

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI AĞIR METAL ve SELENYUM BİLEŞİKLERİNE MARUZ KALAN
ALBALIKLARDA ANTIOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

AYSEL ALKAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

MALATYA

2005

Aileme

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE,

Aysel ALKAN'a ait bu bilimsel çalışma jüri üyeleri olarak tarafımızdan Biyoloji anabilim dalında **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. A.Ümit ERDEMLİ

Başkan


Prof. Dr. Murat ÖZMEN

Üye


Yrd. Doç. Dr. İbrahim ÖRÜN

Üye


Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Tarih

Prof. Dr. Ali ŞAHİN
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI AĞIR METAL ve SELENYUM BİLEŞİKLERİNE MARUZ KALAN ALABALIKLARDA ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Aysel ALKAN

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
55 + ix sayfa
2005

Danışman: Yrd.Doç.Dr. İbrahim ÖRÜN

Bu çalışmada, selenyumun balıklarda antioksidatif rolünü belirlemek amacıyla krom, kadmiyum ve selenyumun gökkuşacağı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum,1792) karaciğer ve solungaç dokularındaki bazı biyokimyasal parametreler üzerine etkileri araştırılmıştır.

Cd (2 ppm), Cr (2 ppm), Se (2 ppm), Cd+Se (2 ppm Cd + 2 ppm Se) ve Cr+Se (2 ppm Cr + 2 ppm Se)'a bir hafta süreyle maruz bırakılan gökkuşacağı alabalıklarının karaciğer ve solungaç dokularında selenyum bağımlı Glutatyon peroksidaz (Se-GSHPx), Süperoksit dismutaz (SOD) ve Katalaz aktiviteleri ile malondialdehit (MDA) düzeyindeki değişimler incelenmiştir.

Çalışma sonucunda Cd, Cr, Cd+Se ve Cr+Se'a maruz kalmış grupların enzim aktivitelerinde kontrole göre istatistiksel açıdan önemli oranda düşüşlerin olduğu ($p<0.05$) gözlenmiştir. Ayrıca Cd, Cr, Cd+Se ve Cr+Se'a maruz kalmış grupların MDA düzeylerinde kontrole göre istatistiksel olarak önemli artışların olduğu ($p<0.05$) belirlenmiştir. Se maruzatı ise enzim aktiviteleri ile MDA düzeylerinde önemli değişimler yaratmamıştır.

Bu sonuçlar, ağır metallere maruz bırakılmış grupların biyokimyasal parametrelerinde meydana gelen olumsuz etkilerin, Se ilavesi ile giderilebileceğini ortaya koymaktadır.

ANAHTAR KELİMELER: Kadmiyum (Cd), Krom (Cr), Selenyum (Se), Oksidatif stres, Antioksidan savunma sistemi

ABSTRACT

Master Thesis

RESEARCHING OF ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES IN RAINBOW TROUTS EXPOSED TO SOME OF THE HEAVY METALS AND SELENIUM COMPOUNDS

Aysel ALKAN

Inonu University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

55 + ix pages

2005

Supervisor: Asst. Prof. Dr. İbrahim ÖRÜN

In this study, the effects of cadmium, chromium and selenium on some of the biochemical markers in the liver and gill tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) were investigated to determine antioxidative role of selenium in fish.

The activities of Se-dependent Glutathione peroxidase (Se-GSHPx), Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT) and the changes in levels of malondialdehyde (MDA) were analysed in liver and gill tissues of rainbow trouts exposed to Cd (2 ppm), Cr (2 ppm), Se (2 ppm), Cd+Se (2 ppm Cd + 2 ppm Se) and Cr+Se (2 ppm Cr + 2 ppm Se) for a week.

As a result of this study, it was observed that there were statistically significant decreases in enzyme activities of the groups exposed to Cd, Cr, Cd+Se and Cr+Se compared to control ($p < 0.05$). In addition, it was observed that there were statistically significant increases in MDA levels of the groups exposed to Cd, Cr, Cd+Se and Cr+Se compared to control ($p < 0.05$). The selenium exposure did not cause to changes significantly in enzyme activities and MDA levels.

These results suggest that the negative effects occurred on the biochemical markers of the groups exposed to heavy metals can be eliminated as a result of selenium supplementation.

KEY WORDS: Cadmium (Cd), Chromium (Cr), Selenium (Se), Oxidative stress, Antioxidant defence

TEŞEKKÜR

Bu alıőmanın yapılmasında yardımlarını gördüğüm, bilgi birikiminden yararlandığım, beni yönlendiren danışman hocam Sayın Yrd.Doç.Dr. İbrahim ÖRÜN'e,

Yüksek lisans boyunca her konuda yardımlarını esirgemeyen ve laboratuvar çalışmalarında her zaman yanımda olan Zeliha SELAMOĞLU TALAS'a, doku homojenizasyonu sırasında Biyokimya Laboratuvarını kullanıma aan Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. İsmet YILMAZ'a,

Bugünlere gelmemi sağlayan değerli aileme ve üniversite hayatım boyunca her konuda bana destek veren sevgili Miraç UÇKUN'a

teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ.....	3
2.1. Ağır Metaller.....	3
2.1.1. Kadmiyum.....	5
2.1.2. Krom.....	7
2.2. Oksidatif Stres ve Etkileri.....	9
2.2.1. Serbest radikaller.....	9
2.2.2. Oksijen, oksijen radikalleri ve oksidatif stresin tanımı.....	11
2.3. Antioksidan Savunma Sistemleri.....	15
2.3.1. Enzim yapısındaki antioksidanlar.....	15
2.3.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD).....	15
2.3.1.2. Katalaz (CAT).....	16
2.3.1.3. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px).....	16
2.3.2. Enzimatik olmayan savunma sistemleri.....	18
2.3.2.1. Bir antioksidan eser element olan selenyumun biyolojik özellikleri.....	18
2.3.2.2. Selenyumun kullanım alanları.....	22
3. KAYNAK ÖZETLERİ.....	23
4. MATERYAL VE METOT.....	27
4.1. Materyal.....	27
4.2. Metot.....	27
4.2.1. Diseksiyon işlemi ve doku numunelerinin hazırlanması.....	28
4.2.2. Protein tayini.....	28
4.2.3. Enzim aktivite tayinleri.....	30
4.2.3.1. Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz (Se-GSHPx) aktivite tayini.....	30
4.2.3.2. Katalaz (CAT) aktivite tayini.....	31
4.2.3.3. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivite tayini.....	32
4.2.4. Lipid peroksidasyonunun belirlenmesi.....	33
4.2.5. Verilerin istatistiksel analizi.....	33
5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	34
5.1. Solungaç Dokusundaki Enzim Aktivite ve MDA Sonuçları.....	34
5.1.1. Solungaç dokusundaki enzim aktivite sonuçları.....	35
5.1.1.1. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi.....	35
5.1.1.2. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi.....	36
5.1.1.3. Katalaz (CAT) aktivitesi.....	37
5.1.2. Solungaç dokusundaki MDA düzeyi.....	38
5.2. Karaciğer Dokusundaki Enzim Aktivite ve MDA Sonuçları.....	39
5.2.1. Karaciğer dokusundaki enzim aktivite sonuçları.....	40
5.2.1.1. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi.....	40
5.2.1.2. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi.....	41
5.2.1.3. Katalaz (CAT) aktivitesi.....	42

5.2.2. Karaciğer dokusundaki MDA düzeyi.....	43
6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	44
7. KAYNAKLAR.....	50
ÖZGEÇMİŞ.....	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1. Serbest radikallerin biyolojik hedeflere verdiği zararlar.....	10
5.1. Solungaç dokusunda Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesindeki değişiklikler	35
5.2. Solungaç dokusunda Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesindeki değişiklikler.....	36
5.3. Solungaç dokusunda Katalaz (CAT) aktivitesindeki değişiklikler.....	37
5.4. Solungaç dokusunda Malondialdehit (MDA) düzeyindeki değişiklikler.....	38
5.5. Karaciğer dokusunda Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesindeki değişiklikler	40
5.6. Karaciğer dokusunda Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesindeki değişiklikler.....	41
5.7. Karaciğer dokusunda Katalaz (CAT) aktivitesindeki değişiklikler.....	42
5.8. Karaciğer dokusunda Malondialdehit (MDA) düzeyindeki değişiklikler.....	43

ÇİZELGELER DİZİNİ

5.1. Solungaç dokusundaki enzim aktivite ve MDA sonuçları.....	39
5.2. Karaciğer dokusundaki enzim aktivite ve MDA sonuçları.....	44

SİMGELER VE KISALTMALAR

Se	: Selenyum
Cr	: Krom
Cd	: Kadmiyum
SOD	: Süperoksit dismutaz
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
CAT	: Katalaz
MDA	: Malondialdehit
ROS	: Reaktif Oksijen Türevleri
GSH	: Redükte glutasyon
BSA	: Bovine serum albumin
EDTA	: Etilen diamintetraasetik asit
NADPH	: β -Nikotinamid adenin dinükleotid
CuSO ₄	: Bakır sülfat
NaN ₃	: Sodyum azid
Na ₂ CO ₃	: Sodyum karbonat
Na,K-Tartarat	: Soyum- potasyum tartarat
NaOH	: Sodyum hidroksit
KH ₂ PO ₄	: Potasyum dihidrojenfosfat
K ₂ HPO ₄	: Dipotasyum hidrojenfosfat
Na ₂ HPO ₄	: Disodyum hidrojenfosfat
NaH ₂ PO ₄	: Sodyum dihidrojenfosfat
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HCl	: Hidroklorik asit
NaCl	: Sodyum klorür
TBA	: Tiyobarbütirik asid
TCA	: Trikloroasetik asid

1. GİRİŞ

Endüstrinin gelişmesine paralel olarak su, hava ve toprağın sağlığa zararlı maddeler ile kirlenmesi son yıllarda önemli bir çevre sorunu olarak insanlığın karşısına çıkmıştır. Yeryüzündeki su devamlı bir döngü içindedir. Suyun bu döngüsü sırasında insanların etkisi sonucu ortaya çıkan ve suya karışan maddeler suyun fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini değiştirerek su kirliliğine neden olur [1].

Kirletici olarak ağır metaller sucul ortamlara; tarımsal alanlardan, kırsal ve endüstriyel üretim alanlarından, yağmur suları ve kirli su arıtımı gibi uzun vadeli ekotoksikolojik etkilerle sonuçlanabilen yollarla girebilmektedir [2]. Bu toksikolojik etkiler popülasyon ya da ekosistem düzeyinde fizyolojik ve biyokimyasal reaksiyonlarla başlar. Bu nedenle kirlenmenin canlılar üzerindeki etkilerinin çeşitli fizyolojik, histolojik, hematolojik ve biyokimyasal parametrelerle incelenmesi sonucunda önemli bilgiler elde edilmektedir [3].

Suların kirlenmesi, sucul ortamlarda yaşayan canlılar üzerinde çeşitli olumsuzluklar meydana getirmektedir. Suda oksijen miktarı azalırken bakterilerin, organik maddelerin, metal tuzlarının ve toksik maddelerin miktarı artar. Bundan dolayı su ortamında yaşayan bitkiler, balıklar ve diğer sucul organizmalar ölebilir veya zehirli maddeleri bünyelerinde saklayarak onları besin zinciri yoluyla diğer canlılara ulaştırabilir [4]. Ağır metaller, iyon halinde veya bileşik formları içinde suda çözülmüş olduklarından ve organizmalar tarafından kolayca absorbe edilebildiklerinden dolayı oldukça toksik maddelerdir. Absorpsiyon sonrası metaller fonksiyonel proteinler, enzimler ve nükleik asitler gibi hayati hücre makromoleküllerine bağlanarak hücrelerin fonksiyonlarını etkilerler [5].

Besin zincirinin bir halkasını oluşturan ve önemli bir protein kaynağı olarak tüketilen balıkların ağır metal kirliliğine maruz kalmalarının etkilerinin araştırılması, ekolojik dengenin korunması ve insan sağlığı açısından gerekli hale gelmiştir. Ağır metaller besin zinciriyle ya direkt olarak planktonlar aracılığıyla ya da sudaki tüketici diğer organizmalar yolu ile balıklara geçmektedir [6]. Ağır metallerin suda bulunan tuzları ve bunların balıklara olan etkisi suyun yoğunluğu, osmotik basıncı, pH'sı, sertliği, serbest oksijen miktarı ve suyun sıcaklığına bağlı olarak değişir [1].

Biyokimyasal parametreler balıkların sağlık durumlarının bir göstergesi olarak sıkça kullanılmaktadır. Bu bakımdan herhangi bir stresin göstergesi olarak biyokimyasal metotların kullanımı, bu değişen çevreye karşı balıkların fizyolojik tepkileri hakkında

önemli bilgiler sağlamaktadır. Özellikle subletal toksisite çalışmaları, meydana gelen fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikleri anlamak ve letal etkilerin oluşturduğu tehdidi tahmin etmeyi mümkün kılmaktadır [6].

Selenyum düşük konsantrasyonda insan ve hayvanların büyümesi için gerekli olan esansiyel bir elementtir. Fakat yüksek konsantrasyonlarda toksik özelliklere sahiptir [7]. Selenyum yiyeceklerde esas olarak selenometiyonin ve selenosistein gibi organik bileşikler halinde bulunur. Buna karşılık selenyumun dışardan alındığı durumlarda kullanılan bileşiğin sodyum selenit olması nedeniyle özellikle deneysel selenyum çalışmaları selenit metabolizması üzerinde yoğunlaşmıştır [8].

Selenyumun biyolojik açıdan önemli oluşunun nedenlerinden biri, hücrelerin birincil antioksidan savunma sisteminde anahtar role sahip olan Glutasyon peroksidazın (GSH-Px) kofaktörü olmasıdır [9]. GSH-Px, hücre ortamında oluşan peroksitleri metabolize ederek serbest radikal oluşumunu engeller. Yine bu metabolizmadaki serbest radikal kaçaklarının önemli bir göstergesi Süperoksit dismutaz (SOD)'dır. SOD, süperoksit radikalini metabolize eden enzimdir ve dolaylı olarak GSH-Px aktivitesi ile bağlantılıdır. Ağır metal toksisitesi sonucu gelişen lipid peroksidasyonunun en belirgin ürünü malondialdehit (MDA)'tir. Bu nedenle lipid peroksidasyonunu belirlemede kullanılır. MDA, oluşum yerinden kolayca difüze olabilir, membran yapısındaki lipid ve proteinlere çapraz bağlanarak membran geçirgenliğinde değişikliklere yol açabilir [10].

Bu bilgiler ışığında, belli dozlarda ağır metal (krom, kadmiyum) stresine maruz bırakılmış ve aynı dozda selenyum ilave edilmiş gökkuşuğu alabalıklarının solungaç ve karaciğer dokularında Se-GSHPx, SOD, Katalaz enzim aktiviteleri ile birlikte MDA düzeylerindeki değişimlerin gözlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Ağır Metaller

Ağır metaller, kalıcı kirleticiler olarak nitelendirilmektedir ve bir organizmadan diğerine besin zinciri yoluyla geçerek yüksek yapılı organizmalarda birikme özelliğindedirler. Özellikle kadmiyum, civa, kurşun ve krom gibi ağır metaller, besin zinciriyle girdikleri canlı bünyelerinde doğal fizyolojik mekanizmalarla atılamadıkları için birikime uğrarlar ve bünyede belirli derişimlerin üzerine çıkmaları durumunda toksik olup, alıcı ortamlardaki canlı yaşamı üzerinde derişimleri ile orantılı olarak toksik etki yaparlar [11].

Metallerden bahsedildiğinde sık sık ‘iz metal’ (canlının yaşaması ve büyümesi için gerekli temel mineraller) ifadesi kullanılır. Bu şekilde ifade edilen birçok metal eser miktarlarda canlıların normal fizyolojik fonksiyonları için gereklidir. Ancak bu miktarlar farklı türler arasında önemli değişiklikler gösterir. Önemli iz metallere bakır, demir, çinko, kobalt, molibden, nikel, mangan, selenyum, kalay ve brom dahildir. Bunlardan bir veya birkaç tanesinin eksikliği veya fazlalığı hücrede fizyolojik fonksiyonları değiştirir [12].

Endüstriyel ve tarımsal faaliyetler sonucu organik ve inorganik kirleticiler yollarını çevrede bulurlar. Tatlı sularda bulunan ağır metaller Pb, Cr, Cu, Ni, Co, Mn, Hg ve Zn’dir. İnsan sağlığının bu ağır metallerden etkilenmesi sadece onların varlığı ve toksisitesinden kaynaklanmaz, aynı zamanda onların besin zinciri yoluyla önemli konsantrasyonlarda birikmesinden kaynaklanır. Ayrıca bu elementler dip sedimentlerinde de birikebilir ve besin zinciri yoluyla konsantrasyonları daha da artarak canlılar üzerinde akut ya da kronik etkiler oluşturabilirler. Bu elementler toksisiteye çok fazla duyarlı olan sindirim sistemi ya da renal tübüler hücrelere saldırabilirler [13].

Ağır metallerin canlı bünyelerinde birikimi sonucunda sularda yaşayan balıklar ve diğer canlılar ölebilir. Hatta bu tür su ürünleriyle beslenen insanların yaşamı da tehlikeye girebilir. Toksik maddeler suda düşük konsantrasyonlarda bulunmaları halinde bile (örneğin 1 mg/L) insan sağlığına zarar vererek hastalıklara ve hatta ölüme sebep olabilirler [12].

Son yıllarda ülkemizde hızlı nüfus artışı ve endüstrileşme, mevcut ülke kaynaklarının hızlı tüketimini ve büyük boyutlara ulaşan çevre kirliliğini de beraberinde getirmiştir. Sucul ortamlar içme ve kullanma suyu temini, rekreatif amaçla kullanım ve artan protein ihtiyacını karşılamada önemli bir yere sahiptir [14].

Su kaynaklarında kirlenmeye neden olan kirletici etkenleri temel olarak biyolojik, fiziksel ve kimyasal olmak üzere üç grupta toplayabiliriz. Sularda kimyasal kirlenmeye neden olan önemli unsurlardan birisi de ağır metallerdir. Ağır metaller su ortamlarına maden endüstrilerinden, metal endüstrilerinden ve çeşitli sanayi kuruluşlarından bırakılmaktadır. Bu gibi kuruluşlarda yıkama amacı ile bol miktarda su kullanılmakta ve bu su alıcı ortamlara bırakılmaktadır [14]. Endüstriyel atık sularla atılan metal iyonlarının bozulmadan kalabilmeleri suların kirlenmesi açısından oldukça büyük önem taşır. Özellikle sanayi atıklarında bulunan metal ve metalloidler suların kirlenmesi ve balıkların ölümünde önemli rol oynamaktadır. Örneğin Cr, Cd, Pb, Fe, Cu, Zn, Al, As ve birçok metal ve metalloidler sanayi atıklarında bulunmakta ve bunlar toprakta yok olmadıkları için yağmur sularıyla ve erozyonla sulara taşınmaktadır [1]. Başlıca metal endüstrilerini oluşturan metal kaplama sanayi, otomotiv sanayi, elektrik ve elektronik malzemeleri, mutfak ve ev eşyaları işlenmesi esnasında kullanılan su içerisinde bol miktarda ağır metal tespit edilmiştir. Sularda kirlenmeye neden olan ağır metaller genelde inorganik karakterli olup çoğunlukla asidiktir. Bu metaller çok küçük konsantrasyonlarda dahi suda yaşayan canlı organizmalar için öldürücü olabilir. Ayrıca ekosistem içerisindeki besin zincirine girerek insan sağlığını da tehdit edebilir [14]. Ağır metaller sularda çözülmüş halde (iyon, şelat iyon, kompleks iyon ve moleküler) ve partikül halde (kolloidal, yoğunlaşmış ve adsorblanmış) bulunurlar. Sudaki mevcut metal yapısı ve organizmaları etkileyen fizyolojik faktörler; pH, sıcaklık, çözülmüş oksijen, ışık ve tuzluluktur. Organik kökenli kimyasal maddeler toprakta ve suda genellikle bozunmaya uğrar ve yan ürün olarak inorganik maddeler açığa çıkarır. Fakat bazı organik maddelerin parçalanması zor veya uzun süre alır. İnorganik ve radyoaktif maddelerin uzaklaşması ise oldukça zordur [1].

Balıklar ekosistem içerisinde insan tarafından tüketilen önemli bir protein kaynağıdır. Ağır metallerin balıklara olan etkisinin metalin cinsi ve konsantrasyonuna, su kalitesine ve balığın tür ve yaşına bağlı olarak değiştiği belirlenmiştir. Bazı ağır metaller mikro düzeylerde toksik olmasa dahi canlının fizyolojisini etkileyerek gelişmesini yavaşlatmakta veya üreme yeteneğini kaybetmesine sebep olmaktadır. Ağır metaller toksik özelliklerinin yanı sıra, su canlılarının vücudunda birikme eğilimi gösterirler. Ağır metallerin balık vücudundaki birikimi hem beslendiği besinlerle hem de solungaçları ile suyu süzdüğü esnada olmaktadır. Balıklar için son derece toksik olan ağır metallerin bazıları iz miktarda balık için son derece gereklidir. Örneğin; alabalıklarla yapılan bir deneyde çinko eksikliğinde gözlerde katarakt oluşmuştur [14].

Ağır metallere maruz kalan bir balıkta gözlenen başlıca semptomlar; yüksek konsantrasyonlarda yoğun balık ölümleri, düşük konsantrasyonlarda ise yavaş büyüme, omurgada deformasyonlar, yüzme bozuklukları, anemi, iç organlarda fonksiyon bozuklukları, kısırılık, solunum güçlüğü ve iyon dengesinde bozulma sayılabilir. Ayrıca çoğu su canlılarının vücudunda depolanabilen bu metallerin konsantrasyonu besin zinciri boyunca artmakta ve bu canlılar üzerinden beslenen insan hayatını da tehdit etmektedir. Su canlıları için toksik olan ağır metallerin etkisi metalin türü ve konsantrasyonuna, su kalitesine, maruz kalan canlının türü ve yaşına ve ağır metallerin birbirleriyle olan etkileşimine bağlı olarak değişmektedir [14].

2.1.1. Kadmiyum

Kadmiyum doğada sarı renkli kadmiyum sülfür (CdS) şeklinde çınko filizi ile birlikte bulunur [15]. Kadmiyum, endüstriyel işlemler ya da diğer antropojenik faaliyetler sonucu meydana gelen atık suların doğal su kaynaklarına karışması sonucu her yerde sıklıkla mevcut olabilmektedir [16]. Yer kabuğunda bulunan Cd insan aktiviteleri, volkanik aktiviteler ve erozyon yoluyla geniş ölçüde yayılır. Toksik bir metaldir ve biyolojik bir işlevi yoktur. Kadmiyum normalde reaktif türlere karşı koruma sağlayan tiyoller ya da enzimlerle reaksiyona girerek serbest radikal toksisitesine neden olur. Kadmiyuma maruz kalma kemik mineral yoğunluğu ve böbrek fonksiyonunu etkileyebilir [17]. Kadmiyum organizmaya başta solunum yolu olmak üzere, daha az olarak da besinler ve içilen sularla sindirim yolundan girmektedir. Kanda büyük ölçüde hemoglobine bağlı olarak dolaşır ve bir transport ve depolama proteininin (metalloprotein) –SH gruplarına bağlanmış şekilde böbrek ve karaciğerde toplanır [15]. Balıklarda kadmiyum karaciğer, solungaç ve böbreklerde birikir. Kadmiyum ve bileşikleri sularda genelde eser miktarlarda bulunur ve bu 0.001 mg/L düzeyini aşmaz, çok ender durumlarda 0.010 mg/L'ye ulaşır [18].

Endüstride kadmiyumlu mineraller, kadmiyum içeren plastik ve metal atıklarından çevreye yayılan kadmiyum hava, su ve toprağı kirletmektedir. Toprak ve suda biriken kadmiyum ise sudaki organizmalara geçmekte, buradan besin zinciriyle hayvan ve insanlara ulaşmaktadır [19]. Havada bulunan kadmiyum partiküllerinin insan için öldürücü dozu (LD₅₀) 2900 mg/m³'dür. 0.3-0.5 µm büyüklüğündeki partiküller solunduğunda yaklaşık %10-15'i akciğerlerde tutulur. Kadmiyum sigara dumanı içinde de bulunur (20 sigarada 20-25 µg) [15].

Kadmiyum balıklar üzerine düşük konsantrasyonda bile toksik olabilmektedir. Balığın solungaç, karaciğer, böbrek ve mide-bağırsak bölgesinde birikir. Memelilerde biriken Cd safra, idrar ve feçesle salgılanırken, balıklarda ise bağırsaklar safra ve solungaçlar vasıtasıyla salgılanır [20].

Subletal dozlarda suda çözünmüş kadmiyuma kronik maruz kalmanın fizyolojik etkilerinin bazıları solunumda bozukluk, bütün vücutta ya da plazma iyon düzeninde bozukluk, hematolojik değişiklikler, balıklarda stres göstergesi olan kortizol ve glukoz gibi diğer kan parametrelerinde değişiklikler şeklinde açıkça ortaya koyulur [21].

Kadmiyum endüstride demir, çelik, bakır, çinko gibi metallerin korozyonuna karşı kaplamalarda, kurşunla alaşım şeklinde kablo kaplamalarda, insektisit üretiminde, nikel-kadmiyum pili yapımında, nükleer reaktörlerde nötron absorblayıcısı olarak, boya ve cam üretiminde, plastiklerde stabilizatör olarak kullanılmaktadır [19]. Kadmiyumun çeşitli tuzları (asetat, bromid, karbonat, klorür, florid, oksit, iyodit, nitrat, salisilat, siyanit, tungstat) serbest ya da çinko, nikel, gümüş ve kurşunla alaşım şeklinde endüstride elektroplatin, alüminyum lehimleri, fotoelektrik hücreler, dişçilikte amalgam, fotoğraf malzemeleri, nükleer malzeme, vakum tüpleri, porselen, kadmiyum lambaları, akümülatör yapımında kullanılmaktadır [15].

2.1.2. Krom

Krom (Cr) doğada kromit (FeCr_2O_4) şeklinde bulunur [19]. Dünyada bol bulunan bir elementtir Cr^{2+} dan Cr^{6+} ya kadar sırasıyla çeşitleri vardır fakat sadece trivalent Cr(III) ve hegzavalent Cr(VI) formlarının biyolojik önemi vardır. Trivalent daha yaygın bulunan şeklidir ancak kromat gibi hegzavalent formlarının daha büyük endüstriyel önemi vardır. Sodyum kromat ve dikromat, bütün krom kimyasallarının üretimi için esas maddelerdir. Kromun en büyük kaynağı kromit madenidir. Kromatlar madenin eritilmesi, kızdırılması ve saflaştırılması yoluyla üretilir. Havadaki krom kaynağını endüstriyel faaliyetlerden, özellikle ferrokrom üretimi, maden arıtımı, çimento yapımı ve fosil yakıtlarının yanmasından alır. Krom çökeltileri ve kalıntıları toprak ve suda birikir, topraktakiler sonunda yağmur suları aracılığıyla suya taşınarak sedimentlerde birikir. İnsanlarda zararlı etkileri olduğu bilinen krom formu hegzavalent formudur ve bu zararlı etkileri, Cr(VI)'nın Cr(III)'e indirgenmesi ve hücrelerarası makromoleküllerle kompleksler oluşturmasıyla ilgili olabilir. Cr(III) bileşikleri Cr(VI) bileşiklerine göre daha az toksiktir ve tahriş etme ya da aşındırma özellikleri yoktur [22].

Krom eser miktarlarda vücuda gereklidir. Üç değerlikli krom canlılar için esansiyel olup özellikle dokulara taşınır. Glukoz ve lipid metabolizmasında kontrolün sağlanmasında önemli rolü vardır. Krom metalinin organizmadaki esas görevi, glukoz tolerans faktör (GFT yapısı = Cr (+3) + nikotinik asit + glutamik asit + glisin + kükürtlü aminoasit)'ün yapısında yer almasıdır. Diyabet hastalarına krom verilmesi glukoz toleransını artırır. Krom (+3) metalinin plazma proteinlerine bağlandığı ve deri, akciğer, kaslar ve yağda bulunduğu bildirilmektedir. Altı değerlikli krom deride ve mide asidinde üç değerlikli forma dönüşür. Krom bileşiklerinin toksisitesi bileşiğin türü, oksidasyon basamağı, konsantrasyonu ve pH'sına göre değişir. Sucul organizmalarda Cr(III) ve Cr(VI)'nın toksisitesi genellikle düşüktür. Balıklar üzerine etkisi sıcaklık, pH ve türe bağlı olarak değişir. Vücuda alınan Cr(VI) formunun bağırsaklardaki absorpsiyon hızı Cr(III) formundan daha fazla olduğundan Cr(VI) daha toksiktir. Doğal ortamlarda Cr(VI) kolaylıkla Cr(III)'e indirgenebilir ve böylece toksik etkisi azalabilir. Krom bileşiklerine ve kronik asit buharlarına maruz kalma sonucu deride tahrişler, solunum yolu rahatsızlıkları, dermatitler, ülserleşme, solunum yolu kanserleri ve sinir sisteminde bozukluklar meydana gelebilir [23].

Bir dizi in vivo ve laboratuvar çalışmaları, Cr(VI)'nın genomik DNA hasarı ve lipid ve proteinlerin oksidatif bozunmasına neden olan reaktif oksijen türevlerinin (ROS)

üretimini arttırmak suretiyle bir oksidatif stres yarattığını göstermektedir. Süperoksit anyonu ve hidroksil radikallerinin üretiminin artması sonucu, yüksek lipid peroksidasyonu ve genomik DNA fragmentasyonu, hücre içi oksidize durumların modülasyonu, protein kinaz C'nin, apoptotik hücre ölümünün aktivasyonu ve gen ifadesinin değişimini içeren bir oksidatif stres oluşur. Cr(VI)'nın insan ve hayvanlarda toksik ve karsinojenik etkilerinin yanı sıra, deride alerjilere neden olduğu da bilinmektedir [24].

Kromun alabalıklar için su kalitesine bağlı olarak 28-80 ppm aralığında toksik olabileceği belirtilmektedir [14]. Cr(VI)'nın neden olduğu toksisitenin mekanizmasının çok iyi bilinmemesine rağmen, oksidatif stresin önemli bir rol oynadığına inanılır. Malondialdehit (MDA) kroma mesleki maruz kalmanın bir biyolojik göstergesi olarak kullanılabilir [17].

Çeşitli bileşik (kromik asit, kromatlar ve bikromatlar) ve alaşımlar (kromit) şeklinde ülkemizde de çok bulunan krom türevleri metalürji, tekstil, elektronik, boya ve kimya gibi çeşitli endüstri kollarında yaygın olarak kullanılır [15]. Cr(VI) endüstriyel ve kimyasal alanda yaygın olarak boyacılık, metal cilalanması, paslanmaz çeliği de kapsayan çelik imalatı, dayanıklı alaşımlar ve ahşap işlenişinde kullanılır. Krom polinikotinat, krom klorid ve krom pikolinat gibi Cr(III) tuzları ise daha çok gıda katkıları olarak kullanılır [24].

2.2. Oksidatif Stres ve Etkileri

2.2.1. Serbest radikaller:

Serbest radikaller, dış orbitallerinde bir ya da daha fazla paylaşılmamış elektronları olan kimyasal türlerdir. Serbest radikallerin reaktivitesi, karşı spin yönünün bir elektronunu kazanma isteğinden dolayı oluşur [25]. Her türden kimyasal ve biyokimyasal tepkime daima atomların dış orbitallerindeki elektronlar seviyesinde gerçekleşir. Dış orbitallerinde paylaşılmamış elektron bulunması söz konusu kimyasal türün reaktivitesini olağanüstü arttırdığı için radikaller reaktivitesi çok yüksek olan kimyasal türlerdir. Serbest radikaller kanser ve kalp hastalığı gibi kronik hastalıkların gelişimine katkıda bulunabilir [26].

Bütün hücreler her an binlerce serbest radikal tarafından kötü bir şekilde etkilenir. Serbest radikaller normal hücresel metabolizmanın ürünü olarak çevremizdeki kimyasallar tarafından üretilir [27].

Radikaller başlıca üç temel mekanizma ile oluşur:

- 1- Kovalent bağların homolitik kırılması ile
- 2- Normal bir molekülün elektron kaybetmesi ile
- 3- Normal bir moleküle elektron transferi ile [28].

Başlıca serbest radikal kaynaklarını şu şekilde sınıflandırabiliriz:

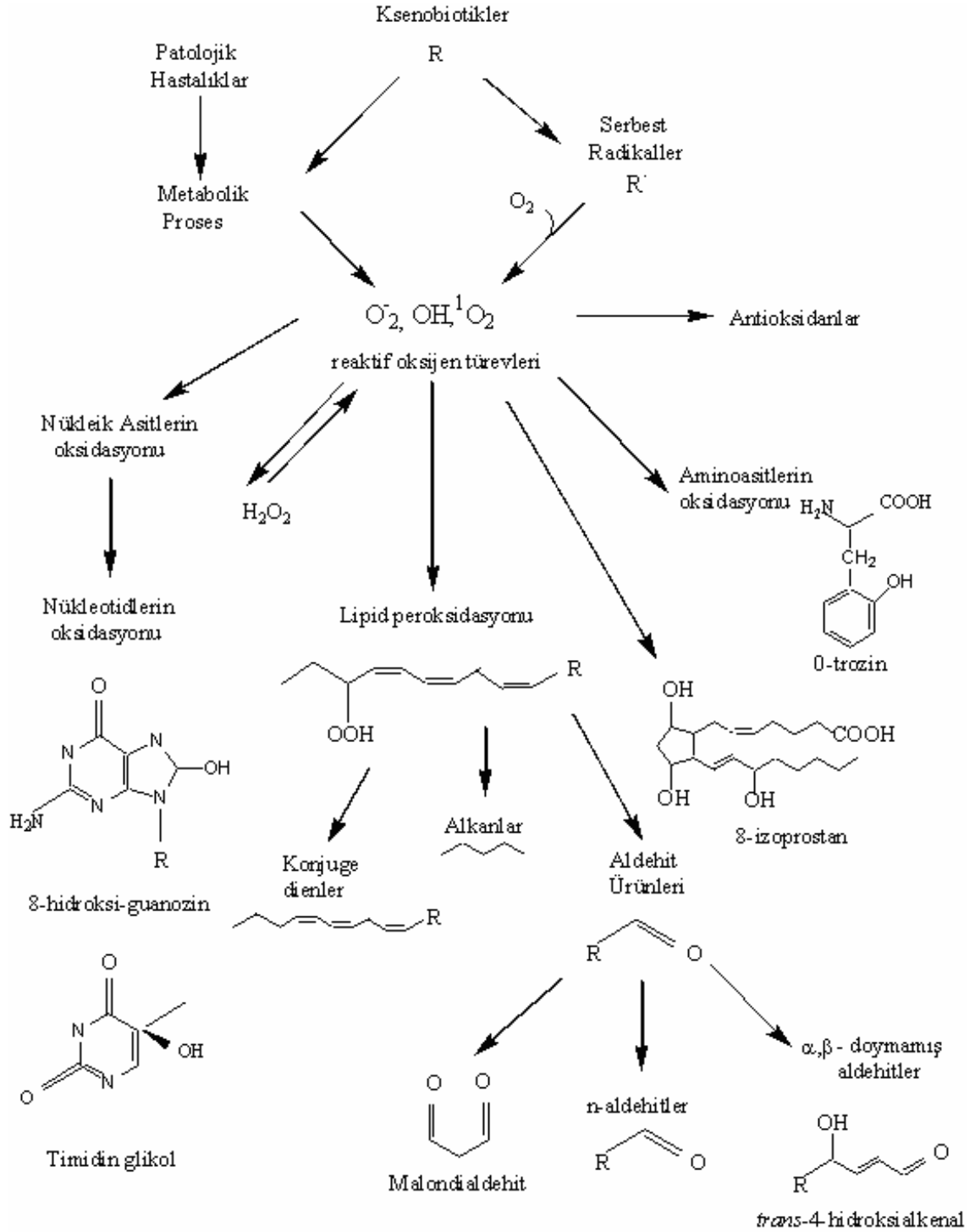
1- Biyolojik Kaynaklar

Antineoplastik ajanlar (nitrofrontoin, bleomisin, doxorubicin gibi kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar), alışkanlık yapan maddeler, çevresel ajanlar (hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler), radyasyon ve stres serbest oksijen radikallerinin biyolojik kaynakları içinde yer almaktadır.

2- İntraselüler Kaynaklar

Küçük moleküllerin (tioller, katekolaminler, flavinler, tetrahidropterinler, hidrokinonlar, antibiyotikler) otooksidasyonu, enzimler ve proteinler (triptofan dioksijenaz, ksantin oksidaz, hemoglobin), mitokondrial elektron transport zinciri, endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri (sitokrom P-450 ve sitokrom b5 gibi), peroksizomlar (oksidazlar, flavoproteinler), plazma membranı (lipoksijenaz, prostaglandin sentetaz, lipid peroksidasyonu, fagositlerde NADPH oksidaz) ve oksidatif stres yapıcı durumlar (iskemi, travma, intoksikasyon) [29].

Serbest radikaller hücredeki bütün makromoleküllere, lipidlere, DNA'ya, hücre membranı ve proteinlere saldırarak onları zarara uğrattılar. Aşağıdaki şekil bu açıklamayı detaylı bir şekilde göstermektedir [10].



Şekil 2.1. Serbest radikallerin biyolojik hedeflere verdiği zararlar [10]

2.2.2. Oksijen, oksijen radikalleri ve oksidatif stresin tanımı

Moleküler oksijen dış orbitallerinde paylaşılmamış iki elektron içerir. Radikal tanımına göre oksijen diradikal yapıya sahip bir moleküldür. Oysa oksijenin reaktivitesi beklenenin aksine çok düşüktür. Diradikal bir yapıya sahip olan oksijenin herhangi bir molekül ile tepkimeye girebilmesi için tepkimeye gireceği molekülün de benzer yapıya (farklı orbitallerde spinlerin aynı yönde elektron içermesi) sahip olması gerekir. Oysa başta organik moleküller olmak üzere, atom ve moleküller orbitallerinde elektronları anti paralel ve eşleşmiş olarak içerirler. Veya paylaşılmamış elektronlar kovalent bağlara katılmışlardır. Bunun sonucu olarak oksijenin diğer moleküllere olan reaktivitesi son derece kısıtlanmıştır. Bu kısıtlama “spin kısıtlaması” olarak adlandırılır. Canlıların oksijeni kullanabilmesi için oksijene elektron transferi yaparak spin kısıtlamasını aşmaları gerekir. Bu işlem için canlılar bazı metal iyonlarından (Fe, Cu, Mn, Zn) yararlanırlar. Oksijen bulunan bir ortamda çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenlerle oksijen radikalleri yapılabilir. Düşük derişimlerdeki reaktif türler hücrelerin antioksidan sistemleri tarafından inaktive edildiklerinden, önemli toksik etkilere neden olmazlar. Ancak bu radikallerin yapımları çeşitli patolojik durumlarda artabilir [28].

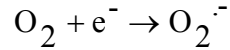
Serbest radikaller ve oksijenin radikal olmayan türleri toplu olarak reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılır [25]. Aerobik organizmalarda normal fizyolojik ve metabolik süreçler sonucunda üretilen reaktif oksijen türleri (ROS) çok toksiktir ve birçok biyomolekülü oksitleyerek hücre ölümlerine ve doku hasarlarına yol açarlar. Bu reaktif oksijen türleri insan vücudunda devamlı oluşturulurlar ve normal şartlar altında enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri tarafından ortadan kaldırılırlar. Prooksidanlar ve antioksidanlar arasındaki denge, aerobik organizmaların fonksiyonu ve yaşamı için önemlidir. Prooksidanlar lehine ve/veya antioksidanlar aleyhine bir dengesizlik, canlı vücudunda güçlü bir şekilde hasara yol açar ve bu oksidatif stres olarak adlandırılır [30]. Bir başka deyişle oksijen radikallerinin fazla yapımının neden olduğu etkilerin toplamı oksidatif stres olarak adlandırılır [28]. Serbest oksijen radikallerinin uzaklaştırılmasında bir azalma olduğu zaman ya da aşırı üretilmeleri durumunda patolojik bir durum oluşabilir. ROS’lar doğal koruma sistemlerini geçtiği zaman vücuda ekzojen antioksidan bileşikler gönderilmelidir [30].

Oksijenden oluşan başlıca reaktif oksijen türleri:

1. $O_2^{\cdot-}$ (Süperoksit radikali)
2. HO^{\cdot} (Hidroksil radikali)
3. H_2O_2 (Hidrojen peroksit)
4. $HOCl$ (Hipokloröz asit)
5. $O_2^{\uparrow\downarrow}$ (Singlet oksijen)
6. ROO^{\cdot} (Peroksil radikali)
7. $RCOO^{\cdot}$ (Organik peroksit radikali)
8. R^{\cdot} (Alkil radikali)
9. RO^{\cdot} (Alkoksil radikali)
10. HO_2^{\cdot} (Perhidroksil radikali) [27, 31].

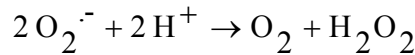
$O_2^{\cdot-}$ (Süperoksit) radikali :

Moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesiyle kararsız bir yapı olan $O_2^{\cdot-}$ radikali oluşur:



H_2O_2 (Hidrojen peroksit):

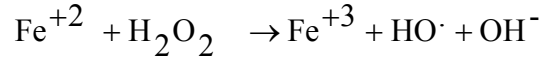
$O_2^{\cdot-}$ 'e bir elektron eklenirse (süperoksit dismutasyonu) veya O_2 'nin direkt olarak indirgenmesiyle hidrojen peroksit oluşur. Dismutasyon kendiliğinden veya Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi aracılığıyla katalize olabilir.



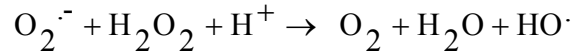
Hidrojen peroksit birçok oksidant oluşturabilir ancak en reaktif olanlardan iki tanesi; hidroksil radikali (OH^{\cdot}) ve hipokloröz asittir ($HOCl$) [25].

HO· (Hidroksil) radikali, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları:

1. Fenton reaksiyonu: Hidrojen peroksit Fe⁺² ve diğer geçiş (transition) elementleri (Cu, Zn, Mn, Cr, Co, Ni, Mo) varlığında indirgenerek HO· radikali oluşur:



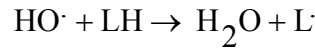
2. Haber-Weiss reaksiyonu: Hidrojen peroksit O₂⁻ İle reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturur. Bu reaksiyon bakır ve demir tarafından katalizlenir [25].



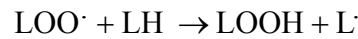
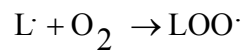
ROO· (peroksil radikali) ve lipid peroksidasyonu:

Karbon merkezli radikaller hızlı bir şekilde oksijen ile reaksiyona girerek peroksil radikalini oluştururlar. Bu peroksil radikali lipid peroksidasyonunu başlatan radikaldir. Lipid peroksidasyonu serbest radikaller tarafından sebep olunan oksidatif stresin bir göstergesi olarak en yaygın kullanılan metotlardan biridir. Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poliansatüre yağ asitleri (PUFA) grubu serbest radikallerle olan reaksiyonlara karşı çok hassastır. Yağ asitlerinde lipidlerin peroksidasyonu bir radikal zincir reaksiyonuna sebep olabilir ve bu reaksiyon kendi kendine katalizlenerek devam eder [10].

Lipid peroksidasyonu ağır metallerin varlığında artar. Bu metaller süperoksit ve hidrojen peroksitin daha güçlü oksidanlara dönüşümünü katalize ederler. Lipid peroksidasyonu, poliansatüre yağ asitlerinin zincirleme bir radikal reaksiyonudur. HO· radikali, bir yağ asitinin (LH) metilen kısmından bir hidrojen atomu (H⁺) kopararak bir lipid radikali oluşturur.



Zincirleme reaksiyon oluşan lipid radikaline O₂ ilavesi ile devam eder ve lipid peroksil radikali (LOO·) ile lipid peroksit (LOOH) oluşur.



Tek elektron üzerinden yeniden yapılanma lipidin parçalanması ile sonuçlanır.

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ürünlerin başlıcaları MDA, 4-hidroksinonenal, 4-hidroksi-2,3-transnonenaldir. Zincir reaksiyonu antioksidanlar (Vitamin E gibi) tarafından sonlandırılabilir. Lipid peroksidlerinin konsantrasyonları arttıkça, membranların akışkanlıkları azalır ve kalsiyum gibi iyonların hücre içine geçişi kolaylaşır ve sonuçta hücre fonksiyonlarında bozukluklar ortaya çıkar. Lipid hidroperoksidleri üretildikleri yerden yayılıp proteinleri ya da DNA'yı oksitleyerek hasarlar oluşturabilen malondialdehit ve 4-hidroksi-2-nonenal gibi birçok aldehitlere ayrışabilir. Lipid peroksidasyonu markırları sıklıkla oksidatif hasarın göstergeleri olarak kullanılır [25,31]. Lipid peroksidasyonunun göstergeleri; pentan, malondialdehit (MDA), 4-hidroksinonenal (4-HNE), konjuge yağ asitleri (özellikle hidroksioktadekadienoik asitler (HODEs)), izoprostanlar ve LPO ürünlerinin DNA'ya eklenmesinden türetilen ürünlerdir [32].

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid hidroperoksidlerinin yıkımı için geçiş metalleri iyon katalizi gerekir. Lipid hidroperoksidleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler ya da başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin peroksidasyonunda tiobarbütirik asitle ölçülebilen malondialdehit (MDA) meydana gelir. Malondialdehit lipid peroksid seviyelerinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılır. MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir fakat lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir [33].

Bakır, krom, nikel ve kadmiyum gibi metaller ve şelat kompleksleri lipid peroksidasyonunda ve sonrasında karsinogenezisin teşvik edilmesinde rol oynarlar [31].

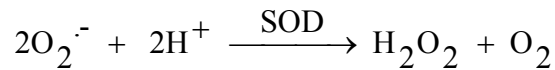
2.3. Antioksidan Savunma Sistemleri

Normal fizyolojik koşullarda hücreler, oluşan serbest radikal ürünleri ve peroksitler gibi moleküllerin neden olabileceği oksidatif hasara karşı antioksidan savunma sistemleri tarafından korunur. Bu sistemler enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere iki gruba ayrılır. Enzimatik olanlar; Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), Katalaz (CAT), Glutasyon-S-Transferaz (GST) ve Glutasyon redüktaz (GR)'dır. Enzimatik olmayanlar ise; Vitamin E, Vitamin C, Vitamin A gibi vitamin türleri ile Flavinoidler, Melatonin, Hemogloblin, Miyogloblin, Askorbik asit, Transferrin, Laktoferrin, Albümin, Sistein, Bilirubin, Mannitol, Lipoik asit, Hemopeksin, Glutasyon, Koenzim Q, karotenoidler ve bazı eser elementlerdir [10, 25, 31]. Özellikle enzimatik savunma sistemleri reaktif oksijen türevleri, reaktif nitrojen türevleri ve onların ara ürünlerini ortadan kaldırma, nötralize etme ya da süpürme yeteneğine sahip molekülleri içerir [27].

2.3.1. Enzim yapısındaki antioksidanlar

2.3.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD; Süperoxide Oksidoredüktase: EC 1.15.1.1)

İlk olarak 1968 yılında Mc Cord ve Fridovich tarafından tanımlanan Süperoksit dismutaz enzimi, toksik ve reaktif olan süperoksit anyon radikalinin ($O_2^{\cdot-}$) daha az reaktif olan hidrojen peroksit (H_2O_2) indirgenmesini katalize eder. Hidrojen iyonu kullanır ve oksijen üretir.



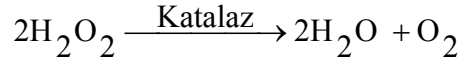
Aktif merkezlerinde bulunan geçiş metalinin tipine göre SOD'lar 3 şekilde sınıflandırılabilir. Bunlar; bakır/çinko (Cu/Zn) SOD, mangan (Mn) SOD ve demir (Fe) SOD'dur. Cu/Zn SOD öncelikle ökaryotların sitozolünde, kloroplastlarda ve bazı bakteri türlerinde bulunur, Mn-SOD ökaryotlar ve prokaryotların mitokondrisinde ve Fe-SOD da prokaryotlarda bulunur. Genel olarak hücrede en bol bulunan izomer sitozolik Cu-Zn SOD'dur [27].

Enzimin fizyolojik fonksiyonu, oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır ve doku pO_2 artışı ile artar. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda

süperoksit üretimi olmasına rağmen bu enzim sayesinde intraselüler süperoksit düzeyleri düşük tutulur. SOD'un ekstraselüler aktivitesi çok düşüktür [33].

2.3.1.2. Katalaz (CAT; H₂O₂ Oksidoredüktase: EC 1.11.1.6)

Katalaz, molekül ağırlığı 24000 olan ve aktif merkezinde 4 tane ferrihem grubu bulunduran bir enzimdir. Hidrojen peroksiti (H₂O₂) suya ve moleküler oksijene katalize eder.



Katalaz, kataliz görevini iki farklı yoldan gerçekleştirir:

- 1) H₂O₂'nin parçalanması (katalitik reaksiyon)
- 2) Alifatik alkollerin peroksidasyonu (peroksidik reaksiyon) [34].

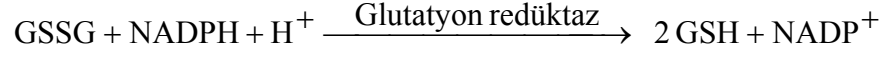
Katalaz kofaktör olarak demire ihtiyaç duyar ve aktivitesi oksidatif kas fibrillerinde en yüksektir [25].

2.3.1.3. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px; Glutathione: H₂O₂ Oksidoredüktase EC 1.11.1.9)

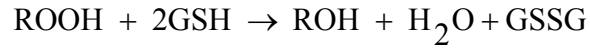
Glutasyon peroksidaz, elektron kaynağı olarak glutasyonu kullanarak hidrojen peroksit ve organik hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Mitokondri, sitozol ve hücre membranlarında bulunur [25]. Glutasyon peroksidazın molekül ağırlığı yaklaşık olarak 85000 D.'dur. Tetramerik, 4 selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir [33]. Bu enzim, hücre membranlarını, lipid peroksidasyonundan kaynaklanan hasarlardan korur. Selenyum, bu büyük hücresel antioksidan enzimin aktivasyonu için gerekli bir kofaktördür. Glutasyon peroksidaz enziminin selenyuma bağımlı ve bağımsız iki izomeri vardır. Selenyum bağımlı GSH-Px enziminin aktif merkezinde enzime kovalent bir şekilde bağlı selenosistein formunda selenyum bulunmaktadır. Selenyum bağımlı Glutasyon peroksidaz enzimi, hidrojen peroksit (H₂O₂) ve lipid peroksitlerine karşı aktiftir. Enzimin aktivitesi, enzim için tek hidrojen veren Glutasyon (GSH)'un bol miktarı ve enzimin dört alt ünitesinin her birindeki Se varlığına bağlıdır. Se eksikliği GSH-Px aktivitesinde azalmaya, dolayısıyla lipid peroksidasyonunda artışlara yol açmaktadır. GSH-Px, redükte glutasyon (GSH)'u okside glutasyon (GSSG)'a dönüştürerek, hidrojen peroksiti ortadan kaldırır.



Hidroperoksitlerin redükte olması ile meydana gelen GSSG, glutatyon redüktazın katalizlediği reaksiyon ile tekrar GSH'a dönüşür [35, 36].



Fosfolipid hidroperoksid glutatyon peroksidaz da (PLGSH-Px) molekül ağırlığı 20.000 dalton olan, monomerik, selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. Membran fosfolipid hidroperoksidlerini, alkollere indirger [33].



2.3.2. Enzimatik olmayan savunma sistemleri

Enzimatik olmayan savunma sistemlerine Vitamin E, Vitamin C, Vitamin A gibi vitamin türleri ile Flavinoidler, Melatonin, Hemoglobin, Miyoglobin, Askorbik asit, Transferrin, Laktoferrin, Albümin, Sistein, Bilirubin, Mannitol, Lipoik asit, Hemopeksin, β -karoten, Glutasyon, Koenzim Q, karotenoidler ve bazı eser elementler girer [25].

2.3.2.1. Bir antioksidan eser element olan selenyumun biyolojik özellikleri

Selenyum, küçük miktarlarda alındığında hücreleri ve dokuları serbest radikal hasarından koruyan çok önemli bir antioksidan, fakat daha büyük miktarlarda alındığında toksik olabilen temel eser bir mineraldir [37].

Selenyum VI A grubunda sülfür ile tellurium arasında ve periyodik tablonun 4. periyodunda arsenik ve brom arasında yer alan bir metalloiddir. Birçok kimyasal özellikleri bakımından sülfüre çok benzer. 1817'de İsveç kimyacı Jons Jacob Berzelius tarafından keşfedilmiştir [38]. İnsanlar ve hayvanlar için gerekli bir element olduğu gibi, bitkiler yaşamlarını sürdürmek için selenyuma gereksinim duymazlar. Selenyuma, selenoproteinler olarak da bilinen selenyum bağımlı enzimlerin birçok fonksiyonu için ihtiyaç duyulur [37].

Selenyumun organik ve inorganik olmak üzere iki formu bulunmaktadır. Organik selenyum formları; selenosistein, selenometiyonin, dimetilselenit gibi aminoasitlere bağlı metile formlardır. Organik selenyum bileşikleri ağır metallerle bağlanır ve onların vücuttan atılmasına yardım eder. İnorganik selenyum tuzlarından en önemlileri sodyum selenat ve sodyum selenittir. İnorganik selenyum bitkisel kaynaklıdır ve toprakta da bol miktarda bulunur [39,40]. Selenyum doğada ve biyolojik sistemlerde selenat (Se^{+6}), selenit (Se^{+4}), elementel selenyum (Se^0) ve selenid (Se^{2-}) olarak meydana gelir. Bitkilerde ve hayvanlarda doğal olarak selenosistein, selenometionin ve diğer benzer sülfür aminoasit yapılarında bulunur [22]. İnsanda ortalama vücut selenyum düzeyi 14.6 mg'dır. Vücutta daha çok karaciğer, böbrek ve dalakta birikir [15].

Selenyumun Vitamin E eksikliği olan hayvanlarda karaciğer nekrozunu önlemede gerekli bir element olduğunun 1957'de keşfedilmesinden dolayı, selenyumla ilgili çalışmalara ilgi özellikle çiftlik hayvanları endüstrisinde önemli derecede artmıştır. 1973'te selenyum her molekülünde Se bulunan 4 atomlu bir tetramerik protein olarak tanımlanan Glutasyon peroksidazın önemli bir bileşeni olarak tanımlandı [38].

Selenyum bir antioksidan enzim olan Glutasyon peroksidazdaki rolünden dolayı insanlar ve hayvanlar için gerekli temel eser bir mineraldir. Bu enzim hücre membranlarını, lipid peroksidasyonundan dolayı meydana gelen hasarlardan korur. Reaktif oksijen türevlerinin üretimini engelleyerek oksidatif hasara karşı hücreler arası savunma mekanizmasına yardımcı olur. 1980'lerde selenoproteinlerin keşfi, selenyumun sadece antioksidan aktivitesinin olmadığını, memeli metabolizmasının birçok yönünde rolünün olduğu bulundu. Daha sonraları selenyum, Thioredoxin redüktazda fonksiyonel bir selenoprotein olarak İyodotrin deiodinazın önemli bir bileşeni olarak gösterildi. Selenoproteinlerin ve diğer selenyum metabolitlerinin bağışıklık sisteminde önemli olduğu ve kanser riskini azalttığına dair birçok delil vardır [38].

Selenyumun biyolojik aktivitesinin 3 düzeyi vardır:

- 1- İz miktarlarda normal büyüme ve gelişme için ihtiyaç duyulur
- 2- Orta miktarlarda depo edilebilir ve homeostatik fonksiyonlar sürdürülür
- 3- Yüksek konsantrasyonları toksik etkilerle sonuçlanabilir.

Endüstriyel ve tarımsal aktiviteler selenyumun jeolojik kaynaklardan salınımını hızlandırmakta ve onu dünyanın etrafındaki karasal ve sucul ekosistemlerdeki yabanıl hayvanlar ve balıklar için mevcut kılmaktadır. Tarımsal faaliyetler sonucu salınan atık sular, lağım çamuru, kömürle yanan elektrik santrallerinin uçan külleri, yağ rafinerileri, fosfat ve metal madenlerin işlenmesi gibi faaliyetlerin hepsi sucul ortamlardaki Se kontaminasyonunun kaynağıdır. Selenyumun biota ile alınımı, su ya da besin yoluyla olabilir. Suda çözülmüş Se balıklar ve yaban hayvanları tarafından solungaçlar, deri ya da ağız yoluyla alınmaktadır [41].

Selenyumun besinsel ya da ilave formları, selenosistein (SeCys) ve selenometiyonin (SeMet) gibi aminoasitler, Se-metilselenosistein (SeMSC) gibi aminoasit türevleri ve selenit ve selenat gibi Se tuzlarıdır. Bu formların her biri selenyumun metabolik yoluna farklı bir noktadan girerler ve bundan dolayı her birinin farklı metabolik sonucu vardır [42].

Selenyumun ana rolü, Se-GSHP(x) enziminde bir kofaktör olarak görev yapmasıdır. Glutasyon peroksidazın her molekülü 4 atom selenyum içermektedir. Organik selenyum bileşikleri ağır metallere bağlanır ve onların vücuttan atılmasına yardım eder. Vücudu civa, kadmiyum, gümüş, arsenik ve kurşunun zararlı etkilerine karşı korur. Yeterli derecede Se alan insanlarda sigara, alkol, oksidize yağlar, Hg ve Cd toksisitesi daha az görülür. Selenyum özellikle erkeklerde protein sentezi, büyüme, gelişme ve üremeye yardımcı olur. Sperm üretimi ve hareketliliğini düzenlediği gösterilmiştir. Erkeklerin vücutlarında bulunan selenyumun aşağı yukarı yarısı testislerde toplandığı için erkekler dişilere göre selenyuma daha çok ihtiyaç duyarlar. Selenyumun hidrojen peroksitin yıkılmasında rolünün olduğu ve antioksidan bir etken olan E vitamininin etkisini desteklediği düşünülmektedir. E vitamini ile birlikte çalışır ve lipidleri oksidatif hasardan koruyarak hücre membran bütünlüğünün korunmasına yardım eder. Selenyum Vitamin E ile birlikte immün sistemin koruyucu fonksiyonunu 20-30 kat daha fazla düzenler ve birlikte sinerjistik etki gösterirler. Detoksifiye antibadilerin artışında ve dolayısıyla hastalıklara karşı dirençte kullanılmaktadır. Selenyum, kanser riskini yaklaşık %40 düşürebilir ayrıca kanserden ölüm oranını %50 düşürebilir. Bundan dolayı bu madde antikarsinojenik bir antioksidan olarak adlandırılabilir. Hayvanlarla yapılan çalışmalarda 1-4 ppm selenyumun besinlere eklenmesiyle kanser oranlarında düşme gözlenmiştir. Günde 200 µg selenyum alımının kanserden ölüm oranını %50 azalttığını bulmuştur. Ayrıca besinlerine selenyum ilave edilmiş olan insanların %63 daha az prostat kanseri, %58 daha az bağırsak kanseri, %46 daha az akciğer kanseri ve %37 daha az bütün kanserlere yakalandığı tespit edilmiştir. Selenyum ayrıca kırmızı kan hücre metabolizmasına yardım eder ve doku kültürlerinde kromozom kırılmalarını önler [43]. Selenyum, bir prohormon olan tiroksini (T4) homonun aktif formu olan triiyodotrone (T3) dönüştürmek için ihtiyaç duyulan İyodotrone deiodinaz enziminin bir komponentidir. Dolayısıyla Se eksikliği, tiroid hormon fonksiyonunu zayıflatır ve hipotiroidizm ortaya çıkar [44].

Selenyum ölçüm miktarı µg birimiyle ifade edilir. Besin ve Beslenme Kurulu (FNB) besinlerden günlük 50-200 µg Se alınımının güvenli ve yeterli olabileceğini belirtmiştir. Erkekler için günlük minimum 70µg, kadınlar için 55µg, bebek ve 14 yaşına kadar çocuklar için 10-45 µg Se alınması tavsiye edilmiştir. Selenyum toksisitesi maksimum tavsiye edilen dozun üzerine çıktığında gözlenmektedir. Maksimum tavsiye edilen doz, günde 400 µg'dır. Günlük inorganik olarak 1000µg, organik olarak 2000-3000 µg selenyumun tırnaklarda kayba ve gerilemeye yol açtığı saptanmıştır [43, 44].

Selenyum vücuda fazla miktarlarda alındığında toksik etkiler göstermektedir. Se toksisitesi ilk olarak 1930'larda selenyumca zengin toprakların bulunduğu alanlarda otlanan çiftlik hayvanlarında alkali hastalığı ve Blind staggers diye bilinen hastalıkların ortaya çıkmasıyla keşfedilmiştir. Alkali hastalığı, 5'in üzerinde fakat 50 mg/kg'dan daha az Se içeren bitkilerin sürekli yenmesiyle atların ve sığırların kronik zehirlenmesidir. Bu oranlarda Se biriktiren bitkiler, ikincil indikatör bitkiler olarak adlandırılır. Bu hastalık, tırnaklarda çürüme ve tüylerde dökülmelerle karakterize edilir. Selenyum toksisitesinin ilk gözlemleri Marco Polo'nun 13.YY'da Çin'in bazı bölgelere seyahati esnasında yüksek selenyum içeren toprakların olduğu yerlerde atlarda toynak dökülmesinin olduğunun fark edilmesiyle yapılmıştır. Blind staggers (kör sendeleme) de doğal olarak 1000 mg/kg'dan fazla Se biriktiren birincil indikatör bitkiler olarak sınıflandırılan bitki türleriyle beslenen hayvanlarda görülen bir kronik zehirlenmedir. Bu hastalığın belirtileri; kilo kaybı, körlük, saldırma, yönelememe ve solunum güçlüğüdür. Hayvanlarda selenozise neden olan bitkiler, *Morina reticulata* ve *Nepturia amplexicaulis* bitkileridir. Selenyumun insanlardaki çevresel toksisitesi nadirdir ancak selenyumla çalışan işçilerin uzun süreli maruz kalmaları sonucunda tırnaklarda çürüme, hipokromik anemi ve lökopeniye neden olduğu rapor edilmiştir. Selenyum toksisitesi sadece tüketilen elementin miktarına ve kimyasal şekline bağlı değildir, aynı zamanda maruz kalanın türü, yaşı, fizyolojik durumu ve beslenme şekli gibi birçok faktörlere bağlıdır [38].

Biyokimyasal özellikleri açısından selenyum sülfüre çok benzer. Selenyum fazla miktarlarda olduğunda, hücreler anahtar fonksiyonlarından birini (protein sentezini) yerine getirirken, ikisi arasında iyi ayırım yapamazlar. Selenyum yanlışlıkla hücrelerin içinde oluşan proteinlerdeki sülfürün yerine geçer. Sülfür-sülfür bağları, proteinlerin 3'lü (heliks) yapılarını oluşturmaları için gereklidir. Selenyumun normal kimyasal bağlanmayı bozarak sülfürün yerine geçmesi, uygunsuz ve fonksiyonsuz protein ya da enzimlerin oluşmasıyla sonuçlanır [45].

2.3.2.2. Selenyumun kullanım alanları

Selenyum elektronik endüstrisinde rektifier olarak, fotosellerde, solar pillerde, cam ve seramik endüstrisinde, çelik yapımında, boya ve verniklerde kullanılır. Ayrıca insektisit, fungusit ve tıpta kepek önleyici olarak kullanılır. Endüstride selenyum ve selenyum dioksit tozlarına en çok bakırın rafinasyonu ve diğer sülfür filizlerinin kavrulması, cam, seramik endüstrisinde; organik buharlarına ise kimya, plastik endüstrileri ile kauçuk vulkanizasyonu esnasında rastlanır [19].

Selenyumun bu endüstriyel kullanım alanlarının yanında tıpta da birçok kullanım alanı vardır. Selenyum Vitamin E, çinko, beta-karoten ve Vitamin C ile besinsel antioksidan terapinin bir parçası olarak selenometiyonin formunda (aktif form olan selenosisteini üretecektir) birçok enfeksiyonel hastalıkları tedavi etmede yardımcı olabilir. Arthritis ve bazı otoimmün problemleri çözebilir. Selenyumun kardiyovasküler hastalıkların önlenmesine yardımcı olduğu ve çarpıntı ve kalp krizleri riskini azalttığı (muhtemelen platelet agregasyonunu indirgeyerek) bilinmektedir. Selenyum toprakta bol olduğu yerlerde ya da besinlere eklendiğinde bir antikarsinojenik etki sergiler. Kansere yakalanma riskini ve kanserden ölüm oranını azaltır, özellikle meme,bağırsak, prostat, akciğer, ovaryum, mesane, pankreas ve deri kanserlerine karşı koruyucu olduğu bilinmektedir. Selenyumun immün sistemi uyarıcı etkisinden dolayı birçok bağışıklık sistemi hastalıklarının önlenmesinde kullanılır. Selenyum özellikle Vitamin E ile birlikte antioksidan özelliklerinin sayesinde tıp dünyasında güçlü bir tedavi etme aracı olarak kullanılır. Selenyum direncimizi arttırarak hastalıklardan korunmamıza yardımcı olur. Selenyumun hücre membranlarını koruyucu ve doku elastisisesini arttırıcı özelliği onun yaşlanmayı geciktirici özelliğinin bir göstergesidir. Vit. E ile birlikte selenyum akne tedavisinde de kullanılır. Deri sağlığının korunmasında ve kepek önleyici olarak da kullanılır [43].

3. KAYNAK ÖZETLERİ

Berntssen ve arkadaşları (2000), çalışmalarında somon alabalığına (*Salmo salar* L.) yüksek düzeylerde besinsel bakır ve kadmiyum uygulanması sonucunda Se bağımlı GSH-Px aktivitesini ve doku lipid peroksidatif yanıtların düzeyini ölçmüşlerdir. Balıkların besinine 1 aylığına esansiyel olmayan kadmiyum (0.7 ya da 204 mg Cd/kg DW) ya da esansiyel olan bakır (0,34 ya da 691 mg Cu/kg DW) eklemiştir. Sonuçta, 204 mg/kg'lık kadmiyuma maruz bırakılan balıklarda ince bağırsak ve karaciğerde kontrol grubuna göre Se bağımlı GSH-Px aktivitesinde önemli düşüşlerin olduğu gözlenmiştir. Kadmiyumun en yüksek besinsel konsantrasyonda (204 mg/kg) oksidatif savunma sistemini hasara uğratarak doku lipid peroksidasyonunu indüklediği bulunmuştur [47].

Bir başka çalışmada ise farklı dozlarda in vivo kadmiyum kontaminasyonuna maruz bırakılan tatlı su çipurasında (*Oreochromis niloticus*) oluşan oksidatif stres ve metabolik değişikliklerin değerleri ölçülmüştür. 0.35, 0.75, 1.5 ve 3.0 mg/L'lik konsantrasyonlarda Cd²⁺'un (CdCl₂) suya karıştırılması suretiyle 60 günlük uygulama süresi sonucunda SOD ve GSH-Px aktiviteleri balığın karaciğeri ile kırmızı ve beyaz kaslarında ölçülmüştür. Bu ölçümlere dayanılarak, balıkta kadmiyum toksisitesinin bir göstergesi olarak serbest oksijen radikallerinin üretildiği gözlenmiş ve 0.35 mg/L'den daha yüksek konsantrasyonlarda (1.5mg/L ve 3.0 mg/L) kadmiyumun toksik olduğu ve balıklarda ölümlere yol açtığı saptanmıştır [48].

Chowdhury ve arkadaşları (2004), gökkuşağı alabalıklarına kadmiyum uygulanması sonucunda solunum, iyon regülasyonu ve stres parametrelerinde meydana gelebilecek değişiklikleri incelemiştir. Besinsel kadmiyum subletal düzeyde (500 mg/kg diet) 45 günlüğüne her 72 saatte bir 10 µg/L olacak şekilde balıklara uygulanmıştır. Kontrol grubuna göre hematokrit ve hemoglobinde sırasıyla %49 ve %74 oranında bir artış gözlenirken, plazma total amonyum ve glukoz düzeylerinde sırasıyla %43 ve %49 oranında bir azalma olduğu saptanmıştır. Ayrıca kadmiyum uygulanan gruplarda solunum asidozisi de gözlenmiştir. Bu olaylar 72 saatlik bir uygulama sonucunda meydana gelmiş, 45 günlük uygulama sonucunda ise, uygulamanın artık kronikleştiği ve alabalıkların suda çözünmüş Cd tarafından yaratılan fizyolojik streslerden korunduğu saptanmıştır [21].

Kadmiyumun antioksidatif savunma sistemi üzerine etkilerinin araştırılmasına yönelik yapılan çalışmalardan birinde, CdCl₂'nin kemikli balık *Sparus aurata*'ya 3 ve 6 günlük uygulanmasının sonucunda karaciğerindeki enzim aktivite değişimleri incelenmiştir. Karaciğerde antioksidan enzimler olan Glutasyon peroksidaz, Glutasyon redüktaz ve Katalazın aktivitesinin 3 ve 6 günlük Cd uygulaması sonucunda önemli derecede düştüğü gözlenmiştir [49].

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada ise kadmiyumun, sazan balığının (*Cyprinus carpio*) karaciğer ve kas dokularında serum ve glikojen depolarında glukoz düzeyi üzerine etkileri araştırılmıştır. Balıklar 0.05, 0.1, 0.5 ve 1.0 mg/L subletal derişimlerde kadmiyuma 10 günlüğüne maruz bırakılmışlardır. Kadmiyumun belirtilen derişimlerde uygulanması sonucunda balığın kas ve karaciğer dokularındaki glikojen düzeyi kontrole göre önemli ölçüde azalmıştır. Serum glikoz düzeyi ise kontrole göre metalin ortam derişimindeki artışına paralel olarak artmıştır. Buradan, glikoz düzeyinin artması, kadmiyumun sazanın karbohidrat metabolizmasını önemli derecede değiştirdiğini, glikojen düzeyinin azalması ise, glikojenoliziste görev yapan enzimlerin aktivitesinin Cd tarafından uyarılmasının bir sonucu olarak düşünülebilir [50].

Ağır metal toksisitesi türün yanı sıra, aynı türün değişik yaşam evrelerinde de değişiktir. Çalta (1996), yaptığı bir çalışmada gökkuşığı alabalığı için toksik olan 0.5 ppm Cd'un aynı türün iç beslenme evresindeki bir larva için toksik olmadığını belirtmiştir. Aynı çalışmada besin kesesini tamamen absorbe edip dış beslenmeye geçen larvaların çoğunun birkaç gün içinde öldüğü gözlenmiştir [14].

Bir başka çalışmada Krom (VI)'nın insan periferik kan tek çekirdekli hücrelerinde oksidatif stres, apoptotik hücre ölümü ve p53 tümör baskılayıcı genin oluşumu üzerine etkileri incelenmiştir. Krom (VI)'nın bu hücrelerde oksidatif doku ve DNA hasarını oluşturmasının yanı sıra, reaktif oksijen türevlerinin oluşumuna neden olduğunu tespit edilmiştir. Ayrıca krom (VI)'nın, p53'ü eksik farelerde daha belirgin oksidatif hasara neden olduğu bulunmuştur. Bu sonuç, apoptotik düzenleyici protein olan p53'ün krom (VI) ile oksidatif stres ve toksisitede büyük bir rol oynadığını göstermektedir [24].

Roberts ve arkadaşları (2004), hegzavalent kroma (Cr VI) maruz bırakılan gökkuşığı alabalıklarında birçok biyobelirteç cevaplarını gözlemlemiştir. Gökkuşığı alabalıklarını sert suda (63.5 mg/L CaCO₃) 10 mg/L'lik subletal konsantrasyonda hegzavalent kroma 28 günlüğüne maruz bırakmışlar ve birçok biyolojik göstergeler balığın solungaç ve karaciğerinde ölçülmüştür. Cr⁶⁺'nın Cr³⁺ a indirgenmesinin bir sonucu olarak oksidatif stresin meydana geldiği bulunmuştur. Metallothionein

indüksiyonu ile SOD aktivitesi, lipid peroksidasyonu, hücrel morfoloji ve büyümede kontrol grubuna göre önemli farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, solungaç dokusunun karaciğere göre Cr toksisitesine daha duyarlı olduğu bulunmuş olup, bu da bize karaciğerin kroma zamanla adapte olduğunu gösterir [51].

Bir çalışmada da alüminyuma maruz kalmış sıçanlarda Vitamin E ve Selenyumun lipid peroksidasyonu, enzim aktiviteleri ve biyokimyasal parametreler üzerine antioksidan etkisi araştırılmış ve sonuçta alüminyum klorürün ($AlCl_3$) serbest radikalleri önemli derecede indüklediği gözlenmiştir. Vitamin E ya da selenyumun tek başına serbest radikallerin, total lipidlerin, kolesterol, üre ve bilirubin düzeyini düşürdüğü fakat plazma total proteini ve albümin düzeyini arttırdığı bulunmuştur. Vitamin E ve Selenyumun tek başlarına ya da birlikte uygulanmalarının çalışılan parametrelerde alüminyumun toksik etkilerini giderdiğini bulunmuştur [46].

Tinggi (2003), Se eksikliğinin insanlarda ve hayvanlarda sağlık problemlerine yol açtığını, yüksek dozlarda ise selenozise yol açabileceğini belirtmiştir. Avustralya'da Se eksikliğinin çiftlik hayvanlarında sağlık sorunlarına yol açtığını ve hayvanların besinlerine Se ilave sonucunda bu sorunların giderildiğini bulmuştur [38].

Bir başka çalışmada ise aril ve alkil diselenitlerin lipid peroksidasyonu üzerine koruyucu etkisi fare ve sıçanlarda araştırılmıştır. Her iki bileşiğin de lipid peroksidasyonunu azaltan önemli antioksidanlar olduğu bulunmuştur. Ayrıca diaril diselenitlerin alkil diselenitlere göre tiyol peroksidaz aktivitesi açısından daha yüksek bir potansiyel sergilediği ve daha güçlü bir antioksidan olduğu tespit edilmiştir. Diselenitlerin lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etkisinin fare ve sıçanlarda farklı olduğu bulunmuştur. Test edilen bileşiklerin farenin beyinde sıçanlara göre daha yüksek bir antioksidan potansiyeli sergilediği de saptanmıştır [30].

Örün ve arkadaşları (2005), farklı dozlarda sodyum selenitin gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) bazı biyokimyasal ve hematolojik parametreler üzerine etkisini araştırmışlardır. Gözlenen tüm biyokimyasal ve hematolojik veriler doğrultusunda sodyum selenitin gökkuşağı alabalığında 2 ve 4 ppm konsantrasyonlarda antioksidatif savunmaya önemli bir katkıda bulunduğunu, 6 ppm de ise artık letal dozun oluşabileceğini tespit etmişlerdir [52].

Yine selenyumun antioksidan koruyucu etkisinin araştırılmasına yönelik yapılan bir çalışmada yüksek selenyum içerikli brokolinin sıçanları kanserden koruyucu etkisi araştırılmıştır. Kimyasal olarak indüklenen meme ve bağırsak kanserlerine karşı yüksek selenyum içerikli brokoli ve brokoli tohumlarının koruyucu etkisini tespit etmek

amacıyla 2 farklı sıçan ırkının (Sprague-Dawley, F-344) besinlerine brokoli katılmıştır. Sonuçta 3.0 µg/g oranında selenyum içeren brokoliyi tüketen Sprague-Dawley sıçanlarında hiç selenyum bulunmayan ya da 0.1 µg selenit formunda selenyum içeren brokolileri tüketen sıçanlara göre daha az meme tümörlerinin olduğu gözlenmiştir. Bir diğer deneyde ise 2.0 µg/g oranında selenyum içeren brokolileri tüketen F-344 soyu sıçanların 0.1 µg Se ya da hiç selenyum içermeyen brokolileri tüketen sıçanlara göre daha az bağırsak tümörleri oluşturduğu bulunmuştur. Sonuçta yüksek selenyum içerikli brokolinin meme ve bağırsak kanserlerine karşı koruyucu rolünün olduğu tespit edilmiştir [42].

Bir başka çalışmada civa klorid ve sodyum selenitin mavi gourami (*Trichogaster trichopterus*, Pollus)'un bazı immün cevaplar üzerine etkisini araştırılmıştır. Bu iki metalin balıklara toksik düzeylerde uygulanması sonucunda balıkların bağışıklık sisteminin bozulduğu ve 2. haftadan itibaren antikor üretiminin azaldığı tespit edilmiştir [53].

4. MATERYAL VE METOT

4.1. Materyal

Araştırma materyali olarak kullanılan gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792), Karakaya Baraj Gölü alabalık kafes üretme çiftliğinden temin edildi (Malatya). Balıklar (8m x 5m x 1,5m) ebadındaki stok havuzda 15 gün süreyle beslenerek (APYP 9-26073, Pınar yem) ortama adaptasyonları sağlandı. Adaptasyon sonrası balıklar laboratuara getirilerek her biri 250 lt hacimdeki, (1m x 30cm x 45cm) ebadındaki cam akvaryumlara konuldu. Her bir akvaryuma onar adet balık konuldu ve bir hafta düzenli beslenmeleri sağlanarak buraya adaptasyonları sağlandı. Deneyde ortalama 214.36 ± 8.14 g ağırlığında ve 27.22 ± 0.51 cm boyunda balıklar kullanıldı. Akvaryumlarda kullanılan suyun sıcaklığı deney başlangıcında 10°C , sonrasında 12°C iken, pH'sı deney başlangıcında 7,4 sonrasında ise 8,0'dir. Çözünmüş oksijen düzeyi ise $7,56 \pm 0,51$ ppm'dir (çalışma süresince çözünmüş oksijen düzeyi bir hava kompresörü ile yeterli seviyede tutulmaya çalışıldı).

4.2. Metot

Deneylerde; Kadmiyum sülfat ($3\text{CdSO}_4 + 8\text{H}_2\text{O}$), Krom (III) nitrat ($\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 + 9\text{H}_2\text{O}$) ve sodyum selenit pentahidrat tuzlarının ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 + 5\text{H}_2\text{O}$) 2 ppm'lik dozları balıklara akvaryum suyuna karıştırılmak suretiyle uygulandı. Balıklar 7 gün süre ile ağır metal uygulamasına maruz bırakıldı. Testten 12 saat öncesi balıklar aç bırakıldı. Çalışma, doğal ışık ve sıcaklık ortamında yapıldı.

Deney çalışma grupları aşağıdaki gibi kuruldu:

1. Grup: Kontrol Grubu
2. Grup: Krom (Cr) Grubu (2 ppm dozunda)
3. Grup: Kadmiyum (Cd) Grubu (2 ppm dozunda)
4. Grup: Selenyum (Se) Grubu (2 ppm dozunda)
5. Grup: Krom+ Selenyum (Cr+Se) Grubu (2ppm Cr + 2 ppm Se)
6. Grup: Kadmiyum+ Selenyum (Cd+Se) Grubu (2 ppm Cd + 2 ppm Se)

4.2.1. Diseksiyon işlemi ve doku numunelerinin hazırlanması

Balıklar baş kısımlarına darbe vurularak bayıldı. Karın kısımları açılarak karaciğer ve solungaçları çıkarılıp % 0,9'luk NaCl (sodyum klorür) ile muamele edilerek dokulardaki kanın uzaklaştırılması sağlandı. Bu işlemlerden sonra dokular derin dondurucuda -70°C'de muhafaza edildiler. Dokular enzimatik aktiviteleri ile lipid peroksidasyonunun belirlenmesi amacıyla iki parçaya ayrıldılar. Enzim analizi için kullanılacak olan örnekler öncelikle tartıldı ve 1/5 w/v oranında PBS tamponu (fosfatla tamponlanmış tuz solüsyonu) (pH 7,4) eklenerek buz izolasyonu altında Ultra Turrax homojenizatör kullanılarak homojenize edildi. Homojenize edilen örnekler Nüve NF-800-R soğutmalı santrifüjde 17000 rpm'de 15 dakikalık santrifüj edildi ve elde edilen süpernatantlar hemen -70°C'de derin dondurucuda muhafaza edildi.

Dokuların ikinci parçası lipid peroksidasyon analizleri için kullanıldı. Dokular 1/10 w/v oranında % 1,15'lik KCl'de (potasyum klorür) homojenize edildi. Homojenatlar analiz yapılıncaya kadar -70°C'de derin dondurucuda saklandı.

4.2.2. Protein tayini

Karaciğer ve solungaç dokularından elde edilen süpernatantlarda protein miktarını belirlemek için Lowry yöntemi kullanıldı [54].

Bu yöntem için kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları şöyledir:

A çözeltisi:

%2'lik Na₂CO₃'ün 0.1 N NaOH'teki çözeltisi : 100 hacim

%2'lik Na,K-Tartarat çözeltisi : 1 hacim

%1'lik CuSO₄ çözeltisi : 1 hacim

A çözeltisi, yukarıdaki çözeltilerin belirtilen hacim oranlarında karıştırılmasıyla deneyden hemen önce hazırlandı.

B çözeltisi:

Folin Fenol Belirteci : 1 hacim

Bidestile su : 1 hacim

B çözeltisi, bu iki çözeltinin belirtilen hacim oranlarına karıştırılmasıyla hazırlandı.

BSA çözeltisi:

Standart protein çözeltisi olarak kullanılan BSA (Bovine Serum Albumin) 1 mg/mL konsantrasyonunda stok çözelti olarak hazırlandı ve örneklerin çalışma aralığına göre 10, 20, 30, 40, 50, 60, ... µg/mL'lik çözeltileri hazırlanarak kullanıldı.

Protein tayini aşağıdaki gibi yapıldı:

- 1- Her deney için 2 kör, örneğin çalışma aralığına göre değişik konsantrasyonlarda BSA'lar ve örnek tüpleri hazırlandı. Bütün tüplere A çözeltisinden 2.5 mL eklendi.
- 2- BSA tüplerine belirtilen hacimlerde BSA çözeltisi, örnek tüplerine ise deney şartlarına bağlı olarak 5, 10, 20, 30 µL'lik örnek çözeltileri tüpün duvarlarına damlacıklar şeklinde bırakıldı.
- 3- Tüpler 2 kez vorteksle karıştırılarak 10 dak. bekletildi.
- 4- 1:1 oranında hazırlanan Folin-fenol belirtecinden tüm tüplere 250 µL eklendi. Tüpler tekrar 2 kez vortekslenerek renk oluşumu için karanlıkta 45 dak. beklemeye bırakıldı.
- 5- Bu sürenin bitiminde karanlık ortamdan çıkarıldı ve Shimadzu UV-1601-UV visible spektrofotometresi kullanılarak örneklerin 695 nm'deki absorbans değişimi okundu.
- 6- Standart BSA çözeltileri ile hazırlanan kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak her örnek tüpündeki süpernatanın 1 mL'sindeki protein miktarı hesaplandı.

4.2.3. Enzim aktivite tayinleri

4.2.3.1. Selenyum bağımlı Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivite tayini

Se-bağımlı GSH-Px enziminin aktivite tayini için Lawrance ve Burk yöntemi kullanıldı [55].

Kullanılan reaktifler

Tampon Çözelti : 50 mM KH₂PO₄ + K₂HPO₄ + 5 mM EDTA içeren pH: 7 olan çözelti, tampon çözelti olarak kullanıldı.

NaN₃ (Sodyum azid) : 1 mM

H₂O₂ : 0.25 mM

NADPH : 0.2 mM

GSH (Redükte glutatyon) : 2 mM

GSSG redüktaz : 1.2 U/mL

Deneyin yapılışı:

Yukarıdaki derişimlerde hazırlanan çözeltilerle önce kör ardından da örnek deneyleri yapıldı. Kör için spektrofotometre küvetine 1 mL tampon, 10 µL GSH, 10 µL NADPH, 10µL NaN₃ ve 2 µL GSSG redüktaz çözeltileri kondu. 37°C'de 5 dak. süre ile inkübasyona tabii tutulan çözelti karışımına 10µL H₂O₂ ilave edildi ve Shimadzu UV-1601-UV visible spektrofotometrede 340 nm'deki absorbans değişimi (1 dak.) gözlemlendi. Örnek deneyleri için ise çözelti karışımına belirli miktarlarda süpernatant ilave edildikten sonra 37°C'de 5 dak. süre ile inkübasyona tabii tutulup 340 nm'deki absorbans değişimi okundu.

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesinin hesaplanması

Enzim aktivite tayini aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$C = \frac{\Delta OD}{6220 / \text{mL}} \quad \Delta OD : \text{Optik dansite farkı}$$

4.2.3.2. Katalaz (CAT) aktivite tayini

Katalaz enziminin aktivite tayini Luck yöntemine göre yapıldı [56].

Kullanılan reaktifler

1/15 M konsantrasyonda Na, K-fosfat tamponu (Na₂HPO₄-KH₂PO₄) pH: 7

Derişik H₂O₂ çözeltisi

Deneyin yapılışı

Na, K-fosfat tampon çözeltisinin 100 mL'sine 160 µL H₂O₂ çözeltisi eklendi ve bu çözeltiden 1000 µL alınıp kör olarak kullanıldı. Örneklerin katalaz içeriğini belirlemek amacıyla hazırlanan bu karışımdan 1000 µL alınıp küvete kondu ve üzerine çalışma aralığına bağılı olarak 30µL'den başlayarak gittikçe artan konsantrasyonlarda süpernatan eklendi ve bir kez karıştırılıp Shimadzu UV-1601-UV visible spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda 30 sn. süreyle absorbans değişimi okundu.

Katalaz (CAT) aktivitesinin hesaplanması

Okunan absorbans değişimlerinden mL'deki enzim ünite sayısı aşığıdaki formüle göre hesaplandı.

$$C = \frac{\Delta OD \times 1000}{0.036 \times \mu L \text{ süpernatan} \times 1 \text{ dk}}$$

4.2.3.3. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivite tayini

SOD enziminin aktivite tayini McCord ve Fridovich yöntemine göre yapıldı [57]. Yöntemin esası ksantin-ksantin oksidaz sisteminde üretilen süperoksit radikallerinin sitokrom-C'yi indirgemesinin SOD tarafından inhibisyonu temeline dayanır.

Kullanılan reaktifler

A Çözeltisi:

5 µmol ksantinın 0.001 N NaOH'daki çözeltisi: 10 hacim

2 µmol sitokrom-C'nin 50 mM pH 7.8 ve 0.1 mM EDTA içeren fosfat tamponundaki çözeltisi: 100 hacim

A çözeltisi, belirtilen hacim oranlarında karıştırılarak hazırlandı. Bu çözelti +4°C'de 3 gün kararlıdır.

B çözeltisi:

Ksantin oksidazın 0.1 mM EDTA'daki çözeltisi 0.2 U/mL. B çözeltisi deneyden hemen önce taze olarak hazırlanır.

Deneyin yapılışı

1- 3 mL'lik spektrofotometre küvetine 2.9 mL A çözeltisi eklendi.

2- 50 µL örnek ilave edildi.

3- Tepkime 50 µL B çözeltisinin eklenmesiyle başlatıldı.

4- Daha sonra Shimadzu UV-1601-UV visible spektrofotometrede 550 nm'deki absorbans değişimi (1 dak.) okundu.

5- Kör okuması yapılırken örnek yerine 50 µL bidestile su eklendi.

6- Kalibrasyon grafiği çizmek için belli konsantrasyondaki ($5 \cdot 10^{-7}$ M) SOD çözeltisinin 5 µL, 10µL ve 15µL'deki bilinen değerlerine karşılık elde edilen % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi.

SOD aktivitesinin hesaplanması

Örneklerin % inhibisyon değerleri aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\Delta \text{ OD (Örnek)}}{\Delta \text{ OD (Kör)}} \times 100$$

4.2.4. Lipid peroksidasyonunun belirlenmesi

Lipid peroksidasyonu, son ürün olan malondialdehit (MDA) düzeyinin Beuge yöntemine göre ölçülmesiyle bulundu [58].

Kullanılan reaktifler

% 15'lik TCA çözeltisi : 1 hacim

% 0.375'lik TBA çözeltisi : 1 hacim

% 0.25 N'lik HCl çözeltisi : 1 hacim

Yukarıdaki üç çözeltinin belirtilen hacim oranlarında karıştırılmasıyla bir solüsyon hazırlandı.

Deneyin yapılışı

- 1) 10 mL'lik santrifüj tüpleri alındı ve bütün tüplere hazırlanan solüsyondan 4 mL kondu.
- 2) Kör tüpleri hariç tutularak örnek tüplerine 1 mL homojenat kondu.
- 3) Bir kez vortekslendi.
- 4) Kaynar suda (95-100°C'de) 15 dak. bekletildi.
- 5) Daha sonra tüpler soğutuldu ve 3500 rpm'de 10 dak. santrifüj edildi.
- 6) Elde edilen süpernatanın absorbansı 535 nm dalga boyunda Shimadzu UV-1601-UV visible spektrofotometresinde okundu.

Malondialdehit (MDA) düzeyinin hesaplanması

Malondialdehit miktarı aşağıdaki formülle hesaplandı.

MDA-TBA kompleksi için molar absorbans katsayısı: $\epsilon : 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$$C = \frac{\text{OD}}{1.56 \times 10^5} \times \frac{\text{Total Hacim}}{\text{Numune Hacmi}}$$

4.2.5. Verilerin istatistiksel analizi

Doku ve doza bağlı olarak enzim aktiviteleri ve lipid peroksidasyonu düzeyinin istatistiksel olarak belirlenmesinde gruplar arası karşılaştırmada Kruskal-Wallis H testi; grup içi karşılaştırmalarda ise Mann-Whitney U testi kullanılarak (SPSS for Windows Paket programında) $p < 0.05$ seviyesinde tespit edildi.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. Solungaç Dokusundaki Enzim Aktivite ve MDA Sonuçları

Gökkuşığı alabalıklarına (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) farklı ağır metal (krom, kadmiyum) uygulanması ve selenyum ilavesi sonucunda solungaç dokusunda selenyum bağımlı Glutasyon peroksidaz (Se-GSHPx), Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) aktiviteleri ile Malondialdehit (MDA) düzeyleri Çizelge 5.1.'de detaylıca gösterilmiştir.

Çizelge 5. 1. Solungaç dokusundaki enzim aktivite ve MDA (^Δ) sonuçları

Uygulama Grupları	GSH-Px (Ünite/mg prot.)	SOD (ng/mg prot.)	CAT (Ünite/mg prot.)	MDA (nmol/mg prot.)
Kontrol	94.81±2.48	5.24±0.34	30.73±1.36	6.34±0.92
Selenyum	84.07±1.34*	5.08±0.31	29.60±1.38	7.82±0.61
Krom	53.90±1.84*	3.16±0.07*	23.38±1.82*	15.55±0.69*
Krom+Selenyum	61.71±2.34*	3.92±0.14*	24.17±0.55*	8.98±0.18*
Kadmiyum	46.23±2.69*	3.37±0.02*	20.32±1.45*	19.21±1.71*
Kadmiyum+Selenyum	59.99±1.47*	3.77±0.05*	24.17±1.85*	10.47±0.47*

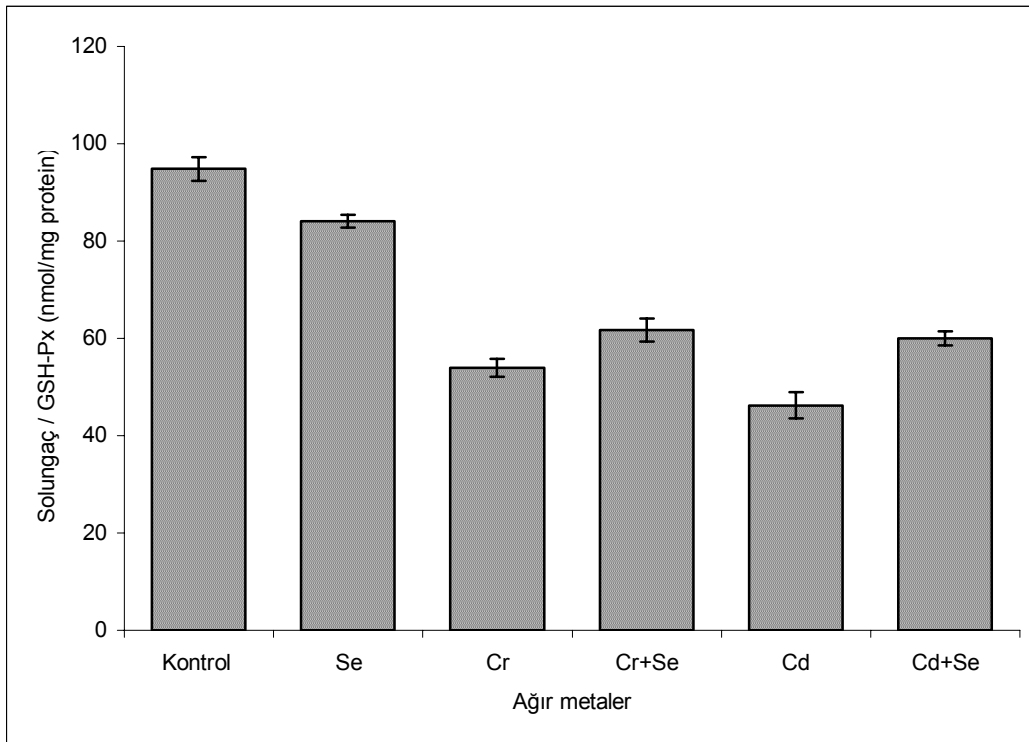
***Mann-Whitney U** testine göre her bir sütundaki ortalama değerler kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır (p<0.05).

^Δ Tabloda verilen değerler **ortalama±standart hata** değeri olarak ifade edilmektedir.

5.1.1. Solungaç dokusundaki enzim aktivite sonuçları

5.1.1.1. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi

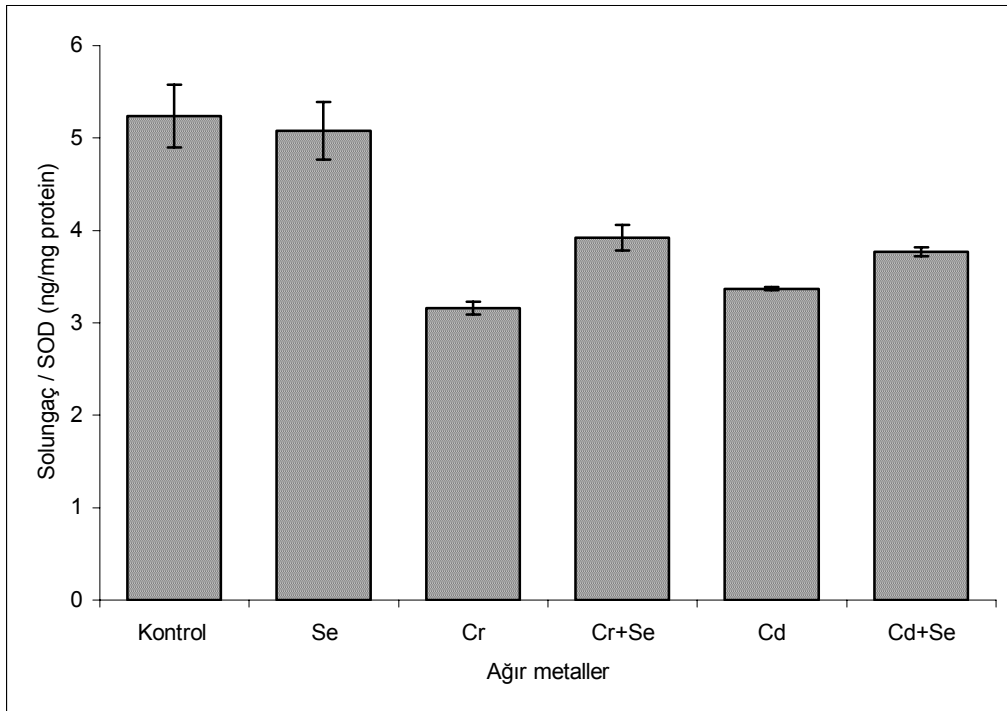
Hücrede hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu olan Glutasyon peroksidaz enziminin (GSH-Px) aktivitesindeki değişiklikler kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Buna göre; Se, Cr, Cr+Se, Cd ve Cd+Se gruplarındaki GSH-Px aktivite değerlerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir fark olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Bu gruplardaki farklılık GSH-Px enzim aktivitelerinin azalışı yönündedir. Ayrıca, hem Cr ve Cr+Se hem de Cd ve Cd+Se uygulanmış gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak önemli bir farkın olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$).



Şekil 5.1: Balıkların solungaç dokularındaki krom (Cr), kadmiyum (Cd) uygulanması ve selenyum (Se) ilavesi sonucu selenyum bağımlı Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri.

5.1.1.2. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi

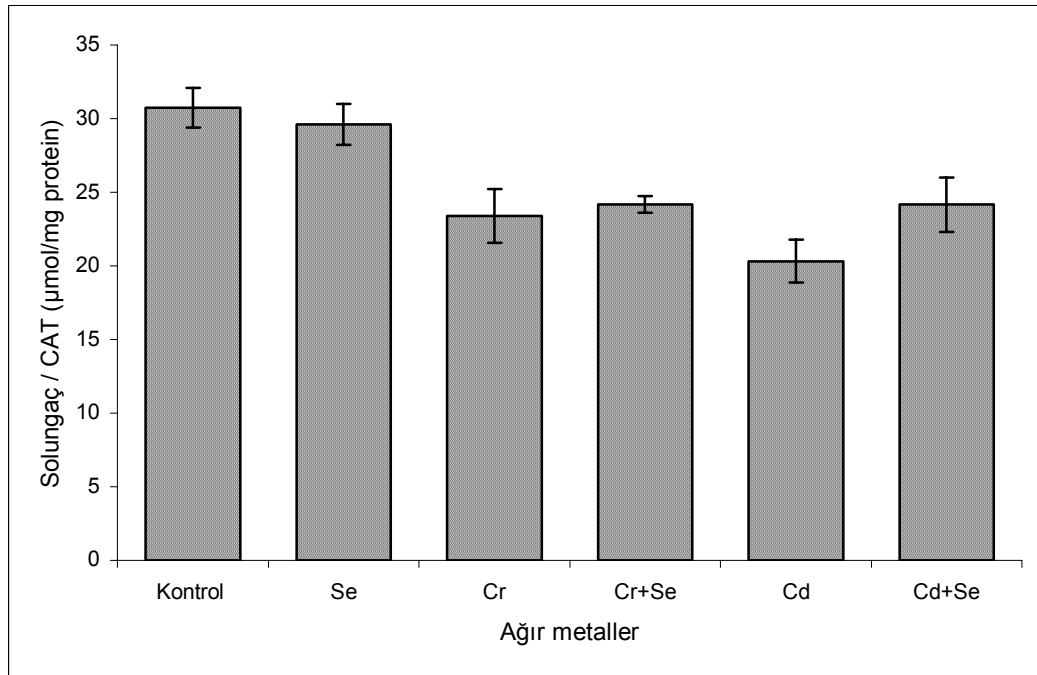
Hücrede süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit ve suya dismutasyonunu katalizleyen Süperoksit dismutaz enziminin (SOD) aktivitesindeki değişiklikler kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Buna göre; kontrol grubu ile diğer gruplar (Cr, Cr+Se, Cd ve Cd+Se) karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel açıdan önemli bir fark görülürken ($p<0.05$), selenyum uygulanmış grupta bu farkın önemli düzeyde olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$). SOD enzim aktiviteleri diğer gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli bir azalış gösterirken ($p<0.05$), selenyum uygulanmış gruptaki azalışın istatistiksel açıdan önemli olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Ayrıca, hem Cr ve Cr+Se hem de Cd ve Cd+Se uygulanmış gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak önemli bir farkın olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$).



Şekil 5.2: Balıkların solungaç dokularındaki krom (Cr), kadmiyum (Cd) uygulanması ve selenyum (Se) ilavesi sonucu Süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri.

5.1.1.3. Katalaz (CAT) aktivitesi

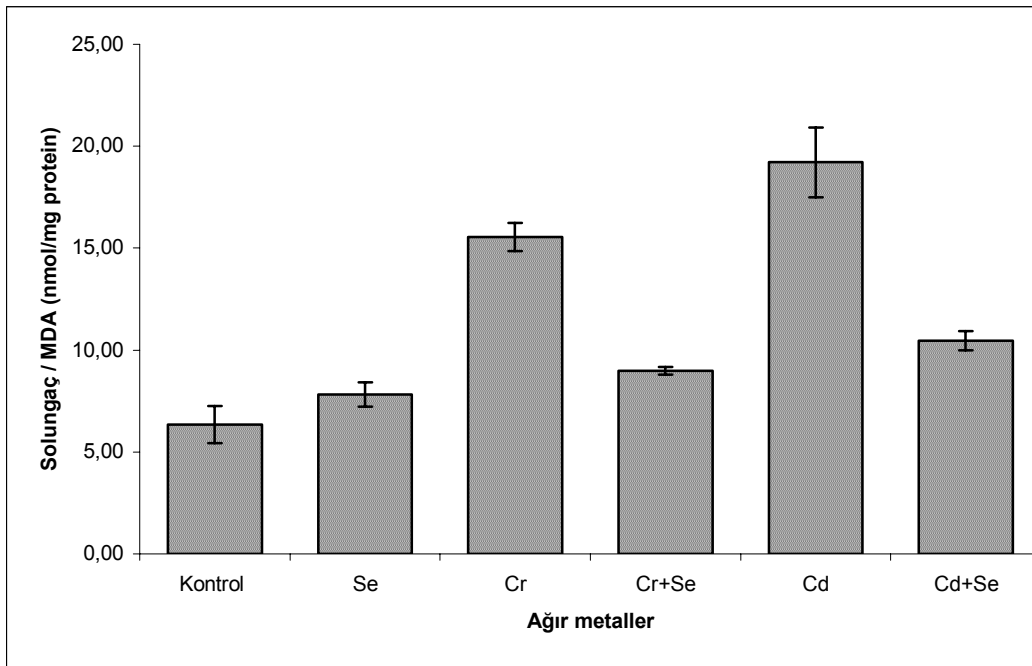
Hücrede hidrojen peroksitin (H_2O_2) suya ve oksijene indirgenmesini katalizleyen katalaz enzim aktivitesi kontrol grubuna kıyasla değerlendirilmiştir. Buna göre; kontrol grubu ile diğer gruplar (Cr, Cr+Se, Cd ve Cd+Se) karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel açıdan önemli bir fark görülürken ($p<0.05$), selenyum uygulanmış grupta bu farkın önemli olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$). Katalaz enzim aktiviteleri diğer gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli bir azalış gösterirken ($p<0.05$), selenyum uygulanmış gruptaki azalışın istatistiksel açıdan önemli olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Ayrıca, Cr ve Cr+Se ile Cd ve Cd+Se uygulanmış gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak önemli bir farkın olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$).



Şekil 5.3: Balıkların solungaç dokularındaki krom (Cr), kadmiyum (Cd) uygulanması ve selenyum (Se) ilavesi sonucu katalaz (CAT) aktiviteleri.

5.1.2. Solungaç dokusundaki MDA düzeyi

Lipid peroksidasyonunun önemli bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) düzeyleri de kontrol grubuna kıyasla değerlendirilmiştir. Buna göre; kontrol grubu ile diğer gruplar (Cr, Cr+Se, Cd ve Cd+Se) karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel açıdan önemli bir fark görülürken ($p<0.05$), selenyum uygulanmış grupta bu farkın önemli olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$). MDA düzeyleri diğer gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli bir artış gösterirken ($p<0.05$), selenyum uygulanmış gruptaki artışın istatistiksel açıdan önemli olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Ayrıca, hem Cr ve Cr+Se hem de Cd ve Cd+Se uygulanmış gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak önemli bir farkın olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$).



Şekil 5.4: Balıkların solungaç dokularındaki krom (Cr), kadmiyum (Cd) uygulanması ve selenyum (Se) ilavesi sonucu Malondialdehit (MDA) düzeyleri.

5.2. Karaciğer Dokusundaki Enzim Aktivite ve MDA Sonuçları

Gökkuşığı alabalıklarına (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) farklı ağır metal (krom, kadmiyum) uygulanması ve selenyum ilavesi sonucunda karaciğer dokusunda selenyum bağımlı Glutasyon peroksidaz (Se-GSHPx), Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) aktiviteleri ile Malondialdehit (MDA) düzeyleri Çizelge 5.2.'de detaylıca gösterilmiştir.

Çizelge 5.2. Karaciğer dokusundaki enzim aktivite ve MDA (^Δ) sonuçları

Doz Grupları	GSH-Px (Ünite/mg prot.)	SOD (ng/mg prot.)	CAT (Ünitel/mg prot.)	MDA (nmol/mg prot.)
Kontrol	99.81±0.44	1,55±0.16	82.23±1.53	0.54±0.03
Selenyum	96.89±0.64*	2.01±0.31	79.75±2.05	0.61±0.08
Krom	60.79±1.79*	0.57±0.02*	57.93±5.80*	4.15±0.12*
Krom+Selenyum	73.10±0.82*	1.15±0.04*	65.44±0.57*	2.51±0.06*
Kadmiyum	56.48±1.43*	0.34±0.02*	55.80±0.82*	5.40±0.21*
Kadmiyum+Selenyum	69.29±1.19*	0.75±0.09*	66.80±1.68*	2.89±0.13*

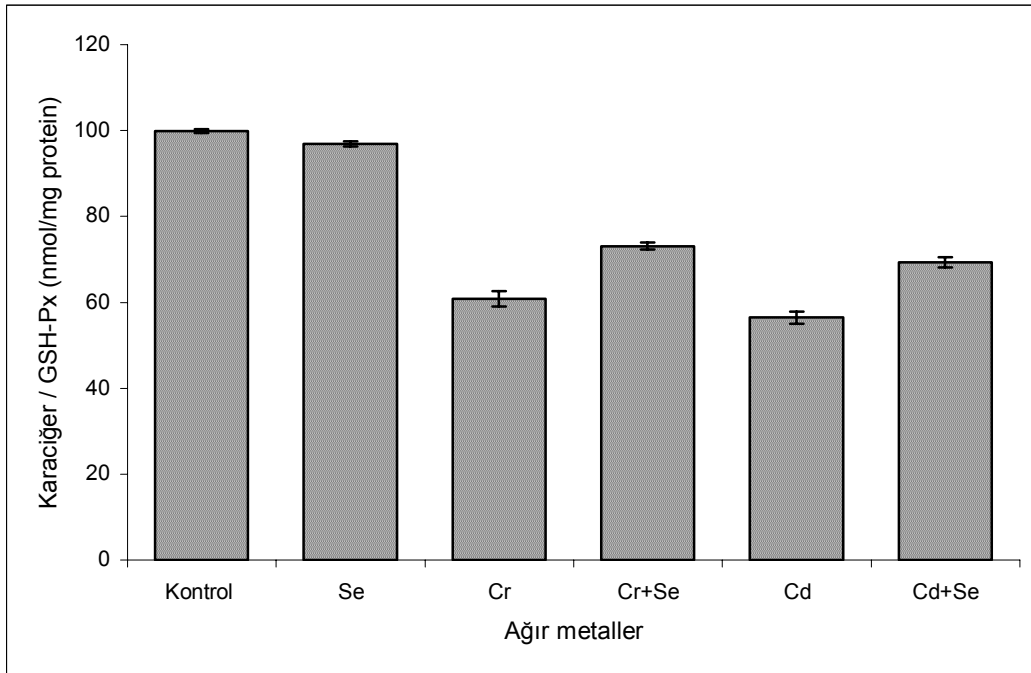
***Mann-Whitney U** testine göre her bir sütundaki ortalama değerler kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır (p<0.05).

^Δ Tabloda verilen değerler **ortalama±standart hata** olarak ifade edilmiştir.

5.2.1. Karaciğer dokusundaki enzim aktivite sonuçları

5.2.1.1. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi

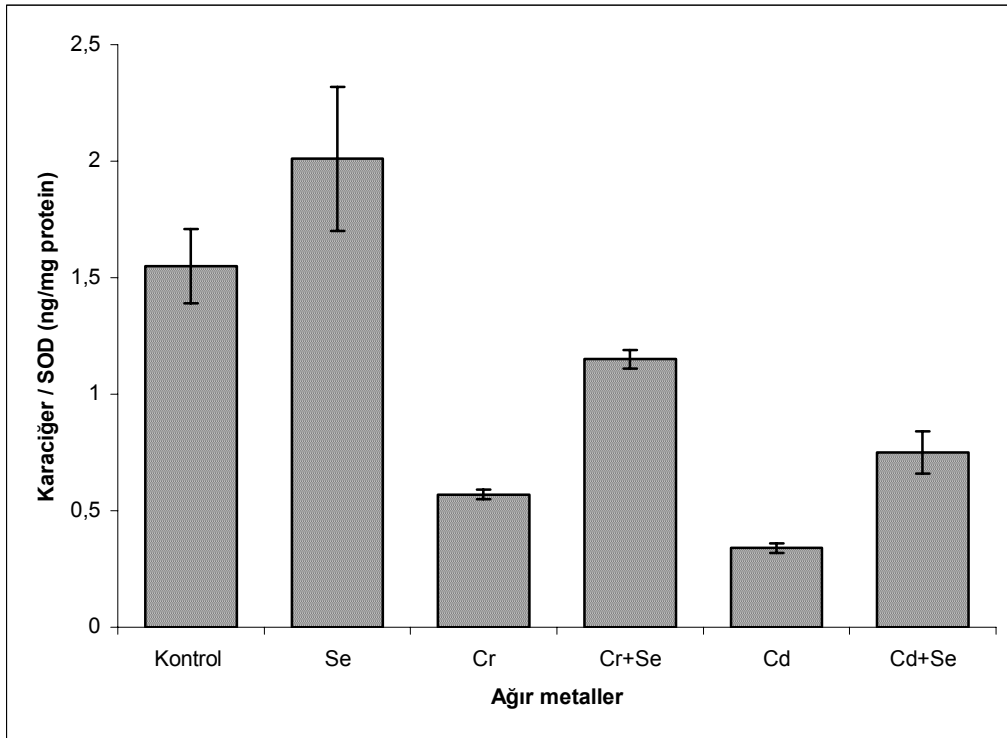
Karaciğerde Glutasyon peroksidaz enziminin (GSH-Px) aktivitesindeki değişiklikler solungaç dokusunda olduğu gibi kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Buna göre; Se, Cr, Cr+Se, Cd ve Cd+Se gruplarındaki GSH-Px aktivite değerlerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir fark olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Balıkların test edilen metallerle maruz kalması, GSH-Px düzeyinin düşmesine neden olmuştur. Ayrıca, hem Cr ve Cr+Se hem de Cd ve Cd+Se uygulanmış gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak önemli bir farkın olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Cr+Se ve Cd+Se gruplarında GSH-Px enzim aktivitelerindeki azalış, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Cr ve Cd uygulama gruplarına göre daha azdır.



Şekil 5.5: Balıkların karaciğer dokularındaki krom (Cr), kadmiyum (Cd) uygulanması ve selenyum (Se) ilavesi sonucu selenyum bağımlı Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri.

5.2.1.2. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi

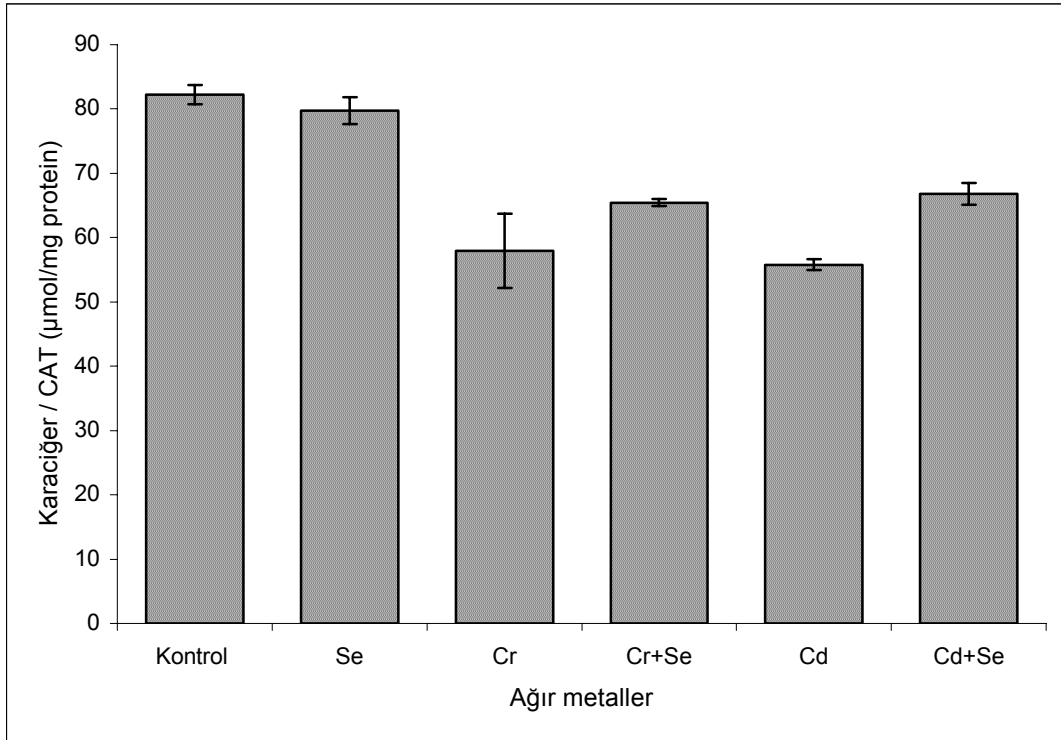
Karaciğerde Süperoksit dismutaz enziminin aktivitesindeki değişiklikler solungaç dokusunda olduğu gibi kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Buna göre; kontrol grubu ile diğer gruplar (Cr, Cr+Se, Cd ve Cd+Se) karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel açıdan önemli bir fark görülürken ($p < 0.05$), selenyum uygulanmış grupta bu farkın önemli olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0.05$). Cr, Cr+Se, Cd ve Cd+Se gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli bir azalış görülürken ($p < 0.05$), Se uygulanmış grupta kontrol grubuna göre bir artış gözlenmiş, ancak bu artışın istatistiksel açıdan önemli olmadığı saptanmıştır ($p > 0.05$). Ayrıca, hem Cr ve Cr+Se hem de Cd ve Cd+Se uygulanmış gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak önemli bir farkın olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$).



Şekil 5.6: Balıkların karaciğer dokularındaki krom (Cr), kadmiyum (Cd) uygulanması ve selenyum (Se) ilavesi sonucu Süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri.

5.2.1.3. Katalaz (CAT) aktivitesi

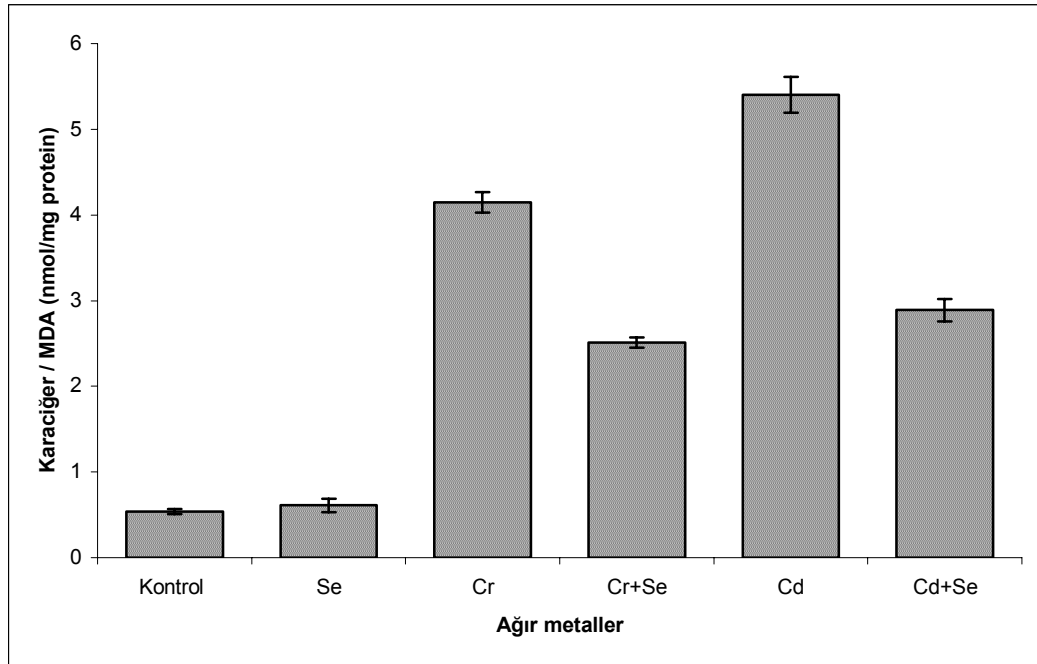
Karaciğerde katalaz enzim aktivitesi de kontrol grubuna kıyasla değerlendirilmiştir. Buna göre; kontrol grubu ile diğer gruplar (Cr, Cr+Se, Cd ve Cd+Se) karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel açıdan önemli bir fark görülürken ($p<0.05$), selenyum uygulanmış grupta bu farkın önemli olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$). Katalaz enzim aktiviteleri diğer gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli bir azalış gösterirken ($p<0.05$), selenyum uygulanmış gruptaki azalışın istatistiksel açıdan önemli olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Ayrıca, Cr ile Cr+Se grupları arasında istatistiksel açıdan önemli bir farkın olmadığı ($p>0.05$), Cd ile Cd+Se grupları arasında ise istatistiksel olarak önemli bir farkın olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$).



Şekil 5.7: Balıkların karaciğer dokularındaki krom (Cr), kadmiyum (Cd) uygulanması ve selenyum (Se) ilavesi sonucu Katalaz (CAT) aktiviteleri.

5.2.2. Karaciğer dokusundaki MDA düzeyi

Karaciğerde MDA düzeyleri de kontrol grubuna kıyasla değerlendirilmiştir. Buna göre; kontrol grubu ile diğer gruplar (Cr, Cr+Se, Cd ve Cd+Se) karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel açıdan önemli bir fark görülürken ($p < 0.05$), selenyum uygulanmış grupta bu farkın önemli olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0.05$). MDA düzeyleri diğer gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli bir artış gösterirken ($p < 0.05$), selenyum uygulanmış gruptaki artışın istatistiksel açıdan önemli olmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$). Ayrıca, hem Cr ve Cr+Se hem de Cd ve Cd+Se uygulanmış gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak önemli bir farkın olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$).



Şekil 5.8: Balıkların karaciğer dokularındaki krom (Cr), kadmiyum (Cd) uygulanması ve selenyum (Se) ilavesi sonucu Malondialdehit (MDA) düzeyleri.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada ergin olmayan gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum1792)'na farklı ağır metal (kadmiyum ve krom) uygulanması ve selenyum ilavesi sonucu karaciğer ve solungaç dokularında antioksidan enzim (GSH-Px, SOD ve CAT) aktiviteleri ile lipid peroksidasyonu ürünü olan malondialdehit (MDA) düzeylerindeki değişimler istatistiksel olarak belirlendi. Yapılan bu çalışmada kadmiyum, krom ve selenyumun 2 ppm'lik dozları balıklara akvaryum suyuna karıştırılmak suretiyle bir hafta süreyle uygulandı.

Balıklar gibi sucul omurgalılar, solungaçları vasıtasıyla çevreyle çok yakın ilişki içerisinde yaşarlar ve bu da onları sucul kirleticilere çok yatkın yapar. Tatlı su balıkları homeostasis için gerekli olan iyonların çoğunu sudan solungaçları vasıtasıyla alır [16]. Ağır metaller, subletal ortam derişimlerinin etkisinde karaciğer, böbrek ve dalak gibi metabolik aktivitenin yoğun olduğu doku ve organlarda birikmektedir. Balıklarda kadmiyum ve diğer ağır metaller öncelikle solungaçlarda birikir. Bunun nedeni, solungaçların sudaki çözülmüş ağır metallerle doğrudan doğruya etkileşim halinde kalmasıdır [59]. Bu yüzden çalışmamızda ilk hedef organ olarak solungaç seçilmiştir.

Karaciğer, kirleticilerin depolanması, yeniden dağıtımı, detoksifikasyonu ya da dönüşümünde önemli rol oynar ve ayrıca kirleticiler tarafından sebep olunan patolojik etkilerin aktif bölgesi olarak davranır [13]. Balıklarda karaciğer, ağır metalleri bağlayarak toksik etkilerinin giderilmesinde işlev gören metallothionein ve glutatyon gibi metal bağlayıcı proteinlerin başlıca sentez yerlerinden biridir. Çeşitli balık türlerinde metal birikimi ile ilgili yapılan çalışmalarda karaciğerdeki metal derişiminin diğer doku ve organlara göre önemli düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu da karaciğerin balıklarda metal bağlamada etkin bir rol oynadığının bir göstergesidir [59]. Bu nedenlerden dolayı çalışmamızda ikinci hedef organ olarak karaciğer seçilmiştir.

Balıklar ekosistem içerisinde insan tarafından tüketilen önemli bir protein kaynağıdır. Ağır metallerin balıklara olan etkisinin, metalin cinsi ve konsantrasyonuna, su kalitesine ve balığın tür ve yaşına bağlı olarak değiştiği belirlenmiştir [14]. Kadmiyum ve bileşikleri sulara genelde eser miktarlarda bulunur ve bu 0.001 mg/L düzeyini aşmaz, çok ender durumlarda 0.010 mg/L'ye ulaşır. Balıklarla yapılan çalışmalarda 57 mg/L konsantrasyonda kadmiyumun balıklarda embriyo gelişimini zayıflattığı fakat 4.5-37 mg/L düzeyindeki kadmiyumun ise büyüme ve üreme üzerine

olumsuz bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir [18]. Söz konusu dozla ilgili çalışmamızda balıklara 2 mg/L kadmiyum uygulanmıştır.

Kadmiyum normalde reaktif türlere karşı koruma sağlayan tiyoller ya da enzimlerle reaksiyona girerek serbest radikal toksisitesine neden olur. Cd'a maruz kalma kemik mineral yoğunluğu ve böbrek fonksiyonunu etkileyebilir [17]. Kadmiyum organizmaya başta solunum yolu olmak üzere, daha az olarak da besinler ve içilen sularla sindirim yolundan girmektedir. Kanda büyük ölçüde hemoglobine bağlı olarak dolaşır ve bir transport ve depolama proteininin (metalloprotein) –SH gruplarına bağlanmış şekilde böbrek ve karaciğerde toplanır [15].

Bazı ksenobiyotiklere özellikle toksik kimyasal kirleticilere maruz kalma, endojen ve ekzojen reaktif oksijen türleri (ROS) arasında bir dengesizlik ve sonuçta antioksidan savunma sisteminde bir azalma oluşturabilir. Bu durum, biyolojik sistemlerde oksidatif stres, dokuların hasara uğraması, enfeksiyonlar, dejeneratif hastalıklar ve yaşlanmayı başlatır. Kimyasal toksik kirleticiler biyolojik sistemlerde reaktif oksijen türevlerinin önemli kaynaklarıdır [49].

Kadmiyum antioksidan enzimleri (SOD, CAT ve GSH-Px) bozmak suretiyle lipid peroksidasyonuna neden olur. Cd tarafından GSH-Px aktivitesinde meydana gelen düşüş, sonradan yağ asitlerinin oksidasyonuna sebep olabilen hidroksil radikallerinin oluşumunu ve hidrojen peroksitlerin düzeyini artırır. Besinsel Cd'la indüklenmiş lipid peroksidasyonu, α - tokoferol, selenyum ve glutatyon gibi antioksidanların besine eklenmesiyle önlenabilir. Yapılan bir çalışmada 204 mg/kg kadmiyuma 4 haftalık maruz bırakılan balıklarda ince bağırsak ve karaciğerde kontrol grubuna göre Se bağımlı GSH-Px aktivitesinde önemli düşüşlerin olduğu gözlenmiştir. Kadmiyumun en yüksek besinsel konsantrasyonda (204 mg/kg) oksidatif savunma sistemini hasara uğratarak doku lipid peroksidasyonunu indüklediği bulunmuştur [47]. Bir başka çalışmada, CdCl₂'nin kemikli balık *Sparus aurata*'ya 2.5 mg/kg oranında 3 ve 6 günlük uygulanmasının sonucunda karaciğerinde antioksidan enzimler olan Glutatyon peroksidaz, Glutatyon redüktaz ve katalazın aktivitesinin önemli derecede düştüğü gözlenmiştir. Bu etki, Cd'un sözkonusu enzimlerin kofaktörleriyle etkileşerek enzim yapısında modifikasyonlara neden olduğu ve bundan dolayı aktivitede düşüş meydana getirdiği şeklinde yorumlanabilir [49]. Yapmış olduğumuz çalışmada da kadmiyumun GSH-Px, Katalaz, SOD aktivitesini düşürdüğü ve lipid peroksidasyonu ürünü olan MDA'yı arttırdığı yönündeki bulgularımız yukarıdaki çalışmalar ile paralellik göstermektedir.

Krom (VI) ile yapılmış olan bir dizi çalışmalar sonucunda, krom (VI)'nın genomik DNA hasarı ile lipid ve proteinlerin oksidatif bozunmasına neden olan reaktif oksijen türevlerinin (süperoksit ve hidroksil radikalleri) üretimini arttırmak suretiyle bir oksidatif stres yarattığı gözlenmiştir. Süperoksit anyonu ve hidroksil radikallerinin üretiminin artması sonucunda, yüksek lipid peroksidasyonu ve genomik DNA fragmentasyonu, hücre içi oksidize durumların modülasyonu, protein kinaz C'nin, apoptotik hücre ölümünün aktivasyonu ve gen ifadesinin değişimini içeren bir oksidatif stres oluşur. Cr(VI)'nın insan ve hayvanlarda toksik ve karsinojenik etkilerinin yanı sıra, deride alerjilere neden olduğu da bilinmektedir [24]. Krom (Cr)'un alabalıklar için su kalitesine bağlı olarak 28-80 ppm aralığında toksik olabileceği belirtilmektedir [14]. Cr(VI)'nın neden olduğu toksisitenin mekanizmasının çok iyi bilinmemesine rağmen, oksidatif stresin önemli bir rol oynadığına inanılır. Malondialdehit (MDA) kroma mesleki maruz kalmanın bir biyolojik göstergesi olarak kullanılabilir [17].

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid hidroperoksitlerinin yıkımı için geçiş metalleri iyon katalizi gerekir. Lipid hidroperoksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler ya da başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin peroksidasyonunda tiobarbütirik asitle ölçülebilen malondialdehit (MDA) meydana gelir. Malondialdehit lipid peroksit seviyelerinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılır. MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir fakat lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir [33].

Cr(VI)'nın gökkuşağı alabalıklarına 10 mg/L'lik subletal konsantrasyonda 28 günlük uygulanması sonucunda Cr⁶⁺'nın Cr³⁺'a indirgenmesinin bir sonucu olarak karaciğer ve solungaç dokularında oksidatif stresin meydana geldiği bulunmuştur. Metallothionein induksiyonu ile SOD aktivitesi, lipid peroksidasyonu, hücre morfoloji ve büyümede kontrol grubuna göre önemli farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, solungaç dokusunun karaciğere göre Cr toksisitesine daha duyarlı olduğu bulunmuş bu da bize karaciğerin kroma zamanla adapte olduğunu gösterir [51].

Biz de yapmış olduğumuz çalışma sonuçlarına dayalı olarak, kromun lipid peroksidasyonunu artırarak ve antioksidan enzimler olan SOD, GSH-Px ve Katalazın aktivitesini düşürerek hücrelerde bir oksidatif stres yarattığını söyleyebiliriz.

Selenyum bir antioksidan enzim olan Glutasyon peroksidazın (GSH-Px) tam oluşumu ve fonksiyonu için gereklidir. Glutasyon peroksidazın her molekülü 4 atom selenyum içermektedir. Selenyum bu enzimde bir kofaktör olarak görev yapar ve bu rolünden dolayı insan ve hayvanlar için gerekli temel eser bir mineraldir. Glutasyon peroksidaz hücre membranlarını lipid peroksidasyonundan dolayı meydana gelen hasarlardan korur. Reaktif oksijen türevlerinin üretimini engelleyerek oksidatif hasara karşı hücrelerarası savunma mekanizmasına yardımcı olur [38].

Selenyumun antioksidan etkisinin araştırılmasına yönelik yapılan bir doz taraması çalışmasında Örün ve arkadaşları farklı dozlarda sodyum selenitin gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) bazı biyokimyasal ve hematolojik parametreler üzerine etkisini araştırmışlardır. Gözlenen tüm biyokimyasal ve hematolojik veriler doğrultusunda sodyum selenitin gökkuşağı alabalığında 2 ve 4 ppm konsantrasyonlarda antioksidatif savunmaya önemli bir katkıda bulunduğunu, 6 ppm de ise artık letal dozun oluştuğunu tespit etmişlerdir [52]. Bizim de çalışmamızda selenyumun 2 ppm'lik dozu çalışma gruplarına uygulanmıştır.

Selenyumun antioksidan koruyucu etkisinin araştırılmasına yönelik yapılan bir çalışmada yüksek selenyum içerikli brokolinin sıçanları kanserden koruyucu etkisi araştırılmıştır. Kimyasal olarak indüklenen meme ve bağırsak kanserlerine karşı yüksek selenyum içerikli brokoli ve brokoli tohumlarının koruyucu etkisini tespit etmek amacıyla 2 çeşit sıçanın besinlerine brokoli katılmıştır. Sonuçta yüksek selenyum içerikli brokolinin meme ve bağırsak kanserlerine karşı koruyucu rolünün olduğu tespit edilmiştir [42].

Selenyumun kadmiyumun toksik etkilerini giderici özelliğinin araştırılmasına yönelik yapılan bir çalışmada kontrol, Cd, Se ve Cd+Se şeklinde dört uygulama grubu oluşturulmuştur. Cd farelere günlük 8 mg/kg (kg vücut ağırlığı başına mg Cd), Se sodyum selenit formunda günlük 0.35 mg/kg (kg vücut ağırlığı başına mg Se), Cd+Se ise 8 mg/kg Cd + 0.35 mg/kg Se oranında oral yolla 8 haftalık uygulanmıştır. Cd'un tek başına uygulandığı grubun karaciğerlerinde önemli miktarda Cd biriktiği gözlenirken, Cd+Se uygulanan grubun karaciğerlerinde Cd konsantrasyonunda yaklaşık olarak %18'lik bir azalma olduğu gözlenmiştir. Ayrıca Cd'la muamele edilmiş grubun karaciğerindeki GSH-Px aktivitesinde önemli oranda bir düşüş olurken, Se ilave edilmiş

grupta GSH-Px aktivitesinin ($p < 0.05$) seviyesinde önemli derecede yükseldiği tespit edilmiştir. Sadece Se uygulanmış grupta ise GSH-Px aktivitesinde kontrol grubuna göre önemli bir değişim olmamıştır. Bu sonuçlar, kadmiyuma selenyum ilave edilmesinin kadmiyumun karaciğerdeki birikimini önemli derecede düşürdüğünü ve aynı zamanda bir antioksidan enzim olan GSH-Px'i kadmiyumun hasar yapıcı etkisinden koruduğu yönündeki bulgularımız ile paralellik göstermektedir [60].

Bir başka çalışmada da kadmiyuma maruz kalmış sıçanların karaciğerinde selenyumun antioksidan savunma sistemi üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Kontrol, Cd, Se ve Cd+Se şeklinde 4 tane grup oluşturulmuştur. Kadmiyum grubuna 15 mg/kg/gün Cd, selenyum grubuna 7µg/kg/gün Se, Cd+Se grubuna ise 15 mg Cd + 7 µg Se / kg/gün Cd+Se uygulanmıştır. Kadmiyumun sıçanların karaciğerinde SOD, CAT ve GSH-Px aktivitesinde düşümlere neden olduğu bulunmuştur. Kadmiyumun tersine, selenyumun bu enzimlerin aktivitesinde önemli bir artış yarattığı bulunmuştur. Cd+Se uygulanmış grupta ise Cd'un bahsedilen enzimlerin aktivitesi üzerine olan toksik etkilerinin Se tarafından giderildiği tespit edilmiştir [61]. Bizim yapmış olduğumuz deneyde de Cd'un SOD, CAT ve GSH-Px aktivitesini düşürdüğü, Cd'a Se ilave edilmesiyle oluşturulmuş grupta ise (Cd+Se) bu enzimlerin aktivitesinin tekrar yükseldiği tespit edildi.

Süperoksit dismutaz süperoksit radikallerinin (O_2^-), Glutasyon peroksidaz ve Katalaz da reaktif oksijen türleri olan süperoksit (O_2^-) ve hidroksil (OH) radikallerinin ürünü olan hidrojen peroksidin (H_2O_2) süpürülmesinden sorumludur. Bu iyonlar protein ve membranlarda birçok hasarlara neden olurlar. SOD, CAT ve GSH-Px enzimlerinin aktivasyonlarının inhibe olması, bu zararlı iyonların oluşumunu artırmakta ve sonuçta mitokondri ve endoplazmik retikulum membranlarında ve protein yapılarında bozukluklar meydana gelmektedir. Bu da Cd gibi ağır metallerin varlığında olabilmektedir. Selenyumun özellikle akut uygulamalarda kadmiyuma karşı bir antagonistik element olduğu belirlenmiştir. Kadmiyumun Glutasyon peroksidazın aktivitesini düşürmesi, kadmiyumun selenyumla bir kompleks oluşturması, bu yüzden de serbest selenyumdan yararlanmanın azaldığı ve bunun da Glutasyon peroksidaz aktivitesinde düşüş ile yansıtıldığı şeklinde yorumlanabilir. Kadmiyum uygulanması sonucu katalazın inhibisyonu, substratı olan hidrojen peroksidin düzeyinin düşmesine ya da Cd'un hücrelerarası konsantrasyonunun artmasının bir sonucu olarak bu enzimin sentezinin azalması şeklinde yorumlanabilir. Hücrelerarası alanda kadmiyumun

konsantrasyonun artması, oksijen tüketimini ve elektron taşıyıcıların redoks oranını olumsuz bir şekilde etkiler [62].

Sonuç olarak; krom ve kadmiyum metal stresine maruz kalmış gökkuşuğu alabalıklarında oluşan oksidatif stresin ve lipid peroksidasyonunun bu çalışmada gösterildiği gibi düşük düzeyde de olsa indirgenmesinde selenyumun bir rolünün olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte çalışma sonuçlarının daha ayrıntılı çalışmalar ile test edilmesi gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

- [1] Özmen H., Su Kirliliğini Kimyasal Olarak Belirleme Yöntemleri ve Kirlilik Parametreleri, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü Su Kirliliği Hizmet İçi Eğitim Semineri Notları (12-14 Mayıs 1998), Elazığ, 175-182
- [2] Strmack M., Braunbeck T., Isolated hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a tool to discriminate between differently contaminated small river system, **Toxicol. In vitro**, 14: (2000) 361-377
- [3] Lenhardt M., Seasonal changes in some blood chemistry parameters and in relative liver and gonad weights of pike (*Essox lucius*) from the River Danube, **J. Fish Biol.**, 40: (1992) 709-718
- [4] Arda M., Balıklarda bakteriyel, mantar, viral ve ekolojik nedenlerden ileri gelen hastalıklar ve tedavileri, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları 300: (1974) 212 s. Ankara
- [5] Landis G.W., Yu M.H., Heavy metals, **Environ. Toxicol., Lewis Pub., USA** (1999) 177
- [6] Blaxhall P.C., Daisley K.W., Routine haematological methods for use with fish blood, **J. Fish Biol.**, 5: (1973) 771-781.
- [7] Lemly D., Symptoms and implications of selenium toxicity in fish: The Belews Lake case example, **Aqua. Toxicol.**, 57: (2002) 39-49
- [8] Raymond F.B., Recent developments in trace element metabolism and function: Newer roles of selenium in nutrition, **J. Nutr.**, 119: (1989) 1051-1054
- [9] Wachowicz B., Zbikowska H.M. and Nowak P., Selenium compounds in the environment: Their effects on human health, **Cell. Mol. Biol. Lett.**, Vol. 6 No. 2A (2001)
- [10] De Zwart L.L., Meerman J.H.N., Commandeur J.N.M. and Vermeulen N.P.E., Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans, **Free Radical Biol. Med.**, 26: (1999) 202-226
- [11] Uslu G., Ağır Metal Kirliliği İçeren Atık Sular ve Arıtılması, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü Su Kirliliği Hizmet İçi Eğitim Semineri (12-14 Mayıs 1998), Elazığ 79-90
- [12] Çalta M., Canpolat Ö., Nacar A., Elazığ Keban Baraj Gölü'nde Yakalanan *Capoeta trutta* (Heckel, 1843)'da Bazı Ağır Metal Düzeylerinin Belirlenmesi, **IV. Su Ürünleri Sempozyumu**, Erzurum, 28-30 Haziran (2000) 800-811
- [13] El-Shahawi M.S., Al-Yousuf M.H., Heavy metal contamination in liver and skin tissues of lethrinus lentijan fish family: Lethrinidae (teleost) from the Arabian Gulf, **Int. J. Food Sci. and Nutr.**, 49: (1998) 447-451

- [14] Çalta M., Girgin A., Ağır Metallerin Balıklar Üzerindeki Etkileri, T.C. Tarım Orman ve Köy işleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü Su Kirliliği Hizmet İçi Eğitim Semineri (Mayıs, 1998), Elazığ, 151-157
- [15] Dökmeci İ., Toksikolojik Zehirlenmelerde Tanı ve Tedavi, Nobel Tıp Kitabevleri İstanbul ISBN: 975-420-074-2 (2001)
- [16] Pratap H.B., H.F., Lock R.A.C. and Bonga S.E., Effect of waterborne and dietary cadmium on plasma ions of the teleost *Oreochromis mossambicus* in relation to water calcium levels, **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, 18: (1989) 568-575
- [17] Kakkar P., Jaffery F.N, Biological markers for metal toxicity, **Environ. Toxicol. Pharm.**, 19: (2005) 335-349
- [18] Akman Y., Ketenöglü O., Evren H., Kurt L. ve Düzenli S., Çevre Kirliliği Çevre Biyolojisi, Palme Yayıncılık, Ankara (2000) 216-217
- [19] Vural N., Toksikoloji, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No: 56 Ankara Üniversitesi Basımevi (1984)
- [20] Chowdhury M.J., McDonald D.G., Wood C.M., Gastrointestinal uptake and fate of cadmium in rainbow trout acclimated to sublethal dietary cadmium, **Aqua. Toxicol.**, 69: (2004) 149-163
- [21] Chowdhury M.J., Pane E.F., Wood C.M., Physiological effects of dietary cadmium acclimation and waterborne cadmium challenge in rainbow trout: respiratory, ionoregulatory, and stress parameters, **Comp. Biochem. Physiol., Part C**, 139: (2004) 163-173.
- [22] Klassen C.D., Ph. D., Casarett&Doull's Toxicology, Mc Graw-Hill Companies (2001)
- [23] Erdem M., Atık Sulardan Krom Giderme Yöntemleri, Yüksek Lisans Semineri, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, (1994) 27.
- [24] Bagchi D., Bagchi M. and Stohs S.J., Chromium (VI)-induced oxidative stress, apoptotic cell death and modulation of p53 tumor suppressor gene, **Mol. Cell. Biochem.**, 222: (2001) 149-158.
- [25] Deaton C.M. and Marlin D.J., Exercise-Associated Oxidative Stress, **Clinical Techniques in Equine Practice**, Vol 2, No 3, (2003) 278-291
- [26] Mourente G., Diaz-Salvago E., Characterization of antioxidant systems, oxidation status and lipids in brain of wild-caught size-class distributed *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) crustacea, decapoda, **Comp. Biochem. Physiol. Part B**, 124: (1999) 405-416
- [27] Mruk D.D., Silvestrini B., Meng-yun Mo, Cheng C.Y.a, Antioxidant superoxide dismutase-a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility, **Contraception**, 65: (2002) 305-311

- [28] Yurdakul Z., Oksijen ve Canlılar, (2003) www.klinikbiyokimya.com/seminer/oksijen/oksijen.htm.
- [29] Özkan A., Fışkın K., Serbest oksijen radikalleri, karsinogenez ve antioksidan enzimler, **Turkish J. Hematol. Oncol.**, No 1, Vol. 14, (2004)
- [30] Meotti F.C., Stangerlin E.C., Zeni G., Nogueira C.W. and Rocha J.B.T., Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation, **Environ. Res.**, 94: (2004) 276-282
- [31] Valavanidis A., Vlahogianni T., Dassenakis M., Scoullou M., Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants, **Ecotox. Environ. Safety**, (2005)
- [32] Spiteller G., Lipid peroxidation in aging and age-dependent diseases, **Exp. Gerontol.**, 36: (2001) 1425-1457
- [33] Akkuş İ., Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, Konya, (1995)
- [34] Mavelli I., Rotilio G., Enzymatic protection against intracellular oxidative processes, advances on oxygen radicals and radioprotectors, **Edizioni Scientifiche**, (1984) 65-80
- [35] Steenvoorden D.P.T., Beijersbergen van Henegouwen G.M.J., The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection, **J. Photochem. Photobiol. B: Biology**, 41: (1997) 1-10.
- [36] Arteel G.E., Briviba K., Sies H.V., Protection against peroxynitrite, **FEBS Lett.**, 445: (1999) 226-230.
- [37] Rayman M.P., The importance of selenium to human health, **The Lancet**, 356: (2000) 233-241
- [38] Tinggi U., Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review, **Toxicol. Lett.**, 137: (2003) 103-110
- [39] Sasakura C. and Suzuki K.T., *Inorganic Biochemistry* (1998) 71-159
- [40] Suzuki K.T. and Ogra Y., Trace elements, **Biomed. Res.**, (1999) 10-95
- [41] Hamilton S.J., Review of selenium toxicity in the aquatic food chain, **Sci. Total Environ.**, 326: (2004) 1-31
- [42] Finley J.W., Clement Ip, Donald J.L., Davis C.D., Hintze K.J. and Whanger P.D., Cancer-protective properties of high-selenium broccoli, **J. Agric. Food Chem.**, 49: (2001) 2679-2683

- [43] Susan Turner, Selenium to prevent and treat cancer, (1997) Volume II, Issue I 635 [www. hmscrown. com/selenium. htm-14k](http://www.hmscrown.com/selenium.htm-14k)
- [44] Jane Higdon, Ph. D., Linus Pauling Institute (2001) [http: // Ipi. Oregon state. Edu/infocenter/minerals/selenium/](http://Ipi.Oregon.state.Edu/infocenter/minerals/selenium/)
- [45] Lemly A.D., A teratogenic deformity index for evaluating impacts of selenium on fish populations, **Ecotox. Environ. Safety**, 37: (1997) 259-266
- [46] El-Demerdash F.M., Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium, **J. Trace Elements Med. Biol.**, 18: (2004) 113-121
- [47] Berntssen M.H.G., Lundebye A.K. and Hamre K., Tissue lipid peroxidative responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr fed high levels of dietary copper and cadmium **Fish Physiol. Biochem.**, 23: (2000) 35-48
- [48] Almeida J.A., Diniz Y.S., Marques S.F.G., Faine L.A., Ribas B.O., Burneiko R.C., Novelli E.L.B., The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination **Environ. Int.**, 27: (2002) 673-679
- [49] Vaglio A. and Landriscina C., Changes in liver enzyme activity in the teleost *Sparus aurata* in response to cadmium intoxication **Ecotox. Environ. Safety**, 43 (1999) 111-116
- [50] Cicik B., Engin K., The effects of cadmium on levels of glucose in serum and glycogen reserves in the liver and muscle tissues of *Cyprinus carpio* (L., 1758) **Turk. J. Vet. Anim. Sci.**, 29 (2005) 113-117
- [51] Roberts A.P., Oris J.T., Multiple biomarker response in rainbow trout during exposure to hexavalent chromium **Comp. Biochem. Physiol.**, Part C 138 (2004) 221-228
- [52] Örün İ., Ateş B., Selamoğlu Z., Yazlak H., Öztürk E., Yılmaz İ., Effect of various sodium selenite concentrations on some biochemical and haematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), **Fresen. Environ. Bull.**, Vol. 14 No. 1 (2005) 18-22.
- [53] Low K.W., Sin Y.M., Effects of mercuric chloride and sodium selenite on some immune responses of blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallus), **Sci. Total Environ.**, 214: (1998) 153-164
- [54] Lowry O., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., Protein measurements with the folin phenol reagent, **J. Biol. Chem.**, 193: (1956) 265-275
- [55] Lawrance R.A., Burk R.F., Glutathion peroxidase activity in selenium deficient rat liver, **Biochem. Biophys. Res. Com.**, Vol. 71, No.4: (1976) 952-958

- [56] Luck H., Catalase, *Methods of Enzymatic Analysis*, (1963) 885-888
- [57] Mc Cord J.M., Fridovich I., Superoxide dismutase: An enzymic function for Erythrocyte hemoglobin (Hemoglobin), **J. Biol. Chem.**, Vol. 244 No 22: (1969) 6049-6055
- [58] Beuge J.A., Aust S.D., Microsomal lipid peroxidation, **Methods in Enzymology**, 52: (1978) 302-310
- [59] Sağlamtimur B., Cıçık B., Erdem C., Farklı ortam derişimlerinin etkisinde bakır ve bakır + kadmiyum karışımının tatlı su çipurasının (*Oreochromis niloticus*, L.) solungaç, karaciğer, böbrek ve kas dokularındaki bakır birikimi üzerine etkileri, **Turk J. Vet. Anim. Sci.**, 27: (2003) 813-820
- [60] Jamba L., Nehru B. and Bansal M.P., Effect of selenium supplementation on the influence of cadmium on Glutathione and Glutathione peroxidase system in mouse liver, **J. Trace Elements Exp. Med.**, 13: (2000) 299-304
- [61] Ognjanovic B., Zikic R.V., Stajin A., Saicic Z.S., Kostic M.M., Petrovic V.M., The effects of selenium on the antioxidant defense system in the liver of rats exposed to cadmium, **Physiol. Res.**, 44 (5): (1995) 293-300
- [62] Jamba L., Nehru B. and Bansal M.P., Selenium supplementation during cadmium exposure: Changes in antioxidant enzymes and the ultrastructure of the kidney, **J. Trace Elements Exp. Med.**, 10: (1997) 233-242

ÖZGEÇMİŞ

27. 05. 1981 yılında Malatya’da doğdu. 1992 yılında Cengiz Topel İlkokulu’ndan, 1995 yılında Atatürk Ortaokulu’ndan ve 1999 yılında H. Hüseyin Kölük Anadolu Tic. Meslek Lisesi’nden mezun oldu. Aynı yıl girmiş olduğu üniversite sınavında İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı. Buradan 2003 yılında mezun oldu. Eylül 2003’te İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı ve hala çalışmalarını İnönü Üniversitesi’nde sürdürmektedir.