

ZEBRA BALIKLARINDA (*Danio rerio*) AĞIR METAL İNDÜKSİYONUNUN OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİNE ETKİSİ

Zeynep Atasayar Ünver, Meliha Koldemir, Belgin Süsleyici Duman,
Nüzhet Cenk Sesal, Figen Esin Kayhan*

Marmara Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Göztepe Kampüsü, İstanbul, Türkiye

Received: 29.07.2013 / Accepted: 13.03.2014 / Published online: 29.06.2014

Öz:

Bu çalışmada farklı subletal dozlarda ağır metal (bakır, çinko, kadmiyum) uygulanmış olan Zebra balıklarının (*Danio rerio*)’nın solungaç dokularındaki Lipit peroksidasyon (LPO) Malondialdehit (MDA) ile antioksidatif enzimlerden Glutatyon (GSH), Katalaz (CAT) ve total protein seviyeleri incelenmiştir. Çalışmada sırasıyla; bakır, çinko ve kadmiyumun 0.1 ppm, 0.5 ppm, 1 ppm ve 5 ppm’lik subletal dozlarına maruz bırakılan zebra balıklarının solungaçlarındaki enzim parametreleri belirlenmiştir. Sonuç olarak, bakır, çinko ve kadmiyumun en düşük subletal dozlarının bile, solungaç hücrelerindeki antioksidan savunma mekanizmalarını aktive ettiği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Zebra balığı, Ağır metal, Oksidatif stres

Abstract: Effects of Heavy Metal Induction on Oxidative Stress Parameters in Zebrafish (*Danio rerio*)

In our study, Lipid peroxidation (LPO) Malondialdehyde (MDA), antioxidant enzymes such as Glutathione (GSH), Catalase (CAT) and the total protein levels in the gill tissues of zebrafish have been analysed as a response to sublethal doses of heavy metals (Cu, Zn, Cd). The study was performed on zebrafish exposed to 0.1 ppm, 0.5 ppm, 1 ppm and 5 ppm doses of copper, zinc and cadmium. The MDA, GSH, CAT and total protein levels have been measured in heavy metal exposed zebrafish. In conclusion, the lowest sublethal doses of heavy metals have been found activate cellular antioxidative defence mechanisms.

Keywords: Zebra fish, Heavy metal, Oxidative stress

* Correspondence to:

Figen Esin KAYHAN, Marmara Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Göztepe Kampüsü, 34722, İstanbul, TÜRKİYE

Tel: +90 216 346 45 53 -1179

E-posta: fekayhan@marmara.edu.tr

Giriş

Sucul ekosistemler sıklıkla evsel ve endüstriyel atıklar tarafından kirletilirler. Sucul ekosistemde bulunan en önemli çevresel kirleticilerden biri de ağır metallerdir. Ağır metaller deniz, göl ve akarsularda fazla miktarda bulundukları zaman sucul organizmalar tarafından bünyelerine alınırlar (Akçalı vd., 2009; Richetti vd., 2011; Oliva vd., 2012). Toksik ağır metaller sucul canlıların özellikle metabolik olarak aktif organlarında birikme eğilimindedirler. Balıklarda bu tip kirleticiler ile ilk etkileşen organ solungaçlardır. Kirleticiler hedef organ ve dokularda birikerek yapısal ve işlevsel mekanizmalara hasar verebilirler (Hsu vd., 2013; Pereira vd., 2013).

Oksidatif stres, antioksidan savunma sistemi ile hücrelerin lipid tabakasının peroksidasyonuna neden olan serbest radikal üretimi arasındaki dengesizlik olarak tanımlanabilir. Proteinler, lipidlere oranla serbest radikallerden daha az etkilenirler. Serbest radikaller nedeniyle meydana gelebilecek hücre hasarlarını engelleyen sisteme “antioksidan savunma sistemi” denir. Bu moleküller, serbest oksijen radikallerine bir hidrojen iyonu verirler ve bu radikalleri kendilerine bağlarlar. Bu şekilde onları zayıf bir moleküle çevirirler ve radikal hasarını önlerler. En önemli antioksidan enzimler Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) ve Glutasyon peroksidaz (GSH) olarak sayılabilir (Stegeman vd., 2010). Bu çalışmanın amacı; 96 saat süreyle farklı subletal dozlarda (her ağır metal için sırasıyla; 0.1 ppm, 0.5 ppm, 1 ppm ve 5 ppm) bakır, çinko ve kadmiyumun uygulandığı zebra balıklarının solungaç dokularında oluşabilecek lipid peroksidasyon sonucu Malondialdehit (MDA) seviyesini belirlemektir. Ayrıca antioksidatif enzimler olan Glutasyon (GSH) ve Katalaz (CAT) ile total protein seviyeleri incelemektir.

Materyal ve Metot

Zebra Balığı (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan, 1882): Zebra Balığı (*Danio rerio*) Cyprinidae familyasına ait tropikal bir türdür. Anavatanı Güneydoğu Asya olan zebra balıkları yoğun olarak Pakistan ve Hindistan’da iç sularda bulunmaktadır. Balığın gövdesi ışığa bağlı olarak koyu mavi, gümüş beyazı veya altın sarısı çizgilerle örtülüdür. Son yıllarda, ekotoksikoloji araştırmalarında zebra balığı dokuları, yumurtaları ve embriyoları sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Zebra balığı, dayanıklı bir tür olması, kolay elde

edilmesi, laboratuvar ortamında kolay bakılabilmesi ve çoğaltılması, ergin dişilerin haftalık aralıklarla yüzlerce yumurta bırakabilmesi, yumurta ve larva gelişimlerinin kolay izlenebilmesi, üreme zamanının kısa olması ve embriyolarının toksik ajanlara duyarlı oluşu gibi nedenlerle toksikoloji çalışmalarında sıklıkla kullanılan model organizmaların başında gelmektedir (www.fishbase.org).

Çalışmada kullanılacak olan Zebra balıkları ticari firmalardan temin edilmiştir. Marmara Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Zooloji Araştırma Laboratuvarına plastik torbalar ile getirilmiştir. Zebra balıkları gruplara ayrılarak, her grupta 10 balık olacak şekilde (toplam 130 balık) büyük- lükleri 70x30x45 cm olan cam akvaryumlarda ortama uyumları sağlanmıştır. Balıkların bulunduğu akvaryumlardaki su piyasadaki ticari içme sularından hazırlanmıştır. Akvaryumlardaki su sıcaklığı 22-23°C, pH 7 ve aydınlık: karanlık (12:12) olacak şekilde sabitlenmiştir. Akvaryumlara bir hava motoru yardımı ile yeterli düzeyde (9-12 mg/l) sürekli oksijen verilmiş, deneme süresince oluşan buharlaşma minimum seviyede olduğu için su eklenmemiştir. Denemede balıkların beslenmesi için toz balık yemi kullanılmıştır. Yemleme, yeter miktarda sabah ve akşam olmak üzere günde iki öğün tekrarlanmıştır. Yemlemeye, toksikolojik testlerin başlangıcına iki gün kalana kadar devam edilmiş ve toksikolojik deneyler esnasında yemleme yapılmamıştır (OECD, 1999). Balıkların ortama uyumları sağlandıktan sonra akvaryumlara 96 saat süreyle farklı artan dozlarda bakır (0.1 ppm Cu, 0.5 ppm Cu, 1 ppm Cu ve 5 ppm Cu), çinko (0.1 ppm Zn, 0.5 ppm Zn, 1 ppm Zn ve 5 ppm Zn) ve kadmiyum (0.1 ppm Cd, 0.5 ppm Cd, 1 ppm Cd ve 5 ppm Cd) eklenmiştir. Kontrol grubu ise (10 balık) aynı fiziksel şartlara sahip olarak bırakılmış, deney süresinin kısıtlılığı nedeniyle balıklara herhangi bir stres önleyici anestezi madde uygulanmamıştır. 96 saat devam eden test süresince akvaryum sularının fizikokimyasal özelliklerini kontrol etmek amacıyla toksik madde ilavesi yapıldıktan sonra suyun sıcaklığı, çözünmüş oksijeni, pH’sı, toplam sertliği, alkalinitesi, amonyak ve nitrit konsantrasyonları günde bir defa olmak üzere deneme süresince ölçülmüştür. Zebra balıklarının bulunduğu akvaryumların pH değerleri Thermo Orion 420A model pH metre kullanılarak ölçülmüş, ağır metal içeren akvaryum sularının çözünmüş oksi-

jen değeri 6.36 ± 0.47 mg/L, sıcaklık $19.2 \pm 0.1^\circ\text{C}$, pH 7.64 ± 0.12 , toplam sertlik 34.0 ± 1.5 mg/L (CaCO_3 olarak), alkalinite 23.5 ± 2.2 mg/L (CaCO_3 olarak), amonyak 11 ± 5 ng/L ve nitrit 8.5 ± 5.0 $\mu\text{g/L}$ olarak belirlenmiştir. Belirlenen deney süreleri sonunda balıklar derin dondurucuda 3-5 dakikalık soğuk şoku ile uyuşturulduktan sonra solungaç dokuları hızlıca dekapiye edilmiştir.

%10 Doku homojenatının hazırlanması: Solungaç örnekleri ayrı ayrı serum fizyolojik ile yıkanıp temizlendikten sonra süzgeç kağıdı ile kurutulmuş ve tartılmıştır. Bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrılmış ve gerekli miktar serum fizyolojik ve cam boncuklar yardımıyla homojenizatörde parçalanmıştır. Her doku homojenatı ependorf tüplere konularak etiketlenmiş ve -20°C 'de analiz zamanına kadar saklanmıştır.

Solungaç Dokusunda Malondialdehit (MDA) Tayini (Ledwozyw Yöntemi): LPO ürünü olan MDA ile tiyobarbitürik asit (TBA) arasındaki reaksiyon sonucu oluşan pembemsi rengin absorbansı spektrofotometrik olarak değerlendirilmiş, doku homojenatında LPO düzeyleri MDA için saptanmış ekstinksiyon kat sayısı ($1.56.105 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak nmol MDA/mg protein cinsinden hesaplanmıştır (Ledwozyw vd., 1986).

Solungaç dokusunda İndirgenmiş Glutasyon (GSH) Tayini (Beutler Yöntemi): Elmann ayıracı, 5-5' ditiyobis 1-2 nitro benzoikasid (DTNB) ile sülfidril gruplarının reaksiyonu sonucu oluşan renkli ürün spektrofotometrik olarak değerlendirilmiş, homojenatta GSH düzeyleri, seyreltme faktörü ve oluşan sarı renkli ürünün 412 nm 'de ekstinksiyon katsayısı ($13600/\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak GSH $\mu\text{g/mg}$ protein cinsinden hesaplanmıştır (Beutler, 1975).

Solungaç Dokusunda Katalaz Aktivitesi (CAT) Tayini (Aebi Yöntemi): CAT enzimi; H_2O_2 'nin, H_2O 'ya dönüşüm reaksiyonunu katalizlemektedir. Bu dönüşüm 240 nm 'de absorbansın azalması ile takip edilebilmekte, bir dakika-daki absorbans azalması katalaz aktivitesi ile ilişkilidir. Süpermatantta katalaz aktivitesi bu deney için belirlenmiş ekstinksiyon katsayısı 0.004 (0.00394) $\text{mM}^{-1} / \text{mm}^{-1}$ kullanılarak ve yapılan seyreltmeler göz önüne alınarak Ü/mg protein dk cinsinden hesaplanmıştır (Aebi, 1984).

Solungaç Dokusunda Protein Tayini (Bradford Yöntemi): Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlere bağlanması sonucunda oluşturduğu renkli çözeltilerin 595 nm 'de absorbansının ölçülmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu-

nun için % 10 mg albümin stok çözeltisi hazırlanmış, 10 mg albümin az distile suda tamamen çözüldükten sonra hacmi 100 mL'ye distile su ile tamamlanmış, protein çalışma standart çözeltileri stok çözeltilerden uygun hacimler alınarak % 20, 40, 60, 80 μg albumin ihtiva edecek şekilde distile su ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Bradford reaktifi stok çözeltilerden kullanılmış, standartların grafiği üzerinden protein miktarı hesaplanmıştır (Bradford, 1976).

İstatistiksel Analizler: İstatistiksel analizler SPSS 17.0 paket programı kullanılarak yapılmış, tanımlayıcı istatistiklerde ise sürekli ölçümlü değişkenler için ortalama $\pm$ standart hata (SH) ve medyan (minimum-maksimum) olarak verilmiştir. Kategorik değişkenler gözlem sayısı ve (%) değer olarak gösterilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalarda normal dağılım gösteren değişken için Student's t testi, normal dağılım göstermeyen değişkenler için Mann-Whitney-U testi kullanılmıştır. Biyokimyasal parametrelerin gruplar arasındaki farklılıkları Varyans analizi ile tespit edilmiş, Bonferroni testi ile her bir parametre için gruplar bire bir karşılaştırılmıştır. $p < 0.05$ değeri üzerinden istatistiksel olarak anlamlılık kabul edilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Çalışmamızda farklı subletal dozlarda ağır metal (bakır, kadmiyum ve çinko) uygulanmış zebra balıklarının solungaç dokularından belirlenen lipid peroksidasyon (MDA), antioksidatif enzimler (GSH, CAT) ve total protein seviyeleri her bir ağır metal için ayrı tablolarda verilmiştir. Ayrıca tek yönlü varyans analizi ile metalin biyokimyasal seviyede etkisi belirlenmiştir. Solungaç dokusunda ölçülen MDA seviyeleri kontrol grubunda, farklı dozlarda uygulanan bakır gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuş, 0.1-5 ppm arasındaki bakır dozlarının balık solungaç dokusundaki MDA seviyeleri üzerine etkili olmadığı gözlemlenmiştir. Herhangi bir ağır metal uygulanmamış (Kontrol grubu) olan Grup-1'deki GSH seviyeleri, 0.1 ppm Cu uygulanmış balıkların (Grup-2) solungaçlarında ölçülen GSH seviyelerinden istatistiksel olarak daha düşük bulunmuştur ($p < 0.05$).

0.1 ppm Cu (Grup-2) ve 0.5 ppm Cu (Grup-3) uygulanan balıkların GSH seviyeleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p > 0.05$). 1 ppm (Grup-4) ve 5 ppm (Grup-5) gibi yüksek dozlarda bakır uygulanan gruplarda ise antioksidatif stres mekanizmalarının engellendiği belirlenmiştir. 0.1

ve 0.5 ppm Cu uygulanan gruplar ile kontrol grubu arasında katalaz enzim aktivitesi açısından anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. Ancak 1 ve 5 ppm Cu uygulanan gruplarda CAT aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir. Kontrol grubunun (Grup-1) protein seviyeleri, 0.1 ppm Cu (Grup-2) ve 1 ppm Cu (Grup-4) uygulanmış balıkların solungaçlarında ölçülen protein seviyelerinden istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$) (Tablo.1).

Kontrol grubunda ölçülen GSH, CAT ve protein seviyeleri ile 0.1 ppm Zn (Grup-6) ve 0.5 ppm Zn (Grup-7) uygulanmış balıkların solungaçlarında ölçülen GSH, CAT ve protein seviyeleri seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0.05$). Kontrol grubu balıkların solungaçlarında ölçülen MDA seviyeleri, 0.1 ppm ve 0.5 ppm Zn uygulanan balıkların MDA düzeylerinden daha yüksek bulunmuştur. ($p < 0.01$). 0.1 ppm Zn uygulanan balıkların solungaç doku MDA düzeyleri, 0.5 ppm Zn uygulanan balıklara göre daha yüksek bulunmuştur

($p < 0.05$). 1 ppm'den daha yüksek çinko uygulanan gruplarda ise CAT aktivitesinin hızla azaldığı gözlemlenmiştir (Tablo.2).

Kontrol grubuna ait GSH ve CAT seviyeleri, 0.1 ppm Cd uygulanmış balıklar (Grup-10) ile farklılık göstermezken, 0.5 ppm Cd (Grup-11) uygulanmış grup ile karşılaştırıldığında GSH düzeylerinin daha düşük ($p < 0.05$); CAT düzeylerinin ise daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). 0.1 ppm Cd (Grup-10) ve 0.5 ppm Cd (Grup-11) uygulanan balıkların solungaç doku MDA seviyelerinin, kontrol grubuna göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. 0.5 ppm Cd uygulanan gruba ait MDA seviyelerinin, 0.1 ppm Cd uygulanan balıkların MDA seviyelerinden daha fazla olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). Kontrol grubuna ait total protein seviyeleri, 0.1 ppm Cd uygulanan gruba oranla daha yüksek bulunmuştur. 0.1 ppm Cd uygulanan grubun total protein seviyeleri ise, 0.5 ppm Cd uygulanan gruba kıyasla daha düşük olduğu gözlenmiştir ($p < 0.05$).

Tablo 1. Farklı miktarlarda bakır uygulanan Zebra balığı solungaçlarında MDA, GSH, CAT ve Protein seviyeleri ile kontrol grubu.

Table 1. Effects of different Cu amounts on the MDA, GSH, CAT and Protein levels in gill tissues of Zebrafish and control group.

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

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

Tablo 2. Farklı miktarlarda çinko uygulanan Zebra balığı solungaçlarında MDA, GSH, CAT ve Protein seviyeleri ile kontrol grubu.**Table 2.** Effects of different Zn amounts on the MDA, GSH, CAT and Protein levels in gill tissues of Zebrafish and control group.

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

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

Tablo 3. Farklı miktarlarda kadmiyum uygulanan Zebra balığı solungaçlarında MDA, GSH, CAT ve Protein seviyeleri ile kontrol grubu.**Table 3.** Effects of different Cd amounts on the MDA, GSH, CAT and Protein levels in gill tissues of Zebrafish and control group.

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

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

Sucul ekosistemlerle ilişkili ekotoksikolojik etkilerin araştırılmasında çeşitli omurgasız ve omurgalı test organizmaları kullanılmaktadır. Özellikle son on yılda model organizma olarak çeşitli türde balıkların kullanılması oldukça yaygınlaşmıştır. Glutasyon (GSH), oksijen radikali yakalayıcısı olarak antioksidant savunmada önemlidir. GSH düzeyindeki değişim, canlının detoksifikasyon yeteneğinin önemli bir belirteçidir. GSH sistemi balıklarda oksidatif hasara karşı farklı yollardan kofaktör gibi davranarak çalışır. Hücrelerde glutasyonun anti-oksidatif fonksiyonu, konsantrasyon, reaksiyon hızı ve sentez hızına bağlı olarak meydana gelmektedir. Metal GSH konjugasyon işlemi metallerin safra ile atılmasını

sağladığından istenen bir durum olmasına karşın glutasyonu tüketmesine bağlı olarak antioksidant savunma kapasitesini azaltmaktadır (Fırat vd., 2009; Loro vd., 2012; Hsu vd., 2013). Hücresele GSH miktarı hücresele işlevlerin korunmasında önemlidir ve detoksifikasyon ve oksidatif stres durumunda azalabilmektedir. Ancak devam eden stres durumunda GSH/GSSG oranı adaptif mekanizmaların etkisi ile oksidatif strese karşı koyabilmek üzere artmaktadır (Zhang vd., 2005).

Stres şartları altında ve bazı hastalıklarda bakır iyonları, GSH ile etkileşime girerek redoks aktif bakır formunda dokulardan salınır. Glutasyon L-askorbik asitin suda çözülebilir antioksidanlar olarak çeşitli reaktif oksijen türlerini orta-

dan kaldırdığı gösterilmiştir. Çünkü hidrojen peroksit ile etkileşen bakır, hidroksil radikali oluşturarak hücrede lipid, protein ve nükleik asitleri hasarlayan reaktif oksijen türleri gibi davranırlar (Halliwell ve Gutteridge, 1990). Kadmiyum, sulu ortamlarda yer alan en zararlı ağır metal kirleticilerden biridir. Literatürde kadmiyum toksitesinin reaktif oksijen türleri ile birlikte gelişen oksidatif hasar ile ilişkisi çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Bagchi, 2000; Shi, 2005; Taş vd., 2009). Balıklarda kadmiyumun glutatyon metabolizmasına etkilerini inceleyen sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Balıklarda kadmiyum birikimin hedef organı böbrek ve karaciğer olduğundan çalışmalar bu yönde yoğunlaşmıştır (Kim vd., 2004). Bakır ve kadmiyum doğrudan ya da dolaylı olarak hücresel demir düzeylerinin yükselmesine neden olarak antioksidan aktiviteyi engeller, hücresel glutatyon kullanımına neden olur ya da glutatyon ile ilişkili enzimleri inhibe eder (Kang, 1997). Pek çok enzimatik ve non-enzimatik detoksifikasyon reaksiyonlarının substratı olan glutatyon, kirleticilere maruz kalan balıklarda etkin bir biyobelirteç olarak ele alınmaktadır.

Çalışmamızda balıklara uygulanan 0.1 ve 0.5 ppm'lik bakır dozlarının kontrol grubu balıklara kıyasla daha yüksek seviyelerde olması, balık solungaçlarında bulunan GSH varlığına bağlı olarak bakır tutulumunu göstermektedir. Çalışmamızda 0.5 ppm Cu uygulanan grupta, kontrole oranla daha yüksek GSH seviyeleri görülmüştür. Ancak 1 ppm ve daha yüksek dozlarda benzeri bir etki görülmeyip, kontrol grubu ile benzer sonuçlar elde etmemiz, artan bakır miktarının GSH tarafından tutulduğunu ve muhtemelen böbreklere taşınarak atıldığını düşündürmektedir. Çalışmamıza ait tüm çalışma grupları arasında sadece 0.5 ppm Cd (Grup-11) uygulanmış grupta yüksek GSH yanıtı gözlenmiştir. MDA, lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ürünlerden biridir ve oksidatif hasarı göstermede yaygın olarak kullanılan bir parametredir. MDA miktarının yüksek bulunması lipid peroksidasyonuna işaret etmektedir. Lipid peroksidasyonu meydana gelmemesi veya düşük düzeylerde olması oksidatif enzimlerin koruyucu etkilerinin göstergesidir. Oksidatif stresin pek çok biyolojik hedefleri arasında yer alan lipidler okside olarak birçok ikincil ürün oluştururlar. Bu ikincil ürünler arasında yer alan MDA çoklu doymamış peroksidasyon ürünü olarak oluşur. MDA, DNA ve proteinler ile etkileşime girebildiğinden potansiyel bir mutajendir. MDA'nın nükleik asit ve proteinler ile etkileşimi, hücrenin

fonksiyonel kapasitesini belirleyen mekanizmaların geri dönüşümsüz olarak bozulmasına neden olur (Hsu vd., 2013).

Bakır, lipid peroksidasyonunu hızlandıran bir metaldir. Lipid peroksidasyonunu başlatıcı ajan olarak görev yapan bakır, aynı zamanda sonraki reaksiyon basamaklarında katalizör olarak rol alır. LPO'nun primer ürünleri olarak meydana gelen lipid hidroperoksitler bakır ve demir gibi metaller ile reaksiyona girerek alkoksil ya da peroksil radikallerini oluştururlar. Deltametrin ve kadmiyumun, *Channa punctata* (Spotted snakehead)'da oksidatif stres etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada lipid peroksidasyonunun önemli ölçüde arttığı, solungaç dokuda en fazla sadece deltametrin verilen gruplarda (%53 kontrole oranla) saptanmıştır (Atıf vd., 2005). Seyhan Baraj Gölü'nde kirli ve temiz olmak üzere iki ayrı istasyondan toplanan sazangiller ailesine ait tatlı su balıklarının karaciğer dokusunda malondialdehit düzeyleri karşılaştırılmış ve kirli alandan toplanan örneklerde malondialdehitin önemli düzeyde arttığı bildirilmiştir (Kamunde ve MacPhail, 2010). Yapılan bir tez çalışmasında, Kılıçkuyruk Balığı (*Xiphophorus hellerii*)'nin solungaç dokusu üzerine farklı dozlarda uygulanan deltametrin ve kadmiyumun oksidatif strese neden olması sebebiyle malondialdehit düzeylerinde artış görülmüştür. İndirgenmiş glutatyon miktarının ise oksidatif strese karşı koyabilmek üzere arttığı ve oksidatif stresle oluşan oksijen radikallerinin katalaz enzim aktivitesini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Kaymak, 2011). Çeşitli ağır metallerin oluşturdukları oksidatif hasarlar sonucu artan dokü spesik GSH seviyeleri ve antioksidan enzim aktivitelerindeki değişiklikler halen tartışma konusudur. Balıkların karaciğer ve böbrek dokuları, metaller tarafından oluşan oksidatif stresden korunmak amacıyla CAT ve SOD gibi antioksidan savunma sistemlerince zengindir (Basha ve Rani, 2003; Lushchak, 2011).

Katalaz (CAT), H_2O_2 'i substrat olarak kullanarak oksijen ve suya parçalayan ve böylece H_2O_2 detoksifikasyonunu sağlayan peroksidazlardandır. Katalazın ksenobiyotik etkisinde farklı yanıtlar verdiği saptanmıştır. Aşırı O_2 tüketiminin CAT aktivitesini inhibe edebilme özelliği ile CAT aktivitesini azaltabileceği belirtilmiştir (Suvetha vd., 2010). CAT, tüm biyolojik membranlardan geçip, bazı enzimleri inaktivite eder. Metalik ya da organik kirleticilere maruz kalan balıklarda doza bağlı olarak katalaz aktivite yanıtlarının indüklenme ya da inhibe olma yönünde

farklılık gösterdiği bilinmektedir. Bu nedenle balıklarda zararlı etkiler oluşmadan hemen önce belirlenen CAT aktivitesinin oksidatif stres için hassas bir biyobelirteç olduğu kabul edilmektedir (Romeo vd., 2000; Gül vd., 2004). Metallerin (Cu, Cd, Fe ve Ni) *Channa punctata*'nın solungaçlarının biyokimyasal ve morfolojik özelliklerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada CAT, GST ve SOD gibi antioksidant enzim aktivitelerinde zamana bağlı azalmalar gözlenmiştir (Sanchez vd., 2005).

Kadmiyum ve çinkonun Tilapya Balığı (*Oreochromis niloticus*)'nda eritrosit antioksidan sistemleri üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada 5 mg/l Zn, 1 mg/l Cd ve ikisinin kombinasyonu olmak üzere üç grup oluşturulmuş ve GSH ve CAT aktiviteleri araştırılmıştır. Her iki antioksidan sistemin tüm gruplarda arttığı bildirilmiştir (Pandey vd., 2008). Bizim çalışmamızda 1 ve 5 ppm bakır dozlarının CAT aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir. Katalaz enziminin çeşitli kirlenmelerde farklı yanıtlar verdiği saptanmıştır. Aşırı O₂ tüketiminin CAT aktivitesini inhibe edebilme özelliği ile CAT aktivitesini azaltabileceği belirtilmiştir. Bu konuyla ilgili yapılan diğer bir çalışmada, Hindistan'ın Yamuna Nehri'nin ağır metallerce kirlendiği düşünülen Panipat ve Agra bölgelerinden yakalanan *Wallago attu* (Mully Catfish) türü balıkların karaciğer, solungaç ve böbrek dokularında CAT, GSH ve lipid peroksidasyon düzeyleri incelenmiştir. Avlanan balıklarda GSH ve lipid peroksidasyonunun yüksek olduğu, CAT aktivitesinin solungaç, karaciğer ve böbrekte önemli derecede azaldığı belirtilmiştir (Pandey vd., 2003). Benzer sonuçlara pestisitlerle yapılan çalışmalarda da rastlanmaktadır. Çipura (*Sparus aurata*) türü balıklara farklı dozlarda kadmiyum uygulaması sonucunda, katalaz enzim aktivitesinde önemli düşüşler gözlemlendiği bildirilmiştir (Goel vd., 2005).

Subletal dozlarda kadmiyum uygulanan gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) solungaç dokularında bazı antioksidan enzim aktivitelerindeki değişimler incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda üç grup halindeki balıklara yedi gün süreyle 1 ve 5 ppm Cd uygulanmıştır. Deneylerin üçüncü gününde süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz enzim aktivitelerinin solungaç dokusunda önemli derecede ($p < 0.05$) arttığı, beşinci günden itibaren ise azaldığı belirtilmiştir. Subletal dozlardaki kadmiyumun, gökkuşağı alabalıklarında oksidatif strese sebep olduğu ve diğer antioksidan enzimlerin bu stresin ön-

lenmesinde rol oynadıkları rapor edilmiştir (Alak ve Hisar, 2008).

Sonuç

Çevre kirliliğinin bir göstergesi olarak canlılarda ölçülen metalik kirlenmeler özellikle su ürünlerinde sıklıkla yüksek seviyelere ulaşabilir. Günümüzde artan nüfus yoğunluğu ve besin ihtiyacına bağlı olarak insan ve çevre sağlığı bu nedenle büyük önem kazanmıştır. Sucul organizmalarda ağır metal birikim ve hasarlarının incelenmesi araştırmaların yapılması, ağır metallerle karşı duyarlılığı yüksek olan türlerin belirlenmesinin yanı sıra sucul organizmaların biyokimyasal ve fizyolojik parametrelerinde meydana gelebilecek değişikliklerin belirlenmesi açısından da önemlidir. Su kaynaklarına yakın yerlerdeki endüstriyel faaliyetler ilgili kurumlarca sıklıkla denetlenmelidir. Su ortamı ve sucul canlılarda kirlilik izleme programları ve ekotoksikolojik risk değerlendirme çalışmaları ağır metal yükü olduğu düşünülen ortamlarda periyodik olarak izlenmelidir.

Teşekkür

Bu araştırma, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (BAPKO) tarafından desteklenmiştir. Proje no: FEN-C-YLP-211009-0324

Kaynaklar

- Aebi, H., (1984). Catalase Invitro, *Methods in Enzymology*, **105**: 121-126.
- doi: [10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Akçalı, İ., Küçüksezgin, F., (2009). Ege Denizi kıyılarında görülen kahverengi alg *Cystoseris sp.*'de ağır metal birikimi, *Ege University Journal of Fisheries & Aquatic Science*, **26**(3): 159-163.
- Alak, G., Hisar, O., (2008). Kadmiyumun Gökkuşağı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) karaciğer ve böbrek dokularındaki bazı antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkisi. *Yüksek Lisans Tezi*, Atatürk Üniversitesi, Su Ürünleri Bölümü, YÖK Tez no: 25240.
- Atıf, F., Parvez, S., Ali, M., Kaur, M., Rehman, H., Khan, H.A., Raisuddin, S., (2005). Modulatory effect of cadmium exposure on deltamethrin-induced oxidative stress in *Channa punctata* bloch, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **49**: 371-377.

doi: [10.1007/s00244-003-9231-4](https://doi.org/10.1007/s00244-003-9231-4)

Bagchi, D., Joshi, S.S., Bagchi, M., Balmoori, J., Benner, E.J., Kuszynski, C.A., Stohs, S.J., (2000). Cadmium and chromium-induced oxidative stress, DNA damage, and apoptotic cell death in cultured human chronic myelogenous leukemic K562 cells, promyelocytic leukemic HL-60 cells, and normal human peripheral blood mononuclear cells, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, **14**: 33-41. DOI:

doi: [10.1002/\(SICI\)1099-0461\(2000\)14:1<33::AID-JBT5>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0461(2000)14:1<33::AID-JBT5>3.0.CO;2-Y)

Basha, P.S., Rani, A.U., (2003). Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **56**: 218-221.

doi: [10.1016/S0147-6513\(03\)00028-9](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00028-9)

Beutler E., (1975)., Glutathione in Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods. 2nd ed., Grune and Stratton, N.Y., 112-114.

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

doi: [10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Firat, Ö., Çoğun, H.Y., Aslanyavrusu, S., Kargin, F., (2009). Antioxidant responses and metal accumulation in tissues of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* under Zn, Cd and Zn+Cd Exposures, *Journal of Applied Toxicology*, **29**: 295-301.

doi: 10.1002/jat.1406

Fish Base -

<http://www.fishbase.org/summary/4653>

Goel, A., Dani, V., Dhawan, D.K., (2005). Protective effects of zinc on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and hepatic histoarchitecture in chlorpyrifos induced toxicity, *Chemico-Biological Interactions*, **156**: 131-140.

doi: [10.1016/j.cbi.2005.08.004](https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.08.004)

Gül, Ş., Belge-Kurutaş, E., Yıldız, E., Şahan, A., Doran, F., (2004). Pollution correlated modi-

fications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey, *Environment International*, **30**: 605-609.

doi: [10.1016/0076-6879\(90\)86093-B](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86093-B)

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview, *Methods in Enzymology*, **186**: 80-85.

Hsu, T., Huang, K.M., Tsai, H.T., Sung, T.S., Ho, T.N., (2013). Cadmium (Cd)-induced oxidative stress down-regulates the gene expression of DNA mismatch recognition proteins MutS homolog 2 (MSH2) and MSH6 in zebrafish (*Danio rerio*) embryos, *Aquatic Toxicology*, **126**: 9-16.

doi: [10.1016/j.aquatox.2012.09.020](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.09.020)

Kamunde C., MacPhail R., (2010). Metal-metal interactions of dietary cadmium, copper and zinc in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **74**(4): 658-667.

doi: [10.1016/j.ecoenv.2010.10.016](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.10.016)

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

Kaymak, G., (2011). Farklı dozlarda deltametrin ve kadmiyum uygulanan Kılıçkuyruğu (*Xiphophorus hellerii*) balıklarında oluşan oksidatif stres tayini. Yüksek lisans tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D., İstanbul.

Kim, S.G., Jee, J.H., Kang, J.C., (2004). Cadmium accumulation and elimination in tissues of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* after sub-chronic cadmium exposure, *Environmental Pollution*, **127**: 117-123.

doi: [10.1016/S0269-7491\(03\)00254-9](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(03)00254-9)

Ledwozyw A., Michalak D., Stepień A., Kadziolka A., (1986). The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis, *Clinica Chimica Acta*, **155**(3): 275-283.

doi: [10.1016/0009-8981\(86\)90247-0](https://doi.org/10.1016/0009-8981(86)90247-0)

Loro, V.N., Jorge, M.B., Rios da Silva, K., Wood, C.M., (2012). Oxidative stress parameters

- and antioxidant response to sublethal water-borne zinc in a euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*: Protective effects of salinity, *Aquatic Toxicology*, **110-111**: 187-193.
- doi: [10.1016/j.aquatox.2012.01.012](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.01.012)
- Lushchak, V.L., (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals, *Aquatic Toxicology*, **101**: 13-30.
- doi: [10.1016/j.aquatox.2010.10.006](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006)
- OECD., (1999).
<http://www.oecd.org/dac/environment-development/1884214.pdf>
- Oliva, M., José Vicente, J., Gravato, C., Guilhermino, L., Galindo-Riaño, MD., (2012). Oxidative stress biomarkers in Senegal sole, *Solea senegalensis*, to assess the impact of heavy metal pollution in a Huelva estuary (SW Spain): Seasonal and spatial variation, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **75**(1): 151-162.
- doi: [10.1016/j.ecoenv.2011.08.017](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.08.017)
- Pandey S., Parvez S., Sayeed I., Haque R., Bin-Hafeez, Raisuddin S., (2003). Biomarkers of Oxidative Stress: A Comparative Study of River Yamuna Fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.), *The Science of The Total Environment*, **309**: 105-115.
- doi: [10.1016/S0048-9697\(03\)00006-8](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00006-8)
- Pereira, S., Cavalie, I., Camilleri, V., Gilbin, R., Adam-Guillermi, C., (2013). Comparative genotoxicity of aluminium and cadmium in embryonic zebrafish cells, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **750**(1-2): 19-26.
- doi: [10.1016/j.mrgentox.2012.07.007](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2012.07.007)
- Richetti, S.K., Rosemberg, D.B., Ventura-Lima, J., Monserrat, J.M., Bogo, M.R., Bonan, D., (2011). Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure, *NeuroToxicology*, **32**(1): 116-122.
- doi: [10.1016/j.neuro.2010.11.001](https://doi.org/10.1016/j.neuro.2010.11.001)
- Romeo, M., Bennani, N., Gnassia-Barelli, M., Lafaurie, M., Girard, J.P., (2000). Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*, *Aquatic Toxicology*, **48**: 185-194.
- doi: [10.1016/S0166-445X\(99\)00039-9](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00039-9)
- Sanchez, W., Palluel, O., Meunier, L., Coquery, M., Porcher, J.M., Ait-Aissa, S., (2005). Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **19**: 177-183.
- doi: [10.1016/j.etap.2004.07.003](https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.07.003)
- Shi, H.S.; Sui, Y.X.; Wang, X.R.; Luo, Y.; Ji, L.L., (2005). Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium and naphthalene in liver of *Carassius auratus*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **140C**: 115-121.
- doi: [10.1016/j.cca.2005.01.009](https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.01.009)
- Stegeman, J.J., Goldstone, J.V., Hahn, M.E., (2010). Perspectives on zebrafish as a model in environmental toxicology, *Fish Physiology*, **29**: 367-439.
- doi: [10.1016/S1546-5098\(10\)02910-9](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(10)02910-9)
- Suvetha, L., Ramesh, M., Saravanan, M., (2010). Influence of cypermethrin toxicity on ionic regulation and gill Na⁺/K⁺-ATPase Activity of a freshwater teleost fish *Cyprinus carpio*, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **29**: 44-49.
- doi: [10.1016/j.etap.2009.09.005](https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.09.005)
- Taş, E.Ç., Ergen, Z. ve Sunlu, U., (2009). 2002-2004 Yılları arasında Homa Lagünü'nden (İzmir Körfezi) toplanan *Hediste diversicolor*'da ve yaşadığı sedimentte ağır metal düzeylerinin (Cd, Cu, Zn, Pb, Cr, Fe) araştırılması, *Ege University Journal of Fisheries&Aquatic Sciences*, **26**(3): 179-185.
- Zhang, J.F., Liu, H., Sun, Y.Y., Wang, X.R., Wu, J.C., Xue, Y.Q., (2005). Responses of the antioxidant defenses of the Goldfish *Carassius auratus*, exposed to 2,4-dichlorophenol, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **19**: 185-190.
- doi: [10.1016/j.etap.2004.07.001](https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.07.001)