Batteux, F., 2018. *The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway controls fibrosis and autoimmunity in scleroderma.* Frontiers in Immunology. **9**: 1-14.
- Kayapınar, A., 2007. *Avrupa Birliği Ülkeleri ve Türkiye’de Su Ürünleri Yetiştiricilik Sektörünün Analizi* (Yüksek Lisans Tezi). T.O.G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- Kaymak, G., 2011. *Farklı dozlarda Deltametrin ve Kadmiyum uygulanan Kılıçkuyruk (Xiphophorus hellerii) balıklarında oluşan oksidatif stres tayini* (Yüksek

- Lisans Tezi). Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Bilimleri Anabilim Dalı, İstanbul.
- Keleştemur, G.T., Keleştemur, Ü., Selçuk, S., 2010. *Nakil işleminin gökkuşuğu alabalığı, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1972) yavrularının malondialdehit üzerine etkisi*. SAÜ Fen Bilimleri Dergisi. **14** (2): 119-123.
- Kesebir, A.Ö., 2021. *Tiyazol Türevlerinin Glutasyon Redüktaz Üzerindeki İnhibitör Etkilerinin Belirlenmesi*. Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi. **21**: 1315-1323.
- Khalidi, S.A.M., Sabullah, M.K., Sani, S.A., Ahmad, S.A., Shukor, M.Y., Jaafar, I.N.M., Gunasekeran, B., 2019. *Acetylcholinesterase from the brain of *Monopterus albus* as detection of metal ions*. Journal of Physics: Conference Series. **1358**: 012028.
- Kıvrakdal, A., 2010. *Farklı sertlik değerlerindeki sulara metal (Cu, Cr) etkisinde kalan farklı büyüklükteki balıkların (*Oreochromis niloticus*) ATPaz tepkilerinin belirlenmesi* (Yüksek Lisans Tezi). Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Kim, J.H., Kang, J.C., 2015. *The arsenic accumulation and its effect on oxidative stress responses in juvenile rockfish, *Sebastes schlegelii*, exposed to waterborne arsenic*. *Environmental Toxicology and pharmacology*. **39**: 668-676.
- Kishimoto, T., 1989. *The biology of interleukin-6*. *Blood*. **71**: 1-10.
- Kobayashi, M., Yamamoto, M., 2005. *Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation*. *Antioxidant & Redox Signaling*. **7** (3-4): 385-94.
- Kokuludağ, A., Gümüşdiş, G., Doğanavşargil, E., 1999. *Klinik Romatoloji*. Deniz Matbası, İstanbul. 39- 46.
- Korkmaz, A.Ş., Zencir, Ö., Coşkun, T., 2008. Türkiye’de Uygulanan Alabalık Yetiştirme Teknikleri. *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, **4** (1-2): 58-64.
- Köse, E., Uysal, K., 2008. *Cinsi olgunluğa erişmemiş pullu sazan (*Cyprinus carpio* L., 1758)' ların kas, deri ve solungaçlarındaki ağır metal akümülyasyon oranlarının karşılaştırılması*. Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. **17**: 19-26.

- Kronfol, Z. Remick, D.G., 2000. *Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry*. Am J Psychiatry. **157** (5): 683-94.
- Kumar, V., Sharma, M., Lemos, M., Shriram, V., 2013. *Efficacy of Helicteres isora L. against free radicals, lipid peroxidation, protein oxidation and DNA damage*. Journal of Pharmacy Research. **6**: 620-625.
- Kuşçuoğlu, U., 2004. "*Deneysel omurilik yaralanmasında agmatinin doza bağımlı nöroprotektif etkilerinin incelenmesi*", Uzmanlık tezi, İstanbul Üniversitesi.
- Lee Y., Um I., Yoon J., 2003. *Arsenic (III) Oxidation by iron (VI) (Ferrate) and subsequent removal of arsenic(V) by iron (III) coagulation*. Environmental Science and Technology, **37**: 5750-756.
- Lenoble, V., Bouras, O., Deluchat, V., Serpaud, B., and Bollinger, J.C., 2002. *Arsenic Adsorption onto Pillared Clays and Iron Oxides*, Journal of Colloid and Interface Science, **255**: 52-58.
- Li, M., Kong, Y., Wu, X., Yin, Z., Niu, X., Wang, G., 2021. *Dietary α -lipoic acid can alleviate the bioaccumulation, oxidative stress, cell apoptosis, and inflammation induced by lead (Pb) in Channa argus*. Fish and Selfish Immunology. **119**: 249-261.
- Li, R., Chen, B., Wang, G., Yu, B., Ren, G., Ni, G., 2011. *Effects of Mechanical Strain on Oxygen Free Radical System in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from Children*. Injury, **42**: 753-757.
- Lindhorst-Emme, W., 1990. *Forellenzucht*. Verlag Paul Parey. 157 s. Hamburg und Berlin.
- Lord, C.J., Ashworth, A. 2012. *The DNA damage response and cancer therapy*. Nature. **481**: 287-294.
- Loukidou, M.X., Matis, K.A., Zouboulis, A.I., Liakopoulou-Kyriakidou, M., 2003. *Removal of As(V) from wastewaters by chemically modified fungal biomass*, Water Research. **37**: 4544-4552.
- Ma, Q., 2013. *Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity*. Annu Rev Pharmacol Toxicol. **53**: 401-426.
- Mahamood, M., Javed, M., Alhewairini, S.S., Zahir, F., Sah, A.K., Ahmad, M.I., 2021. *Labeo rohita, a bioindicator for water quality and associated biomarkers of heavy metal toxicity*. Clean Water. **4**: 41545.

- Manuel, S.R., Bienvenu, J., Whicher, J., Burtis, C.A., Aschwood, E.R., 1999. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. Philadelphia, WB Saunders Company. **5**: 541-616.
- Mate, M., Murshudov, G., Bravo, J., Melik-Adamyany, W., Loewen, P.C., Fita, I., 2001. *Heme-catalases*. In: *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*. Scott RA (chief ed), J. Wiley & Sons Press, New York, NY. 486-502.
- Matschullat, J., 2000. *Arsenic in the geosphere a review*. The Science of the Total Environment, **249**: 297-312.
- Matsuda, T., Hirano, T., 1990. *Interleukin 6 (IL-6)*. Biotherapy, **2** (4): 363-373.
- Mayers, P.A., 1993. *Pentoz Fosfat Yolu ve Heksoz Metabolizmasının Diğer Yolları*. Harper'ın Biyokimyası. Barış Kitapevi. İstanbul. 237-238.
- Meister, A., Anderson, M. E., 1983. *Glutathione*. Annual Review of Biochemistry. **52**: 711-760.
- Milan, F.S., Maleki, B.R.S., Moosavy, M.H., Mousavi, S., Sheikhzadeh, N., Khatibi, S.A., 2021. *Ameliorating effects of dietary Haematococcus pluvialis on arsenic-induced oxidative stress in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. Ecotoxicology and Environmental Safety. **207**: 111559.
- Minokoshi, Y., Saito, M., Shimazu, T., 1988. *Sympathetic activation of lipid synthesis in brown adipose tissue in the rat*. J Physiol. **398**: 361-370.
- Mohamed, A.A.R., Metwally, M.M.M., Khalil, S.R., Salem, G.A., Ali, H.A., 2019. *Moringa oleifera extract attenuates the CoCl₂ induced hypoxia of rat's brain: Expression pattern of HIF-1 α , NF- κ B, MAO and EPO*. Biomedicine and Pharmacotherapy. **109**: 1688-1697.
- Mohan. D., Pittman Jr. C.U., 2007. "Arsenic removal from water/wastewater using adsorbents—a critical review," Journal of Hazardous Materials. **142**: 1–53.
- Molaoğlu, Z., 2021. *Borik asit ve bazı türevlerinin Saccharomyces Cerevisiae üzerindeki biyokimyasal etkileri*. (Yüksek Lisans Tezi). Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı, Denizli.
- Moneeb, R.H., Mekkawy, I.A., Mahmoud, U.M., Sayed, A.E.H., 2020. *Histopathological and ultrastructure studies on hepatotoxicity of arsenic in Clarias gariepinus (Burchell, 1822): Hepatoprotective effect of Amphora coffeaeformis*. Scientific African. **8**: e00448

- Morales, A.E., Pèrez-Jimènez, A., Hidalgo, M.C., Abellan, E., Gabriel, C.G., 2004. *Oxidative stres and antioxidant defenses after prolonged starvation in Dentex dentex liver*. Comporative Biochemistry and Physiology, Part C. **139**: 153–161.
- Neta, R., Oppenheim, J.J., Gillis, S., 1987. *The in-vivo effects of interleukin-1. I Bone marrow cells are induced to cycle after administration of interleukin-1.5*. Immunol. **139**: 1861-1862.
- Nicholson, D.W., 1999. *Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death*. Cell Death Differ. **6**: 1028-1042.
- Omata, Y., Saito, Y., Yoshida, Y., Jeong, B. S., Serwa R., Nam, T., Porter, N. A., Niki, E., 2010. *Action of 6-Amino-3-Pyridinols as Novel Antioxidants Against Free Radicals and Oxidative Stress in Solution, Plasma, and Cultured Cells*. Free Radical Biology & Medicine, **48**: 1358-1365.
- Özdek, U., Toz, H., Kömüroğlu, A.U., Mis, L., Huyut, Z., Değer, Y., 2019. *Protective Effect of Chitosan Against Lead-Induced Oxidative Stress in Rat Kidney*. Van Veterinary Journal. **30**(3): 187-191.
- Öztürk, M., Güzelhan, Y., Sayar, K., Tüzün, Ü., 2001. *Yaygın Gelişimsel Bozukluğu Olan Çocuklarda Plazma Malondialdehit ve Glutasyon Düzeylerinin Araştırılması*. Klinik Psikofarmakoloji Bülteni. **11**: 155-159.
- Pahl, H.L., 1999. *Activators and target genes of Rel/NFkappaB transcription factors*. Oncogene. **18** (49): 6853-6866.
- Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C., 2008. *Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health*. Int J Biomed Sci. **4** (2): 89-96.
- Placer, Z.A., Cushman, L.L., Johnson, B.C., 1966. *Estimation of product of lipid peroxidation malonyldialdehyde in biochemical systems*. Anal. Biochem. **16**: 359-364.
- Qiu, W., Hu, J., Magnuson, J. T., Greer, J., Yang, M., Chen, Q., Fang, M., Zheng, C. & Schlenk, D., 2020. *Evidence linking exposure of fish primary macrophages to antibiotics activates the NF-kB pathway*. Environment International. **138**: 1–10.
- Rajeshkumar, S., Liu, Y., Ma, J., Duan, H.Y., Li, X., 2017. *Effects of exposure to multiple heavy metals on biochemical and histopathological alterations in common carp, Cyprinus carpio L*. Fish & Shellfish Immunology. **70**: 461-472.

- Rose, W.C., 1984. *New aspects of glutathione biochemistry and transport-selective alteration of glutathione metabolism*. Nutrition Reviews **42** (12): 397-410.
- Rossetto, D., Truman, A.W., Kron, S.J., Cote, J. 2010. *Epigenetic modifications in double-strand break DNA damage signaling and repair*. Clin. Cancer. Res. **16**: 4543- 4552.
- Sabullah, M.K., Subramaniam, K., Basirun, A.A., Umar, A.M., 2019. *In Vitro Heavy Metals Inhibitive Assay Using the Acetylcholinesterase from Osteochilus hasselti (Cyprinid Fish)*. Journal of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology. **2**(2): 30-34.
- Serdar, O., Yildirim, N.C., Tatar, Ş., Yildirim, N., 2019. *Kurşuna maruz bırakılan Gammarus pulexte antioksidan enzim yanıtları*. Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences. **2**: 216-220.
- Sherif, A.H., El-Sharawy, M.E., El-Samannoudy, S.I., Seida, A.A., Sabry, N.M., Eldawoudy, M., Abdelsalam, M., Younis, N.A., 2021. *The deleterious impacts of dietary titanium dioxide nanoparticles on the intestinal microbiota, antioxidant enzymes, diseases resistances and immune response of Nile tilapia*. Aquaculture Research. **52**: 6699-6707.
- Silke, J., Hartland, E.L., 2013. *Masters, marionettes and modulators: intersection of pathogen virulence factors and mammalian death receptor signaling*. Curr Opin Immunol. **25** (4): 436-440.
- Springer, J.E., Azbill, R.D., Nottingham, S.A., Kennedy, S.E., 2000. *Calcineurin Mediated BAD Dephosphorylation Activates the Caspase-3 Apoptotic Cascade in Traumatic Spinal Cord Injury*. The Journal of Neuroscience. **20**: 7246-7251.
- Subasinghe, R.P., 2003. *An outlook for aquaculture development: major issues, opportunities and challenges*. Review of the State of World Aquaculture. **886**: 31.
- Suwanprasert, S., Saenphet, S., Buncharoen, W., Kullasoot, S., Sareein, N., Phalaraksh, C., 2020. *Effects of cadmium on acetylcholinesterase activities and histopathology of African catfish (Clarias gariepinus) from contaminated fish farm in Mae Sot District, Tak Province, Thailand*. Scienceasia. **46**: 1513-1874.

- Şener, G., Yeğen Berrak, Ç., 2009. *İskemi Reperfüzyon Hasarı*. Klinik Gelişim Dergisi. **22**: 5-13.
- Şenol, A., 2021. *Hepatit B virüs enfeksiyonu ve glutatyon*. Genel Tıp Dergisi. **31** (3): 239-242.
- Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., Hirano, T., Kishimoto, T., 1989. *Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer*. gp130. Cell. **58** :573-81.
- Takebe, F., Hara, I., Matsuyama, H., Yumoto, I., 2007. *Effects of H2O2 under low- and high-aeration -level conditions on growth and catalase activity in Exiguobacterium oxidotolerans*. J Biosci Bioeng. **104**: 464-469.
- Taysı, M.R., 2019. Gökkuşığı Alabalığı (Oncorhynchus Mykiss) *Beyin Dokusunda Civa Klorür Toksisitesinin Oluşturduğu Oksidatif Stres Ve Dna Hasarının Belirlenmesi* (Yüksek Lisans Tezi). Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootekni Anabilim Dalı, Bingöl.
- Taysı, M.R., 2019. *Gökkuşığı alabalığı beyin dokusunda civa klorür toksisitesinin oluşturduğu oksidatif stres ve DNA hasarının belirlenmesi* (Doktora Tezi). Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootekni Anabilim Dalı, Bingöl.
- Thompson, E.B., 1994. *Apoptosis and Steroid Hormones*. Molecular Endocrinology. **8**: 665-673.
- Trenzado, C., Carmen H.M., Gallego, M.G., Morales, A.E., 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.
- Trivedi, S.P., Singh, S., Trivedi, A., Kumar, V., 2022. *Mercuric chloride-induced oxidative stress, genotoxicity, haematological changes and histopathological alterations in fish Channapunctatus*. Fish Biology. **100**: 868-883.
- Tüfek, Ö. M., Yalçın, N., 2007. *Rezervuarlarda su ürünleri yetiştiriciliği*. Ulusal Su Günleri, 16-18 Mayıs 2007, Antalya, Türkiye.
- Ulu, F., 2010. *İçme sularında alüminyum elektrotlar kullanarak elektrokoagülasyon ile arsenik giderimi* (Yüksek Lisans Tezi). Gebze Yüksek Teknolojiler Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, Kocaeli.

- Uysal, İ., Alpaz, A., 2002. *Comparison of the growth performance and mortality in Abant trout (Salmo trutta abanticus Tortonese, 1954) and rainbow trout (Oncorhynchus mykiss Walbaum, 1792) under farming conditions*. Turk J. Zool., **26**: 399-403.
- Ünver, Z.A., Koldemir, M., Duman, B.S., Sesal, N.C., Kayhan, F.E., 2014. *Zebra balıklarında ağır metal indüksiyonunun oksidatif stres parametrelerine etkisi*. Journal of Fisheries Sciences. **8** (3): 199-207.
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, C., 2009. *8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis*. Journal of Environmental Science and Health- Part C Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews. **27**: 120-139.
- Valerie, K., Povirk, L.F., 2003. *Regulation and mechanisms of mammalian doublestrand break repair*. Oncogene. **22**: 5792-5812.
- Volkert, M.R., Loewen, P.C., Switala, J., Crowley, D., Conley, M., 1994. *The deletion greatly enhances resistance to hydrogen peroxide in stationary-phase Escherichia coli*. J Bacteriol. **176**: 1297-1302.
- Wang, X., Gao, X., Wang, X., Fang, Y., Xu, L., Zhao, K., Huang, B., Liu, B., 2022. *Bioaccumulation of manganese and its effects on oxidative stress and immune response in juvenile groupers (Epinephelus moara ♀ × E. lanceolatus ♂)*. Chemosphere. **297**: 134235.
- Waddick, K., Uckun, F.M., 1999. *Innovative treatment programs against cancer: II. Nuclear factor-κB (NF-κB) as a molecular target*. Biochem Pharmacol. **57**: 9-17.
- Xue, H., Cao, H., Xing, C., Feng, J., Zhang, L., Zhang, C., Hu, G., Yang, F., 2021. *Selenium triggers Nrf2-AMPK crosstalk to alleviate cadmium-induced autophagy in rabbit cerebrum*. Toxicology. **459**: 152855.
- Yağmur, F., Hancı, İ.H., 2002. *Arsenik*. Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi. **11**: 250-251
- Yalçın, A.S., 1998. *Antioksidanlar*. Klinik Gelişim. **11**: 342-346.
- Yalçın, M.S., 2007. *Hepatitli hastalarda antioksidan enzimlerinin süperoksit dismutaz, Glutasyon peroksidaz ve Katalaz enzim aktivite düzeylerinin incelenmesi* (Yüksek Lisans Tezi). Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Adana.

- Yanık, T.,2009. Gökkuşığı Alabalığı ve Morfolojik Özellikleri Arazi Çalışmaları. *Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü 'Doğal Alabalık Çalıştayı'* 22-23 Ekim 2009, Trabzon. 144-148.
- Yazıcı, M., Değirmenci, M., Sözüdoğru, O., Ekmekçi, M., Atmaca, E., Tezcan, L., Namkhai, O.B., 2015. *Kayseri kenti yer altı sularının arsenik kirliliği açısından değerlendirilmesi*. Karaelmas Science and Engineering Journal. **5**(1): 16-25.
- Yokuş, B., Çakır, D.Ü., 2002. *In vivo oksidatif DNA hasarı biyomaekeri; 8-hydroxy-2'-deoxygunosine*. T Klin J Med Sci. **22**: 535-543.
- Yöntürk, Y., 2017. *Gökkuşığı alabalığında arı poleninini antioksidan ve immunostimulan etkisinin araştırılması*. (Yüksek Lisans Tezi). Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Zhang, D.D., 2006. *Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway*. Drug Metabolism Reviews. **38**: 769-789.
- Zhao, H., Wang, Y., Shao, Y., Liu, J., Wang, S., Xing, M., 2018. *Oxidative stress-induced skeletal muscle injury involves in NF-kB/ p53-activated immunosuppression and apoptosis response in copper (II) or/and arsenite-exposed chicken*. Chemosphere. **210**: 76-84.

