

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KADMİYUM, KURŞUN, BAKIR VE KOMBİNASYONLARININ
***Xenopus laevis* İRİBAŞLARINDA BAZI BİYOBELİRTEÇLER**
ÜZERİNE ETKİLERİ

ERTAN YOLOĞLU

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MALATYA

ARALIK 2012


Tezin Başlığı: **Kadmiyum, Kurşun, Bakır ve Kombinasyonlarının *Xenopus laevis* İribaşlarında Bazı Biyobelirteçler Üzerine Etkileri**

Tezi Hazırlayan: **Ertan YOLOĞLU**

Sınav Tarihi: 28.12.2012

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Ana Bilim Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jürisi Üyeleri:

Prof. Dr. Figen ERKOÇ: .....(Gazi Üniversitesi)

Prof. Dr. Murat ÖZMEN: .....(İnönü Üniversitesi)

Prof. Dr. A. Ümit ERDEMLİ: .....(İnönü Üniversitesi)

Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA: .....(İnönü Üniversitesi)

Prof. Dr. Dilek ASMA: .....(İnönü Üniversitesi)

İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Mehmet ALPASLAN

Enstitü Müdürü

ONUR SÖZÜ

Doktora Tezi olarak sunduğum “**Kadmiyum, Kurşun, Bakır ve Kombinasyonlarının *Xenopus laevis* İribaşlarında Bazı Biyobelirteçler Üzerine Etkileri**” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.



Ertan YOLOĞLU

ÖZET

Doktora Tezi

KADMİYUM, KURŞUN, BAKIR VE KOMBİNASYONLARININ *Xenopus laevis* İRİBAŞLARINDA BAZI BİYOBELİRTEÇLER ÜZERİNE ETKİLERİ

Ertan YOLOĞLU

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
119 + x sayfa

2012

Danışman: Prof. Dr. Murat ÖZMEN

Bu çalışmada, kadmiyum (Cd), kurşun (Pb), bakır (Cu) ve bu metallerin karışımlarının *Xenopus laevis* iribaşları üzerine etkilerinin saptanması amaçlandı. Bu amaçla, seçilen metallerin uygulama konsantrasyonları Avrupa Birliği (AB) içme suları yönetmeliğinde belirtilen kabul edilebilir sınır değerler ve 96 saatlik test sonucu elde edilen ortalama öldürücü konsantrasyon (LC₅₀) değerlerine göre belirlendi. Buna göre, 46. evredeki *Xenopus laevis* iribaşları 0.005 (AB değeri), 0.52 (LC_{50/10}), 2.59 (LC_{50/2}) ve 5.18 mg/L (LC₅₀) Cd; 0.01 (AB değeri), 12.3 (LC_{50/10}), 61.53 (LC_{50/2}) ve 123.05 mg/L (LC₅₀ değeri) Pb; 0.01, 0.085 (LC_{50/10}), 0.425 (LC_{50/2}) ve 0.85 mg/L (LC₅₀) Cu ve bu metallerin belirlenen konsantrasyonlarının ikili karışımlarına (1:1) ve üçlü karışımına (1:1:1) 96 saatlik statik yenilemeli test sisteminde maruz bırakıldı. Bunun dışında, metallerin 96 saatlik LC₅₀ ve LC_{50/2} değerleri karışımlarına 24 saat süresince maruz bırakıldılar. Amfibi iribaşlarında metallerin, glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR), asetilkolinesteraz (AChE), karboksilesteraz (CaE), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT) enzimleri ve metalotiyonein (MT) miktarı üzerine etkileri saptandı.

Metallerin ve karışımlarının 96 saatlik uygulamaları sonucunda, Pb ve Cd'un LC₅₀ değerleri karışımının ve Pb+Cu, Cd+Cu ve Pb+Cd+Cu karışımlarında ise metallerin LC₅₀ ve LC_{50/2} değerleri karışımlarının bütün iribaşları öldürdüğü belirlendi. Metallerin tek başlarına LC_{50/2} ve LC₅₀ değerleri ile düşük metal konsantrasyonları karışımlarının seçilen biyobelirteç enzimleri önemli düzeyde etkilediği ve MT miktarının konsantrasyonla ilişkili olarak arttığı saptandı. Metallerin 96 saatlik LC₅₀ ve LC_{50/2} değerleri karışımlarına 24 saat süresince maruz bırakılan iribaşlarda GST, GR ve CAT enzimlerinin önemli düzeyde etkilendiği ve MT miktarının önemli düzeyde arttığı saptandı.

Araştırma sonuçları, metallerin 46. evredeki *X. laevis* iribaşlarında toksik potansiyele sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, metallerin karışım olarak uygulandıklarında, LC_{50/2} ve LC₅₀ değerlerinden çok daha düşük konsantrasyonlarda toksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca sonuçlarımız, *X. laevis* iribaşlarının sucül ekosistemlerde, metal kirliliğinin belirlenmesini amaçlayan çalışmalar için uygun bir test organizması olduğunu ve seçilen biyokimyasal belirteçlerin de metal toksisitesini iyi bir şekilde yansıttığını göstermektedir.

ANAHTAR KELİMELER: Kadmiyum, Kurşun, Bakır, Metal Toksisitesi, *Xenopus laevis*, Enzim.

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

EFFECTS OF CADMIUM, LEAD, COPPER AND THEIR COMBINATIONS ON SELECTED BIOMARKERS IN *Xenopus laevis* TADPOLES

Ertan YOLOĞLU

İnönü University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
119 + x pages

2012

Supervisor: Prof. Dr. Murat ÖZMEN

The aim of this study was to determine the effects of cadmium (Cd), lead (Pb), copper (Cu), and their mixtures on *Xenopus laevis* tadpoles. For this aim, the application concentrations of metals were determined according to their acceptable limit values in drinking water set forth by the European Union (EU) and the 96-hour median lethal concentration values (LC₅₀). Given these, tadpoles in stage 46 were exposed to 0.005 (EU limit value), 0.52 (LC₅₀/10), 2.59 (LC₅₀/2) and 5.18 mg/L (LC₅₀) Cd; 0.01 (EU limit value), 12.3 (LC₅₀/10), 61.53 (LC₅₀/2) and 123.05 mg/L (LC₅₀) Pb; 0.01, 0.085 (LC₅₀/10), 0.425 (LC₅₀/2) and 0.85 mg/L (LC₅₀) Cu and the metals were applied as double (1:1) and triple (1:1:1) metal mixtures in 96-hour static renewal test system. In addition to the 96-hour tests, tadpoles were also exposed to metal mixtures for 24-hours using LC₅₀/2 and LC₅₀ values. Effects of metals on glutathione S-transferase (GST), glutathione reductase (GR), acetylcholinesterase (AChE), carboxylesterase (CaE), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) levels and amount of metallothionein (MT) in tadpoles were determined.

The results from 96-hour metal or metal mixture applications showed that all tadpoles died when exposed to LC₅₀ value mixtures of Pb and Cd. Also, all tadpoles died when exposed to LC₅₀/2 or LC₅₀ value of metals in Pb+Cu, Cd+Cu and Pb+Cd+Cu mixtures. The LC₅₀/2 and LC₅₀ values of metals and the lowest concentrations of metal mixtures significantly affected selected enzymatical biomarkers. Also, the amount of MT significantly increased with exposure concentrations. The GST, GR and CAT activities were significantly affected and amount of MT significantly increased with the exposure to mixtures of metals using the application concentrations of LC₅₀/2 or LC₅₀ of 96-hour exposure time for 24-hour exposure for all tadpoles.

The results indicated that metal and metal mixtures have toxic potential on *X. laevis* tadpoles in stage 46. Furthermore, when applied as mixtures, the metals showed a toxic effect on tadpoles at concentrations much lower than their LC₅₀/2 or LC₅₀ values. Also, our results showed that *X. laevis* tadpoles can be used as a suitable test organism and the selected biochemical markers may also serve well for studies with the aim of determining metal pollution in aquatic ecosystems.

KEY WORDS: Cadmium, Lead, Copper, Metal toxicity, *Xenopus laevis*, Enzyme.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın konusunun belirlenmesinde ve çalışma süresince karşılaşılan sorunların çözümünde öneri ve desteklerini esirgemeyen, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum danışman hocam Sayın Prof. Dr. Murat ÖZMEN'e;

Çalışmalarım süresince uyarı ve önerilerini esirgemeyen, elektroforez çalışmalarına katkı sağlayan Tez İzleme Komitesindeki değerli hocam Sayın Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA'ya;

Çalışmalarım süresince uyarı ve önerileri ile bana sürekli destek olan Tez İzleme Komitesindeki değerli hocam Sayın Prof. Dr. Dilek ASMA'ya;

Çalışmalar süresince öneri ve destekleriyle bana ağabeylik yapan değerli hocam Doç. Dr. Abbas GÜNGÖRDÜ'ye, laboratuvar çalışmalarında büyük emeği olan değerli dostum Arş. Gör. Miraç UÇKUN'a ve çalışma süresince hep yanımda olan değerli dostlarım Adıyaman Üniversitesi Eğitim Fakültesi öğretim elemanlarından Öğr. Gör. Suat ÇAPUK ve Arş. Gör. Selçuk FIRAT'a;

Çalışmalar süresince büyük özverisi ile bana destek olan hayatımı yaşanır kılan sevgili eşim SEMRA'ya ve hayatımıza yeni giren oğlum ŞAHİN KAĞAN'a;

Her konuda benden desteklerini esirgemeyen ve hep yanımda olan sevgili ANNEM'e ve BABAM'a;

Bu çalışmaya maddi olarak destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (Proje No: 2009/38);

EN İÇTEN DİLEKLERİMLE TEŞEKKÜR EDERİM...

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Metaller.....	4
1.1.2. Toksik Etkileri Değerlendirilen Metaller.....	7
1.1.2.1. Kadmiyum	7
1.1.2.2. Kurşun.....	9
1.1.2.3. Bakır.....	12
1.2. <i>Xenopus laevis</i>	13
1.2.1. <i>Xenopus laevis</i> 'in Morfolojisi ve Anatomisi	14
1.2.2. <i>Xenopus laevis</i> 'in Sistematığı	14
1.2.3. <i>Xenopus laevis</i> 'in Beslenmesi ve Bakımı	15
1.2.4. <i>Xenopus laevis</i> 'in Üremesi, Embriyo ve Larva Gelişimi	16
1.3. Toksisitenin Değerlendirilmesinde Kullanılan Biyobelirteçler	18
1.3.1. Enzimatik Biyobelirteçler	18
1.3.1.1. Asetilkolinesteraz.....	18
1.3.1.2. Glutasyon S-transferaz	20
1.3.1.3. Karboksilesteraz.....	21
1.3.1.4. Glutasyon Redüktaz	22
1.3.1.5. Glutasyon Peroksidaz	24
1.3.1.6. Katalaz	24
1.3.2. Enzimatik Olmayan Biyobelirteç Olarak Metallothionein	25
1.3.2.1. Metallothioneinlerin Görevleri	26
2. KAYNAK ÖZETİ.....	29
2.1. Alan Çalışmaları	29
2.2. Laboratuvar Çalışmaları	33

3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	39
3.1. <i>Xenopus laevis</i> Yumurta ve İribaşlarının Sağlanması	39
3.2. Metallerin LC ₅₀ Değerlerinin ve Uygulama Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	40
3.3. Metal Toksisitesinin Belirlenmesi	40
3.4. Ortam pH'sının Saptanması.....	42
3.5. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	42
3.5.1. İribaşların Homojenizasyon ve Santrifüj İşlemleri.....	42
3.5.2. Glutasyon S-transferaz Aktivitesi	43
3.5.3. Glutasyon Redüktaz Aktivitesi.....	43
3.5.4. Karboksilesteraz Aktivitesi.....	43
3.5.5. Asetilkolinesteraz Aktivitesi.....	44
3.5.6. Katalaz Aktivitesi	44
3.5.7. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi	44
3.6. Metalloiyonein Tayini	45
3.6.1. İribaşların Homojenizasyon ve Santrifüj İşlemleri.....	45
3.6.2. Metalloiyoneinin Yoğunlaştırılması, Saflaştırılması ve Miktar tayini	45
3.6.2.1. Metalloiyoneinin Spektrofotometrik Olarak Tayini	46
3.6.2.2. Metalloiyoneinin Elektroforetik-Florimetrik Olarak Tayini	47
3.7. Toplam Protein Miktarı Tayini	47
3.8. İstatistiksel Analiz ve Hesaplamalar.....	48
4. BULGULAR.....	49
4.1. 96 Saatlik Çalışmalar İle İlgili Bulgular	50
4.1.1. 96 Saatlik LC ₅₀ , NOAEC ve LOAEC Değerleri.....	50
4.1.2. 96 Saatlik Uygulamalarda Ortamların pH Değerleri	50
4.1.3. 96 Saatlik Çalışmalarda Belirlenen Ölüm Oranları	51
4.1.4. 96 Saatlik Cd Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi.....	54
4.1.5. 96 Saatlik Pb Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi	57
4.1.6. 96 Saatlik Cu Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi.....	60
4.1.7. 96 Saatlik Cd+Cu Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi.....	63
4.1.8. 96 Saatlik Pb+Cu Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi	65
4.1.9. 96 Saatlik Pb+Cd Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi	68
4.1.10. 96 Saatlik Pb+Cd+Cu Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi ...	71
4.1.11. 96 Saatlik Metal ve Metal Karışımı Uygulamalarının Metalloiyonein Miktarına Etkisi	74

4.1.12. 96 Saatlik Elektroforetik-Florimetrik Çalışmalar İle İlgili Bulgular	77
4.2. 24 Saatlik Çalışmalar İle İlgili Bulgular	81
4.2.1. 24 Saatlik Uygulamalarda Ortamların pH Değerleri	81
4.2.2. 24 Saatlik Çalışmalarda Belirlenen Ölüm Oranları	81
4.2.3. 24 Saatlik Cd+Cu Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi	82
4.2.4. 24 Saatlik Pb+Cu Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi	85
4.2.5. 24 Saatlik Pb+Cd Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi	87
4.2.6. 24 Saatlik Pb+Cd+Cu Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi	89
4.2.7. 24 Saatlik Metal Karışımı Uygulamalarının Metalloiyonein Miktarına Etkisi ...	91
4.2.8. 24 Saatlik Elektroforetik-Florimetrik Çalışmalar İle İlgili Bulgular	92
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	94
6. KAYNAKLAR	108
ÖZGEÇMİŞ	119

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Metallerin ekosistemde yayılışı	6
Şekil 1.2. Kadmiyum taşınımı, protein bağlanması ve toksisitesi	9
Şekil 1.3. Kurşun'un <i>hem</i> biyosentezi üzerine etkisi.....	11
Şekil 1.4. Dişi (A) ve erkek (B) ergin yabancıl tip <i>Xenopus laevis</i> türü kurbağalar.	13
Şekil 1.5. Üreme davranışı gösteren erkek ve dişi <i>Xenopus laevis</i> türü kurbağalar.	17
Şekil 1.6. <i>Xenopus laevis</i> 'in bazı metamorfoz evreleri	17
Şekil 1.7. Asetilkolin'in genel kimyasal yapısı.	18
Şekil 1.8. Asetilkolin ve asetilkolinesteraz arasındaki hidroliz reaksiyonu.	19
Şekil 1.9. İmpuls iletimi ve AChE'nin impuls iletimini sonlandırma mekanizması.	19
Şekil 1.10. Bir tripeptid olan glutatyonun açık formülü	22
Şekil 1.11. Glutatyon redüktazın GSH metabolizmasındaki yeri.....	23
Şekil 1.12. Metalloitiyonein miktarındaki artış ile biyolojik sonuçlar (olaylar) arasındaki ilişkiye genel bir bakış.....	28
Şekil 3.1. Metal toksisitesi deney düzeneği.	41
Şekil 3.2. GSH standart eğrisi.....	46
Şekil 3.3. BSA standart eğrisi.	48
Şekil 4.1. A; mBBBr ile etiketlenmiş MT'nin SDS-PAGE elektroforezinden sonra UV-Florensans görüntüsü. B; MT'nin SDS-PAGE elektroforezinden sonra comassie brilliant mavi ile boyanmış görüntüsü.	77
Şekil 4.2. A; mBBBr ile etiketlenmiş MT'nin SDS-PAGE elektroforezinden sonra UV-Florensans görüntüsü. B; MT'nin SDS-PAGE elektroforezinden sonra comassie brilliant mavi ile boyanmış görüntüsü.	78
Şekil 4.3. A; mBBBr ile etiketlenmiş MT'nin SDS-PAGE elektroforezinden sonra UV-Florensans görüntüsü. B; MT'nin SDS-PAGE elektroforezinden sonra comassie brilliant mavi ile boyanmış görüntüsü.	79
Şekil 4.4. A; mBBBr ile etiketlenmiş MT'nin SDS-PAGE elektroforezinden sonra UV-Florensans görüntüsü. B; MT'nin SDS-PAGE elektroforezinden sonra comassie brilliant mavi ile boyanmış görüntüsü.	80
Şekil 4.5. A; mBBBr ile etiketlenmiş MT'nin SDS-PAGE elektroforezinden sonra UV-Florensans görüntüsü. B; MT'nin SDS-PAGE elektroforezinden sonra comassie brilliant mavi ile boyanmış görüntüsü.	93
Şekil 5.1. 96 saatlik Cd, Pb ve Cu uygulamalarının MT miktarına etkisi.	99
Şekil 5.2. 96 saatlik düşük konsantrasyonlardaki Pb, Cu ve Pb+Cu uygulamalarının AChE aktivitesi üzerine etkisi.....	102
Şekil 5.3. Pb ile Cd'un LC ₅₀ /2 değerlerinin tek başına ve karışım halinde CAT aktivitesi üzerine etkisi.	103
Şekil 5.4. 96 saatlik Cd, Pb, Cu ve karışımları uygulamasının GST aktivitesine etkisi	104

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Bazı endüstri kaynaklarından çevreye salınan başlıca metaller	2
Çizelge 1.2. Bazı kirlilik kaynakları ve kirleticileri.....	3
Çizelge 4.1. Metallerin 96 saatlik LC ₅₀ , NOAEC ve LOAEC değerleri.	50
Çizelge 4.2. 96 saatlik çalışmalarda elde edilen ortalama pH değerleri.	51
Çizelge 4.3. 96 saatlik enzim çalışmalarda belirlenen ölüm oranları.	52
Çizelge 4.4. 96 saatlik MT çalışmalarda belirlenen ölüm oranları.....	53
Çizelge 4.5. 96 saatlik Cd uygulamasının enzim aktiviteleri üzerine etkisi	56
Çizelge 4.6. 96 saatlik Pb uygulamasının enzim aktiviteleri üzerine etkisi	59
Çizelge 4.7. 96 saatlik Cu uygulamasının enzim aktiviteleri üzerine etkisi	62
Çizelge 4.8. 96 saatlik Cd+Cu uygulamasının enzim aktiviteleri üzerine etkisi	64
Çizelge 4.9. 96 saatlik Pb+Cu uygulamasının enzim aktiviteleri üzerine etkisi.....	67
Çizelge 4.10. 96 saatlik Pb+Cd uygulamasının enzim aktiviteleri üzerine etkisi.....	70
Çizelge 4.11. 96 saatlik Pb+Cd+Cu uygulamasının enzim aktiviteleri üzerine etkisi....	73
Çizelge 4.12. 96 saatlik metal ve metal karışımı uygulamalarının MT miktarına etkisi	76
Çizelge 4.13. 24 saatlik çalışmalarda elde edilen ortalama pH değerleri.	81
Çizelge 4.14. 24 saatlik çalışmalarda belirlenen ölüm oranları.	82
Çizelge 4.15. 24 saatlik Cd+Cu uygulamasının enzim aktiviteleri üzerine etkisi	84
Çizelge 4.16. 24 saatlik Pb+Cu uygulamasının enzim aktiviteleri üzerine etkisi.....	86
Çizelge 4.17. 24 saatlik Pb+Cd uygulamasının enzim aktiviteleri üzerine etkisi.....	88
Çizelge 4.18. 24 saatlik Pb+Cd+Cu uygulamasının enzim aktiviteleri üzerine etkisi....	90
Çizelge 4.19. 24 saatlik metal karışımı uygulamalarının MT miktarına etkisi.....	92

SİMGELER VE KISALTMALAR

AB	Avrupa Birliği
ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolinesteraz
ACTI	Asetilkolin iodid
ALP	Alkalen fosfataz
ALT	Alanin aminotransferaz
AST	Aspartat aminotransferaz
ASTM	Amerikan Standartları Enstitüsü
BChE	Bütirilkolinesteraz
BSA	Sığır serum albümini
CaE	Karboksilesteraz
CAT	Katalaz
Cd	Kadmiyum
CdCl ₂	Kadmiyum klorür
CDNB	1-kloro-2,4-dinitrobenzen
ChE	Kolinesteraz
Cu	Bakır
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DTNB	5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoik asit)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EROD	7-Etoksirezorufin- <i>O</i> -deetilaz
FETAX	Frog Embryo Teratogenesis Assay- <i>Xenopus</i>
GR	Glutasyon redüktaz
GPx	Glutasyon peroksidaz
GSH	Redükte glutasyon
GST	Glutasyon S-transferaz
GSSG	Okside glutasyon
G6PD	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
hCG	İnsan koryonik gonadotropin
IgA	İmmünoglobulin A
IgG	İmmünoglobulin G
IU	Ünite
KCl	Potasyum klorür
LC ₅₀	Ortalama öldürücü konsantrasyon
LOAEC	Olumsuz etki görülen en düşük konsantrasyon
LP	Lipaz
LT ₅₀	Ortalama ölüm zamanı
LDH	Laktat dehidrogenaz
mBBr	Monobromobimane
MT	Metallotiyonein
NAD ⁺	Nikotinamid adenin dinükleotid (okside)
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid (redükte)
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NaN ₃	Sodyum azid
NOAEC	Hiçbir olumsuz etkinin görülmediği konsantrasyon

NOS	Nitrit oksit sentetaz
OP	Organofosforlu
PAH	Polisiklik aromatik hidrokarbon
Pb	Kurşun
PCB	Poliklorlu bifenil
PMSF	Fenilmetilsülfonilflorür
PNPA	<i>P</i> -nitrofenol asetat
P450-MO	Sitokrom P450 monooksigenaz
ROS	Reaktif oksijen türü
USEPA	Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Kurumu
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SOD	Süperoksit dismutaz
TI	Teratojenik indeks
OD	Optik dansite
-SH	Sülhidril

1. GİRİŞ

İnsanoğlu var olduğu günden itibaren doğada üstünlük kurmaya yönelik arayışlar içine girmiş ve doğayı sınırsızca kullanarak çevre ile arasındaki dengenin bozulmasına neden olmuştur. Doğa üzerinde yapmış olduğu tahribatı çok geç fark eden insanoğlu, 19. yüzyılda çevre ile olan ilişkilerinde birçok sorunla karşı karşıya kaldıktan sonra doğa ile uyum içinde yaşamak zorunda olduğunu anlamıştır. Çevrenin canlı yaşamını etkileyecek şekilde bozulması kirlilik düzeyinin doğanın kendini yenilenme yeteneğinin üzerine çıkması ile başlamıştır [1,2].

İnsan aktivitelerinin artması ile birlikte çevreye verilen kimyasalların miktarı da artmaktadır. Bu kimyasalların birçoğu ekosistemler ve organizmalar için oldukça zararlıdır [3]. Son yüzyılın en önemli sorunlarından biri olan çevre kirliliği hızlı kentleşme, endüstriyel aktiviteler ve nüfus artışı sonucu giderek artış göstermektedir. Çevre kirliliğini oluşturan temel unsurlar evsel, endüstriyel ve tarımsal atıklardır [4]. Bu atıklar canlılar üzerinde doğrudan ya da dolaylı birçok olumsuz etkiye neden olur. Cansız çevrede oluşacak her türlü olumsuz değişim ise ekosistemin bütününe etkiler ve ekolojik dengenin bozulmasına neden olabilir [5]. Ekolojik dengeyi bozan ve bu nedenle çevrede varlığı istenmeyen ancak çevrede bulunurluğu her geçen gün artan kirlenici faktörlerden biri de metallerdir. Metallerden bir kısmı yaşam için elzem elementler iken, önemli bir bölümü de çevresel bir stres faktörü olabilir ve organizmalar üzerinde çok düşük konsantrasyonlarda dahi olumsuz etkiye yol açabilir [6].

Sucul ekosistemlerdeki metal kirliliği diğer bütün insan kaynaklı kimyasallardan bir kaç bin yıl önce başlamıştır. Demir ve bronz çağlarında sınırlı bir metal işletim süreci olsa da, endüstri devrimi ile başlayan büyük ölçekli madencilik ve maden eritmenin hızla yaygınlaşması sonucu ekosistem metaller tarafından da hızla kirlenilmeye başlanmıştır [7]. Günümüzde de metaller endüstriyel üretim, madencilik, yanma ürünleri ve tarımsal pestisitler ile suya, havaya ve karasal çevreye verilmektedir (Çizelge 1.1) [8]. Gelişmiş işletim süreçleri ve artan yasal düzenlemeler Batı Avrupa ve Kuzey Amerika'da yayılmayı belli oranda sınırlamaktadır. Ancak endüstriyel işletim süreçlerinden ve maden ocaklarından kaynaklanan metal kirliliği, dünyanın büyük çoğunluğunda devam etmektedir [7].

Çizelge 1.1. Bazı endüstri kaynaklarından çevreye salınan başlıca metaller [9].

Endüstri Kolu	Cd	Cr	Cu	Hg	Pb	Ni	Sn	Zn
Kağıt Endüstrisi	-	+	+	+	+	+	-	-
Petrokimya	+	+	-	+	+	-	+	+
Klor-alkali Üretimi	+	+	-	+	+	-	+	+
Gübre Sanayi	+	+	+	+	+	+	-	+
Demir-Çelik Sanayi	+	+	+	+	+	+	+	+
Enerji Üretimi (Termik)	+	+	+	+	+	+	+	+

Çevreye bırakılan kimyasallar, ekosistemin normal işlevlerini kısa veya uzun süreli olarak ve geçici ya da kalıcı şekilde değiştirebilirler. Sonuçta ekonomik, sosyal ve çevresel kayıplara neden olurlar [10]. Bu potansiyel etkilerin en önemli sebepleri metallerin, pestisitlerin ve diğer kirlilik kaynaklarının çoğunlukla bir hedef seçiciliklerinin olmamasıdır. Çizelge 1.2’de ekosistem dengeleri üzerine olumsuz etkisi olabilecek bazı kirlilik kaynakları ve kirleticileri verilmiştir.

Çizelge 1.2. Bazı kirlilik kaynakları ve kirleticileri [11].

Kirlilik Kaynakları	Kirleticiler
Kentsel ve Endüstriyel atıklar, Sıvı Gübreler	Nitratlar, Fosfatlar, Metaller , Boyalar, Fenoller, Diğer organik kirleticiler ve Patojen mikroorganizmalar
Pestisit Kullanımı	Az veya Çok dirençli bileşikler (organofosforlu bileşikler, karbamatlı bileşikler)
Endüstri	Metaller , Hidrokarbonlar, Asitler, Solventler, Radyoaktif maddeler vb.
Kentsel ve Endüstriyel Atmosferik Kirlilik Kaynaklı Olarak	Metaller , Dioksinler, Asitler vb.
Hidrokarbon Depolanan Alanlar (Gaz istasyonlarından yağ depolarına kadar)	Hidrokarbonlar
Çöp Depo Alanları	Metaller , Mikroorganizmalar, Asitler, Endüstriyel atıklarla bağlantılı olarak oluşan çeşitli kimyasallar, vb.
Cephanelikler ve Eski Savaş Alanları	Kompleks ve dirençli bileşikler

Bir ekosistem ya da bir organizma üzerinde olumsuz etkilerin saptanabilmesi için, toksik maddelerin ilk olarak laboratuvar koşullarında çeşitli türden organizmalar için olası risk analizlerinin yapılması gerekir. Bu şekilde toksik ajanın verildiği alıcı ortamda etkilenebilecek organizmaların seçilmesi sonucu kirletici maddenin ekosistem üzerindeki olası etkilerinin saptanması da mümkün olabilir [12,13].

Amfibiler filogenetik olarak balıklar ile reptiller arasında bir pozisyona sahip olduklarından ve bir metamorfoz süreci ile farklı ekosistemlerde yaşamlarını sürdürdüklerinden dolayı metallerin etkisinin çalışılması için ilgi çekici organizmalardır. Yaşamlarının önemli bir kısmını sucul habitatlarda geçirmeleri, metal ile kirlenmiş sucul ekosistemlerde metal etkisine maruz kalmaları açısından amfibileri önemli risk grubu organizmalar arasına sokmaktadır. Doğal habitatları sanayileşmeden dolayı toksik maddeler ile kirlenmektedir. Tüm bunların sonucu olarak son zamanlarda amfibi populasyonlarında bir azalma rapor edilmektedir [14]. Bu durum amfibilerin gelişimlerinin özellikle erken dönemlerinde çevresel kirleticilere karşı yüksek düzeyde

duyarlı olmaları ile ilişkili olabilir. Çevresel kirleticilere amfibi embriyolarının yüksek duyarlılığı, yabancı hayatın su kalitesinin değerlendirilmesinde ve ekotoksikolojik çalışmalar için onları kullanışlı kılmaktadır [15]. *Xenopus laevis* embriyosu, embriyonik gelişim üzerine çevresel faktörlerin veya bileşiklerin toksisitesini belirlemek için kullanılan önemli bir omurgalı modelidir [16].

Dünyada sucul ekosistemleri ve bu ekosistemlerde yaşayan canlıları tehdit eden en önemli sorunlardan biri olarak karşımıza çıkan metal kirliliğinin sucul ekosistem türleri üzerine etkilerinin anlaşılması önemlidir. Buna bağlı olarak, buldukları ekosistemde organizmaların birden fazla metale maruz kalmaları nedeniyle metal karışımlarının etkilerini değerlendirmek de önem arz etmektedir. Bu nedenle bu çalışmada farklı alanlarda yaygın biçimde kullanılan ve çevresel atıklara bağlı olarak konsantrasyonu alıcı ortamlarda giderek artan kadmiyum (Cd), kurşun (Pb), bakır (Cu) ve bunların karışımlarının subletal konsantrasyonlarının toksik etkilerinin saptanması amaçlanmıştır. Buna bağlı olarak metal toksisitesini ortaya koyabilecek biyokimyasal belirteçler seçilerek, asetilkolinesteraz (AChE), glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR), karboksilesteraz (CaE), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT) enzimleri ile toksik etki arasında olası ilişki değerlendirilmiştir. Ayrıca metal toksisitesinde koruyucu olarak bilinen metalotiyonein (MT) miktarının subletal konsantrasyonlarda metal etkisine maruz kalan amfibi iribaşlarında değişiminin gözlenmesi amaçlanmıştır. Böylece seçilen metallerin etkisine maruz kalan amfibi iribaşlarında toksik etkiyi gösterebilecek biyobelirteçlerin saptanması da amaçlanmıştır. Bu nedenle, çalışmalar için İnönü Üniversitesi Biyoloji Bölümü bünyesinde yer alan Çevre Toksikolojisi Araştırma Laboratuvarında yaşatılan *X. laevis* türü kurbağalar model organizma olarak seçilmiştir.

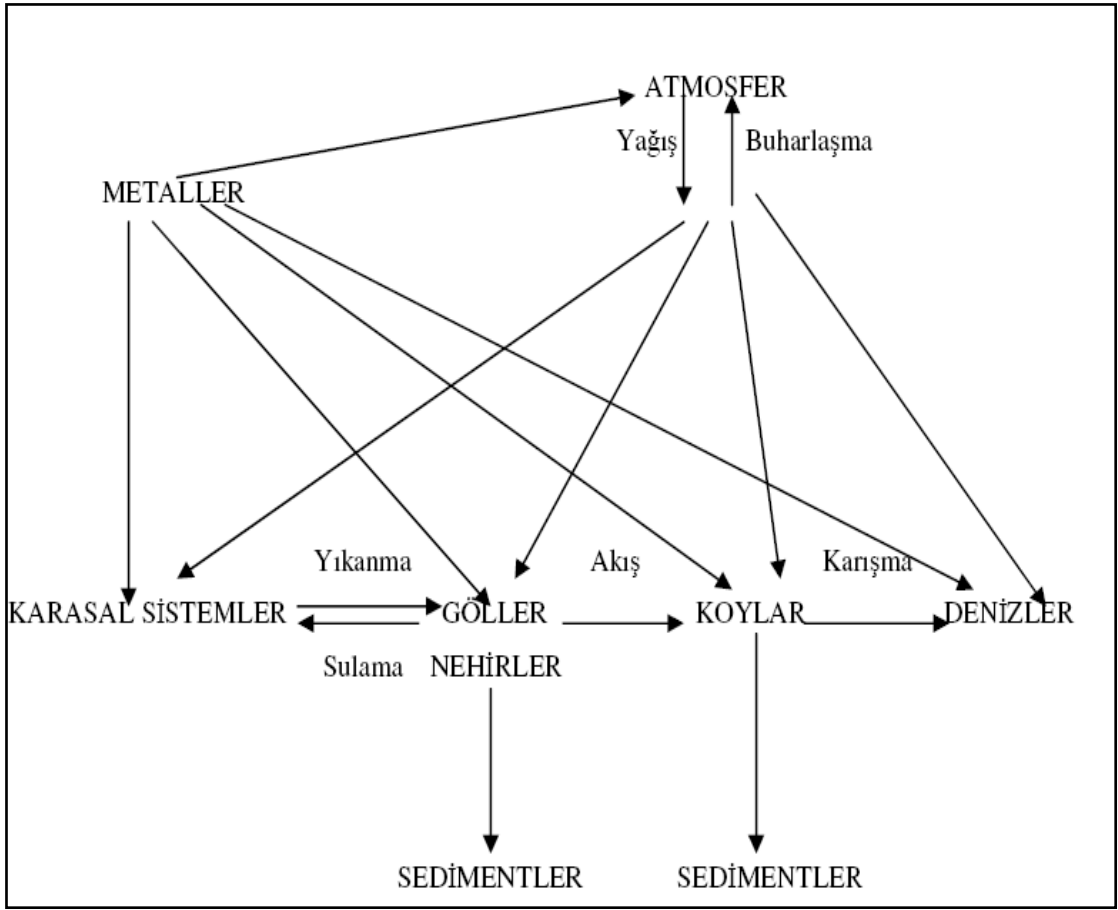
1.1. Metaller

Metaller fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerine göre tanımlanabilir. Atom numaraları demir elementinden büyük olan ve özgül yoğunlukları 5 g/cm^3 'ün üzerinde olan kimyasal elementler "ağır metal" olarak isimlendirilir. Bu metaller periyodik tabloda IIA, IIIB, IVB, VB, VIB grup metalleri oluşturur. Metaller yer kabuğunda doğal olarak bulunan bileşiklerdir. İnsan vücuduna düşük miktarlarda, gıdalar, içme suyu ve hava yolu ile girerler. İz elementler gibi bazı metaller (örneğin; bakır ve çinko) insan metabolizması için önemlidir. Bununla birlikte, yüksek konsantrasyonlarda toksik

olabilirler [17,18]. Biyolojik etkinliklere katılma derecelerine göre metaller, temelde yaşamsal olan ve yaşamsal olmayanlar olarak ayrılırlar. Yaşamsal olarak tanımlananların, organizma yapısında belirli bir derişimde bulunması gereklidir. Ayrıca bu metaller biyolojik tepkimelere katıldıklarından dolayı, düzenli olarak besinler yoluyla alınmalıdır. Örneğin demir, hayvanlarda ve insanlarda eritrositlerin ve birçok oksidasyon ve redüksiyon tepkimesinin vazgeçilmez katalizörüdür. Buna karşın, yaşamsal olmayan metaller çok düşük derişimlerde dahi biyolojik yapıyı etkileyerek sağlık problemlerine yol açabilir. Bir metalin yaşamsal olup olmadığı dikkate alınan organizmaya da bağlıdır. Örneğin nikel bitkilerde toksik etki gösterirken, hayvanlarda üreaz enziminin kofaktörü olarak iz düzeyde bulunması gereken bir elementtir [9]. Bu nedenle metaller (elementler) üç ana gruba ayrılır.

- A- Organizma için gerekli elementler, (Co, Cr, **Cu**, F, Fe, I, Mn, Se ve Zn gibi),
- B- Organizma için gerekli olabilen elementler (Ni, Si, Sn ve V gibi),
- C- Organizma için toksik elementler (As, Be, **Cd**, Hg, **Pb**, Si ve Sb gibi).

Metaller ve tuzları özellikle tarımsal ve endüstriyel aktivite artışına bağlı olarak çevresel kirleticilerin önemli bir grubunu oluşturmaktadır. Bunların ortak özellikleri ise toksik olmaları ve diğer kimyasal maddelere kıyasla hayvan dokularında birikebilmeleridir. Metaller, metal bileşikleri ve çeşitli mineraller göller, nehirler, körfez ve okyanuslar ile bunların sedimentlerinde geniş yayılım gösterirler. Bu mineraller doğal olarak o yapının bir parçası olmaları nedeniyle veya insan faaliyetleri sonucunda yoğun olarak açığa çıkıp, çeşitli şekillerde alıcı ortamlara taşınırlar (Şekil 1.1) [19,20]. Normal koşullarda metallerin doğadaki düzeyi düşüktür. Canlılarda çeşitli biyolojik işlevler ve enzimatik aktivite için gereksinim duyulan metallerin gerekliliği de oldukça düşük konsantrasyondadır. Doğal konsantrasyon düzeylerinin arttığı durumlarda, örneğin gümüş, civa, bakır, kadmiyum ve kurşun gibi metaller özellikle toksik etki yaparlar [21]. Gerek doğal gerekse insan kaynaklı faktörlerin etkisi ile sucul ortamdaki derişimi artan metaller, sucul organizmalar tarafından ortamdaki alınıp ve besin zinciri aracılığı ile üst trofik düzeylere artan derişimlerde iletilerek, metabolik bakımdan aktif doku ve organlarda birikmekte, hücresel veya moleküler düzeyde yapısal ve işlevsel bozukluklara hatta ölümlere neden olmaktadır [22,23].



Şekil 1.1. Metallerin ekosistemde yayılışı [24].

Çevreye insan faaliyetleri sonucu verilen birçok organik bileşik canlılar tarafından daha az toksik metabolitlere yıkılırken, metaller biyolojik olarak daha alt bileşenlere yıkılamaz, yapay olarak üretilemez ve yok edilemezler. Metaller, organizma tarafından alındıklarında veya organizmadaki derişimleri arttığıında bir tür stres proteini olan ve metalotiyonein (MT) olarak adlandırılan proteinlerin sentezi artar [25]. Canlıların metal detoksifikasyonu çoğunlukla, bu maddeleri metalotiyonein adı verilen özgül metal bağlayıcı proteinler ile bağlama veya çözünür olmayan formda hücreler arası granüller ve yağ dokuda uzun süreli saklama şeklindedir [24]. Bu nedenle su, hava ve besinler yolu ile canlılar tarafından alınan metaller, besin zincirinde biyolojik olarak yükseltgenmektedir. Biyolojik yükseltgenmenin bir sonucu olarak metaller, özellikle predatör türlerin böbrek ve karaciğerlerinde öldürücü düzeylere ulaşarak, canlılar ve ekosistem üzerinde yıkıcı etkilere yol açabilir [26].

1.1.2. Toksik Etkileri Değerlendirilen Metaller

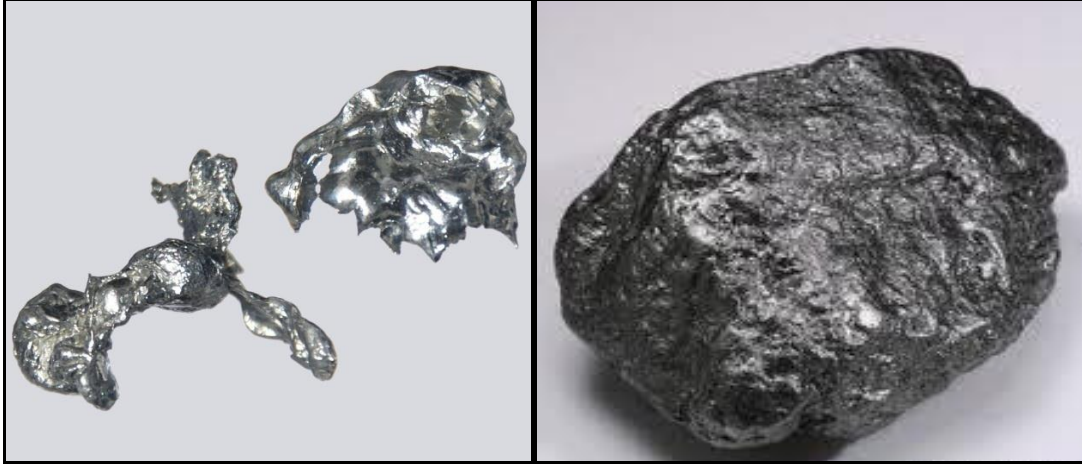
Kimyasal açıdan “ağır metal” terimi, yoğunluğu sudan beş kat daha yüksek olan metaller için kullanılmaktadır, ancak bazı metaller yoğunluk bakımından sudan belirtilen düzeyde ağır olmadıkları halde çevre kirliliğine neden olabilmektedir. Örneğin; alüminyumun yoğunluğu 2.7 g/cm^3 olmasına rağmen, bu metal göllerin asitleşmesine neden olmakta ve çözünür hale gelip fauna üzerinde toksik etkilere neden olabilmektedir. Bu nedenle çevre toksikolojisi açısından “ağır metal” terimi, çevre kirliliğine neden olan metaller için kullanılmaktadır [27]. Buna göre başlıca metaller; **Cd**, Hg, Zn, **Cu**, Ni, Cr, **Pb**, Co, V, Ti, Fe, Mn, Ag ve Sn'dir.

Metaller, kalıcı kirleticiler olarak nitelendirilmektedir ve bir organizmadan diğerine besin zinciri yoluyla geçerek yüksek yapıları organizmalarda birikme özelliğindedir. Özellikle kadmiyum, civa, kurşun ve krom gibi metaller besin zinciriyle girdikleri canlı bünyelerinde doğal fizyolojik mekanizmalarla atılamadıkları için birikime uğrarlar ve organizmada belirli derişimlerin üzerine çıkmaları durumunda toksik olup, alıcı ortamlardaki canlı yaşamı üzerinde derişimleri ile orantılı olarak toksik etki yaparlar [28].

Metaller, genel olarak organizmada normalde yer almadıkları biyokimyasal reaksiyonlarda yer alarak toksik etkilere neden olurlar. Metal sitotoksitesinin moleküler mekanizması; protein ve lipoproteinlere bağlanarak plazma membranlarına zarar verme, Na^+ - K^+ bağımlı ATPaz inhibisyonu, amino asit transportunun inhibisyonu, lipid peroksidasyonu, enzim inhibisyonu ve redükte glutatyonun azalmasını içermektedir [29].

1.1.2.1. Kadmiyum

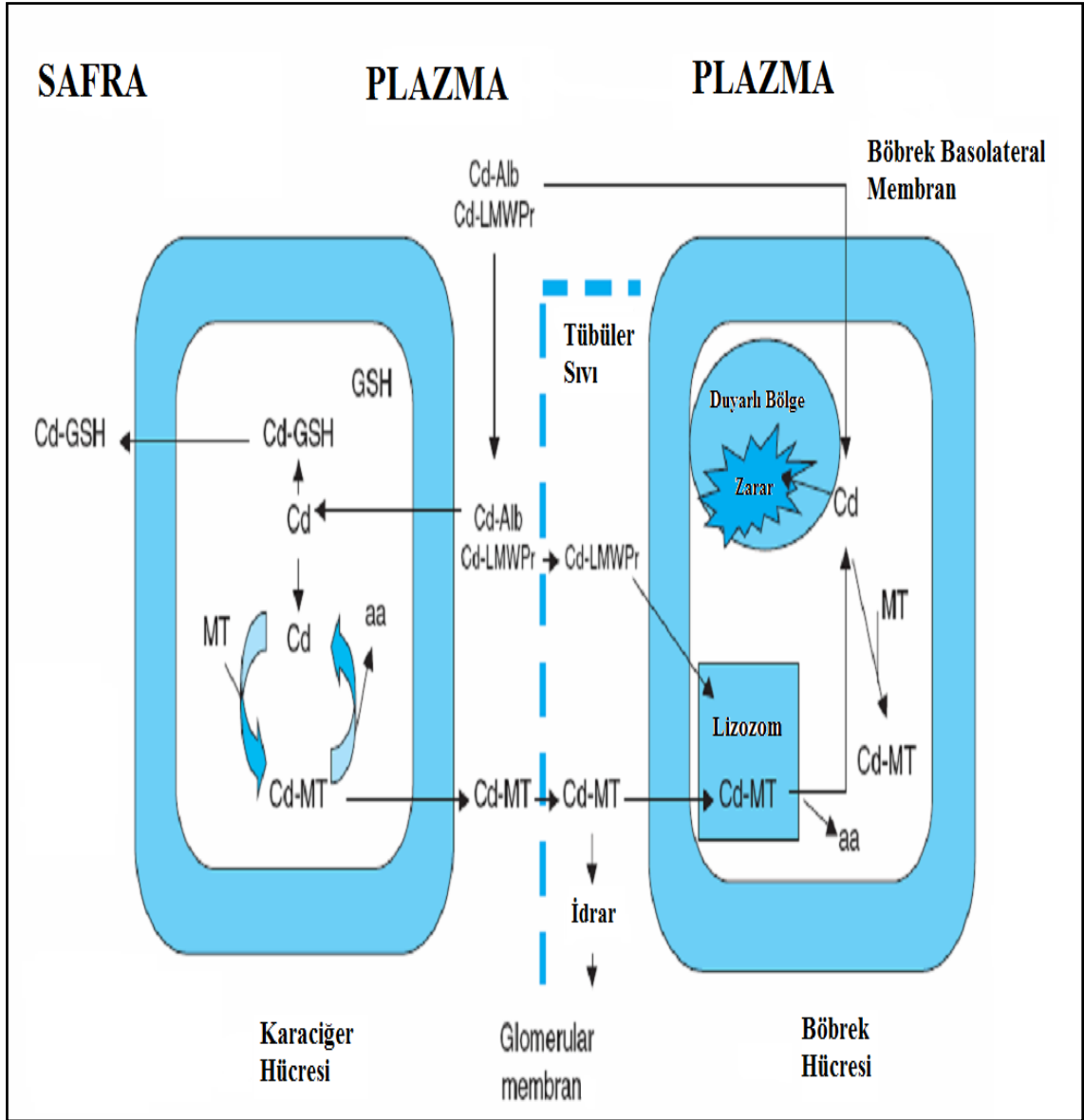
Kadmiyum (Lat: *Cadmia*) periyodik tabloda “Cd” sembolü ile ifade edilen, atom numarası 48, atom ağırlığı 112.411 g/mol olan ve cetvelde 2B grubunda bulunan bir elementtir. Nispeten nadir bulunan, yumuşak, bükülüp şekil verilebilen, mavimsi beyaz renkli, toksik bir geçiş metalidir [30,31]. Kadmiyum 1817'de Almanya'da Friedrich Strohmeyer tarafından çinko karbonat (kalamın) içerisinde keşfedilmiştir [32].



Kadmiyum, diğer metallere gore geç bir tarihte belirlendiği için modern toksik metal olarak kabul edilmektedir [33]. Doğada saf metal olarak bulunmaz, genellikle kadmiyum oksit, kadmiyum klorur, kadmiyum sulfat veya çinko ile bağlı olarak bulunur. Çinko ve kalsiyuma kimyasal olarak benzer. Toksisitesi ve biyolojik sistemlerce alınması su sertliğinden etkilenir [7].

Yuzyl başlarında toksikolojik yonden sorun yaratabileceği pek duşunlmeyen kadmiyum, son yıllarda endüstriyel kullanımına paralel olarak kurşun ve civa gibi ekotoksikolojik yonden önem kazanmış olan metallere biridir [34]. Kadmiyum geniş yayılım gösteren bir çevresel kirletici olup, çeşitli organlardaki toksisitesi ile karakterize olan bir metaldir [35]. Kadmiyumun ekosistemlere başlıca giriş yolu madencilik ve endüstriyel kullanım gibi kaynaklardır. İnsanlar genelde besinler, sigara ve alkol kullanımı ile maruz kalır [36]. Genellikle inko, bakır, kurşun gibi bazı minerallerin üretiminde bir alt ürün olarak çevreye yayılan bu metal, çeşitli endüstri kollarında da giderek artan miktarlarda kullanılmaktadır. Öte yandan, fosfatlı gübreler de önemli miktarda kadmiyum içermektedir. Amerika Birleşik Devletleri evre Koruma Kurumu (USEPA) ve Avrupa Birliği (AB) mevzuatının kadmiyum için içme sularında kabul ettiği kirletici düzeyi 0.005 mg/L iken, Dünya Sağlık rgtne (DSÖ) göre kabul edilen değer ise 0.003 mg/L'dir [37,38].

Kadmiyum teratojenik ve karsinojenik etkileri olan toksik bir metal olarak kabul edilir. Endüstriyel kirlenme sonucu açığa çıkan ve ortama karışan kadmiyum dolaşım sistemi hastalıkları, kanser ve boşaltım sistemi hastalıkları gibi insan sağlığı açısından önemli hastalıklara da sebep olur [39,40]. Özellikle de, karaciğer ve böbrekte biriken bir metaldir (şekil 1.2) [41].



Şekil 1.2. Kadmiyum taşınımı, protein bağlanması ve toksisitesi [24].

1.1.2.2. Kurşun

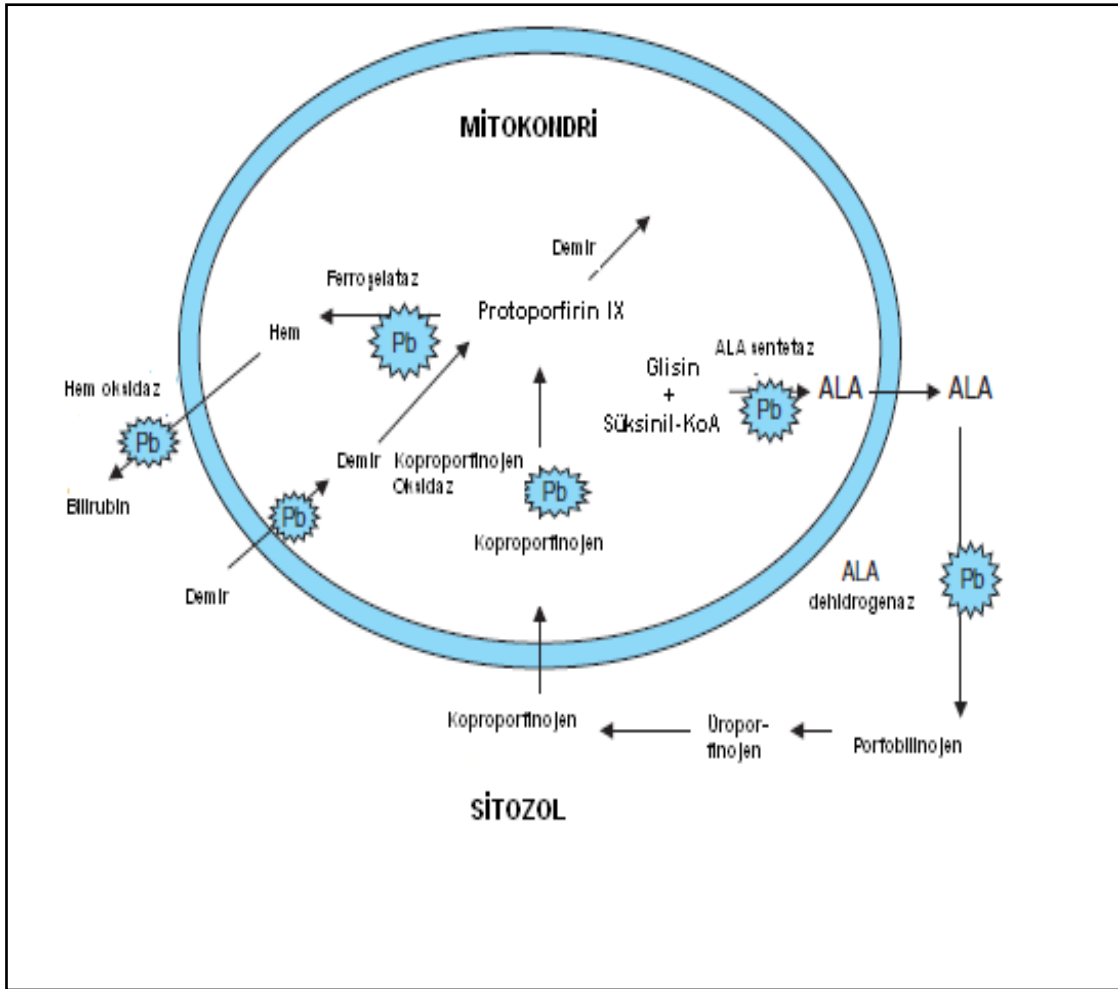
Kurşun (Lat: *Plumbum*) periyodik tabloda “Pb” sembolü ile ifade edilen, atom numarası 82, atom ağırlığı 207.2 g/mol olan bir elementtir [42]. Kurşun yumuşak, oldukça yoğun, zehirleyici, kolay dövülebilen bir yeraltı minerali olup, yeni kesildiğinde mavimsi beyaz, ancak zamanla havada oksitlenmesi sonucu gümüş/mat gri renkli hale gelmektedir [43].



Kurşun, Roma öncesi dönemde de madenciligi yapılan bir elementtir [7]. Kurşun, fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı benzin içeriğinde, akülerde, lehimlemede, boyalarda, metal borularda, seramiklerde bulunmakla birlikte, kalafatlama ve diğer birçok uygulamada yaygın ve uzun süreli kullanıldığı için her yerde bulunabilmektedir [8,40]. Günümüzde aktif olarak maden çıkarılan maden ocaklarından ve terk edilmiş ocakların akıntılarında kurşun salınımı devam etmektedir. Kurşun içermeyen yakıtların kullanımındaki artış çevreye, özellikle de atmosfere motorlu taşıtlardan salınan kurşun miktarlarında önemli düzeyde azalmaya neden olmuştur. Birçok ülkede yapılan yasal düzenlemeler, geçen yüzyılın ilk dönemlerinde yüksek oranda kullanılarak, büyük oranda çevresel kirliliğe neden olan, kurşun içerikli boyaların kullanımını azaltmıştır [7].

Kurşun günümüzde hem antropojenik hem de doğal kaynaklardan devamlı olarak çevreye giren önemli bir kirleticidir. Her yıl büyük miktarlarda çevreye girmekte ve canlılar için önemli bir tehdit oluşturmaktadır [44]. Aynı zamanda kurşun, çevremizde ve birçok üründe yıllardır kullanılan toksik bir metal olup davranışsal problemler, felç ve ölüm gibi birçok sağlık sorununa neden olabilmektedir [45]. Sucul canlıların sürekli olarak metallerin düşük konsantrasyonlarına maruz kalmaları sonucu biyolojik birikim ve besin zinciri aracılığı ile taşınmasından dolayı kurşun gibi canlı için gerekli olmayan metaller canlılar için oldukça toksiktir [3]. DSÖ ve AB mevzuatına göre kurşun için içme sularında kabul edilebilir sınır değeri 0.01 mg/L'dir [37,38].

Kurşunun en iyi bilenen toksik etkilerinden biri *hem* biyosentezini engellemesidir [46]. Kurşun *hem* biyosentezinde gerekli olan enzimlerin aktif yerleri için yarışır. Bunun sonucunda kanda ve idrarda *hem* öncüllerinin anormal konsantrasyonları ortaya çıkar. Kurşun zehirlenmesinin tanısında bu bulgular kullanılmaktadır. Kurşun *hem* biyosentezindeki etkisini şekil 1.3’de gösterilen enzimleri inhibe ederek göstermektedir. Kurşun ile etkilenen bu mekanizmada delta-aminolevünilik asit ve koproporfirinojen III idrar ile atılırken, protoporfirin IX eritrositlerde birikir. Kurşun Na^+/K^+ -ATPaz pompasını ve eritrositlerin zar yapısını bozarak, eritrositlerin yaşam sürelerini kısaltmaktadır [47].



Şekil 1.3. Kurşun’un *hem* biyosentezi üzerine etkisi [24].

1.1.2.3. Bakır

Bakır (Lat. *Cuprum*) periyodik tabloda “Cu” sembolü ile ifade edilen, atom numarası 29, atom kütlesi 63.546 g/mol olan bir elementtir [48].

Doğada diğer metallere kıyasla daha yaygın olarak bulunan bir elementtir. Bakır aynı zamanda çok sayıda biyolojik reaksiyon ve süreçte gereklidir. Literatür verilerine göre civa ve kadmiyum ile karşılaştırıldığında düşük toksisiteye sahiptir. Algisit, fungusit ve insektisit olarak yaygın kullanılan bir element olduğundan, çevrede sıklıkla kullanılan ve asit madeni atıklarında bulunan genel bileşenlerden biridir [7,49]. Yüksek konsantrasyonlarda toksiktir, ancak çözeltilerdeki organik maddelerle kolayca kompleks oluşturduğundan, biyolojik olarak alınma oranının nispeten daha az olduğu rapor edilmektedir [7].



Önemli bir metalloenzim bileşeni olan Cu^{+2} lizil oksidaz, askorbik asit oksidaz, sitokrom oksidaz, monoamin oksidaz, superoksit dismutaz enzimlerinin prostetik grubudur ve dolayısıyla tüm ökaryotik hücrelerin solunumları için gerekli bir elementtir. Omurgalıların kan plazmasında bulunan seruloplazmin, beyinde bulunan serebrokuproin, karaciğerde hepatokuproin ve eklem bacaklılarda solunum pigmenti olan hemosiyanin bakır içeren proteinlerdir. Cu^{+2} 'ın gösterdiği redoks özellik hücresel solunum, serbest radikal savunması ve hücresel demir metabolizması için gereklidir [50,51].

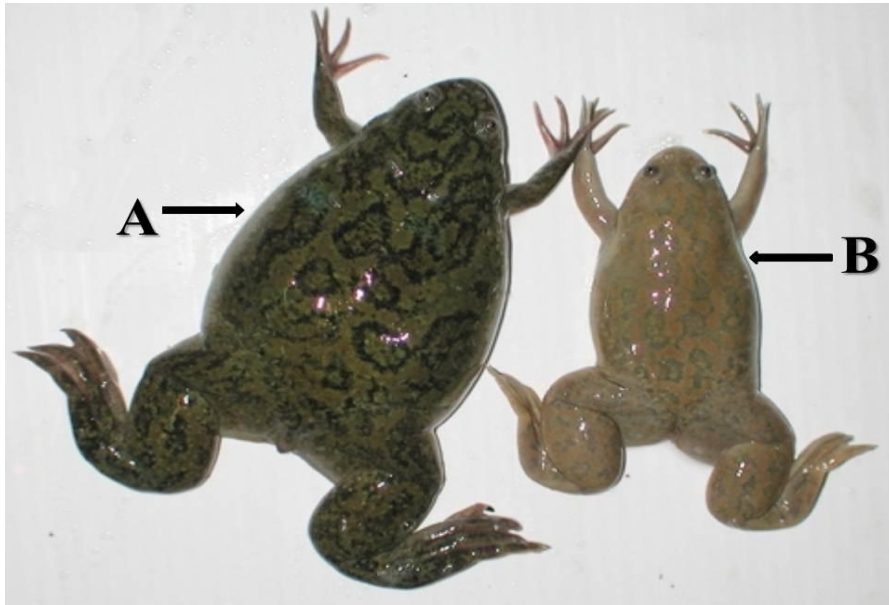
Bu metalin balıklarda oksidatif stresi indükleyerek yüksek reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu teşvik ettiği, lipid zarları ve DNA bütünlüğünü bozarak nekrotik ve apoptik hücre ölümlerine yol açtığı belirlenmiştir. Aynı zamanda balıklarda ozmoregülasyonu ve endokrin fonksiyonları bozduğu bilinmektedir [52]. Cd ile karşılaştırıldığında Cu'nun besin yoluyla toksik etkisinin daha az olduğu belirlenmiştir.

Bu durum Cu'nun metalotiyoneinler aracılığıyla biyokimyasal olarak düzenlenişi ile açıklanmaktadır [49].

Cu sucul ekosistemlerde yaygın olarak bulunan, konsantrasyonu 0.04-294 µg/L aralığında değişen ve ekstrem koşullarda düzeyi 20 mg/L'ye ulaşabilen bir metaldir [52]. EPA'nın bakır için içme sularında kabul ettiği kirletici düzeyi 1.3 mg/L'dir. DSÖ ve AB mevzuatına göre ise kabul edilen değer 2 mg/L'dir [37,38].

1.2. *Xenopus laevis*

Afrika tırnaklı kurbağası olarak bilinen *Xenopus* ilk kez 1803 yılında Fransız doğa bilimci Daudin tarafından keşfedilmiştir (Şekil 1.4). Bu hayvana garip ayak anlamına gelen *Xenopus* adı ilk kez Wagler tarafından verilmiş, yaygın bir şekilde kullanımı ise bu hayvanı ilk kez doğal ortamında inceleyen Leslie tarafından yapılmıştır. *Xenopus*'a genellikle Güney Afrika tırnaklı kara kurbağası adı verilmesine rağmen deri yapısından dolayı su kurbağasına, çiftleşme özelliğinden dolayı da kara kurbağasına benzetilmektedir [53]. *Xenopus*'da yumurtlama ve iribaş oluşumu ilk kez Beddard tarafından gözlemlenmiş, anatomisi ile ilgili ilk ayrıntılı inceleme ise Dreyer tarafından yapılmıştır [54,55]. *X. laevis*, biyolojisi iyi bilinen ve dünyanın her yerinde laboratuvar koşullarına iyi adapte olmuş bir amfibi türüdür. Genellikle embriyoları ve iribaşları, teratojenite ve gelişimsel toksikoloji çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir test organizmasıdır [56].



Şekil 1.4. Dişi (A) ve erkek (B) ergin yabancı tip *Xenopus laevis* türü kurbağalar.

1.2.1. *Xenopus laevis*'in Morfolojisi ve Anatomisi

X. laevis'in vücudu diğer kurbağa türlerine göre dorsa-ventral yassı olup, gövdesi başına göre oldukça geniştir. Kısa olan ön ayaklar ile zarla bağlı uzun parmaklar taşıyan uzun arka bacaklar kara kurbağalarında olduğu gibi gövdenin altına doğru değil yanlara doğru bir açılım göstermektedir. Vücutlarının bu şekli ve duruşu karada yürüme yerine suda yüzmeye elverişli hale getirmektedir [57]. Ön ayaklar hareket veya vücudun desteklenmesinden çok beslenme esnasında besinin alınabilmesi için gereken hareketleri gerçekleştirmektedir [58]. *X. laevis*'in baş bölgesi de gövdesi gibi yassı olup gözler karada yaşayan diğer kurbağalara oranla daha küçük ve daha az belirgindir. Vücutlarının sırt tarafı yeşilimsi gri renkli iken karın tarafı sarımsı beyaz renktedir. Erkek ve dişilerin renkleri birbirlerine benzemekle beraber, dişiler erkeklerden daha büyüktür ve kloaklarında papillalar bulunur [57]. *Xenopus*'da kara kurbağalarında olduğu gibi dıştan görülebilen bir kulak zarı bulunmaz. Kulak zarının hava aracılığıyla gelen ince sesleri almak için özelleşmiş bir organ olması ve yaşamını tümüyle suda geçiren omurgalılarda bulunmaması nedeniyle ilkel bir karakteristik olarak kabul edilmektedir. Lateral çizgi organları diğer anuralardan (kuyruksuz kurbağa) farklı olarak *X. laevis*'de metamorfoz esnasında kaybolmamakta ve erişkin yaşam boyunca da kalmaktadır. Bu kurbağalarda su içerisindeki hareketlilik lateral çizgi organları tarafından algılanmaktadır. *Xenopus*'da akciğerlerin vücut büyüklüğüne oranı diğer amfibilere göre çok daha büyüktür. Akciğerler, larvanın dalacağı su derinliğinin düzenlenmesinde yardımcı olmak için larva yumurtadan çıkar çıkmaz gelişmeye başlamaktadır [58].

1.2.2. *Xenopus laevis*'in Sistematığı

Xenopus cinsinin coğrafik dağılımı Sahra'nın Güneyinde tüm Afrika olup, 6 türü 7 alt türü vardır [58].

Xenopus laevis' in sistematığı şöyledir;

Regnum : Animalia
Filum : Chordata
Subfilum : Vertebrata
Superclass : Tetrapoda
Class : Amphibia

Ordo : Anura
Familiya : Pipidae
Subfamiya : Xenopodinae
Genus : *Xenopus*
Species : *Xenopus laevis*

1.2.3. *Xenopus laevis*'in Beslenmesi ve Bakımı

X. laevis laboratuvar ortamına iyi adapte edilmiş bir türdür. Tüm dünyada çeşitli laboratuvar çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir omurgalı modeldir [53]. Amfibi embriyolarının erken evrelerinde bol miktarda bulunan yolk, gelişimin önemli bir bölümünde canlı için gerekli tüm besinleri içerir. Larvalar yumurtadan çıktıktan sonra embriyonik bağırsak ile kalça ektodermi arasında bulunan bu yolku kullanarak günlerce yaşamlarını sürdürebilirler [59].

Anuralarda 25. evreye kadar beslenme ihtiyacı görülmez ancak daha ileri evrelerde anuraların en uygun besini az kaynatılmış ıspanak ve maruldur [60,61]. *X. laevis* larvaları için pişirilmiş, kurutulmuş ve ince toz haline getirilmiş sığır ciğeri, yeşil sebzelere ve alglere ek olarak kullanılacak besin takviyesidir. Kullanılan diğer besinler arasında toz halinde yumurta sarısı, kurutulup toz haline getirilmiş unla karıştırılmış bakto-beef ekstresi, kıyılmış çiğ karaciğer, alglar ve protozoanlar vardır [53]. Metamorfoz sonrası sindirim kanalı değişikliğe uğradığı için gereksinim duydukları besinlerin türü de değişim gösterir. Bira mayası ve balık yağına daldırılmış balık eti, memeli ve tavuk karaciğeri yeni metamorfozdan çıkmış kurbağalar için ideal besinlerdir [54]. Genel olarak hızla gelişen postmetamorfik hayvanların iyi beslenmeleri gereklidir. Yetersiz beslenen hayvanlar, cinsel olgunluğa erişmeler dahi vücut büyüklükleri geri kalır. İskelet anomalilerini ve kemik yumuşamasını engellemek için yavru ve ergin hayvanlara düzenli olarak besinlerine eklenmiş D vitamini ve kalsiyum takviyesi yapılmalıdır [53].

Laboratuvarda *X. laevis* için ideal su sıcaklığı 20-23°C ve ortam sıcaklığı ise 21-23°C arasında olmalıdır. Daha yüksek sıcaklıklar bireylerin yeterince beslenememesine, metabolizmanın bozulmasına ve bağışıklık sisteminin baskılanmasına neden olabilir. Bundan dolayı hem ortam sıcaklığının, hem de su

sıcaklığının mümkün olduğunca sabit tutulması ve $\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık değişimlerini aşmamasına dikkat edilmelidir [54].

Normal amfibi gelişimi için ışığın gerektiğini gösterir çok fazla bilgi yoktur. Ancak doğada yaşayan larvalar gıdalarını alglerden sağladıkları için ve alg gelişimi için ışığa ihtiyaç duyulduğundan dolayı normal ışık sağlanmalıdır [53].

Laboratuvarımızda yetiştirilen *X. laevis* türü erişkin kurbağalar haftada iki kez kıyılmış tavuk karaciğeri ile beslenmektedir. Besleme yapıldıktan yaklaşık 30 dakika sonra akvaryumların suları boşaltılıp temizlendikten sonra daha önceden dinlendirilmiş olan su akvaryumlara yeterli düzeyde doldurulmaktadır. Ayrıca laboratuvarımızdaki kurbağalar sürekli olarak $23^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta ve 12:12 saat aydınlık:karanlık ışık periyodunda barındırılmaktadır.

1.2.4. *Xenopus laevis*'in Üremesi, Embriyo ve Larva Gelişimi

X. laevis cinsel olgunluğa yaklaşık iki yaşında erişir ve dişi bireyler tek bir yumurtlamada binlerce yumurta dökebilir ancak bu yumurtaların tamamı döllenmez. Sağlıklı bir yumurta 1.5 mm çapta olup jel kılıfla beraber 3 mm kadardır [53]. Ovaryumların gelişmesi ve ovaryumdan hormon salınmasının devamlılığı hipofiz bezi tarafından sağlanan uyarılmayla kontrol edilmektedir. Laboratuvar ortamında tutulan hem dişi hem de erkek bireylerde ticari gonadotropin hormonunun etkili olduğu bilinmektedir [4,58].

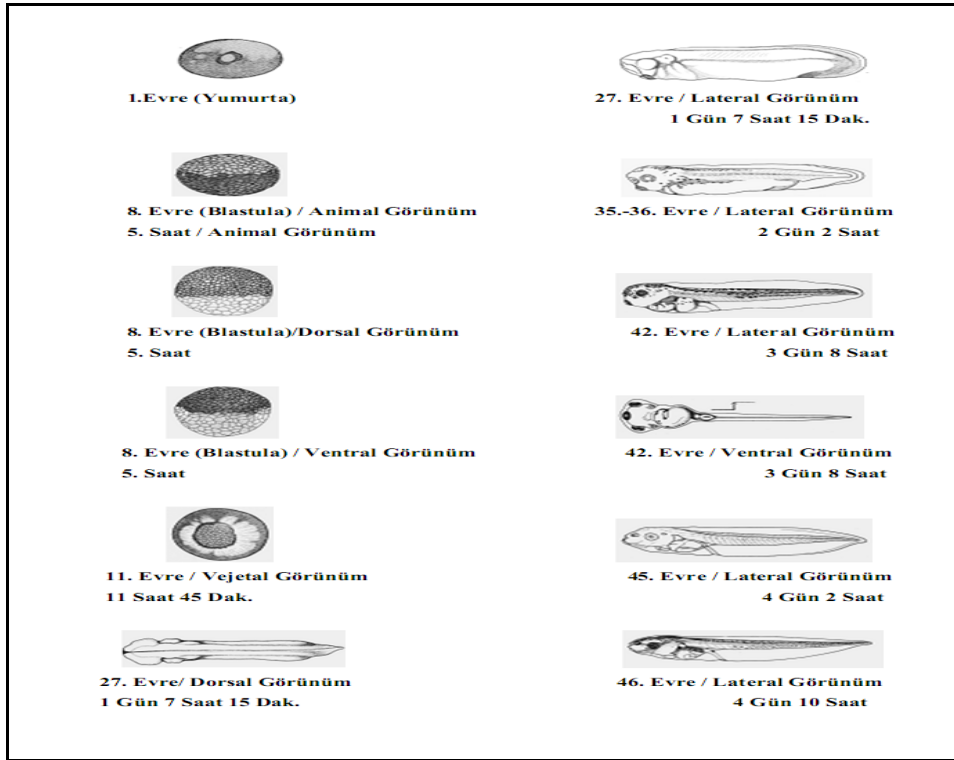
Araştırmalara göre, *X. laevis* dişileri yumurtalıklarındaki tüm yumurtaları tek bir döllenme periyodunda dökmezler, fakat çiftleşmeden sonra yumurtalıklar yavaş yavaş geriler ve ovaryumlarda meydana gelen mevsimsel değişiklik hipofiz hormonları tarafından yönetilir. Üreme mevsiminde erkek *X. laevis*'de en belirgin özellik çiftleşme sırasında dişinin kavranmasında rol oynayan ön kolların iç yüzeyinde siyah ve yapışkan kılların belirmesidir. Bu kılların görülmesi testiste sperm üretildiğinin bir işaretidir. Çiftleşmeye hazır erkek *X. laevis*'in dişiyi önkolları ile kavrama eğilimi bütünüyle refleks bir yanıtır (Şekil 1.5) [4,58].

Laboratuvar koşullarında, *X. laevis* dişileri aylarca üreme düzeyinde tutulabilmektedir. Yumurtlama ve spermatogenez, erkek ve dişiye dorsal lenf bezlerinden uygulanan gonadotropik hormon enjeksiyonu ile indüklenebilir [62,63].



Şekil 1.5. Üreme davranışı gösteren erkek ve dişi *Xenopus laevis* türü kurbağalar.

X. laevis larvası yumurtadan ilk çıktığı zaman yaklaşık olarak 4 mm boyunda ve 1 mm enindedir. Yumurtadan çıktıktan sonraki 2 ile 7. günler arasında (45-49. evre) bulunan larvaya iribaşın 1. formu; 7. günden itibaren başlayan aktif beslenmeden yaklaşık 35. günde görülen arka bacak tomurcuklarının belirmesine (49-56. evre) kadar olan dönemdeki larvaya iribaşın 2. formu; 5 ile 10. haftalar arasında bulunan larvaya da (56-60+ evreler) iribaşın 3. formu denir [58]. Şekil 1.6 'da *X. laevis*'in 46. evreye kadar olan bazı metamorfoz evreleri gösterilmiştir.



Şekil 1.6. *Xenopus laevis*'in bazı metamorfoz evreleri [64].

1.3. Toksisitenin Değerlendirilmesinde Kullanılan Biyobelirteçler

Biyobelirteçlerin, kirleticilerin ve çevresel stresin organizmalara etkilerinin izlenmesinde önemli araçlar olduğu kabul edilmektedir [65,66]. Shugart vd. [67]'e göre biyobelirteç “biyolojik bir sistemde ya da örnekte ölçülebilen hücresel, biyokimyasal, fizyolojik fonksiyon ya da yapılarda ksenobiyotiklerce indüklenen bir değişimdir”.

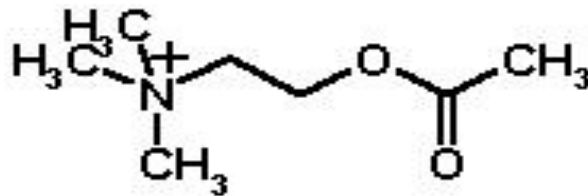
1.3.1. Enzimatik Biyobelirteçler

1.3.1.1. Asetilkolinesteraz

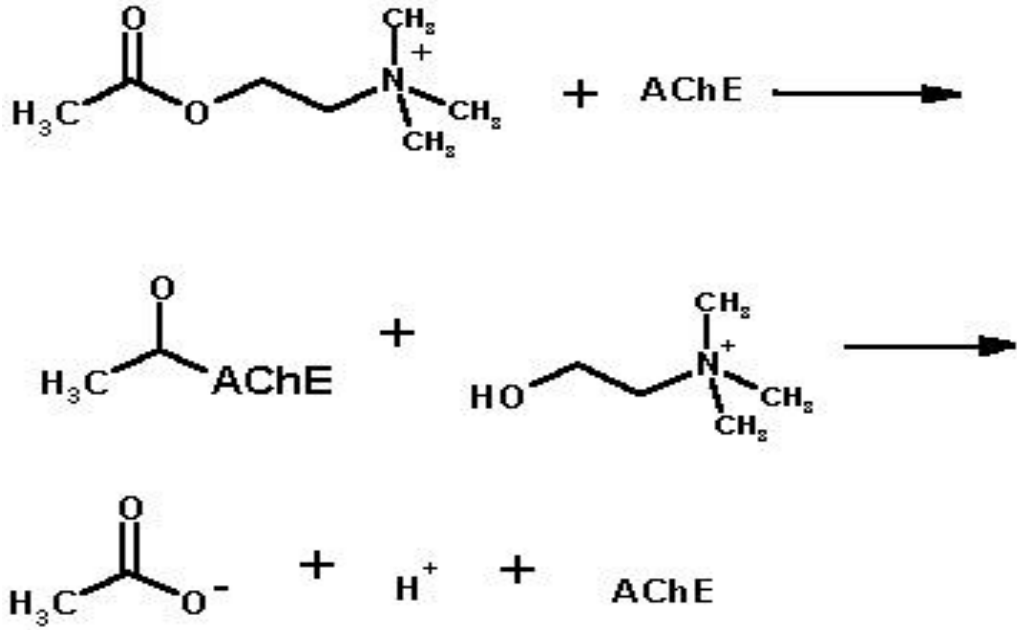
Kolinesterazlar (ChE), kolin esterlerinin hidrolizini katalizleyen bir enzim grubu olup, temel olarak kolinerjik nörotransmisyonla ilgili serin hidrolazların bir sınıfındadır. Bu enzimler büyük oranda omurgalılarda ve böceklerde çalışılmaktadır. Ancak, yumuşakçalarla da yapılan birkaç çalışma vardır [68]. ChE'lerin bilinen iki tipi vardır. Bunlardan ilki, asetilkoline ilgisi olan asetilkolinesteraz (AChE), ikincisinde bütirilkoline ilgisi olan bütirilkolinesterazdır (BChE). BChE'ler ayrıca, özgül olmayan esteraz veya pseudokolinesterazlar olarak da bilinirler [69].

Asetilkolinesteraz (AChE, EC 3.1.1.7), asetilkolin bağımlı nörotransmisyonda önemli bir rol oynayan özgül bir esterazdır ve nöral transmisyonu sonlandırmadaki önemli fizyolojik fonksiyonları nedeniyle AChE çeşitli kolinerjik toksinler için bir hedeftir [70,71].

Asetilkolin (ACh) merkezi sinir sisteminde, birkaç rolü olan klasik bir nörotransmitterdir. Asetilkolin serbest kaldıktan sonra, tip B karboksilesterazlar ailesine dahil olan ve asetilkolini (Şekil 1.7), kolin ve asetik asite hidrolizleyen asetilkolinesteraz tarafından sinaptik boşluktan hızlı bir şekilde uzaklaştırılır (Şekil 1.8).

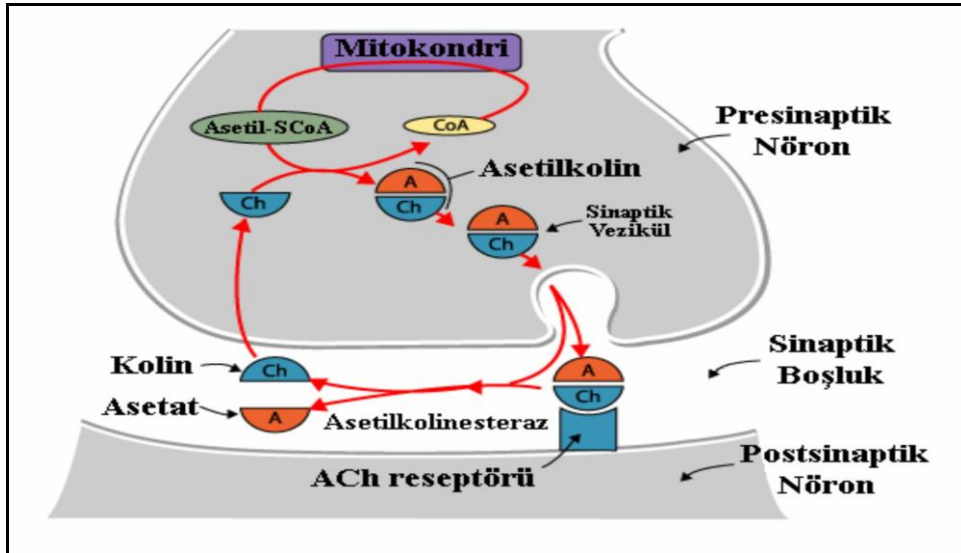


Şekil 1.7. Asetilkolin'in genel kimyasal yapısı.



Şekil 1.8. Asetilkolin ve asetilkolinesteraz arasındaki hidroliz reaksiyonu.

Sinir impulslarının iletimi sırasında ACh, kolinerjik reseptörler olan nikotinik reseptörler veya muskarinik reseptörler gibi bir ya da iki genel reseptöre bağlanır. Nöromusküler sinapslarda ACh'nin nikotinik reseptöre bağlanması uyarma ve kas kasılması ile sonuçlanır. AChE postsinaptik membrana bağlanarak ACh'nin bağlantısını keser ve böylece kolinerjik nöral transmisyon sona erer [72].



Şekil 1.9. İmpuls iletimi ve AChE'nin impuls iletimini sonlandırma mekanizması [66].

AChE'in inhibisyonu, sucul ekosistemler üzerine antropojenik kirleticilerin özellikle de OP ve karbamatlı pestisitler gibi kirleticilerin etkilerinin izlenmesinde duyarlı ve kullanışlı bir biyobelirteç olarak yaygın bir şekilde kullanılırken, AChE aktivitesindeki değişimlerde metaller ve organik ksenobiyotikler gibi diğer kirleticilere maruz kalmaya dayandırılmaktadır [66,73]. AChE inhibisyonu, enzimin aktif merkezindeki serin ile OP bileşiğin reaksiyonu sonucu ortaya çıkar. Bu inhibisyon çok düşük konsantrasyonlarda ortaya çıkar ve fosforillenen enzimin yeniden aktivasyonunun sağlanması çok düşük düzeyde gerçekleşir [74]. OP'lere maruz kalma sonrası gerçekleşen inhibisyondan sonra, AChE aktivasyonunun geri dönüşü büyük oranda enzimin *de novo* sentezine bağlıdır [75]. Enzimin inhibisyonu, sinir sisteminde asetilkolin miktarının artmasına neden olur. Böylece sinir impulslarının sürekli transmisyonu, tetani ve sıklıkla solunum bozuklukları ve nihayetinde ölümlerle sonuçlanabilir [76].

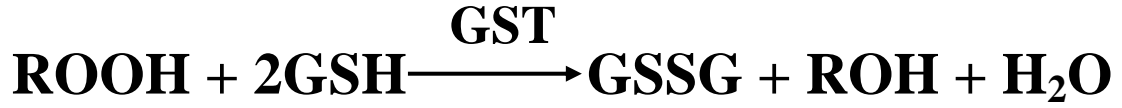
OP ve karbamatlı pestisitlere ek olarak, diğer bazı pestisitler, metaller ve deterjanlar gibi çevresel kirleticilere maruz kalan organizmalarda da AChE aktivitesinin inhibisyona uğradığı rapor edilmiştir [77]. Cd toksisitesi üzerine yapılan bazı çalışmalarda, Cd'a maruz bırakılmış hem hayvan hem de insanlarda AChE aktivitesindeki inhibisyon veya indüksiyondan dolayı kolinerjik nörotransmisyon ve davranışsal bozukluklar arasında bir ilişki olduğu saptanmıştır [78].

1.3.1.2. Glutasyon S-transferaz

Glutasyon S-transferaz (GST, EC 2.5.1.18), faz II biyotransformasyon enzimidir. Reaktif oksijen metabolizmasına karşı hücrelerin korunmasından sorumludur. Çoğu ksenobiyotiğin toksisitesi GST indüksiyonu ile belirlenebilir. GST, redükte glutasyon (GSH) ile elektrofilik bileşiklerin konjugasyonunu katalizleyen sitozolik bir enzimdir. GST'nin, prostaglandinlerin ve lökotrienlerin biyosentezi ve hücre içi taşımadaki önemli fonksiyonlarının dışında, oksidatif hasara, DNA'nın ve lipidlerin peroksidatif ürünlerine karşı savunmada da kritik bir rolü vardır [69].

GST gibi faz II biyotransformasyon enzimleri, faz I metabolizmasının ürünlerinin büyük, polar, suda-çözünür gruplarına atak yaparak eliminasyonlarını sağlarlar. Özellikle sitokrom P450 tarafından üretilen ara ürünleri çeşitli makromoleküllere bağlayarak ya da glutasyon ile reaksiyona sokarak detoksifikasyonu sağlarlar [69,79]. GST'nin substratları olan kimyasal maddeler üç genel özelliğe

sahiptirler. Bunlar; hidrofobiktirler, bir elektrofilik atom içerirler ve GSH ile ölçülebilir oranda enzimatik olmayan reaksiyona girerler [69].



Bu enzim aslında sitozolik olmasına rağmen, membranda bağlı formlarının bulunduğu da bilinmektedir [80]. Ergin *X. laevis* karaciğerinde aynı özellikleri taşıyan; mu, alfa ve sigma sınıfına ait üç alt ünitesinin bulunduğu ve bu izozimlerin sucul çevreden karasal ortama geçişi kuvvetle desteklediği bildirilmektedir [81]. GST ile ilişkili olarak, GST proteinleri 2 süper gen ailesi içerir. Sitozolik enzim 16 gen ailesi ile mikrozomal enzim en az 6 gen ailesi ile temsil edilmektedir. Bu iki GST ailesinin oksidatif strese ve toksik kimyasallara karşı hücrel korunmada önemli bir rolü olduğuna inanılmaktadır [82,83].

1.3.1.3. Karboksilesteraz

Lipolitik enzimler iki büyük sınıfı kapsarlar; bunlar, ester içeren molekülleri katalizleyen karboksilesterazlar ve triaçilgliserollerin hidrolizini katalizleyen lipazlardır. Bu enzimler hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda yaygın bir şekilde bulunur [84].

Karboksilesteraz (CaE, EC 3.1.1.1) esterlerin, amidlerin ve tioesterlerin hidrolizini katalizleyen esterazların serin hidrolazlar süper ailesinin üyesidir [85]. Pestisitler için alternatif fosforilizasyon alanları olduklarından dolayı CaE'lerin veya B-esterazların inhibisyonu, kolinesterazlardan daha hızlıdır. Karboksilesterazın bir organofosfat toksisite tampon enzimi olduğu düşünüldüğünde, kolinesterazlar rekabet açısından CaE tarafından korunmuş olabilirler. Bu nedenle CaE, pestisit maruziyetine karşı kolinesterazlardan daha duyarlı bir biyobelirteç olarak kullanılabilir [86].

Memeli karboksilesterazları, birçok dokuda hücrenin endoplazmik retikulumunda lokalize olmuştur. Hayvanların çeşitli dokuları arasında, en yüksek substrat hidroliz aktivitesi tipik olarak karaciğerde bulunmuştur. Fakat testis, böbrek ve plazma gibi bazı dokularda da aktivite gözlenmiştir. Çok çeşitli ilaçlar CaE tarafından metabolize edildiği için, bu enzimlerin her bir dokuda değişen aktiviteleri klinik açıdan

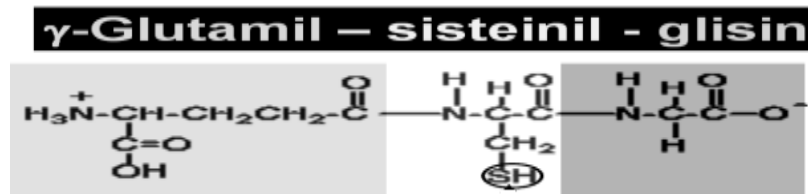
da önemlidir. Bununla birlikte insanların CaE izoenzimlerinin hidrolitik kabiliyetleri ve yapılarındaki farklılıklar hakkında çok az şey bilinmektedir. İnsan karaciğerinde hCaE-1 ve hCaE-2 olarak adlandırılan iki önemli karboksilesteraz tanımlanmıştır [85,87].

Son zamanlarda, lipazlar ve esterazlar gibi enzimler ucuz ve çevreci işlemlerde hidroliz ve esterifikasyon yeteneklerinden dolayı, kiral ilaçların üretiminde potansiyel kullanımlarına dikkat çekilmektedir [88].

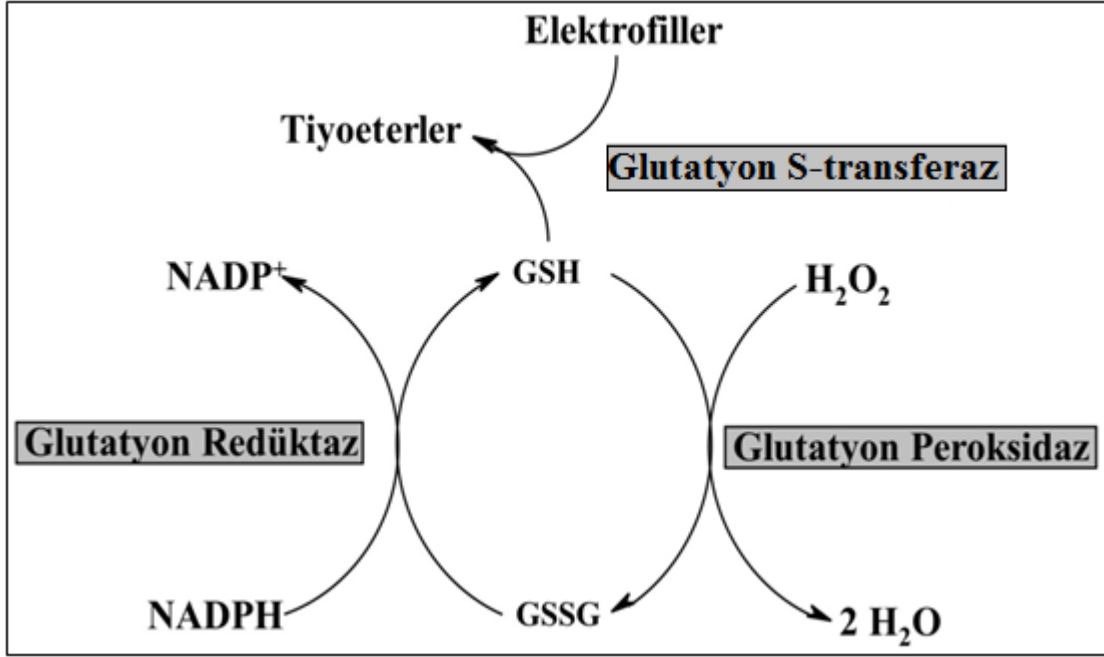
1.3.1.4. Glutasyon Redüktaz

Glutasyon redüktaz (GR, EC 1.6.4.2) oksidatif stres koşullarında, GSH/GSSG homeostazisinin sağlanmasındaki rolü nedeniyle önemli bir enzimdir. GR, NADPH varlığında glutasyonun okside disülfit formunun (GSSG), redükte forma (GSH) dönüşmesini katalizler [89]. Organizmalarda GR aktivitesinin saptanmasının oksidatif stresin iyi bir belirteci olabileceği düşünülmektedir, ancak bu enzim süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzimleri gibi antioksidan savunma sisteminde doğrudan yer almaz [90,91].

GSH, çevredeki oksidan moleküllerin etkisini kendi üzerine çekerek hücrenin fonksiyonel proteinlerinin oksidasyonunu engelleyen bir tripeptittir. Aynı zamanda oksijen radikallerinin biyolojik moleküllere saldırması sonucunda meydana gelen peroksitleri ortadan kaldırmak için bazı peroksidaz enzimleri tarafından da kofaktör olarak kullanılmaktadır. Bunun sonucunda kendisi oksitlenerek okside glutatyon dönüşmekte ve oluşan bu okside glutatyonun da redükte glutatyon haline dönüşümü GR enzimi tarafından katalizlenmektedir (Şekil 1.11). GR, oksidasyon/redüksiyon tepkimelerinde önemli bir redükleyici role sahip olan GSH'nin hücre içi düzeyi azalınca aktive olmakta ve organizmadaki sınırlı olan GSH deposunu tamamlanmaktadır [92,93].



Şekil 1.10. Bir tripeptid olan glutasyonun açık formülü [94].



Şekil 1.11. Glutatyon redüktazın GSH metabolizmasındaki yeri [66].

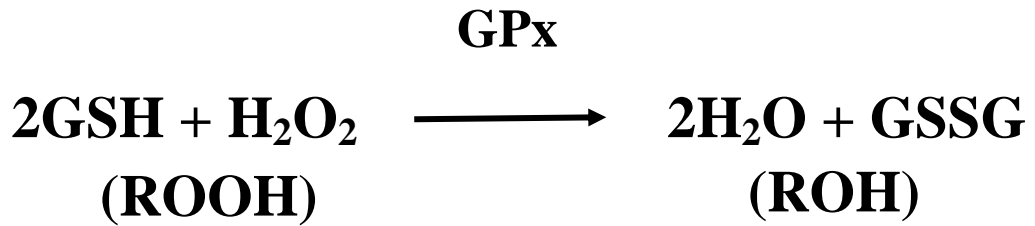
Aerobik hücrelerde, normal metabolizma esnasında özellikle mitokondriyal membranlarda oksidatif metabolizmanın bir sonucu olarak reaktif oksijen türleri (ROS) üretilir. Bu ara ürünler oksidatif strese neden olarak hücreye zarar verebilirler. Hücresel yapılar ve hücre işlevleri oksidatif hasarın potansiyel hedefleridir. Bu oksidasyonun en hassas substratları, kolayca lipid peroksidasyonuna uğrayan hücre membranlarındaki doymamış yağ asitleridir. Bu olay, kas yıkımına, sinir sisteminin zayıflamasına, hücresel metabolizmanın genel olarak bozulmasına ve sonuçta hücre ölümüne neden olabilir [95]. ROS bileşiklerin detoksifikasyonunda GSH iki şekilde yer alır: 1- GSH süperoksit radikal anyonu, nitrik oksit veya hidroksil radikali gibi serbest radikallerle reaksiyona girer, 2- GSH, GPx (Glutatyon Peroksidaz) tarafından gerçekleştirilen peroksitlerin redüksiyonuna elektron vericisi olarak katılır. Bu nedenle GSH miktarında ve GSH/GSSG oranında azalma ve GSSG düzeyinde artış oksidatif stresin belirtisi olarak kabul edilir [96].

Normal metabolizma dışında, çok sayıda çevresel kirlenici sucül organizmalarda oksidatif stresi indükleme kapasitesine sahiptir. Organizmalarda, ROS oluşumu ile hücresel bileşenlerin oksidatif hasarı sonucu gerçekleşen oksidatif strese engel olmak için, antioksidan enzimlerin aktiviteleri artar [97,98].

1.3.1.5. Glutasyon Peroksidaz

Glutasyon peroksidaz, (GPx, EC 1.11.1.9) hidrojen peroksit ve büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerinin redüklenmesinden sorumlu bir enzimdir. Sitolde yerleşiktir, dört selenyum atomu içeren tetramerik yapıya sahiptir. Karaciğerde en yüksek; kalp, akciğer ve beyinde orta; kasta düşük aktivite gösterir. GPx, aşırı hidrojen peroksit varlığında glutasyonun (GSH) okside glutatyona (GSSG) oksidasyonunu katalizler, bu arada H₂O₂'de suya dönüştürülerek detoksifiye edilmiş olur [99].

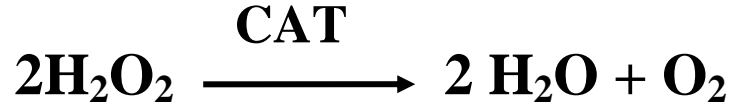
GPx enziminin selenyuma bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki izomeri bulunmaktadır. Se-bağımlı GPx, H₂O₂'in ve lipid hidroperoksitlerinin, Se-bağımsız GPx ise sadece lipid hidroperoksitlerinin temizlenmesinden sorumludur. GPx aşağıdaki reaksiyonları katalizleyerek, hidrojen peroksitin ve organik hidroperoksitlerin (ROOH) redüklenmesini sağlamaktadır [100].



GPx'in iki substratı vardır. Substratlardan biri olan peroksitler alkole indirgenirken, diğer substrat olan glutasyon (GSH) ise okside glutatyona (GSSG) yükseltgenir. Okside glutasyon (GSSG), glutasyon redüktaz enziminin katalizlediği başka bir reaksiyon ile tekrar redükte glutatyona dönüştürülür [101]. Enzimin aktivitesi, hidrojen kaynağı olan redükte glutasyonun (GSH) varlığına ve enzimin 4 alt ünitesinde bulunan selenyuma bağlı olarak değişir. Se eksikliği GPx aktivitesinde azalmaya ve lipid peroksidasyonunda artışlara yol açar [102].

1.3.1.6. Katalaz

Katalaz, (CAT, EC 1.11.1.6.) esas olarak peroksizomlarda bulunan ve yapısında dört "hem" grubu içeren bir hemoproteindir. Karaciğer ve eritrositlerde en yüksek aktiviteye sahiptir. Katalaz, bütün memeli hücrelerinde, bitkilerde ve aerobik mikroorganizmalarda bulunur. Anaerobik hücrelerde katalaz bulunmaz. Katalaz hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene parçalayan bir enzimdir [101,103].



H₂O₂'i suya ve oksijene parçalayarak lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu rol oynar. Katalaz, hidrojen peroksit (H₂O₂) varlığında bir takım küçük substrat moleküllerine karşı peroksidatik aktivite gösterir [104]. Enzim iki tip tepkime kullanarak etkisini gösterir:

- 1- H₂O₂'nin dismutasyonu (katalitik tepkime)
- 2- Alifatik alkollerin peroksidasyonu (peroksidatik tepkime) [105].

Enzimin indirgen özelliği ve peroksidatik aktivitesi hidrojen peroksit ve metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere özgüdür. Büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine etki etmez [101].

1.3.2. Enzimatik Olmayan Biyobelirteç Olarak Metalloitiyonein

Metalloitiyonein (MT) ilk defa 1957 yılında Margoshes ve Valee tarafından at böbreğinde "kadmiyum bağlayıcı protein" olarak tanımlanmıştır [8]. Ancak ilk olarak Kagi ve Vallee tarafından saflaştırılarak karakterize edilmiştir [106]. Metalloitiyoneinlerin bakterilerde, omurgalılarda ve omurgasızlarda bulunduğu bilinmektedir [8]. Genellikle sitozolde bulunan MT'ler düşük molekül ağırlığında (6-7 kDa), metal bağlayan, sisteince zengin, aromatik amino asit bileşikleri bulunmayan ve metal tiyolat gruplarından oluşmuş bir proteindir [8,23,107]. MT genel olarak sitozolde bulunsa da çekirdekte, lizozomda ve mitokondrinin zarlar arası boşluğunda da belirlenmiştir [108].

MT'ler 61-68 amino asitten oluşan N-terminalinde asetilmetiyonin ve karboksil terminalinde alanin bulunan tek zincirli polipeptidlerdir. Amino asitlerin %30'undan fazlası metal bağlayıcı merkezler olan sistein rezidülleridir. Her bir MT, 20 sistein metal tiyolat kompleksi ile iki değerlikli 7 adet iyon bağlayabilmektedir [109]. MT'lerin, metal bağladıktan sonra polipeptid zincir yapıları değiştiği için proteoliz olmaları kolaylaşır [110]. Canlılar ve dokular arasındaki MT-metal bileşenleri arasındaki farklılık, maruz kalınan metal çeşidine ve maruz kalma şekline göre farklılık

göstermesine rağmen MT'lerin değişik metalleri bağlama yönünde ilgisi $Zn^{+2} < Pb^{+2} < Cd^{+2} < Cu^{+2} < Ag^{+2} = Hg^{+2} = Bi^{+3}$ şeklinde bir sıralama göstermektedir [110,111].

MT'lerin MT1, MT2, MT3 ve MT4 olmak üzere dört farklı izoformu vardır. Bunlardan MT1 ve MT2 birçok dokuda sentezlenen ve en çok çalışılan izoformlarıdır. Bu iki izoformun benzer yüklerde oldukları ve yapısal olarak bazı küçük farklılıkları olduğu gösterilmiştir [112,113].

1.3.2.1. Metalloiyoneinlerin Görevleri

Metalloiyoneinler ilk defa 1957 yılında keşfedilmesine rağmen, tanımlanması ve biyolojik işlevlerinin anlaşılması uzun yıllar sürmüştür. MT'lerin, protein yapıları ile ilgili yapılan çalışmalar bu proteinlerin bazı biyolojik fonksiyonlarının anlaşılmasını sağlamıştır. MT moleküllerindeki metal-tiyolat grupları, gruplar arasında ve diğer MT molekülleriyle, metal iyonlarının hızlı bir şekilde yer değiştirmesini sağlamaktadır [114]. Metal iyonlarının taşınmasındaki karakteristik görevinden dolayı, önemli biyolojik işlevlerde MT'lerin rol oynadığı düşünülmektedir [115].

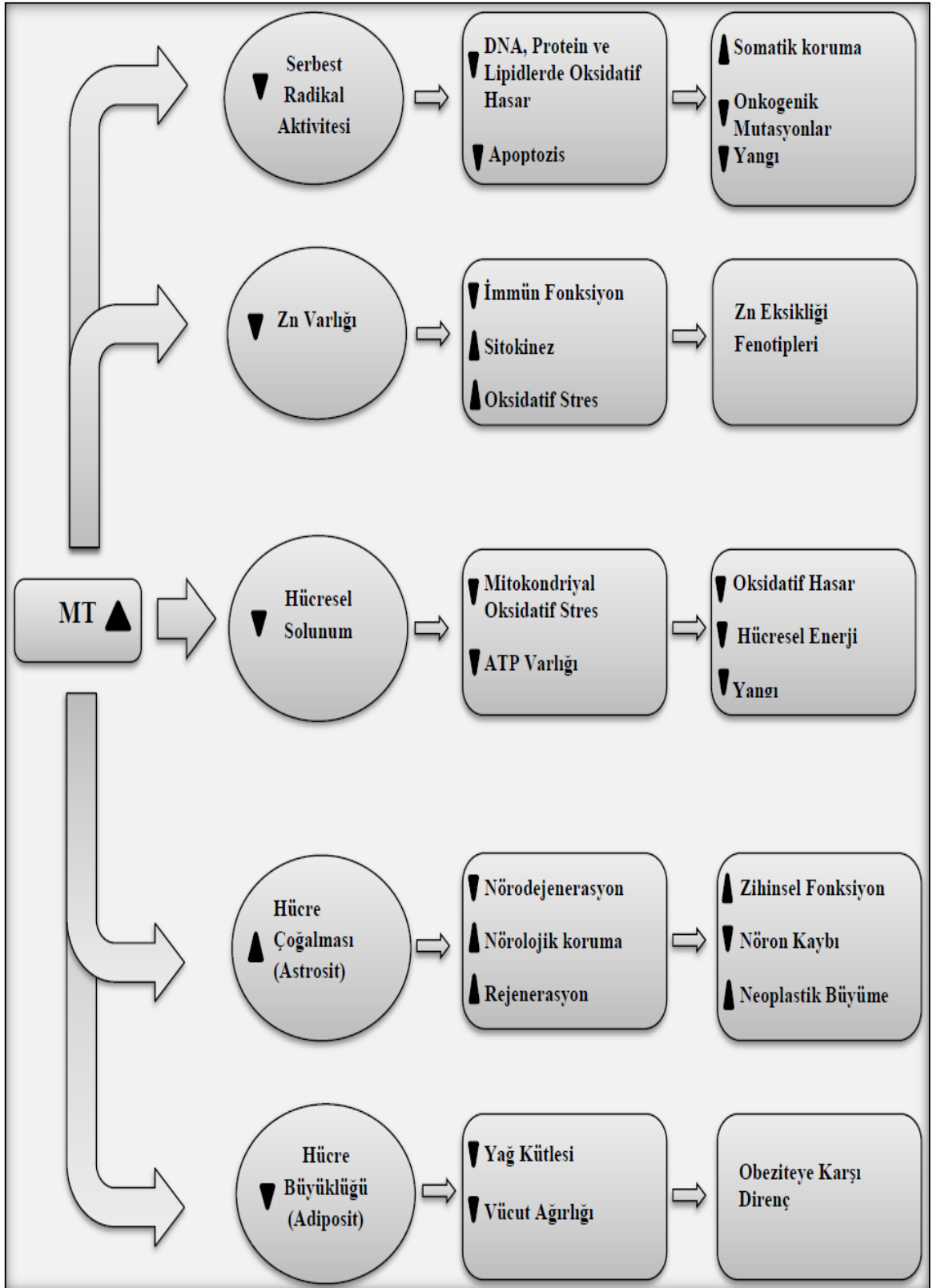
Metalloiyoneinlerin başlıca görevleri;

- Metal absorpsiyonu, metal taşınımı ve atılımı,
- Esansiyel metallerin homeostazisi ve metabolizması,
- Metal detoksifikasyonu,
- Serbest radikal süpürücüsü,
- Zn tutucusu olduğundan hücre çoğalmasında ve hücre yenilenmesinde,
- Apoptoz ve intraselüler redoks dengesinin ayarlanması gibi fonksiyonlarının bilinmesine rağmen, metalloiyoneinlerin değişik izoformlarının hücreye özgü olarak gen seviyesinde ifade edilmesi, bu proteinin biyolojik işlevleri ile ilgili aydınlatılamamış karmaşık yönleridir [24,116].

Metalloiyoneinler çinko ve bakır gibi esansiyel metallerin homeostazisinde önemli rol oynarlar [117]. Çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal olaylar için hücre ve dokular bu esansiyel metallere gereksinim duyduklarında MT'ler tarafından buralara taşınmaktadırlar. Böylece metalloiyoneinler aracılığıyla bu metaller arasındaki homeostazi sağlanır [118].

MT'ler doğrudan metal bağlayıcı oldukları için metallerin hücre içerisinde serbest dolaşarak hücreye zarar vermelerini engellemektedir [119]. Bunun dışında, MT'ler metalleri sadece metal bağlama kapasiteleri ile değil aynı zamanda hücreleri oksidatif hasardan koruyarak da detoksifiye etmektedirler [120]. MT'ler tarafından metal detoksifikasyonları, maruz kalınan hücrenin tipine, metalin özelliğine ve metalin konsantrasyonuna göre değişir. Yapılan çalışmalarda, düşük miktarlardaki Cd maruziyetinin dahi MT miktarını arttırdığı gösterilmiştir. Genel olarak; kısa süreli metale maruz kalma sonucu artan MT sentezi ile metal detoksifiye edilebilmekte, ancak metale kronik olarak maruz kalma sonucunda ise Cd-MT formunun karaciğerden böbreklere taşınarak, nefrotoksik etkiye neden olduğu ileri sürülmektedir [121,122].

Metallotiyoneinler ve glutatyon (GSH) sülfhidril grubunca zengin, serbest radikaller veya lipid peroksidlerin neden olduğu oksidatif strese karşı hücreyi koruyan, hepatositlerde fazla bulunan proteinlerdir [118]. MT'de bulunan tiyol gruplarının hidroksil radikalleri için tutucu olduğu düşünülmektedir [123]. Bunun dışında, Cd ve Zn gibi serbest metaller hücre membranları ile etkileşerek, bağlanma bölgesi ile yarışarak ya da yapısal değişikliklere sebep olarak, demir redoks reaksiyonunu engellemekte ve böylece H₂O₂'in hidroksil radikaline (OH[•]) dönüşümü azaltılmaktadır. Bu etki de MT'nin serbest radikal süpürücüsü olarak görev yaptığını desteklemektedir. Metabolik aktivitesi yüksek olan dokularda, metallotiyonein miktarındaki artış onun serbest radikal süpürücüsü olarak görev yaptığının başka bir göstergesidir [111].



Şekil 1.12. Metallothionein miktarındaki artış ile biyolojik sonuçlar (olaylar) arasındaki ilişkiye genel bir bakış [108].

2. KAYNAK ÖZETİ

2.1. Alan Çalışmaları

Sucul ekosistemlerde metal kirliliğinin etkileri genel olarak balık türleri kullanılarak belirlenmiştir. Bununla birlikte doğal yaşam ortamlarından alınan amfibiler ile yapılan çok az sayıda çalışma mevcuttur.

Cooper ve Fortin [124], yoğun bir şekilde tarım yapılan yamaska nehri (Quebec, Kanada) kıyı şeridi boyunca gübrelemeye bağlı olarak oluşan metal kirliliğini nehirde toplanan boğa kurbağalarında (*Rana catesbeiana*) araştırmıştır. Araştırmacılar, çalışmada karaciğer, böbrek ve ince bağırsakta metal miktarı ile karaciğer metalotiyonein miktarını değerlendirmişlerdir. Genel olarak çözülmüş metal konsantrasyonları ve boğa kurbağalarında birikmiş metal konsantrasyonlarında bölgeler arasında çok fazla bir farklılık tespit edilmemiştir. Karaciğer Cu ve Zn konsantrasyonlarında, nehre giren farklı akarsulardan alınan kurbağalar arasında önemli düzeyde farklılıklar tespit edilmiştir. Karaciğer metalotiyonein içeriğinde ise nehre giren farklı akarsulardan alınan kurbağalar arasında önemli bir farklılık gözlemlenmemesine rağmen, metalotiyonein düzeyi iki bölgede Cu içeriği ile, bir bölgede ise Cd içeriği ile korelasyon göstermiştir.

Othman ve arkadaşları [125], yabancı *Fejervarya limnochairs* türü kurbağalarda karaciğer Cd düzeyleri ile karaciğer GST ve MT düzeyleri arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Araştırma sonuçları kirli bölgeden alınan kurbağa örneklerinde GST aktivitesi ve MT miktarının kontrol grubu olarak seçilen bölgedeki kurbağalardan önemli düzeyde yüksek olduğunu göstermiştir. Ayrıca araştırmacılar karaciğer Cd miktarı ile GST aktivitesi arasında pozitif bir ilişki olduğu ancak karaciğer MT düzeyi ile Cd miktarı arasında pozitif bir ilişki olmadığı sonucuna varmışlardır.

Yapılan başka bir çalışmada kullanılmayan bir uranyum maden ocağı gölcüğünden ve referans bölgeden alınan su örneklerindeki metal içeriği ile her iki bölgeden alınan *Pelophylax perezi* türü kurbağaların çeşitli doku ve organlarındaki GST, CAT, GR, GPx, LDH aktiviteleri ile lipid peroksidasyon düzeyleri karşılaştırılmıştır. Araştırmacılar metallerin maden ocağı gölcüğünden alınan örneklerin dokularında yüksek konsantrasyonlarda olduğunu özellikle uranyumun referans bölgedeki örneklere göre 1350 kat daha fazla olduğunu saptamışlardır. Ayrıca hiçbir dokuda lipid peroksidasyonunda farklılık gözlenmemiş ve maden ocağı gölcüğünden

alınan örneklerin karaciğer dışındaki bütün organlarında total GPx aktivitesinde bir artış belirlenmiştir. Ancak akciğerde CAT enziminin önemli düzeyde baskılanmasının muhtemel bir sonucu olarak GPx aktivitesindeki artışın sadece akciğerde önemli düzeyde olduğu rapor edilmiştir [126].

Fenoglio vd. [127] İtalya'nın Pavia şehri yakınlarındaki iki farklı bölgeden aldıkları *Rana esculenta* türü kurbağalarda kirliliğe bağlı olarak ortaya çıkan histolojik, morfolojik ve bazı enzim aktivitelerindeki değişimleri araştırmışlardır. Araştırmacılar tarafından böbrek parankimasında bazı yapısal modifikasyonlar gözlemlenmiş ancak nekrotik bir oluşum belirlenmemiştir. Ayrıca referans bölgeye göre kirli olduğu düşünülen bölgedeki kurbağalarda asit fosfataz, NOS bağımlı nikotinamid adenin dinükleotid fosfataz, katalaz enzim aktivitelerinin ve indüklenbilir NOS düzeyinin arttığı rapor edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada batı Ukrayna'da bulunan bir nehirden alınan *Rana ridibunda* türü kurbağaların karaciğerinde mevsimsel ve bölgesel farklılıklara bağlı olarak metal birikimindeki değişimler araştırılmıştır. Araştırmacılar karaciğer ağırlığının bahardan, yaz/sonbahara doğru arttığı ve kurbağa karaciğerindeki metal mevcudiyetinin Fe>Cu~Zn>Mn>Cd şeklinde olduğu sonucuna varmışlardır. Ayrıca, en yüksek bakır konsantrasyonuna ilkbahar aylarında rastlanırken diğer metallerin en yüksek konsantrasyonlarına yaz aylarında rastlanmıştır. Kırsal bölgede tarım yapılan alanlara yakın yerlerden alınan kurbağalarda en yüksek bakır konsantrasyonu belirlenmiş iken kadmiyum hem kentsel hem de kırsal bölgeden alınan örneklerde saptanmıştır [128].

Kadmiyumun farklı çevresel konsantrasyonlarına maruz kalan *Fejervarya limnochairs* türü kurbağaların karaciğer, böbrek, testis ve ovaryumlarında metal birikimini incelemeyi amaçlayan bir çalışma yapılmıştır. Araştırma sonuçları kirlenmiş bölgedeki kurbağaların karaciğer, testis ve böbrek Cd düzeylerinin referans olarak seçilen bölgedeki kurbağalarinkinden önemli düzeyde yüksek olduğunu göstermiştir [129].

Başka bir araştırmada Arjantin'in kurak bölgesinde bulunan yapay bir gölü üreme dönemlerinde kullanan altı farklı kara kurbağası türünde Cd ve Pb düzeyleri incelenmiştir. Araştırma sonuçları her bir türün bütün bireylerinde Pb düzeyinin 1.19 ile 5.57µg/g kuru ağırlık aralığında Cd düzeyinin ise 1.09 ile 6.86 µg/g kuru ağırlık aralığında olduğunu göstermiştir. Ayrıca daha fazla kirlenmiş güney kıyısından

toplanan kara kurbağalarında daha az bozulmuş kuzey kıyısındaki kurbağalara göre Cd birikiminin %21, Pb birikiminin ise %40 daha fazla olduğu saptanmıştır [130].

Lopes vd. [131] tarafından Güneybatı Portekiz’de bakır madeni atıkları ile kirlenmiş bir nehirdeki *Leuciscus alburnoides* türünden balıklarda metal kirliliğinin değerlendirildiği bir çalışmada, mevsimsel olarak GST aktivitesi, karaciğer dokusunda çeşitli metallerin düzeyi ve suyun fiziko-kimyasal parametreleri ölçülmüştür. Kontrol alanı ile karşılaştırıldığında suda sülfat (8.1-1136 mg/L), Mg (18-40 mg/L), Mn (0.7-36 nM), Fe (0.5-21 µM) ve Cu (12-110 nM) değerinin ve balıklarda hepatik Cu ve Se düzeyinin yüksek belirlendiği alanda GST aktivitesi kontrol alanından önemli düzeyde yüksek bulunmuştur. GST aktivitesindeki artış, bu elementlerin yüksek konsantrasyonlarına devamlı maruz kalma sonucu balıkların metabolik adaptasyonu ile ilişkilendirilmiştir.

Aarab ve arkadaşları [132], Güneybatı Fransa’da beş nehrin kirlilik düzeyini izledikleri bir çalışmada kirliliğin balıklar üzerindeki etkisini değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar balıklarda EROD, karaciğer GST ve beyin AChE aktiviteleri ile safra PAH metabolit değerlerini biyobelirteç olarak kullanmıştır. Biyoindikatör tür olarak belirlenen *Leuciscus cephalus* balık türünde AChE aktivitesinin, metal bakımından (özellikle Cd) kirli olduğu önceden belirlenmiş bir alanda kontrol alanı olarak seçilen gölden önemli düzeyde düşük olduğu; EROD aktivitesinin ise kontrol alanından yüksek olduğu belirlenmiştir. Yine aynı balık türünde safra metabolitlerinin yüksek belirlendiği, kimya sanayi atık suyunun verildiği bir alanda EROD aktivitesinin de önemli düzeyde yüksek olduğu gösterilmiştir.

Levesque vd. [133] tarafından, Kanada’da (Quebec) madencilik alanından kaynaklanan Cd, Zn ve Cu elementleri ile yüksek oranda kirlenen üç gölde yapılan bir çalışmada, *Perca flavescens* türü balıklarda böbrek metal birikimi ve karaciğer AST, ALT ve LDH aktiviteleri ölçülmüştür. Yaz ve sonbahar mevsimlerinde alınan balık örneklerinde, böbrek Cd ve Zn düzeylerinin kontrol alanı olarak seçilen iki göle kıyasla önemli düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir. Sonbaharda maden alanına en yakın ve yüksek oranda kirlenmiş olan gölde balıklarda karaciğer AST aktivitesinin önemli düzeyde arttığı saptanmıştır.

Çevresel ve endüstriyel atıklarla kirlenmiş Nil nehrinin bazı bölgelerinden yakalanan balık türlerinde kirliliğin belirteçleri olan çeşitli antioksidan enzim aktivitelerindeki değişimler çalışılmıştır. İncelenen türlerden *Oreochromis niloticus*’un karaciğer ve böbrek dokularındaki GR, GST ve GPx aktivitesinin kirlenmiş

bölgelerdeki balıklarda kontrol grubu balıklarına oranla daha yüksek olduğu gözlenmiştir. SDS-PAGE ile *O. niloticus* ve *Clarias lazera*'nın karaciğer ve böbrek örneklerinin elektroforetik separasyonu ile elde edilen metal bağlayıcı proteinlerin yoğunluğunda artış bulunmuştur [134].

Doğal ortamlarındaki ve yetiştirme havuzlarındaki *Anguilla anguilla*'nın kan, karaciğer, böbrek ve kas dokularında Zn, Cd, Cu, Hg, Fe, Pb ve Mn gibi metallerin ve MT düzeylerinin belirlenmesine yönelik bir araştırmada en yüksek Cd düzeyleri yetiştirme havuzlarındaki balıkların karaciğer ve böbreklerinde saptanırken, doğal ortamlarında yakalanan balıkların kanında Pb, böbreklerinde ise Zn yüksek düzeyde bulunmuştur. Yetiştirme havuzlarındaki balıkların böbreklerinde Cd ile MT; doğal ortamdaki balıkların ise karaciğerinde Cu ile MT arasında doğrusal bir ilişki saptanmıştır [135].

Özmen vd. [136] tarafından, Karakaya Baraj Gölü'nde 2000-2001 yılları arasında kirlilik düzeyinin mevsimsel olarak saptanması ve bu kirliliğe bağlı olarak sazan balıkları (*Cyprinus carpio*) üzerine toksik etkilerin belirlenmesini amaçlayan bir çalışma yapılmış ve balık dokularında çeşitli metallerin birikimi de izlenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre, baraj gölünde çeşitli metal düzeylerinin ve diğer kirleticilerin miktarının yüksek düzeyde olduğu, balık dokularında kadmiyum, kurşun ve bakır gibi metallerin biriktiği saptanmıştır. Ayrıca, baraj gölünden yakalanan balıklarda çeşitli enzim değerlerinin de kirlilik düzeyine ve lokasyonlara göre önemli düzeyde değiştiği bulunmuştur.

Özmen vd. [137] tarafından, Karakaya Baraj Gölü'nde *C. carpio* kullanılarak yapılan bir başka araştırmada kimyasal analiz sonuçları, baraj gölü'nün su, sediment örneklerinde ve balıkların solungaç dokusunda çeşitli metallerin varlığını göstermiştir.

Schmitt ve arkadaşları [138], kurşun ve çinko madenlerinin bulunduğu Güneydoğu Missouri (Amerika) bölgesindeki üç balık türünde (*Camptostoma oligolepis*, *Lepomis megalotis*, *Hypentelium nigricans*) yaptıkları çalışmalarda balıkların kan dokusundaki metal düzeylerinin özellikle de kurşun düzeyinin çok yüksek olduğunu ve karaciğer dokusunda MT indüksiyonunun özellikle çinkonun etkisinde arttığını belirlemişlerdir.

2.2. Laboratuvar Çalışmaları

Amfibi türlerinde metal toksisitesinin saptanması amacıyla laboratuvar ortamında yapılmış olan çalışma sayısı alan çalışmalarına göre daha fazladır. Ancak bu çalışmalarda daha çok amfibilerin farklı gelişim dönemlerinde metallerin toksik etkileri araştırılmıştır.

Yapılan bir araştırmada, Cd, Cu ve Pb'nun *X. laevis* embriyolarının gelişimi üzerine toksik etkileri kurbağa embriyogenezi ve teratojenite testi (FETAX) ile incelenmiştir. Araştırmacılar ayrıca amfibi iribaşlarında submitokondriyal GST, GR, AChE, CaE, LDH, AST ve ALT enzim aktivitelerini değerlendirerek toksik etkiyi belirlemiştir. Çalışmada, metallerin 96 saatlik LC₅₀ değerleri Cd için 1.6 mg/L, Pb için 96.1 mg/L ve Cu için 1.37 mg/L olarak belirlenmiştir. Ayrıca teratojenik indeks (TI) Cd için 1.1, Pb için 1.22 ve Cu için 0.52 olarak hesaplanmıştır. TI değerleri bu metallerin ASTM değerlerine göre *X. laevis* embriyoları için teratojen olmadığını göstermiştir. Metallerin enzim aktiviteleri üzerine etkilerine bakıldığında önemli değişimler saptanmış ve bu enzimlerin uygun biyokimyasal biyobelirteçler olduğu belirtilmiştir [139].

Lienesch ve arkadaşları [140], kadmiyumun *X. laevis*'de oosit gelişimi üzerine etkilerini çalışmışlardır. CdCl₂ dişi *X. laevis*'lere 21 günde bir enjekte edilmiş, sonuçta oogenezin her evresindeki oosit yüzdesi azalırken, atretik oosit popülasyonu önemli düzeyde artmıştır. Araştırmacılar Cd'nin oogeneze engel olduğunu ve *Xenopus* gamet gelişim evrelerinin, çevresel kirleticilerin üreme kapasitesi üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde kullanılabilir bir parametre olduğunu belirtmişlerdir.

Xenopus iribaşlarında yapılan bir başka araştırmada sudan ve sedimentten gelen kurşunun organizmada birikip birikmediği araştırılmış ve maruz kalma süresi arttıkça iribaşların gelişimlerinin inhibe olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmalar, iribaş gelişiminin baskılanmasındaki artışın, vücuttaki kurşun birikimiyle doğru orantılı olduğunu göstermiştir [15].

Duttaphrynus melanostictus türü su kurbağası iribaşları dört gün süreyle Cu, Cd, Zn, Pb, Ni, Fe, Al ve Mn'nin çeşitli konsantrasyonlarına maruz bırakılarak ölüm oranları, ortalama ölüm zamanları (LT₅₀) ve LC₅₀ değerleri araştırılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre bütün metal uygulamalarında metal konsantrasyonu ve maruz kalma süresinin azalması ile LT₅₀ ve LC₅₀ değerlerinin arttığı rapor edilmiştir.

Ayrıca Cu, Cd, Zn, Pb, Ni, Fe, Al ve Mn için 96 saatlik LC₅₀ değerleri sırasıyla 0.03, 0.3, 4.2, 1.5, 8.8, 0.4, 1.9 ve 39 mg/L olarak belirlenmiştir [141].

Selvi ve arkadaşları [142] tarafından yapılan bir çalışmada, CdCl₂'ün farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılan *Rana ridibunda* türü ergin su kurbağalarında bu metal tuzunun akut toksisitesi ve sebep olduğu davranışsal değişiklikler araştırılmıştır. Çalışma sonunda metal tuzunun 96 saatlik LC₅₀ değeri 51.2 mg/L olarak belirlenmiştir. Bunun yanında artan metal tuzu konsantrasyonu ile beraber maruz kalan kurbağalarda yüze yakın yüzmeye, solunum güçlüğü, mukus salgılanmasında artış, hareket yavaşlaması, denge kaybı gibi davranışsal değişimler gözlemlenmiş ve en yüksek iki konsantrasyonda ise bütün bireylerin öldüğü rapor edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada *X. laevis*'in yaşaması, gelişmesi ve metamorfoz süreci üzerine radyoaktivitesi %60 oranında azaltılmış uranyumun etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla ilk önce, embriyolar (8-47. evre) 4.8 ile 77.7 mg/L aralığındaki farklı uranyum konsantrasyonlarına 96 saatlik FETAX testi ile maruz bırakılmışlardır. Daha sonra ise 64 günlük kronik deneyde embriyolar (8-66. evre) 6.2 ile 54.3 mg/L aralığındaki farklı uranyum konsantrasyonlarına maruz bırakılmışlardır. Araştırmacılar 96 saatlik FETAX testi sonucunda radyoaktivitesi azaltılmış uranyumun teratojen bir metal olmadığını ve ölüme, malformasyonlara ve gelişim üzerine herhangi bir olumsuz etkiye yol açmadığını belirtmişlerdir. 64 günlük deneyde ise malformasyon ve ölümün gözlenmediği, sadece 13.1 ile 54.3 mg/L aralığındaki uranyum konsantrasyonlarına maruz kalan örneklerde kontrol grubundaki örneklerle göre metamorfozda gecikme olduğu rapor edilmiştir [143].

Başka bir çalışmada ise bir uranyum ocağının havuzunda yaşayan gelişiminin erken evrelerindeki *Rana perezi* türü kurbağalarda maden ocağı atığının etkisi incelenmiştir. Bu amaçla yumurtalar ve larvalar 96 saat süreyle maden ocağı atığının farklı dilusyonlarına maruz bırakılmışlardır. Çalışma sonunda atığın en yüksek konsantrasyonunun larvalarda kuyruk deformitesi ile pigmentasyonda artış, boy uzunluğunda önemli bir azalış olduğunu rapor etmişlerdir [144].

Kostaropoulos vd. [145] tarafından kadmiyum ve kromun *Rana ridibunda*'nın çeşitli dokularındaki GST ve P450 Monooksijenaz aktiviteleri üzerine etkisini araştırmaya yönelik yapılan bir çalışmada ergin kurbağalar 10 mg/L Cr ve 10 mg/L Cr + 10 mg/L Cd karışımına 14 gün süreyle maruz bırakılmıştır. Araştırmacılar kontrol grubundaki hayvanlarda en yüksek ve en düşük P450-MO aktivitesinin sırasıyla karaciğer ve bağırsakta gözlemlerken en yüksek GST aktivitesini ise karaciğer ve

böbrekte gözlemlenmişlerdir. Bundan başka Cr ya da Cr+Cd karışımının kurbağalarda karaciğer GST ve P450-MO ile böbrek GST aktivitelerinde bir azalışa neden olduğunu ve hem GST hem de P450-MO aktiviteleri ile metal karışımına maruz kalan bireylerin karaciğerindeki her iki metalin konsantrasyonu arasında negatif bir korelasyon olduğunu rapor etmişlerdir.

Embriyonik gelişimlerinin sonundaki *Bufo arenarum* embriyoları 10 günlük uygulama protokolü ile kadmiyuma adapte edilmiş ve kurbağa embriyoları MT izolasyonu, Cd ve Zn içeriğinin ölçülmesi için kullanılmıştır. Araştırma sonuçları; embriyolardaki Cd alınımı 7 mg/g embriyo (yaş ağırlık) miktarı ile uygulama yapılmamış ortamlardakinden 255 kez daha fazla olduğunu, büyük MT benzeri bir fraksiyonun Cd tarafından kontrol grubu embriyolarından yaklaşık 8 kat daha fazla indüklendiğini, Zn konsantrasyonunun yaklaşık olarak 44 mg Zn/g embriyo (yaş ağırlık) olduğunu ve bu değer önemli bir değişiklik olmadığı fakat adapte edilmiş embriyolarda iz metalin metalotiyoneinlerden serbest bırakıldığını göstermiştir. Ayrıca artan MT sentezi ve doğal metalotiyoneinlerden Zn serbest bırakımının adaptasyon fenomeni ile ilişkisi tartışılmıştır [146].

Loumbourdis ve arkadaşları [117] tarafından yapılan bir çalışmada, *Rana ridibunda* türü kurbağalarda krom ve krom+kadmiyum karışımının etkisinde karaciğer, böbrek ve bağırsaktaki metal (Cr, Cd) birikimi ve MT sentezi incelenmiştir. Her iki metalin incelenen dokular arasında en çok böbreklerde biriktiği ve bu dokuda saptanan Cr düzeyinin Cr+Cd karışımının etkisinde kromun tek başına etkisinde oranla iki kat daha fazla olduğu gözlenmiştir. MT sentezinin Cr+Cd karışımının etkisindeki organizmalarda kontrol grubuna oranla 2-6 katlık artış gösterdiğini saptamıştır. Araştırmacılar, bağırsakta gözlenen bu yüksek MT sentezindeki artışın, bu proteinlerin metal iyonlarının bağırsaktan kan dokusuna geçişinde etkili olmasından kaynaklandığını belirtmişlerdir.

Yapılan başka bir çalışmada, $CuCl_2$ 'e maruz bırakılan ergin dişi *Rana ridibunda* türü kurbağalarda farklı dokulardaki Cu birikimi ve karaciğer MT düzeyi araştırılmıştır. Araştırmacılar ergin kurbağaları 5, 15 ve 30 gün süresince Cu'nun 50 ve 100 mg/L konsantrasyonlarına maruz bırakmışlar ve karaciğer, böbrek, ventral deri ve bağırsaktaki bakır birikimi ile karaciğer MT düzeyini belirlemişlerdir. Araştırma sonuçlarına göre, Cu'nun ilk olarak deri yoluyla vücuda girdiği daha sonra kalın bağırsakta biriktiği, en son olarak karaciğerde Cu konsantrasyonuna ve maruz kalma süresine bağlı olarak giderek artan bir birikim olduğu belirlenmiştir. En yüksek metal

düzeyi 30 gün 100 mg/L Cu'a maruz kalma sonucunda böbreklerde belirlenmiştir. Buda, muhtemelen karaciğerde aşırı miktarda bakır birikmesinden sonra, böbreklerin Cu detoksifikasyonunda ikinci bir yol gibi davrandığını göstermiştir. Karaciğer MT düzeylerinin ise 5. ve 15. günlerde Cu konsantrasyonunun artışı ile birlikte arttığı belirlenmiştir. Ancak araştırmanın sonunda MT düzeyinde bir azalış görülmüştür [147].

Metallerin ve metal karışımlarının etkileri ile ilgili balıklar kullanılarak laboratuvar koşullarında yürütülmüş olan çok sayıda araştırma literatür kayıtlarında mevcuttur. Ancak bu çalışmaların hemen hepsinde yüksek metal konsantrasyonlarının etkisi değerlendirilmiştir.

Yapılan bir çalışmada, farklı sürelerde Zn, Cd ve Zn+Cd'nin farklı ortam derişimlerine bırakılan Nil tilapiasının (*Oreochromis niloticus*) kan parametreleri üzerine metallerin etkisi incelenmiştir. Araştırma sonucunda, *O. niloticus*'da Zn, Cd ve Zn+Cd karışımı uygulamaları kan ve serum parametrelerinde çeşitli değişikliklere neden olmuştur. Maruz kalma süresi ve ortam derişiminin artışıyla alyuvar, akyuvar, hematokrit, hemoglobin, kolesterol, trigliserid, Ca⁺⁺, Na⁺ ve Cl⁻ düzeyleri ile AChE aktivitesinde azalma, CAT, G6PD, ALT, AST, ALP, LDH ve LP aktivitesi ile GSH, serum albumin, transferrin, seruloplazmin, IgA, IgG, kortizol, glukoz, total protein ve K düzeylerinde artış rapor edilmiştir. İncelenen bütün kan parametreleri üzerine metallerin etkisinin düşük derişimlerine oranla yüksek derişimlerinde daha fazla ve bu etkilerinin Zn+Cd>Cd>Zn şeklinde olduğu saptanmıştır [148].

Yapılan bir başka çalışmada ise, *O. niloticus* Zn (200 mg/L), Cu (60 mg/L) ve Zn+Cu (100+30 mg/L) etkisine 24, 48, 72 ve 96 saatlik sürelerle maruz bırakılarak karaciğer, solungaç ve kas dokularındaki metal birikimi incelenmiştir. Araştırmacılar balık ölümlerinin bakır ve çinkoya oranla çinko+bakır karışımının etkisinde daha fazla olduğunu ve en yüksek bakır birikiminin karaciğerde, en yüksek çinko birikiminin ise solungaçlarda olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, bakır birikiminin çinko varlığında azaldığını ancak ortamda bulunan bakırın dokulardaki çinko birikimini etkilemediğini rapor etmişlerdir [149].

O. niloticus'un 0.018+0.16 mg/L ve 0.03+0.3 mg/L Cd+Zn karışımlarının etkisine 24 ve 672 saat süresince maruz bırakılarak yapılan bir çalışmada metal karışımlarının karaciğer dokusunda neden olduğu histopatolojik değişiklikler incelenmiştir. Araştırmacılar, her iki metal karışımının ortam derişimlerinin etkisinde de benzer histolojik değişikliklerin meydana geldiğini ve bu değişikliklerin; hiyalinizasyon,

hepatositlerde vakuol oluşumu, hücresel şişme ve kan damarlarındaki aşırı kan akışı şeklinde olduğunu saptamışlardır [150].

Atlı ve Canlı [151] tarafından yapılan bir çalışmada, 10 gün süreyle 1 mg/L Cd, Cu, Zn, Pb ve Fe etkisine maruz bıraktıkları *O. niloticus*'un karaciğer homojenatının Sephadex G-75 ile dolu kolondan elde edilen metalotiyonein benzeri protein fraksiyonlarına karşılık gelen düşük molekül ağırlıklı protein fraksiyonunda kontrol grubuna göre Cd düzeyinin arttığını gözlemişlerdir. Aynı zamanda karaciğerde ölçülen toplam metal düzeyi sonuçlarına göre metal etkilerinde bu metallerin artış gösterdiği belirtilmiştir.

Tatlı su balığı olan *O. niloticus* üzerine yapılan bir çalışmada, balıklar 14 gün süreyle 1 mg/L derişimindeki kadmiyum, çinko ve bakırın tek olarak ve karışımlarının etkisine maruz bırakılmışlardır. Karaciğer dokusu homojenatları Sephadex G-75 kolonu ile saflaştırılmış ve karaciğer dokusundaki proteinlerin jel filtrasyon profilleri belirlenmiştir. Ayrıca karaciğerdeki toplam metal ve protein düzeyleri de belirlenmiş ve sülfhidril gruplarının, metalotiyonein benzeri proteinlerin ve bu proteinlere bağlı metallerin analizi yapılmıştır. Araştırma sonunda yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin (YMAP, >80000 Da), orta molekül ağırlıklı proteinlerin (OMAP, ~ 43000 Da) ve düşük molekül ağırlıklı proteinlerin (DMAP, ~ 6500 Da) bulunduğu fraksiyonlarda üç adet pik gözlenmiştir. Kadmiyumun YMAP'lerin düzeyini azalttığı, OMAP ve DMAP'lerin düzeylerini ise arttırdığı, bakırın ise bunun tam tersi olarak YMAP'lerin düzeyini arttırdığı, OMAP ve DMAP'lerin düzeylerini ise azalttığı, çinkonun ise herhangi bir değişikliğe neden olmadığı rapor edilmiştir. Ayrıca karaciğerdeki total metal ve total protein düzeyleri ile metale maruz kalma arasında bir korelasyon belirlenmiştir [152].

Atlı ve Canlı [153] tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, Cu, Zn, Cd ve Pb'na maruz bırakılan *O. niloticus* türü tatlı su balığında GSH ve MT düzeyleri araştırılmıştır. Araştırmacılar, balıkları 14 gün süreyle bu metallerin 0, 5, 10 ve 20 µM'lık konsantrasyonlarına maruz bırakmışlardır. Metal ve GSH düzeylerini karaciğer, solungaç, kas ve kanda, MT düzeyini ise karaciğerde incelemişlerdir. Araştırma sonuçlarına göre; Cu birikimi sadece solungaçta, Zn birikimi sadece kas dokuda, Pb birikimi karaciğer ve solungaçta, Cd birikimi ise bütün dokularda belirlenmiştir. Metaller maruz kalma sonucu kan, kas ve solungaç GSH düzeylerinde önemli bir değişim belirlenmemesine rağmen, Cd, Zn ve Cu'nun karaciğer GSH düzeyini önemli düzeyde arttırdığı belirlenmiştir. Karaciğer MT düzeyinin, sadece Cd'ye maruz

birakılan balıklarda önemli düzeyde arttığı diğer metallerde önemli bir değişimin olmadığı belirlenmiştir.

Shah ve Altındağ [154] tarafından, kadife balığında (*Tinca tinca*) Hg, Cd ve Pb birikimini ve bu birikime bağlı olarak 96 saatlik LC₅₀ değerlerindeki değişim araştırılmıştır. Balıklarda Hg, Cd ve Pb konsantrasyonları sırasıyla 0.011, 0.32 ve 1.59 mg/g ve 96-saatlik LC₅₀ değerleri ise 1.0, 6.5 ve 300 mg/L şeklinde bulunmuştur. Bu metallerin genel birikim sırası ve ilgili 96-saatlik LC₅₀ değerleri Hg< Cd< Pb olarak bulunmuştur. En az metal birikimi belirlenen balıklar için 96-saatlik LC₅₀ değerlerinin de düşük olduğu gözlenmiştir. Araştırmacılar balıklarda metal birikiminin 96-saatlik LC₅₀ değerleri üzerinde önemli bir etkisi olduğunu rapor etmişlerdir.

Oliveira vd. [52] tarafından Cu'nun yılan balıkları (*Anguilla anguilla*) üzerinde toksik etkisinin değerlendirildiği çalışmada, 0.2 µmol/L bakıra (CuCl₂) maruz bırakılan hayvanların karaciğer metalotiyonein düzeyinde önemli bir artış gözlenmiştir. Belirtilen Cu uygulamasının plazma kortizol ve plazma serbest triiodotironin düzeyinin azalmasına neden olduğu ve eritrositik nükleer anormalliklerin arttığı ve bunun genotoksik etkiden dolayı olduğu iddia edilmektedir.

Yapılan bir çalışmada araştırmacılar, *Halichoerus grypus*'un (fok) lökositlerini *in vitro* koşullarda çinko ve kadmiyumun etkisine maruz bırakarak MT'lerin indüksiyonunu incelemişlerdir. Araştırmacılar, *in vitro* Zn ve Cd etkisinde lökositlerde iki farklı MT izoformunun (MT1 ve MT2) sentezinin meydana geldiğini ve metallerin regülasyonunda bu proteinlerin önemli roller üstlendiğini belirtmişlerdir [155].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. *Xenopus laevis* Yumurta ve İribaşlarının Sağlanması

Çalışmada kullanılan *Xenopus laevis* türü amfibi iribaşları, İnönü Üniversitesi Biyoloji Bölümü Çevre Toksikolojisi Araştırma Laboratuvarında yaşatılmakta olan koloniden elde edildi. Çalışmada yumurta elde edilirken her seferinde farklı ergin dişi ve erkek *X. laevis* bireyleri kullanıldı. Bu laboratuvarın ortam sıcaklığı devamlı olarak $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de tutulmakta olup; deneysel çalışmalarda aynı ortamda yürütüldü ve tüm çalışmalar ergin bireylerin yaşatılmakta olduğu ortam koşullarında sürdürüldü. Ayrıca, çalışma ortamında 12:12 saat aydınlık:karanlık ışık periyodu uygulandı. Çalışmada kontrol amaçlı kullanılan ve içerisinde yumurta ve iribaş gelişiminin sağlandığı FETAX solüsyonu, Tip I ASTM standartlarına uygun şekilde hazırlandı [156]. Buna göre 1 L distile suda 625 mg NaCl, 96 mg NaHCO_3 , 30 mg KCl, 15 mg CaCl_2 , 60 mg $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 75 mg MgSO_4 olacak şekilde FETAX solüsyonu her kullanımdan önce taze olarak hazırlandı.

Uygulama öncesi erkek ve dişi erginler 100 x 40 x 60 cm (Boy:En:Derinlik) boyutlarında ayrı akvaryumlara alınarak 48 saat süreyle bekletildi. Yumurta eldesi amacıyla Birhanlı tarafından uygulanan protokol kullanıldı [4]. Yumurtaların elde edilmesi istenen günden 36 saat önce, erkek kurbağaya 200 IU insan koryonik gonadotropin hormonu (hCG) (Pregnyl® 5000 IU, Organon) dorsal lenf bezlerinden enjekte edildi. 36 saatin sonunda dişiye 600 IU, önceden hormon uygulanmış erkeğe ise 300 IU hCG enjekte edildi. Enjeksiyon için 1 ml'lik insülin enjektörleri (0.3x8 mm) (Becton Dickinson) kullanıldı. Enjeksiyon tamamlandıktan sonra erkek ve dişi kurbağalar aynı akvaryuma konup, karartma amacıyla akvaryumun üzeri örtüldü ve sessiz bir ortam sağlandı. Hormon enjeksiyonunu takiben 2 ile 6 saat sonra amplexus başladı ve 10-16 saat yumurta dökme devam etti. Yumurtalar metal toksisitesinde kullanılacakları 46. evreye kadar (4 gün 10 saat) içinde FETAX solüsyonu bulunan ve sürekli havalandırılan plastik küvette bekletildi.

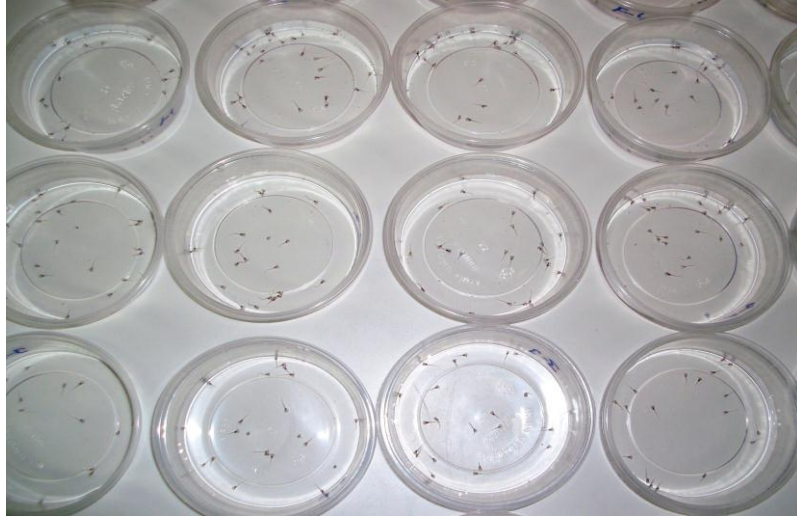
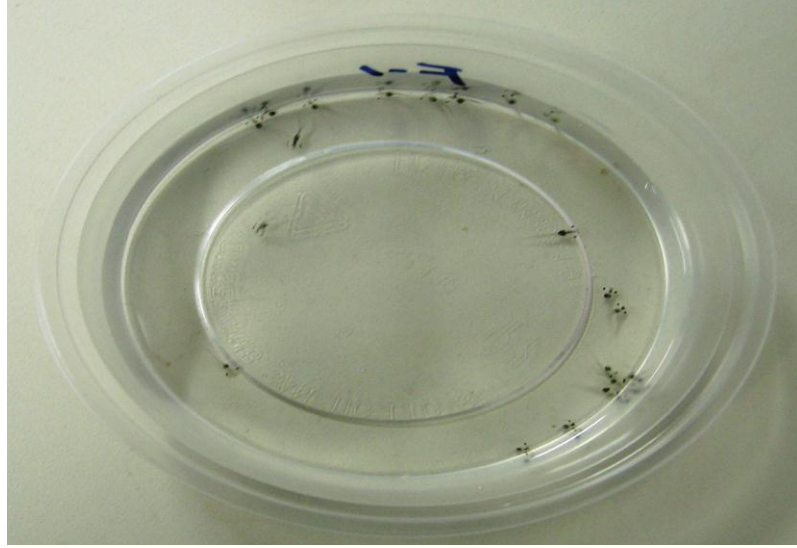
3.2. Metallerin LC₅₀ Değerlerinin ve Uygulama Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Çalışmada Cd, Pb ve Cu'nun toksisitesini belirlemek amacıyla CdCl₂ (Sigma-Aldrich), PbCl₂ (Sigma-Aldrich) ve CuCl₂ (Merck) tuzları kullanıldı. Bu metallerin uygulama konsantrasyonları Avrupa Birliği (AB) içme suları yönetmeliğinde [38] belirtilen kabul edilebilir sınır değerler ve 96 saatlik test sonucu elde edilen ortalama öldürücü konsantrasyon (LC₅₀) değerlerine bağlı olarak belirlendi. Buna göre metallerin uygulama konsantrasyonları;

- Cd için; 0.005 (AB limit değeri), 0.52 (LC₅₀/10), 2.59 (LC₅₀/2) ve 5.18 mg/L (LC₅₀)
- Pb için; 0.01 (AB limit değeri), 12.3 (LC₅₀/10), 61.53 (LC₅₀/2) ve 123.05 mg/L (LC₅₀)
- Cu için; 0.01, 0.085 (LC₅₀/10), 0.425 (LC₅₀/2) ve 0.85 mg/L (LC₅₀) olarak belirlendi.

3.3. Metal Toksisitesinin Belirlenmesi

Cd, Pb, Cu ve bunların karışımlarının, *X. laevis* iribaşları üzerindeki subletal etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla iki farklı uygulama grubu kuruldu. Birinci uygulama grubunda, 46. evredeki amfibi iribaşları her bir metalin ve bunların karışımlarının bir seri subletal konsantrasyonuna 96 saat süre ile statik yenilemeli test ortamında maruz bırakıldı. İribaşlar uygulamanın başlatılmasını takiben 24., 48., 72. ve 96. saatlerde kontrol edildi. Ölü iribaşlar ortamdan alındıktan ve sayıları kaydedildikten sonra, metal çözeltileri yenilendi. İkinci uygulama grubunda ise metallerin 96 saatlik LC₅₀ ve LC₅₀/2 değerlerinin karışımlarına iribaşlar 24 saat süresince maruz bırakıldı. Her iki uygulama grubunda, her bir konsantrasyon için sekiz ayrı kapta, 20 şer iribaş olacak şekilde deney düzeneği kuruldu (Şekil 3.1). Her iki uygulama sonunda ortamdaki ölü iribaşlar uzaklaştırıldıktan sonra, kalan iribaşlar ependorf tüplerine aktarıldı ve buz üzerinde uyuşmaları sağlanarak enzim aktivitesi ve metalotiyonein tayininin yapılacağı zamana kadar -80°C'de derin dondurucuya kaldırıldı.



Şekil 3.1. Metal toksisitesi deney düzeneği.

3.4. Ortam pH'sının Saptanması

Deneylerde statik yenilemeli test sistemi kullanıldığından, iribaşların maruz kaldıkları ortamın pH değerleri de ölçüldü. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda metal çözeltisi bulunan kaplar için 0., 24., 48., 72., ve 96. saatlerdeki pH değerleri periyodik olarak kaydedildi. Böylece toksik etkinin ortamdaki pH değişimine bağlı olarak ortaya çıkıp çıkmadığının saptanması amaçlandı.

3.5. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Bütün enzim aktivitesi ve toplam protein miktarı ölçüm işlemleri, dokuların homojenizasyonu ve santrifüj işleminden hemen sonra, örnekler bekletilmeksizin mikropilaka okuyucu sistem (Versamax[®], Molecular Devices Corp., USA) kullanılarak yapıldı. Enzim aktivitesi ve toplam protein miktarı ölçümlerinde, her bir örnek için üç tekrarlı absorbans okuması yapıldı. Aynı örnek için elde edilen değerler arasında % 10'dan daha büyük korelasyon farkı bulunduğunda, okuma işlemi yinelenildi. Bütün enzimlerin aktiviteleri, örneklerdeki toplam protein düzeyleri ölçüldükten sonra spesifik aktivite (nmol/dk/mg total protein) cinsinden ifade edildi.

3.5.1. İribaşların Homojenizasyon ve Santrifüj İşlemleri

Örneklerin homojenizasyonuna başlamadan önce, iribaşların bulunduğu ependorf tüpleri buz üzerinde çözülmeye bırakıldı ve su damlacıkları pastör pipeti ile uzaklaştırıldıktan sonra tartıldı. Homojenizasyon toplam iribaş ağırlığının 4 katı hacminde (w/v) soğutulmuş homojenizasyon tamponu (0.1 M, pH 7.4 potasyum fosfat tamponu içinde; 0.15 M KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) içinde yapıldı. İribaş örnekleri buz kabı içinde cam-teflon homojenizatör (Heidolph[®] RZ 2021) kullanılarak, 2000 rpm'de 30 saniye süreyle parçalandı. Homojenizasyon sonrası homojenatlar ependorf tüplerine aktarıldı. Homojenat 4°C'de 16,000 xg devirde 20 dakika süre ile santrifüj (Sigma[®] 2-16k) edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı alınarak S16 fraksiyonlarında enzim aktiviteleri ölçüldü. Çalışmaların tüm aşamalarında örnekler buz içerisinde korundu.

3.5.2. Glutasyon S-transferaz Aktivitesi

S16 fraksiyonlarında GST aktivitesini belirlemek amacı ile mikrolaka okuyucu sistem kullanıldı. Substrat olarak, %96'lık etanol içinde hazırlanan 20 mM 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) kullanıldı. Reaksiyonda kofaktör olarak redükte glutasyon (0.002 M) kullanıldı [157]. Mikrolaka kuyucuklarına sırası ile 10 µL süpernatant, 100 µL fosfat tamponu (0.1 M, pH 6.5) + 100 µL GSH karışımı ve son olarak 10 µL CDNB pipetlendi. Karışım mikrolaka okuyucu sisteme yerleştirildikten sonra 15 sn süre ile karıştırıldı ve 25°C'de 2 dakika süre ile 344 nm'de absorbans değişimi kaydedildi. Spesifik GST aktivitesi nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplandı.

3.5.3. Glutasyon Redüktaz Aktivitesi

S16 fraksiyonlarında GR aktivitesi tayini Cribb vd. [158] tarafından kullanılan mikrolaka sistemi ile ölçüm yöntemine göre yapıldı. Reaksiyon solüsyonu 0.1 mM, 150 µl 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB), 1.2 mM, 20 µl NADPH ve 20 µl örnek içermektedir. Yirmi µl, 3.25 mM GSSG'nin ilavesi ile reaksiyon başlatıldı. Bütün çözeltiler, 1 mM EDTA içeren, 0.1 M potasyum fosfat tamponunda (pH 7.5) hazırlandı. Reaksiyon ilerledikçe GSSG'den GSH oluşumu nedeniyle azalan DTNB miktarı oda sıcaklığında 3 dakika süre ile 405 nm'de izlendi ve elde edilen absorbans değerlerinden spesifik GR aktivitesi nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplandı.

3.5.4. Karboksilesteraz Aktivitesi

S16 fraksiyonlarında CaE aktivitesini belirlemek amacı ile önerilen spektrofotometrik yöntem mikrolaka okuyucu sisteme uyarlandı. Aktivite tayininde 26 mM %96'lık etanol içinde hazırlanan *p*-nitrofenol asetat (PNPA) substrat olarak kullanıldı [159,160]. Bu amaçla 5 µL örnek ve 250 µL, 0.05 M trizma pH 7.4 tamponu (Sigma-Aldrich, T7693) kuyucuklara pipetlendi ve 25°C'de 3 dakika ön inkübasyona bırakıldı. Daha sonra, son konsantrasyon 0.5 mM olacak şekilde 5 µL *p*-nitrofenol asetat kuyucuklara ilave edildi ve 2 dakika süreyle 405 nm'de OD okuması yapıldı. Kör olarak distile su kullanıldı. Spesifik CaE aktivitesi nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplandı.

3.5.5. Asetilkolinesteraz Aktivitesi

S16 fraksiyonlarında AChE aktivitesi spektrofotometrik yöntem ile tayin edildi. Bu amaçla Ellman vd. [161] tarafından kullanılan yöntemin, Özmen vd. [162] tarafından modifiye edilmiş ve mikrolaka okuyucu sistemine uyarlanmış şekli kullanıldı. Enzim aktivitesi ölçümünde asetilkolin iodid (ACTI) substrat olarak kullanıldı ve renk değişimine bağlı olarak ürün oluşumu saptandı. İribaşlardan elde edilen süpernatant toplam reaksiyon karışımında 10 µl olacak şekilde mikrolaka kuyucuklarına pipetlendi. Süpernatantın üzerine son reaksiyon karışımında 0.701 mM ACTI ve 0.136 mM DTNB olacak şekilde, 0.1 M trizma pH 8.0 tamponu (Sigma-Aldrich, T8483) içerisinde hazırlanmış karışımdan 200 µl ilave edildi. Karışım mikrolaka okuyucuya yerleştirildi ve 10 saniye süreyle çalkalandı. 25°C'de 1 dakika süre ile 412 nm dalga boyunda absorbans değişimi kaydedildi. Spesifik AChE aktivitesi nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplandı.

3.5.6. Katalaz Aktivitesi

S16 fraksiyonlarında CAT aktivitesi Aebi (1974) tarafından önerilen spektrofotometrik yöntem ile tayin edildi [163]. Enzim aktivitesinin, 240 nm dalga boyunda substrat olarak kullanılan hidrojen peroksitin (H_2O_2) tüketimine bağlı olarak saptanması amaçlandı. Bu amaçla 1 ml'lik kuvartz küvete, 20 µl örnek ve 480 µl 12.5 mM H_2O_2 içeren 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0) pipetlendi. 25°C'de 1 dakika süreyle absorbans değişimi kaydedildi. Spesifik CAT aktivitesi nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplandı.

3.5.7. Glutatyon Peroksidaz Aktivitesi

S16 fraksiyonlarında GPx aktivitesi Bell vd. [164] tarafından önerilen spektrofotometrik yöntemin modifiye edilmiş ve mikrolaka okuyucu sistemine uyarlanmış şekli kullanıldı. Enzim aktivitesi ölçümünde H_2O_2 substrat olarak, sodyum azid (NaN_3) ise katalaz inhibitörü olarak kullanıldı. Bu amaçla, mikrolaka kuyucuklarına 10 µl süpernatant ve 160 µl 1 mM GSH, 0.1 mM NADPH, 0.32 ünite GSH-redüktaz, 1 mM EDTA, 2 mM NaN_3 içeren 50 mM pH 7.4 fosfat tamponu pipetlendikten sonra bu karışım 20°C'de 6 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra

kuyucuklara 30 µl 1.67 mM H₂O₂ pipetlenerek reaksiyon başlatıldı. NADPH oksidasyonuna bağlı olarak absorbans değişimi 25°C’de 3 dakika süreyle 340 nm’de kaydedildi. Spesifik GPx aktivitesi nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplandı.

3.6. Metalloiyonein Tayini

Subletal metal konsantrasyonlarına maruz bırakılan iribaşların spektrofotometrik ve elektroforetik-florimetrik olarak metalloiyonein miktarı ölçümü için Viarengo vd. [165] tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek kullanıldı. Spektrofotometrik yöntem mikropilaka okuyucu sisteme (Versamax®, Molecular Devices Corp., USA) uyarlandı ve her bir örnek için üç tekrarlı absorbans okuması yapıldı.

3.6.1. İribaşların Homojenizasyon ve Santrifüj İşlemleri

Homojenizasyona başlamadan önce iribaşların bulunduğu ependorf tüpleri buz üzerinde çözülmeye bırakıldı ve daha sonra ependorflardaki iribaşlar tartıldı. İribaşlar, her bir ependorfdaki toplam iribaş ağırlığının 3 katı hacminde (w/v) soğutulmuş homojenizasyon tamponu (0.5 M sükröz, 0.5 mM PMSF ve 0.01% b-merkaptoetanol içeren 20 mM tris-HCl pH 8.6) içinde cam-teflon homojenizatör kullanılarak, 2000 rpm’de 30 saniye süreyle parçalandı. Homojenizasyon sonrası homojenatlar ependorf tüplerine aktarıldı ve 4°C’de 15,000 xg devirde 30 dakika süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı alınarak metalloiyonein tayini için kullanıldı. Çalışmanın tüm aşamalarında örnekler buz içerisinde korundu.

3.6.2. Metalloiyoneinin Yoğunlaştırılması, Saflaştırılması ve Miktar tayini

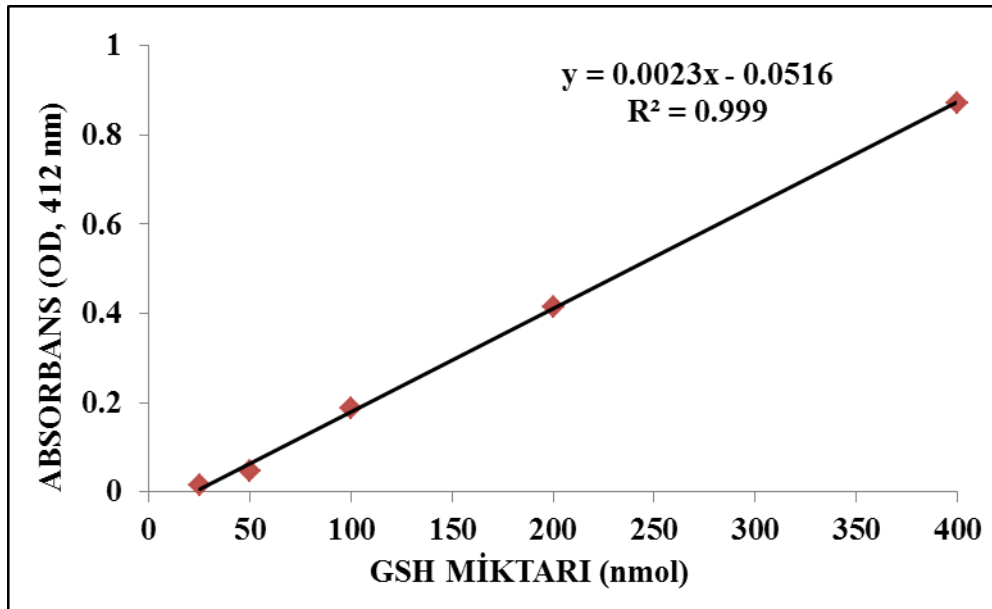
Homojenize edilmiş iribaş örnekleri 15,000 xg’de 30 dakika santrifüj edildikten sonra çeşitli işlemlerden geçirildi. Bu işlemler hem spektrofotometrik hem de elektroforetik-florimetrik MT tayini için belirli bir noktaya kadar ortak iken, daha sonra örnekler farklı işlemlere tabii tutuldular. Her iki yöntemde de ortak olan işlemler aşağıda belirtildiği gibi yapıldı. Bunlar sırasıyla;

- 1- Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantın her 1 ml’si başına 80 µL kloroform ve 1.05 ml soğuk etanol eklendi. Bu karışım 6000 xg’de 10 dakika santrifüj edildi.

- 2- Santrifüj sonrası elde edilen süpernatanta 3 katı hacminde soğuk etanol eklendi ve -20°C'de 1 saat bekletildi. Bu örnekler daha sonra 6000 xg 'de 10 dakika santrifüj edildi.
- 3- Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı. Elde edilen pelet %87 etanol ve %1 kloroform içeren homojenizasyon tamponu ile yıkandı. Bu örnekler 10 dakika 6000 xg 'de santrifüj edildi.

3.6.2.1. Metalotiyoneinin Spektrofotometrik Olarak Tayini

Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve pelet 300 μ l 1 mM EDTA içeren 5 mM tris-HCl (pH 7) içinde resüspanse edildi. Daha sonra resüspanse edilmiş örneklere 0.43 mM DTNB içeren 0.2 M sodyum-fosfat tamponundan (pH 8) 4.2 ml eklendi. Bu örnekler 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 3000 xg 'de 5 dakika santrifüj edildi ve hemen ardından mikropilaya kuyucuklarına 250 μ l örnek pipetlenerek 412 nm'de absorban ölçümü yapıldı. Elde edilen absorban değerleri oluşturulan GSH standart eğrisindeki değerler ile karşılaştırılarak örneklerdeki MT miktarı tayin edildi. MT miktarı 1 nmol GSH = 1 nmol -SH = 0.055 nmol MT eşitliğine göre hesaplandıktan sonra nmol MT / gr yaş ağırlık olarak ifade edildi.



Şekil 3.2. GSH standart eğrisi.

3.6.2.2. Metalloitiyoneinin Elektroforetik-Florimetrik Olarak Tayini

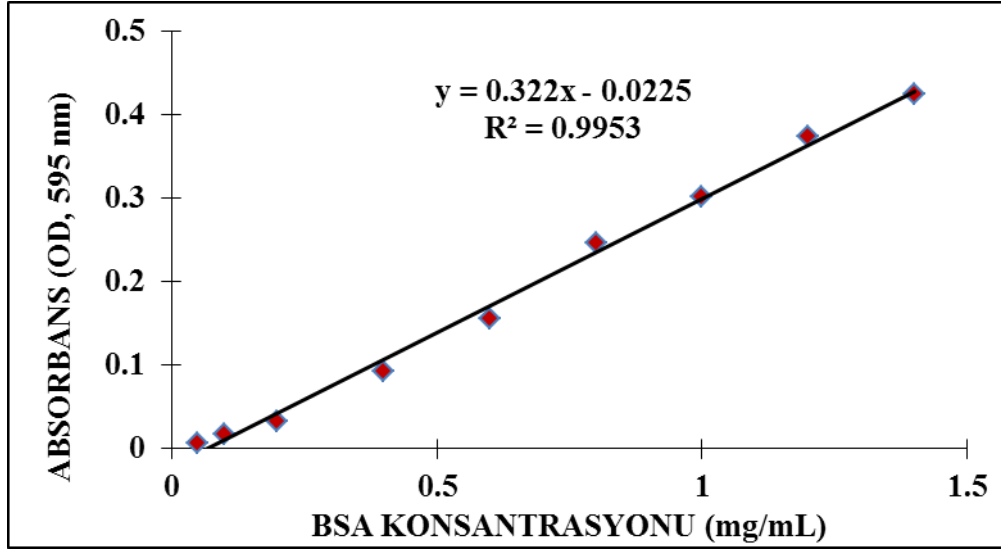
Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak elde edilen pelet ve protein belirteci olarak kullanılan tavşan karaciğer MT II'si (Alexis Biochemicals®, Enzo Life Science®, Switzerland), 6 mM tiyolat (momobromobimane-mBBR; Sigma-Aldrich, USA) içeren 100 µl 150 mM tris-HCl (pH 7) içinde resüspanse edildi. mBBR çözeltisi öncelikle asetonitril içinde 92 mM'lık stok solüsyon olarak hazırlandı ve bu stok solüsyondan 150 mM tris-HCl (pH 7) içinde 6 mM olacak şekilde kullanıldı. Örnekler daha sonra karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra her örneğe %4'lük SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) çözeltisi eklendi ve örnekler 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Bromfenol mavisi (%0.05) ve gliserol içeren örnekler 2-3 dakika ısıtıldı. Örnekler oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra her örnekten jele yükleme yapıldı.

SDS-PAGE elektroforez uygulamasında mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ (BIO-RAD) marka hazır elektroforez jelleri kullanıldı. Örnekler ve protein belirteci kuyucuklara yüklendikten sonra içinde yürütme tamponu bulunan yürütme tankına (mini-PROTEAN® Tetra cell; BIO-RAD) alındı ve 40 mA/jel sabit akımda yaklaşık 30 dakika süreyle yürütüldü. Yürütme işleminden sonra protein bantlarındaki florensans ışımayı görüntüleyebilmek için jel UV/White Light transilluminatör (Spectroline®, BI-O-VISION™) üzerine alındı ve fotoğrafı çekildi (Nikon D3000). Daha sonra jeller Zehr vd. [166] tarafından oluşturulan protokole bağlı olarak coomassie brilliant mavi R-250 ile boyandı ve fotoğrafı çekildi. Bu protokole göre %10 etanol (v:v), %5 glasiyel asetik asit (v:v) ve %0.005 (w/v) coomassie brilliant mavi R-250 içeren çözelti distile su içinde hazırlandı.

3.7. Toplam Protein Miktarı Tayini

İribaş homojenatlarında toplam protein miktarları Bradford [167] tarafından geliştirilen yönteme göre, mikropilaka okuyucu sisteme uyarlanarak tespit edildi. Süpernatant örnekleri 1/4 oranında sulandırıldıktan sonra, sulandırılmış örneklerden 5 µl mikropilaka kuyucuklarına pipetlendi ve üzerine 250 µl Bradford çözeltisi (Sigma B6916, USA) eklendi. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında karanlıkta en az 15 dakika süreyle inkübe edildi. Renk değişimine bağlı olarak, 595 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçüldü. Örneklerdeki toplam protein değerleri bir bilgisayar paket programı

(Slide) kullanılarak, elde edilen değerler ile BSA standart eğrisi değerleri karşılaştırılarak hesaplandı. Daha sonra sulandırım faktörü göz önünde bulundurularak süpernatantlardaki toplam protein değerleri hesaplandı. Elde edilen toplam protein değerleri, spektrofotometrik okuma değerlerine göre hesaplanan S16 fraksiyonları enzim aktivitesi değerleri kullanılarak, spesifik aktivite değerlerinin hesaplanmasında kullanıldı.



şekil 3.3. BSA standart eğrisi.

3.8. İstatistiksel Analiz ve Hesaplamalar

Bulguların istatistiksel olarak değerlendirilmesi amacıyla istatistik paket programları kullanıldı. İribaşlarda enzimatik analiz sonucunda elde edilen bulguların analizi için SPSS programı (SPSS Inc., USA), LC_{50} (ortalama öldürücü konsantrasyon) değerlerinin saptanması için EPA tarafından geliştirilen Finney'in probit analizi paket programı kullanıldı. Ölüm oranlarının ve enzim aktivitelerinin uygulama gruplarına bağlı olarak test edilmesi amacıyla varyans analizi (One-Way ANOVA) yöntemi uygulandı. Gruplar arası farklılık düzeyi en az %95 olasılık ile ($p < 0.05$ için) önemli olarak değerlendirildi. Buna bağlı olarak, gruplar arası farklılığın önemli olup olmadığı $p < 0.05$ düzeyinde önem seviyesine göre saptandı. Gruplar arası farklılığın önemli olduğu saptandığında enzim aktiviteleri için örnekler ikili karşılaştırma ile non-parametrik Mann-Whitney U testine göre kontrol grubu verileri ile karşılaştırıldı. NOAEC ile LOAEC değerlerinin hesaplanmasında ve ölüm oranları için örneklerin ikili karşılaştırılmasında Dunnett-t testi kullanıldı. Grup içi farklılığın $p < 0.05$ ve $p < 0.01$ düzeyinde önemli bulunduğu gruplar saptandı.

4. BULGULAR

Tez çalışmasında iki farklı uygulama süresinde metal toksisitesini ve etkilerini belirlemek üzere tüm aşamalarda iki farklı uygulama grubu kuruldu. Öncelikle 46. evredeki *Xenopus laevis* iribaşları metal ve metal karışımlarının belirlenen bütün konsantrasyonlarına 96 saat statik yenilemeli test düzeneğinde maruz bırakıldı. Buna bağlı olarak seçilen metal ve metal karışımlarının ortalama öldürücü konsantrasyon (LC_{50}) değerleri belirlendi. Çalışmanın ikinci aşamasında ise 46. evredeki *X. laevis* iribaşları 96 saatlik uygulama sonuçlarına göre hesaplanan LC_{50} ve $LC_{50}/2$ değerlerine 24 saat süresince maruz bırakılarak, biyobelirteç olarak seçilen enzimlerin ve metalotiyonein düzeylerindeki değişimin saptanması amaçlandı.

Çalışmada homojenizasyon işlemleri, santrifüj işlemleri ve kullanılan kimyasallar farklı olduğu için, bireylerin metal toksisitesine maruziyeti sonucunda seçilen enzimatik biyobelirteçlerde ortaya çıkan yanıtları belirlemede ayrı, metalotiyonein tayininde kullanmak için de ayrı metal ve/veya karışım uygulamaları kuruldu. Uygulama sürecinin hiçbir aşamasında deneylerde kullanılan iribaşlar beslenmedi. Her bir metal ve/veya metal karışımı uygulamasında 800 adet iribaş gerektiği için uygulamalarının hepsi aynı zamanda kurulamamış olup, çalışmalar süresince farklı dönemlerde gereksinim duyulan yumurtaların eldesinde farklı ergin dişi ve erkek kurbağalar kullanıldı ve elde edilen iribaşlarla farklı zamanlardaki uygulamalar çalışıldı. Bundan dolayı farklı zamanlarda kurulan her metal ve/veya metal karışımı uygulamasında ayrı kontrol grupları oluşturuldu. Bütün istatistiksel değerlendirmeler uygulamaların kendilerine ait kontrol grupları ile karşılaştırılmasına göre yapıldı. Farklı ebeveynlerden elde edilen iribaşların metal toksisitesine verdiği yanıtlar karşılaştırılarak, deneyler arasında korelasyon olup olmadığı analiz edildi ve farklı deneyler arasında bir korelasyon olduğu saptandı.

Çalışmada, iki farklı uygulama grubu olduğu için, bulgular değerlendirilirken 24 ve 96 saatlik iki ayrı grup olarak incelendi.

4.1. 96 Saatlik Çalışmalar İle İlgili Bulgular

4.1.1. 96 Saatlik LC₅₀, NOAEC ve LOAEC Değerleri

Çalışmada kullanılan kadmiyum (Cd), bakır (Cu) ve kurşun (Pb)'un LC₅₀ değerlerinin belirlenmesi amacıyla, yapılan ön çalışma verileri göz önünde bulundurularak, seçilen konsantrasyonlarda her bir metal/metal karışımı etkisine maruz bırakılan iribaşlar için 46. evrede 96 saatlik LC₅₀, NOAEC ve LOAEC değerleri hesaplandı. Bu çalışmalar sonucu elde edilen değerler çizelge 4.1'de verilmiştir. Bu verilere göre metallerin 96 saatlik LC₅₀, NOAEC ve LOAEC değerleri bakımından Pb>Cd>Cu şeklinde bir ilişki saptanmıştır.

Çizelge 4.1. Metallerin 96 saatlik LC₅₀, NOAEC ve LOAEC değerleri.

Metal	LC ₅₀ (mg/L)	NOAEC (mg/L)	LOAEC(mg/L)
Cd	5.18	3.5	4.9
Pb	123.05	105.8	121.67
Cu	0.85	0.410	0.655

LOAEC; Olumsuz etki görülen en düşük konsantrasyon.

NOAEC; Hiçbir olumsuz etkinin görülmediği konsantrasyon.

4.1.2. 96 Saatlik Uygulamalarda Ortamların pH Değerleri

Seçilen metallere organizmaların maruz kalacakları ortamda uygulamalar esnasında 24 saatlik periyotlarda bir pH değişiminin olup olmadığının saptanması önemlidir. Çünkü 24 saatlik aralıklarla kaplardaki metal çözeltileri yenilendiği için, ortamın pH değişimi toksisiteyi etkileyen bir faktör olabilir. Bu nedenle çalışmada kullanılan metal tuzu çözeltilerinin pH değerleri 0., 24., 48., 72. ve 96. saatlerde ölü iribaşlar ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra kaplardaki çözeltiler yenilenmeden önce ölçülerek kaydedildi. Çalışmada, enzim çalışmaları için ayrı (Grup A), metalotiyonein (MT) çalışmaları için ayrı (Grup B) deney düzenekleri kurulduğundan, 96 saat sonundaki ortalama pH değerleri gruplar halinde çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çözelti pH'larının 96 saat sonundaki ortalama değerlerine göre metal ve karışımların pH değerlerinde toksisiteyi etkileyecek düzeyde değişim belirlenmemiştir.

Çizelge 4.2. 96 saatlik çalışmalarda elde edilen ortalama pH değerleri.

Konsantrasyon (mg/L)	Cd	Pb	Cu ^b	Cd+Cu	Pb+Cd	Pb+Cu	Pb+Cd+Cu
Kontrol-A	7.85	7.98	7.75	7.66	7.66	7.63	7.74
AB Değeri-A^a	8.00	8.09	7.81	7.77	7.82	7.76	7.85
LC₅₀/10-A^a	8.05	8.09	7.86	7.80	7.83	7.76	7.86
LC₅₀/2 -A^a	8.04	7.98	7.89	7.75	7.72	7.62	7.50
LC₅₀-A^a	7.99	7.80	7.98	7.70	7.45	7.29	7.11
Kontrol-B	7.85	7.80	7.63	7.74	7.74	7.80	7.80
AB Değeri-B^a	8.04	7.75	7.77	7.78	7.78	7.64	7.67
LC₅₀/10-B^a	8.05	7.72	7.81	7.76	7.73	7.72	7.69
LC₅₀/2 -B^a	8.05	7.61	7.85	7.91	7.74	7.60	7.47
LC₅₀-B^a	7.98	7.25	7.84	7.79	7.62	7.06	7.05

Grup-A; Enzim çalışmaları, Grup-B; MT çalışmaları.

^a: **AB Değeri**: Cd için; 0.005, Cu için; 0.01, Pb için; 0.01 mg/L

LC₅₀/10: Cd için; 0.52, Cu için; 0.085, Pb için; 12.3 mg/L

LC₅₀/2: Cd için; 2.59, Cu için; 0.425, Pb için; 61.53 mg/L

LC₅₀: Cd için; 5.18, Cu için; 0.85, Pb için; 123.05 mg/L

^b: Cu için belirlenen en düşük konsantrasyon AB sınır değeri değildir.

4.1.3. 96 Saatlik Çalışmalarda Belirlenen Ölüm Oranları

Metal ve metal karışımlarının etkisine 96 saat süresince maruz bırakılan 46. evredeki iribaşlarda meydana gelen ölümler test süresince kaydedildi. MT çalışmaları ve enzimatik çalışmalar için ayrı deney düzenekleri kurulduğu için her iki çalışmaya ait ölüm oranları çizelge 4.3 ve 4.4’de verilmiştir. Hem enzim hem de MT çalışmalarında metallerin ve karışımlarının özellikle LC₅₀/2 ve LC₅₀ değerlerinde görülen ölümler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.01$).

Çizelge 4.3. 96 saatlik enzim çalışmalarında belirlenen ölüm oranları.

Konsantrasyon (mg/L)	n	Cd		Pb		Cu ^b		Cd+Cu		Pb+Cd		Pb+Cu		Pb+Cd+Cu	
		Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)	Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)	Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)	Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)	Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)	Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)	Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)
Kontrol	160	2	1.25	2	1.25	0	0	8	5	8	5	0	0	9	5.63
AB Değeri ^a	160	3	1.88	1	0.63	3	1.88	9	5.63	11	6.88	2	1.25	11	6.88
LC ₅₀ /10 ^a	160	3	1.88	2	1.25	1	0.63	7	4.38	7	4.38	3	1.875	12	7.5
LC ₅₀ /2 ^a	160	20*	12.5	5	3.13	10	6.25	160*	100	6	3.75	138*	86.25	160*	100
LC ₅₀ ^a	160	100*	62.5	66*	41.25	72*	45	160*	100	160*	100	160*	100	160*	100

*: $p < 0.01$ kontrol ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.

^a: AB Değeri: Cd için; 0.005, Cu için; 0.01, Pb için; 0.01 mg/L

LC₅₀/10: Cd için; 0.52, Cu için; 0.085, Pb için; 12.3 mg/L

LC₅₀/2: Cd için; 2.59, Cu için; 0.425, Pb için; 61.53 mg/L

LC₅₀: Cd için; 5.18, Cu için; 0.85, Pb için; 123.05 mg/L

^b: Cu için belirlenen en düşük konsantrasyon AB sınır değeri değildir.

Çizelge 4.4. 96 saatlik MT çalışmalarında belirlenen ölüm oranları.

Konsantrasyon (mg/L)	n	Cd		Pb		Cu ^b		Cd+Cu		Pb+Cd		Pb+Cu		Pb+Cd+Cu	
		Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)	Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)	Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)	Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)	Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)	Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)	Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)
Kontrol	160	5	3.13	2	1.25	0	0	9	5.63	9	5.63	2	1.25	2	1.25
AB Değeri^a	160	1	0.63	2	1.25	0	0	11	6.88	12	7.5	6	3.75	2	1.25
LC₅₀/10^a	160	2	1.25	0	0	0	0	8	5	9	5.63	5	3.13	13*	8.13
LC₅₀/2^a	160	18	11.25	3	1.88	21*	13.13	160*	100	6	3.74	148*	92.5	160*	100
LC₅₀^a	160	97*	60.63	76*	47.5	75*	46.88	160*	100	160*	100	160*	100	160*	100

*: $p < 0.01$ kontrol ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.

^a: **AB Değeri**: Cd için; 0.005, Cu için; 0.01, Pb için; 0.01 mg/L

LC₅₀/10: Cd için; 0.52, Cu için; 0.085, Pb için; 12.3 mg/L

LC₅₀/2: Cd için; 2.59, Cu için; 0.425, Pb için; 61.53 mg/L

LC₅₀: Cd için; 5.18, Cu için; 0.85, Pb için; 123.05 mg/L

^b: Cu için belirlenen en düşük konsantrasyon AB sınır değeri değildir.

4.1.4. 96 Saatlik Cd Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi

Kadmiyumun belirlenen konsantrasyonlarına 96 saat süreyle maruz kalan *Xenopus laevis* iribaşlarında çeşitli enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler çizelge 4.5' de verilmiştir. Cd'un en düşük uygulama konsantrasyonu olan 0.005 mg/L'nin (AB mevzuatına göre su kaynakları için kabul edilebilir sınır değer) çalışılan enzimler üzerinde çeşitli değişimlere neden olduğu ancak, bu değişimlerin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olmadığı bulundu ($p>0.05$).

Diğer taraftan, GST aktivitesinin daha yüksek düzeyde Cd konsantrasyonuna maruz kalan iribaşlarda konsantrasyonla ilişkili olarak arttığı ve en yüksek GST aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak %700 oranında artış ile 820.59 ± 56.36 nmol/dk/mg protein olarak 5.18 mg/L Cd'da (LC_{50} değeri) saptandı ve bu artış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.01$). Aynı şekilde, GST aktivitesinin 0.518 mg/L ($LC_{50}/10$ değeri) ve 2.59 mg/L ($LC_{50}/2$ değeri) Cd konsantrasyonlarında arttığı ve bu artışların da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı ($p<0.01$).

GR aktivitesinin, GST enzimi gibi Cd konsantrasyonlarıyla ilişkili bir şekilde arttığı bulundu. Buna göre, en yüksek GR aktivitesi kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak %450 oranında artış ile 56.46 ± 2.55 nmol/dk/mg protein olarak 5.18 mg/L Cd'da (LC_{50} değeri) ölçüldü ve bu artış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.01$). Kadmiyumun 2.59 mg/L ($LC_{50}/2$ değeri) konsantrasyonuna maruz kalan iribaşlarda GR aktivitesinin arttığı ve bu artışında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ($p<0.01$).

GPx aktivitesinde, Cd konsantrasyonlarıyla ilişkisi olmayan değişimler belirlendi. En yüksek ve en düşük GPx aktivitesi sırasıyla 2.59 mg/L ($LC_{50}/2$ değeri) ve 0.005 mg/L (AB değeri) Cd uygulamasında 8.82 ± 0.57 ve 5.53 ± 0.57 nmol/dk/mg protein olarak ölçüldü. GPx aktivitesinde kontrol grubuna kıyasla 2.59 mg/L Cd konsantrasyonunda meydana gelen yaklaşık %60 oranındaki artış ($p<0.01$) ile 0.518 mg/L Cd'da ($LC_{50}/10$ değeri) meydana gelen artış ($p<0.05$) istatistiksel olarak önemli bulundu.

CAT aktivitesinin genel olarak Cd konsantrasyonu maruziyeti ile ilintili bir artış sergilediği ve en yüksek CAT aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla 5.18 mg/L (LC_{50} değeri) Cd maruziyeti ile yaklaşık olarak %100 arttığı (57.043 ± 8.89 nmol/dk/mg protein) bulundu. Bu artış ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak

önemli bulundu ($p<0.01$). 0.518 mg/L Cd'da ($LC_{50}/10$ değeri) meydana gelen CAT aktivitesindeki artış da kontrol grubuna kıyasla önemli bulundu ($p<0.05$).

CaE aktivitesinde, 0.518 mg/L ($LC_{50}/10$ değeri) Cd konsantrasyonuna kadar konsantrasyonla ilişkili artış daha yüksek konsantrasyonlarda ise konsantrasyonla ilişkili inhibisyon gözlenmesine rağmen, bu değişimlerin bütün Cd konsantrasyonlarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olmadığı bulundu ($p>0.05$). En yüksek ve en düşük CaE aktivitesi sırasıyla 0.518 mg/L ve 5.18 mg/L Cd'de (LC_{50} değeri) 222.66 ± 9.86 ve 204.18 ± 7.21 nmol/dk/mg protein olarak ölçüldü.

AChE aktivesinde, Cd konsantrasyonlarıyla ile ilişkisi olmayan değişimler belirlenmesine rağmen, bu değişimlerin bütün Cd konsantrasyonlarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olmadığı saptandı ($p>0.05$). En yüksek ve en düşük AChE aktivitesi sırasıyla 0.005 mg/L (AB değeri) ve 5.18 mg/L Cd'de (LC_{50} değeri) 186.28 ± 10.81 ve 142.63 ± 7.14 nmol/dk/mg protein olarak ölçüldü.

Çizelge 4.5. 96 saatlik Cd uygulamasının enzim aktiviteleri üzerine etkisi (nmol/dk/mg protein \pm standart hata).

Konsantrasyon (mg/L)	n	GST	CaE	AChE	GR	GPx	CAT
Kontrol	8	116.03 \pm 4.51	208.58 \pm 5.30	169.21 \pm 6.22	12.93 \pm 0.45	5.95 \pm 0.26	28.427 \pm 2.12
0.005	8	129.44 \pm 5.38	210.42 \pm 7.97	186.28 \pm 10.81	14.86 \pm 0.53	5.53 \pm 0.57	30.416 \pm 4.64
0.518	8	210.26 \pm 11.27**	222.66 \pm 9.86	158.32 \pm 9.30	16.48 \pm 2.08	7.82 \pm 0.85*	39.191 \pm 3.15*
2.59	8	574.24 \pm 26.55**	220.41 \pm 11.08	170.05 \pm 8.49	51.66 \pm 1.47**	8.82 \pm 0.57**	38.426 \pm 6.79
5.18	8	820.59 \pm 56.36**	204.18 \pm 7.21	142.63 \pm 7.14	56.46 \pm 2.55**	5.94 \pm 0.32	57.043 \pm 8.89**

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ kontrol ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.

4.1.5. 96 Saatlik Pb Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi

Kurşunun belirlenen konsantrasyonlarına 96 saat süreyle maruz kalan *Xenopus laevis* iribaşlarında çeşitli enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler çizelge 4.6'da verilmiştir. Pb'nin en düşük uygulama konsantrasyonu olan 0.01 mg/L'nin (AB mevzuatına göre su kaynakları için kabul edilebilir sınır değer) çalışılan enzimler üzerinde çeşitli değişimlere neden olduğu ancak bu değişimlerin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olmadığı bulundu ($p>0.05$).

Buna karşın, GST aktivitesinin Pb konsantrasyonlarıyla ilişkili olarak arttığı ve en yüksek GST aktivitesi ise kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak %280 oranında artış ile 447.52 ± 42.88 nmol/dk/mg protein olarak 123.05 mg/L Pb'da (LC_{50} değeri) belirlendi ve bu artış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.01$). Benzer şekilde, GST aktivitesinin 12.3 mg/L ($LC_{50}/10$ değeri) ve 61.53 mg/L ($LC_{50}/2$ değeri) Pb konsantrasyonlarında arttığı ve bu artışların kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı ($p<0.01$).

GR aktivitesinde, 12.3 mg/L Pb ($LC_{50}/10$ değeri) konsantrasyonuna kadar konsantrasyonla ilintili inhibisyon, daha yüksek konsantrasyonlarda ise konsantrasyonla ilintili artış görüldü. 0.01 mg/L (AB değeri) ve 12.3 mg/L Pb'da meydana gelen inhibisyonlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu (sırasıyla $p<0.05$ ve $p<0.01$). 61.53 mg/L ($LC_{50}/2$) ve 123.05 mg/L (LC_{50}) Pb konsantrasyonlarında meydana gelen artışların ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olmadıkları saptandı ($p>0.05$). Kurşun maruziyetine bağlı olarak en yüksek ve en düşük GR aktiviteleri, sırasıyla 123.05 mg/L ve 12.3 mg/L Pb'de 16.6 ± 5.40 ve 4.84 ± 0.80 nmol/dk/mg protein olarak ölçüldü.

GPx aktivitesinin Pb konsantrasyonlarıyla ilişkili olarak inhibe olduğu ancak, 123.05 mg/L (LC_{50} değeri) Pb'daki inhibisyon dışında diğer konsantrasyonlardaki inhibisyonların kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olmadığı bulundu ($p>0.05$). En düşük GPx aktivitesi, 123.05 mg/L kurşunda yaklaşık olarak %45 oranında inhibisyon (4.02 ± 1.64 nmol/dk/mg protein) saptandı ve bu inhibisyon kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.01$).

CAT aktivesinde, 12.3 mg/L ($LC_{50}/10$ değeri) dışındaki Pb konsantrasyonlarında genel olarak artış gözlenmesine rağmen, bu artışların bütün Pb konsantrasyonlarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olmadığı bulundu

($p>0.05$). En yüksek ve en düşük CAT aktivitesi sırasıyla 12.3 mg/L ve 123.05 mg/L Pb'da (LC_{50} değeri) 30.03 ± 3.64 ve 22.86 ± 1.85 nmol/dk/mg protein olarak ölçüldü.

CaE aktivitesinde, genel olarak inhibisyon gözlenmesine rağmen, bu inhibisyonların kurşun konsantrasyonlarıyla ilişkili olmadığı ve bütün Pb konsantrasyonlarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olmadığı saptandı ($p>0.05$). En düşük CaE aktivitesi ise 0.01 mg/L (AB değeri) kurşunda (137.11 ± 7.25 nmol/dk/mg protein) belirlendi.

AChE aktivesinin ise Pb konsantrasyonlarıyla lineer ilişkili olmasa da önemli düzeyde inhibe olduğu ve en düşük AChE aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak %35 oranında inhibisyonla 12.3 mg/L Pb ($LC_{50}/10$ değeri) uygulama grubunda olduğu saptandı ve enzim aktivitesi 89.88 ± 5.41 nmol/dk/mg protein olarak ölçüldü. Bu artışın kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ($p<0.01$). Benzer şekilde, AChE aktivitesi 61.53 mg/L ($LC_{50}/2$ değeri) ve 123.05 mg/L (LC_{50} değeri) Pb konsantrasyonlarında inhibe oldu ve bu inhibisyon düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.01$).

Çizelge 4.6. 96 saatlik Pb uygulamasının enzim aktiviteleri üzerine etkisi (nmol/dk/mg protein \pm standart hata).

Konsantrasyon (mg/L)	n	GST	CaE	AChE	GR	GPx	CAT
Kontrol	8	116.38 \pm 18.86	169.08 \pm 19.85	139.02 \pm 7.24	9.19 \pm 1.07	7.10 \pm 1.03	23.98 \pm 1.95
0.01	8	153.07 \pm 15.70	137.11 \pm 7.25	132.67 \pm 5.99	5.74 \pm 0.66*	6.81 \pm 1.84	25.37 \pm 1.01
12.3	8	308.36 \pm 19.57**	141.92 \pm 5.74	89.88 \pm 5.41**	4.84 \pm 0.80**	5.63 \pm 0.89	22.86 \pm 1.85
61.53	8	399.05 \pm 14.79 **	162.36 \pm 5.78	100.00 \pm 4.46 **	10.02 \pm 2.37	5.93 \pm 0.54	24.44 \pm 1.20
123.05	8	447.52 \pm 42.88**	141.09 \pm 10.48	93.96 \pm 7.48 **	16.6 \pm 5.40	4.02 \pm 1.64**	30.03 \pm 3.64

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ kontrol ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.

4.1.6. 96 Saatlik Cu Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi

Bakırın belirlenen konsantrasyonlarına 96 saat süreyle maruz kalan *Xenopus laevis* iribaşlarında çeşitli enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler çizelge 4.7’de verilmiştir. Cu’ın en düşük uygulama konsantrasyonu olan 0.01 mg/L’nin çalışılan enzimler üzerinde çeşitli değişimlere neden olduğu ancak, bu değişimlerin GST dışındaki enzimlerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli düzeyde olmadığı bulundu ($p>0.05$).

GST aktivitesinin 0.01 mg/L ve 0.085 mg/L Cu ($LC_{50}/10$ değeri) konsantrasyonlarında kontrol grubuna kıyasla inhibe olduğu bulundu ve 0.01 mg/L uygulama konsantrasyonunda gözlenen inhibisyon değerinin istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi ($p<0.05$). 0.85 mg/L (LC_{50} değeri) ve 0.425 mg/L ($LC_{50}/2$ değeri) konsantrasyonlarına maruz kalan iribaşlarda GST enzim aktivitesini arttırdığı belirlendi. Bu artışlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak da önemli bulundu ($p<0.01$). En yüksek ve en düşük GST aktivitesi ise sırasıyla 0.85 mg/L ve 0.01 mg/L uygulama konsantrasyonlarında 227.91 ± 6.14 ve 137.75 ± 12.12 nmol/dk/mg protein olarak ölçüldü.

GR aktivitesinde ise 0.085 mg/L ($LC_{50}/10$ değeri) Cu uygulama konsantrasyonuna kadar olan gruplarda konsantrasyonla ilişkili inhibisyon görülürken, daha yüksek konsantrasyonlarda enzim aktivitesi artışı belirlendi. Ancak, 0.01 mg/L ve 0.085 mg/L bakır uygulama konsantrasyonlarında görülen inhibisyon ile 0.425 mg/L ($LC_{50}/2$ değeri) uygulama konsantrasyonunda gözlenen artışın kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olmadığı saptandı ($p>0.05$). Buna karşın, GR aktivitesinin 0.85 mg/L (LC_{50} değeri) Cu uygulamasında yaklaşık olarak %30 oranında arttığı ve bu artışın kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli düzeyde olduğu bulundu ($p<0.05$). Cu etkisine bağlı olarak en yüksek ve en düşük GR aktiviteleri, sırasıyla 0.85 mg/L ve 0.085 mg/L Cu’da 16.70 ± 1.29 ve 11.30 ± 0.94 nmol/dk/mg protein olarak ölçüldü.

GPx aktivitesinin artan bakır konsantrasyonlarıyla ilişkili olarak inhibe olduğu görülmesine rağmen, 0.085 mg/L ($LC_{50}/10$ değeri) ve 0.85 mg/L (LC_{50} değeri) bakır uygulama konsantrasyonlarının yol açtığı inhibisyonların dışında, diğer uygulama konsantrasyonlarında saptanan enzim inhibisyonlarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olmadığı bulundu ($p>0.05$). En düşük GPx aktivitesi, kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak %20 oranında inhibisyon ile 0.85

mg/L Cu'a maruz kalan iribaşlarda (6.15 ± 0.18 nmol/dk/mg protein) belirlendi ve bu inhibisyon kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.01$). Benzer şekilde GPx aktivitesinin 0.085 mg/L Cu uygulaması ile inhibe olduğu belirlendi ve bu inhibisyonda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.05$).

CAT aktivesinde genel olarak Cu uygulama konsantrasyonlarıyla ilintili artışlar gözlenmesine rağmen, 0.85 mg/L (LC_{50}) Cu'a maruz kalan iribaşlarda enzim aktivitesi değerleri kontrol grubuna benzer bir eğilim sergiledi. En yüksek CAT aktivitesi 0.425 mg/L Cu ($LC_{50}/2$ değeri) uygulaması ile kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak %28 oranında artış göstererek 37.99 ± 3.08 nmol/dk/mg protein olarak ölçüldü ve bu artış istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.05$).

CaE aktivitesinin en yüksek Cu konsantrasyonu olan 0.85 mg/L'ye (LC_{50} değeri) kadar konsantrasyonla ilişkili olarak artış sergilediği ancak bu artışların kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olmadığı ($p > 0.05$) bulundu. 0.85 mg/L Cu konsantrasyonunda ise CaE aktivitesinin yaklaşık olarak %15 oranında inhibe olduğu ve bu inhibisyonun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli olduğu saptandı ($p < 0.05$). En yüksek ve en düşük CaE aktiviteleri ise sırasıyla 0.425 mg/L ($LC_{50}/2$ değeri) ve 0.85 mg/L Cu'da 249.42 ± 10.38 ve 183.57 ± 7.09 nmol/dk/mg protein olarak ölçüldü.

AChE aktivitesinin en yüksek Cu uygulama konsantrasyonu olan 0.85 mg/L'e (LC_{50} değeri) kadar konsantrasyonla ilişkili olarak arttığı gözlemlendi. Özellikle 0.085 mg/L ($LC_{50}/10$) ve 0.425 ($LC_{50}/2$) mg/L Cu uygulaması ile enzim aktivitesinde gözlenen bu artışın kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli düzeyde olduğu bulundu ($p < 0.01$). AChE aktivitesinin 0.85 mg/L Cu uygulaması ile meydana gelen inhibisyonunun ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olmadığı saptandı ($p > 0.05$). En yüksek ve en düşük AChE aktiviteleri sırasıyla, 0.425 mg/L ve 0.01 mg/L bakır uygulamasına maruz kalan iribaşlarda 207.66 ± 5.29 ve 165.57 ± 3.81 nmol/dk/mg protein değerinde olduğu belirlendi.

Çizelge 4.7. 96 saatlik Cu uygulamasının enzim aktiviteleri üzerine etkisi (nmol/dk/mg protein \pm standart hata).

Konsantrasyon (mg/L)	n	GST	CaE	AChE	GR	GPx	CAT
Kontrol	8	148.96 \pm 9.56	214.82 \pm 10.93	151.78 \pm 6.17	13.29 \pm 0.45	7.86 \pm 0.44	29.39 \pm 1.09
0.01	8	137.75 \pm 12.12*	227.08 \pm 6.61	165.57 \pm 3.81	12.23 \pm 0.82	7.06 \pm 0.45	29.21 \pm 2.23
0.085	8	147.89 \pm 3.20	239.74 \pm 10.71	177.85 \pm 4.25 **	11.30 \pm 0.94	6.64 \pm 0.33*	32.47 \pm 1.97
0.425	8	203.44 \pm 9.98**	249.42 \pm 10.38	207.66 \pm 5.29 **	15.24 \pm 0.93	6.79 \pm 0.46	37.99 \pm 3.08*
0.85	8	227.91 \pm 6.14**	183.57 \pm 7.09*	142.62 \pm 3.15	16.70 \pm 1.29 *	6.15 \pm 0.18**	30.60 \pm 1.36

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ kontrol ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.

4.1.7. 96 Saatlik Cd+Cu Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi

Kadmiyum ve bakırın belirlenen konsantrasyonlarının 1:1 oranında karışımlarına 96 saat süreyle maruz kalan *Xenopus laevis* iribaşlarında çeşitli enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler çizelge 4.8’de verilmiştir. Cd+Cu uygulamasının LC₅₀/2 ve LC₅₀ değerlerinin 1:1 oranındaki karışımları bütün iribaşları öldürdüğü için, bu konsantrasyonlarda metal karışımına maruz kalan iribaş örneklerinde enzim aktiviteleri tayin edilemedi.

Diğer uygulama konsantrasyonlarında ise; GST aktivitesi, 0.005 mg/L Cd (AB değeri)+0.01 mg/L Cu karışımı uygulanan örneklerde kontrol grubuna kıyasla inhibisyona uğrasada, bu inhibisyonun istatistiksel olarak önemli olmadığı bulundu ($p>0.05$). 0.52 mg/L Cd+0.085 mg/L Cu karışımında ise GST aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak %20 oranında arttığı (550.70±20.17 nmol/dk/mg protein) belirlendi ve bu artış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.01$).

GR aktivitesinde, kadmiyum ve bakır karışımı konsantrasyonları ile ilişkili olarak iribaş örneklerinde enzimin inhibe olduğu bulundu. GR aktivitesi, 0.52 mg/L Cd+0.085 mg/L Cu (LC₅₀/10 değerleri) karışımında kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak %20 inhibisyon ile 15.42±1.53 nmol/dk/mg protein olarak belirlendi ve bu inhibisyon kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$).

GPx aktivitesinin Cd+Cu karışımı konsantrasyonlarıyla ilişkili bir artış sergilediği ancak, her iki konsantrasyonda da meydana gelen artışların kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olmadığı bulundu ($p>0.05$). En yüksek GPx aktivitesi LC₅₀/10 değerleri karışımı uygulamasında 8.484±0.38 nmol/dk/mg protein olarak belirlendi.

CAT aktivitesinin, GR enzimine benzer şekilde kadmiyum ve bakır karışımı konsantrasyonlarıyla ilişkili olarak inhibe olduğu, en düşük CAT aktivitesinin 0.52 mg/L Cd+0.085 mg/L Cu’a (LC₅₀/10 değerleri) maruz kalan iribaşlarda 24.411±1.98 nmol/dk/mg protein düzeyinde olduğu saptandı. Bu inhibisyon kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.01$).

İribaşların Cd+Cu karışımına maruz kalmalarının CaE aktivitesinde bazı değişimlere yol açsa da, bu değişimlerin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olmadığı bulundu ($p>0.05$). En yüksek CaE aktivitesi 0.52 mg/L Cd+0.085 mg/L Cu karışımı uygulamasına bağlı olarak 231.89±8.77 nmol/dk/mg protein düzeyinde olduğu bulundu.

AChE aktivitesinde 0.52 mg/L Cd+0.085 mg/L Cu karışımına maruz kalan iribaşlarda kısmen inhibisyon görülse de, bu inhibisyonun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olmadığı bulundu ($p>0.05$).

Çizelge 4.8. 96 saatlik Cd+Cu uygulamasının enzim aktiviteleri üzerine etkisi (nmol/dk/mg protein \pm standart hata).

Konsantrasyon (mg/L)	n	GST	CaE	AChE	GR	GPx	CAT
Kontrol	8	464.79 \pm 15.26	228.25 \pm 8.29	143.13 \pm 3.65	17.36 \pm 0.53	7.494 \pm 0.19	31.418 \pm 2.38
0.01 Cu + 0.005 Cd	8	421.11 \pm 21.93	221.09 \pm 11.65	145.85 \pm 5.33	15.23 \pm 0.91	7.417 \pm 0.44	30.468 \pm 2.13
0.085 Cu + 0.52 Cd	8	550.70 \pm 20.17**	231.89 \pm 8.77	134.19 \pm 3.95	15.42 \pm 1.53*	8.484 \pm 0.38	24.411 \pm 1.98**
0.425 Cu + 2.59 Cd	8	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
0.85 Cu + 5.18 Cd	8	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ kontrol ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.

4.1.8. 96 Saatlik Pb+Cu Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi

Kurşun ve bakırın belirlenen konsantrasyonlarının 1:1 oranında karışımlarına 96 saat süreyle maruz kalan *Xenopus laevis* iribaşlarında çeşitli enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler çizelge 4.9'da verilmiştir. Pb+Cu uygulamasının LC₅₀/2 ve LC₅₀ değerlerinin 1:1 oranındaki karışımları bütün iribaşları öldürdüğü için bu konsantrasyonlara maruz kalan iribaş örneklerinde enzim aktiviteleri tayin edilemedi.

GST aktivitesinde, Pb+Cu karışımına maruz kalan iribaşlarda enzim aktivitesinin konsantrasyon artışı ile birlikte lineer olmayan artış sergilediği belirlendi. GST aktivitesi, 0.01 mg/L Pb (AB değeri)+0.01 mg/L Cu karışımına maruz kalan iribaşlarda kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak %230 oranında artış ve 12.3 mg/L Pb+0.085 mg/L Cu (LC₅₀/10 değerleri) karışıma maruz kalan iribaşlarda ise yaklaşık olarak %50 oranında artış ile indüklendiği gözlemlendi. Bu aktivite artışlarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak da önemli olduğu bulundu ($p<0.01$).

GR aktivitesinin kurşun ve bakır karışımı konsantrasyonlarına maruz kalma sonucunda arttığı ve en yüksek GR aktivitesinin 12.3 mg/L Pb+0.085 mg/L Cu (LC₅₀/10 değerleri) karışımına maruz kalan iribaşlarda kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak %60 oranında arttığı belirlendi. Bu aktivite artışı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak da önemli bulundu ($p<0.01$).

GPx aktivitesinin Pb+Cu karışımına maruz kalmanın bir sonucu olarak, konsantrasyonlarla doğrusal ilişkili olmayan değişimler sergilediği saptandı. En yüksek GPx aktivitesi, 0.01 mg/L Pb (AB değeri)+ 0.01 mg/L Cu karışımına maruz kalan bireylerde saptandı ve bu artış kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak %10 düzeyinde gerçekleşti. Bu artışın kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak da önemli olduğu bulundu ($p<0.05$).

Pb+Cu karışımına maruz kalan iribaşlarda CAT aktivitesinin maruz kalınan konsantrasyonla ilintili olarak artış sergilediği saptandı. En yüksek CAT aktivitesi 12.3 mg/L Pb+0.085 mg/L Cu (LC₅₀/10 değerleri) karışımına maruz kalan iribaşlarda kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak %65 oranında artış ile 25.15 ± 1.18 nmol/dk/mg protein düzeyinde olduğu bulundu. Bu artışın kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak da önemli olduğu bulundu ($p<0.01$). Benzer şekilde CAT aktivitesinin 0.01 mg/L Pb (AB değeri)+0.01 mg/L Cu karışıma maruz kalan gruplarda da arttığı saptandı ve bu artışın kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli düzeyde olduğu bulundu ($p<0.05$).

CaE aktivitesinin Pb+Cu karışımına maruz kalmanın bir sonucu olarak uygulanan konsantrasyon artışı ile ilişkili olarak inhibe olduğu ve en düşük CaE aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak %20 oranında inhibisyon ile 224.44 ± 5.97 nmol/dk/mg protein değeri ile 12.3 mg/L Pb+0.085 mg/L Cu ($LC_{50}/10$ değerleri) karışımına maruz kalan iribaşlarda ortaya çıktığı saptandı. Bu inhibisyon düzeyi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak da önemli bulundu ($p < 0.01$).

AChE aktivitesi kurşun ve bakır karışımına maruz kalan bireylerde, iribaşların metal karışımlarına maruz kaldıkları konsantrasyon artışı ile lineer bir ilişki göstermeyen inhibisyona uğradığı bulundu. AChE aktivitesi 0.01 mg/L Pb (AB değeri)+0.01 mg/L Cu karışımına maruz kalan organizmalarda kontrol grubuna oranla yaklaşık olarak %30 oranında inhibe olduğu ve saptanan 127.61 ± 6.77 nmol/dk/mg protein değerinin en düşük aktivite düzeyi olduğu saptandı. Bu uygulama ile enzim aktivitesinde ortaya çıkan inhibisyon kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.01$). Benzer şekilde AChE aktivitesi 12.3 mg/L Pb+0.085 mg/L Cu ($LC_{50}/10$ değerleri) karışımı uygulama grubunda da kontrol grubuna göre önemli düzeyde bir inhibisyon gösterdi ($p < 0.05$).

Çizelge 4.9. 96 saatlik Pb+Cu uygulamasının enzim aktiviteleri üzerine etkisi (nmol/dk/mg protein \pm standart hata).

Konsantrasyon (mg/L)	n	GST	CaE	AChE	GR	GPx	CAT
Kontrol	8	300.90 \pm 9.20	273.32 \pm 11.65	182.24 \pm 6.48	11.05 \pm 0.64	13.430 \pm 0.604	15.87 \pm 0.75
0.01 Pb + 0.01 Cu	8	1002.06 \pm 33.92**	247.05 \pm 10.53	127.61 \pm 6.77**	13.96 \pm 1.98	14.719 \pm 0.267*	19.69 \pm 0.99*
12.3 Pb + 0.085 Cu	8	446.90 \pm 20.33 **	224.44 \pm 5.97**	168.06 \pm 2.83*	17.95 \pm 1.31**	11.481 \pm 0.597	25.15 \pm 1.18**
61.53 Pb + 0.425 Cu	8	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
123.05 Pb + 0.85 Cu	8	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ kontrol ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.

4.1.9. 96 Saatlik Pb+Cd Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi

Kurşun ve kadmiyumun belirlenen konsantrasyonlarının 1:1 oranında karışımlarına 96 saat süreyle maruz kalan *Xenopus laevis* iribaşlarında çeşitli enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler çizelge 4.10'da verilmiştir. Pb+Cd uygulamasının LC₅₀ değerlerinin 1:1 oranındaki karışımları bütün iribaşları öldürdüğü için, bu konsantrasyonlarda metal karışımına maruz kalan iribaş örneklerinde enzim aktiviteleri tayin edilemedi.

GST aktivitesi kurşun ve kadmiyum karışımına maruz kalan iribaşlarda konsantrasyon ilişkili olarak artış gösterdi. En yüksek enzim aktivitesi 61.53 mg/L Pb+2.59 mg/L Cd (LC₅₀/2 değerleri) karışımında kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak %190 oranında artış gösterdi. Bu konsantrasyona maruz kalan iribaşlarda saptanan aktivite artışı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli düzeyde bulundu ($p<0.01$). Benzer şekilde, GST aktivitesinin 0.01 mg/L Pb+0.005 mg/L Cd (AB değerleri) ve 12.3 mg/L Pb+0.52 mg/L Cd (LC₅₀/10 değerleri) karışımları uygulaması ile de arttığı ve artışın kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli olduğu bulundu ($p<0.01$).

Pb+Cd karışımına 61.53 mg/L Pb+2.59 mg/L Cd (LC₅₀/2 değerleri) ve daha düşük konsantrasyonlarındaki uygulama gruplarında maruz kalan iribaşlarda gözlenen GR aktivitesi değişiminin istatistiksel olarak önemli olmadığı saptandı ($p>0.05$). Buna karşın, en yüksek GR aktivitesi ise 12.3 mg/L Pb+0.52 mg/L Cd (LC₅₀/10 değerleri) karışımında kontrol grubuna göre yaklaşık olarak %75 oranında arttı. Hem 0.01 mg/L Pb+0.005 mg/L Cd (AB değerleri), hem de 12.3 mg/L Pb+0.52 mg/L Cd karışımında meydana gelen enzim aktivitesi artışları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.01$).

GPx aktivitesi Pb+Cd karışımına maruz kalan iribaşlarda konsantrasyon artışı ile paralel olmayan değişimler gösterdi. Bütün kurşun ve kadmiyum karışımı uygulama gruplarında meydana gelen değişimlerin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak da önemli olmadığı saptandı ($p>0.05$).

Pb+Cd karışımına maruz kalan iribaşlarda CAT aktivitesinin, konsantrasyon artışından bağımsız değişimler sergilediği saptandı. 61.53 mg/L Pb+2.59 mg/L Cd karışımı uygulama grubunda CAT aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak %25 oranında inhibisyona uğradığı ve bu inhibisyon 24.41 ± 1.89 nmol/dk/mg protein

düzeyinde ölçüldü. Bu inhibisyonun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak da önemli olduğu bulundu ($p<0.05$).

CaE aktivitesinin kurşun ve kadmiyum karışımına maruz kalan organizmalarda konsantrasyon artışı ile birlikte arttığı saptandı. En yüksek CaE aktivitesinin 61.53 mg/L Pb+2.59 mg/L Cd karışımına maruz kalan iribaşlarda 336.90 ± 69.62 nmol/dk/mg protein düzeyinde olduğu belirlendi. Bu artış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.01$). Benzer şekilde, enzim aktivitesinin 12.3 mg/L Pb+0.52 mg/L Cd karışımı uygulama grubunda da arttığı ve bu artış da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli düzeyde bulundu. ($p<0.01$).

AChE aktivitesinin 0.01 mg/L Pb+0.005 mg/L Cd (AB değerleri) karışımına maruz kalan iribaşlarda arttığı ancak daha yüksek konsantrasyondaki Pb+Cd karışımı uygulama gruplarında konsantrasyon artışı ile ilişkili olarak inhibisyona uğradığı saptandı. En yüksek ve en düşük enzim aktiviteleri sırasıyla, 61.53 mg/L Pb+2.59 mg/L Cd ve 0.01 mg/L Pb+0.005 mg/L Cd karışımına maruz kalan uygulama gruplarında 169.76 ± 3.78 nmol/dk/mg protein ve 118.18 ± 2.14 nmol/dk/mg protein düzeyinde olduğu belirlendi. Her iki uygulama grubundaki iribaşlarda meydana gelen enzim aktivitesi değişimlerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ($p<0.01$). Bunun yanı sıra, 12.3 mg/L Pb+0.52 mg/L Cd karışımı uygulama konsantrasyonu maruz kalan iribaşlarda enzim aktivitesinin inhibisyonuna yol açtığı belirlendi. Bu inhibisyonun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak da önemli olduğu saptandı ($p<0.05$).

Çizelge 4.10. 96 saatlik Pb+Cd uygulamasının enzim aktiviteleri üzerine etkisi (nmol/dk/mg protein \pm standart hata).

Konsantrasyon (mg/L)	n	GST	CaE	AChE	GR	GPx	CAT
Kontrol	8	464.79 \pm 15.26	228.25 \pm 8.29	143.13 \pm 3.65	17.43 \pm 0.57	7.494 \pm 0.190	31.418 \pm 2.38
0.01 Pb + 0.005 Cd	8	987.41 \pm 45.54**	252.92 \pm 11.35	169.76 \pm 3.78**	28.62 \pm 8.58**	7.498 \pm 0.281	33.855 \pm 3.64
12.3 Pb + 0.52 Cd	8	1076.14 \pm 35.29**	329.67 \pm 13.16**	127.96 \pm 3.17*	30.04 \pm 2.31**	7.094 \pm 0.277	32.44 \pm 1.54
61.53 Pb + 2.59 Cd	8	1358.66 \pm 31.12**	336.90 \pm 69.62**	118.18 \pm 2.14**	21.01 \pm 3.83	7.365 \pm 0.177	24.41 \pm 1.89*
123.05 Pb + 5.18 Cd	8	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ kontrol ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.

4.1.10. 96 Saatlik Pb+Cd+Cu Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi

Pb, Cd ve Cu'nun belirlenen konsantrasyonlarının 1:1:1 oranında karışımlarına 96 saat süreyle maruz kalan *Xenopus laevis* iribaşlarında çeşitli enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler çizelge 4.11'de verilmiştir. Pb+Cd+Cu uygulamasının LC₅₀/2 ve LC₅₀ değerlerinin 1:1:1 oranındaki karışımları bütün iribaşları öldürdüğü için, bu konsantrasyonlarda metal karışımlarına maruz kalan iribaş örneklerinde enzim aktiviteleri tayin edilemedi.

Pb+Cd+Cu karışımına maruz bırakılan iribaşlarda GST aktivitesinin konsantrasyon artışı ile arttığı gözlemlendi. 12.3 mg/L Pb+0.52 mg/L Cd+0.085 mg/L Cu (LC₅₀/10 değerleri) karışımı uygulama grubundaki iribaş örneklerinde enzim aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak %300 oranında artış ile en yüksek değere ulaştığı saptandı. Hem 0.01 mg/L Pb+0.005 mg/L Cd+0.01 mg/L Cu hem de, 12.3 mg/L Pb+0.52 mg/L Cd+0.085 mg/L Cu karışımlarına maruz kalan iribaşlarda görülen enzim aktivitesinde ki artışların kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ($p<0.01$).

GR aktivitesinin, GST aktivitesine benzer bir eğilim göstererek, Pb+Cd+Cu karışımına maruz kalan iribaşlarda konsantrasyon artışı ile lineer ilişkili olarak arttığı saptandı. En yüksek GR aktivitesinin 12.3 mg/L Pb+0.52 mg/L Cd+0.085 mg/L Cu karışımı uygulama grubunda 85.75 ± 2.77 nmol/dk/mg protein düzeyinde olduğu belirlendi. İribaşlarda hem 0.01 mg/L Pb+0.005 mg/L Cd+0.01 mg/L Cu (AB değerleri), hem de 12.3 mg/L Pb+0.52 mg/L Cd+0.085 mg/L Cu karışımı konsantrasyonlarının neden olduğu artışlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli düzeyde bulundu ($p<0.01$).

Pb+Cd+Cu karışımı konsantrasyonlarının, maruz kalan iribaşlarda GPx aktivitesinde değişimlere neden olduğu ancak meydana gelen bu değişimlerin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli düzeyde olmadığı saptandı ($p>0.05$).

CAT aktivitesi Pb+Cd+Cu karışımı uygulama gruplarındaki iribaşlarda konsantrasyon artışı ile doğrusal olarak artış gösterdi. En yüksek CAT aktivitesi 36.20 ± 2.38 nmol/dk/mg protein düzeyi ile 0.01 mg/L Pb+0.005 mg/L Cd+0.01 mg/L Cu karışımına maruz kalan iribaş örneklerinde saptandı. Ayrıca, 12.3 mg/L Pb+0.52 mg/L Cd+0.085 mg/L Cu karışımının da iribaşlarda enzim aktivitesi artışına neden olduğu görüldü. Her iki uygulama grubunda iribaş örneklerinde meydana gelen artışlar

kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli düzeyde bulundu ($p<0.01$).

CaE aktivitesinde 0.01 mg/L Pb+0.005 mg/L Cd+0.01 mg/L Cu karışımı uygulamasının maruz kalan örneklerde inhibisyona neden olduğu ancak bu inhibisyonun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli olmadığı saptandı ($p>0.05$). 12.3 mg/L Pb+0.52 mg/L Cd+0.085 mg/L Cu karışımının iribaşlarda kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak %35 oranında artışa yol açtığı gözlemlendi. Bu artışın kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak da önemli olduğu bulundu ($p<0.01$).

AChE aktivitesinde 12.3 mg/L Pb+0.52 mg/L Cd+0.085 mg/L Cu karışımı maruz kalan iribaşlarda kısmen inhibisyona yol açsa da bu inhibisyonun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olmadığı saptandı ($p>0.05$).

Çizelge 4.11. 96 saatlik Pb+Cd+Cu uygulamasının enzim aktiviteleri üzerine etkisi (nmol/dk/mg protein \pm standart hata).

Konsantrasyon (mg/L)	n	GST	CaE	AChE	GR	GPx	CAT
Kontrol	8	200.24 \pm 10.87	238.72 \pm 13.76	142.14 \pm 4.68	10.80 \pm 0.63	5.462 \pm 0.233	18.84 \pm 0.98
0.01 Pb + 0.005 Cd + 0.01 Cu	8	378.47 \pm 13.42**	232.14 \pm 8.14	142.87 \pm 3.05	18.89 \pm 0.77**	5.498 \pm 0.173	36.20 \pm 2.38**
12.3 Pb + 0.52 Cd + 0.085 Cu	8	810.74 \pm 16.19**	325.51 \pm 8.52**	134.61 \pm 2.20	85.75 \pm 2.77**	5.816 \pm 0.260	34.61 \pm 0.59**
61.53 Pb + 2.59 Cd + 0.425 Cu	8	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
123.05 Pb + 5.18 Cd + 0.85 Cu	8	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ kontrol ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.

4.1.11. 96 Saatlik Metal ve Metal Karışımı Uygulamalarının Metallotiyeinin Miktarına Etkisi

Metal ve/veya metal karışımlarının belirlenen konsantrasyonlarına 96 saat süreyle maruz kalan *Xenopus laevis* iribaşlarında metallotiyeinin miktarında meydana gelen değişimler spektrofotometrik yöntemle belirlenerek hesaplandı. Bu çalışmalara bağlı olarak elde edilen veriler çizelge 4.12'de verilmiştir. Metallerin ve metal karışımlarının en düşük uygulama konsantrasyonu olan AB sınır değeri konsantrasyonlarına maruz kalmanın iribaşlarda MT miktarı üzerinde kısmen değişikliğe yol açtığı ancak bu değişimin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli düzeyde olmadığı bulundu ($p>0.05$). Aynı zamanda Pb+Cd karışımı dışında bütün metal karışımlarının $LC_{50}/2$ ve LC_{50} uygulama konsantrasyonları ile Pb+Cd karışımının ise sadece LC_{50} uygulama konsantrasyonu bütün iribaşları öldürdüğü için bu konsantrasyonlarda MT miktarı spektrofotometrik olarak tayin edilemedi.

Kadmiyum uygulaması sonucunda, MT miktarının konsantrasyonla doğrusal ilişkili olarak özellikle 2.59 mg/L Cd ve 5.18 mg/L Cd konsantrasyonlarında metale maruz kalan iribaşlarda arttığı belirlendi ve en yüksek MT miktarı 5.18 mg/L uygulamasında kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak %100 oranında artış gösterdi. Bu organizmalarda MT 36.13 ± 1.17 nmol MT/gr yaş ağırlık olarak ölçüldü. Hem 2.59 mg/L hem de 5.18 mg/L Cd uygulama konsantrasyonlarındaki artışlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.01$).

Kurşun etkisine bağlı olarak MT miktarında konsantrasyonla doğru ilişkili olarak 61.53 mg/L Pb konsantrasyonuna kadar iribaşlarda artış gözlenirken 123.05 mg/L uygulama konsantrasyonunda ise kısmi bir azalış saptandı. En yüksek MT miktarı kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak %60 oranında artış (33.81 ± 0.75 nmol MT/gr yaş ağırlık) ile 61.53 mg/L Pb'da belirlendi. Kurşun uygulamasının 12.3 mg/L, 61.53 mg/L ve 123.05 mg/L konsantrasyonlarına maruz kalan bireylerde MT miktarında meydana gelen artışların kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak da önemli olduğu saptandı ($p<0.01$).

Bakır maruziyetinde ise MT miktarının konsantrasyonla ilişkili olarak lineer bir artış sergilediği bulundu. En yüksek MT miktarı 0.85 mg/L uygulama konsantrasyonunda kontrol grubuna kıyasla yaklaşık %40 oranında artış ile 33.99 ± 1.47 nmol MT/gr yaş ağırlık olarak ölçüldü. Bu artış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

istatistiksel olarak da önemli bulundu ($p<0.01$). Benzer şekilde, 0.085 mg/L bakır uygulamasında görülen artışın da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı ($p<0.05$).

Kurşun ve kadmiyum karışımı uygulamasında MT miktarının konsantrasyonla ilintili bir artış sergilediği belirlendi ve en yüksek MT miktarı 61.53 mg/L Pb+2.59 mg/L Cd karışımı uygulama konsantrasyonunda kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak %40 oranında artış ile 32.37 ± 0.97 nmol MT/gr yaş ağırlık olarak ölçüldü. Hem 12.3 mg/L Pb+0.52 mg/L Cd, hem de 61.53 mg/L Pb+2.59 mg/L Cd karışımına maruz kalan iribaşlarda meydana gelen artışlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak da önemli bulundu ($p<0.01$).

Kadmiyum ve bakır karışımı uygulama gruplarında ise MT miktarının uygulanan konsantrasyon ile bağlantılı olmayan bir artış gösterdiği saptandı. En yüksek MT miktarı kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak %13 oranında artış ile 0.005 mg/L Cd+0.01 mg/L Cu karışımında 26.30 ± 0.79 nmol MT/gr yaş ağırlık olarak ölçüldü. Ancak MT miktarındaki bu artış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulunmadı ($p>0.05$).

Kurşun ve bakır karışımı uygulamasına bağlı olarak MT miktarında konsantrasyon artışına paralel olmayan değişim belirlendi. En yüksek MT miktarı kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak %30 oranında artış ile 12.3 mg/L Pb+0.085 mg/L Cu karışımında saptandı. Bu grup için MT değeri 27.30 ± 1.22 nmol MT/gr yaş ağırlık olarak ölçüldü. Bu artışın kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ($p<0.05$).

Metallerin üçlü karışımı (Pb+Cd+Cu) uygulaması ise maruz kalan bireylerin MT miktarının konsantrasyonla ilişkili olarak artışına yol açtı. En yüksek MT miktarı 0.52 mg/L Cd+0.085 mg/L Cu+12.3 mg/L Pb uygulamasına maruz kalan iribaşlarda gözlemlendi ve kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak %50 oranında artışa yol açtı. Belirlenen artışın kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak da önemli olduğu bulundu ($p<0.01$).

Çizelge 4.12. 96 saatlik metal ve metal karışımı uygulamalarının MT miktarına etkisi (nmol MT/gr yaş ağırlık ± standart hata).

Konsantrasyon (mg/L)	n	Cd	Pb	Cu ^b	Pb+Cd	Cd+Cu	Pb+Cu	Pb+Cd+Cu
Kontrol	8	18.79 ± 0.37	21.05 ± 1.83	23.91 ± 0.65	23.17 ± 1.27	23.17 ± 1.27	21.05 ± 1.83	21.05 ± 1.83
AB Değeri^a	8	18.68 ± 0.72	24.99 ± 1.08	23.30 ± 1.16	24.50 ± 0.82	26.30 ± 0.79	20.69 ± 0.56	23.36 ± 1.56
LC₅₀/10^a	8	18.51 ± 0.54	29.49 ± 1.17**	25.56 ± 0.49*	29.07 ± 1.19**	24.44 ± 0.76	27.30 ± 1.22*	32.54 ± 1.07**
LC₅₀/2^a	8	30.66 ± 0.32**	33.81 ± 0.75**	26.44 ± 1.99	32.37 ± 0.97**	N/A	N/A	N/A
LC₅₀^a	8	36.13 ± 1.17**	29.81 ± 0.90**	33.99 ± 1.47**	N/A	N/A	N/A	N/A

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ kontrol ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.

^a: **AB Değeri**: Cd için; 0.005, Cu için; 0.01, Pb için; 0.01 mg/L

LC₅₀/10: Cd için; 0.52, Cu için; 0.085, Pb için; 12.3 mg/L

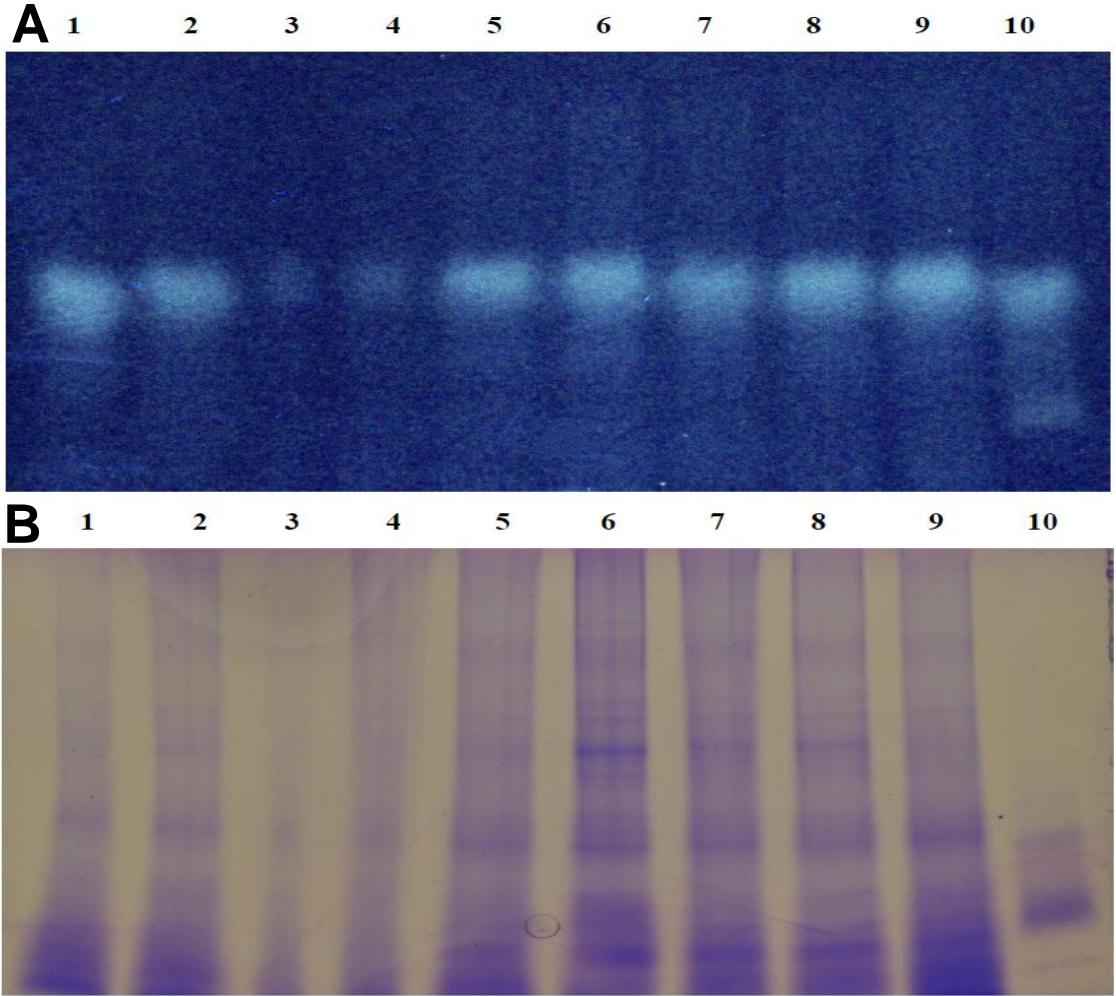
LC₅₀/2: Cd için; 2.59, Cu için; 0.425, Pb için; 61.53 mg/L

LC₅₀: Cd için; 5.18, Cu için; 0.85, Pb için; 123.05 mg/L

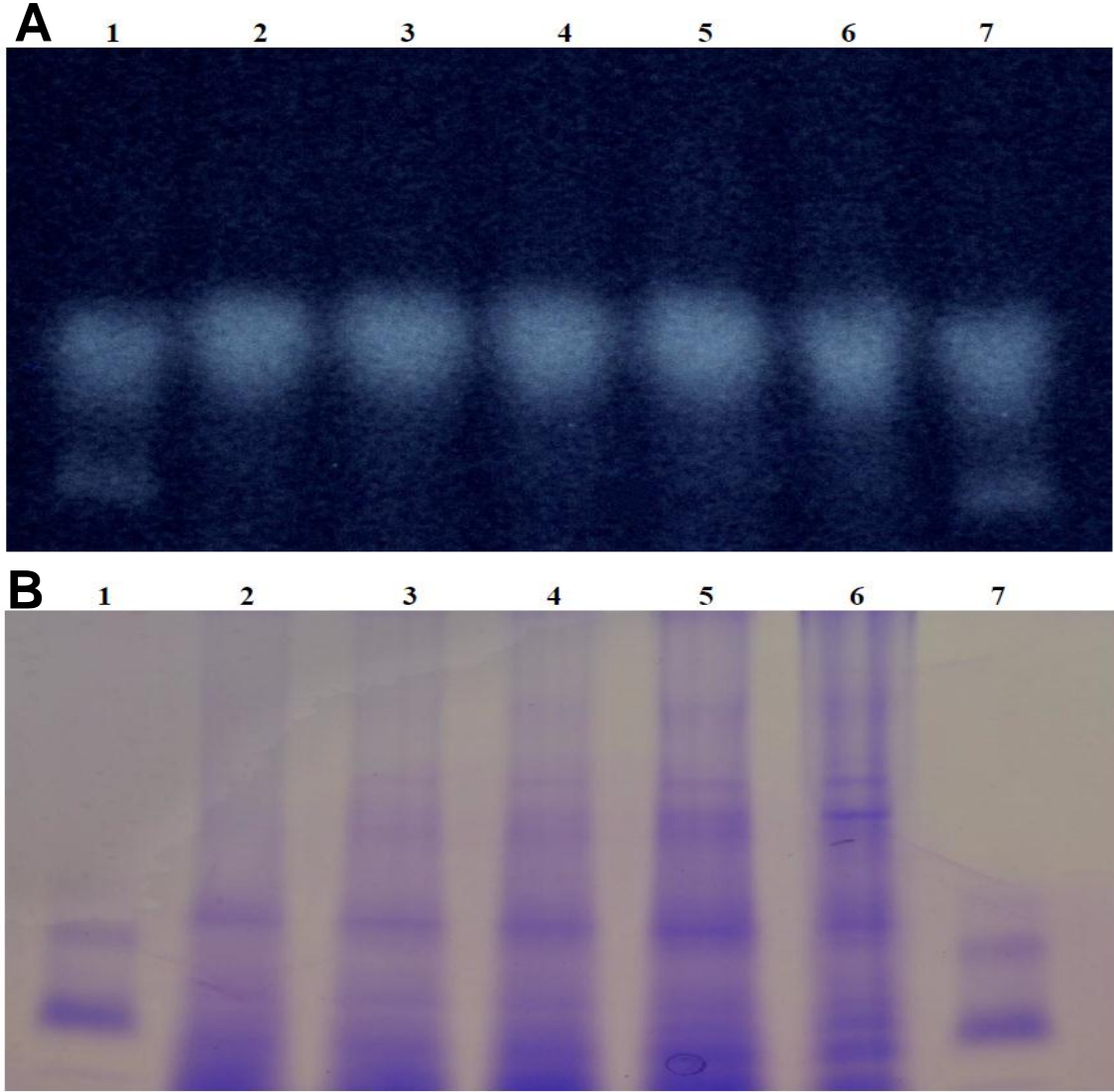
^b: Cu için belirlenen en düşük konsantrasyon AB sınır değeri değildir.

4.1.12. 96 Saatlik Elektroforetik-Florimetrik Çalışmalar İle İlgili Bulgular

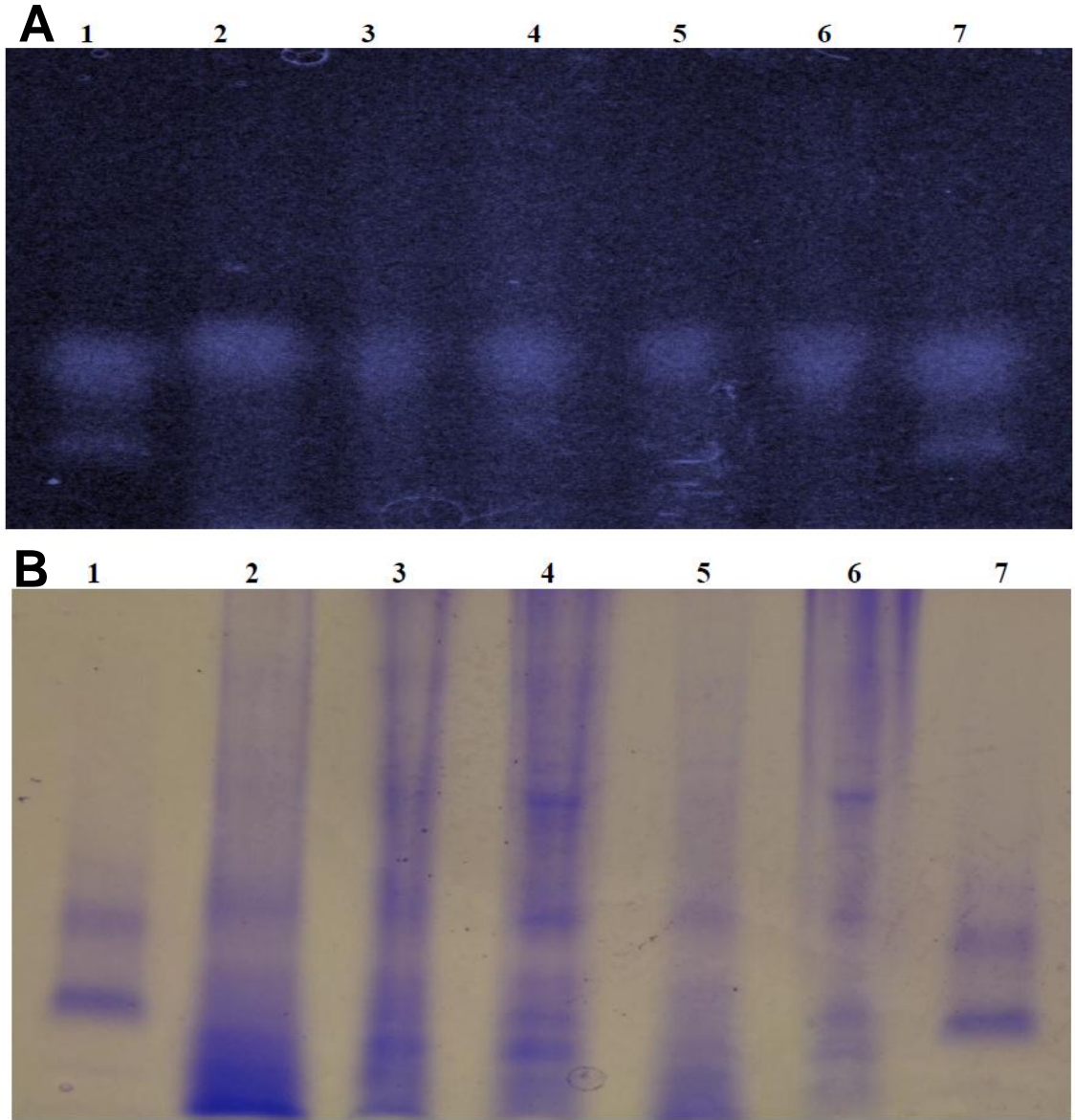
Metal ve/veya metal karışımlarının belirlenen konsantrasyonlarına 96 saat süreyle maruz kalan *Xenopus laevis* iribaşlarında metalotiyoneinin nitel olarak varlığını belirleyebilmek için protein elektroforezi yapıldıktan sonra iki farklı görüntüleme tekniği kullanıldı. Bu çalışmalara bağlı olarak elde edilen veriler şekil 4.1, 4.2, 4.3, ve 4.4’de verilmiştir.



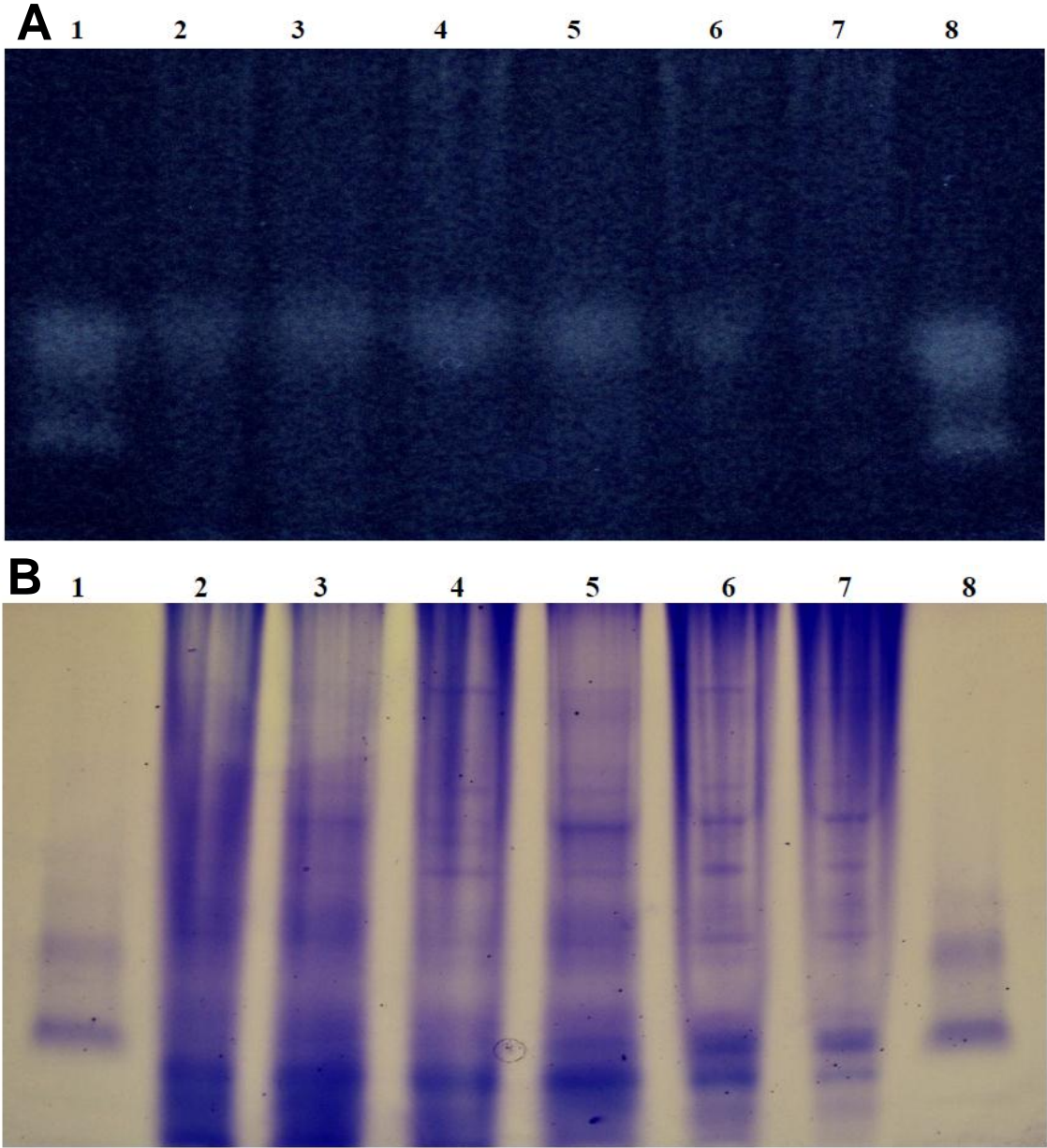
Şekil 4.1. A; mBBR ile etiketlenmiş MT'nin SDS-PAGE elektroforezinden sonra UV-Florensans görüntüsü. B; MT'nin SDS-PAGE elektroforezinden sonra comassie brilliant mavi ile boyanmış görüntüsü. **1-** Kontrol (FETAX) **2-** Cu (LC₅₀ değeri) **3-** Cu (LC₅₀/2 değeri) **4-** Cu (LC₅₀/10 değeri) **5-** Cu (0.01 mg/L) **6-** Pb (LC₅₀ değeri) **7-** Pb (LC₅₀/2 değeri) **8-** Pb (LC₅₀/10 değeri) **9-** Pb (AB sınır değeri) **10-** Tavşan Karaciğer MT II.



Şekil 4.2. A; mBBr ile etiketlenmiş MT'nin SDS-PAGE elektroforezinden sonra UV-Florensans görüntüsü. B; MT'nin SDS-PAGE elektroforezinden sonra comassie brilliant mavi ile boyanmış görüntüsü. **1 ve 7-** Tavşan Karaciğer MT II **2-** Kontrol (FETAX) **3-** Cd (AB sınır değeri) **4-** Cd (LC₅₀/10 değeri) **5-** Cd (LC₅₀/2 değeri) **6-** Cd (LC₅₀ değeri).



Şekil 4.3. A; mBBR ile etiketlenmiş MT'nin SDS-PAGE elektroforezinden sonra UV-Florensans görüntüsü. B; MT'nin SDS-PAGE elektroforezinden sonra comassie brilliant mavi ile boyanmış görüntüsü. **1 ve 7-** Tavşan Karaciğer MT II **2-** Kontrol (FETAX) **3-** Pb+Cu (AB sınır değerleri karışımı) **4-** Pb+Cu (LC₅₀/10 değerleri karışımı) **5-** Pb+Cd+Cu (AB sınır değerleri karışımı) **6-** Pb+Cd+Cu (LC₅₀/10 değerleri karışımı).



Şekil 4.4. A; mBBR ile etiketlenmiş MT'nin SDS-PAGE elektroforezinden sonra UV-Florensans görüntüsü. B; MT'nin SDS-PAGE elektroforezinden sonra comassie brilliant mavi ile boyanmış görüntüsü. **1 ve 8-** Tavşan Karaciğer MT II **2-** Kontrol (FETAX) **3-** Cd+Cu (AB sınır değerleri) **4-** Cd+Cu ($LC_{50}/10$ değerleri karışımı) **5-** Pb+Cd (AB sınır değerleri karışımı) **6-** Pb+Cd ($LC_{50}/10$ değerleri karışımı) **7-** Pb+Cd ($LC_{50}/2$ değerleri karışımı).

4.2. 24 Saatlik Çalışmalar İle İlgili Bulgular

4.2.1. 24 Saatlik Uygulamalarda Ortamların pH Değerleri

Çalışmada kullanılan metal karışımı çözeltilerinin pH değerleri 0. ve 24. saatlerde ölçüldü. Enzim çalışmaları için ayrı (Grup A), MT çalışmaları için ayrı (Grup B) deney düzenekleri kurulduğundan 24 saat sonundaki ortalama pH değerleri gruplar halinde çizelge 4.13’de verilmiştir.

Çözelti pH’larının 24 saat sonundaki ortalamalarına bakıldığında, metal karışımlarının bulunduğu ortamın pH değerlerinde toksisiteyi etkileyecek düzeyde bir değişim belirlenmemiştir.

Çizelge 4.13. 24 saatlik çalışmalarda elde edilen ortalama pH değerleri.

Konsantrasyon (mg/L)	Cd+Cu	Pb+Cd	Pb+Cu	Pb+Cd+Cu
Kontrol-A	7.37	7.59	7.59	7.37
LC ₅₀ /2-A ^a	7.51	7.52	7.47	7.49
LC ₅₀ -A ^a	7.50	7.26	7.35	7.27
Kontrol-B	7.53	7.53	7.53	7.37
LC ₅₀ /2-B ^a	7.56	7.37	7.55	7.49
LC ₅₀ -B ^a	7.42	7.23	7.23	7.27

Grup-A; Enzim çalışmaları, Grup-B; MT çalışmaları.

^a: LC₅₀/2: Cd için; 2.59, Cu için; 0.425, Pb için; 61.53 mg/L

LC₅₀: Cd için; 5.18, Cu için; 0.85, Pb için; 123.05 mg/L

4.2.2. 24 Saatlik Çalışmalarda Belirlenen Ölüm Oranları

Metallerin etkisine 24 saat süreyle maruz kalan 46. evredeki iribaşlarda meydana gelen ölümler deney sonunda kaydedildi. MT çalışmaları ve enzim çalışmaları için ayrı deney düzenekleri kurulduğu için her iki çalışmaya ait ölüm oranları çizelge 4.14’de verilmiştir. Çalışmada uygulanan kontrol grupları için gözlenen ölüm oranları kabul edilebilir sınırlar içinde bulunmuştur. Her iki çalışmada da LC₅₀/2 uygulama gruplarında tüm metal karışımı uygulamaları için düşük oranda öldürücü toksik etki

saptanırken, LC₅₀ uygulama gruplarında Cd+Cu ve Pb+Cd+Cu uygulamaları %100 ölüme neden oldu.

Hem enzim hem de MT çalışmalarında metallerin ikili karışımların LC₅₀/2 değerlerinde, metallerin üçlü karışımının LC₅₀/2 ve LC₅₀ değerlerinde meydana gelen ölümlerin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ($p<0.01$).

Çizelge 4.14. 24 saatlik çalışmalarda belirlenen ölüm oranları.

Konsantrasyon (mg/L)	n	Cd+Cu		Pb+Cd		Pb+Cu		Pb+Cd+Cu	
		Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)	Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)	Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)	Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)
Kontrol-A	160	1	0.63	0	0	0	0	1	0.63
LC₅₀/2-A^a	160	2	1.25	1	0.63	2	1.25	21 [*]	13.13
LC₅₀-A^a	160	160 [*]	100	88 [*]	55	29 [*]	18.13	160 [*]	100
Kontrol-B	160	0	0	0	0	0	0	2	1.25
LC₅₀/2-B^a	160	4	2.5	1	0.63	0	0	16 [*]	10
LC₅₀-B^a	160	160 [*]	100	60 [*]	37.5	28 [*]	17.5	160 [*]	100

Grup-A; Enzim çalışmaları, Grup-B; MT çalışmaları.

*: $p<0.01$ kontrol ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.

^a: LC₅₀/2: Cd için; 2.59, Cu için; 0.425, Pb için; 61.53 mg/L

LC₅₀: Cd için; 5.18, Cu için; 0.85, Pb için; 123.05 mg/L

4.2.3. 24 Saatlik Cd+Cu Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi

Kadmiyum ve bakırın belirlenen konsantrasyonlarının 1:1 oranında karışımlarına 24 saat süreyle maruz kalan *Xenopus laevis* iribaşlarında çeşitli enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler çizelge 4.15’de verilmiştir.

GST aktivitesinde kadmiyum ve bakır karışımı etkisine bağlı olarak, uygulama gruplarında konsantrasyonla ilişki göstermeyen aktivite değişimleri saptandı. Buna göre

en yüksek GST aktivitesi ise kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak %30 oranında artış göstererek 220.85 ± 8.74 nmol/dk/mg protein düzeyinde 2.59 mg/L Cd+ 0.425 mg/L Cu ($LC_{50}/2$ değerleri) karışımına maruz kalan iribaşlar için saptandı. Bu artış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak da önemli bulundu ($p < 0.01$). LC_{50} değerleri karışımına maruz kalan iribaşlarda ise GST aktivitesinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bir inhibisyona uğradığı ve bu inhibisyon düzeyinin istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ($p < 0.05$).

GR aktivitesi 5.18 mg/L Cd+ 0.85 mg/L Cu (LC_{50} değerleri) karışımına maruz kalan iribaşlarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yaklaşık %30 oranında inhibisyon ile 5.61 ± 0.49 nmol/dk/mg protein olarak ölçüldü. Bu inhibisyon düzeyi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.01$).

GPx aktivitesinde, uygulanan Cd+Cu karışımı konsantrasyonları artışı ile paralellik sergileyen bir inhibisyon belirlenmesine rağmen, enzim aktivitesinde ki bu baskılanmanın kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olmadığı saptandı ($p > 0.05$).

CAT aktivitesinin, Cd+Cu karışımı konsantrasyon artışları ile ilişkili olarak artış göstermesine rağmen, bu aktivite artışı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulunmadı ($p > 0.05$).

CaE aktivitesinin ise metal karışımlarının konsantrasyon artışı ile ilişkili olarak inhibisyona uğradığı ve en düşük CaE aktivitesinin 5.18 mg/L Cd+ 0.85 mg/L Cu karışımında yaklaşık %30 oranında inhibisyon ile 134.14 ± 8.78 nmol/dk/mg protein değerinde olduğu bulundu. Enzim aktivitesindeki bu baskılanma kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak da önemli bulundu ($p < 0.05$).

AChE aktivitesinin 5.18 mg/L Cd+ 0.85 mg/L Cu karışımında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yaklaşık %10 oranında arttığı ve bu aktivite artışının istatistiksel olarak da önemli olduğu saptandı ($p < 0.05$).

Çizelge 4.15. 24 saatlik Cd+Cu uygulamasının enzim aktiviteleri üzerine etkisi (nmol/dk/mg protein \pm standart hata).

Konsantrasyon (mg/L)	n	GST	CaE	AChE	GR	GPx	CAT
Kontrol	8	173.78 \pm 4.33	189.31 \pm 13.00	117.21 \pm 3.32	8.13 \pm 0.36	11.35 \pm 0.81	12.26 \pm 0.63
2.59 Cd + 0.425 Cu	8	220.85 \pm 8.74**	172.97 \pm 6.29	116.33 \pm 5.08	8.96 \pm 0.88	10.30 \pm 0.78	15.18 \pm 1.71
5.18 Cd + 0.85 Cu	8	149.41 \pm 7.63*	134.14 \pm 8.78*	127.37 \pm 2.64*	5.61 \pm 0.49**	8.65 \pm 1.87	15.09 \pm 1.58

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ kontrol ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.

4.2.4. 24 Saatlik Pb+Cu Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi

Kurşun ve bakırın belirlenen konsantrasyonlarının 1:1 oranında karışımlarına 24 saat süreyle maruz kalan *Xenopus laevis* iribaşlarında çeşitli enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler çizelge 4.16'da verilmiştir.

GST aktivitesinin Pb+Cu karışımına maruz kalan iribaşlarda konsantrasyon artışı ile paralellik sergileyen bir artış gösterdiği bulundu. En yüksek enzim aktivitesi, 123.05 mg/L Pb+0.85 mg/L Cu uygulamasına maruz kalan iribaşlarda yaklaşık %90 oranında arttığı saptandı. GST aktivitesinin 123.05 mg/L Pb+0.85 mg/L Cu veya bu değerlerin yarısı kadar metal içeren ($LC_{50}/2$ değerleri) karışımdaki artışın kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak da önemli olduğu saptandı ($p<0.01$).

GR aktivitesinin Pb+Cu karışımı uygulamasında konsantrasyon artışı ile ilişkili olarak arttığı saptandı. Metallerin LC_{50} ve $LC_{50}/2$ karışımlarına maruz kalan iribaşlarda GR aktivitesinde meydana gelen artışların kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ($p<0.01$).

GPx aktivitesinin kurşun ve bakır karışımı uygulaması gruplarında konsantrasyon artışı ile ilişkili olarak arttığı ancak bu artışın kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olmadığı saptandı ($p>0.05$).

Pb+Cu karışımı uygulama gruplarında CAT aktivitesinin konsantrasyon artışı ile ilintili olarak arttığı gözlemlendi. CAT aktivitesinin 123.05 mg/L Pb+0.85 mg/L Cu (LC_{50} değerleri) karışımına maruz kalan iribaşlarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yaklaşık %110 oranında arttığı saptandı ve aktivite artışı istatistiksel olarak önemli düzeyde bulundu ($p<0.05$).

Kurşun ve bakır karışımına maruz kalan bireylerde CaE aktivitesinin konsantrasyon artışı ile lineer bir şekilde artmasına rağmen bu artışın kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlendi ($p>0.05$).

Pb+Cu karışımı uygulaması sonucu iribaşlarda AChE aktivitesinin konsantrasyon artışı ile ilişkili olarak artmasına yol açtığı ancak bu artışın kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olmadığı saptandı ($p>0.05$).

Çizelge 4.16. 24 saatlik Pb+Cu uygulamasının enzim aktiviteleri üzerine etkisi (nmol/dk/mg protein \pm standart hata).

Konsantrasyon (mg/L)	n	GST	CaE	AChE	GR	GPx	CAT
Kontrol	8	413.37 \pm 22.80	226.17 \pm 22.08	92.70 \pm 4.33	9.49 \pm 0.57	13.12 \pm 1.58	10.06 \pm 1.41
61.53 Pb + 0.425 Cu	8	649.64 \pm 25.49**	235.33 \pm 13.65	96.15 \pm 1.72	23.55 \pm 0.88**	13.32 \pm 1.09	11.74 \pm 1.90
123.05 Pb + 0.85 Cu	8	775.42 \pm 47.86**	236.36 \pm 9.96	97.68 \pm 4.14	32.45 \pm 1.75**	16.18 \pm 0.99	21.62 \pm 3.93*

*: $p<0.05$, **: $p<0.01$ kontrol ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.

4.2.5. 24 Saatlik Pb+Cd Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi

Kurşun ve kadmiyumun belirlenen konsantrasyonlarının 1:1 oranında karışımlarına 24 saat süreyle maruz kalan *Xenopus laevis* iribaşlarında çeşitli enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler çizelge 4.17’de verilmiştir.

GST aktivitesinin Pb+Cd karışımı uygulamasında konsantrasyon artışı ile ilişkisi olmayan değişim gösterdiği belirlendi. En yüksek enzim aktivitesinin 61.53 mg/L Pb+2.59 mg/L Cd (LC₅₀/2 değerleri) karışımına maruz kalan iribaşlarda gözlemlendi ve bu aktivite artışının kontrol grubuna kıyasla yaklaşık %90 düzeyinde olduğu saptandı. Hem 123.05 mg/L Pb+5.18 mg/L Cd (LC₅₀) hem de 61.53 mg/L Pb+2.59 mg/L Cd karışımı uygulanan gruplardaki enzim aktivitesi artışı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.01$).

Kurşun ve kadmiyum karışımı uygulamasının GR aktivitesinde konsantrasyon artışları ile ilişkili olarak artışa yol açtığı ve en yüksek GR aktivitesi kontrol grubuna kıyasla %265 oranında artış ile metallerin LC₅₀ değerleri karışımına maruz kalan bireylerde saptandı. GR aktivitesinde LC₅₀ ve LC₅₀/2 değerleri karışımlarının neden olduğu artışın kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ($p<0.01$).

GPx aktivitesinin Pb+Cd karışımının artan konsantrasyonları ile ilintili olarak baskılandığı belirlenmesine rağmen bu baskılanmanın kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olmadığı saptandı ($p>0.05$).

Pb+Cd karışımı uygulamasının CAT aktivitesinde konsantrasyonla ilişkili bir şekilde artışa neden olduğu ve en yüksek enzim aktivitesi, 123.05 mg/L Pb+5.18 mg/L Cd karışımına maruz kalan iribaşlarda belirlendi. Bu aktivite artışının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yaklaşık %90 düzeyinde gerçekleştiği ve istatistiksel olarak da önemli olduğu bulundu ($p<0.01$).

CaE aktivitesinin kurşun ve kadmiyum karışımı uygulamasının sonucu olarak çeşitli değişimler gösterdiği ancak bu değişimlerin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olmadığı saptandı ($p>0.05$).

AChE aktivitesinin CaE gibi, Pb+Cd karışımına maruz kalan iribaşlarda konsantrasyon ile ilişkili olmayan değişimler sergilemesine rağmen bu değişimlerin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olmadığı saptandı ($p>0.05$).

Çizelge 4.17. 24 saatlik Pb+Cd uygulamasının enzim aktiviteleri üzerine etkisi (nmol/dk/mg protein \pm standart hata).

Konsantrasyon (mg/L)	n	GST	CaE	AChE	GR	GPx	CAT
Kontrol	8	413.37 \pm 22.80	226.17 \pm 22.08	92.70 \pm 4.33	9.49 \pm 0.57	13.13 \pm 1.58	10.06 \pm 1.41
61.53 Pb + 2.59 Cd	8	780.36 \pm 12.47**	242.44 \pm 11.63	102.81 \pm 3.12	23.49 \pm 0.43**	12.34 \pm 0.51	11.07 \pm 1.12
123.05 Pb + 5.18 Cd	8	704.59 \pm 94.80**	216.38 \pm 26.51	94.29 \pm 13.47	33.77 \pm 1.93**	9.26 \pm 2.41	19.06 \pm 1.29**

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ kontrol ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.

4.2.6. 24 Saatlik Pb+Cd+Cu Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi

Pb, Cd ve Cu'nun belirlenen konsantrasyonlarının 1:1:1 oranında karışımlarına 24 saat süreyle maruz kalan *Xenopus laevis* iribaşlarında çeşitli enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler çizelge 4.18'de verilmiştir.

GST aktivitesinde Pb+Cd+Cu karışımına maruz kalan iribaşlarda konsantrasyon artışı ile ilişkili olmayan değişimler gösterdiği belirlendi. En yüksek enzim aktivitesi 61.53 mg/L Pb+2.59 mg/L Cd+0.425 mg/L Cu (LC₅₀/2 değerleri) karışımı uygulamasında kontrol grubuna kıyasla yaklaşık %60 artış ile 281.45±37.49 nmol/dk/mg protein değerinde saptandı. Bu artış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak da önemli bulundu ($p<0.05$).

GR aktivitesinin de GST enzimi gibi bir eğilim göstererek Pb+Cd+Cu karışımı uygulamasında konsantrasyon artışı ile paralel olmayan değişimler gösterdiği ve en yüksek GR aktivitesinin 15.86±2.36 nmol/dk/mg protein düzeyi ile 61.53 mg/L Pb+2.59 mg/L Cd+0.425 mg/L Cu karışımına maruz kalan iribaşlarda saptandı. Bu artış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak da önemli bulundu ($p<0.01$).

GPx aktivitesinin Pb+Cd+Cu karışımına maruz kalan bireylerde konsantrasyon artışı ile lineer olarak baskılandığı ve en düşük enzim aktivitesi metallerin LC₅₀ değerlerine maruz kalan iribaşlarda saptandı. Bu inhibisyonun kontrol grubuna kıyasla yaklaşık %40 oranında gerçekleştiği ve istatistiksel olarak da önemli olduğu belirlendi ($p<0.05$).

CAT aktivitesinin Pb+Cd+Cu karışımına maruz kalmanın bir sonucu olarak artan metal karışımı konsantrasyonları ile ilişkili olmayan değişimler gösterdiği ve en düşük CAT aktivitesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yaklaşık %50 düzeyinde inhibisyon ile 123.05 mg/L Pb+5.18 mg/L Cd+0.85 mg/L Cu karışımına maruz kalan iribaşlarda saptandı. Bu inhibisyon kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak da önemli bulundu ($p<0.01$).

CaE aktivitesinde Pb+Cd+Cu karışımı etkisinde konsantrasyon artışı ile doğrusal olarak inhibisyon saptandı. En düşük CaE aktivitesi, 123.05 mg/L Pb+5.18 mg/L Cd +0.85 mg/L Cu karışımına maruz kalan iribaşlarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yaklaşık %40 oranında inhibisyon ile 118.59±8.75 nmol/dk/mg protein düzeyinde ölçüldü. Enzim aktivitesindeki bu inhibisyon kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak da önemli bulundu ($p<0.05$).

AChE aktivitesinin Pb+Cd+Cu karışımı uygulaması sonucu iribaşlarda konsantrasyon artışı ile ilişkili olmayan değişimler sergilemesine rağmen bu değişimlerin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olmadığı saptandı ($p>0.05$).

Çizelge 4.18. 24 saatlik Pb+Cd+Cu uygulamasının enzim aktiviteleri üzerine etkisi (nmol/dk/mg protein \pm standart hata).

Konsantrasyon (mg/L)	n	GST	CaE	AChE	GR	GPx	CAT
Kontrol	8	173.78 \pm 4.33	189.31 \pm 13.00	117.21 \pm 3.32	8.13 \pm 0.36	11.35 \pm 0.81	12.26 \pm 0.63
61.53 Pb + 2.59 Cd + 0.425 Cu	8	281.45 \pm 37.49*	177.41 \pm 10.71	121.09 \pm 3.47	15.86 \pm 2.36**	9.80 \pm 0.92	18.06 \pm 2.95
123.05 Pb + 5.18 Cd + 0.85 Cu	8	159.72 \pm 16.27	118.59 \pm 8.75*	106.22 \pm 4.32	9.47 \pm 1.39	7.82 \pm 0.87*	6.02 \pm 0.51**

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ kontrol ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.

4.2.7. 24 Saatlik Metal Karışımı Uygulamalarının Metallotiyein Miktarına Etkisi

Metallerin LC₅₀/2 ve LC₅₀ değerlerinin 1:1 veya 1:1:1 oranındaki karışımlarına 24 saat süreyle maruz bırakılan *Xenopus laevis* iribaşlarında spektrofotometrik yöntem ile ölçülen metallotiyein miktarları ve gruplar arasında ortaya çıkan değişimler çizelge 4.19'da verilmiştir.

Kurşun ve kadmiyum karışımı uygulamasında MT miktarının iribaşlara uygulanan konsantrasyonla ilişkili olarak paralel bir artış sergilediği belirlendi. En yüksek MT miktarı 123.05 mg/L Pb+5.18 mg/L Cd karışımına maruz kalan iribaşlar için kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yaklaşık olarak %37 oranında arttı ve 26.83±1.32 nmol MT/gr yaş ağırlık olarak ölçüldü. Hem 61.53 mg/L Pb+2.59 mg/L Cd hem de 123.05 mg/L Pb+5.18 mg/L Cd karışımına maruz kalan iribaşlarda gözlenen artış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.01$).

Kadmiyum ve bakır karışımı etkisine maruz bırakılan iribaşlardaki MT miktarının konsantrasyonla bağlantılı olarak artış sergilediği ve buna bağlı olarak saptanan en yüksek MT miktarı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yaklaşık olarak %35 oranında artış ile 5.18 mg/L Cd+0.85 mg/L Cu uygulamasına maruz kalan iribaşlarda saptandı. Hem 2.59 mg/L Cd+0.425 mg/L Cu hem de 5.18 mg/L Cd+0.85 mg/L Cu uygulama gruplarında saptanan artışlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.01$).

Kurşun ve bakır karışımı uygulaması sonucunda konsantrasyonla bağlantılı olarak MT miktarının arttığı bulundu. En yüksek MT miktarı 123.05 mg/L Pb+0.85 mg/L Cu uygulanan organizmalarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yaklaşık %35 oranında arttı ve 26.48±1.48 nmol MT/gr yaş ağırlık olarak ölçüldü. Elde edilen veriler 61.53 mg/L Pb+0.425 mg/L Cu ve 123.05 mg/L Pb+0.85 mg/L Cu uygulama gruplarında gözlenen bu artışların kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak da önemli olduğunu göstermiştir ($p<0.01$).

Metallerin üçlü karışımına (Pb+Cd+Cu) maruz kalan iribaşlarda ise diğer metal karışımı uygulamalarında olduğu gibi, MT miktarının uygulanan konsantrasyon artışı ile paralel bir artış gösterdiği belirlendi. En yüksek MT miktarı 123.05 mg/L Pb+5.18 mg/L Cd+0.85 mg/L Cu karışımının uygulandığı iribaşlarda bulundu ve bu değer kontrol grubuna göre yaklaşık %38 oranında daha yüksek olduğu hesaplandı. Bu uygulama grubunda iribaşlar için saptanan MT miktarının, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak da önemli olduğu saptandı ($p<0.01$).

Çizelge 4.19. 24 saatlik metal karışımı uygulamalarının MT miktarına etkisi (nmol MT/gr yaş ağırlık \pm standart hata).

Konsantrasyon (mg/L)	n	Pb+Cd	Cd+Cu	Pb+Cu	Pb+Cd+Cu
Kontrol	8	19.23 \pm 0.23	19.23 \pm 0.23	19.23 \pm 0.23	16.89 \pm 0.30
LC _{50/2} ^a	8	24.18 \pm 0.95**	22.66 \pm 0.54**	23.28 \pm 0.78**	20.51 \pm 1.43
LC ₅₀ ^a	8	26.83 \pm 1.32**	26.15 \pm 1.76**	26.48 \pm 1.48**	22.75 \pm 1.98**

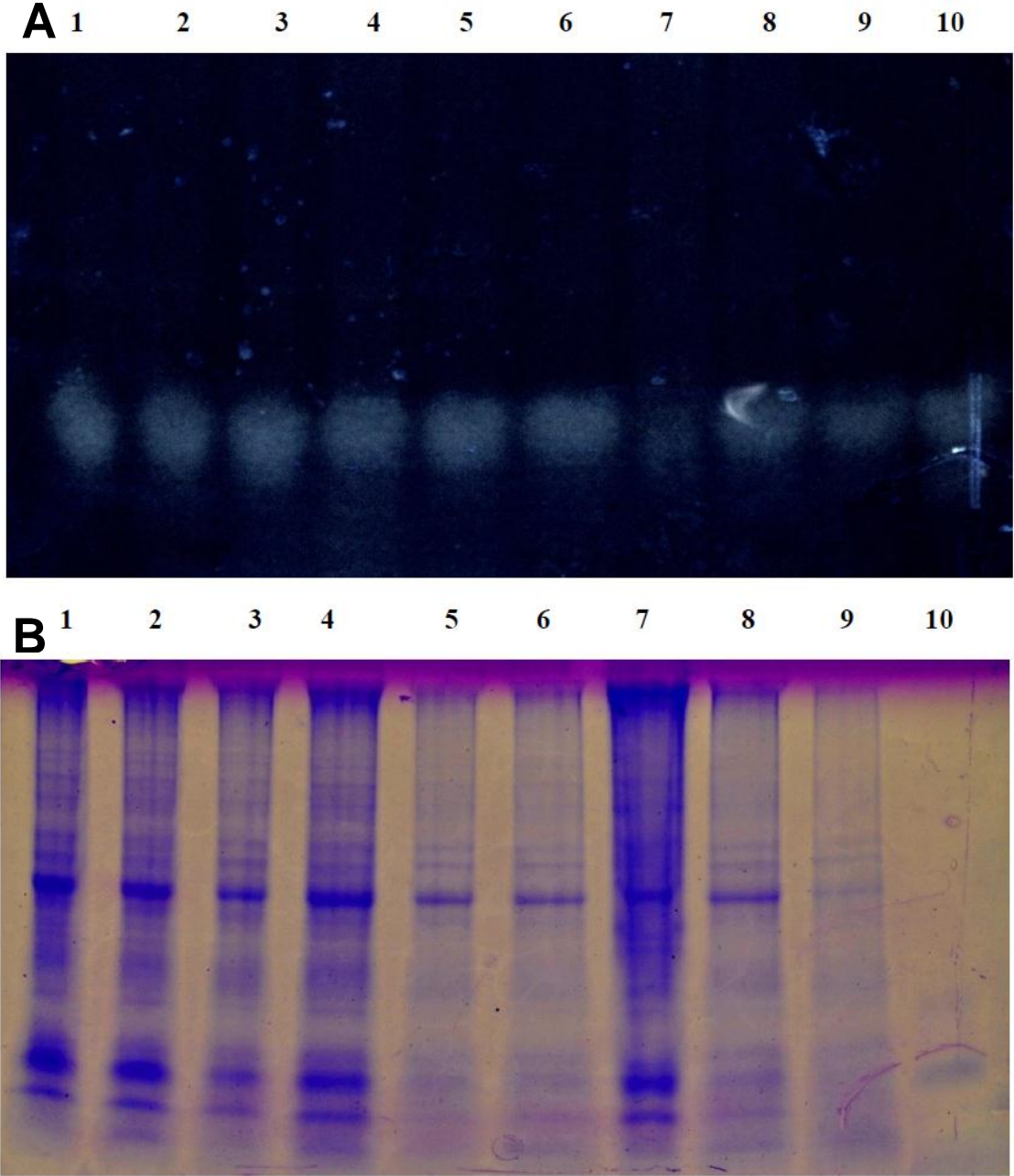
*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ kontrol ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.

^a: LC_{50/2}: Cd için; 2.59, Cu için; 0.425, Pb için; 61.53 mg/L

LC₅₀: Cd için; 5.18, Cu için; 0.85, Pb için; 123.05 mg/L

4.2.8. 24 Saatlik Elektroforetik-Florimetrik Çalışmalar İle İlgili Bulgular

Metallerin LC_{50/2} ve LC₅₀ değerlerinin 1:1 veya 1:1:1 oranındaki karışımlarına 24 saat süreyle maruz bırakılan *Xenopus laevis* iribaşlarında metalotiyoneinin nitel olarak varlığını belirleyebilmek için protein elektroforezi yapıldıktan sonra iki farklı görüntüleme tekniği kullanıldı. Bu çalışmalara bağlı olarak elde edilen veriler şekil 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.5. A; mBBR ile etiketlenmiş MT'nin SDS-PAGE elektroforezinden sonra UV-Florensans görüntüsü. B; MT'nin SDS-PAGE elektroforezinden sonra comassie brilliant mavi ile boyanmış görüntüsü. **1-**Pb+Cd+Cu (LC₅₀ değerleri karışımı) **2-** Pb+Cd+Cu (LC₅₀/2 değerleri karışımı) **3-** Pb+Cd (LC₅₀ değerleri karışımı) **4-** Pb+Cu (LC₅₀/2 değerleri karışımı) **5-** Pb+Cd (LC₅₀ değerleri karışımı) **6-** Pb+Cd (LC₅₀/2 değerleri karışımı) **7-** Cd+Cu (LC₅₀ değerleri karışımı) **8-** Cd+Cu (LC₅₀/2 değerleri karışımı) **9-** Kontrol (FETAX) **10-** Tavşan Karaciğer MT II.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ekolojik dengeyi bozan ve çevrede varlığı her geçen gün artan kirletici faktörlerden biri de metallerdir. Metallerin artan insan aktiviteleri sonucu çeşitli şekillerde çevreye yüksek miktarlarda verildiği ve özellikle de gelişmekte olan ülkelerde gerekli yasal düzenlemelerin ve yaptırımların eksikliği nedeniyle, başlıca çevresel kirleticiler arasında bulunduğu bilinmektedir. Metallerin farklı ekosistemlerde ve farklı canlı türlerinde etkilerinin değerlendirildiği çok sayıda bilimsel çalışma bulunmaktadır. Ancak bu çalışmalar daha çok metallerin tek başlarına etkilerini değerlendirmektedir. Özellikle amfibilerde metal karışımlarının etkilerinin değerlendirildiği bilimsel çalışmalar sınırlı sayıdadır. Tatlı su ekosistemleriyle ilgili biyolojik izleme çalışmalarında ve çevresel kirleticilerin etkilerinin değerlendirildiği laboratuvar çalışmalarında daha çok balık türleri kullanılmaktadır. Oysa ki amfibiler farklı gelişimsel dönemlerinde suya bağımlı organizmalardır ve özellikle erken gelişim evrelerinde çok düşük konsantrasyonlardaki kirleticiler dahi önemli toksik etkilere neden olabilir. Bundan dolayı sucul ekosistemlerdeki çevresel sorunların belirlenmesi için iyi bir biyoindikatör tür olarak kabul edilirler. Biyolojisi iyi bilinmesine ve çok sayıda bilimsel çalışmada deney hayvanı olarak kullanılmasına rağmen *X. laevis*'de metal toksisitesinin değerlendirildiği çalışma sayısı sınırlıdır. Aynı zamanda *X. laevis*'de biyobelirteç enzimler ve MT düzeyi kullanılarak çevresel kirliliğin izlendiği çalışma sayısı balık türlerine oranla çok azdır. Buna karşın ekosistemde genelde birarada bulunan metallerin karışımının çalışıldığı araştırma ise bulunamamıştır.

Yapılan bu araştırmanın sonuçlarına göre, test materyali olarak kullanılan üç farklı metalin ve bunların karışımlarının *X. laevis* iribaşları üzerinde toksik etkilere neden oldukları görülmektedir. Bununla birlikte, hipotezimize uygun olarak uygulanan metal karışımlarının metallerin tek başlarına olan etkilerine kıyasla daha toksik oldukları belirlendi. Her üç metal (Cd, Pb, Cu) ve metal karışımları ile yapılan çalışmalarda özellikle yüksek konsantrasyonlarda ölüm oranlarında artış gözlemlendi, hatta metal karışımlarının yüksek konsantrasyonlarında bütün iribaşların kısa sürede öldüğü saptandı. Yapılan toksisite çalışmaları sonucunda Cu, Cd ve Pb'nin LC₅₀ değerleri sırası ile 0.85, 5.18 ve 123.05 mg/L olarak hesaplanmış olup, metallerin ortalama öldürücü konsantrasyonları arasında Pb>Cd>Cu ilişkisi belirlenmiştir. Ayrıca metallerin NOAEC ve LOAEC değerleri arasında da benzer bir ilişki saptanmıştır. Metaller arasındaki bu ilişki daha önce de laboratuvarımızda *X. laevis* iribaşları üzerinde

yapılmış olan metal toksisitesi çalışması ile uyumludur [139]. Özellikle Cu ve Cd'un LC₅₀ değerlerinin oldukça düşük konsantrasyonda hesaplanması, bu metallerin iribaşlar için yüksek toksik etkiye sahip oldukları şeklinde değerlendirilebilir.

Araştırmada kullanılan metallerin ve karışımlarının seçilen biyobelirteç enzimler üzerinde farklı etkilere yol açtığı görülmektedir. Bu da metallerin toksisite mekanizmalarının farklı olabileceğini göstermektedir. Buna karşılık, metalotiyonein (MT) düzeyi üzerinde ise hem ayrı ayrı metallerin hem de karışımlarının benzer etkilere neden olduğu belirlenmiştir.

Araştırma sonuçlarımıza göre 96 saat süreyle kadmiyuma maruz kalan *X. laevis* iribaşlarında GST, GR, GPx ve CAT aktivitesinin önemli düzeyde arttığı görülmektedir ($p<0.01$ ve $p<0.05$). Özellikle antioksidan savunma sisteminin elemanları olan bu enzimlerdeki artışlar, literatürdeki farklı türlerle yapılan çalışmalardan elde edilen veriler ile de benzerlik göstermektedir. Basha ve Rani, Cd'a maruz bırakılan *Oreochromis mossambicus*'un karaciğer ve böbrek dokularında CAT enzim aktivitesinin arttığını göstermiş ve bunu Cd etkisine karşı verilen bir detoksifikasyon yanıtı olarak değerlendirmişlerdir. Bu araştırmacılar Cd'a maruz kalma sonrası ilk yanıt olarak, diğer detoksifikasyon mekanizmalarının indüksiyonundan önce, serbest radikallerin etkisinden organizmayı korumak için antioksidan savunma sistemlerinin indüklendiğini de vurgulamışlardır [168]. Yapılan başka bir çalışmada ise *O. niloticus*'un karaciğer ve böbrek dokularındaki GR, GST ve GPx aktivitesinin kirlenmiş bölgelerdeki balıklarda kontrol grubu balıklarına oranla daha yüksek olduğu rapor edilmiştir [134]. Yine başka bir çalışmada araştırmacılar çeşitli dozlarda Cd'a maruz bırakılmış sıçanların karaciğerinde konsantrasyona bağlı olarak GST aktivitesinin arttığını belirtmişlerdir [169]. Çalışmamızda Cd uygulamasına bağlı olarak iribaşların AChE ve CaE aktivitelerinde çeşitli dalgalanmalar görülse de, istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli bir değişim belirlenmedi. Bu verilerden yola çıkarak, *X. laevis* iribaşlarında kadmiyum toksisitesinin belirlenmesinde bu enzimlerin iyi birer biyobelirteç olmadığı ifade edilebilir. Ancak bu enzimlerin çok fazla etkilenmemesinde antioksidan savunma sisteminin koruyucu bir rolünün olabileceği de düşünülebilir. Bu anlamda literatürde de çeşitli veriler bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada *Monodonta lineata* türü gastropodlarda kadmiyumun AChE aktivitesi üzerinde etki göstermediği, *Nucella lapillus* türünde en yüksek Cd konsantrasyonunun AChE aktivitesini önemli düzeyde arttırdığı ve bu artışın literatür ile uyuşmadığı, ancak literatürde de Cd uygulamalarının farklı canlı türlerinde AChE

aktivitesinde farklı seyirlere neden olduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada, Cd uygulaması sonucu *Daphnia magna*'da AChE aktivitesinin değişmediği, *Oncorhynchus mykiss*'de AChE aktivitesinin yükseldiği ve *Barbus conchoni*'de ise AChE aktivitesinin azaldığı ifade edilmiştir [170]. Diğer taraftan literatür verileri ve çalışmamızda elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde CaE aktivitesinin çok fazla etkilenmemesinden dolayı, bu enziminde *X. laevis* iribaşlarında Cd toksisitesinin belirlenmesinde majör bir biyokimyasal belirteç olmadığından söz edilebilir.

Çalışmamızda, kadmiyumun metal detoksifikasyon sisteminde önemli rolü olan metallothionein miktarı üzerine etkisine bakıldığında, MT miktarının beklentilerimizde olduğu gibi konsantrasyon artışına bağlı olarak önemli düzeyde arttığı görülmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda MT miktarında görülen bu artış, metallothioneinlerin metal iyonlarını tutarak hücrel hasarı engellemedeki koruyucu rolünü ortaya koymaktadır. Bu konu ile ilgili daha önce yapılmış bazı çalışmalarda bulgularımızı destekler niteliktedir. Serra ve arkadaşlarının [171], kadmiyum etkisine bıraktıkları *Scapharca inaequivalvis* türü deniz tarağının çeşitli dokularında Cd düzeyini ve metal bağlayıcı proteinleri araştırdıkları bir çalışmada, Cd'nin özellikle böbrek, solungaç, kas ve kan gibi dokularda biriktiği ve Cd'nin dokularda metal bağlayıcı proteinlere bağlandığı belirlenmiştir. *Halichoerus grypus*'un (fok) lökositlerini *in vitro* koşullarda çinko ve kadmiyumun etkisine maruz bırakarak MT'lerin indüksiyonunun araştırıldığı bir çalışmada ise, araştırmacılar *in vitro* Zn ve Cd etkisinde lökositlerde iki farklı MT izoformunun (MT1 ve MT2) sentezinin meydana geldiğini ve metallerin regülasyonunda bu proteinlerin önemli roller üstlendiğini belirtmişlerdir [159].

Farklı konsantrasyonlarda kurşuna 96 saat süreyle maruz kalan iribaşlarda ise biyobelirteç olarak seçilen enzimlerden glutatyon S-transferaz (GST) aktivitesinde Avrupa Birliği içme suları yönetmeliğine göre Pb için kabul edilebilir konsantrasyon olan 0.01 mg/L dışındaki diğer konsantrasyonlarda önemli artışlar saptandı ($p<0.01$). Ayrıca, AChE aktivitesinin konsantrasyon artışı ile paralel olmasa da, önemli düzeyde inhibe olduğu belirlendi ($p<0.01$). Glutatyon redüktaz (GR) aktivitesinin 12.3 mg/L ($LC_{50}/10$) ve 0.01 mg/L (AB değeri) konsantrasyonlarında önemli oranda inhibe olduğu ($p<0.05$ ve $p<0.01$) daha yüksek konsantrasyonlarda ise kontrol grubuna yaklaşan bir eğilim gösterdiği belirlendi. Glutatyon peroksidaz (GPx) enziminde ise konsantrasyon ile ilişkili bir inhibisyon söz konusu olup sadece LC_{50} değerinde görülen inhibisyon önemli bulundu. Karboksilesteraz (CaE) ve katalaz (CAT) aktivitelerinde ise çeşitli değişimler görülmesine rağmen, bu değişimlerin önemli düzeyde olmadığı belirlendi.

Bundan önce yapılan çalışmalarda pestisitler, metaller ve deterjanlar gibi çevresel kirleticilere maruz kalan organizmalarda AChE aktivitesinin inhibisyona uğradığı rapor edilmiştir [77]. Özellikle organofosforlu ve karbamatlı pestisitler için sinir sistemi AChE enziminin hedef olduğu bilinmektedir [66,77]. Diğer taraftan, sinir sisteminin kurşun içinde öncelikli hedef olduğu ve dolayısıyla kolinerjik sistemi etkilediği bilinmektedir [172,173]. Bu çalışmada, artan Pb konsantrasyonlarına bağlı olarak AChE aktivitesinde görülen inhibisyon, kurşunun *X. laevis* iribaşları için nörotoksik bir metal olduğunu göstermektedir. Çeşitli ksenobiyotiklerin etkilerinin belirlenmesinde GST'nin kullanışlı bir biyokimyasal belirteç olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. GST aktivitesinin artışı, kirleticilerin neden olduğu strese organizmanın gösterdiği adaptasyon olarak değerlendirilmektedir [66]. Güngördü vd. tarafından yapılan bir çalışmada kurşuna maruz kalan *X. laevis* iribaşlarında Pb konsantrasyonu ile GST aktivitesi arasında pozitif bir ilişki olduğu rapor edilmiştir [139]. Yaptığımız bu çalışma sonucu olarak, GR aktivitesinde Pb etkisine bağlı meydana gelen değişimler literatür kayıtları ile de uyumaktadır. Antioksidan enzimlerin inhibisyonu subletal metal toksisitesinin potansiyel bir belirteci olarak düşünülmektedir. GR aktif bölgesinde bir disülfid bağına sahiptir ve kurşununda bu bağına affinitesi yüksektir. Bundan dolayı kurşun GR enzimini inhibe edebilir. Böylece kurşun toksisitesine maruz kalan *X. laevis* iribaşlarında meydana gelen inhibisyon, GSSG'nin redüksiyonunun engellenerek hücrelerin oksidatif hasara daha duyarlı hale geldiğini düşündürmektedir. Diğer taraftan, bazı çalışmalarda GR aktivitesi üzerine metallerin herhangi bir etkisinin olmadığı da bildirilmektedir [174,175]. Bu çalışmada en yüksek kurşun konsantrasyonu uygulaması ile iribaşlarda görülen GPx inhibisyonunun metabolik bir baskılanmaya uğradığı veya Pb'un enzimin aktif bölgesine bağlanması nedeniyle bu inhibisyonun gerçekleştiği düşünülebilir. Literatürde de GPx'in aktive olmak için selenyuma ihtiyaç duyduğu ve kurşun ve selenyumun bir kompleks oluşturduğu durumlarda enzimin inhibe olabileceği rapor edilmiştir [174]. Bu durum bizim çalışma sonuçlarımızı destekler niteliktedir. Diğer enzimlerle karşılaştırıldığında CAT aktivitesinde meydana gelen kısmi değişimler, bu enzimin Pb için öncelikli hedef olmadığını veya enzimin aktivasyonu için gerekli olan serbest oksijen radikallerinin diğer antioksidan enzimler tarafından elimine edildiğini akla getirmektedir. Bu bağlamda Labrot vd. tarafından yapılan bir çalışmada, *Brachydanio rerio*, *Corbicula* sp. ve *Eisenia fetida* kurşuna maruz bırakıldıktan sonra CAT aktivitesinin *Corbicula* sp.'de düştüğü, *Eisenia fetida*'da düştüğü ancak bu düşüşün çok az düzeyde olduğu ve *Brachydanio rerio*'da ise CAT

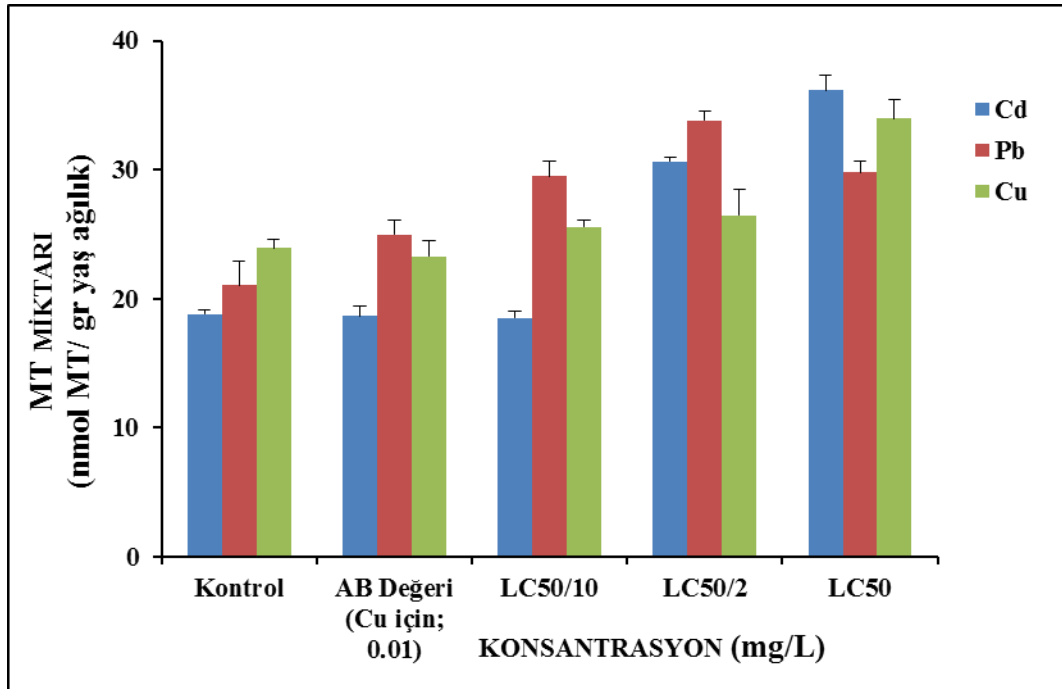
aktivitesinin düşük konsantrasyonlarda azaldığı yüksek konsantrasyonlarda ise arttığı rapor edilmiştir [176]. Bu çalışmada *X. laevis* iribaşlarında CaE aktivitesinde meydana gelen değişimler ise Güngördü vd. tarafından *X. laevis* iribaşlarında yapılmış bir çalışma ile de paralellik göstermektedir [139].

Metallotiyonein miktarı üzerine kurşunun etkisi incelendiğinde ise, artan kurşun uygulama konsantrasyonları ile paralel olarak MT miktarının da arttığı ancak en yüksek maruz kalınan konsantrasyon ile birlikte MT miktarında kısmen bir azalış olduğu şekil 5.1’ de görülmektedir. Bu durum iribaşlarda toksik etkiye bağlı olarak genel protein sentezi inhibisyonunun bir sonucu olabilir. Daha önce farklı organizmalar üzerinde yapılmış benzer çalışmalarda bulgularımızı destekler niteliktedir. Örneğin, *Lampito mauritii* türü toprak solucanlarında Pb ve Zn’nin doku metallotiyonein düzeyleri üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, çinko ve kurşun ile kontamine olmuş toprakda yaşayan solucanlarda doku metallotiyonein düzeyinde önemli bir artış gözlenmiştir [177]. Yapılan başka bir çalışmada ise *Perca fluviatilis* türü balıklarda MT miktarının kurşun konsantrasyonu ile ilişkili olarak arttığı rapor edilmiştir [178].

Bakırın 96 saatlik test sonucu 46. evredeki iribaşlarda biyobelirteç olarak seçilen enzimler üzerindeki etkisi incelendiğinde, 0.01 mg/L ve LC₅₀/10 değerlerinde Cu uygulamasının Cd ve Pb uygulamalarından farklı olarak, GST aktivitesinde inhibisyona neden olduğu görülmektedir. 0.085 mg/L (LC₅₀/10) ve 0.425 mg/L (LC₅₀/2) Cu uygulamalarının AChE, GR, CaE ve CAT enzim aktivitelerinde artışa, ancak en yüksek Cu konsantrasyonun bu enzimlerde inhibisyona neden olduğu gözlenmiştir. Bu durum yüksek konsantrasyonda metal maruziyetinin ortaya çıkardığı genel bir toksik etki ile ilişkilendirilebilir. Oysaki Cu’nun özellikle AChE enzim aktivasyonu için önemli bir kofaktör olduğu bilinmektedir. GPx aktivitesinin de özellikle LC₅₀ değerinde Cu uygulaması ile baskılandığı görülmektedir. AChE, GR, CaE ve CAT enzimlerinde genel olarak görülen aktivite kaybının iribaşların ölüm periyoduna girmeleri nedeniyle protein sentezinin baskılanmasının bir sonucu olarak meydana geldiği düşünülebilir. Yapılan çeşitli çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile verilerimiz benzerlik göstermektedir. Örneğin, uzun süreli subletal Cu konsantrasyonuna maruz kalan *Sparus aurata*’nın beyin AChE aktivitesinin önemli düzeyde arttığı bildirilmiştir [179]. Yine *Monodonta lineata* ve *Nucella lapillus* türü iki gastropod ile yapılan bir çalışmada, her iki türde Cu uygulamasının AChE aktivitesi üzerinde herhangi bir etkiye neden olmadığı, *N. lapillus* türünde Cu uygulamasının GST aktivitesini inhibe ettiği, *M. lineata* türünde ise 60 µg/L Cu uygulamasının dahi GST aktivitesini etkilemediği bildirilmiştir [170]. Bakır

uygulamasına bağı olarak CaE aktivitesinde görülen eğilim daha önce laboratuvarımızda yapılan diğer bir çalışma ile de benzerlik göstermektedir [139]. Cu'nun bir tatlı su midyesi olan *Anodonta anatina* üzerine etkisinin değerlendirdiği bir çalışmada CAT, GR, SOD ve GPx aktivitelerinin düşük konsantrasyonlarda arttığı, ancak Cu hasarı nedeniyle protein sentez kapasitesinin engellendiği ve böylece enzim aktivitelerinin doku ağırlığına ve Cu konsantrasyonuna bağı olarak baskılandığı gözlemlenmiştir [180]. Tüm bu çalışma sonuçları *X. laevis* üzerine Cu'nun yol açtığı toksisiteye bağılı hasarı destekler niteliktedir.

Bakıra maruz kalan *X. laevis* iribaşlarında MT miktarının hem Cd hem de Pb uygulamalarına benzer şekilde konsantrasyon artışı ile doğrusal olarak arttığı görülmektedir. Ancak bakırın neden olduğu artış kadmiyum ve kurşuna maruz kalan iribaşlarda görülen artışa göre kontrol grupları ile karşılaştırıldığında daha düşük düzeydedir (Şekil 5.1). Bakır uygulamasında MT miktarındaki artışın diğer metal uygulamaları sonucu gözlenen MT miktarı artışına göre daha az düzeyde olması, bakırın iz element olarak çeşitli biyolojik süreçlere katılmasına bağı olarak belirli bir hücrel konsantrasyona erişikten sonra toksik etkiye neden olduğunu akla getirmektedir.



Şekil 5.1. 96 saatlik Cd, Pb ve Cu uygulamalarının MT miktarına etkisi.

Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler ile literatür verileri karşılaştırıldığında, sonuçlarımızın literatür ile benzerlik gösterdiği görülmektedir. Cooper vd. [124] tarafından yapılan bir çalışmada bir nehre giren farklı akarsulardan alınan *Rana catesbeiana* türü kurbağalarda karaciğer metallotiyonein düzeyi iki bölgede Cu içeriği ile, bir bölgede ise Cd içeriği ile pozitif korelasyon göstermiştir. Yine yapılan başka bir çalışmada, doğal ortamlarından alınan balıkların karaciğer MT konsantrasyonu ile Cu maruziyeti arasında doğrusal bir ilişki olduğu rapor edilmiştir [135]. Araştırmacıların ergin *Rana ridibunda* türü kurbağaları 5, 15 ve 30 gün süresince Cu'nun 50 ve 100 mg/L konsantrasyonlarına maruz bıraktıkları bir çalışmada, en yüksek metal düzeyi 30 gün süreyle 100 mg/L Cu'a maruz kalma sonucunda böbreklerde belirlenmiştir. Bu durum, karaciğerde aşırı miktarda bakır birikmesinden sonra, böbreklerin Cu detoksifikasyonunda ikinci bir yol gibi davrandığını göstermiştir. Aynı çalışmada karaciğer MT düzeylerinin ise 5. ve 15. günlerde Cu konsantrasyonunun artışı ile birlikte arttığı belirlenmiştir. Ancak araştırmanın sonunda MT düzeyinde bir azalış görülmüştür [147].

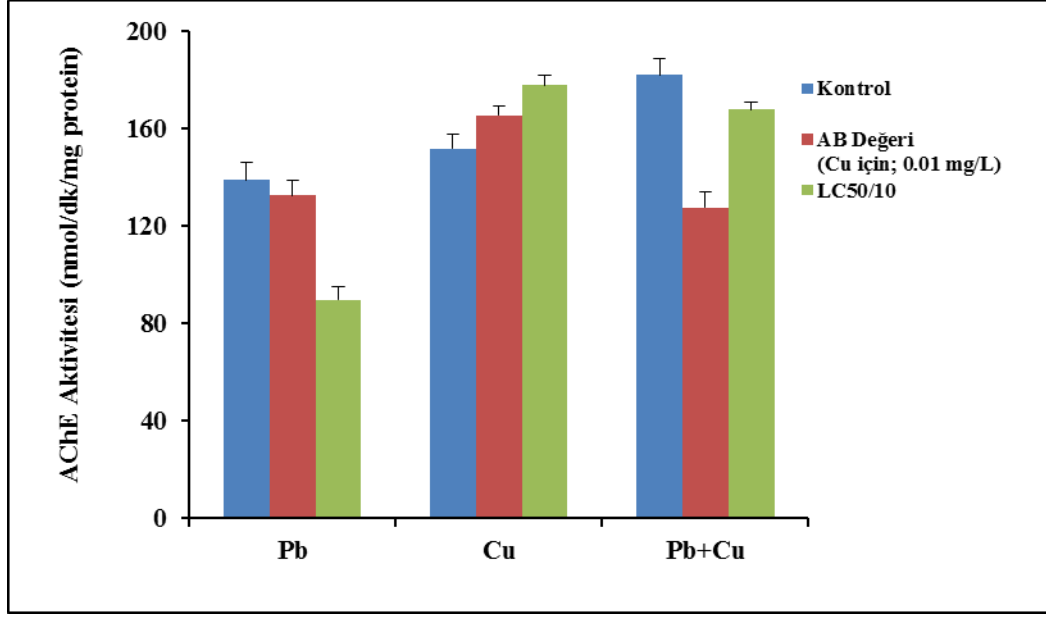
Çalışmamızda bütün metal karışımlarının biyokimyasal belirteçler üzerine etkileri değerlendirilirken, hem 96 saatlik hem de 24 saatlik çalışmalar ile ilgili bulgular birlikte ele alınmıştır.

Bu çalışmada, kurşun ve kadmiyumun $LC_{50}/2$ değerlerinin karışımı dışında bütün metallerin ikili ve üçlü kombinasyonlarında, $LC_{50}/2$ ve LC_{50} değerlerinin karışımlarına maruz kalan iribaşların hepsinin öldüğü görülmektedir. Bu da metallerin LC_{50} ve $LC_{50}/2$ değerleri karışımlarının öldürücü etki düzeyinin, tek başlarına metallerin belirtilen konsantrasyonlarının öldürücü etki düzeylerinden yüksek olduğunun bir göstergesidir. Ayrıca 96 saat süreyle metal karışımlarına maruz kalan iribaşlarda belirlenen enzim aktiviteleri ve MT miktarı üzerine olan etkileri incelendiğinde, metallerin her birinin tek başına düşük konsantrasyonlarına maruz kalan gruplarda enzimlerin çoğunda çok önemli değişimler gözlenmemiştir. Ancak düşük konsantrasyonlarda metal karışımı uygulanan gruplarda ise önemli düzeyde aktivite değişimleri belirlenmiştir. Sucul ekosistemlerde kirleticiler genelde birçok toksik etmenin karışımlar halinde bulunması nedeniyle bir toksik etkiye yol açabilir. Bu durumda bir kirletici kaynaktan gelen birçok farklı metal düşük konsantrasyonlarda dahi ekosisteme giriş yaparsa, tek başlarına ancak daha yüksek konsantrasyonlardaki toksik etkilerine göre önemli toksisite artışına yol açabileceğini düşünebiliriz. Bu nedenle bu çalışmada esas olarak metal karışımlarının her birinin AB mevzuatına göre kabul

edilebilir sınır değerlerinde birlikte (karışım halinde) olası toksik etkilerinin saptanması amaçlanmıştır.

Düşük konsantrasyonlardaki kadmiyum ve bakır karışımına 96 saat süreyle maruz kalan iribaşlarda GST aktivitesindeki artış ile birlikte GR ve CAT aktivitelerinde bir azalma görülürken, diğer enzim aktivitelerinde önemli bir değişim görülmemektedir. Buna karşın, 24 saat süreyle Cd+Cu karışımının yüksek konsantrasyonlarının uygulandığı gruplarda GST aktivitesinde önce artış, sonra azalış; CaE ve GR aktivitelerinde baskılanma; AChE aktivitesinde ise artış belirlendi. Metallerin tek başlarına etkileri göz önünde bulundurulduğunda, Cd+Cu karışımının düşük konsantrasyonlarına maruz kalan iribaşlarda enzim aktivitelerinin kısmen daha fazla etkilendiği görülmektedir. Verilerimiz doğrultusunda enzim aktivitelerinde görülen değişimlerin tek başına Cd uygulamasından daha çok Cu uygulamasına benzediğini ve *X. laevis* iribaşları için bakırın kadmiyum ile birlikte uygulanmasının, Cu'a olan duyarlılığı ve toksik etkiyi arttırdığını söyleyebiliriz.

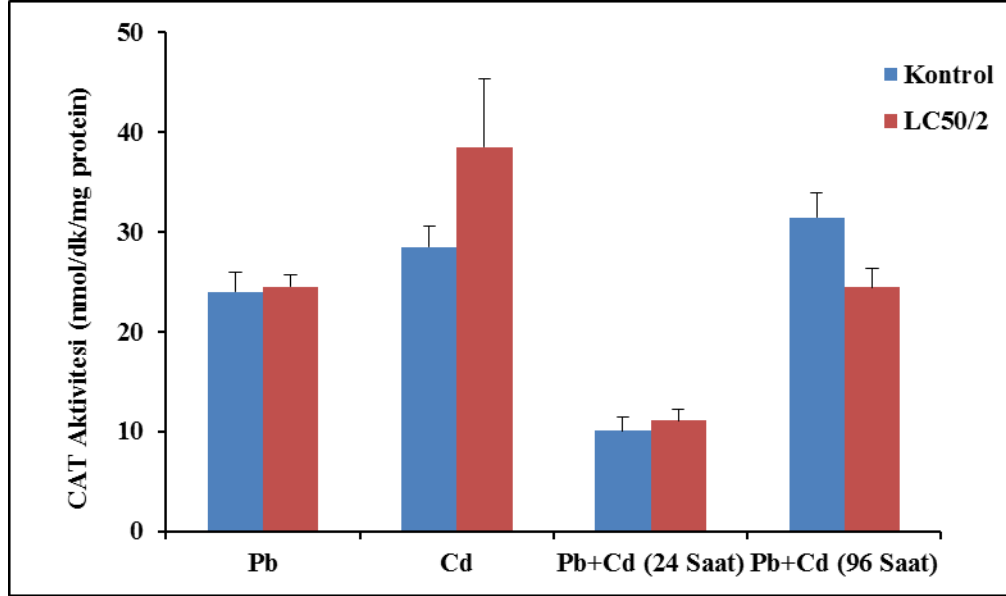
İribaşlarda Pb ve Cu karışımı uygulamasına bağlı olarak 96 saat süreyle metallerin düşük konsantrasyonlarının karışımına maruz kalma sonucunda GST, GR, GPx ve CAT aktivitelerinde, 24 saat süreyle yüksek konsantrasyonlarının karışımına maruz kalma sonucunda ise GST, GR ve CAT aktivitelerinde artış belirlenmiştir. Buna karşın 96 saat süreyle metal karışımının düşük konsantrasyonlarına maruz kalan bireylerde CaE ve AChE aktivitelerinde inhibisyon belirlenmesine rağmen, yüksek konsantrasyonlara 24 saat süreyle maruz kalan iribaşlarda önemli bir değişim görülmemektedir. Bunun yanı sıra, 0.01 mg/L Pb (AB değeri) ve 0.01 mg/L Cu konsantrasyonlarının tek başlarına enzimleri etkilemediği ancak bu metallerin karışım halinde GST, AChE, GPx ve CAT enzimlerinde önemli düzeyde değişimlere neden olduğu gözlenmiştir. Ayrıca bu metallerin enzimler üzerinde tek başlarına oluşturdukları etkiler ile karışım halinde oluşturdukları etkiler, AChE enzimi dışında benzer bir eğilim göstermektedir. Tek başına bakır AChE aktivitesinde artışa, tek başına kurşun ise inhibisyona neden olurken, bu metallerin karışımı özellikle düşük konsantrasyonlarda inhibisyona neden olmuştur (Şekil 5.2). Bu doğrultuda Pb ve Cu karışımının düşük konsantrasyonlarda bile yüksek toksik etkiye neden olduğu, ancak kurşunun neden olduğu AChE inhibisyonunun Cu'nun antagonistik etkisi nedeniyle kısmen azaldığı düşünülmektedir.



Şekil 5.2. 96 saatlik düşük konsantrasyonlardaki Pb, Cu ve Pb+Cu uygulamalarının AChE aktivitesi üzerine etkisi.

Kurşun ve kadmiyumun $LC_{50}/2$, $LC_{50}/10$ ve AB mevzuatı değerleri karışımlarına 96 saat süreyle maruz kalan *X. laevis* iribaşlarında görülen enzimatik değişimlerin, metallerin tek başlarına neden oldukları enzimatik değişimlerden farklı bir eğilim gösterdiği belirlenmiştir. Metallerin AB mevzuatına göre içme sularında kabul edilebilir düzeyde bulunmasına izin verilen konsantrasyonlarının tek başlarına uygulanması sonucunda belirlenen enzimlerin çok fazla etkilemediği, ancak karışım halinde uygulandıklarında GST, GR ve AChE aktivitesinde artışa neden oldukları gözlenmiştir. Her iki metal ayrı ayrı uygulandığında CaE aktivitesinde önemli değişimlere yol açmamış ancak karışım halinde konsantrasyon artışı ile paralel olarak enzim aktivitesinin artmasına neden olmuşlardır. AChE aktivitesinin ise Cd etkisinde çok fazla değişmediği, Pb etkisinde baskılandığı ve Pb+Cd etkisinde ise önce aktive olduğu daha sonra ise inhibe olduğu görülmektedir. Bunun dışında, GPx aktivitesinin tek başına Pb'na maruz kalan hayvanlarda $LC_{50}/2$ değeri ve daha düşük konsantrasyonlarında kısmen inhibe olmasına karşın, tek başına Cd etkisinde indüklendiği belirlenmiştir. Pb+Cd karışımında ise GPx aktivitesinde önemli bir değişim görülmemektedir. Bu durum ise metallere karışım halinde maruz kalmanın *X. laevis*'de antagonist bir etkiye neden olabileceğini akla getirmektedir. Diğer taraftan, ayrı ayrı metal uygulamalarında CAT aktivitesinde artış gözlenirken, metallerin $LC_{50}/2$ değerleri karışımının 24 saatlik uygulama sonucunda enzim aktivitesini arttırdığı, buna karşın 96 saatlik uygulamada ise aktivitenin önemli düzeyde inhibe olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.3). Bunun da enzimlerin

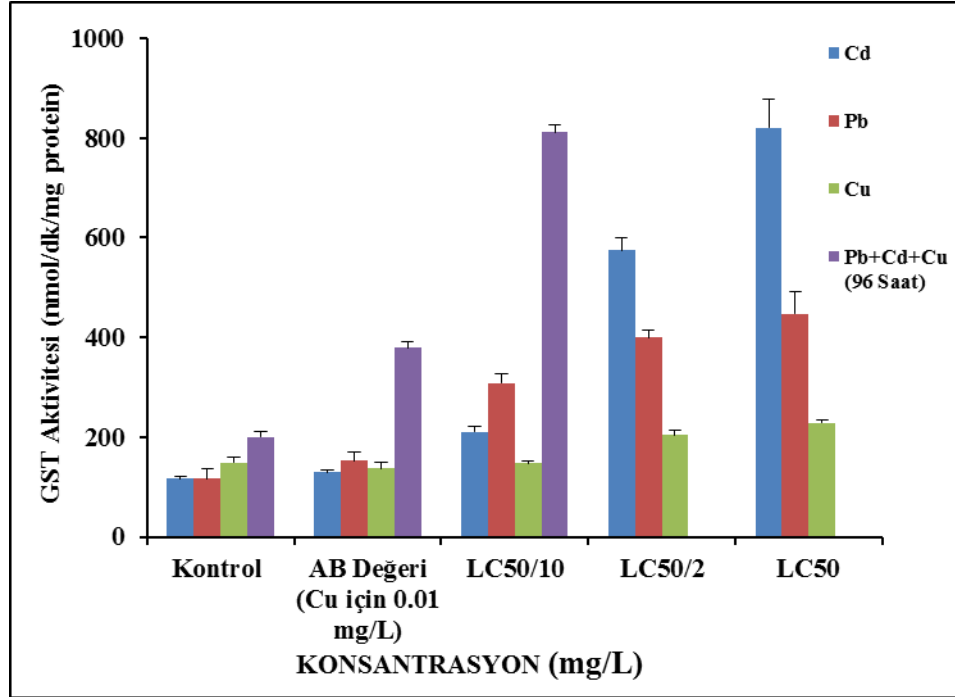
akut ve subakut maruziyette farklı yanıtlar vermesinin bir sonucu olarak meydana geldiği ve CAT aktivitesinin baskılanması sonucu serbest radikallerin birikimi nedeniyle bir toksik hasarın ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 5.3. Pb ile Cd'un LC_{50/2} değerlerinin tek başına ve karışım halinde CAT aktivitesi üzerine etkisi.

Metallerin AB mevzuatı sınır değerleri ve LC_{50/10} değerlerinin üçlü karışımına 96 saat süreyle maruz bırakılan *X. laevis* iribaşlarında özellikle GST, CaE, GR ve CAT aktivitelerinin önemli düzeyde arttığı saptanmıştır. Ancak daha önceden de bahsedildiği gibi, özellikle metallerin tek başına AB sınır değerleri konsantrasyonları genel olarak enzimler üzerinde önemli bir değişime yol açmamıştır. Özellikle 96 saatlik metal uygulama grupları kendi içinde değerlendirildiğinde kontrol gruplarına kıyasla düşük konsantrasyonların karışımında görülen GST aktivitesindeki artış oranı, metallerin bu konsantrasyonlarının tek başlarına uygulamalarında görülen artış oranından çok daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.4). Bu da metallerin tek başlarına oluşturdukları etkilere göre ortamda karışım şeklinde bulduklarında çok daha toksik olduklarının bir göstergesi olarak düşünülebilir. Bu durum çeşitli ülkelerde içme ve kullanım sularında mevcudiyeti sınır değerleri aşmadığı sürece metallerin sınır değerlerde, ancak karışım halinde olduğunda sağlık bakımından önemli bir risk oluşturabileceğinin bir göstergesidir. Metallerin tek başlarına enzimler üzerindeki etkileri göz önünde bulundurulduğunda, karışım halinde iken birbirleri ile etkileşime girerek ya da birbirlerinin antogonisti olarak davranmalarının bir sonucu olarak risk oluşturabileceği

sonucunu çıkarabiliriz. Metallerin üçlü karışımına 24 saat süreyle maruz bırakılan iribaşlarda, özellikle en yüksek konsantrasyon olan LC₅₀ karışımlarının enzimlerin çoğunda aktivite kaybına yol açtığı gözlenmektedir. Burada yüksek konsantrasyondaki metal karışımının metabolik baskılanmaya neden olarak protein sentezini engellemesinden ve akut düzeyde sucul ekosistemlerin kirlenmesinin hemen ardından, ortamdaki metal konsantrasyonu seyrelmeye uğramadan önce önemli bir risk unsuru olabileceği de değerlendirilmelidir.



Şekil 5.4. 96 saatlik Cd, Pb, Cu ve karışımları uygulamasının GST aktivitesine etkisi.

Her üç metalin farklı konsantrasyonlardaki karışımlarına maruz kalan iribaşlarda MT miktarındaki değişimlere bakıldığında, 96 saatlik uygulama sonucunda metallerin AB mevzuatı tarafından kabul edilebilir sınır değerlerinin MT miktarında önemli bir değişime neden olmadığı görülmektedir. Bu da metal toksisitesi sonucu MT indüksiyonunun gerçekleşmesi için daha yüksek metal konsantrasyonlarının gerektiğini akla getirmektedir. Ancak kadmiyum ve bakır karışımı dışındaki karışımlarda, metal konsantrasyonunun artışı ile birlikte MT miktarında artışlar olduğu görülmüştür. Metallerin yüksek konsantrasyonlarına 24 saat süreyle maruz kalan iribaşlarda ise MT miktarının önemli düzeyde arttığı belirlenmiştir. Bu veriler MT sentezinin artması için hücrelerin belirli bir metal konsantrasyonuna ulaşması sonucu olarak MT sentezinin arttığı ve MT miktarındaki artışın bir savunma mekanizması gibi işlediğini düşündürmektedir. Bir bakıma bunu MT aracılığı ile gerçekleşen ve bir immün sistem

veya biyotransformasyon sistemi gibi görev yapan bir koruma mekanizmasına benzetebiliriz. Yapılan elektroforez çalışmalarında da 24 saatlik uygulamalardan elde edilen görüntülerdeki protein bantlarının 96 saatlik uygulamalardan elde edilenlerden daha belirgin olduğu da görülmektedir.

Çalışmamızda metal karışımları uygulamaları sonucu elde ettiğimiz veriler ile doğrudan ilişkilendirilebilecek literatür verisi sınırlı sayıda olmakla birlikte, farklı biyoindikatör türlerin, biyokimyasal belirteçlerin ve metal karışımlarının kullanıldığı çok sayıda çalışma mevcuttur. Literatürdeki bu çalışmalar elde ettiğimiz veriler ile büyük oranda benzerlikler göstermektedir. Bu konuda yapılan bir çalışmada, kullanılmayan bir uranyum maden ocağı gölcüğünden ve referans olarak seçilen bölgeden alınan su örneklerindeki metal içeriği ile her iki bölgeden alınan *Pelophylax perezi* türü kurbağaların çeşitli doku ve organlarındaki GST, CAT, GR, GPx, LDH aktiviteleri ile lipid peroksidasyon düzeyleri karşılaştırılmıştır. Araştırmacılar metallerin maden ocağı gölcüğünden alınan örneklerin dokularında yüksek konsantrasyonlarda olduğunu özellikle de uranyumun referans bölgedeki örneklere göre 1350 kat daha fazla olduğunu saptamışlardır. Maden ocağı gölcüğünden alınan kurbağaların karaciğer dışındaki bütün organlarında total GPx aktivitesinde bir artış belirlenmiştir. Ancak akciğerde CAT enziminin önemli düzeyde baskılanmasının muhtemel bir sonucu olarak GPx aktivitesindeki artışın sadece akciğerde önemli düzeyde olduğu rapor edilmiştir [126]. Fenoglio vd. [127] iki farklı bölgeden aldıkları *Rana esculenta* türü kurbağalarda kirliliğe bağlı olarak bazı enzim aktivitelerindeki değişimleri araştırılmıştır. Araştırmacılar tarafından referans bölgeye göre kirli olduğu düşünülen bölgedeki kurbağalarda asit fosfataz, NOS bağımlı nikotinamid adenin dinükleotid fosfataz, katalaz enzim aktivitelerinin ve indüklenebilir NOS düzeyinin arttığı rapor edilmiştir. Özmen ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada Karakaya Baraj Gölünden yakalanan balıkların dokularında kadmiyum, kurşun ve bakır gibi metallerin biriktiği saptanmıştır. Ayrıca GST, CaE, AST, LDH ve ASP aktivitelerinin kirlilik düzeyine ve lokasyonlara göre önemli düzeyde değiştiği bildirilmiştir [137]. *O. niloticus*'un Zn, Cd ve Zn+Cd karışımına maruz bırakılması sonucu maruz kalma süresi ve ortam derişiminin artışıyla ChE aktivitesinde azalma, CAT, G6PD, ALT, AST, ALP, LDH ve LP aktivitesinde artış rapor edilmiştir. İncelenen bütün biyokimyasal belirteçler üzerine metallerin etkisinin düşük derişimlere oranla yüksek derişimlerde daha fazla ve bu etkilerin Zn+Cd>Cd>Zn şeklinde olduğu saptanmıştır [148]. Başka bir çalışmada çevresel ve endüstriyel atıklarla kirlenmiş Nil nehrinin bazı bölgelerinden yakalanan

O. niloticus'un karaciğer ve böbrek dokularındaki GR, GST ve GPx aktivitesinin kirlenmiş bölgelerdeki balıklarda kontrol grubu balıklarına oranla daha yüksek olduğu gözlenmiştir [134]. Kostaropoulos vd. [145] tarafından kadmiyum ve kromun *Rana ridibunda*'nın çeşitli dokularındaki Cr ya da Cr+Cd karışımının kurbağalarda karaciğer GST ve P450-MO ile böbrek GST aktivitelerinde bir azalışa neden olduğunu ve hem GST hem de P450-MO aktiviteleri ile metal karışımına maruz kalan bireylerin karaciğerindeki her iki metalin konsantrasyonu arasında negatif bir korelasyon olduğunu rapor etmişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada ise, *O. niloticus* türü balıklar Zn, Cu ve Zn+Cu etkisine maruz bırakıldığında balık ölümlerinin bakır ve çinkoya oranla çinko+bakır karışımının etkisinde daha fazla olduğunu bildirmişlerdir [149]. Arjantin'in Ushuaia koyundan referans olarak seçilen bir bölge ile farklı düzeyde kontamine olmuş dört bölgeden alınan sediment örneklerinde lokal amfipodların (*Gammarid: Paramorea*) biyolojik yanıtları ve sediment metal konsantrasyonları araştırılmıştır. En fazla etkilenen alanlardan alınan sediment örneklerine maruz bırakılan amfipodlarda AChE aktivitesinde inhibisyon, GST aktivitesinde ise aktivasyon gözlenmiştir. Organizmaların biyolojik yanıtları ile sediment metal konsantrasyonu ve ötrofikasyon düzeyini ilişkilendirmek için temel bileşen analizi yapılmıştır. Cd ve Cr düzeyi ile AChE inhibisyonu ve GST'deki artış arasında bir ilişki saptanmıştır. CAT aktivitesi ve lipid peroksidasyon düzeyinde çoğu sediment örneğinde artış gözlenmiştir, ancak bu artışın kirletici konsantrasyonları ile doğru orantılı olmadığı saptanmıştır [181]. Lopes vd. [131] tarafından bakır madeni atıkları ile kirlenmiş bir nehirdeki *Leuciscus alburnoides* türü balıklarda metal kirliliğinin değerlendirildiği bir çalışmada, mevsimsel olarak GST aktivitesi, karaciğer dokusunda çeşitli metallerin düzeyi ve suyun fiziko-kimyasal parametreleri ölçülmüştür. Kontrol alanı ile karşılaştırıldığında suda sülfat, Mg, Mn, Fe ve Cu düzeyi ile balıklarda hepatik Cu ve Se düzeyinin yüksek belirlendiği alanda GST aktivitesi kontrol alanından önemli düzeyde yüksek bulunmuştur. GST aktivitesindeki artış, bu elementlerin yüksek konsantrasyonlarına devamlı maruz kalma sonucu balıkların metabolik adaptasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan benzer bir çalışmada ise Güneybatı Fransa'da beş nehrin kirlilik düzeyini izlendiği bir çalışmada kirliliğin *Leuciscus cephalus* türü balıklar üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Araştırmacılar karaciğer GST ve beyin AChE aktivitelerinin, metal bakımından kirli olduğu önceden belirlenmiş bir alanda kontrol alanı olarak seçilen gölden önemli düzeyde düşük olduğu bildirilmiştir [132]. Kamel ve arkadaşları [73] tarafından yapılan bir çalışmada, Tunus'un kıyı kesimlerine deşarj edilen işlenmiş

kentsel atıkların %0, %1, %3 ve %10'luk atık konsantrasyonlarına 7 ve 14 gün süre ile maruz bırakılan *Ruditapes decussatus* türü midyelerin sindirim bezinde önemli düzeyde Cu, Cd ve Zn birikimi ve önemli biyokimyasal değişimler gözlemlenmiştir. Kentsel atıkların artan konsantrasyonlarına bağlı olarak midyelerin hem sindirim bezi hem de solungaçlarındaki CAT aktivitesi, lipid peroksidasyon düzeyleri ve MT düzeyleri indüklenmiş, AChE aktivitesi ise inhibe olmuştur. Sonuç olarak araştırmacılar, *Ruditapes decussatus*'un solungaç ve sindirim bezi CAT, GST, AChE aktiviteleri ile MT ve lipid peroksidasyon düzeylerinin, sucül ekosistemler üzerine antropojenik kirleticilerin, özellikle de kompleks atıkların etkilerinin izlenmesinde duyarlı ve kullanışlı biyobelirteçler olduğunu önermişlerdir. Başka bir çalışmada ise krom ve krom+kadmiyum karışımının etkisine maruz bırakılan *Rana ridibunda* türü kurbağalarda, MT sentezinin Cr+Cd karışımında kontrol grubuna oranla 2-6 katlık artış gösterdiğini saptamıştır [117]. Cooper ve Fortin [124], yoğun bir şekilde tarım yapılan bir nehrin kıyı şeridi boyunca gübrelemeye bağlı olarak oluşan metal kirliliğinin nehirden toplanan boğa kurbağaları (*Rana catesbeiana*) üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar karaciğer metalotiyonein içeriğinde nehre giren farklı akarsulardan alınan kurbağalar arasında önemli bir farklılık gözlemlenmediğini, metalotiyonein düzeyinin iki bölgede Cu içeriği ile, bir bölgede ise Cd içeriği ile korelasyon gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Çalışmamızın sonuçları, insan aktiviteleri sonucu çeşitli şekillerde çevreye verilen metallerin 46. evredeki *X. laevis* iribaşlarında toksik potansiyele sahip olduğunu göstermiştir. Bu durum test organizmasının gelişim evresinde, özellikle organogenez esnasında düşük konsantrasyonlarda dahi metallerin ortamda bir karışım halinde bulduklarında yüksek toksisite riski taşıyabileceklerinin bir göstergesi olabilir. Ayrıca çalışma sonuçları *X. laevis* iribaşlarının metal toksisitesinin belirlenmesi için uygun bir biyoindikatör tür ve seçilen biyobelirteçlerden özellikle GST, AChE, GR, CAT ve MT'nin bu amaçla kullanışlı biyokimyasal belirteçler olduğunu ortaya koymaktadır.

Çalışma verilerimizden yola çıkarak, doğal habitatları toksik maddeler ile kirletildiğinden, son zamanlarda popülasyonlarında bir azalma görülen amfibiler ile ilgili olarak bu kirleticilerin tek başlarına etkilerinden çok, karışım halindeki ve düşük konsantrasyonlardaki etkilerinin belirlenmesinin çok daha önemli olduğu sonucunu doğurmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- [1] F. Berkes, M. Kışlalıoğlu, *Ekoloji ve Çevre Bilimleri*, Remzi Kitabevi, İstanbul, 1990.
- [2] E. Özbey, Radyasyona Dirençli *Demococcus Radiodurans* İle *Escherichia Coli*'de Radyasyonun Antioksidan Sistem Üzerine Etkisinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya, 2009.
- [3] M. Henczová, A. K. Deér, A. Filla, V. Komlósi and J. Mink, *Effects of Cu²⁺ and Pb²⁺ on different fish species: Liver cytochrome P450-dependent monooxygenase activities and FTIR spectra*, **Comp. Biochem. Physiol. Part C**, 148 (2008) 53-60.
- [4] A. Birhanlı, Bazı Tekstil Boyar Maddelerinin *Xenopus laevis* Üzerinde Toksik Etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya, 2003.
- [5] Ö. Yeşilada, D. Asma, S. Cing, *Decolorization of textile dyes by fungal pellets*, **Process Biochem.**, 38 (2003) 933-938.
- [6] R.K. Somashekar, M.R. Gurudev and Sidda Ramiah, *Somatic Cell Abnormalities Induced by Dye Manufacturing Industry Waste Water*. **Cytologia.**, 50 (1985) 129-134.
- [7] D. E. Kime, *Endocrine Distruption in Fish*, Kluwer Academic Publishers, USA, 1998, p: 16-17.
- [8] M.C. Newman and M. A. Unger, *Fundamentals of Ecotoxicology*, Lewis Publishers, USA, 2003, P: 27-30.
- [9] Ö. Kahvecioğlu, G. Kartal, A. Güven ve S. Timur, *Metallerin Çevresel Etkileri-I*, (2006) http://www.metalurji.org.tr/dergi/dergi136/d136_4753.pdf.
- [10] *Ecological Effects*, <http://www.extoxnet.orst.edu/tibs/ecologic.htm>
- [11] E. Yoloğlu, Bir kayısı bahçesinde mevsimlik düzenli pestisit uygulamasının toprak solucanlarına "*Lumbricus Sp.*" etkisinin izlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya, 2006.
- [12] EPA (a), *A Review of the reference dose and reference concentration processes*, **U.S. Environ. Protection Agency**, Washington, D.C., EPA/630/P-02/002F, 2002.
- [13] EPA (b), *Framework for Cumulative Risk Assessment*, **U.S. Environ. Protection Agency**, Washington, D.C., EPA/630/P-02/001A, 2002.
- [14] K. Dobrovoljc , I. Falnoga , B. Bulog , M. Tusek-Znidaric , J. Scancarb., *Hepatic metallothioneins in two neotenic salamanders, Proteus anguinus and Necturus maculosus (Amphibia, Caudata)*, **Comp. Biochem. Physiol. Part C**, 135 (2003) 285–294.
- [15] D. W. Berzins, K.J. Bundy, *Bioaccumulation of lead in Xenopus Laevis tadpoles from water and sediment*, **Environ. Internat.**, 28 (2002) 69-77.
- [16] A.M. Rizzo, L. Adorni, G. Montorfano, F. Rossi, B. Bera, *Antioxidant metabolism of Xenopus laevis embryos during the first days of development*, **Comp. Biochem. Physiol. Part B**, 146 (2007) 94-100.
- [17] A. Akinbiyi, *Removal of Lead from Aqueous Solutions by Adsorption Using Peat Moss*, Master Thesis, University of Regina, Saskatchewan- Canada, 2000.
- [18] ANONİM, 2006, Yerüstü Suları ve Kirliliği. http://www.cevreorman.gov.tr/su_02.htm.
- [19] A. C. Roach, W. Maher, F. Krikowa, *Assessment of Metals in Fish from Lake Macquarie, New South Wales, Australia*, **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, 54 (2008) 292–308.
- [20] S. Katalay, H. Parlak, Ö. Ç. Arslan, *Ege Denizinde Yaşayan Kaya Balıklarının (Gobius niger L., 1758) Karaciğer Dokusunda Bazı Ağır Metallerin Birikimi*, **E.U. J. Fish. Aquat Sci.**, 22:3-4 (2005) 385-388.

- [21] C. de Conto Cinier, M.P. Ramel., R. Faure., D. Garin., Y. Bouvet, *Kinetics of Cd accumulation and elimination in Carp Cyprinus carpio tissues*. **Comp. Biochem. Physiol. Part C**, 122 (1999) 345-352.
- [22] P.S. Basha, A.U. Rani, *Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost Oreochromis mossambicus (Tilapia)*, **Ecotoxicol. Environ. Safe.**, 56 (2003) 218–221.
- [23] G. Wang, B. A. Fowler, *Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic*, **Toxicol. Appl. Pharm.**, 233 (2008) 92–99.
- [24] C.D. Klaassen, Casarett & Doull's Essentials of Toxicology -The Basic Science of Poisons, Seventh Edition McGraw-Hill, New York, 2003, 23: 935-945.
- [25] S.H. D'Souza, G. Menezes., T. Venkatesh, *Role of essential trace minerals on the absorption of heavy metals with special reference to lead*. **Indian J. Clin. Biochem.**, 18:2 (2003)154-160.
- [26] M. Pérez-López, M. H. de Mendoza, A. L. Beceiro and F. S. Rodríguez, *Heavy metal (Cd, Pb, Zn) and metalloid (As) content in raptor species from Galicia (NW Spain)*, **Ecotoxicol. Environ. Safe.**, 70 (2008) 154-162.
- [27] E. Hodgson and R.C.Smart, Introduction to biochemical toxicology, USA, III. Edition, 2001, p.691-692.
- [28] G. Uslu, 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.
- [29] P. Calow, Heavy metals. Handbook of Ecotoxicology vol. 2, Oxford Blackwell Scientific Publications, London, 1994, pp. 79–97.
- [30] N. Ercal, H. Gurer-Orhan and N. Aykin-Burns, *Toxic metals and oxidative stress Part I: Mechanisms involved in metal induced oxidative damage*, **Curr. Top. Med. Chem.**, 1 (2001) 529-539.
- [31] <http://www.webelements.com/cadmium/>
- [32] C.J.D. Maciel, G.M. Miranda, D.P. de Oliveira, M.E.P.B. de Siqueira, J.N. Silveira, E.M.A. Leite and J.B.B. da Silva, *Determination of cadmium in human urine by electrothermal atomic absorption spectrometry*, **Anal. Chim. Acta**, 491:2 (2003) 231-237.
- [33] C. D. Klaassen, Casarett & Doull's Toxicology-The Basic Science of Poisons, McGraw-Hill, New York, 2001, p.133–225.
- [34] E.M. Conti, G. Cecchetti, *A biomonitoring study: Trace metals in algae and mollusks from Tyrrhenian coastal areas*, **Environ. Res.**, 93 (2003) 99-112.
- [35] D. Gunnarsson, G. Nordberg, P. Lundgren, G. Selstam, *Cadmium-induced decrement of LH receptor expression and CAMP levels in the testis of rats*. **Toxicology**, 183 (2003) 57–63.
- [36] S. Haouema, M. F. Najjarb, A. E. Hania, R. Saklyc, *Accumulation of cadmium and its effects on testis function in rats given diet containing cadmium-polluted radish bulb*, **Exp. Toxicol. Path.**, 59 (2008) 307–311.
- [37] EPA, *2009 Edition of the drinking water standards and health advisories*, **U.S. Environ. Protection Agency**, Washington, D.C., EPA/822/P-09/011, 2009.
- [38] <http://www.lenntech.com/who-eu-water-standards.htm>
- [39] M.J. Bebianno, M. Machado, *Concentrations of metals and metallothioneins in Mytilus galloprovincialis along the South Coast of Portugal*, **Mar. Pollut. Bull.**, 34:8 (1997) 666-670.

- [40] A.P.S. Benaduce, D. Kochhann, E. M. M. Flores, V. L. Dressler, B. Baldisserotto, *Toxicity of Cadmium for Silver Catfish Rhamdia quelen (Heptapteridae) Embryos and Larvae at Different Alkalinities*, **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, 54 (2008) 274–282.
- [41] G.F. Nordberg, B.A. Fowler, M. Nordberg, L.T. Friberg, *Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier, Amsterdam, 2007, pp. 446–479.
- [42] <http://www.webelements.com/lead/>
- [43] M.İ. Doğru, Ağır Metal ve Adrenomedullin Uygulamasının Bazı Sıçan Dokularında Antioksidan Savunma Sistemi Üzerine Etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya, 2007.
- [44] M. Ansaldo, D. E. Nahabedian, C. Di Fonzo, E. A. Widerb, *Effect of cadmium, lead and arsenic on the oviposition, hatching and embryonic survival of Biomphalaria glabrata*, **Sci. Total Environ.**, 407 (2009) 1923-1928.
- [45] <http://www.epa.gov/lead/>
- [46] S.J.S. Flora, M. Pande, A. Mehta, *Beneficial effect of combined administration of some naturally occurring antioxidants (vitamins) and thiol chelators in the treatment of chronic lead intoxication*, **Chem-Biol. Interact.**, 145:3 (2003) 267-280.
- [47] İ. Dökmeci, Toksikoloji, Zehirlenmelerde Tanı ve Tedavi, 3. baskı, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2001.
- [48] <http://www.webelements.com/copper/>
- [49] D. J. Hoffman, B. A. Rattner, G. A. Burnot and Jr. J. Cairns, *Handbook of Ecotoxicology*, CRC Press, USA, 2003.
- [50] A. Gagnon, C. Jumarie, A. Hontela, *Effects of Cu on Plasma Cortisol and Cortisol Secretion by Adrenocortical Cells of Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss)*, **Aquat. Toxicol.**, 78 (2006) 59–65.
- [51] G. Atlı, Bakır, çinko, kadmiyum, krom ve gümüşün *Oreochromis niloticus*'un solungaç ve böbrek dokusundaki Na⁺/K⁺-ATPaz, Ca⁺²-ATPaz ve Mg⁺²-ATPaz ile kas dokusundaki Ca⁺²-ATPaz enzim aktivitesi üzerine etkileri, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, 2009.
- [52] M. Oliveira, A. Serafim, M. J. Bebianno, M. Pacheco, M. A. Santos, *European eel (Anguilla anguilla L.) metallothionein, endocrine, metabolic and genotoxic responses to copper exposure*, **Ecotoxicol. Environ. Safe.**, 70 (2008) 20–26.
- [53] T. Özgünen, *Xenopus laevis* 'te Deneysel Embriyoloji, Ders Notu, Adana 1994.
- [54] A. Boğa, Dış Ortamda Yer Alan Çeşitli Kimyasal Kirliliklerin Embriyo Gelişimi Üzerine Etkisini Değerlendirmede FETAX Testinin Değeri, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 1996.
- [55] G.K. Noble, *The biology of the Amphibia*, McGraw- Hill New York, 1931.
- [56] M. Prati, E. Biganzoli, P. Boracchi, M. Tesaro, C. Monetti, G. Bernardini, *Ecotoxicological soil evaluation by FETAX*, **Chemosphere**, 41 (2000) 1621-1628.
- [57] A. Boğa Pekmezekmek, Nikel, Magnezyum, Kobalt, Kadmiyum, Çinko Klorürün Teratojenik; Embriyotoksik Etkilerinin Fetax Testi Kullanılarak *Xenopus laevis*'te Araştırılması, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 2004.
- [58] T. Özgünen, *Xenopus* Fizyolojisi, Ders Notu, Adana, 1991.
- [59] G. Hilken, J. Dimigen, F. Iglauer, *Growth of Xenopus laevis Under Different Laboratory Rearing Conditions*, **Lab. Anim.**, 29 (1995) 152-162.
- [60] M. Saka, *Examination of an amphibian-based assay using the larvae of Xenopus laevis and Ambystoma mexicanum*, **Ecotoxicol. Environ. Safe.**, 55:1 (2003) 38-45.

- [61] M.J. Delgado, M.V. Cespedes, N.De Pedro, M. Alonso-Bedate, A.L. Alonso-Gomez, *Day/night variations of dopamine ocular content during Xenopus laevis ontogeny*, **Neuro-sci. Lett.**, 300 (2001) 129-132.
- [62] K. Al-Sapti, *Cholorotriazine reaktive azo red 120 textile dye induces micronuclei in fish*, **Ecotoxol. Environ. Safe.**, 47 (2000) 149-155.
- [63] D.J. Fort, E.L. Stover, T.L. Propst, B.C. Faulkner, T.A. Vollmuth, F.J. Murray, *Evaluation Of The Developmental Toxicity Of Caffeine And Caffeine Metabolites Using The Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (Fetax)*, **Food Chem. Toxicol.**, 36 (1998) 591-600.
- [64] P.D. Nieuwkoop, J. Faber, *Normal Table of Xenopus laevis (Daudin)*, Garland Publishing, INC., New York & London, 1994.
- [65] B. Beliaeff, T. Burgeot, *Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment*, **Environ. Toxicol. Chem.**, 21:6 (2002) 1316-1322.
- [66] A. Güngördü, Karakaya Baraj Gölünün Su Kalitesinin Ekotoksikolojik Yaklaşım ile Değerlendirilmesi, Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya, 2007.
- [67] L. R. Shugart, J. F. McCarthy, R. S. Halbrook, *Biological markers of environmental and ecological contamination: An overview*, **Risk Anal.**, 12 (1992) 353-360.
- [68] A. Bineli, F. Ricciardi, C. Riva, A. Provini, *New evidences for old biomarkers: Effects of several xenobiotics on EROD and AChE activities in Zebra mussel (Dreissena polymorpha)*, **Chemosphere**, 2006, 62:510-519.
- [69] R. Van der Oost, J. Beyer, P.E. Vermeulaen, *Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review*, **Environ. Toxicol. and Pharmacol.**, 13 (2003) 57-149.
- [70] M. Shapira, S. Seidman, N. Livni, H. Soreq, *In vivo and in vitro resistance to multiple anticholinesterases in Xenopus laevis tadpoles*, **Toxicol. Lett.**, 102-103 (1998) 205-209.
- [71] B. Bukowska, K. Hutnik, *2,4-D and MCPA and their derivatives: Effect on the activity of membrane erythrocytes acetylcholinesterase (in vitro)*, **Pest. Biochem. Physiol.**, 85 (2006) 174-180.
- [72] L. S. Beauvais, S. B. Jones, S. K. Brewer, E. E. Little, *Physiological measures of neurotoxicity of diazinon and malathion to larval rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) and their correlation with behavioral measures*, **Environ. Toxicol. Chem.**, 19:7 (2000) 1875-1880.
- [73] N. Kamel, J. Jebali, M. Banni, S.B. Khedher, L. Chouba, H. Boussetta, *Biochemical responses and metals levels in Ruditapes decussatus after exposure to treated municipal effluents*, **Ecotoxicol. Environ. Safe.**, 82 (2012) 40-46.
- [74] H. M. Thompson, *Esterases as markers of exposure to organophosphates and carbamates*, **Ecotoxicology**, 8 (1999) 369-384.
- [75] J. Wogram, A. Sturm, H. Segner, M. Liess, *Effects of parathion on acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and carboxylesterase in three-spined stickleback (Gasterosteus aculeatus) following short-term exposure*, **Environ. Toxicol. Chem.**, 20 (2001) 1528-1531.
- [76] C. Pretti, A. M. Cognetti-Varriale, *The use of biomarkers in aquatic biomonitoring: the example of esterases*, **Aquat. Conserv.**, 11 (2001) 299-303.
- [77] M. G. Lionetto, R. Caricato, M. E. Giordano, T. Schettino, *Biomarker application for the study of chemical contamination risk on marine organisms in the Taranto marine coastal area*, **Chem. Ecol.**, 20:1 (2004) 333-343.

- [78] J. F. Goncalves, F. T. Nicoloso, P. Costa, J. G. Farias, F. B. Carvalho, M. M. Da Rosa, J. M. Gutierrez, F. H. Abdalla, J. S. F. Pereira, G. R. M. Dias, N. B. V. Barbosa, V. L. Dressler, M. A. Rubin, V. M. Morsch, M. R. C. Schetinger, *Behavior and brain enzymatic changes after long-term intoxication with cadmium salt or contaminated potatoes*, **Food Chem. Toxicol.**, (2012) doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.07.016.
- [79] P.J. Brown, S.M. Long, D.J. Spurgeon, C. Svendsen, P.K. Hankard, *Toxicological and biochemical responses of the earthworm *Lumbricus rubellus* to pyrene, a non carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon*, **Chemosphere**, 57 (2004) 1675–1681.
- [80] J.D. Hayes, R.C. Strange, *Invited commentary potential contribution of the Glutathione-S-Transferase supergene family to resistance to oxidative stress*, **Free Radical Res.**, 22:3 (1995) 193-207.
- [81] S. Angelucci, P. Sacchetta, A.D. Luca, P. Moio, F. Amicarelli, C.D. Ilio, *Glutathione transferase isoenzymes from frog (*Xenopus laevis*) liver and embryo*, **Biochim. Biophys. Acta**, 1569 (2002) 81-85.
- [82] J.D. Hayes, R.C. Strange, *Glutathione S-Transferase Polymorphism and their Biological consequences*, **Pharmacology**, 61:3 (2000) 154-166.
- [83]] R.C. Strange, P.W. Jones, A.A. Fryer, *Glutathione S-Transferase: Genetics and role in toxicology*, **Toxicol. Lett.**, 112 (2000) 357-363.
- [84] Y. Park, S.Y. Choi, H. Lee, *A carboxylesterase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* P1; purification, characterization, and expression*, **Biochim. Biophys. Acta**, 1760 (2006) 820–828.
- [85] M.K. Ross, A. Borazjani, C.C. Edwards, P.M. Potter, *Hydrolytic metabolism of pyrethroids by human and other mammalian carboxylesterases*, **Biochem. Pharm.**, 71 (2006) 657– 669.
- [86] E. Küster, *Cholin- and carboxylesterase activities in developing zebrafish embryos (*Danio rerio*) and their potential use for insecticide hazard assessment*, **Aquat. Toxicol.**, 75 (2005) 76–85.
- [87] T. Satoh, *Toxicological implications of esterases—From molecular structures to functions, a review*, **Toxicol. Appl. Pharm.**, 207 (2005) 11-18.
- [88] Q.U. Maqbool, S. Johri, S. Rasool, S. Riyaz-ul-Hassan, V. Verma, A. Nargotra, S. Koul, G.N. Qazi, *Molecular cloning of carboxylesterase gene and biochemical characterization of encoded protein from *Bacillus subtilis* (RRL BB1)*, **J. Biotech.**, 125 (2006) 1-10.
- [89] O. Carnevali, G. Mosconi, H. R. Habibi, A. C. Elia, M. Cardinali, A. M. Polzonetti-Magni, *Validation of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for *Cyprinus carpio* L. vitellogenin, as a biomarker of reproductive disorders*, **Chem. Ecol.**, 19:1 (2003) 5–13.
- [90] M. Machala, P. Drabek, J. Neca, J. Kolarova, Z. Svobodova, *Biochemical markers for differentiation of exposures to nonplanar polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in trout liver*, **Ecotoxicol. Environ. Safe.**, 41:1 (1998) 107-111.
- [91] F. Peixoto, D. Alves-Fernandes, D. Santos, A. Fontainhas-Fernandes, *Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus**, **Pest. Biochem. Physiol.**, 85 (2006) 91-96.
- [92] T. Yan, L.H. Tee, Y.M. Sin, *Effect of Mercury and Lead on Tissue Glutathione of the Green Mussel, *Perna viridis* L.*, **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 58 (1997) 845-850.

- [93] J.L. Forney, A.C. Reddy, M. Tien, T.S. Aust, *The Involment of Hidroxy RadicalDerived From Hydrogen Peroxide Lignin Deratation by the White Rot Fungus Phanerochaete chrysosporium*, **J. Biol. Chem**, 257:19 (1982) 11455-11462.
- [94] D.L Nelson, M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry* (3rd ed), Worth Publishers, New York, 2000.
- [95] J. Zhang, H. Shen, X. Wang, J. Wu, Y. Xue, *Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish Carassius auratus*, **Chemosphere**, 55 (2004) 167–174.
- [96] E. Camera, M. Picardo, *A nalytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes*, **J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, 781 (2002) 181–206.
- [97] S. Pandey, S. Parvez, I. Sayeed, R. Haque, B. Bin-Hafeez, S. Raisuddin, *Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish Wallago attu (Bl. & Schn.)*, **Sci. Total Environ.**, 309 (2003) 105–115.
- [98] E. Stephensen, J. Sturve and L. Förlin, *Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver*, **Comp. Biochem. Physiol. Part C**, 133:3 (2002) 435-442.
- [99] <http://www.gata.edu.tr/temelbilimler/biyokimya/seminer/OKS%C4%B0DAT%C2%B0F%20STRES.doc>
- [100] D. Asma, *Biyolojik sistemlerde Radikaller ve Antioksidanlar*, İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Yüksek Lisans Ders Notları.
- [101] M.J. Prieto-Alamo, N. Abril, C. Pueyo, *Mutagenesis in Escherichia coli K-12 Mutants Defective in Superoxide Dismutase or Catalase*, **Mutat. Res-Fund. Mol. M.**,14:2 (1993) 237-244.
- [102] H. Geçkil, İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Biyokimya-1 Ders Notları, 2007 119-129.
- [103] R. Singh, S. Rana, *Influence of Antioxidants on Metallothionein- Mediated Protection in Cadmium–Fed Rats*, **Biol. Trace El. Res.**, 88 (2002) 71-77.
- [104] M.S. Paller, M.T. Patent, *Hydrogen Peroxide and İschemic Renal İnjury: Effect of Catalase İnhibition*, **Free Radical Biol. Med**, 10 (1991) 29-34.
- [105] I. Marvelli, G. Rotilio, *Oxygen Free Radicals, and Tumor cells, Icosanoids and Cancer in Ed.Thaler-Dao, H. Crastes de Panlet, A. Paoletti, R. Raven Press, New York,1-10, 1984.*
- [106] J. H. R. Kagi, B.L. Vallee, *A cadmium and zinc-containing protein from equine renal cortex*, **J. Biol. Chem.**, 235 (1960) 3460-3465.
- [107] E. Szczurek, C. Bjornsson, C. Taylor, *Dietary Zinc Deficiency and Repletion Modulate Metallothionein Immunolocalization and Concentration in Small Intestine and Liver of Rats*, **J. Nutrient**, 131 (2001) 2132-2138.
- [108] W. R. Swindell, *Metallothionein and the biology of aging*, **Ageing Res. Rev.**, 10 (2011) 132–145.
- [109] J.H. Kagi, Y. Kojima, *Chemistry and biochemistry of metallothionein*, **Experientia**, 52 (1987) 25-61.
- [110] M. Vasak, *Advances in metallothionein structure and functions*, **J. Trace Elem. Med. Biol.**, 19:1 (2005) 13-17.
- [111] J.P. Thomas, G.J. Bachowski, A.W. Girotti, *Inhibition of cell membrane lipid peroxidation by cadmium- and zinc-metallothioneins*, **Biochim. Biophys. Acta**. 884 (1986) 448-461.

- [112] M.P. Richards, J.H. Beattie, *Characterization of metallothionein isoforms. Comparison of capillary zone electrophoresis with reversed-phase high-performance liquid chromatography*, **J. Chromatogr.**, 648 (1993) 459-468.
- [113] M. Wan, J.H. Kagi, P.E. Hunziker, *Resolution and quantification of four metallothionein isoforms from rabbit kidney cells*, **Prot. Express. Purif.**, 4 (1993) 38-44.
- [114] L.D. Lehman-Mckeeman, G.K. Andrews, C.D. Klaassen, *Mechanisms of regulation of rat hepatic metallothionein- I and metallothionein- II levels following administration of zinc*, **Toxicol. App. Pharmacol.**, 92 (1998) 1-9.
- [115] J.H. Kagi, *Overview of metallothionein*, **Meth. Enzymol.**, 205 (1991) 613-626.
- [116] A. T. Miles, G.M. Hawksworth, J.H. Beattie, V. Rodilla, *Induction, Regulation, Degradation, and Biological Significance of Mammalian Metallothioneins*, **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, 35:1 (2000) 35-70.
- [117] N. S. Loumbourdis, I. Kostaropoulos, B. Theodoropoulou, D. Kalmanti, *Heavy Metal Accumulation and Metallothionein Concentration in the Frog *Rana ridibunda* after Exposure to Chromium or a Mixture of Chromium and Cadmium*, **Environ. Pollut.**, 145 (2007) 787-792.
- [118] R.D. Palmiter, *The elusive function of metallothioneins*, **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 95:15 (1998) 8428-8430.
- [119] P. Dziegiel, *Expression of Metallothioneins in Tumor Cell*, **Pol. J. Pathol.**, 55:4 (2004) 3-12.
- [120] G. Aktay, T. Söylemezoğlu, *Metalloproteinlerin Toksikolojik Önemi*, **FABAD J. Pharm. Sc.**, 26:4 (2001) 197-203.
- [121] J.M. Sauer, M.P. Waalkes, S.B. Hooser, A.T. Baines, R.K. Kuester, I.G. Sipes, *Tolerance induced by all-transretinol to the hepatotoxic effects of cadmium in rats: role of metallothionein expression*, **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 143:1 (1997) 110-119.
- [122] N. Pastacı, *Diyet ile Alınan Çinkonun Metallothionein Seviyesine Etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 2010.
- [123] P.J. Thornalley, M. Vasak, *Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals*, **Biochim. Biophys. Acta.**, 827 (1985) 36-44.
- [124] S. Cooper, C. Fortin, *Metal and metallothionein content in bullfrogs: Study of a whole watershed impacted by agricultural activities*, **Ecotoxicol. Environ. Safe.**, 73 (2010) 391-399.
- [125] M. S. Othman, W. Khonsue, J. Kitana, K. Thirakhupt, M. Robson, M. Borjan, N. Kitana, *Hepatic Metallothionein and Glutathione-S-Transferase Responses in Two Populations of Rice Frogs, *Fejervarya limnocharis*, Naturally Exposed to Different Environmental Cadmium Levels*, **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 89 (2012) 225-228.
- [126] S. M. Marques, S. C. Antunes, B. Nunes, F. Goncalves, R. Pereira, *Antioxidant response and metal accumulation in tissues of Iberian green frogs (*Pelophylax perezi*) inhabiting a deactivated uranium mine*, **Ecotoxicology**, 20 (2011) 1315-1327.
- [127] C. Fenoglio, F. Albicini, G. Milanesi, S. Barni, *Response of renal parenchyma and interstitium of *Rana ssk. esculenta* to environmental pollution*, **Ecotoxicol. Environ. Safe.**, 74 (2011) 1381-1390.
- [128] O. B. Stolyar, S. Loumbourdis, H. I. Falfushinska, L. D. Romanchuk, *Comparison of Metal Bioavailability in Frogs from Urban and Rural Sites of Western Ukraine*, **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, 54 (2008) 107-113.

- [129] M. S. Othman, W. Khonsue, J. Kitana, K. Thirakhupt, M. G. Robson, N. Kitana, *Cadmium Accumulation in Two Populations of Rice Frogs (*Fejervarya limnocharis*) Naturally Exposed to Different Environmental Cadmium Levels*, **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 83 (2009) 703–707.
- [130] M. B. Jofré, R. I. Antón, E. Caviedes-Vidal, *Lead and cadmium accumulation in anuran amphibians of a permanent water body in arid Midwestern Argentina*, **Environ. Sci. Pollut. Res.**, 19 (2012) 2889–2897.
- [131] P. A. Lopes, T. Pinheiro, M. C. Santos, M. da Luz Mathias, M. J. Collares-Pereira, A. M. Viegas-Crespo, *Response of antioxidant enzymes in freshwater fish populations (*Leuciscus alburnoides complex*) to inorganic pollutants exposure*, **Sci. Total Environ.**, 280:1-3 (2001) 153-163.
- [132] N. Aarab, O. Champeau, P. Mora, M. Daubeze, P. Garrigues and J. F. Narbonne, *Scoring approach based on fish biomarkers applied to French river monitoring*, **Biomarkers**, 9:3 (2004) 258–270.
- [133] H. M. Levesque, T. W. Moon, P. G. C. Campbell, A. Hontela, *Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field*, **Aquat. Toxicol.**, 60 (2002) 257–267.
- [134] R.R. Hamed, N.M. Farid, S.H.E Elowa, A. M. Abdalla, *Glutathione Related Enzyme Levels of Freshwater Fish as Bioindicators of Pollution*, **The Environmentalist**, 23 (2003) 313–322.
- [135] R. Urena, S. P. Ramo, A. Torreblanca, *Metal and Metallhionein Content in Tissues from Wild and Farmed *Anguilla anguilla* at Commercial Size*, **Environ. Inter.**, 33 (2007) 532–539.
- [136] M. Özmen, Z. Küçükbay, A. Güngördü, E. Güler, *Karakaya Baraj Gölü'nde su kirliliğinin balıklar üzerine etkileri*, Ulusal Su Günleri, Ankara, 1-3 Ekim 2003.
- [137] M. Özmen, A. Güngördü, Z. Küçükbay, E. Güler, *Monitoring the effects of water pollution on *Cyprinus carpio* in Karakaya Dam Lake, Turkey*, **Ecotoxicology**, 15:2 (2006) 157-169.
- [138] C. J. Schmitt, J. J. Whyte, A. P. Roberts, M. L. Annis, T. W. May, D. E. Tillitt, *Biomarkers of Metals Exposure in Fish From Lead-Zinc Mining Areas of Southeastern Missouri, USA*, **Ecotoxicol. Environ. Safe.**, 67 (2007) 31–47.
- [139] A. Güngördü, A. Birhanlı, M. Özmen, *Assessment of embryotoxic effects of cadmium, lead and copper on *Xenopus laevis**, **Fre. Environ. Bull.**, 19:15 (2010) 2528 – 2535.
- [140] L.A. Lienesch, J.N. Dumont, J.A. Bantle, *The effect of cadmium on oogenesis in *Xenopus laevis**, **Chemosphere**, 41 (2000) 1651-1658.
- [141] M. Shuhaimi-Othman, Y. Nadzifah, N.S. Umirah, A.K. Ahmad, *Toxicity of metals to tadpoles of the common Sunda toad, *Duttaphrynus melanostictus**, **Toxicol. Environ. Chem.**, 94 (2012) 364–376.
- [142] M. Selvi, A. Gul, M. Yılmaz, *Investigation of acute toxicity of cadmium chloride ($CdCl_2 \cdot H_2O$) metal salt and behavioral changes it causes on water frog (*Rana ridibunda Pallas, 1771*)*, **Chemosphere**, 52 (2003) 259–263.
- [143] S. E. Mitchell, C. A. Caldwell, G. Gonzales, W. R. Gould, R. Arimoto, *Effects of depleted uranium on survival, growth, and metamorphosis in the african clawed frog (*Xenopus laevis*)*, **J. Toxicol. Environ. Health Part A**, 68 (2005) 951–965.
- [144] S. M. Marques, F. Gonçalves, R. Pereira, *Effects of a uranium mine effluent in the early-life stages of *Rana perezi Seoane**, **Sci. Total Environ.**, 402 (2008) 29-35.

- [145] I. Kostaropoulos, D. Kalmanti, B. Theodoropoulou, N. S. Loumbourdis, *Effects of Exposure to a Mixture of Cadmium and Chromium on Detoxification Enzyme (GST, P450-MO) Activities in the Frog Rana ridibunda*, **Ecotoxicology**, 14 (2005) 439-447.
- [146] C.S. Pérez-Coll, J. Herkovits, O. Fridman, P. Daniel, J.L. D'Eramo, *Metallothionein induction and cadmium uptake in Bufo arenarum embryos following an acclimation protocol*, **Environ. Pollut.**, 106 (1999) 443-448.
- [147] E.A. Papadimitriou, N.S. Loumbourdis, *Copper kinetics and hepatic metallothionein levels in the frog Rana ridibunda, after exposure to CuCl₂*, **Biometals**, 16 (2003) 271-277.
- [148] Ö. Fırat, *Oreochromis Niloticus'ta Metal (Zn, Cd) ve Metal Karışımının (Zn+Cd) Kan Dokusunda Fizyolojik ve Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkisi*, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 2007.
- [149] F. Kargın, C. Erdem, *Bakır- Çinko Etkileşiminde Tilapia nilotica (L.)'nın Karaciğer, solungaç ve Kas Dokularındaki Metal Birikimi*, **Doğa-Tr. J. Zool.**, 16 (1992) 343-348.
- [150] J. C. Van Dyk, G. M. Pieterse, J. H. J. Van Vuren, *Histological Changes in the Liver of Oreochromis mossambicus (Cichlidae) after Exposure to Cadmium and Zinc*, **Ecotoxicol. Environ. Safe.**, 66 (2007) 432-440.
- [151] G. Atlı, M. Canlı, *Natural Occurrence of Metallothionein-like Proteins in the Liver of Fish Oreochromis niloticus and Effects of Cadmium, Lead, Copper, Zinc, and Iron Exposures on Their Profiles*, **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 70 (2003) 619-627.
- [152] K. Eroğlu, *Oreochromis Niloticus'un karaciğerinde metal etkileşimine bağlı kadmiyum, çinko ve bakır birikimi ve bunun metallothionein benzeri protein sentezine etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 2002.
- [153] G. Atlı, M. Canlı, *Responses of metallothionein and reduced glutathione in a freshwater fish Oreochromis niloticus following metal exposures*, **Environ. Toxicol. Pharm.**, 25(2008) 33-38.
- [154] S. L. Shah, A. Altındag, *Effects of Heavy Metal Accumulation on the 96-h LC50 Values in Tench Tinca tinca L., 1758*, **Turk J. Vet. Anim. Sci.**, 29 (2005) 139-144.
- [155] S. Pillet, M. Fournier, L. M. Measures, J. M. Bouquagueau, D. G. Cry, *Presence and Regulation of Metallothioneins in Peripheral Blood Leukocytes of Grey Seals*, **Toxicol. and Appl. Pharma.**, 185 (2002) 207-217.
- [156] ASTM, *Standard guide for conducting the frog embryo teratogenesis assay-Xenopus (FETAX)*, E1439-91, American Society for Testing and Materials, 1991, Philadelphia, PA.
- [157] W. H. Habig, M. J. Pabst, W. B. Jakoby, *Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation*, **J. Biol. Chem.**, 249 (1974) 7130-7139.
- [158] A. E. Cribb, J. S. Leeder, S. P. Spielberg, *Use of a microplate reader in an assay of glutathione reductase using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)*, **Anal. Biochem.**, 183 (1989) 195-196.
- [159] U. Nousiainen, R. Torronen, *Differentiation of microsomal and cytosolic carboxylesterases in rat liver by in vivo and in vitro inhibition*, **Gen. Pharmacol.**, 15 (1984) 223-227.
- [160] P. Santhoshkumar, T. Shivanandappa, *In vitro sequestration of two organophosphorus homologs by the rat liver*, **Chem. Biol. Interact.**, 119-120 (1999) 277-282.

- [161] G. L. Ellman, D. C. Andres, *New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*, **Biochem. Pharmacol.**, 7 (1961) 88–95.
- [162] M. Özmen, S. E. Dominguez, A. Fairbrother, *Effects of dietary azinphos methyl on selected plasma and tissue biomarkers of the gray-tailed vole*, **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 60 (1998) 194-201.
- [163] H. Aebi, Catalase. In: Bergmayer, H. U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, London, 671–684, 1974.
- [164] J.G. Bell, C. B. Cowey, J. W. Adro, A. M. Shanks, *Some effects of vitamins and selenium deprivation on tissue enzyme levels and indices of tissue peroxidation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)*, **Br. J. Nutr.**, 53 (1985) 149-157.
- [165] A. Viarengo, E. Ponzano, F. Dondero, R. Fabbri, *A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to mediterranean and antarctic molluscs*, **Mar. Environ. Res.**, 44:1 (1997) 69-84.
- [166] B.D. Zehr, T.J. Savin, R.E. Hall, *One step, low background Commaassie staining procedure for polyacrylamide gels*, **Anal. Biochem.**, 182 (1989) 157-159.
- [167] M. M. Bradford, *A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, **Anal. Biochem.**, 72 (1976) 248–254.
- [168] P. S. Basha, A.U Rani, *Cadmium-Induced Antioxidant Defence Mechanism in Freshwater Teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia)*, **Ecotoxicol. and Environ. Safe.**, 56 (2003) 218–221.
- [169] E. Casalino, C. Sblano, G. Calzaretto, C. Landriscina, *Acute cadmium intoxication induces alpha-class glutathione S-transferase protein synthesis and enzyme activity in rat liver*, **Toxicology**, 217 (2006) 240–245.
- [170] I. Cunha, E. Mangas-Ramirez, L. Guilhermino, *Effects of copper and cadmium on cholinesterase and glutathione S-transferase activities of two marine gastropods (*Monodonta lineata* and *Nucella lapillus*)*, **Comp. Biochem. Physiol. Part C**, 145 (2007) 648–657.
- [171] R. Serra, E. Carpena, A. C. Marcantonio, G. Isani, *Cadmium Accumulation and Cd-Binding Proteins in the Bivalve *Scapharca inaequalvis**, **Comp. Biochem. Physiol. C**, 111: 2 (1995) 165–174.
- [172] G.R. Reddy, B.C. Devi, C.S. Chetty, *Developmental lead neurotoxicity: alterations in brain cholinergic system*, **Neurotoxicology**, 28 (2007) 402–407.
- [173] M. Saint-Denis, J. F. Narbonne, C. Arnaud, D. Ribera, *Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of lead acetate*, **Soil Biol. Biochem.**, 33 (2001) 395–404.
- [174] N. Ercal, H. Gurer-Orhan, N. Aykin-Burns, *Toxic Metals and Oxidative Stress Part I: Mechanisms Involved in Metal Induced Oxidative Damage*, **Curr. Top. Med. Chem.**, 1 (2001) 529-539.
- [175] C. Dautremepuits, D. J. Marcogliese, A. D. Gendron, Michel Fournier, *Gill and head kidney antioxidant processes and innate immune system responses of yellow perch (*Perca flavescens*) exposed to different contaminants in the St. Lawrence River, Canada*, **Sci. Total Environ.**, 407 (2009) 1055–1064.
- [176] F. Labrot, D. Ribera, M. Saint Denis, J. F. Narbonne, *In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species*, **Biomarkers**, 1 (1996) 21-28.

- [177] S. Maity, S. Roy, S. Bhattacharya, S. Chaudhury, *Metallothionein responses in the earthworm *Lampito mauritii* (Kinberg) following lead and zinc exposure: A promising tool for monitoring metal contamination*, **Eur. J. Soil Biol.**, 47 (2011) 69-71.
- [178] S. Křížková, O. Zitka, V. Adam, M. Beklova, A. Horna, Z. Svobodova, B. Sures, L. Trnkova, L. Zeman, R. Kizek, *Possibilities of electrochemical techniques in metallothionein and lead detection in fish tissues*, **Czech J. Anim. Sci.**, 52 (2007) 143–148.
- [179] R. Romani, C. Antognelli, F. Baldracchini, A. De Santis, G. Isani, E. Giovannini, G. Rosi, *Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations*, **Chem. Biol. Interact.**, 145:3 (2003) 321-329.
- [180] A. P. Nugroho, H. Frank, *Effects of copper on lipid peroxidation, glutathion, metallothionein and antioxidative enzymes in the freshwater mussel *Anadonta anatina**, **Toxicol. Environ. Chem.**, 94:5 (2012) 918-929.
- [181] N. Schvezov, O. Amin, *Biochemical response of amphipods (Gammarid: *Paramorea*) in a sediment laboratory exposure from Ushuaia Bay, Beagle Channel*, **Ecotoxicol. Environ. Safe.**, 74 (2011) 394-402.

ÖZGEÇMİŞ

26.02.1982 tarihinde Malatya’da doğdu. İlk, Orta ve Lise öğrenimini Malatya’da tamamladıktan sonra 2004 yılında İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2006 yılında İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisansını tamamladı. Aynı yıl İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında doktora öğrenimine başladı ve halen devam etmektedir. 2007 yılından bu yana Adıyaman Üniversitesi Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Öğretmenliği Anabilim Dalında Öğretim Görevlisi olarak görev yapmaktadır. Evli ve bir çocuk babasıdır.