

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

**ALİAĞA KÖRFEZİNDEKİ DENİZ KİRLİLİĞİNİN
BÖLGE KEFAL BALIKLARINDA KİRLİLİĞİN
BİYOGÖSTERGESİ OLAN KARACİĞER EROD
ENZİM AKTİVİTESİ VE BALIKTAKİ ÇEŞİTLİ METAL
DÜZEYLERİ İLE BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Ecz. Onur Kenan ULUTAŞ

Danışman
Prof.Dr. İsmet ÇOK

Ankara-2007

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında bilgisini, desteğini ve alakasını hissettiğim, yetişmemi sağlayan değerli hocam Prof.Dr. İsmet Çok'a;

İlgi ve destekleri için Prof.Dr. Ali Esat Karakaya, Prof.Dr. Semra Şardaş, Prof.Dr. Sema Burgaz, Prof.Dr. Benu Karahalil, Doç.Dr. Neslihan Aygün Kocabaş'a;

EROD aktivitesi çalışmalarının yapılması için gerekli bilgi ve teknik ekipmanı sağlayıp, ölçümlerin yapılmasında yardımcı olan, Pamukkale Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünden Prof.Dr. Alaattin Şen'e;

Metal ölçümü çalışmalarım sırasında bilgisi ve yardımları ile bana her türlü desteği sağlayan Analitik Kimya Bölümünden Doç.Dr. Nusret Ertaş'a;

Dostluklarını ve yardımlarını eksik etmeyen F. Toksikoloji Anabilim Dalı asistanları, sevgili arkadaşlarım Dr.Ecz. Gonca Çakmak Demircigil, Uzm.Ecz. Eren Özçağlı, Uzm.Ecz. Ela Kadioğlu, Uzm.Ecz. Emre Durmaz, Uzm.Ecz. Erdem Coşkun ve Ecz. Esra Emerce Tufan'a;

Huzurlu ve sevgi dolu bir çalışma ortamı sağlayıp her konuda bana destek olan anneme, babama ve karıma,

Teşekkür ederim.

Sevgili anneme ve babama....,

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
I. GİRİŞ ve AMAÇ	1
II. GENEL BİLGİLER	6
II.1. Sucul Kirlenmenin Biyogöstergeleri	8
II.2. Sucul Ortamlarda Biyogöstergelerin Önemi	12
II.3. Biyokimyasal göstergeler	13
II.4. Sitokrom P450'ler	15
II.4.1 Sitokrom P450'lerin Sınıflandırılması ve Adlandırılması	21
II.5. MFÖ Enzim indüksiyonunun toksikolojik önemi	22
II.6. EROD Aktivitesi Ölçümü	24
II.7. CYP1A İndüksiyonunun Mekanizması	29
II.8. AhR Bağlantılı Toksisitenin Mekanizması	32
II.9. Türkiye'de Sucul Kirlenmenin Göstergesi Olarak EROD Aktivitesi Ölçümleri	34
II.10. Sucul Sistemlere Konu Olan Diğer Biyogöstergeler	35
II.11. Metaller	37
II.11.1. Metallere Maruziyet	37
II.12. Kadmiyum (Cd)	41
II.12.1 Kadmiyum Maruziyeti ve Yarattığı Toksik Etkiler	42
II.12.2. Kadmiyumun Karsinojenik Etkisi	45
II.12.3. Sucul Sistemde Kadmiyum	45
II.12.4. Türkiye'de İzin Verilen Sınır Değerler	46
II.13. Krom (Cr)	47
II.13.1 Biyolojik rolü	48
II.13.2. Toksisitesi	48

II.13.3. Krom'un Karsinogenik Etkileri	50
II.13.4. Sucul Sistemde Krom	50
II.13.5. Türkiye'de İzin Verilen Sınır Değerler	51
II.14. Kurşun (Pb)	51
II.14.1 Kurşun Maruziyeti ve Yarattığı Toksik Etkiler	52
II.14.2. Kurşun Karsinogenitesi	56
II.14.3. Sucul Sistemde Kurşun	56
II.14.4. Türkiye'de İzin Verilen Sınır Değerler	57
II.15. Cıva (Hg)	58
II.15.1 Cıvaya Maruziyet ve Yarattığı Toksik Etkiler	58
II.15.2. Cıvanın Karsinogenitesi	63
II.15.3 Sucul Çevrede Cıva	64
II.15.4. Türkiye'de İzin Verilen Sınır Değerler	66
II.16. Türkiye'de Sucul Çevrede Yapılan Metal Ölçümleri	66
III. GEREÇLER ve YÖNTEM	69
III.1. Balıkların Avlanması	69
III.1.1 Balıkların Karaciğer ve Kas Dokularının İzolasyonları ve Saklanması	70
III.2. Karaciğer Örneklerinin Homojenizasyonu ve Mikrozom Eldesi	71
III.2.1 Homojenizasyon için Gerekli Cihaz ve Malzemeler	72
III.2.2 Homojenizasyon Sırasında Kullanılan kimyasallar	71
III.2.3 Homojenizasyon Yöntemi	72
III.3 Karaciğer Örneklerinde Protein Tayini ve EROD Analizi	73
III.3.1 Cihaz ve Malzemeler	73
III.3.2 Kullanılan Kimyasallar	74
III.3.3 Protein Tayin Yöntemi	74
III.4 Karaciğer Örneklerinde EROD Analizi	75

III.4.1 Cihaz ve Malzemeler	76
III.4.2 Kullanılan Kimyasallar	76
III.4.3 EROD Yöntemi	77
III.5 SDS-PAGE ve Western Blot	78
III.5.1 Cihaz ve Malzemeler	78
III.5.2 Kullanılan Kimyasallar	78
III.5.3 Yöntem	82
III.6 Atomik Absorbsiyon Spektrometresi ile Ağır Metal Tayini	84
III.6.1 Cihaz ve Malzemeler	84
III.6.2 Kullanılan Kimyasallar	84
III.6.3 Yöntem	85
III.7. Kimyasallar	90
III.8. İstatistiksel Analiz	91
IV. B U L G U L A R	92
IV.1. Karaciğer EROD Aktivitesi Ölçüm Sonuçları	92
IV.2. Balık Karaciğer Mikrozomlarının SDS-PAGE ve Western Blot ile Analizleri	95
IV.3. Kefal Balığı Kas Dokusunda Cr, Hg, Cd, Pb Ölçüm Bulguları	96
IV.3.1 Kefal Balığı Kas Dokusunda Cr Ölçüm Bulguları	98
IV.3.2 Kefal Balığı Kas Dokusunda Cd Ölçüm Bulguları	100
IV.3.3 Kefal Balığı Kas Dokusunda Hg Ölçüm Bulguları	101
IV.3.4 Kefal Balığı Kas Dokusunda Pb Ölçüm Bulguları	103
V. T A R T I Ş M A	105
VI. ÖZET	116
VII. SUMMARY	118
VIII.K A Y N A K L A R	120

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil No:	Şekil Adı	Sayfa
Şekil 1:	Maruziyet Seviyesine Göre Organizmanın Biyolojik Cevabındaki Değişiklikler	11
Şekil 2:	Sitokrom P450'ler Tarafından Gerçekleştirilen Bir Reaksiyon Örneği	17
Şekil 3:	Bir Ksenobiyotiğin Sitokrom P450 Tarafından Monoksijenasyon Basamakları	20
Şekil 4:	CYP1A1 İndüksiyonun Basamakları Ve Uygun Ölçüm Metodları	25
Şekil 5:	Ahr Ligandlarının Yapısal Gösterimi	30
Şekil 6:	Ahr Nedenli Toksisite İçin Öngörülen Mekanizma	31
Şekil 7:	Metallerin Doğal Döngüler	38
Şekil 8:	New York Şehrinde 1992-2003 Yılları Arasında Evlerde Kullanımda Olan Suyun Kurşun Tayin Sonuçları	39
Şekil 9:	1976-1980 Yılları Arası Benzindeki Kurşun Oranları ve İnsan Kanında Ölçülmüş Kurşun Seviyeleri	40
Şekil 10:	Kurşunun Doza Bağımlı Olarak Yarattığı Klinik Sonuçlar	55
Şekil 11:	Sucul Çevrede Cıva Döngüsü	60
Şekil 12:	Buz Örneklerinde Cıva Ölçümü Sonuçları İle Dünyadaki Olaylarla Alakaları	62
Şekil 13:	Aliağa Körfezinin Kuş Bakışı Görüntüsü Üzerinden Balıkların Avlandığı Bölgeler	68
Şekil 14:	Liza saliens karaciğer EROD aktivitesinin örnek kalibrasyon eğrisi	77
Şekil 15:	Cıva Ölçümlerinde Hg Standartları İle Elde Edilen Örnek Kalibrasyon Eğrisi	87
Şekil 16:	Krom Ölçümlerinde Cr Standartları İle Elde Edilen Örnek Kalibrasyon Eğrisi	88

Şekil 17: Cd Ölçümlerinde Numuneye Standart Ekleme Yöntemi İle	
Elde Edilen Örnek Kalibrasyon Eğrisi	89
Şekil 18: Pb Ölçümlerinde Numuneye Standart Ekleme Yöntemi İle	
Elde Edilen Örnek Kalibrasyon Eğrisi	89
Şekil 19: Erod Aktivitesi Ortalama Değerlerinin Toplu Karşılaştırması	93
Şekil 20: Kontrol Bölgesi Ve Aliağa Bölgesi Erod Aktivite	
Ortalamaları Karşılaştırılması	94
Şekil 21: Aliağa Körfezinden Yakalanan Kefal Balıklarının Karaciğer	
Mikrozomlarının İmmünoblot Analiz Sonucu	95
Şekil 22: Kefal Balık Kas Dokularında Cr Ölçüm Sonuçlarının Karşılaştırılması	99
Şekil 23: Kefal Balık Kas Dokularında Cd Ölçüm Sonuçlarının Karşılaştırılması	101
Şekil 24: Kefal Balık Kas Dokularında Hg Ölçüm Sonuçlarının Karşılaştırılması	102
Şekil 25: Kefal Balık Kas Dokularında Pb Ölçüm Sonuçlarının Karşılaştırılması	104

TABLULARIN LİSTESİ

Tablo No:	Tablo Adı	Sayfa
Tablo 1:	Sitokrom P450 Bağımlı Monooksijenaz Sistemi Tarafından Metabolize Edilen Bileşiklere Örnekler	18
Tablo 2:	Özgül İndükleyicileri Ve Ölçümde Kullanılan Model Katalitik Aktiviteleri İle Bazı P450 Alt Aileleri	19
Tablo 3:	Monooksijenaz Sisteminin Bileşenleri	20
Tablo 4:	Benzo-a-Piren Ve β -Naftaflavona Maruz Kalan Levreklerin EROD Aktivitesindeki Artışın Kontrol Balıkları İle Kıyaslanması	26
Tablo 5:	Çeşitli Kimyasalların EROD Aktivitesini İndükleme Güçleri	27
Tablo 6:	Çeşitli Kirleticiler İle Kirlenmiş Sularda Değişik Balık Türleri Kullanılarak Yapılan Bazı EROD Aktivitesi Ölçümleri Sonuçları	33
Tablo 7:	EPA'nın Kadmiyum Oral Referans Dozları	45
Tablo 8:	Türkiye'de Çeşitli Bölgelerinde ve Farklı Balık Türlerinde Yapılan Cd, Cr, Hg Ve Pb Metal Ölçüm Sonuçları	66
Tablo 9:	Grafit Fırın Yönteminde Kullanılan Küleştirme ve Atomlaştırma Sıcaklıkları	88
Tablo 10:	Deneylerde Kullanılan Kimyasalların Sağlayıcıları ve Katalog Numaraları	89
Tablo 11:	Avlanma Bölgelerinde Kefal Balığı Karaciğer EROD Aktivitesi Ölçüm Sonuçları	92
Tablo 12:	EROD Aktivitesi Sonuçlarının İstatistiksel Değerlendirilmesi	94
Tablo 13:	Metallerin Balık Kas Dokusundaki Ölçüm Sonuçları	97
Tablo 14:	Kefal Balığı Kas Dokusunda Ölçülen Cr Metal Değerleri	98
Tablo 15:	Cr Metali Ölçüm Sonuçlarının İstatistiksel Değerlendirmesi	99
Tablo 16:	Kefal Balığı Kas Dokusunda Ölçülen Cd Metal Değerleri	100
Tablo 17:	Cd Metali Ölçüm Sonuçlarının İstatistiksel Değerlendirmesi	100

Tablo 18: Kefal Balığı Kas Dokusunda Ölçülen Hg Metal Değerleri	101
Tablo 19: Hg Metali Ölçüm Sonuçlarının İstatistiksel Değerlendirmesi	102
Tablo 20: Kefal Balığı Kas Dokusunda Ölçülen Pb Metal Değerleri	103
Tablo 21: Pb Metali Ölçüm Sonuçlarının İstatistiksel Değerlendirmesi	103
Tablo 22: Türkiye’de Yapılan EROD Aktivitesi Ölçüm Sonuçları ile Bu Çalışma Sonuçlarının Karşılaştırılması	109

I. GİRİŞ ve AMAÇ

Günümüzde geniş miktardaki farklı insan aktivitelerinin bir sonucu olarak sucul çevre pek çok sayıda kimyasal veya ksenobiyotik tarafından gittikçe artan oranda tehdit edilmektedir. Bu tehdit sadece sulara yaşayan organizmaların sağlığı üzerine değil bu ürünleri tüketen insana da yöneliktir. Yüksek derecede kirlenmiş alanlarda yaşayan balık popülasyonlarında yüksek sıklıkta patolojik lezyonlar ve neoplasmların sedimetlerdeki toksik kontaminantların düzeyi ile ilgili olduğunu gösteren pek çok çalışma mevcuttur¹.

Çevre Toksikolojisinin bütünleyenlerinden biri olan “Akuatik - Sucul Toksikoloji”, kimyasalların sucul organizmalar üzerine advers veya toksik etkilerini kalitatif ve kantitatif olarak tanımlandığı çalışma alanını oluşturmaktadır. Bu tanımlamayı yaparken de sucul çevrede kimyasalların transportunu, dağılımını, transformasyonunu ve sonuç etkilerini değerlendirerek yoruma ulaşmaktadır. Bilimin bu multidisipliner dalında biyokimya çalışmaları ve sucul organizmaların biyotransformasyon enzimleri ana rolü oynamaktadır.

Günümüz çevresi başta kalıcı organik kirleticiler (KOK’lar) olmak üzere Pestisitler (*Klorlu Hidrokarbonlar: DDT, Aldrin, Lindan, Dieldrin, Endrin, Klordan..*), klorlu organik bileşikler (*Poliklorobifeniller, Dibenzodioksinler, Dibenzofuranlar...*), Metaller (*Kurşun, Kadmiyum, Cıva...*),yanma işlemi sırasında oluşan kirleticiler (*Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar, Pireliz Ürünleri, Akrilamid....*), radyonüklidler (*Cs-137,Sr-90..*) gibi pek çok kimyasal ve fiziksel ajan tarafından sürekli ve artan oranlarda kirlenmektedir^{2, 3}. Çevrenin önemli bir kompartımanı olan suların sayılan bu çevre kirleticileri ile değişik konsantrasyonlarda kirlenmesi insan, evcil ve yaban hayat açısından beklenmeyen

tehlikelerin doğmasına neden olabilmekte, su flora ve faunasını olumsuz yönde etkilemektedir. Artan sanayileşmenin yanı sıra tarımda üretimin artırılması amacıyla çeşitli zararlı canlılara karşı kullanılmakta olan pestisitlerin sayı ve miktarının artması bu kompartımana ulaşan kirleticilerin boyutlarında da artışları beraberinde getirmektedir. Nitekim yurdumuzun çeşitli yörelerinde göl ve denizlerde yapılan çalışmalarda bu kimyasallara maruziyet açıkça pek çok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur^{4, 5, 6, 7}. Özellikle endüstrinin bulunduğu alanlarda, endüstrilerin atıkları, PCB'ler, PAH'lar, PCDD/F'ler gibi kalıcı, dayanıklı organik kirleticileri içerebilmektedir. Doğal olarak parçalanmayan bu bileşikler, gıda zinciri sudan balıklara ve balıklardan da onları tüketen diğer canlılara ve nihayet insana kadar ulaşarak, artan oranlarda canlılarda birikmektedirler. Balıkların ve insanların yağ dokularında uzun yıllar kalmakta ve uzun dönemde toksik etkilerini göstermektedirler^{8, 9}.

Balıklar hem faz I hem faz II reaksiyonlarını gerçekleştirebilecek gerekli enzim sistemlerine sahiptirler¹⁰. Ksenobiyotiklerin metabolizması için balıkta gerekli enzimlerin azlığı veya yokluğunun ilk kez ileri sürüldüğü 1962 yılından bu yana, özellikle petrol-yağ hidrokarbonları, kağıt hamuru fabrika pis suyu, endüstriyel ve şehir kanalizasyonu ile kontamine bölgelerden elde edilen balıklarda, artmış CYP P4501A ve bununla bağlantılı arilhidrokarbon hidroksilaz (AHH) ve/veya 7-etoksiresorufin O-deetilaz (EROD) aktiviteleri adı geçen bölgelerdeki kimyasalların yarattığı çevresel kontaminasyonun biyoizlenmesinde balıkta en çok yaralanılan biyokimyasal ölçüm yöntemleridir^{10, 11, 12}.

Özellikle CYP 1A subfamilyası karsinogenik ve mutajenik etkili PAH'lar ve poliklorlu hidrokarbonların (PCB, PCDD/F'lar, pestisitler gibi) yarattığı çevre kirliliği sonuçlarının değerlendirilmesinde Biyolojik Tanımlayıcı "biomarker" olarak son derece önemli bir role sahiptir^{13, 14}. Biyolojik tanımlayıcıların geniş bir alandaki organizmalara uygulanabilmeleri, erken uyarıcı testler olmaları, duyarlı olabilmeli ve özgün özellikte

olmaları en önemli özellikleri olarak sıralanabilir. Bu biyolojik tanımlayıcılardan biri olan ve özellikle karaciğerde bulunan CYP 1A, PAH'lar, PCB'ler, PCDD'ler ve diğer organik kimyasallara maruziyetin biyolojik tanımlayıcısı olarak balıklarda, memelilerde ve kuşlarda tanımlanmakta ve biyolojik tanımlayıcı yaygın olarak kullanılmaktadır¹⁵. CYP1A'nın saptanması 7-etoksiresorufin-o-deetilaz (EROD) enzim aktivitesi ile ilişkilidir. Biyoizleme aracı olarak EROD aktivitesi, toksik düzlemsel yapılara (örneğin PAH'lar) yakın zaman içinde maruziyeti hakkında bilgi vermektedir. Bu nedenle EROD çoğunlukla, erken uyarı sistemi olarak tanımlanmaktadır¹⁵.

Başta balıklar olmak üzere sucul canlılarda sudaki kirliliğin belirlenmesinde kullanılan enzim analizlerinin yanı sıra, kirliliğe neden olan dioksinler, dibenzofuranlar, nitroaromatikler, organofosfatlar, ftalat esterleri, radyonüklidler ve metaller (Cd, Hg, Ag, Co, Cr, Ni, Pb, Zn, Cu, Fe) ve organik klorlu bileşikler gibi pek çok kontaminantın düzeyleri çeşitli dokularda saptanabilmektedir^{5, 16, 17}. Çeşitli endüstriyel faaliyetlerden kaynaklanan atık suların içinde bazen eser miktarda, bazen de yüksek konsantrasyonlarda metaller bulunur. Metaller, ortamdaki canlı yaşam üzerinde konsantrasyonları ile orantılı olarak toksik etki yaparlar¹⁸. Bu maddeler arasında en önemli grubu, ağır metaller olarak adlandırılan Sb, Ag, As, Be, Cd, Cr, Cu, Pb, Mn, Hg, Ni, Se, T, U, V, Zn elementleri oluşturur. Bu metaller balıkların başta karaciğer ve kas dokuları olmak üzere çeşitli dokularında kimyasal kirliliğe bağlı olarak çeşitli konsantrasyonlarda saptanabilmektedirler.

Metaller biyolojik parçalanmaya dayanıklı olup, bir çoğu çevrede lipofilik özellik kazanarak sucul bitki ve hayvanlarda birikirler. Özellikle kadmiyum (Cd), cıva (Hg), kurşun (Pb) ve krom (Cr) gibi ağır metaller, besin zincirleriyle girdikleri canlı bünyelerinde doğal fizyolojik mekanizmalarla atılamadıkları için birikime uğrar ve organizmada belirli sınır konsantrasyonların aşılması halinde toksik etki gösterirler¹⁹. Bu birikim sonucunda sulara yaşayan balıklar ve diğer sucul organizmalar olumsuz etkilenmekte, bu tür

ürünlerle beslenen insanlarda da toksik etkiler ortaya çıkabilmektedir. Japonya'da Minamata bölgesinde cıva (Hg) ile kontamine olan balıkların yenmesi ile görülen zehirlenme olayı bunun en iyi örneğidir²⁰.

Sonuç olarak planlanan çalışma, başta petrokimya olmak üzere yoğun sanayileşmenin yaşandığı İzmir yakınlarındaki Aliağa Körfezinde ve Foça Körfezinde seçilecek temiz referans bölgelerde, avlanan kefal balıkları ile -leaping mullet (Liza saliens)- yürütülecektir. PAH, PCB ve diğer kalıcı organik kirleticilerin neden olduğu kirliliğin belirlenmesi için Kefal Balıklarının karaciğerlerinde 7-etoksiresorufin O-deetilaz (EROD) aktivitesi ve CYP 1A1 indüksiyonu belirlenecektir. Ayrıca bu körfeze çok yakın olması nedeniyle Dünyanın en önemli 5 Gemi yıkım merkezinden ve körfezi ziyaret eden çok sayıdaki gemiden kaynaklanan metal kirliliği, kentsel ve çevredeki önemli sanayi kuruluşlarının (kağıt fabrikası gibi) neden olabilecekleri metal kirliliğinin belirlenmesi amacıyla gene kefal balıklarının kas dokusunda Pb, Cd, Cu, ve Cr metallerinin miktarları araştırılacaktır. Bu çalışma sonucunda Yurdumuzun önemli sanayi tesislerinin pek çoğunun bulunduğu bu bölgedeki su ekosistemindeki kirlilik düzeyinin yanı sıra bu kirliliğin sucul organizmalar üzerine olan etkisinin ortaya çıkarılması amaçlanmaktadır. Ayrıca Yurdumuz için ekonomik öneme sahip olan bu bölgedeki endüstri tesislerinin Aliağa körfezinin yanı sıra Foça Körfezinde yarattıkları kirliliğin belirlenmesi de çalışma ayrıca önem taşımaktadır. Çünkü bu bölgede de endüstriyel faaliyetlere bağlı olarak ortaya çıkan kirliliğin belirlenmesine yönelik daha önceden yapılmış bir çalışma mevcut değildir. Bu çalışma sonucunda elde edilecek bilgiler; çevre açısından risk taşıyan pek çok faktörün elimine edilmesinde güçlü kanıt olarak kullanılabilecek ve kirliliğin gerek sucul sistem gerekse besin zincirinin tepesinde yer alan insan için yaratacağı sağlık risklerin belirlenip önceden alınması gereken önlemler açısından da gereklilik arz edecektir. Bu çalışmanın sonuçlarının Yurdumuzda özellikle kimyasalların neden olduğu çevre kirlenmesine yönelik bilinçlenmenin oluşmasına da katkı sağlayacağı açıktır. Bu durum son zamanlarda Yurdumuzda yaşanan çeşitli çevre felaketleri göz önünde

bulundurulduğunda, başta kimyasallar olmak üzere çevre kirliliğine neden olan pek çok faktöre yönelik kamuoyu oluşmasına da yardımcı olacaktır.

II. GENEL BİLGİLER

20. yüzyılın başında kullanılan 1000 kadar kimyasal maddenin büyük bölümü bitkisel, hayvansal ve mineral kaynaklı iken bugün çoğunluğu sentetik olmak üzere çevremizi saran kimyasal maddelerin sayısı 100.000'i geçmekte^{21, 22} ve her yıl bu sayıya 1000 kadar yeni kimyasalı eklendiği hesaplanmaktadır²²⁻²⁷. Bu rakamlar modern yaşamda kimyasal maddelere maruziyetin kaçınılmaz olarak arttığı sonucunu da beraberinde getirmektedir. Modern üretim tekniklerinin sonucu olarak geçmiş 50 yıl boyunca çeşitli sentetik kimyasallar ve bu kimyasalların yer aldığı ürünler başta tarımsal üretimin artırılması amacıyla geniş olarak üretilip çevreye salınmışlardır. Bu kimyasalların büyük bir çoğunluğu gerek insanlar gerekse ekosistemler için tehlikeli sonuçlar yaratabilmektedir. Çevrenin önemli bir kompartımanı olan suların sayılan bu çevre kirleticileri ile değişik konsantrasyonlarda kirlenmesi insan ve yaban hayat açısından beklenmeyen tehlikelerin doğmasına neden olabilmekte, su flora ve faunasını olumsuz yönde etkilemektedir.

Canlılar, yaşamsal ve ekonomik gereksinimleri için suyu hidrolojik döngüden alır ve kullandıktan sonra tekrar aynı döngüye iade ederler. Bu süreç sırasında suya karışan maddeler, suların fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini değiştirerek, "su kirliliği" denilen olguyu ortaya çıkarır. Söz konusu özellik değişimleri aynı zamanda sularda yaşayan çeşitli canlı varlıkları da (sucul canlılar) etkiler. Böylece suyun çeşitli nedenlerle kirlenmesi sucul ekosistemin etkilenmesine, dengelerin bozulmasına ve giderek doğadaki tüm suların sahip oldukları asimilasyon ve kendi kendini temizleme kapasitesinin azalmasına veya yok olmasına yol açabilir.

Dünyada bulunan yer üstü ve yer altı suları, oldukça çok sayıda kaynaktan ve kompleks endüstriyel atıklar ve yoğun tarımsal faaliyetlerden dolayı gittikçe artan oranlarda kirlenmektedir²⁸. Kimyasal 'kirliliği'nden nasibini büyük ölçüde almakta olan sular, Dünya yüzeyinin %71'ini kapsamakta, bu suyun önemli kısmını (%99'u) deniz ve okyanuslardaki tuzlu sular oluşturmaktadır. Sucul çevrede, virüsten balinaya oldukça çeşitli sayıda canlı bulmak mümkün olduğu gibi; dünyadaki yaşamının temelini suda atılması ve günümüzde bile dünya oksijen düzeyinin ayarlanmasında hala sudaki en küçük planktonun bile önemi bulunması, sucul ekosistemi oldukça önemli hale getirmektedir¹.

Toksik kimyasalların sucul çevrede çok çeşitli kompartımanlarda bulunuyor olması, başta bu kimyasalların residüel kirliliklerinin sucul organizmaların bir çok dokusunda akümüle olması nedeniyle, sucul ekosistemin sağlığı için oldukça büyük bir tehdit oluşturmaktadır²⁹. Kirleticilerin, besin zinciri boyunca daha yüksek seviyelere doğru göstermiş olduğu biyomagnifikasyon, kirleticilerin oluşum noktasından ve insan aktivitelerinin bulunduğu alanlardan çok daha uzaklara yayılmasına neden olmaktadır²⁹. Derin deniz balıkları³⁰, yunuslarda³¹, okyanus sularındaki fok balıklarında ve kutup ayılarında³², DDT gibi tarım ilaçları ve PCB gibi endüstriyel bileşiklerin görülmesi bu duruma en güzel örnekleri oluşturmaktadır.

Oldukça toksik ve kalıcı kirleticilerin sucul ekosistemde oluşturdukları etkileri, organizmada oluşturdukları biyolojik tepki cinsinden değerlendirmenin daha doğru olacağı açıktır²⁹. Bu tür kirleticilerin çevresel kalite üzerine etkilerinin ortaya konulmasında, izlenmesi gereken en akılcıca yol, ekosistemde oluşturduğu negatif etkilerin hızlıca saptanması olmaktadır³³. Bu nedenden dolayı moleküler ve hücresele seviyede biyolojik göstergelerin veya biyogöstergelerin kullanılması, çevresel kalitenin belirlenmesinde başvurulacak biyolojik etkilerin gözlenmesinde hassas bir erken uyarı aracı olması nedeniyle oldukça önemlidir³⁴.

II.1. Sucul Kirlenmenin Biyogöstergeleri

Değişik moleküler yaklaşımlar kullanılarak, organik kirleticiler, metaller ve organometal bileşikleri gibi çeşitli kontaminantların etkileri ve maruziyetinin ölçülebilmesi nedeniyle biyogöstergeler oldukça önem arz etmektedir²⁹. Moleküler, hücresel ve hatta tüm hayvan biyogösterge modelleri bulunmakta olup, bazıları kirleticilere spesifik, bazıları ise kirlilik ve doğal stresörlerin durumuna göre cevaplarında değişiklik göstermektedir³⁵. Tanı ve prognoz amaçlı kullanılabilen bu tür erken uyarı testlerinin varlığı, daha geniş çaplı organizmalar ile çalışılmasını, daha spesifik ve hassas ölçümlerin yapılmasını sağlamaktadır²⁹. Biyogöstergeler, kirleticilerin varlığının göstermesi veya organizmanın, kirleticilere karşı oluşturduğu cevabın şiddetinin saptanması amacıyla vücut sıvılarının, hücrelerinin ya da dokularının, biyokimyasal ve hücresel bazda ölçümüdür³⁶. Seçilen biyogösterge, organizmanın kimyasallara-kirleticilere maruz kaldığını (maruziyetin biyogöstergesi), ve/veya kirleticie-kimyasala karşı organizmanın oluşturduğu cevabın şiddetini (etkinin biyogöstergesi veya stres biyogöstergesi) gösterebilmektedir²⁹.

Biyogöstergelerin önemleri aşağıdaki başlıklar altında özetlenebilir²⁹:

- 1) Maruz kalınan kimyasallar ile organizmalar arasında gerçekleşen etkileşimleri saptayabilir ve öldürücü olan düzeye kadar bu etkilerin ölçülmesini sağlayabilirler,
- 2) Kimyasal analiz yöntemleri yalnızca belirli bir kısım kontaminantı ölçmede kullanılabilir; buna karşın, kontaminantların advers etkileri hakkında bilgi vermezler. Biyogöstergeler sayesinde ise, kontaminantların oluşturduğu advers etkiler hakkında bilgi sahibi olunabilir.

3) Biyogöstergeler, hem bilinen hem de bilinmeyen kontaminantların varlığının gösterilmesini sağlayabilirler,

4) Öldürücü düzeyin altında olan etkilerin erken tanısı uyarı olarak görülüp, durumun düzeltilmesi veya koruyucu önlemlerin alınmasına yardımcı olurlar,

5) Biyogöstergeler yardımıyla, bölgesel ve kısa dönemli olarak, kirliliğin biyolojik saptanması yapılabilir,

6) Çevresel kirleticilere maruziyetin ve oluşabilecek risk konusunda bilgi verirler,

7) Kirliliğin şiddetine bağlı, ekosistemde oluşan değişimleri gösterebilmektedirler,

8) Yol gösterici olarak kullanılabilir, geri dönülmez çevresel hasara bağlı ekolojik sonuçlar doğmadan, biyolojik düzeltme stratejilerin geliştirilmesini sağlayabilirler.

9) Değişik ekolojik seviyelerden elde edilen bilgi ile, türlere maruziyet konusunda önemli yolaklar saptanabilir. Böylece ileri koruma ve düzeltme stratejilerinin yanı sıra önemli izleme politikalarının hazırlanması sağlanabilir.

10) Laboratuarlarda yapılan toksisite biyoçalışmaları, kimyasal ve atıkların toksisiteleri hakkında göreceli bilgi vermektedir. Bu bilgilerin ekolojik ortama ekstrapolasyonu, kimyasalların karışım içindeki miktarlarının ve absorpsiyonlarının değişimi nedeniyle oldukça zorlayıcıdır veya mümkün değildir. Ek olarak, besin zinciri boyunca birikimleri, kısa dönem testlerinde görülemeyen ölümcül altı doz ve etkilerinin saptanamaması da zorlayıcı nedenler arasında sayılabilir.

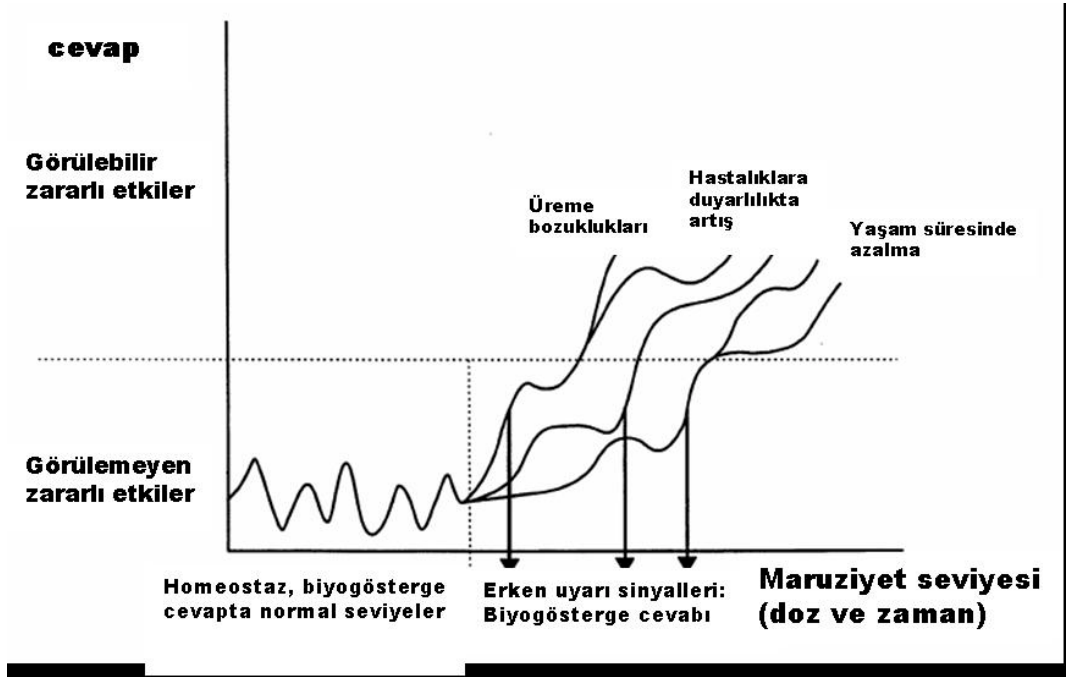
11) PAH'lar ve organofosfatlar gibi, metaboliti etkin olan kimyasallara maruziyet ile oluşacak toksik etki arasında ilişki kurulmasını sağlayabilirler.

12) Biyogöstergeler, bir çok PCB türünün, PAH'ların ve metallerin toksikolojik etkileşimleri ile ortaya çıkan kümülatif etkilerini, belirli bir organ, doku veya moleküler düzeyde ortaya koyabilirler.

13) Ölçüm düzeyinin tek kimyasalın üstünde olması ve kontaminant düzeyinin değişik dozlarının saptanabilmesi sayesinde, uzun dönem ekolojik etkileri, kısa dönem çalışmalar ile gösterebilmektedir.

14) Hem laboratuvar hem de saha çalışmaları için uygundur.

Biyogöstergelerden, kirleticilerin çevrede bulunduğu miktarlar hakkında kesin bilgiler yerine, oluşturdukları biyolojik etkiler hakkında bilgi vermesi nedeniyle yaygın olarak yararlanılır. Kirleticilerin etki mekanizmalarının anlaşılmasını sağladıkları gibi; birden çok biyogöstergenin izlenmesi, organizmanın maruz kaldığı toksikanlar ve stres hakkında çok önemli bilgiler sunar. Kirlilik stresi bir çok biyolojik cevaba yol açar ki, teoride bütün bu biyolojik cevaplar, biyogösterge olarak kullanılabilir. Belirli bir seviyenin üstünde, (kirleticinin dozu cinsinden ya da maruziyet zamanı olarak) kirleticie karşı oluşan biyogösterge cevap, stressiz durumdaki normal seviyelerinden farklılaşarak belirginleşir. Şekil 1'de de gösterildiği gibi, zaman geçtikçe ve maruziyet miktar artıkça cevabın şiddeti artar, cevapta farklılıklar ve biyolojik sistem üzerinde istenmeyen etkiler oluşur³⁷.



Şekil 1: Maruziyet seviyesine göre organizmanın biyolojik cevabındaki değişikliklerin şiddeti değişebilmektedir³⁷.

Biyogöstergeler, sağladıkları bilginin tipine göre bir kaç kategoride incelenebilir³⁸:

Maruziyetin biyogöstergesi, bir ajana maruziyetin olup olmasının ve bunun yanında metabolitlerinin, bu metabolitlerin makromoleküller ile veya kendi aralarında verdikleri katım bileşiklerinin ölçülmesini içerir.

Duyarlılığın biyogöstergesinden, maruziyet sonucu genetik nedenlerle genel popülasyondan daha yüksek riske sahip spesifik bireylerin veya diğer predispozisyonların saptanmasında yararlanır. Bunlar, spesifik bir kimyasalın detoksifikasyonunda veya aktivasyonunda yer alan spesifik enzimlerin aktivitesi veya DNA hasarının belirli tipleri için DNA onarım kapasitesi olabilir.

Etkinin biyogöstergesi, hastalıkların, karsinogenezin ve toksisitenin gelişimi sırasında erken uyarılar sağlar. Göstergeler, devam etmekte olan olaylar dizisinde, maruziyetten en son etki görülene kadar, her hangi bir zamanda ölçülebilir

Bazı biyogöstergeler bu sınırlamalar içinde kalırlar; örneğin, belli bir kimyasal ile ilişkilendirilebilen DNA katım bileşiği, metabolizma-dağılma veya kimyasalın DNA ile etkileşmesi aşamasında yani hücresel süreç sırasında meydana gelebilecek olsa da, maruziyetin göstergesi için karakteristiktir. Ama bu özelliği yüzünden bir noktaya kadar etkinin göstergesi olarak da anılabilir.

II.2. Sucul Ortamlarda Biyogöstergelerin Önemi

Yukarıda sözü edilen kimyasallar tarafından sucul çevrenin kirlenmesi ve bu çevrede oluşturdıkları biyolojik değişiklik ve hasarların belirlenmesinde sucul organizmalardan biri olan balık en fazla kullanılan tür olarak dikkati çekmektedir. Balıklar hem faz I hem faz II reaksiyonlarını gerçekleştirebilecek gerekli enzim sistemlerine sahiptirler³⁹. Her ne kadar insan ile balıklardaki biyotransformasyon reaksiyonları birbirine benzer ise de, farklılıklar kimyasalların metabolik işlenmesi sırasında ortaya çıkmaktadır. Ksenobiyotiklerin metabolizması için balıkta gerekli enzimlerin azlığı veya yokluğunun ilk kez ileri sürüldüğü 1962 yılından bu yana, özellikle petrol-yağ hidrokarbonları, kağıt hamuru fabrika pis suyu, endüstriyel ve şehir kanalizasyonu ile kontamine bölgelerden elde edilen balıklarda, artmış CYP P4501A ve bununla bağlantılı arilhidrokarbon hidroksilaz (AHH) ve/veya 7-etoksiresorufin O-deetilaz (EROD) aktiviteleri adı geçen bölgelerdeki kimyasalların yarattığı çevresel kontaminasyonun biyoizlenmesinde balıkta en çok yararlanılan biyokimyasal ölçüm yöntemleridir^{39, 40}.

Özellikle CYP1A subfamilyası karsinogenik ve mutajenik etkili PAH'lar ve poliklorlu hidrokarbonların (PCB, PCDD/F'ler, pestisitler gibi) yarattığı çevre kirliliği

sonuçlarının değerlendirilmesinde biyogösterge olarak son derece önemli bir role sahiptir^{15,41}.

Balıkların biyoindikatör tür olarak kullanımları, sucul çevredeki değişimlere oldukça yüksek duyarlılıkla tepki oluşturabildikleri ve su kirliliğinin izlenmesinde önemli bir rol oynamaları nedeniyledir. Balıkların ani ölümü yüksek derecede kirliliğe işaret ederken, ölümcül düzeyin altında kirleticilere maruziyetin oluşturduğu etkiler, balık organizmasında gözlenen biyokimyasal, fizyolojik veya histolojik değişimler yoluyla ölçülebilir⁴². Kirli olduğu düşünülen bölgede yaşayan balık popülasyonunun yaşında ve türlerin dağılımında oluşan değişiklikler, su kirliliğinin genel bir göstergesi olmakla birlikte, tek bir kirleticinin veya kirletici gruplarına karşı oluşan daha özgül cevaplar da bulunmaktadır⁴³. Aynı toksik aktivite mekanizmasına sahip spesifik bir grup kimyasal varlığında indüklenen biyokimyasal değişimler, biyokimyasal göstergeler olarak adlandırılmakta olup⁴⁴, sucul çevrede oluşmuş olan kirliliğinin izlenmesinde oldukça sık başvurulan bir yöntemdir.

II.3. Biyokimyasal göstergeler:

Ksenobiyotikler organizmaya girdikten sonra, hücre yüzeyinde veya hücre içinde sitoplazmada ya da hücre organellerinde lokalize olmuş, reseptör denilen spesifik hücresel yapılara bağlanırlar. Ksenobiyotiğin reseptörü ile bağlanması, hücre için toksik olan veya istenmeyen etkilere yol açabilecek hücresel süreçleri indükleyebilir. Makroorganizmalarda, bu tür süreçler, organları, sistemleri, organizmanın tamamını veya ait olduğu tüm popülasyonu etkileyebilmektedir⁴⁴.

Biyokimyasal göstergeler, organizmanın ksenobiyotiklere maruziyeti sonucunda oluşan ölçülebilir tepkilerdir. Genellikle spesifik olarak kimyasalın kendisine değil, bu kimyasaldan dolayı oluşan toksik aktivite mekanizmasına tepki verirler. Böylece

aynı yolla etki gösteren benzer veya heterojen ksenobiyotik gruplarının da varlığında spesifik tepki gözlemlenmektedir. Biyokimyasal göstergeler toksisitenin türünü saptarlar; hatta bir çok durumda, cevabın şiddeti kirliliğin derecesi ile orantılıdır^{37, 44}.

Biyokimyasal göstergeler toksikolojik, ekotoksikolojik ve farmakolojik çalışmalarda kullanılmaktadırlar. Çalışmaların çoğu in vitro deneyleri kapsasa da^{45, 46} sucul çevrenin konu edildiği çalışmalarda in vivo yöntemlere başvurulmuştur^{29, 47, 48}.

Biyokimyasal göstergelerin en önemli avantajı, özellikle pek çok kimyasal ya da kirleticili ajanın bir arada bulunması ile ortaya çıkabilecek kirlilik durumlarını, bu kimyasalların/kirleticilerin sinerjistik ve antagonistik etkilerinin tamamını içerecek şekilde yansıtabilmeleridir⁴⁴.

Biyozileme çalışmalarında metabolizma enzimlerinin ölçümü oldukça sık kullanılan bir yöntem olup, sitokrom P450'lerin ölçümü çalışmalarda başı çekmektedir⁴⁴. Çevresel kirleticilere maruz kalan/kalmış hayvanlarda, çevresel kontaminasyonun potansiyel indikatörü olarak, detoksifikasyonda görev alan enzimlerin seviyesinin ölçümü, pratik ve mantıksal olarak oldukça uygun görülmektedir. Çünkü, ilk olarak, bir çok lipofilik kimyasalın biyoakümülyasyona uğradığı ana organ/bölge hepatik dokular olup, bu organda meydana gelen değişimler, enzim seviyelerinin, ölçülebilmesi yoluyla gerçekleştirilebilir⁴⁹. İkinci olarak, nispeten yüksek olan sorumlu enzimlerin düzeylerinin saptanabilirliğidir. Üçüncü olarak, bu enzim sistemleri (genel olarak sitokrom P450'ler) bir çok çeşit çevresel kontaminant tarafından yüksek derece de indüklenebilirler. Son olarak da, bu enzimler, bir çok çevresel toksikanın metabolizmasından sorumlu olduğu için, bunların indüksiyonu, bu tür ajanlara tekrarlanan maruziyetine duyarlılığı gösterebilmektedir⁴⁹.

Biyogöstergeler, bir çok çalışmacının, petrokimyasallara, polihalojenlenmiş aromatik hidrokarbonlara, 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin gibi çeşitli

düzeylelerdeki kontaminantlara, kemirgenler, balıklar, kuşlar ve insan gibi çeşitli türlerde, çevresel maruziyetin araştırılmasında kullanılmakta olup^{10, 50, 51, 52}, tüm dünyada, sucul çevrede bulunan kirleticilere karşı organizmanın oluşturduğu cevabın sitokrom P450 seviyeleri cinsinden ölçülmesi bir çok çalışma ile ortaya konmuştur^{53, 54, 55}.

II.4. Sitokrom P450'ler

Yaban hayattaki canlılar sadece insan aktiviteleri sonucu ortaya çıkan kimyasallar ile değil, doğal organik kimyasallarla da yüzyıllardır mücadele etmektedirler. Bakterilerin, mantarların, alglerin ve bitkilerin, kendi aralarında yarışma ve kendilerini tüketen/yiyen canlılardan korunmak amacıyla doğal organik toksikanları üretmek zorunda olduğu bilinmektedir⁵⁶. Buna ek olarak PAH'lar gibi kimyasal yapılar, organik maddelerin yanmaları (örneğin ormanlar ve yeşil alanların yanması) dolayısıyla ortaya çıkan bileşikler olup, binlerce yıldır başta sucul sistemler olmak üzere yaban hayata doğal yollarla ulaşabilmektedirler⁵⁶.

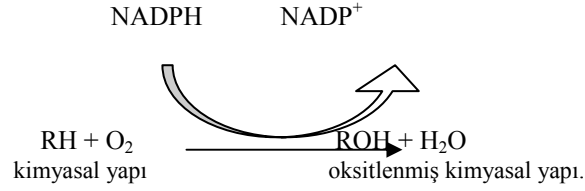
Başta içinde yaşadığımız yüzyıl olmak üzere son birkaç yüzyıldır insanoğlu, pek çok sayıdaki kimyasalı üretip isteyerek veya istemeyerek çevreye bırakmaya başlamıştır. Bu kimyasallardan bazıları, doğal ksenobiyotiklere benzer yapıda olup kolaylıkla biyotransformasyona uğrayabilirken bazıları da, örneğin, organik klorlu pestisitler, poliklorlu bifeniller (PCB'ler), doğal yapılara benzemezler. Dolayısıyla, bu tür bileşiklerin enzimatik transformasyona göreceli rezistansları, günümüzde biyosferde olan artık miktarlarının açıklaması olarak karşımıza çıkmaktadır⁵⁶. Bu tür, metabolizmaya dirençli bileşikler, trigliserit depoları gibi yağca zengin dokularda birikme eğilimindedirler. Biyotransforme olabilen türler ise, suda çözünebilir metabolitlerine dönüştürülüp, ana bileşiğin yıkımı sağlanabilmektedir. Her ne kadar biyotransformasyon detoksifikasyon yolağı olarak anılsa da, enzimatik transformasyon sonucu bileşiğin toksisitesinin (karsinojenitesinin de) arttığı durumlara bir çok örnek bulunabilir⁵⁶.

Biyotransformasyon çoğunlukla 2 fazdan oluşur. İlk aşama, Faz I, daha çok oksidasyon basamağı olup, hidroksil grupları polar fonksiyonel grupların, lipofilik kirleticilere, daha hidrofilik yapmak amacıyla sunulmasıdır. Faz II'de ise, Faz I'de oluşan metabolitlerin hücrede, şeker türevleri, peptidler veya sülfatlar gibi doğal olarak oluşan endojen bileşikler ile kovalan bağlanması yer almaktadır. Bu reaksiyonlar genellikle, nontoksik, iyonize olabilen ve kolaylıkla atılabilen, oldukça suda çözünebilir ürünler ile sonuçlanır⁴⁴.

İlk aşama olan Faz I reaksiyonları için en önemli oksidasyon enzimleri “Karma Fonksiyonlu Oksidazlar” olarak da bilinen sitokrom P450'lerdir⁵⁷. Sitokrom kelimesi pek uygun olmamakla birlikte ilk zamanlarda, hem prostetik gruplu fakat hem enzimi olmayan elektron transport proteinlerini tanımlamak için kullanılmıştır⁵⁷. P450 ve monoksijenaz sisteminde görevli diğer enzimler, özellikle düzgün yüzeyli endoplasmik retikulumda lokalize olup, membrana bağımlı proteinlerdir. İzolasyon prosedürlerinde, endoplasmik retikulum mikrozom adı verilen membran vesikülleri şeklinde elde edilir. Çoğu zaman karşılaşılan mikrozomal P450 teriminin kullanımı buradan gelmektedir. Sitokromlar, karaciğerde yüksek düzeylerde, hepatositlerin kütlece %1-2'si oranda bulunurlar⁵⁷. Bunun dışında bağırsak, böbrek, akciğer, beyin, deri, prostat bezleri ve plasenta gibi karaciğer dışı dokularda da bulunurlar²⁵. Sitokrom P450'ler tanımlandığı 1948 yılından günümüze kadar 1000'inin üzerinde isoformu izole edilmiştir⁵⁶.

Sitokrom P450 (veya P450) elektron transportunda görev alan “hem” içeren proteindir. Hem'deki demir redükte/indirgenmiş halde (Fe^{+2}) iken, P450'ler, karbon monoksitide bağlanıp 450nm dalga boyunda en yüksek dalga boyunu verirler. Bu spektral özellik yalnız P450'nin bütün/bozulmamış ve katalitik fonksiyonu mevcut halde ortaya çıkar. P ön harfi, endoplasmik retikulumda yapılan kırmızı pigmentler hakkındaki ilk

Çalışmalardan gelmektedir. P450'ler genellikle Şekil 2'de verilen hidroksilasyon reaksiyonu basamağını izlerler⁵⁶.



Şekil 2: Sitokrom P450'ler tarafından gerçekleştirilen tipik bir reaksiyon örneği^{44, 56, 57}.
(R burada ksenobiyotikler (pestisit, kimyasal vs) gibi substratı ifade etmektedir.)

Hidroksilasyona ek olarak, P450 bağımlı monoksijenazlar, epoksidasyon, dealkilasyon, deaminasyon, sulfoksidasyon ve desülfirasyonun da dahil olduğu bir çok diğer reaksiyonu da katalizlerler⁵⁶. Bu enzim ailesi yalnız yabancı kimyasalların metabolizmasında yer almanın dışında, steroid hormonları, prostaglandinler, safra tuzları ve yağ asitlerinin metabolizmasında da yer alırlar⁴⁴.

Tablo 1: Sitokrom P450 bağımlı monoksijenaz sistemi tarafından metabolize edilen bileşiklere örnekler:

<i>Polisiklik aromatik hidrokarbonlar</i>
<i>Aromatik aminler</i>
<i>Aromatik amidler</i>
<i>Pestisitler (bir çoğu)</i>
<i>Azo bileşikleri</i>
<i>Flavonoidler</i>
<i>İlaçlar ve diğer kimyasallar</i>
<i>Endojen substratlar</i>
<i>Prostaglandinler</i>
<i>Steroid hormonları</i>
<i>Yağ asitleri</i>
<i>Safra asitleri</i>

Memelilerde ve balıklarda yer alan, endoplasmik retikulum sitokromları substrat spesifik değildirler. Her bir isoform, bir çok bileşiğin metabolizmasına katılabilir. Bunun yanında bir substrat da, bir çok sitokrom isoformu tarafından metabolize edilebilir. Ama yine de neredeyse her isoformun tanımlanmasında kullanılabilecek özel bir substratı bulunmaktadır⁵⁷. Buna karşın bakteriyel ve mitokondriyal sitokrom P450 isoformları oldukça yüksek substrat seçicidir⁵⁷. Tablo 2’de bazı P450 alt ailelerinin özgül indükleyicileri ve onların tanımlanmasında da kullanılabilecek özel katalitik aktivite örnekleri verilmiştir.

Tablo 2: Özgül indükleyicileri ve ölçümde kullanılan model katalitik aktiviteleri ile bazı P450 alt aileleri¹.

P-450 (CYP) alt ailesi	Özgül indükleyici	Prototip aktiviteleri
1A	Aromatik hidrokarbonlar, β -naftoflavon, klorlu dibenzo- <i>p</i> -dioksinler ve dibenzofuranlar, bazı (düzlemsel) PCBler	EROD, AHH, ECOD
2B	Fenobarbital, bazı (düzlemsel olmayan) PCBler	PROD, EMND, APND, AE
3A	Pregnenolon-16 α -karbonitril glukokortikoidler	EMND, T6H
4A	Klofibrat, ftalat esterleri, 2,4,5-T	FAH

EROD: 7-etoksiresorufin O-deetilaz; AHH: aril hidrokarbon hidroksilaz; ECOD: 7-etoksikumarin O-deetilaz; PROD: pentoksiresorufin O-dealkilaz; EMND: etilmorfin N-demetilaz; APND: aminopiren N-demetilaz; AE: aldrin epoksidaz; T6H: testosteron 6 β -hidroksilaz; FAH: yağ asidi ω -hidroksilaz.

P450'lerin katalizlediği reaksiyonlar için birkaç bileşene ihtiyaç vardır; bu bileşenler bir arada, sitokrom P450 monoksijenaz sistemini oluştururlar. Bu bileşenler Tablo 3'de gösterilmiştir. Bu sistem aynı zamanda karma fonksiyonlu oksidazlar(KFO) veya oksijenazlar olarak da bilinmektedir. KFO sistemi, 2 ana enzimden, sitokrom P450 ve NADPH-sitokrom P450 redüktazdan oluşmaktadır. Bazı monoksijenasyon reaksiyonlarında sitokrom b_5 ve NADH-sitokrom b_5 redüktaz da dahil olabilmektedir⁵⁸. Diğer gerekli bileşenler NADPH, fosfolipid ve O_2 'dir. Redüktazlar, ksenobiyotiğin oksidasyonu sırasında, elektronların NADPH'dan (NADH-sitokrom b_5 redüktazın kullanıldığı durumda NADH)sitokrom P450'ye aktarılmasında görev almaktadırlar. Diğer bir deyişle, bu bileşenler monoksijenaz döngüsünü, bir moleküler oksijen atomunu (O_2) ksenobiyotiğe aktarıp, bileşiği suda daha çok çözünür hale getirerek işlev görmektedirler.

Şekil 3'de, bir ksenobiyotiğin sitokrom P450'ler tarafından monoksijenasyon basamakları özetlenmiştir.

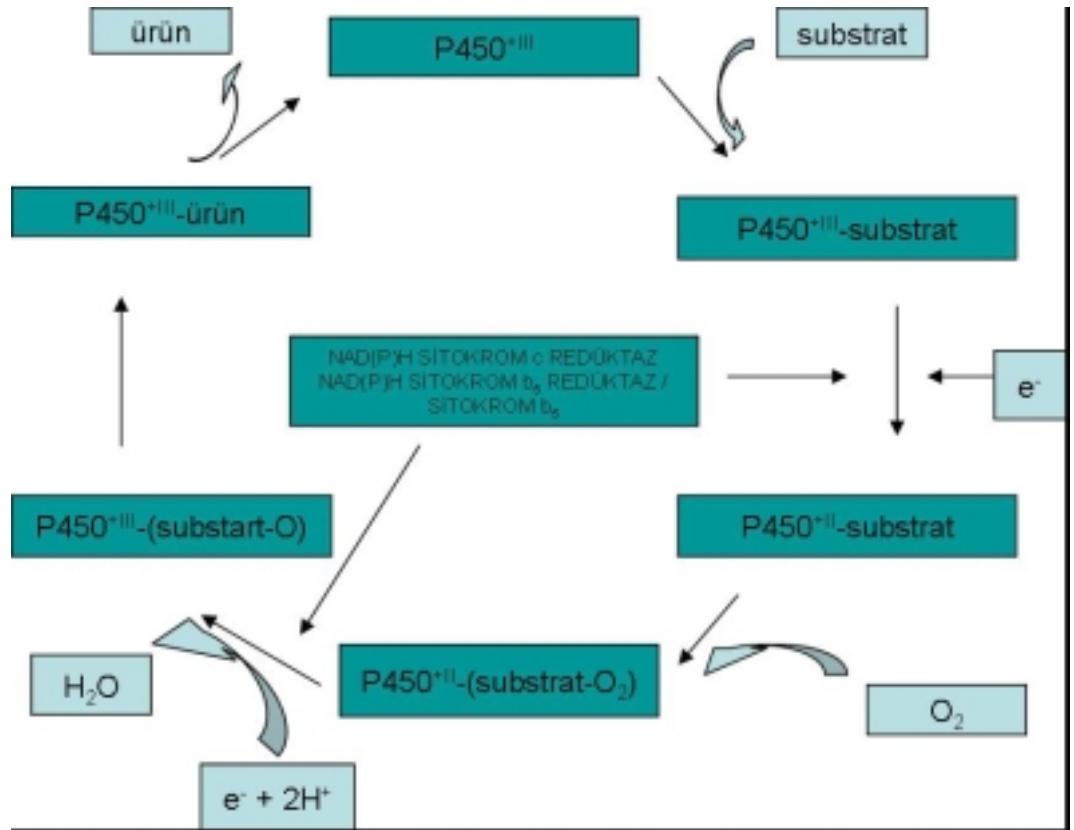
Tablo 3: Monoksijenaz sisteminin bileşenleri⁵⁶:

Sitokrom P450 ^a
NADPH-sitokrom P450 redüktaz
NADH-sitokrom b ₅ redüktaz ^b
Fosfolipid membran
NADPH
NADH ^b
O ₂

^a: bir çok enzimden oluşan bir ailedir.

^b: bazı reaksiyonlara katılabilir.

Şekil 3: Bir ksenobiyotiğin sitokrom P450 tarafından monoksijenasyon basamakları^{44, 57}.



II.4.1 Sitokrom P450'lerin Sınıflandırılması ve Adlandırılması

Günümüzde sitokrom P450'ler omurgalı ve omurgasız hayvanlar, bitkiler ve bakterileri de içeren ökaryot ve prokaryot organizmalarda bulunmakta olup, Mayıs 2006 itibariyle toplam 6008 farklı sitokrom P450 dizisi (2255 hayvan, 205 basit yapılı ökaryot, 1918 bitki, 629 bakteri ve 1001 mantar), rapor edilmiştir⁵⁹.

Sitokrom P450'lerin birçok reaksiyonu katalizlenmelerinden dolayı enzimlerin isimlendirilmesindeki sıradan metot yetersiz kalmıştır ve yapısal homolojiye dayanan sistematik bir adlandırma geliştirilmiştir^{60, 61}. Bu sistemde her bir sitokrom P450 için belirli aileyi tanımlamak için rakamlar verilmiştir. Bunu, alt aileyi belirlemek için büyük harflerin kullanılması izler ve bir diğer rakam özgün P450 formunu göstermek için kullanılır. Örnek olarak 1A2 ve 2E1 verilebilir. CYP terimi ise sitokromun "cytochrome" ilk iki harfini ve P450'nin ilk harfini temsil eder. Bu terim bir gen ya da Sitokrom P450 gibi bir proteinin başlangıcının dizaynı için kullanılır. Bu adlandırma sisteminde sitokrom P450 1A2 ve 2E1 CYP1A2 ve CYP2E1 olarak gösterilir. Aynı ailenin üyeleri en az %40 homolog aminoasit dizisini paylaşır ve aynı alt ailenin üyeleri en az %55 homolog diziyi paylaşır^{62, 63}.

Bugüne kadar hem memelilerden hem balıklardan bir çok P-450 geni sekansı ortaya çıkarılmıştır. Örneğin alabalığın (*Oncorhynchus mykiss*) CYP1A1 gen sekansı memeli gen dizilimlerine benzerliği, diğer gen dizilim benzerliklerine nazaran oldukça fazladır. CYP1A2 için benzerlik oranı %51-53 iken CYP1A1 formunda %57-59 amino asit benzerliği vardır. Bu gen diziliminin, memelilerin oluşum yolunda, balık ve omurgalıların birbirlerinde ayrıldığı 350 milyon yıl önceden beri korunuyor olması, katalitik fonksiyonun ve/veya yapısının önemini ortaya koymaktadır¹.

KFO sistemi bir kimyasalı daha az ya da çok toksik hale getirebilir. Doğal substratlarda dahil olmak üzere, bazı kimyasallara maruziyet sonucunda sitokrom P450'lerin belli tipleri indüklenebilir. İndüksiyon, P450'nin kodlanmasından sorumlu mRNA'nın transkripsiyonun ve translasyonundaki artıştan kaynaklanmaktadır. Örneğin CYP1A'nın balıklarda en önemli indükleyicileri arasında PAH'lar, nitratlanmış poliaromatik hidrokarbonlar (NPAH'lar), PCB'ler, poliklorlu dibenzo dioksinler ve furanlar (PCDD/F) ve bazı pestisitler gelmekte olup bu bileşikler sucul çevrenin kirlenmesinden sorumlu en önemli bileşikler olarak gösterilmektedir⁶⁴.

II.5. MFÖ Enzim indüksiyonunun toksikolojik önemi:

Karma Fonksiyonlu Oksidazların (KFO'ların) ana görevleri olan detoksifikasyonun yanı sıra, bir çok toksik ve karsinojenik bileşiğin toksisitesini, kimyasal olarak toksik olan reaktif/etkin türlere çevriminden de sorumlu oldukları anlaşılmıştır⁶⁵. Örnek olarak hidrokarbonlar ve aromatik aminlerin yanı sıra, ilaç örneği olarak da parasetamol verilebilir. Organ ya da organizma seviyesinde toksisitenin görülmesi ve şiddeti, kimyasalın tipi ve şiddeti, oluşan-görevli MFO enzimlerinin tipleri, ve diğer konjugasyon enzimleri ile biyokimyasallar gibi bazı faktörlere bağlıdır. Bu nedenden dolayı, toksisitenin ortaya çıktığı durumların, kronik indüksiyon ve kimyasalların görece yüksek seviyelerine maruz kalınması ile ilişkili olduğu bilinmelidir⁶⁵. Örneğin sigara içimi yüksek derecede PAH ve benzeri kimyasallara maruziyete neden olmaktadır ve insanlarda yapılan klinik çalışmalar, yüksek indüklenebilme özelliği olanlarda, sigaraya bağlı karsinogenez riskinin daha yüksek olduğunu ortaya koymaktadır⁶⁶. Benzer olarak, yüksek etanol seviyeleri MFO enzimlerini indükleyebilir⁶⁷ ve yüksek etanol tüketimi, toksik aldehit metabolitlerinin artması nedeniyle karaciğer hasarı oluşturabilmektedir.

Benzer olarak, çeşitli hidrokarbonlar ile yüksek seviyede çevresel kirlenmenin görüldüğü sediment ve sularda, KFO indüklenmesi ile toksisite arasında bağ

kurulabilmektedir. Laboratuar çalışmalarının da, petrol hidrokarbonlarının potent mutajenleri içermekte olduğunu ve bunların, balık ve fare karaciğer enzimleri tarafından aktive edilebildiğini göstermişlerdir⁶⁸. Amerikanın batı sahillerinde yer alan Puget Sound'da uzun süredir yapılan saha çalışmalarında da, yüksek oranda hidrokarbon kirliliği olan bölgelerden toplanan balıklarda, yüksek seviyede neoplazmalar görülmekte olup⁶⁹ araştırmacılar, PAH'lara ve sediment ekstraktlarına bağlı hücresel toksisitenin görülmesi için MFO aktivasyonu gerektiğini saptamışlardır^{70, 71}.

Karsinojen olarak tanımlanan bir çok kimyasal, bu biyolojik etkilerini göstermek için metabolik aktivasyona ihtiyaç duymaktadır. Bu aktivasyon sitokrom P450 oksidazlar (faz I) ile yürütülmekte olup, aktiveleşen moleküller elektrofilik özellik kazanıp, hücresel DNA ile kovalan katım bileşikleri verecek hale gelebilirler. Guanin, alkilleyici veya büyük polisiklik aromatik ajanların DNA'ya bağlanmada kullandığı ana hedef yapılardan biridir. Balıklarda bu tür metabolik değişimleri gerçekleştirebildikleri gösterilmiştir⁷².

Sitokrom P450'ler, karsinojenlerin yanı sıra steroidler gibi endojen bileşiklerinde dahil olduğu sayısız eksojen çevresel kirletici molekülün metabolizmasında rol oynarlar⁷³. Doğal olmayan fakat bu yapıdaki indükleyici kimyasalların hayvanlarda kritik biyolojik fonksiyonları etkileyebilme potansiyelleri ekolojik sistem açısından oldukça önemlidir⁶⁵. Sitokrom P450 monoksijenaz sisteminin hidroksillemediği substratların çeşitliliği, bir çok katalitik ölçüm tekniği tarafından ölçülebilmektedir. Reaksiyonların izlenmesi için en güvenilir yol olarak, ürün oluşum izlemesi uygun olup; bu amaçla kullanılabilen kesintisiz ölçüm yapabilen test yöntemleri sayıca azdır: Etoksikumarin o-deetilaz (ECOD), p-nitrofenol o-deetilaz (NPOD), p-nitroanisol o-deetilaz (NAOD). Belirtilen bu test yöntemleri, nonspesifik substrat seçicilik özellikte olup, etoksiresorufin o-deetilaz (EROD) aktivitesi bu özellik dışında davranıp, ölçüm yöntemleri arasında ayrıcalıklı durumdadır⁷³.

II.6. EROD Aktivitesi Ölçümü

Etoksiresorufin O-deetilaz (EROD) aktivitesi ölçümü, balıklarda polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH'lar), poliklorlu bifeniller (PCB'ler) ve poliklorlu dibenzodioxinler/furanlar (PCDD/F'ler) ile yapısal olarak benzer kimyasallara maruziyetin iyi tanımlanmış bir in vivo biyogöstergesi olduğu kabul edilmektedir^{74, 75}. EROD aktivitesi sitokrom P450 bağımlı monoksijenazların (özellikle CYP1A alt familyası ile) ksenobiyotikler tarafından reseptör aracılıklı indüksiyonu hakkında kanıtlar sunduğu için balıklarda, ilgili kimyasal veya kimyasallara maruziyetin yüksek derece hassas bir indikatörü olarak uzun süredir yaygın olarak kullanılmaktadır¹⁵.

Sözü edilen kimyasalların detoksifikasyonunda yer alan *P-450 1A1* indüksiyonu yani enzim miktarı ve aktivitesindeki artış, bu proteini DNA'da kodlayan *CYP1A1* gen bölgesinin aktivasyonunu, aktive olan bölgeden proteini oluşturacak şekilde hücresel olayları (gen transkripsiyonu ve mRNA'nın proteine translasyonu) ve bu proteine enzimsel katalitik aktivitenin oluşturulması için gerekli posttranskripsiyonel modifikasyonları (hem sokulması da dahil) içeren bazı basamaklardan oluşmaktadır. Süreçteki her bir basamak, uygun moleküler probun (cDNA veya antikor) veya katalitik ölçüm yönteminin (örneğin 7-etoksiresorufin O-deetilaz, EROD) kullanılması ile çalışılabilirken¹, EROD yöntemi ölçüm maliyetlerinin oldukça düşük ve hızlı sonuç vermesi, bunun yanında çok fazla örnekle çalışılmasının yolunu açıp, araştırılan kirleticilerin oluşturduğu etkiler hakkında geniş çaplı sonuç vermesi nedeniyle tercih edilmektedir¹⁵.

Düzy	İsimlendirme	Gösterge
DNA	→ <i>CYP1A1</i>	
mRNA	→ CYP1A1	DNA probu
protein	→ P450 1A1	antikor
enzim	→ EROD	katalitik analiz

Şekil 4: CYP1A1 indüksiyonunda DNA gen diziliminden enzim miktarına kadar yer alan basamaklar ve her basamağa uygun ölçüm metodu¹. (DNA *CYP1A1* gen bölgesinin aktivasyonu ve transkripsiyonu ile başlayan indüksiyon miktarı, proteine translasyona uğrayan mRNA üzerinden, hepatositlerde bulunan P450 1A1 proteinine geliştirilen antikor ile ve P450 1A1 miktarına bağlı gözlenen katalitik aktivitenin kantitatif EROD analizi ile ölçülebilir.)

EROD aktivitesi ile kimyasallar arasındaki ilişki bugün için dünya yüzeyinde 150'den fazla balık türünde incelenmiştir (Tablo 5). Bu çalışmalarda PAH, PCB, PCDD/F'lerin yanı sıra bir çok kimyasalın gerek tek başlarına gerekse çevrede oluşturdukları kompleks karışımları EROD indüksiyonu oluşturmaları açısından araştırılmıştır¹⁵. Bu çalışmalar sonucunda EROD aktivitesi, balıklarda kirleticilere bağlı indüksiyon cevabın saptanmasında en hassas katalitik problardan biri olduğu saptanmıştır. Tablo 4'de de görülebileceği gibi bu çalışmalarda, özellikle PAH tipi indükleyici kimyasallara maruziyette, balık türlerinde bu aktivitenin yükseldiği, kontamine olmayan temiz bölgelerden sağlanan balıklarda ise çok düşük düzeyde veya hiç saptanamayacak düzeyde kaldığı belirlenmiştir.

Tablo 4: Benzo-a-piren ve β -naftoflavona maruz kalan levreklerin (*Dicentrarchus labrax*) EROD aktivitesindeki artış kontrol balıkları ile kıyaslanmıştır⁷⁶

Uygulama	Gözlenen EROD Aktivitesi
Kontrol	0.20 $\pm$ 0.06
Benzo-a-piren	0.83 $\pm$ 0.20*
B-naftoflavon	2.98 $\pm$ 0.43*
* p$\leq$0.05	

Balıklarda EROD indükleyici kontaminantlara maruziyette görülen zararlı etkilerle, CYP1A indüksiyonu mekanizmasının yakın ilgili olduğu anlaşılmıştır⁷⁷. CYP1A enzim sisteminin indüksiyonunu, aktivitenin katalitik ölçümü yoluyla gösteren EROD, bütün bu yapılan çalışmalar sonucu, çevresel kirleticilere (PHH ve PAH gibi) maruziyetin izlenmesinde iyi bir araç olarak görüldüğü gibi, doza bağımlı cevap oluşturabilmekte, ölçülen katalitik aktivitenin şiddeti, maruziyetin süresi ve kimyasalın gücüne göre şekillenmektedir¹⁵.

Tablo 5: Çeşitli kimyasalların EROD aktivitesini indükleme güçleri, bir çok balık türünde incelenmiştir¹⁵.

Kimyasal	İndüksiyon Gücü (*)	Tür
Benzo(a)piren	orta	Yılanbalığı
	orta	Gizzard shad
	güçlü	Mirror carp
	zayıf	Channel catfish
	zayıf, güçlü	Alabalık
	orta	Arctic char
	zayıf	Poeciliopsis lucida
	zayıf, orta	European sea bass
	zayıf, orta, güçlü	Bluegill
	orta	Sunfish hybrid
	zayıf	Gilthead seabream
	orta	Pagothenia bernacchi
	orta	Flounder
	zayıf	Hardhead seafish
Ham petrol	zayıf	Pacific herring
	zayıf	Polar cod
	orta	Viviparous blenny
Floranten	zayıf	Mirror carp
İsosafrol	zayıf, orta	Alabalık
	orta	European plaice
3-metil kolantren	orta	Common carp
	zayıf	Fathead minnow
	zayıf, orta	Channel catfish
	orta	Alabalık
	zayıf, orta	Gulf killifish
	zayıf	Sheephead minnow
	orta	European sea bass
	orta	Nile tilapia
	zayıf, orta, güçlü	Tilapia hybrid
	orta	Sheepshead
	orta	Scup
	güçlü	Red drum
	güçlü	Stripped mullet

	orta zayıf, orta	Dab European plaice
B-naftaflavon	zayıf zayıf zayıf, orta zayıf zayıf orta, güçlü	Common carp Roach Brown bullhead Channel catfish Northern pike Alabalık
Aroklor 1242	zayıf, orta	Alabalık
Aroklor 1254	zayıf, orta zayıf, orta orta zayıf zayıf orta zayıf, orta zayıf zayıf	Common carp Channel catfish Alabalık Brook trout Mummichog Nile Tilapia Tilapia hybrid Gilthead seabream Cliff flathead
Aroklor 1260	orta	Pagothenia bernacchi
Clophen A40	zayıf	Dab
Clophen A50	orta zayıf orta zayıf	Alabalık River perch Tilapia Flounder
Aroklor 5432	zayıf	Mummichog
Aroklor 5460	zayıf	Mummichog
2,3,7,8-TCDD	güçlü orta, güçlü zayıf zayıf, orta orta	Mirror carp Alabalık Atlantic cod Mummichog European flounder
1,2,3,7,8-PCDD	güçlü	Mirror carp
1,2,3,6,7,8-HCDD	güçlü	Mirror carp
1,2,3,4,5,6,7,8-OCDD	orta	Mirror carp

*: İndüksiyon gücü: 10 katın altı zayıf indüksiyon; 10 ile 100 kat arası orta indüksiyon; 100

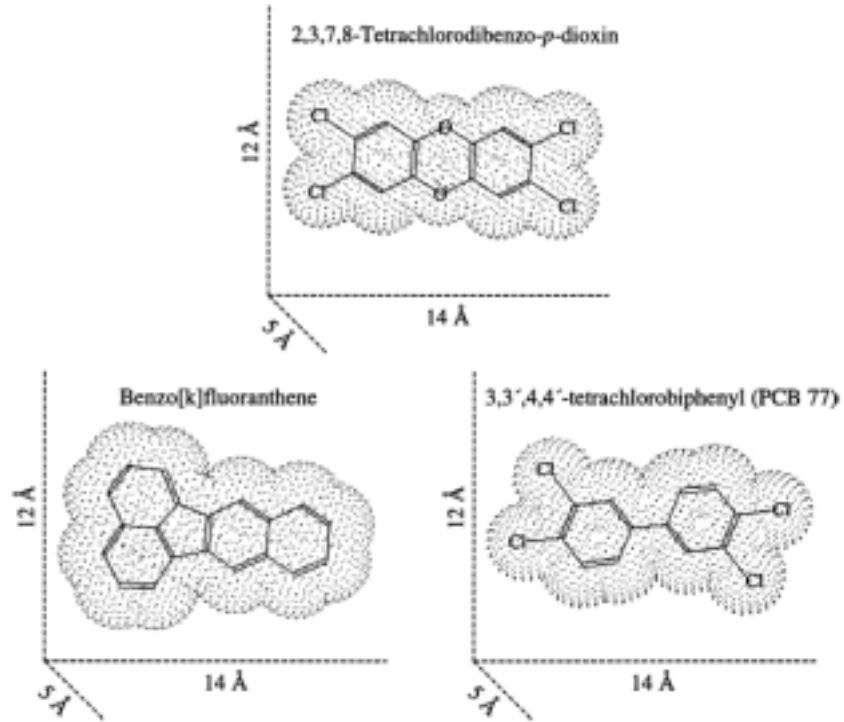
katın üstü güçlü indüksiyonu göstermektedir.

II.7. CYP1A İndüksiyonunun Mekanizması

CYP1A'nın (ve katalitik aktive ölçüm metodu olan EROD'un) biyoizleme amaçlı kullanılmasını sağlayan en önemli özelliği, kimyasal maruziyeti sonucunda hücrelerde artan üretimi, yani indüklenebilmesidir. Yukarıda da sözü edildiği gibi CYP1A aktiviteleri genellikle kontrol balıkları ile kirliliğe maruz kalmamış balıklarda tespit edilemezken, kısmi halojenlenmiş düzlemsel hidrokarbonlara ve polisiklik aromatik hidrokarbonlara maruziyetten sonra miktarların arttığı saptanmıştır⁷⁸. Bu enzimin kimyasal maruziyeti sonucunda indüksiyonuna neden olan faktörler memelilerde ayrıntılı olarak araştırılmış olup, balıklarda da aynı mekanizmanın işlediğine inanılmaktadır⁷⁹. CYP1A'nın indüksiyonu, ksenobiyotiklerin sitozolik aril hidrokarbon reseptörüne (AhR) bağlanması ile yürütülmektedir (Şekil 6). Mekanizma aydınlatılana kadar seneler boyunca, AhR için endojen spesifik bir ligandın varlığı bulunmaya çalışılmıştır. Daha sonra proteinlere sokulan hem yapısının degradasyon ürünleri olan bilirubin ve daha ileri ürün olan biliverdinin, AhR'ye tam olarak bağlandığı ve AhR bağlantılı genlerin ekspresyonunu aktive ettiği bulunmuştur⁸⁰. Araştırmacılar, AhR'nin "karmaşık" bir yapısı olduğunu ve ayrıca, başka endojen aktivatörlerin (triptamin ve indol asetik asit gibi) varlığını da saptamış olup, memeli kültür hücrelerinde AhR'nin doğal bir aktivatörünün aynı zamanda CYP1A için de endojen bir ligand olduğunu da göstermişlerdir⁸¹. Endojen AhR ligandlarının özelliklerinin ve CYP1A'nın, onların regülasyonlarındaki görevlerinin tanımlanması, AhR ligandı olan eksojen maddelerin oluşturduğu toksik etkilerin açıklanmasında oldukça önemli olmuştur¹⁵.

AhR, hem in vivo hem de in vitro olarak, bir çok balık türünde tespit edilmiş olup, mekanizmanın hem memelilerde hem de balıklarda benzer/ortak gerçekleştiğini ortaya koymaktadır. AhR ligandları izosterik konfigürasyona sahip olan, CYP1A için model bir indükleyici olan 2,3,7,8,-tetraklorodibenzo-p-dioksin (2,3,7,8,-

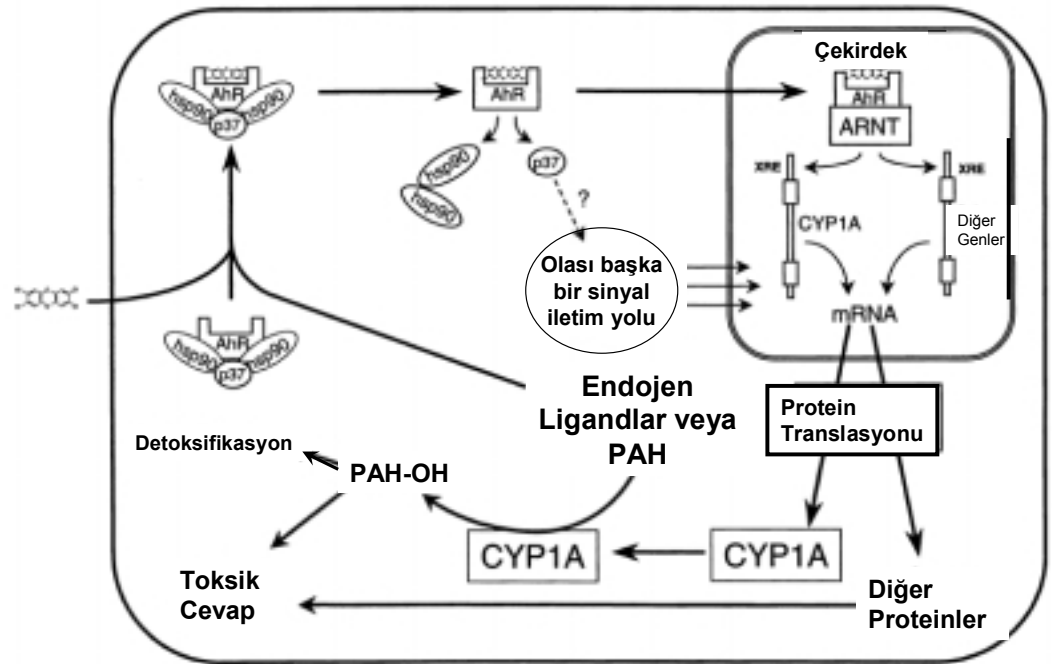
TCDD)'e yapıca benzerdirler^{15, 57} (Şekil 5). AhR bağlanmaya tam olarak özgü kimyasalları sınıflandırmak için bir çok çalışma yapılmıştır. 3 boyutlu yapılandırma çalışmaları ile radyo işaretli ligandlara yarışmalı bağlanma çalışmaları⁸², AhR'ye bağlamak için molekülün 12Å⁰ x 14Å⁰ x 5Å⁰ 3 boyutlu yapısının bulunması gerektiğini ortaya koymuştur. Moleküler geometri potansiyel olarak AhR'ye bağlanmak için ana şart olsa da, hidrofobite, elektron kabul etme kapasitesi, molekülün polarlanabilme özelliği gibi fizikokimyasal özellikleri de önem taşımaktadır¹⁵.



Şekil 5: AhR bağlanma bölgesine bağlanabilme özelliği olan AhR ligandlarının yapısal gösterimi¹⁵. (AhR'ye bağlamak için molekülün 12Å⁰ x 14Å⁰ x 5Å⁰ 3 boyutlu yapısının bulunması gerektiği ortaya konulmuştur)

AhR'nin diğer bazı proteinlerle beraber bulunduğu saptanmıştır; bunlar dimerik formda 90-kDa'lık ısı şok proteini hsp-90 ile, bir c-Src tirozin kinaz proteini, p37'dir⁵⁷. Ligandın bağlanmasından sonra hsp90 ve p37'nin ayrılmasını ve böylece

AhR'nin görevli diğer bir protein olan aril hidrokarbon nükleer translokasyon proteinine (ARNT) bağlanmasını içeren bir aktivasyon basamağı yer almaktadır^{15, 57} (Şekil 6). AhR, ligandın bağlanması ile aktive olan bir transkripsiyon faktörü olup, dioksin sorumlu element olarak (DRE, dioxin responsive elements) adlandırılan, DNA'nın spesifik kısımlarına bağlanmaktadır. Bu bağlanma, Ah-gen bataryası olarak bilinen bazı/birkaç genin transkripsiyonunu ve buna bağlı olarak proteinlerin sentezlerini başlatmaktadır. Bunlar arasında CYP1A, CYP1B, glutatyon S-transferaz, UDP-glukroniltransferaz, NAD(P)H:kinin oksidoredüktaz (DT-diaforaz) ve aldehid dehidrogenaz bulunmaktadır¹⁵.



Şekil 6: AhR bağlantılı toksisite için öngörülen mekanizma özetlenmiştir.

AhR'ye bağlanabilen ligandların oluşturduğu sinyal AhR aracılığıyla yürütülmekte olup, çekirdekte aril hidrokarbon nükleer transkripsiyon proteini (ARNT) ile birlikte transkripsiyon faktörünü oluşturur. Bu yapı, dioksin sorumlu element olarak bilinen (DRE) spesifik DNA sekansına bağlanıp, bir çok genin indüksiyonuna (Ah gen bataryası) ve sonuç olarak bir çok proteinin/enzimin üretimine yol açar^{15, 57}.

II.8. AhR Bağlantılı Toksisitenin Mekanizması

Bazı PAH ve PCB'ler ile benzer yapısal özellik gösteren kimyasalların toksik etkilerini AhR yoluyla, indüklenen proteinlerin hücresel homeostazi bozmaları/değiştirmeleri nedeniyle gösterdikleri bilinmektedir⁸³. Ah gen bataryasının indüksiyonu, elektrofilik metabolitlerin ve oksijen radikallerin üretimi, ksenobiyotik metabolizmasında kapasitenin azalması ve endojen substrat metabolizmasının işleyişinde değışiklikleri kapsayan bir çok moleküler olay ile bağlantılıdır⁷⁸. Memelilerde, bu moleküler değışikliklerin gecikmiş ya da ikincil etkileri arasında tükenme sendromu, tümör promosyonu, timik atrofi de yer almaktadır⁸⁴. Balıklarda, yaşamın erken safhaları AhR ligandların etkilerine daha hassas olduğu görülmekte olup, son çalışmalar toksik cevapta P450 enzimlerinin dahil olduğunu göstermektedir⁷⁷.

AhR agonistik kimyasallara örnek verecek olursak, PAH'lar (örneğin benzo(a)piren) daha çok AhR nedenli sitokrom P450, özellikle de CYP1A formları ile, mutajenik/karsinojenik reaktif ara metabolitlere metabolize edilirler. PAH'larla kontamine su ve sedimentlere uzun dönem maruziyet(özellikle 4 ve 5 aromatik halkalı) birçok tatlı su, deniz suyu balık türünde deri ve karaciğer tümörleri ile ilişkilendirilmektedir. Laboratuarda alabalıklarla yapılan çalışmalar, diyetle BaP maruziyetinin, birkaç sene içinde karaciğer tümörleri oluşturduğunu ortaya koymaktadır⁸⁶. BaP'ın balıklarda yarattığı başka etkileri de rapor edilmiş olup, ip 5 mg/kg Benzo-a-piren (BaP) maruziyeti, *Oreochromis niloticus*'da apoptotik hücrelerin oluşmasına ve dolaşımdaki lenfositlerin sayısının azalmasına yol açmaktadır⁸⁷.

PAH'lar, CYP1A indüksiyonunda ve AhR bağlı toksik etkilerin oluşmasında etkili olup, sucul kirlenmenin önemli nedenleri arasında yer almaktadırlar. Tablo 5 ve Tablo 6'da da görülebileceği üzere dünyanın çeşitli ülkelerinde, PAH ve benzer yapısal özellikteki kimyasallar ile kirlendiği düşünölen nehir, göl ve denizlerde

kirliliğin ortaya konulması için EROD aktivitesi ölçüm yöntemine oldukça sık başvurulmaktadır.

Tablo 6: Çevresel kirliliğin ortaya konması için çeşitli kirleticiler ile kirlenmiş sularda değişik balık türleri kullanılarak yapılan bazı EROD aktivitesi ölçümleri sonuçları;

Kontamine Bölge	Balık Türü	Şüpheli Kimyasal	EROD Aktivitesi ($\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein)	Ref:
Niuwe Nehri, Amsterdam, Hollanda	sazan yılanbalığı turna	PCB ve OCP	3.5 238.3 55.2	88
Gaasperplas Nehri, Amsterdam	sazan yılanbalığı turna	PCB ve OCP ve PAH	0.6 128.7 29.2	88
Finlandiya körfezi	Levrek	PAH	2.7	89
Laboratuvar çalışması	PLHC-1 hücre kültürü	Benzo(a)piren Benz(a)antrasen 3-metilkolantren benzo(k)fluoranten	19.3 30.8 41.8 60.8	90
Corsica (Galeria ve Stareso), Akdeniz Fransız sahilleri (Cannes ve Roquebrune)	Serranus cabrilla	PAH	465 ve 424 320 ve 342	91
Kastro Körfezi, San Francisco, ABD	Citharichthys stigmaeus	PAH, PCB, DDT ve metal	41.7	92
İzmir Körfezi, Türkiye (Pasaport, Tuzla, Karşıyaka)	Kefal	Yoğun/çoklu kirlilik	1293, 334, 761	93
Douro Nehri, Portekiz	Kefal	PAH	300, 432, 662 (değişik aylarda)	94
La Gadre, Rabastense, Montespan Gölleri, Fransa	<i>Leuciscus cephalus</i> <i>Barbus barbus</i> alabalık	Çoklu kirlilik	199.39 218.5 458.16	95

II.9. Türkiye’de Sucul Kirlenmenin Göstergesi Olarak EROD Aktivitesi Ölçümleri

Türkiye su kaynakları oldukça çok, 3 tarafı denizlerle çevrili bir ülke olduğu halde, araştırmacılar tarafından sucul kirlenme üzerine fazla çalışılmamış olup, günümüzde bu konu giderek önem kazanır duruma gelmektedir. Yapılan çalışmalarda, kirlenmenin saptanması genellikle kimyasalların doğrudan analitik analizi şeklinde yapılmakta olup^{6, 96, 97}, biyogösterge olarak EROD aktivitesi ölçümü yalnız İzmir Körfezi ile sınırlı kalmıştır.

Arınç ve arkadaşlarının 2001 yılında başta kentsel atıklar olmak üzere, çeşitli nedenlerden dolayı kirlendiği düşünülen, İzmir Körfezinin oldukça kirli bölgesi olan Pasaport Bölgesinden elde edilen kefal balıklarındaki EROD aktivitesini 883 ± 172 pmol $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, temiz referans bölgeden elde edilen kefal balıklarındaki EROD aktiviteleri (11 ± 2 pmol $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) ile karşılaştırmış ve iki bölge arasında EROD aktivitesi açısından 80 kat daha fazla aktivite farkı olduğu görülmüştür⁹⁸. Belirlenen değerler, Arınç ve Şen’in 1999 yılındaki aynı bölgede yapılan çalışması ile uyumlu sonuç vermiştir. 1999 yılındaki çalışma sonucunda kirli bölgenin EROD aktivitesi 1293 ± 292 pmol $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein olarak ölçülmüş olup, değer temiz bölgenin değerinden 62 kat daha fazla olduğu kaydedilmiştir⁹³.

Yurdumuzda Arınç ve arkadaşlarının İzmir Körfezindeki çeşitli bölgelerden sağladıkları kefal balıklarındaki EROD aktivitesi çalışmaları^{93, 98, 99} dışında EROD biyogöstergesi çalışması bulunmamakta olup, Türkiye’deki göl, nehir, deniz gibi sucul sistemlerde yaşayan balıklarda genellikle OCP ve metal tayinleri gerçekleştirilmektedir^{5, 156-158}.

II.10. Sucul Sistemlere Konu Olan Diğer Biyogöstergeler

Sucul sistemlerde kirliliğe karşı oluşan cevabın tayininde, EROD dışında, çeşitli duyarlılıklarda başka biyogöstergelerden de yararlanılmaktadır. Bunların önemlilerinden aşağıda kısaca bilgi sunulmuştur. Bazılarından kısaca bahsedecek olursak;

- Organik fosforlu ve karbamat türevi bazı pestisitlerin seçici olarak kolinesteraz aktivitesini inhibe ettikleri bilinmektedir. Bu kimyasallar nehirlere veya denizlere ulaştıklarında bir çok sucul ekosistemi de kontamine etmektedirler. Karbamat ve organofosforlu pestisitler çok kısa yarı ömürlü olduklarından kolinesteraz (ChE) inhibisyonu sucul kirlenmenin tespitinde daha uzun süre içinde kullanışlı olmaktadır. Yine kolinesteraz aktivitesi ölçümlerinde, ortamda bulunabilecek antikolinesteraz bileşiklerinin sonucu etkileyici göz önünde bulundurulmalıdır¹⁰⁰.
- Sucul organizmalarda antioksidan savunma sisteminin parçası olan, superoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) üçlü enzim sistem seviyesi ölçümü, kirleticilere bağlı oluşan oksidatif hasarın ortaya konulmasında kullanılabilir. PAH bileşiklerinin midyelerde GPx, CAT ve SOD düzeyine olan etkisini incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada, karaciğer CAT düzeyi düşük bulunmasına karşın GPx ve SOD düzeyleri kirlenme miktarına bağlı olarak artmıştır¹⁰¹.
- Glutatyon S-transferaz'lar faz II biyotransformasyon enzimlerinden olup, çeşitli eksojen ve endojen kaynaklı elektrofilik, hidrofobik bileşiklerin glutatyon (GSH) ile konjugasyonunu kataliz eder. GST substratlarının çoğu, ksenobiyotikler ve Faz I reaksiyon ürünleridir. Kirlilik durumunda metabolizma cevabı olarak GSH seviyesi, EROD enzim aktivitesinde

gerçekleştirdiği gibi artmakta olup, sucul kirlenmenin tayini çalışmalarında başvurulan diğer bir biyogösterge metodudur¹⁰².

- Metallothioneinler (MT) düşük molekül ağırlıklı, sisteinden zengin sitozolik proteinlerdir. Bakır, gümüş, çinko, kadmiyum ve cıva gibi metalleri bağlarlar. Bakır, çinko gibi esansiyel metallerin hemostozisinin düzenlenmesi kadmiyum, gümüş ve cıva gibi toksik metallerin detoksifikasyonu, serbest radikallerin neden olduğu oksidatif strese karşı hücreleri koruyuculuğu gibi çeşitli fonksiyonları vardır. MT indüksiyonu tüm dünyada deniz kirliliğinin izlendiği programlara dahil olmuş sucul ekosistemdeki metal kirliliğinin değerlendirilmesinde ele alınan bir biyogöstergedir. Fakat MT düzeyleri vücut ağırlığına, cinse, üreme durumuna, mevsime ve su ısısına bağlı olarak değişiklik gösterir^{103, 104, 105}.
- Benzopirenhidroksilaz(BPH) aktivitesi veya diğer tanın adıyla aril hidrokarbon hidroksilaz(AHH) düzlemsel organik bileşiklerin (PAH gibi) etkilerinin göstergesi olarak uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. Son yapılan çalışmalar, AHH aktivitesinin insanlarda CYP1B1 ile daha alakalı olduğunu düşündürmektedir. Etoksikumarin O-deetilaz da, hidrokarbon kirliliğinde kullanılan diğer biyogöstergelerden biri olmakla beraber, bazı diğer kirleticilerden de etkilenebildiği bilinmektedir^{12, 106, 107}.

Sunulan araştırmada Aliağa Körfezinden yakalanan kefal balıklarında olası maruziyetin ortaya çıkarılması amacıyla bazı toksik metallerin de miktar tayinleri yapılmıştır. Bu nedenden dolayı özellikle çalışılan metallerle ilgili olarak genel bir bilgi aşağıda sunulmuştur.

II.11. Metaller

Metaller ve metal bileşikleri, çevrenin doğal bileşenleridir. Ana kaynakları volkanlar ve erozyon gibi doğal oluşumlardır. Bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından toprak ve havadan alınan ve işlenen ve besin zinciri ile diğer organizmalara geçen metallerin doğal döngüleri, madencilik, metalürji, kömür yanması gibi insan müdahaleleri ile bozulmaktadır¹⁰⁸.

Endüstriyel, tarımsal ve ilaç olarak oldukça geniş insan aktivitesinde yer bulan metallerin maruziyeti ile bir çok sağlık sorunu ilişkilendirilmiş; metaller, insanlar üzerine yarattığı etkileri ve çevreye salınışları nedeniyle her zaman sorgulanmıştır. Metallere akut ve kronik maruziyete bağlı olarak ortaya çıkan nörotoksisite, genotoksisite ve karsinogeniteye ait pek çok çalışma yapılmıştır¹⁹.

Metalleri daha az toksik formlarına parçalamak olanaksızdır, dolayısıyla çevrede kalıcıdır ve birikirler. Na, K, Ca, Mg gibi normal gelişim için gerekli (esansiyel) olanları olduğu gibi; Hg, As, Cd, Pb gibi çok düşük düzeylerde organizmada bulunmasının toksisite göstermesi için yeterli olduğu metaller de vardır¹⁹. Sürekli olarak başta endüstri olmak üzere, çeşitli nedenlerle çevremizde bulunmaktadır. Bu metallerin büyük bir kısmı çevrede birikme özelliğine sahiptir¹⁹.

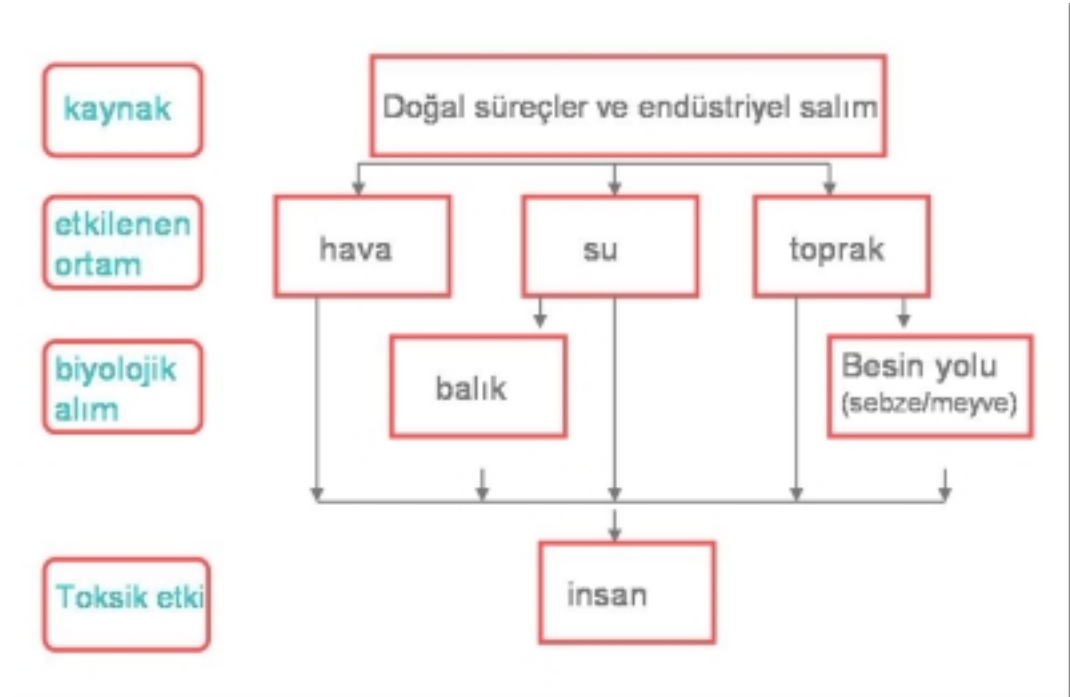
II.11.1. Metallere Maruziyet

Canlılar metallere besin ve su alımı, kontamine havanın solunması yoluyla maruz kalırlar. Metaller, besinlerin normal bileşeni olabildiği gibi kirlilik olarak da bulunabilir. Metal içeren pestisit kalıntıları, endüstriyel atıkların suya ve toprağa karışması en önemli kirlenme nedenleri olmakla beraber, doğal kaynaklardan da salınmış olduğu ve bunlara da maruz kalınabileceği unutulmamalıdır¹⁰⁹.

Deniz ve okyanuslarda insan aktivitesi sonucu metallerle kirlenmektedirler. Biyolojik parçalanmaya dayanıklı metaller, çevrede lipofilik özellik kazanarak(metilasyon ile) sucul bitki ve hayvanlarda birikirler. Böylece besin zincirinin en uç noktasındaki insana kadar ulaşabilmektedirler¹⁹.

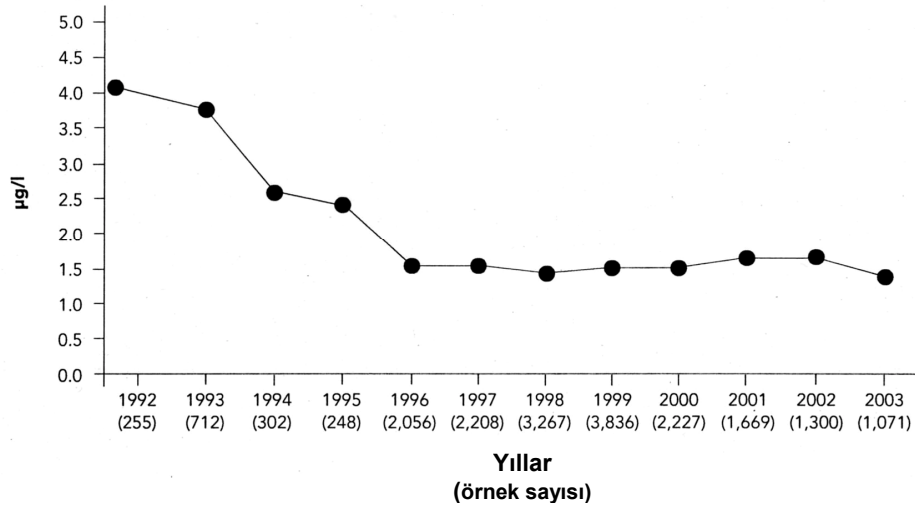
Metallerin hücrelerle ya da vücut fonksiyonları ile etkileşiminde 'ortak' bir yol yoktur; hücresel düzeyde, metal bileşenine göre, farklı proteinler hedeflenir ve farklı yollar yer alır. Dolayısıyla zehirlenme durumlarında, hangi metale maruz kaldığının bilinmesi önemlidir. Düşük düzeylerde maruz kalındığında akut toksisite belirtileri belirgin değilken, uzun süreli devamlı maruziyetlerde (kontamine besin, su) toksisite belirgin hale gelmektedir^{19, 108}).

Metallerin çevredeki doğal döngüleri Şekil 7'de şematize edilmiştir.



Şekil 7: Metallerin doğal döngüleri¹⁹

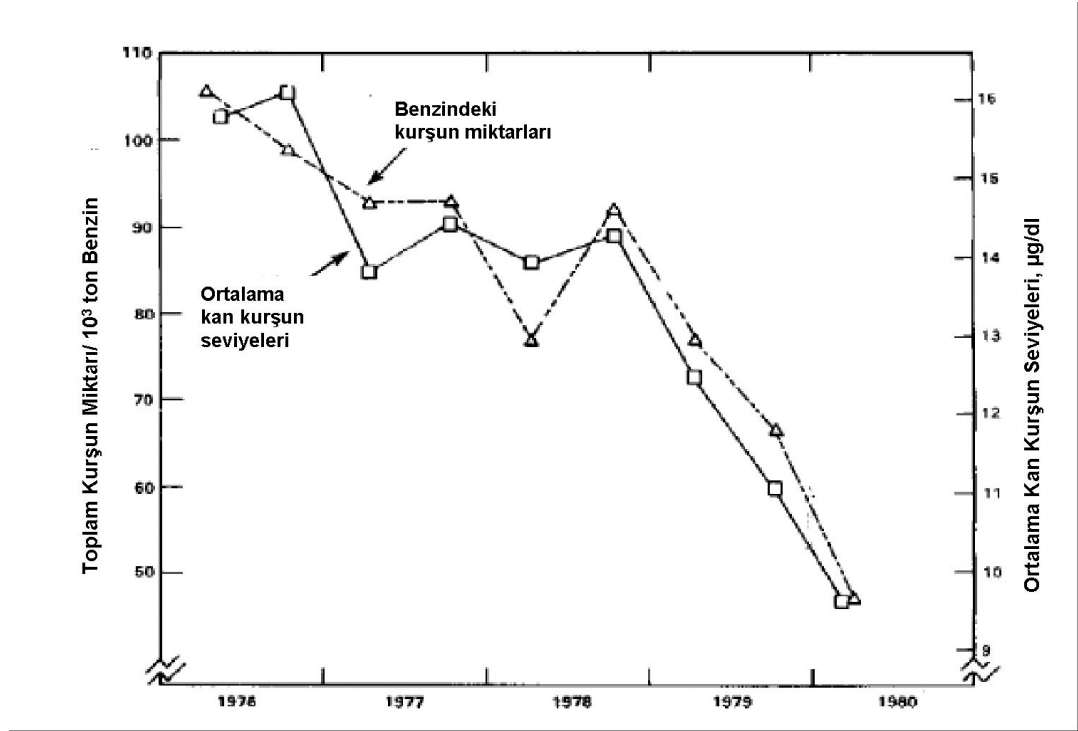
İçme suyu ile maruziyetin meydana geldiği ve bu konuda önlem alınmasını gerektiren önemli metallerden biri kurşundur. 1988 yılında araştırmacıların, 6 µg/dl kan kurşun düzeyinde bile çocuklarda ölçülebilir nörolojik hasar oluştuğunu tespit etmesi ve bu kan değerlerinin kurşunla kontamine içme sularının tüketilmesi ile ulaşılabilceğinin görülmesi başta EPA olmak üzere otoriteleri önlem almaya itmiştir¹¹⁰. Kurşun kaplı su soğutucularının ve benzeri ürünlerin satışının yasaklanması, suyu kirlettiği tespit edilmiş eski ev borularının değiştirilmesi ve bu konuda halkın bilinçlendirilmesi gibi önlemler ile içme suyu ile kurşun maruziyeti, Şekil 8'de görülebileceği üzere, %50'den fazla azaltılabilmektedir¹¹⁰.



Şekil 8: New York Şehrinde 1992-2003 yılları arasında evlerde kullanımda olan suyun kurşun tayin sonuçları¹¹⁰.

Ayrıca 1925'den beri motor yakıtı katkısı olarak vuruntuya karşı kullanılan bir kurşun bileşiği olan tetraetilkurşun, atmosferik maruziyet ile yarattığı negatif sağlık etkisinin anlaşılması ile 1978'den başlayarak kullanımı başta ABD olmak üzere gelişmiş ülkelerde basamak basamak azaltılmıştır. Yurdumuzda da son senelerdeki önlemler ile

tetraetil kurşun kullanımı yasaklanmıştır. Alınan önlemler ile kimyasallara maruziyetin ve organizmalar üzerinde yarattığı toksik potansiyellerinin azalabileceği, Şekil 9'da görülebileceği üzere ölçülen kan değerleri ile gösterebilmektedir.



Şekil 9: 1976-1980 yılları arası benzindeki kurşun oranları ve insan kan seviyeleri¹¹¹

Besinler yoluyla insan maruziyeti oluşturan metallerden en önemlilerinden biri de cıva olmaktadır. Cıva içeren balıkların yenmesi ile gerçekleşen Minamata Hastalığı, bu durumu ortaya koyan en çarpıcı olayların başında gelmektedir. Ağır nörolojik semptomların ortaya çıktığı bu hastalık, dikkat edilmediği ve önlem alınmadığı takdirde metallerle maruziyetin oluşturabileceği ciddi sağlık problemlerine önemli bir örnek teşkil etmektedir.

Metallerin gösterilen uzun yarılanma ömürleri, çevrede birikimleri, toksik etkileri ve mutajenik potansiyelleri, kurşun miktarlarının azaltılması için yapılan

Çalışmalarda görüldüğü gibi devlet ve sivil toplum kuruluşlarını bu konuda önlem almaya zorlamaktadır.

ATSDR ve EPA tarafından hazırlanan CERCLA (The Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act; evresel Yanıt, Yerine Koyma, Sorumluluk Hareketi) 2005 yılındaki öncelikler listesinde, Kurşun ve Cıva 2005 ilk üç sıra içinde yer almakta olup, Kadmiyum ise aynı listenin 8. sırasındadır. Bu  ncelikler listesi; bilinen ya da şüphelenilen toksisitesi olan maddeleri, insan maruziyeti olasılıklarına göre, insan sağlığına en fazla tehdit oluşturabilme özelliklerine göre belirlenmektedir¹¹².

Aşağıda bu çalışmada analizi yapılan metaller ve bu metallerin yarattığı toksik etkiler hakkında bilgi sunulmuştur.

II.12. Kadmiyum (Cd)

Kadmiyum, Cd sembolü ile periyodik cetvelde gösterilen ve atomik numarası 48 olan bir metaldir.

Kadmiyum ve çinko atomik yapı ve kimyasal davranışları bakımından birbirine benzerler ve doğada genellikle beraber bulunurlar. Çinkonun esansiyel bir element olduğu gösterilmişken, kadmiyumun hayvan metabolizmasında herhangi bir fonksiyonunun olmadığı ve oldukça toksik bir metal olduğu g sterilmiřtir¹¹³.

Üretilen kadmiyumun $\frac{3}{4}$   pillerde ( zellikle Ni-Cd bataryalar) kullanılırken, geri kalan kısmının büyük bölümü kaplamacılıkta ve boyacılıkta pigment olarak ve plastikler için stabilizör olarak kullanılır. Geri kalan kullanım alanları ř  şekilde sıralanabilir¹¹⁴:

- Çok düşük erime noktalı metal alaşımlarında,
- Düşük sürtünme katsayısı ve uzun ömür sağlaması nedeniyle, dayanıklı alaşım yapımında,
- Elektrokaplamaacılıkta,
- Bir çok lehim içeriğinde,
- Nükleer fizyonun kontrolünde bariyer olarak,
- Siyah beyaz televizyonlarda fosforun yapısında, renkli televizyonların mavi ve yeşil fosforun yapısında kullanılır,
- Kadmiyum sarısı olarak da bilinen ve ışıktta renklen bir pigment olan kadmiyum sülfid de cam, sabun, tekstil, kağıt, kauçuk, yazıcı mürekkebi, seramik sır ve hava fişeklerin renklendirilmesinde ve boyacılık endüstrisinde sarı renk yaratmada kullanılır,
- Kadmiyum sülfid, kadmiyum selenid, kadmiyum tellurid gibi yarı iletkenler, güneş panellerinde ışığın saptanmasında kullanılırlar.
- Bazı kadmiyum bileşikleri PVC yapısında stabilizatör olarak konulur.

II.12.1 Kadmiyum Maruziyeti ve Yarattığı Toksik Etkiler

Kadmiyumun insan vücudunda belirlenmiş bir fonksiyonun olmadığı saptanmıştır. Organizmalarda ve ekosistemde, yarılanma ömrünün oldukça yavaş olması nedeniyle biyoakümüasyonu sürekli. Çok düşük konsantrasyonlarda bile bileşiğin kendisi ve solüsyonları toksiktir. İnsan kadmiyum karşılaşması mesleksi maruziyet veya endüstriyel atıkların sulara ve toprağa karışması nedeniyle gerçekleşmektedir ¹¹⁵.

Mesleksi olarak da, kadmiyum yüklü tozların solunması soluk borusu enfeksiyonuna ve ölümcül olabilecek böbrek hastalıklarına yol açabilmektedir. Az miktarlarda bile olsa kadmiyumun yutulması ani zehirlenmeye, böbrek ve karaciğer hasarlarına neden olmaktadır¹¹⁵.

Kadmiyum, oksidasyon, redüksiyon veya alkilasyon gibi doğrudan herhangi bir metabolizasyon dönüşümüne girmez. +2 değerlikli kadmiyum iyonları albümin ve metalotiyonin gibi proteinlerin anyonik gruplarına (özellikle sülfidril gruplarına) veya diğer moleküllere bağlanmaktadır. Kadmiyumun metabolizması, toksisite açısından, metalotiyonine bağlanması nedeniyle önemlidir. Metalotiyonine bağlanan kadmiyum böbreklere geçer, glomerülüslerden filtre edilebilir olsa da, proksimal tübül hücreler tarafından yeniden absorblanabilmektedir. Araştırmacılar, kadmiyumun oluşturduğu böbrek hasarının metalotiyonine bağlanmayan kadmiyum bileşikler tarafından yapıldığını düşünmektedirler. Emilen ve inhale edilen kadmiyumun çoğu ise, feçesle emilmeden atılmaktadır. Vücuda alınan kadmiyumun ise yarılanma ömrü oldukça yavaştır. Deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda kadmiyum bileşiklerinin yarı ömrünün 38 yıla kadar uzadığı bulunmuştur¹¹⁶.

Akciğer, karaciğer ve böbreklerde akümüle olan kadmiyum, karaciğer ve böbrekte metalotiyonin adlı küçük bir protein ile birleşir. Akümülasyon ve yarı ömrünün uzunluğu yüzünden, yaşla böbrek kadmiyum konsantrasyonları korelasyon göstermektedir. İngiltere'de otopsi örneklerindeki ortalama konsantrasyonları karaciğer için 2.0 mg/kg (1.2 – 3.7) ve böbrek için 11.7 mg/kg (2.1 - 22.0) iken, 18 –26 sene boyunca mesleksi maruziyete uğrayan ve maruziyetten 3 – 9 sene sonra ölen 4 işçide karaciğer konsantrasyonları 23 – 145 mg/kg ve böbrek konsantrasyonları 13 – 80 mg/kg olarak bulunmuştur. Normal idrar kadmiyum seviyesi 0.0001 – 0.0002 mg/L sınırındadır¹¹⁷.

Akut toksisitesi, kadmiyum içeren yiyeceklerin/içeceklerin yenmesi ile meydana gelebilmektedir. Düşük dozlarda baş dönmesi, mide bulantısı ve abdominal ağrıya sebep olurken kalıcı etkiler bırakmaz. Et, balık ve meyveler 1'den 50 µg/kg civarında kadmiyum içerirken, kabuklu deniz canlılarında bu değer 100'den 1000 µg/kg'a

kadar ulaşabilmektedir. Suda bulunan kadmiyum kabuklu deniz canlılarında, kadmiyum bağlayan peptidlere bağlanarak akümüle olurlar¹⁰⁹.

Kronik kadmiyum zehirlenmesi sonucu ortaya çıkan itai-itai hastalığı, renal disfonksiyonla osteomalazi veya ağır osteoporozun kombinasyonudur. Hastalık, Japonya'nın bazı yörelerinde, maden eritici fabrikaların bulunduğu alanlarda ekilen çeltiği besin olarak kullananlarda yaygın olarak görülmüştür. Kirlenmiş alanlarda, pirinçteki kadmiyum konsantrasyonunun 0.6 ila 1 µg/g arasında değiştiği bulunmuştur. Renal hasar sonucu kalsiyum ve fosfor metabolizmasının bozulmasının, iskelet deformitelerinin ve yaygın bacak – sırt ağrılarının sebebi olduğu sanılmaktadır¹¹⁵.

Kadmiyum, sülfidril enzimlerinin bir inhibitörüdür. Aynı zamanda, proteinlerin hidroksil, karboksil, fosfatidil, sisteinil ve histidil kısımları, purinler ve porforinler gibi hücresel ligandlara da afiniteleri vardır. Oksidatif fosforilasyon yolağının işlevini de bozabilir¹¹⁷.

Kadmiyum, diğer metallerle hem etkileşir hem de yarış halindedir. Örneğin hayvan deneylerinde, bu elementin yüksek diyet seviyeleri, bakır emilimini engellemiş ve doku bakır seviyelerini de düşürmüştür. Kadmiyum benzer şekilde, magnezyum ve kalsiyumun yer aldığı biyolojik süreçlere de engel olabilmektedir¹¹⁸.

Yarattığı toksisitenin ana nedenleri arasında çinko içeren enzimlerle vücutta yarışmasıdır. Çinko, biyolojik sistemde oldukça önemli bir element olduğu halde, kimyasal yapısı çinkoya bu kadar benzer olan kadmiyum, biyolojik sistemde çinkonun işlevlerini hiçbir şekilde yerine getiremez.

EPA'nın kadmiyumun kronik maruziyeti için belirlediği referans dozlar Tablo 7'de özetlenmiştir. Oral Referans Dozun (RfD), karsinogenik etkiler dışındaki etkiler

için belirlendiği unutulmamalıdır. Mg/kg-gün cinsinden belirtilen değer toksik etkinin başlaması için bir sınır değer olduğu ve bu değer bulunması esası üzerine dayanır ¹¹⁸.

Tablo 7: EPA'nın kadmiyum için belirlemiş olduğu oral referans dozlarının özeti verilmiştir.

Gösterdiği Etki:	Deneysel Doz:	Referans Doz:
Belirgin Proteinüri	NOAEL(su): 0.005 mg/kg/gün	5×10^{-4} mg/kg/gün (su)
Kronik maruziyeti de kapsayan insan çalışmaları (EPA 1985)	NOAEL (besin): 0.01 mg/kg/gün	1×10^{-3} mg/kg/gün (besin)

II.12.2. Kadmiyumun Karsinojenik Etkisi

Özellikle pillerin yapımında yaygın olarak kullanılan kadmiyumun mesleksi maruziyeti hakkında tutarlı ve birbiri ile uyumlu epidemiolojik çalışmalardan akciğer kanseri için yeterli fakat diğer kanser türleri için kısıtlı delillerin varlığı ortaya konmuştur. Bunun yanı sıra deney hayvanı çalışmaları da; kadmiyumun karsinojenik etkileri hakkında yeterli veri elde edilmesine yardımcı olmuştur^{118, 119}.

IARC de, kadmiyum ve kadmiyum bileşiklerinin insanlarda karsinojen olduğuna dair yeterli kanıt bulunduğu gerekçesi ile, 1993 yılında grup 1'e dahil ederken, EPA'da benzer olarak, kadmiyumu muhtemel insan karsinojeni olan 1B grubuna almıştır.

II.12.3. Sucul Sistemde Kadmiyum

Subletal etkilerini test etmek için Hontela ve arkadaşları steelhead'i 400-2,400 µg/l konsantrasyonlarda kadmiyuma maruz bırakmışları sonucunda, balıklarda

plazma tiroksin seviyesinde belirgin bir düşme, plazma kortizol seviyesinde belirgin bir artma görülmüştür. Bunun yanında plazma tiroksin ve karaciğer glikoz seviyelerinde düşme de göze çarpmıştır¹²⁰.

EPA'nın değerlendirmelerine göre kadmiyum bentik omurgasızlarda önemli oranda biyoakümüle olmamakla birlikte, çoğu araştırmacı kadmiyumun biyoakümülyasyon potansiyeline dikkat edilmesi gerektiği konusunda hem fikirdir¹²⁰.

Yalnızca normal ve yüksek doz çalışmaların yanında, düşük doz kadmiyumun da balıklar üzerine etkileri incelenmiştir. 2ppb'lik kadmiyumun sudaki konsantrasyonları, alabalıklarda, fagositik aktivitenin bozulması ve serbest radikal oluşmasını da içeren immunotoksik etkilere yol açmıştır¹²¹.

Sitotoksik etkilerin gözlenmesi için balık hücre kültürleri ile yapılan deneyler, 0.03 µM seviyelerinden başlayarak kadmiyum konsantrasyonu arttıkça, koloni sayısında anlamlı derecede düşmenin olduğu görülmektedir¹²².

Yurdumuzda çeşitli bölgelerde avlanan farklı balıklardaki Cd düzeylerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalar tablo 8'de özetlenmiştir.

II.12.4. Türkiye'de İzin Verilen Sınır Değerler

Çevre ve Orman Bakanlığının, Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliğine göre, deniz sularında kadmiyum 0.01 mg/l'den daha az bulunması gerekirken, aynı yönetmeliğin petrol sanayi atık sularının alıcı ortama deşarj standartları geri hidrokarbon üretim tesislerinde ölçüm sonucunda 0.15 mg/l'nin altında olması gerekmektedir¹²³. Türk Gıda Kodeksinde ise, aroma maddeleri yapısında kadmiyumun değerinin 1 mg/kg'ı aşmaması gerektiği bildirilmiştir¹²⁴. Kadmiyum ve çözünebilen bileşiklerinin, işyeri

havasında bulunmasına müsaade edilen azami miktarı 0.2 mg/m^3 ; kadmiyum oksit için bu miktar 0.1 mg/m^3 'dür¹²⁵.

II.13. Krom (Cr):

Periyodik cetvelde "Cr" sembolü ile gösterilen ve atomik numarası 24 olan elementtir. Çelik-gri renkli, parlak, sert ve yüksek erime derecesine sahiptir. Kokusuz, tatsız ve bir miktar şekil verilebilir durumdadır.

En sık karşılaşılan oksidasyon basamakları +2, +3 ve +6 olup, +3 formu en stabil halidir. +1, +4 ve +5 oldukça nadirdir. Oksidasyon basamağı +6 olan krom bileşikleri çok güçlü oksidanlardır.

Oksijen ile oldukça pasif halde olup, çok ince, suda çözünmeyen oksit yapısı, kapladığı metali oksidasyondan korumak amacıyla kullanılır¹²⁶.

Kromit hali (FeCr_2O_4) ile madenleri bulunan kromun dünyada başlıca üretildiği topraklar, Güney Afrika, Kazakistan, Hindistan ve Türkiyedir¹²⁶. Endüstriyel kullanımı oldukça geniş olan kromun kullanım alanları şu şekilde sıralanabilir:

- Metalürjide, korozyonu önlemek amacıyla ve parlaklık vermek amacıyla,
 - o Çatal bıçak gibi paslanmaz çelik karışımlarında
 - o Krom kaplamacılıkta
 - o Alüminyumun anodizasyonunda, alüminyumun yüzeyini sertleştirmek ve kırmızı yapmak için
- Boyalarda yeşil ve sarı renk elde etmede,
- Kimyasal reaksiyonlarda katalisit olarak,

- Krom tuzları derinin renklendirilmesinde
- Potasyum dikromat laboratuvarlarda yıkama çözeltilerinde ve titrasyon ajanı olarak, aynı zamanda tekstilde boya sabitleyici olarak,
- Krom(IV)oksit, kasetlerin üretiminde demirin yerine,
- Sağlık endüstrisinde, zayıflama amaçlı ve besin desteği olarak, krom(III)klorid ya da krom(III)pikolinat olarak kullanılmaktadır¹²⁶⁻¹²⁸.

Yüksek çevresel konsantrasyonlarda krom, mutajenik, teratojenik ve karsinojeniktir. Genel olarak Cr, besin zincirinde biyomagnifiye olmaz ve en düşük tropik seviyelerde en yüksek konsantrasyonlarda görülmektedir.

II.13.1 Biyolojik rolü:

Trivalen krom (Cr^{+3}), insanlarda şeker metabolizmasında oldukça düşük miktarlarda gerekli olduğu tartışılmaktadır. Eksikliği, krom eksikliği sendromuna yol açabilmektedir. Gelişmiş ülkelerde oldukça nadir görülen bu hastalıkta, krom eksikliği nedeniyle insulinin şeker balansını ayarlanmasındaki etkinliği düşmektedir. Glikoz metabolizması rahatsızlığı olarak ortaya çıkan bu durum, krom pikolinat içeren ilaçların verilmesi ile tedavi edilmektedir¹²⁷.

Kromun diğer esansiyel metallerden farklı olarak, insan diyetinde ne kadar gerekli olduğu ve fonksiyonu hala açıklığa kavuşmamıştır. Bunun yanında, krom(III)pikolinat kompleksi ile yapılan son çalışmalarda, hamster hücrelerinde kromozom hasarı yaptığı görülmüştür¹²⁹. Amerika Birleşik Devletlerinde günlük tavsiye edilen krom alımı 50-200µg'dan erkeklerde 35µg'a, kadınlarda 25µg'a düşürülmüştür¹²⁸.

II.13.2. Toksisitesi

Krom metalik formu ve krom(III) bileşikleri genel olarak sağlık için bir tehlike oluşturduğu kabul edilmemekle beraber, hekzavalen krom (krom VI) bileşikleri,

oral olarak alınırsa veya inhale edilirse oldukça toksik olabilmektedir. Atmosfere karışan ve toksisiteden sorumlu olan krom kaynağını, ferrokrom üretimi, maden arıtımı ve fosil yakıtların yakılması gibi endüstriyel kaynaklardan almaktadır¹⁰⁹.

Besinlerde oldukça az olan kromun günlük tüketim miktarı 100 µg civarındadır¹²⁵. İçme sularında, WHO tarafından içme suyunda bulunacak krom(VI) miktarı için maksimum değer 0.05 mg/L olarak belirlenmiştir. Yüksek çevresel konsantrasyonlarda krom, mutajenik, teratojenik ve karsinojeniktir. Genel olarak krom, besin zincirinde biyokonsantrasyona uğramaz.

Hekzavalen krom, deri ile teması hem irrite edici hem de alerjen özelliktedir. Organizmaya girdikten sonra trivalen kroma indirgenen krom, proteinlere bağlanarak immün sistem reaksiyonları başlatan haptenlerin oluşumuna yol açmaktadır¹³⁰.

OSHA tarafından hekzavalen krom bileşikleri için zaman ağırlıklı 8 saatlik maruziyet limiti (TLV-STEL) 5 µg/m³ havadan az olmalıdır¹³⁰.

Krom, diğer metallerin aksine, biyolojik rolünün de olması sebebiyle, atılımı daha metabolizasyonu daha hızlıdır. Ratlarda yapılan çalışmalar, kromun yarı ömrünün 6 ila 84 gün arasında olduğu bulunmuştur¹³¹.

Doğal olarak bulunan en yaygın form trivalen olup, biyolojik sistemde hekzavalen forma dönüştüğüne dair hiçbir bilgi bulunmamaktadır. Ama hekzavalen krom, hücresel membranlardan kolaylıkla geçip, intraselüler olarak trivalen kroma redüklenebilir¹⁰⁹.

Hekzavalen krom genotoksiktir. Genotoksisite mekanizması pentavalent ve trivalent kroma dayanmakta olup, hekzavalen krom hücre içinde bu formlara indirgenir. Araştırmacılara göre, hücre içinde hidrojen peroksit tarafından pentavalen kromun

yeniden oksidasyonu sırasında ortaya çıkan hidroksil radikalleri hasardan sorumlu olmaktadır¹³².

II.13.3. Krom'un Karsinojenik Etkileri

Krom(VI) insan karsinojeni olarak sınıflandırılmaktadır¹²⁹. Krom(0) ve Krom(III) bileşikleri için IARC'nin yaptığı değerlendirmelerde, tümör insidansında bir artışa rastlanmazken, Krom(VI)'nın Almanya, İtalya, Japonya, İngiltere ve Amerika'da, endüstriyel maruziyet sonucunda akciğer kanserini oldukça artırdığı saptanmıştır¹²⁹. Akciğer ve sinonasal kanserler dışında kanser insidanslarında bir artış görülmemiştir. Sonuç olarak, hezavalen krom, insanlara için karsinojenik olarak (Grup 1) bilinirken, metalik ve diğer krom-III bileşikleri, insanlar için karsinojenik olduğu sonucuna varılmaz olarak, Grup3'de sınıflandırılmaktadır¹³².

Bileşiklerin kronik inhalasyonu akciğer kanseri riskini artırmaktadır. Çinko kromat, endüstride kullanılan kromatlardan en güçlü karsinojenik etkiye sahip olanı olup, suda çözünür, kromik asit gibi bileşikler zayıf karsinojendir^{126, 127}.

II.13.4. Sucul Sistemde Krom

Cr'un toksisite ve subletal özellikleri ve Cr hassasiyeti, türler arasında ve ortam koşullarında değişmektedir. Aynı ortamda yaşayan balık türleri arasında oldukça farklı Cr konsantrasyonları görülebilmekte olup, bir çalışmada aynı toplama alanında yaşayan *Pachymetopan grande*'nin kas krom değerleri, *Lophius piscatorius*'e göre 140 kat fazla ölçülmüştür. Bu tür farklılıkların nedeni tam olarak açıklanamamış değildir¹³³.

Krom+3 ve krom+6'nın balıklarda oluşturabileceği etkileri görmek üzere sazan balıklarında yapılan genotoksisite çalışmasında, mikroçekirdek tayini yapılmıştır.

Temiz ve kirli bölgelerden alınan balıklara sub-letal dozlarda krom maruziyeti, kontrol gruplarına kıyasla mikroçekirdek insidansının yükseldiği saptanmıştır¹³⁴.

Kromun balık kuru ağırlığında, kg başına 4.0 mg'dan fazla olduğu durumlarda kontaminasyon olduğu düşünülmeli, durum tespitinde bölge çevresel kirlenme adına değerlendirilmelidir¹³³.

Yurdumuz göl ve denizlerinde yaşayan balıklarda yapılan az sayıda çalışmalarla, balıklardaki krom düzeylerinin belirlenmesine çalışılmıştır. Bu çalışmalar Tablo 8'de özetlenmiştir.

II.13.5. Türkiye'de İzin Verilen Sınır Değerler

Çevre ve Orman Bakanlığının, Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliğine göre, deniz sularında krom +6'nın 0.1 mg/l'den daha az bulunması gerekirken, aynı yönetmeliğin petrol sanayi atık sularının alıcı ortama deşarj standartları geri hidrokarbon üretim tesislerinde ölçüm sonucunda 0.5 mg/l'nin altında olması gerekmektedir¹²⁴. Kromik asit ve tuzlarının, işyeri havasında bulunmasına müsaade edilen azami miktarı 0.1 mg/m³'dür¹²⁵.

II.14. Kurşun (Pb):

Atomik numarası 82 ve "Pb" sembolü ile gösterilen, periyodik cetvelin 14'üncü (IVa) grubunda bulunan, yoğun, mavimsi-gri metalik elementtir. Metalik kurşun yumuşak, şekil verilebilen bir metaldir.

Kurşunun günümüzdeki kullanım alanları kısaca aşağıda bildirilmiştir¹³⁵;

- Kurşun, araba akülerinin(kurşun-asit aküsü) ana bileşenlerinden biridir. Seramik ürünlerde renklendirme aracı olarak ve de toprağının bileşiminde bulunan kurşun, bu yüzden bir çok kere tartışmalara da konu olmuştur.
- Mumların daha uzun süre yanmasını sağlamak için az gelişmiş ülkelerde kullanılabilen kurşunun yerini Amerika ve Avrupa'da, çinko almıştır.
- En bilenen kullanım alanlarından biride radyasyondan korunmak için zırh yapımıdır. Çoğu eski su borusu bileşiminde kurşun olduğu unutulmamalıdır. Kurşun borunun karışımına girerek, borunun istenen kalınlığa sahip olması sağlanır.
- Elektroliz aşamasında elektrot olarak kurşun kullanılabilir.
- Çeşitli cihazların ve kabloların yapısında kullanılabilir. Örneğin, su tutulumunu en aza indirdiği için yüksek gerilim hattı kablolarında yer alır.

II.14.1 Kurşun Maruziyeti ve Yarattığı Toksik Etkiler

Kurşun zehirlenmesi eski çağlardan beri bilinmektedir. Yunanlılar ve Romalıların kurşunu yemek pişirmede oldukça yaygın olarak kullanıldığı söylenmektedir. Bronz kaplar yemeklere acı bir tat verirken kurşunun, tatlandırdığını bulmuşlardır. Roma su boruları kurşundan yapılı olup, milattan önce 25 yıllarında Horace, kurşun borular nedeniyle suyun temizliği konusunu sorgulamıştır¹³⁷.

Besinlerle maruz kalınan da dahil olmak üzere, kurşuna tüm çevresel maruziyetler, inorganik kurşun sebebiyledir. Bunun en büyük nedeni, benzinler yapısında yer alan tetraetil kurşunun, benzindeki miktarının yasal düzenlemeler ile gittikçe azaltılması ve kurşunsuz benzinlerin gittikçe yaygınlaşması ile tetraetil kurşunun çevresel maruziyetin gittikçe azalması olup, yine de, havacılık ile ilgili yakıtlarda hala tetraetil kurşun katkısı yer almaktadır^{144, 109}. Türkiye'de yakın zaman önce kalkan süper benzinde

400 mg/L, normal benzinde ise 150 mg/L kurşun katılmaktadır. Benzine katılan bu bileşikler yanma sonucu egzoz gazları ile havaya yayılmakta olup, trafiğin yoğun olduğu şehir havasında bu nedenle kurşun miktarı 1-10 µg/m³ ve hatta daha yüksek düzeyde olabilmektedir¹⁹.

İçme sularının kurşun kaplı depolarda bekletilmesi sırasında, ayrıca kalsiyum ve magnezyumca fakir yumuşak sulara, borulardan sulara kurşun geçebilmektedir¹⁹.

Organizmaya oral, inhalasyon ve deri yoluyla alınırken, absorpsiyonu kimyasal yapısı ile ilişkilidir. Organik kurşun bileşikleri, örneğin tetraetil kurşun, deri teması sonucu hızla penetre olur. İnorganik bileşiklere nazaran daha hızlı gerçekleşen penetrasyonun yanında, organik kurşunun yüksek derecede yağda çözünürlüğü, sinir dokularına geçmesini sağlar¹³⁵.

Endüstri dışı kurşun maruziyetinin büyük bir bölümü içecekler ve yiyecekler nedeniyle olmaktadır. Tüketilen kurşunun %5-10'unu absorbe olurken geri kalanı idrar ve feçes ile atılır. Günlük 600 µg kurşun tüketimi (yutulması) zehirlenmeye neden olabilecek düzeyde olup, WHO günlük miktarın 5µg/kg üzerine çıkmaması gerektiğini önermektedir.

Kana karışan kurşunun %95'i eritrositlerde yer alan hemoglobine bağlandığını bulunmuştur¹³⁶. Kurşun, eritrositlerden plazmaya, daha sonra ekstraselüler sıvıya, ardından intraselüler boşluğa ve doku hücrelerine diffüze olur. Karaciğer ve böbrek, yumuşak dokular arasında en yüksek konsantrasyonun olduğu bölgelerdir. Ardından bu kurşunun bir kısmı kemiklerde birikirken, geri kalan kısmı da itrah edilmektedir. Vücutta bulunan kurşunun %90'ı iskelette yerleşiktir¹³⁶.

Kurşun protoplasmik bir zehir olup, kümülatif, yavaş etkili ve değişik semptomlar ortaya çıkarmaktadır. Diğer ağır metaller gibi, sülfüre afinitesi vardır ve aktivitesinin büyük çoğunlukla, sülfidril inhibisyonu ile gerçekleştirir. Maruziyetin ardından kurşunun kandan temizlenmesi yaklaşık 40 gün alırken, kemiklere yerleşen kurşunun yarılanma ömrü 20 yıl civarındadır¹³⁹.

Kurşun, karsinogenik etkileri dışında bir çok organ ve sistemleri etkileyebilmekte olup, en zarar gören sistemler hematopoetik sistem, merkezi sinir sistemi ve böbrekler üzerindedir¹³⁶.

Kurşun, eritrositlerle ekstra selüler sıvı arasındaki su-elektrolit alışverişini bozarak, eritrositlerin su ve potasyum kaybetmesine neden olur. Eritrosit zar bütünlüğü bozulur, hemoliz sonucu anemi oluşur. Kurşun ayrıca "hem" biyosentezini, sitoplazmadaki δ -aminolevülinik asit dehidraz (ALA-D) ile mitokondrideki ferroşelataz enzimini inhibe ederek bozduğu da gösterilmiştir. Ayrıca kurşunun sitoplazmada bulunan ferro iyonunun (Fe^{+2}) mitokondrilere girmesini engelleyerek hem sentezini azaltır^{136, 138}.

Kurşun bileşiklerinin metalotieninleri indükleme potansiyellerini araştıran çalışmalarda, kurşunun metalotiyonini indüklemediği görülmüştür¹⁴⁰.

Kurşun maruziyetinin yol açtığı diğer bir problem ise, sinirlilik, huzursuzluk, hafıza kaybı gibi etkileri ile görülen kurşun ensefalopatisidir. Kandaki Pb düzeyi, $30\mu g/100ml$ 'nin üzerinde olduğunda çocuklarda IQ oranında düşme saptanmış¹⁹, daha sonraki çalışmalarda zeka geriliğinin $6\mu g/100ml$ kurşun kan seviyelerinde dahi görülmeye başlandığı tespit edilmiştir¹¹⁰. Şekil 10'da görülebileceği üzere, kandaki kurşun miktarı arttıkça başta IQ gerilemesi, daha ileri seviyelerde hematopoetik sistem üzerine etkileri belirginleşir.

ÇOCUKLAR	Kandaki Kurşun Konsantrasyonu (µg/dl)	YETİŞKİNLER
Ölüm	100	Beyin İltihaplanması
Beyin İltihaplanması		Belirgin Kansızlık
Beyin İltihaplanması		Ömür Kısalması
Belirgin Kansızlık		
Ciddi Mide Ağrıları	50	Hemoglobin ↓
Hemoglobin ↓	40	{ Periferik nöropati Erkeklerde kısırlaşma Böbrek iltihaplanması
	30	{ Erkeklerde sistolik kan basıncı ↑ İşitme hassasiyeti ↓
Vitamin D Metabolizması ↓		Erkeklerde Eritrosit Protoporfirin ↑
Sinir İletim Hızı ↓	20	
Eritrosit Protoporfirin ↑ Vitamin D Metabolizması ↓		Kadınlarda Eritrosit Protoporfirin ↑
Toksisite Gelişimi	10	Hipertansiyon ↑
↓ IQ ↓ İşitme ↓ Büyüme		
↑ Artan Fonksiyon		↓ Azalan Fonksiyon

Şekil 10: Kurşunun çocuklarda ve yetişkinlerde doza bağımlı olarak yarattığı klinik sonuçlar¹⁴¹.

II.14.2. Kurşun Karsinojenitesi

Hayvan karsinojenite deneyleri, kurşun ve bileşikleri için yeterli kanıt sunarken, insanlar için bu bilgiler sınırlı kalmaktadır. Kurşun IARC değerlendirmesinde muhtemel insan karsinojeni olarak bilinen 2A grubunda yer almaktadır¹⁹.

II.14.3. Sucul Sistemde Kurşun

Bilimsel çalışmalar sucul organizmalarda kurşunun değişik konsantrasyonlarda bulunabildiğini ortaya çıkarmıştır. 30 gün boyunca ölümcül altı doza maruz kalan tatlı su balıklarının, bu dönem sonucunda kan ve dokularında belirgin miktarda kurşun akümüle ettiği bulunmuştur. Balıklarda organa özgü akümülyasyon gösterip, en yüksek konsantrasyon kanda görülürken, sırasıyla böbrek, solungaç, karaciğer, beyin ve en son olarak da kas dokusunda birikir. Tatlı su balığı Anabas testudineus ile 5ppm'lik doza 30 gün boyunca maruziyet çalışmasında balıkta total lipit, fosfolipid ve kolesterol seviyelerini düşürdüğünü göstermiştir¹³³.

Adriyatik Denizinde 1974 yılında meydana gelen geniş çaplı bir tetraetil kurşun yayılması sonrası yapılan bir incelemede sucul faunada akümülyasyonu nispeten düşük bulunmuştur. Deniz suyunda tetraetil kurşunun yarı ömrünün ise 14.5 saate denk geldiği bulunmuştur¹³⁷.

Kurşunun sudaki yüksek konsantrasyonları ise balıkta aşırı mukoz üretimine sebep olur. Tüm vücudu ve özellikle solungaçlarda toplanan mukus, solunum sisteminin işlev görememesine ve balığın anoksiden ölümüne yol açar. 10 µg/l'nin üstünde uzun dönem maruziyet balıklarda anemi, dorsal kuyruk bölümünün koyulaşması ve bu bölgede doku hasarı, akıntıya karşı yüzme problemleri, eritrositlerde ALAD

inhibisyonu, kas atrofisi ve gelişme geriliği gibi, sucul yaşamı etkileyen problemlere yol açtığı saptanmıştır¹³³.

Endüstrinin yoğun olarak bulunduğu Mersin, İskenderun Körfezinde yapılan çalışmalarda, balıklardaki Pb miktarlarının 1,8 µg/g ila 185 µg/g arasında değişmekte olduğu saptanmıştır^{7, 142}. İzmir körfezinde yapılan çalışmalarda da, yıllara göre farklılıklar görülmekle beraber, kurşun düzeylerinin 8 µg/g'dan 400 µg/g seviyelerine kadar yükselebildiği görülmüştür¹⁴³.

Yurdumuz göl ve denizlerinde yaşayan balıklarda yapılan az sayıda çalışmalarla, balıklardaki kurşun düzeylerinin belirlenmesine çalışılmıştır. Bu çalışmalar Tablo 8'de özetlenmiştir.

II.14.4. Türkiye’de İzin Verilen Sınır Değerler

Endüstride havada kurşun için verilen TLV değeri 0.2 mg/m³'dür. Çevre ve Orman Bakanlığının, Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliğine göre, deniz sularında kurşunun 0.1 mg/l'den daha az bulunması gerekirken, aynı yönetmeliğin petrol sanayi atık sularının alıcı ortama deşarj standartları geri hidrokarbon üretim tesislerinde ölçüm sonucunda 1 mg/l'nin altında olması gerekmektedir¹³⁰. Türk Gıda Kodeksinde ise, aroma maddeleri yapısında kurşunun değerinin 10 mg/kg'ı aşmaması gerektiği bildirilmiştir¹³¹. Kurşunun, işyeri havasında bulunmasına müsaade edilen azami miktarı 0.2 mg/m³; kurşun arsenat için bu miktar 0.15 mg/m³'dür¹²⁵.

II.15. Cıva (Hg):

Cıva doğada oldukça nadir bulunur. Volkanik olaylar sırasında sıcak madenlerin yer altından yüzeye doğru akın etmesi şekliyle oluşmaktadır. Genellikle kayalık yerlerde, 1-1000 metre derinlikte karşılaşılır. Cıva genellikle diğer maddelere bağlanmış haldedir. En sık karşılaşılan maden kırmızı cıva sülfittir (HgS). Diğer karşılaşılan madenlerin kimyasal yapıları $Hg_3S_2Cl_2$, $HgSb_4S_8$, HgO , $HgCl$ şeklindedir¹⁴⁴.

Endüstriyel cıva salınımının ana kaynağının %40'ını kömür yakıtlı elektrik santralleri oluşturmaktadır. Bunun dışındaki kaynaklar^{145, 146}:

- Klorin, çelik, fosfat ve altın üretimi,
- Metal arıtımı,
- Elektronik cihazlar ve hava ölçümü cihazlarının bakımı, tamiri,
- Kentsel atıkların gömülmesi ve yakılması (cıva içeren ürünlerin başlıcaları: otomobil parçaları, bataryalar, flüoresan lambalar, termometre ve termostatlar)
- Medikal uygulamalar,
- Diş hekimliğinde,
- Kozmetik endüstrisi,
- Cıva ve sülfür bileşikleriyle yapılan laboratuvar çalışmaları.

II.15.1 Cıvaya Maruziyet ve Yaratdığı Toksik Etkiler

Cıva önemli sağlık problemleri yaratması nedeniyle kullanımı ve salınımı(atımı) sıkı denetim altında olan bir metaldir. 1988 yılında insan aktiviteleri sonucu havaya, toprağa ve suya tüm dünyada salınan cıva için hesaplanan değer 11 milyon kg'dır. Bu değere endüstriyel süreçler sırasında ara ürün ve atık olarak çıkan cıvanın yanı sıra; fosil yakıtları da 1 ppm'e kadar cıva içerebilmekte olup, petrolün işlenmesi, kömür ve

doğal gaz kullanımının yıllık en az 5000 ton cıvanın atmosfere salınımına yol açmaktadır^{150, 109}.

Cıva konsantrasyonlarının karada $\sim 7 \times 10^{-2}$ mg/kg ve okyanuslarda $\sim 3 \times 10^{-5}$ mg/l olduğu belirtilmektedir. Buz kütlelerinde yüksek hassasiyette cıva ölçümü yoluyla yapılan çalışmalar, cıvanın 270 yıl öncesine kadar dünyadaki kullanımı ve ne kadar cıvanın salındığı konusunda bilgi vermektedir. Şekil 12'den de görülebileceği gibi, endüstri öncesi dönemde (yaklaşık 1700'lerde) atmosferik cıva miktarı 4 ng/L civarında olduğunu, volkanik olayların meydana geldiği durumlarda konsantrasyonun 4-6 kat arttığını ortaya koymaktadır¹⁴⁷. Cıvanın atmosferik konsantrasyonları en belirgin olarak son yıllardaki endüstriyel kullanımı yüzünden artmış olsa da, endüstrinin düşük olduğu dönemlerde, altın aranmasının toplumda zirve yaptığı durumlarda belirgindir¹⁴⁷.

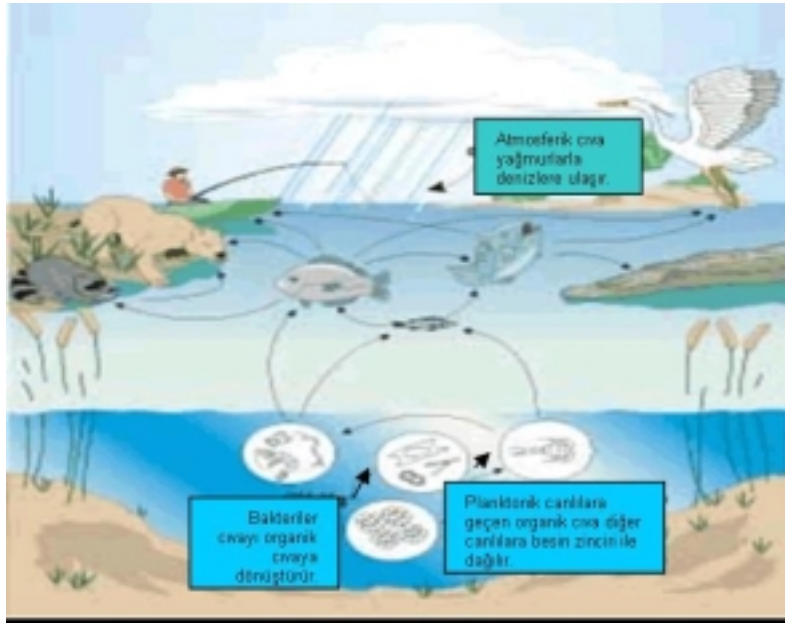
Konsantrasyonun günümüz dünyasında maksimum olduğu zaman 1984 yılı olmakla birlikte, EPA'nın cıva miktarlarını düşürme yolunda aldığı kararlar, ve Temiz Hava Yasası, Kuzey Amerika'daki cıva konsantrasyonlarını önemli ölçüde düşürmekte olduğunu göstermektedir¹⁴⁶.

Normal şartlarda, cıva maruziyeti besinlerle, özellikle balık gibi, cıvanın akümüle olup yüksek değerlere çıkması durumunda gerçekleşmektedir. İnsan sindirim sisteminde cıva yüksek oranlarda emilmemekle beraber, uzun süreler boyunca tüketilmesi kümülatif etkilere yol açmaktadır.

Genel olarak normal yaşamını süren bir insanın solunum yoluyla havadan 1 µg/gün, sudan 2 µg/gün'den daha az, yemeklerden ise yaklaşık 20 µg/gün cıvaya maruz kaldığı hesaplanırken, diyetteki balığın boyutuna göre balıklardan maruziyet 75 µg/gün'e kadar çıkmaktadır. Yaklaşık maruziyet dozlarından da

anlaşılabileceği gibi, cıvanın balıklarda biyoakümülyasyon potansiyeli nedeniyle balıklarda bulunan cıva konsantrasyonu, en dikkat çeken maruziyet yolu olmaktadır¹⁰⁹.

Nehirlere ve endüstriyel atık sulara karışan elementel ve inorganik cıva bileşikleri; bunun yanında atmosferik cıva, yağmurlarla birlikte denizlere ve okyanuslara karışmaktadır. Sucul sistemde cıvanın birikmesinin asıl sebebi, denizdeki küçük bakteriler tarafından cıvanın organik türlere çevrilmesi, bu organik cıvanın da yüksek lipofilitesi nedeniyle organizma dokularında birikmesi nedeniyledir. Şekil 11'de de şematize edildiği gibi, organik cıva önce planktonların yapısına, ardından da planktonlarla beslenen canlıların bünyesine geçer. Besin zinciriyle balıklara ve onları tüketen daha büyük balıklarda artan miktarlarda cıva konsantrasyonlarına ulaşılır. Bu balıkların özellikle insanlar ve diğer besin zincirinin üst halkalarında yer alan canlılar tarafından tüketilmesi, cıvanın toksik etkilerinin ortaya çıkması ile sonuçlanabilmektedir¹⁰⁹.



Şekil 11: Sucul çevrede cıva döngüsü.

Cıva toksisitesinin ilk zamanlardan beri farkında olunduğu, Romalıların yalnız köleleri cıva madenlerinde çalıştırmışından anlaşılmaktadır. Cıva ve tuzlarının,

batı dünyasında Paracelsus'un sifilis tedavisinde birlikte tüm hastalıklara çare olarak görülmüş ve günümüze kadar laksatif ve topikal antiseptik olarak tedavide oldukça geniş yer bulmuştur. Fakat günümüzde pratik bir önemi yoktur¹⁴⁴.

Biyokimyasal toksikolojisi bileşiğinin kimyasal formuna ve vücuda giriş yoluna göre değişiklik gösterir. Divalent inorganik cıva, monovalent bileşiklerden daha çok çözünür olup, oral absorpsiyonu daha yüksek ve hızlıdır. İnorganik cıva, deriden ve mukoz membranlardan kolaylıkla emilir. Elementel cıva yağda çözünebilir olduğu için deriden absorbe olurken, gastrik mukozadan oldukça düşük, %0.01'den daha az emilmektedir¹⁴⁸.

Akut cıva zehirlenmesi, hem organik hem de inorganik cıva türevlerinin oral alımından sonra meydana gelebilmektedir. Elementel cıvanın buharının solunması da akut toksisite yol açabilmektedir. Alkil cıva bileşiklerinden ve metalik cıva dumanlarının solunması sonucu zehirlenmelerde, pnömonitis, letarji veya huzursuzluk, ateş, öksürük, siyanoz, kusma ve diyare gibi karakteristik semptomlar görülür. Zehirlenmenin sistemik etkileri, birkaç saat içinde başlayıp günlerce devam edebilir, bazı durumlar ölümle sonuçlanabilir¹⁴⁸.

Cıvanın en önemli toksik etkisi böbrekler üzerindedir. Cıvanın neden olduğu böbrek lezyonları büyük ölçüde tübüler epitelyum ile sınırlı kalırken, glomeruli de hasar görür. Dolaşıma cıvanın geçmesinden birkaç dakika içinde böbrek hasarı ortaya çıkar. İlk oluşan cevap, eğer yeterli dolaşım devam edebilirse, diürez olur. Ardından, ağır renal hasara bağlı olarak, oligoüri ve sonuç olarak da anüri oluşur¹⁴⁸.

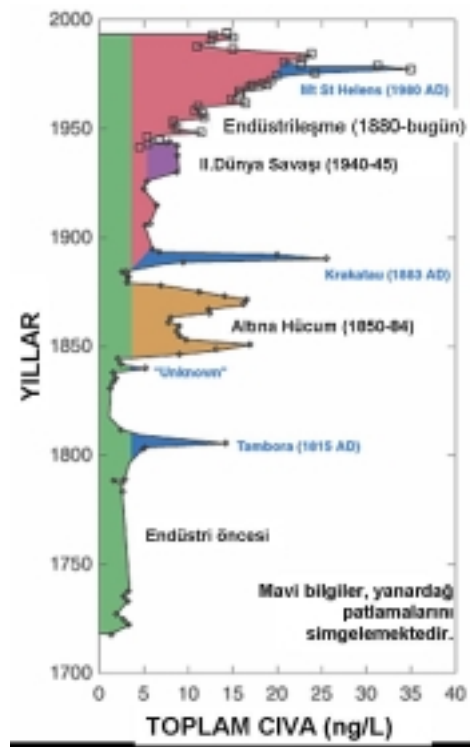
Cıvanın genotoksik etkileri hücrede tubuline bağlanıp etkinliğini bozması, bu nedenle de hücre bölünmesinde sayısal anormallikler nedeniyle mutasyona yol

açması yolu gerçekleştiğine inanılmaktadır. Bunun dışında cıvanın oksidatif hasar oluşturarak DNA hasarını indüklediği de düşünülmektedir¹⁴⁹.

Cıva konsantrasyonları yüksekten düşüğe doğru sıralanacak olursa, en başta böbrek, ardından sırasıyla kanda, karaciğer ve beyindedir. Normal insan kan seviyeleri 0.5 – 1.0 µg/ml civarındadır¹⁴⁸.

Cıva iyonları potent enzim inhibitörü, protein çöktürücü ve koroziv olarak etkirler. Cıva, arsenik gibi, sülfidril gruplarına yüksek afinite gösterir; fosforil, karboksil ve amin, amid gruplarına bağlanabilir.

Amerika Birleşik Devletlerinde Çevre Koruma Örgütü (EPA), bir çok alanda cıvanın kullanımına sınırlama getirerek yıllık atık miktarlarını sınırlandırmayı amaçlamaktadır¹⁴⁴.



Şekil 12: Buz örneklerinde cıva ölçümü sonuçları ile dünyadaki olaylarla

bağdaştırılması¹⁴⁷. (yeşil: doğal cıva konsantrasyonu; mavi: volkanik olaylar; kırmızı: endüstriyel işlemler nedeniyle salınan cıva konsantrasyonlarını simgelemektedir. Değerler Kuzey Amerika için geçerlidir.)

Cıva bileşikleri ile ilgili, en korkunç endüstriyel kaza, metalik cıvanın Japonya'daki Minamata Körfezi'ne salınması nedeniyle gerçekleşmiştir. Gübreleme ve sonrası petrokimya ürünleri ile uğraşan Chisso Kurumu, 1932-1968 yılları boyunca, körfezin kirlenmesinden sorumlu bulunmuştur. Minamata Hastalığı olarak da bilinen ve şiddetli cıva zehirlenmesine bağlı çeşitli deformitelerin oluşması ve ölümle karşılaşılan bu durumdan 3000'den fazla kişinin etkilendiği hesaplanmıştır¹⁴⁴.

Minamata hastalığı ilk olarak 1956 yılında, Japonya'nın Kumamoto yerleşkesinde açığa çıkmıştır. Cıva denizde metillenip organik halde, Minamata Körfezindeki ve Shiranui Denizindeki balıklarda, istiridye ve midye gibi kabuklularda biyoakümüle olduktan sonra, bölgede yaşayanlar tarafından tüketilmiştir. Minamata Hastalığı, şiddetli cıva zehirlenmesine bağlı gelişen nörolojik bir sendromdur. Semptomları arasında el ve ayakların uyuşması ve bükülmesi, genel kas güçsüzlüğü, görüş alanının azalması, duyma ve konuşma bozuklukları olup, aşırı vakalarda ise, semptomların ortaya çıkmasından birkaç hafta sonra paraliz, koma ve ölüm meydana gelmektedir¹⁵⁰. Nitekim Minamata Körfezinin cıva bileşikleri ile kirlenmesinden dolayı 1784 kişi yaşamını yitirmiştir¹⁵⁰.

Minamata Körfezindeki epidemikde, körfezden avlanan balıklardaki ortalama cıva konsantrasyonu 11mg/kg yaş ağırlık olarak ölçülmüştür¹⁰⁹.

II.15.2. Cıvanın Karsinojenitesi

Değerlendirmeler, cıva ve cıva bileşikleri için insanda karsinojenite verisi sınırlı olduğu yönündedir¹⁵¹. Deney hayvanları ile yapılan sınırlı sayıda çalışmalarda ise, cıva ve cıva bileşiklerinin renal adenom ve adenokarsinomaları yükselttiği saptanmıştır.

IARC, metalik ve inorganik cıvayı Grup 3'e, yani "insandaki karsinojenik etkileri yönünden sınıflandırılabilir olmayanlara" sokarken, metil cıva bileşiklerini Grup 2B'ye, "insanda muhtemelen karsinojenik etkili olanlara" almıştır¹⁵¹.

II.15.3 Sucul Çevrede Cıva

Anorganik cıva bileşikleri, besin zincirinde birikmez. Cıvanın metilasyonu, başlıca akarsu ve okyanus sularında oluşur. Bunun dışında balıkların bağırsak içeriğinde ve balıkların dış derilerinde anorganik cıvanın metil cıvaya dönüştüğü gösterilmiştir¹⁹. Metil cıva bileşiklerinin (CH_3Hg^+) ve $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$, *Desulfovibrio desulfuricans* LS gibi sularda yaşayan bakterilerce inorganik cıvadan bakteriyel sentezle oluştuğu gösterilmiştir¹⁵².

Bu aşamadan sonra metil cıvayla karşılaşan deniz kabukluları ve balıklar, vücutlarında oldukça toksik olan bu metil cıvayı biriktirme eğilimine girerler (Şekil 11). Balıklara akümüle olan cıva, besin zinciri boyunca artar ve besin zincirinin son halkası olan insanlarda toksik seviyeler oluşturacak kadar artabilir^{158, 109}. Yapılan araştırmalar metil cıvanın, balık dokusundaki birikme oranı suya göre 10.000 ila 100.000 kat daha fazla olduğunu ortaya koymaktadır¹⁹. Bunun en güzel örneği, bölüm II.15.1'de bahsedilen Minamata Körfezinde yaşanan olaylardır. Bu bölgeye salınan cıvanın balıklarda birikmesi nedeniyle, bu balıkları tüketen kişilerde başta ölüm olmak üzere çok çeşitli toksik etkiler belirlenmiştir.

Metil cıva ile elementel cıvanın çok küçük ve doğmamış çocuklarda toksik etkilerini daha belirgin olarak gösterebilmeleri nedeniyle Amerikan EPA ve FDA dernekleri, hamile ya da çocuk doğurmayı planlayan kadınlara ve de küçük çocuklara, haftada bir balıktan daha fazla tüketilmemesini önermektedir¹⁵³.

Uzun dönem cıva maruziyeti ile balıklarda oluşan toksisitenin ana kaynağı santral sinir sistemi olup, balık davranışlarında instabilite, beslenme bozuklukları ve tepki bozukluklarına yol açabilmektedir. 16-48ug/g'ın üstünde uzun dönem maruziyet alabalıklarda gelişimin geriliğine, deri rengi, ağırlık ve davranışlar üzerinde olumsuz etkilere yol açmıştır¹⁵⁴.

II.15.4. Türkiye’de İzin Verilen Sınır Değerler

Çevre ve Orman Bakanlığının, Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliğine göre, deniz sularında cıvanın 0.004 mg/l'den daha az bulunması gerekirken, aynı yönetmeliğin petrol sanayi atık sularının alıcı ortama deşarj standartları geri hidrokarbon üretim tesislerinde ölçüm sonucunda 0.05 mg/l'nin altında olması gerekmektedir¹³⁰. Türk Gıda Kodeksinde ise, aroma maddeleri yapısında cıvanın değerinin 1 mg/kg'ı aşmaması gerektiği bildirilmiştir¹³¹. Cıvanın, işyeri havasında bulunmasına müsaade edilen azami miktarı 0.1 mg/m³; cıvanın organik bileşikleri için bu miktar 0.01 mg/m³'dür¹²⁵.

II.16. Türkiye’de Sucul Çevrede Yapılan Metal Ölçümleri:

Su kaynakları oldukça geniş olan Türkiye'nin, bir çok nehir, göl ve denizinde yaşayan canlılarda sucul kirlenmenin izlenmesi amacıyla çeşitli balık türlerinde metal ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar çoğunlukla o bölgede yaşayan balık türlerinde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaların sonuçları tablo 8'de özetlenerek sunulmuştur.

Tablo 8: Türkiye'de çeşitli bölgelerinde ve farklı balık türlerinde yapılan Cd, Cr, Hg ve Pb metal ölçüm sonuçlarıdır. (Verilen değerler µg/g kuru ağırlık üzerindendir).

Bölge:	Cd:	Cr:	Hg:	Pb:	Canlı Türü:	Ref.:
Beyşehir gölü	0.578	0.245	0.012	0.348	Kefal (L. Cephalus)	155
	0.543	0.308	0.022	0.03	Aynalı sazan, (C. carpio)	
	0.643	0.260	0.023	0.678	L. lucioperca	
	0.598	0.235	0.028	0.415	Kilizbalığı (Tinca tinca)	
Yarseli Baraj Gölü				ilkbahar: 1.8±0.4 yaz: 1.0±1.2 sonbahar: 1.5±0.6 kış: 1.9±0.2 genel: 1.5±0.5	Havuz sazanbalığı, (Carassius carassius, crucian carp)	156
Sakarya Nehri havzası	Kasım95: 0.221 Şubat96: 0.135 Mayıs96: 0.119 Ağust96: 0.177			Kasım95: 0.329 Şubat96: 0.351 Mayıs96: 0.169 Ağust96: 0.183	Aynalı sazan (Cyrprinus carpio)	157
	Kasım95: 0.181 Şubat96: 0.147 Mayıs96: 0.114 Ağust96: 0.229			Kasım95: 0.372 Şubat96: 0.308 Mayıs96: 0.095 Ağust96: 0.152	Karakeçi (Barbus plebejus, barbel)	
Akdeniz kuru ağırlık	0.37±0.11	1.24±0.46		5.54 ±0.74	İzmarit-çipura (Sparus auratus, gilthead)	16
	0.37±0.08	2.21±1.09		6.12±1.25	Gümüş balığı (Atherina hepsetus, sand smelt)	
	0.66±0.08	1.56±0.30		5.32±2.33	Has kefal (Mugil cephalus, grey mullet)	
	0.79±0.17	2.42±0.47		4.27±1.03	Öksüz balığı (Trigla cuculus, red gurnard)	
	0.55±0.08	2.22±0.54		5.57±1.03	Sardalye (Sardina pilchardus, sardine)	
	0.45±0.06	1.70±0.42		2.98±0.03	Zargana balığı (Scanberesax saurus, saury pile)	
Mersin Körfezi	2.12	<-- (bulunmuştur yüksek değerler) →		185.39	Çeşitli balık türlerinde genel bir analiz	142
Yumurtalık sahili, İskenderun Körfezi	Ocak: 2.1±0.62 Nisan: 2.5±0.47 Haziran: 3.5±1.65 Eylül: 2.7±0.64			Ocak: 14.0±2.72 Nisan: 17.2±1.63 Haziran: 26.6±1.89 Eylül: 17.8±1.14	Dil balığı (Solea solea, common sole)	158
	Ocak: 2.4±0.88 Nisan: 2.2±0.44 Haziran: 3.2±1.35 Eylül: 2.1±0.97			Ocak: 13.6±2.15 Nisan: 17.6±1.63 Haziran: 22.1±1.85 Eylül: 15.6±1.78	İzmarit, çipura (Sparus aurata, gilthead seabream)	

Bölge:	Cd:	Cr:	Hg:	Pb:	Canlı Türü:	Ref:
	Ocak: 3.2±1.14 Nisan: 2.7±0.87 Haziran: 5.0±0.86 Eylül: 3.0±0.74			Ocak: 15.4±1.44 Nisan: 16.2±0.97 Haziran: 28.6±2.15 Eylül: 16.5±1.76	Penaeus semiculatus	
Güllük Körfezi, Ege Denizi	<0.01–0.04			<0.02–0.4	Dicentrarchus labrax	159
Karadeniz, Sinop, İçliman	Mayıs00: 0.11±0.004 Ağustos00: 0.30±0.05 Kasım00: 0.20±0.04 Şubat01: 0.19±0.05			Mayıs00: 0.67±0.03 Ağus00: 0.88±0.01 Kasım00: 0.72±0.04 Şubat01: 0.74±0.03	Altınbaş kefal (Mugil auratus)	160
Atatürk Baraj Gölü	Tespit edilebilir limitlerin altında		Tespit edilebilir limitlerin altında	Tespit edilebilir limitlerin altında	Chondrostoma regium Acanthobrama marmid Capoetta trutta Chalcalburnus mossulensis Carasobarbus luteus Sazan, cyprinus carpio	161
Seyhan Nehri	Kasım: 3.4±0.24 Ocak: 2.9±0.20 Nisan: 3.2±0.35 Temmuz: 5.9±0.52			Kasım: 7.1±0.59 Ocak: 6.7±0.67 Nisan: 7.7±0.75 Temmuz: 10.9±0.97	Capoeta barroisi	162
Çine Deresi, Aydın	0.0058 ±0.0040			0.312 ±0.345	Güneş balığı (Lepomis gibbosus)	163
Tokat'daki çeşitli göller	0.1-1.3	0.6-1.6		0.7-2.4	Çeşitli balıklar için bulunmuş ortalama değerler	6
İskenderun Körfezi	1.310	1.654		3.474	Brushtooth lizardfish, Saurida undosquamis	7
	0.831	2.719		1.808	Tekir balığı (red mullet, Mullus barbatus)	
	1.341	1.309		2.314	İzmarit, çipura (Sparus aurata)	
Samsun, Orta Karadeniz	0.35±0.05			0.52±0.16	Tirsi balığı (shad, Alosa caspia)	164
	0.20±0.03			0.38±0.02	Hamsi (European anchovy, Engraulis encrasicolus)	
	0.47±0.10			0.85±0.16	İstavrit (Trachurus trachurus)	
	0.09±0.02			0.22±0.04	Uskumru (Sarda sarda)	
	0.30±0.15			0.74±0.11	Çaça balığı (Clupea sprattus)	
Ege Denizi genelinden farklı	0.25 ± 0.05			0.85 ± 0.14	Tekir balığı (Mullus barbatus) max değerlerdir	17

Bölge:	Cd:	Cr:	Hg:	Pb:	Canlı Türü:	R e f :
noktalardan	0.4 ± 0.06			0.8 ± 0.26	Merlos balık (Merluccius merluccius) max değerlerdir	
	0.2 ± 0.03			0.8 ± 0.23	Boops boops, max değerlerdir	
İzmir Körfezi	1996: 0.13–2.4 1997: 0.53–5.7 1998: 0.77–1.6 2000: 0.38–9.4 2001: 1.1– 10 2002: 0.10–10 2003: 0.83–2.2		1996: 182– 259 1997: 66– 399 1998: 27– 285 2000: 14– 355 2001: 18– 276 2002: 34– 520 2003: 101– 209	1996: 2.6–125 1997: 29– 349 1998: 8.0–478 2000: 16– 241 2001: 36– 303 2002: 17– 300 2003: 15– 103	Tekir balığı (Mullus barbatus)	1 4 3
	1996: 0.44–2.2 1997: 1.1– 2.3 1998: 1.2– 3.5 2001: 1.8– 2.1 2002: 0.10–3.5		1996: 17– 159 1997: 5.2– 95 1998: 11 –212 2001: 4.5– 91 2002: 10– 113	1996: 46– 388 1997: 110– 364 1998: 2.0–341 2001: 90– 491 2002: 1.0–218	Dilbalığı (Solea vulgaris)	
Ege Denizi genelinden farklı noktalardan	2.49 (0.57–4.5)		90.56 (16–200)	126.36 (40–207)	Tekir balığı (Mullus barbatus)	1 6 5
İskenderun Körfezi		1.46±0.53		7.45± 3.44	Has kefal (Mugil cephalus)	1 6 6
		1.28±0.42		1.03 ±0.49	İstavrit (Trachurus mediterraneus)	
İskenderun Körfezi (yaş ağırlık üstünden) 3 farklı bölge için sonuçlar verilmiştir		1.14±0.64 1.71±0.92 1.42±0.70		3.59±1.79 6.42±2.82 10.02±2.86	Has kefal Grey Mullet (Mugil cephalus L.)	1 6 7
		0.86±0.38 0.99±0.69 1.08±0.37		4.84±1.67 7.33±1.85 6.39±2.49	Çipura Sea Bream (Sparus aurataL.)	

Yurdumuzda yapılan bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, endüstrinin yoğun ve aktivitenin yoğun olduğu körfezlerde yaşayan balıklardaki çalışmalarda Hg konsantrasyonunun 399 µg/g, Cr'un 1.45 µg/g, Pb'nun 491 µg/g ve Cd'un 2.5 µg/g seviyelerine çıkabildiğini göstermektedir^{143, 165, 166}. Daha çok tarım sonucu kirlenmenin yaşandığı Seyhan Nehri'nde kadmiyumun, endüstrinin yoğun olduğu körfezlere göre daha yüksek olması (5.9 µg/g) dikkat çekici olmakla beraber, çoğunlukla Tablo 8'den de anlaşılacağı gibi, gerek şehirleşme gerekse ticaretin yaşandığı bölgelerdeki metal kirliliği önemli görülebilir.

III. GEREÇLER ve YÖNTEM

III.1. Balıkların Avlanması:

İzmir İline bağlı Aliağa Körfezinde rafineri bölgesinden ve örneklerin kıyaslanabilmesi için rafineri bölgesine göre uzak ve kirlenmenin olmadığı Foça'dan, balıkçılar tarafından avlanan kefal balıklardan (*Liza saliens*) faydalanılmıştır. Balıklar, bölge balıkçıları tarafından özel kefal ağları ile avlanmış balıklar olup, avlanma sırasında özel bir yöntem gerekmemiştir.

Avlanma alanı olarak seçilen A, I ve G bölgeleri petrol rafinerisinin hemen iç alanında yer almakta olup, I ve G bölgesinde rafineride gemilerin yanaştığı alanlardandır. B ve D bölgeleri körfez içinde fakat petrol rafinerisinden nispeten uzak alanlardır. Kontrol bölgesi olarak seçilen Foça, Aliağa Körfezi dışında yer almaktadır, temiz olduğu düşünülen bu bölge hakkında bir kirlilik verisi mevcut değildir. Balıkların avlandığı bölgeler Şekil 13 üzerinde gösterilmiştir.

B ve D bölgeleri, Aliağa Körfezi içinde fakat rafineri bölgesi dışında kalan, balıkların avlanması planlanan diğer alanlar olarak belirlenmiştir. Fakat bu planlanan bölgelerden balıkçılar tarafından yalnızca 1'er adet balık avlanması gerçekleştirilebilmesi, bu bölgelerin değerlendirme dışında kalmasına neden olmuştur.



Şekil 13: Aliğa Körfezinin Kuş bakışı görüntüsü üzerinde balıkların avlandığı bölgeler gösterilmiştir (B ve D bölgelerinden balık tutulması planlanmış ama bu bölgelerden kefal balığı avlanamamıştır).

III.1.1 Balıkların Karaciğer ve Kas Dokularının İzolasyonları ve Saklanması:

Avlanan balıklar kıyıda, boyları ve ağırlıkları ölçülüp numaralandırılmış ve kaydedilmiştir. Balıklar tricaine ile uyutulduktan sonra çalışmaya kadar canlı olarak korunmuşlar, karaciğer örnekleri ve kas dokusu örnekleri alınmıştır. Karaciğerler, 2ml'lik ependorflara konulduktan hemen sonra, laboratuara getirilene kadar sıvı azot tankında saklanmış; kas dokuları kesildikten sonra 50ml'lik falkon tüplere konulup, buz aküleri ile laboratuara getirilene kadar soğukta muhafaza edilmiştir. Laboratuarda deney zamanına kadar tüm dokular, -80°C'lik derin dondurucularda saklanmıştır.

III.2. Karaciğer Örneklerinin Homojenizasyonu ve Mikrozm Eldesi

Hücre proteinleri ile çalışma öncesi, alınan doku homojenize edilmeli ve ardından mikrozmolar elde edilmelidir. Protein tayini ve sonrasındaki çalışmalar elde edilen olan mikrozmolar üzerinden yapılmıştır.

III.2.1 Homojenizasyon için Gerekli Cihaz ve Malzemeler:

- Genel laboratuvar alet ve malzemeleri
- Üsten kefeli hassas terazi; doku ve kimyasal tartımında kullanılmıştır.
- Buzdolabı ve derin dondurucu(-20°C); kimyasalların ve stok çözeltilerin saklanması için kullanılır.
- Kar/Buz makinesi, mikrozmolar enzimlerin aktivitelerinin doğru ölçümü için tüm deney basamakları soğukta gerçekleşmesi gerekmektedir.
- Hızı ayarlanabilir homojenizatör, karıştırıcı ve homojenizasyon tüpü
- Küçük homojenizatör, büyük homojenizatörün yetersiz kaldığı durumlarda elle homojenizasyon yapmak için kullanılacaktır.
- Değişik hacimlerde otomatik pipetler
- Vorteks
- Soğutmalı ve hızı ayarlanabilir santrifüj aleti; santrifüj işlemi de soğukta gerçekleştirilmelidir.
- Deiyonize su elde etmek için, distile su cihazı ve mikrosmoz aleti.

III.2.2 Homojenizasyon Sırasında Kullanılan kimyasallar:

1. EDTA (etilendiamin tetraasetikası), NaOH (sodyum hidroksit), PMSF (Fenilmetilsülfonilflorit), izopropil alkol, BHA (Butilehidroksianisol), Kolik

asit (kolat), KCl (potasyum klorür), CaCl₂ (kalsiyum klorür). Tüm çözeltiler analitik saflıkta olup özellikleri bölüm III.7'de verilmiştir.

2. **Süspansiyon Tamponu (Suspension Buffer):** 2 ml 100 mM EDTA ile 90 ml soğuk dH₂O ve 10 ml soğuk gliserol karıştırılarak hazırlanır.
3. **Homojenizasyon solüsyonu:** Günlük olarak daha önce hazırlanmış stok çözeltilerden faydalanılarak, aşağıda verilen miktarlara uyularak hazırlanır.

<u>Stok</u>	<u>Alınan hacim</u>
100 mM EDTA	2 ml
100 mM PMSF	0,3 ml
100 mM BHA	0,2 ml
%10 kolat	0,5 ml
%1.3 KCl	177ml
dH ₂ O	20 ml
<u>son hacim:</u>	200 ml

III.2.3 Homojenizasyon Yöntemi:

1. Dokular tartılır, ağırlıklarının 3 katı homjenizasyon çözeltisi konur, homojenizatörde iyice homojen hale getirilir.
2. Elde edilen homojenatlar, 2⁰C'de, 25 dakika, 12000 G'de santrifüj edilir.
3. Sıvı kısım alınır, üzerine uygun miktar CaCl₂ eklenir, 2⁰C'de, 60 dakika, 20000 G'de santrifüj edilir.
4. Sıvı kısım alınır, üzerine uygun miktar gliserol eklenir. Küçük homojenizatör yardımıyla iyice karıştırılır, sitozol olarak etiketlenip - 80⁰C'de saklanır.

5. Pelletler üzerine 2.5ml'şer süspansiyon solüsyonu eklenir, bir miktar vortekslenip, 2⁰C'de, 75 dakika, 20000 G'de santrifüj edilir.
6. Sıvı dökülür, pelletler üzerine uygun miktar süspansiyon solüsyonu eklenir. Küçük homojenizatör yardımıyla iyice karıştırılır, "Mikrozom" olarak etiketlenmiş ependorflara bu sıvı boşaltılır. –80⁰C'de saklanır.

III.3 Karaciğer Örneklerinde Protein Tayini ve EROD Analizi

Karaciğer dokuları homojenize edildikten sonra Lowry metodu kullanılarak protein miktarları tayin edilmiştir. Lowry metodu, protein konsantrasyonlarını hassas ve basit olarak tayin edebilen ve biyokimya laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan bir metod olup, bazik bakır çözeltisi ile proteinlerin reaksiyona girmesi ile indirgenmesi sonucu oluşan mavi rengin, spektrofotometrik olarak 660nm'de ölçülmesine dayanmaktadır. Karaciğer örneklerinde yapılan protein tayini ve EROD analizleri, Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde gerçekleştirilmiştir.

III.3.1 Cihaz ve Malzemeler:

1. Bölüm III.2.1'de belirtilen genel laboratuvar alet ve malzemeleri kullanılmıştır.
2. Bazı reaktifler (örneğin folin) ışıktan bozulabilmektedir. Bunun için ışıktan koruyucu önlemler alınmalıdır, örneğin kullanılan cam malzemenin alüminyum folyo ile kaplanması.
3. UV spektrofotometresi.

III.3.2 Kullanılan Kimyasallar:

1. **Bazik Bakır Çözeltisi:** Sırasıyla aşağıda verilen örnekde olduğu gibi, sırasıyla reaktif I'den 1 pay, reaktif II'den 1 pay ve reaktif III'den 100 pay alınarak kullanımdan hemen önce taze olarak hazırlanıp kullanılır.

Reaktif I: %2 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1 pay)

2 gr $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ tartılarak, 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

Reaktif II: %2 $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (rochelle tuzu) (1 pay)

2 gr $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ tartılarak, 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

Reaktif III: %2 Na_2CO_3 (0.1 N NaOH içerisinde) (100 pay)

0,4 gr NaOH 100 ml'de çözülerek 0.1 N NaOH elde edilir.

2 gr Na_2CO_3 bir miktar 0,1 N NaOH içerisinde çözüldükten sonra son hacim 100 ml'ye tamamlanır. (yaklaşık 98 ml 0.1 N NaOH eklenir.)

2. **Lowry Reaktifi:** Hazır folin reaktifi distile suyla 1:1 oranında kullanımdan hemen önce seyreltilerek hazırlanır, karanlıkta saklanır.
3. **BSA(bovin serum albumin) Standartları:** 0.02 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.10 mg/ml, 0.15 mg/ml, 0.20 mg/ml konsantrasyonlarda BSA solüsyonları, daha önce hazırlanan stoktan seri seyreltme yapılır. (Örnek seyreltme: 1 mg/ml 'lik BSA stok hazırlanması: 10 mg BSA tartılır ve 10 ml dH_2O 'da çözülür.)

III.3.3 Protein Tayin Yöntemi:

1. Bir önceki basamakta elde edilen protein örnekleri 1/200 oranında seyreltilerek kullanılır. Bunun için, 0.25 ml mikrozom, 12.5 ml dH_2O ile seyreltilir, bundan 1 ml alınıp 3 ml dH_2O ile seyreltilir.

2. Protokol tablosu:

Tüp No:	Standart protein (ml)	Bilinmeyen protein (ml)	Distile su (ml)	Bazik bakır (ml)	Lowry (folin) reaktifi (ml)
1 – 1' (kör)	---	---	0,5	2,5	0,25
2 – 2' (Std1:0,02mg)	0,5	---	---	2,5	0,25
3 – 3' (Std2:0,05mg)	0,5	---	---	2,5	0,25
4 – 4' (Std3:0,10mg)	0,5	---	---	2,5	0,25
5 – 5' (Std4:0,15mg)	0,5	---	---	2,5	0,25
6 – 6' (Std5:0,20mg)	0,5	---	---	2,5	0,25
7 – 7'	---	0,1	0,4	2,5	0,25
8 – 8'	---	0,25	0,25	2,5	0,25
9 – 9'	---	0,5	---	2,5	0,25

3. Tabloya (protokol) bakılarak deney tüplerine çözeltiler eklenir. Bazik bakır çözeltilisinden sonra 10 dakika beklenir.
4. Taze olarak hazırlanan folin reaktifi konulur, tüpler karıştırılıp 10 dakika 50°C'lik su banyosunda bekletilir.
5. Tüpler 660 nm'de spektrofotometrede okutulur. Sonuçlar değerlendirilir.

III.4 Karaciğer Örneklerinde EROD Analizi

EROD (7-etoksiresorufin-O-deetilaz) analizi, bulunan protein miktarları üzerinden yapılmıştır. EROD aktivitesi kelimesi substrat 7-etoksiresorufin (7-ER)'den ürün olarak resorufin oluşturmak için CYP1A kontrollü deetilasyonun hızını betimlemektedir. Bu substrata karşı sahip olunan katalitik aktivite, ortamda bulunan enzim miktarı olarak; dakikada, mg protein başına oluşan resorufin konsantrasyonu (mol/mg/dakika) cinsinden, spektrofotometrik olarak ölçülmektedir.

III.4.1 Cihaz ve Malzemeler:

1. Bölüm III.2.1’de belirtilen genel laboratuvar alet ve malzemeleri kullanılacaktır.
2. Hamilton pipeti (Deney hassasiyetinin artırılması amacıyla, bir kimyasalın deney ortamına enjeksiyonunda kullanılacaktır.)
3. Varian Cary Eclipse marka florometre cihazı
4. Cihaza bağlı bilgisayar ve yazıcı

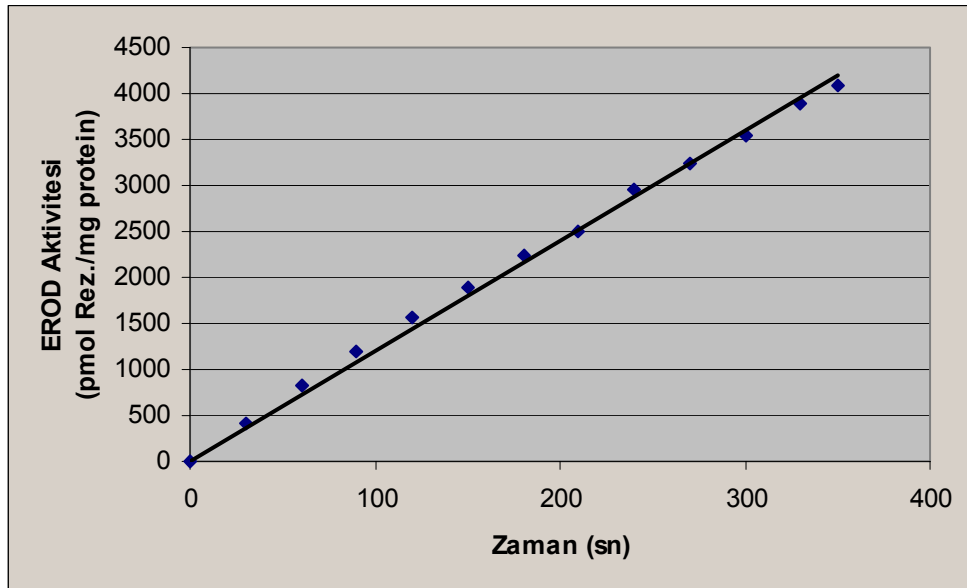
III.4.2 Kullanılan Kimyasallar:

1. Protein solüsyonları: Bir önceki basamakta, her doku örneği için bulunan protein miktarları üzerinden hazırlanır. EROD deney ortamında 1mg/ml protein bulunması gerekmektedir (deney koşullarına göre değiştirilebilir). Bu nedenle her örnek için kullanılacak protein miktarları 1/protein miktarı olarak hesaplanabilir.
2. **NADPH**(nikotinamid adenin dinükleotid fosfat): Her ölçümde 10 µl 10 mM NADPH kullanılmaktadır.
3. **EROD tamponu**: 100 mM Tris, 100 mM NaCl, pH=8 olacak şekilde çözelti hazırlanır.
4. **7-ER**(7-etoksiresorufin): 7-ER’in EROD tamponu içinde %2’lik solüsyonu hazırlanır, her ölçümde 150 µl kullanılır.
5. **BSA**(bovin serum albumin): Stoktan hareketle 12mg/ml’lik BSA çözeltisi hazırlanır.
6. NaCl: en az analitik saflıkta olmalıdır.

III.4.3 EROD Yöntemi:

1. Florometre küvetine sırasıyla 250 µl EROD tamponu, 100 µl NaCl, 100 µl BSA, 100 µl analizi yapılacak protein çözeltisi, 290 µl dH₂O mikropipetlerle konulur.
2. NADPH şırınga ile küvetteki sıvının içine daldırılarak enjekte edilir.
3. Üstüne 7-ER konulur, ters düz edilir, hemen spektrofotometrik ölçüm yapılır. (NADPH ortama konulunca reaksiyon başlamakta olduğu için son basamakla hızlı yapılır).
4. Son olarak, reaksiyon karışımına iç standart olarak rezorufinin bilinen miktarı eklendi ve floresantaki artış kaydedilir. Enzim aktiviteleri, rezorufin eklenmesinin neden olduğu floresans artış kullanılarak hesaplanır.
5. Reaksiyon Cary Eclipse Florometre ile 2 dakika boyunca takip edilip, sonuçlar bilgisayar yazılımları aracılığıyla değerlendirilir.

Şekil 14: Liza saliens karaciğer EROD aktivitesinin örnek kalibrasyon eğrisi



III.5 SDS-PAGE ve Western Blot

EROD aktivitesinin ölçümü yanı sıra, elde edilmiş olan proteinler, SDS-Poliakrilamid jele uygulanarak Western Blot analizleri yapılmıştır. Deney, proteinlerin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jele uygulandıktan sonra elektrik akımı ile membrana geçirilmesi ve membrandaki proteinlere spesifik antikorların bağlanması esasına dayanır. Antikorların tespit edilmesi ile protein olup olmadığı, çıkan bantların kalınlığının kontrol bantlarıyla karşılaştırılmasıyla da CYP1A1 proteinin ekspresyon seviyesinin düzeyi hakkında bilgi edinilmeye çalışılmıştır.

III.5.1 Cihaz ve Malzemeler:

1. Bölüm III.2.1'de belirtilen genel laboratuvar alet ve malzemelerinden yararlanılmıştır.
2. Dikey Jel Elektroforezi
3. Elektroforez Güç Kaynağı (Thermo EC 250-90)
4. Elektroforetik Transfer Aparatı (western blot apereyi)
5. Whatman filtre kağıtları
6. pH ölçer.

III.5.2 Kullanılan Kimyasallar:

1. **10X Elektrod Yürütme Tamponu:** 15 gr Tris 72 gr gliserin içerisinde çözülür ve 500ml'ye dH₂O ile tamamlanır.
2. **1X Elektrod Yürütme Tamponu:** 100 ml 10 x elektrot yürütme tamponundan alınır; üzerine dH₂O eklenir, içine 1 gr SDS ilave edilir.

3. **Stok Ayırıştırma Jel Tamponu:** 18,15 gr Tris ~ 60 ml dH₂O'da çözülür ve 10 M HCl ile pH'sı 6,8'e ayarlanır, son hacim dH₂O ile 100 ml'e tamamlanır.
4. **Stok Sıkılaştırma Jel Tamponu:** 6 g Tris, yaklaşık 40ml dH₂O'da çözülür, pH'sı 10 M HCl ile 6,8'e ayarlanıp 100ml'ye dH₂O'ye tamamlanır.
5. **Stok Jel Solüsyonu:** 29,2 gr Akrilamit az suda çözülür; 0,8 gr BIS (N,N,metilen_bis_akrilamit) eklenir ve solüsyon dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır ve daha sonra solüsyon filtre kağıdından süzülür.
6. SDS(sodyum dodesil sülfat), amonyum persülfat(katalizör), HCl, MgCl₂, ZnCl₂, NaCl.
7. **4 x Numune Seyreltme Tamponu** (SDS indirgenme tamponu):

Stok çözeltiler:	Alınan hacim:
1M Tris-HCl, pH=6,8	2,5 ml
Gliserol	4,0 ml
β-merkaptoetanol	2,0 ml
SDS	0,8 gr
Bromfenol blue	4 mg
Total dH ₂ O	10 ml

Tamponun pH'sı son hacme tamamlanmadan önce 6,8'e titre edilir. 1 M HCl ile titrasyon yapılır.

8. **Stok moleküler ağırlık standart çözeltileri:** BSA, Katalaz, Ovalbumin, Cytochrome C, Phosphorylase b, Glyceraldehit 3 PDH'ın 1mg/ml'lik stokları hazırlanır, derin dondurucuda saklanır, aşağıdaki oranlara göre;

MA:

Cytochrome c	11700	6 µl
Glyceraldehit 3 PDH	36000	5 µl
Ovalbumin	45000	6 µl
Katalaz	60000	4 µl

BSA	66000	4 µl
Phosphorylase b	97400	10 µl
		10 µl dH ₂ O
		15 µl 4xSDB (3x1)

→ küçük tüpe belirtilen hacimlere konulup, 2 dakika kaynatılarak hazırlanır. → deney düzeneğine hamilton pipeti ile 10 µl uygulanır.

9. Jel Polimerizasyon Çözeltilerinin Hazırlanması

İçerik:	Ayrıştırıcı jel (%8,5) Stacking jel (%4)	
stok jel solüsyonu	8,5 ml	1,5 ml
dH ₂ O	13,55 ml	5,88 ml
ayrıştırıcı jel tamponu	7,5 ml	---
stacking jel tamponu	---	2,5 ml
%10 SDS	0,4 ml	0,16 ml
Katalizör	0,15 ml	0,075 ml
Temed	0,017 ml	0,014 ml
Son hacim:	30 ml	10 ml

10. **Boyama/İşaretleme (Staining) Solüsyonu:** 0,2 gr Coomasie Pırlanta mavisi R250, 15 ml MetOH'de çözülür, üzerine 35 ml MetOH ve 12 ml asetik asit eklenip, son hacim dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.

11. **Temizleme (Destaining) Solüsyonu:** 30 ml MetOH, 7 ml asetik asit, dH₂O ile 100ml'ye tamamlanır.

12. **Transfer Tamponu:** 350 ml 10X Elektrod Yürütme Tamponu, 700 ml MetOH 3,5L'ye dH₂O ile tamamlanır. Son hacimin %0.015 olacak şekilde SDS eklenmelidir.

13. **TBST solüsyonu:** 20 ml 1 M Tris-HCl, pH=7.4, 29.44 gr NaCl, 0.5 ml Tween 20 karıştırılıp, 1L'ye dH₂O ile tamamlanır.

14. **1 M Tris-HCl, pH=7.4:** 12.1 gr Tris, 30 ml dH₂O'da çözülür. 1 M HCl ile pH=7,4'e titre edilir, son hacim dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.

15. **Blocking Solution (%5):** Sigma P-4739 phospahte buffered saline with %5 non-fat dry milk, pH=7.3'den 1 paket, 100 ml dH₂O'da çözülür. Üzerine 0.5 ml Tween 20 eklenir.
16. 1'ncil antikor(1/5000): 100 ml blocking solution içine 0,625 ml 1'ncil antikor konur.

Renklendirme Solüsyonu (A+B+C)

- Solüsyon A

2,67 ml 1,5 M Tris HCl, pH=8,8

4,0 ml 1 M NaCl

0,82 ml 100 mM MgCl₂

0,04 ml 100 mM ZnCl₂

0,096 ml DEA →dietilenamin

12,2 mg NBT →nitrobluetetrazolum

dH₂O ile 40 ml'ye tamamlanır.

→ son hacme tamamlanmadan önce pH'sını sature Tris ile 9,55'e ayarlanır.

- Solüsyon B

1 mg phenazine methosulfate / 0,5 ml dH₂O ependorfta hazırlanır.

- Solüsyon C

5,44 mg BCIP / 0,136 ml N,N-dimethylformamide ependorfta hazırlanır.

→ BCIP'ı N,N-dimethylformamide'de çözmek zor, onun için, solüsyon

A'nın içine atabilirsın onu.

→ Solüsyon A ve Solüsyon C karıştırılır, Solüsyon B'den 0,268 ml eklenir.

17. Kullanılan tüm kimyasallar saflığı %99'dan daha fazladır olup, özellikleri bölüm III.7'de verilmiştir.

III.5.3 Yöntem:

1. EROD aktivitesi yüksek olan örnekler seçilir.
2. 1 x yürütme tamponu ile alete ait vakum plastiği ve 'spacer' çubukları ıslatılır. Cam düzeneği kapatılır, kısıkaçlarla sıkıştırılır. Alete ait "tarak" takılıp, cam üzerine işaretlenir.
3. Ayırıştırma Jel polimerizasyon çözeltisi hazırlanıp (jel üzerine APS (katalizör) ve Temed (aktivatör) eklenmesiyle polimerleşme başlar) camlar arasına, işaretli yere kadar solüsyon dökülür. İzopropil alkol ilave edilir, polimer düzleştirilir. Polimerleşme tamamlanana kadar beklenir.
4. Stacking jel polimerizasyon çözeltisi hazırlanır, seperating jelin üstüne pipetle, dışarı taşana kadar doldurulur.
5. Tarak dikkatlice sisteme sokulur. Tarağın her bir dişi, bir 'kuyucuğa' karşılık geleceği için, bu dişlere cam üstünden numaralar verilir. Polimerleşme sonrası tarak çıkarılır.
6. Kısıkaçlar çıkarılır, sistem elektroforez sistemine yerleştirilir.
7. Hazırlanan numune ve standart çözeltiler, Hamilton pipeti ile, kuyucuklara yüklenir.
8. Sistem, 8 mAmperde, 90 voltta, geceboyunca yürütülür.
9. Süre sonunda Jel alınır 2'ye bölünür, 1 bölümü elektroforez staining solüsyona yatırılır. 1, 1.5 saat çalkalanır. Diğer bölüm western blotting için ayrılır.
10. Boyandıktan sonra jel bol çeşme suyu altında yıkanır.
11. Jel, de-staining solüsyonuna alınır. Geceboyunca bu solüsyonda bekletilir.
12. Bantların görülmesi beklenir.
13. Diğer jel ise, transfer tamponu içeren bir kaba aktarılır ve 20 dakika çalkalanır.

14. Bu jelin boyutuna uygun olacak şekilde PVDF membran kesilir, absolue metanol'e sokulup, ısıtılır. Ardından bol dH₂O ile membran iyice yıkanır.
15. Membran, içinde transfer tamponu bulunan bir kaba alınır, 5 dakika bekletilir.
16. Western blot sistemi hazırlanır, sistemi sıkıştırmak için filtre kağıtları kesilir.
17. Sisteme ait süngerin üstüne filtre kağıtları, üstüne jel yerleştirilir. Jelin üzerine dikkatlice kesilmiş olan membran konulur, üzerine filtre kağıtları konulmaya devam edilir.
18. Sistem kurulup tankın içine yerleştirilir. Tank transfer tamponu ile doldurulur.
19. 90 Volt, 450 mAmper, 2 saat boyunca akım uygulanır.
20. Süre sonunda jel alınır, SDS-PAGE'in sonundaki gibi boyama işlemi yapılabilir. Proteinler yetirince belirinceye kadar devam edilir.
21. Membran alınıp, bir kapta TBST ile muamele edilir. 10 dakika boyunca çalkalanır.
22. Ardından 45 dakika boyunca blocking solüsyonu ile çalkalanır.
23. Ardından 1'nci antikor solüsyonu ile 2 saat muamele edilir.
24. TBST ile bir kaç yıkayıp, Renklendirici solüsyona alınır.
25. Sarı sıvı morlaşıp, membranda renklenme olur. Bu işlem 1-2 dakika sürer.
26. Bantlar görüldükten sonra membran substrattan arındırılır. Çeşme suyunda yıkanır. Filtre kağıdında hafifçe kurutulur, fotoğraflanır ve bantlara bakılarak değerlendirilir.

III.6 Atomik Absorbsiyon Spektrometresi ile Ağır Metal Tayini:

Çalışmamızın diğer bir basamağını, kefal balığı kas dokusunda Pb, Cd, Hg, Cr metallerinin kalıntı düzeylerinin tespiti oluşturmuştur. Ortamdaki canlı yaşam üzerinde konsantrasyonları ile orantılı olarak toksik etki yapan bu metallerin tespitinde, Atomik Absorbsiyon Spektrometresi (AAS) yöntemi kullanılmıştır.

III.6.1 Cihaz ve Malzemeler:

1. Bölüm III.2.1’de belirtilen genel laboratuvar alet ve malzemeleri kullanılmıştır.
2. Yıkılama işleminde kullanılan cam aletler.
3. Unicam 939 Atomik Absorbsiyon Spektrometresi
4. Autosampler.
5. Azot, Asetilen ve Argon Gazları.

III.6.2 Kullanılan Kimyasallar:

1. Ölçüm sırasında kullanılan metal standartları, 1000 mg/L’lik stok metal çözeltilerinden çoklu seyreltmeler ile hazırlanmıştır.
 - 1000mg/L’lik stok cıvadan sırasıyla 100 mg/L, ve ardından 100 µg/L ara standartları hazırlanıp, buradan hareketle 2, 4, 8 ve 12 µg/L’lik standartlar elde edilmiştir.
 - 1000mg/L’lik stok krom ve kadmiyumdaki sırasıyla 100 mg/L, ve ardından 100 µg/L ara standartları hazırlanıp, buradan hareketle 10, 20, 30 µg/L’lik standartlar elde edilmiştir.

- 1000mg/L'lik stok kurşundan sırasıyla 100 mg/L, ve ardından 100 µg/L ara standartları hazırlanıp, buradan hareketle 100, 200, 300 µg/L'lik standartlar elde edilmiştir.
2. Nitrik asit, Kalay klorür, hidroklorik asit. Kullanılan tüm kimyasalların metal düzeyleri belirlenmiş olmalı, saflıkları da en azından analitik derecede olmalıdır.
 3. Numune çözeltileri: Yıkılama işlemi sonucu elde edilen numuneler, deiyonize suyla balon jojelerde 25ml'ye tamamlanır. Ölçümler bu numuneler üzerinden gerçekleştirilir.

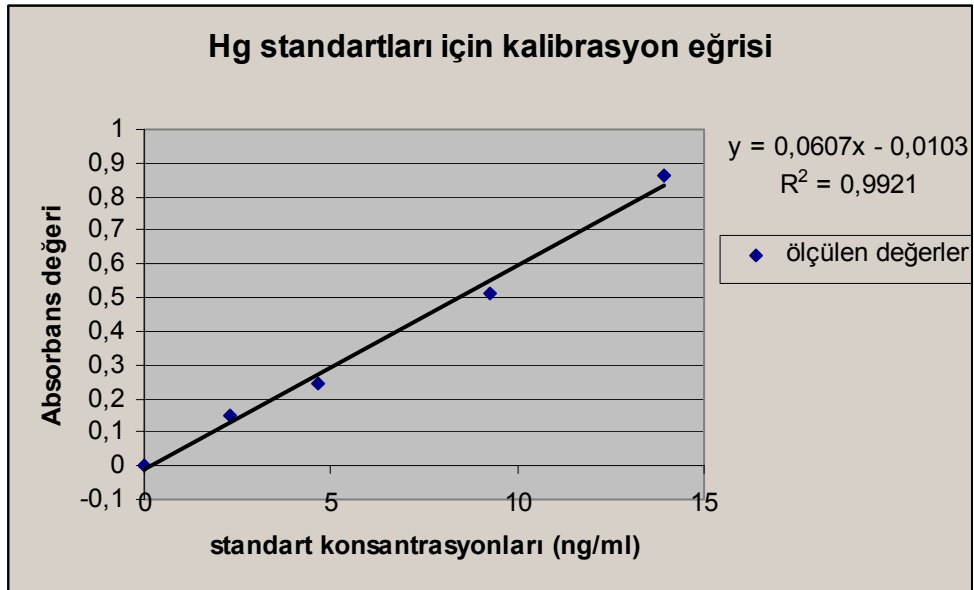
III.6.3 Yöntem:

1. Numunenin yıkılmasında, asit yıkılama işleminden faydalanılmıştır. Yöntem basamakları kısaca şu şekildedir:
 - 1g civarı numuneler tartılır ve 5ml nitrik asit (%65 w/v) ile oda sıcaklığında 15 dakika bekletilir.
 - Takiben, önce 55 °C'de 20 dakika, ardından 110 °C'de 30 dakika civarı bekletilir. Sonra sıcaklık 140 °C'ye kadar çıkartılır ve 30 dakika bu sıcaklıkta tutulur.
 - Oda sıcaklığına soğutulan numunelere 1ml sülfürik asit (%96 w/v) ve 2ml perklorik asit (%70 w/v) ilave dilip 2 saat içinde küçük artışlarla önce 140 °C'ye, ardından 200 °C'ye çıkartılır ve bu sıcaklıklarda 15'er dakika bekletilir.
 - Son olarak sıcaklık 310 °C'ye kadar çıkarılıp, numune sıvısı tamamen berraklaşana ve en son 1ml'lik sülfürik asit hacmi kalana kadar devam eder.
 - Çözeltiler deiyonize suyla 25 ml'ye tamamlanır ve ölçümlere kadar buzdolabında saklanır.

2. Asit ile yıkılama yapıldıktan sonra numunedeki cıva kaybını önlemek için ölçümler bekletilmeden, aynı gün gerçekleştirilmiştir.
3. Cıva için soğuk buhar yönteminden faydalanılmıştır.
4. Cıva ölçümü dolaylı yolla yapılmaktadır, ortamda cıvanın kalay klorür ile reaksiyona girip serbest hale geçmesi sağlanmakta, serbest hale geçen cıva ölçülmektedir. Lamba dalga boyu olarak 253,7nm kullanılır.
5. Ölçümler öncesi Hg standart çözeltileri hazırlanıp alete okutulur, elde edilen değerlerden cıva için bir kalibrasyon eğrisi çizilir ve numuneler elde edilen doğrunun denklemi ile değerlendirilir. Cıva kalibrasyon eğrisi Şekil 15'de verilmiştir.
6. Numune ölçümleri için ortama 5 ml numune çözeltisi, üstüne de 800ul kalay klorür eklenir, manyetik karıştırıcı ile kapalı bir sistemde karıştırılır.
7. Reaksiyonun gerçekleşmesi için ~50 saniye beklenmiş, sonra ölçüm yapılmıştır. Ölçümlerin doğruluğunu teyit etmek için bazı ölçülen numunelerin üstüne standart cıva çözeltileri eklenerek ölçümler tekrarlanmıştır.
8. Kadmiyum, krom ve kurşun ölçümleri için Grafit Fırından faydalanılır. Soğuk buhar yönteminde kimyasal reaksiyon ile serbest hale getirdiğimiz analit ölçülürken, grafit fırın yönteminde, ısı uygulanarak analit atomları haline getirilir, serbest atom halindeki analit ölçülür.
9. Her metal için kullanılacak lamba dalga boyları şu şekildedir:

Krom,	Lamba dalgaboyu: 358 nm
Kadmiyum,	Lamba dalgaboyu: 228.9 nm
Kurşun,	Lamba dalgaboyu: 217 nm
10. Metallerin ölçümünde kullanılacak külleştirme ve atomlaştırma sıcaklıkları, alet yazılımı içinde bulunan "Külleştirme-Atomlaştırma Sıcaklık Programı Belirleme" özelliği yardımı ile ayarlanmıştır. Kullanılan külleştirme-atomlaştırma sıcaklıkları tablo 9'da özetlenmiştir.

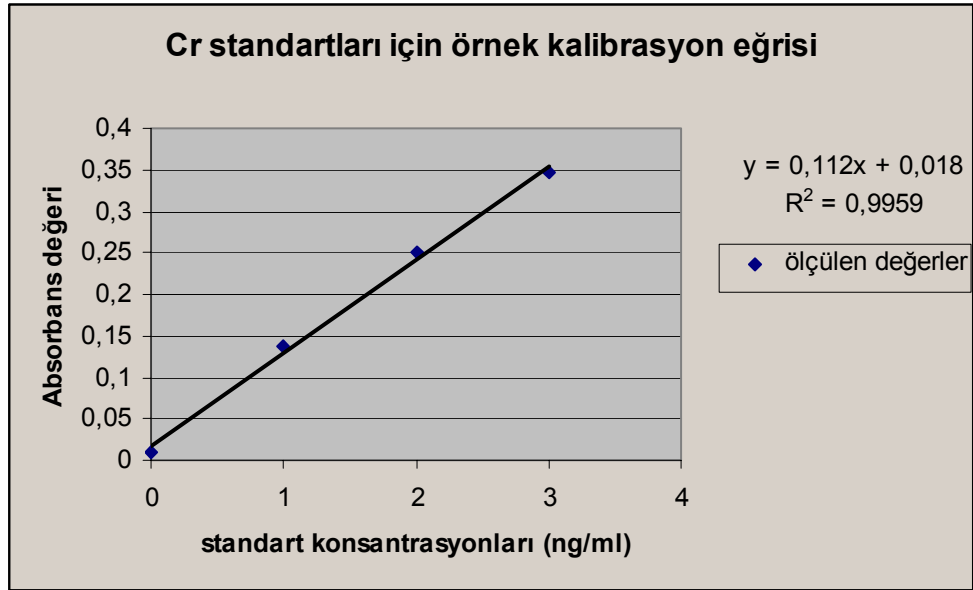
11. Her ölçüm için numune çözeltisi 1/10 deiyonize su ile seyreltilerek grafit tüpün içine konulup, uygun dalga boyunda ve sıcaklıklarda okunmuştur. Ölçümlerin doğruluğunu teyit etmek için bazı ölçülen numunelerin üstüne standart metal çözeltileri eklenerek ölçümler tekrarlanmıştır.
12. Krom ölçümleri öncesi Cr standart çözeltileri hazırlanıp alete okutulur, elde edilen değerlerden krom için bir kalibrasyon eğrisi çizilir ve numuneler elde edilen doğrunun denklemi ile değerlendirilir. Krom kalibrasyon eğrisi Şekil 16'de verilmiştir.
13. Kurşun ve kadmiyum ölçümlerinde, matriksin kullanılan dalga boyunda yapabildiği absorbans nedeniyle, ölçümler sırasında numunelere standart ilaveleri yapılmıştır. Elde edilen değerler göz önüne alınarak metaller için kalibrasyon eğrileri çizilmiş, deney sonuçları değerlendirilmiştir. Kurşun ve kadmiyum ölçümlerinde genel olarak her bir numune için yeni bir kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Kurşun ve kadmiyum için örnek kalibrasyon eğrileri şekil 17 ve 18'de verilmiştir.



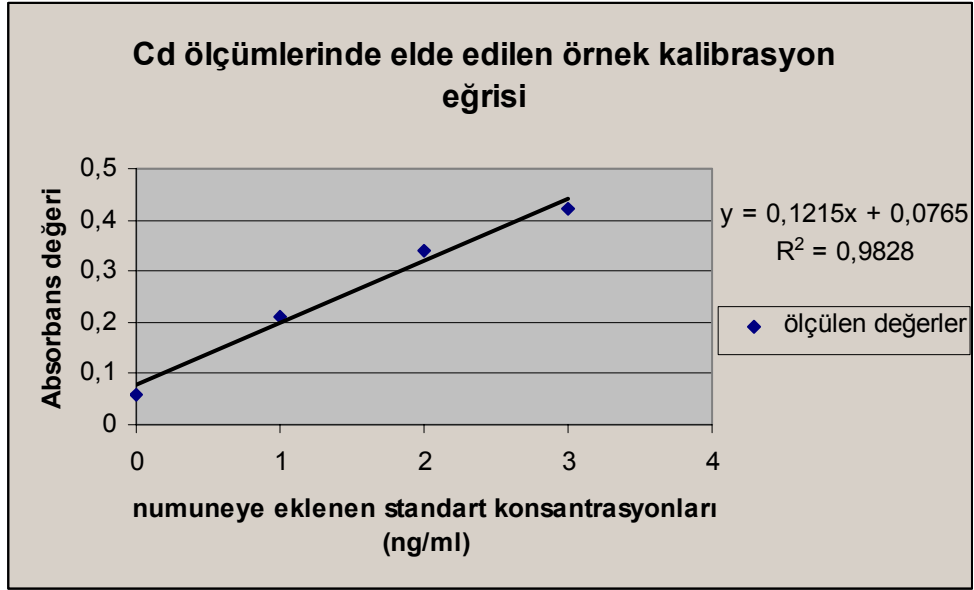
Şekil 15: Cıva ölçümlerinde Hg standartları ile elde edilen örnek kalibrasyon eğrisi (grafikteki her bir nokta yapılan 3 ölçümün ortalamasıdır).

Tablo 9: Grafit fırın yönteminde kullanılan külleştirme ve atomlaştırma sıcaklıkları.

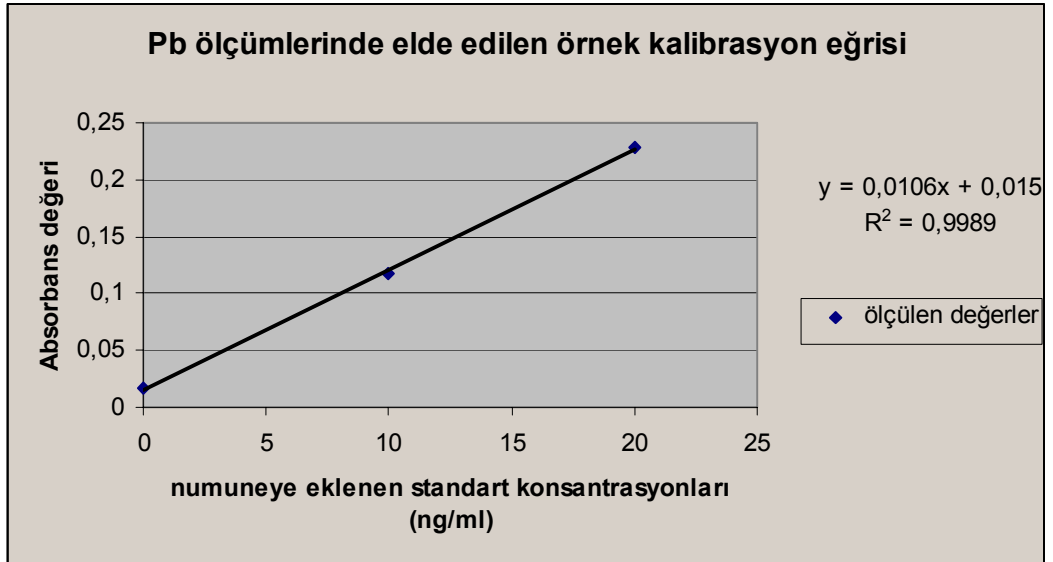
Ölçülen metal:	Külleştirme sıcaklığı (°C)	Atomlaştırma sıcaklığı (°C)
Cr	1400	2300
Cd	500	1000
Pb	500	1300



Şekil 16: Krom ölçümlerinde Cr standartları ile elde edilen örnek kalibrasyon eğrisi (grafikteki her bir nokta yapılan 3 ölçümün ortalamasıdır).



Şekil 17: Cd ölçümlerinde numuneye standart ekleme yöntemi ile elde edilen örnek kalibrasyon eğrisi (ölçülen numuneye 1 ng/ml, 2 ng/ml, 3 ng/ml konsantrasyonlarda Cd eklenmiştir; grafikteki her bir nokta yapılan 3 ölçümün ortalamasıdır).



Şekil 18: Pb ölçümlerinde numuneye standart ekleme yöntemi ile elde edilen örnek kalibrasyon eğrisi (ölçülen numuneye 10 ng/ml ve 20 ng/ml konsantrasyonlarda Pb eklenmiştir; grafikteki her bir nokta yapılan 3 ölçümün ortalamasıdır).

III.7. Kimyasallar

Deney aşamalarında kullanılan kimyasalların marka ve katalog numaraları aşağıdaki tabloda verilmiştir. Kullanılan tüm diğer kimyasallar %99 veya daha yüksek düzeyde analitik saflıktadır.

Tablo 10: Deneylerde kullanılan kimyasalların sağlayıcıları ve katalog numaraları verilmiştir.

Malzemenin Cinsi	Marka, katalog numarası
Metanol	Merck
SDS (sodium dodecyl sulfate)	Applichem A2263
Tris: Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane	Applichem A2264
NaCl (Sodyum klorür)	Applichem A2942
Tween20(polyoxyethylene-sorbitan monolaurate)	Applichem A4974
Glycine (aminoaceticacid)	Applichem A1067
HCl %37, extra pure	Merck
Phosphate buffered saline with %3 non-fat Milk dry powder, pH=7.4 Toz Paketleri halinde	Sigma P2194
MgCl ₂ (magnesium chloride hexahydrate)	Applichem A4425
ZnCl ₂ (zinc chloride)	Riedel-31650
DEA (diethanolamine)	Applichem A2155
NBT(nitroblue tetrazolum veya nitrotetrazolum blue chloride)	Applichem A1243
Phenazine methosulfate	Sigma P9625
BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate disodiumsalt)	Applichem A1117
DMF (N,N_dimethylformamide)	Applichem A3676
KH ₂ PO ₄ (potassium dihydrogen phosphate)	Applichem A2946
K ₂ HPO ₄ (di-potassium hydrogen phosphate anhydrous)	Applichem A2945
Triton – X100	Applichem A4975
(EDTA) ₂ -Na ₂ .H ₂ O(Etilendiamin tetraasetikasit)	Applichem A2937
NaOH (sodium hydroxide) pellet	Applichem A0991
PMSF (phenylmethylsulfonyl flouride)	Applichem A0999

BHA (butilenhidroksianisole, butillenmiş hidroksianisol)	Sigma B1253
Sodium cholate hydrate, from ox or sheep bile, min %99	Sigma C1254
KCl (potassium chloride)	Applichem A1362
Gliserol anhydrous	Applichem A2926
Calcium chloride dihydrate	Applichem A0775
CuSO ₄ .5H ₂ O (cupric sulfate pentahydrate)	Applichem A1034
Na ₂ CO ₃ (sodium carbonate anhyrous)	Applichem A1881
Rochelle Tuzu (NaKC ₄ H ₄ O ₆ .4H ₂ O, sodyum-potasyum-tartarat)	Applichem A0651
Folin ve Ciocal Teu's Phenol Reagent	Sigma F9252
BSA: bovin serum albumin (albumin fraction V, pH=7.0)	Applichem A1391
NADPH.Na ₄	Applichem A1395
7-ER: (7-ethoxyresorufin - C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Sigma E3763
APS (amonyum persulfate)	Applichem A2941
BIS (N,N'-methylenebisacrylamide)	Sigma M7256
Coomassie Brilliant Blue – R250	Applichem A1092
Acrylamide	Applichem A3812
β-merkaptotetanol	Applichem A1108
Bromfenolblue	Applichem A2331
Asetikasit %100	Applichem A3686
cytochrome c from bovine heart	Sigma C3131
glyceraldehit 3PDH	Fluka 49830
catalaz from bovine liver	crystalline suspension in water, pH6, Fluka60630
phosphorylase b from rabbit muscle	Sigma P6635
TEMED(N,N,N',N',tetramethyl-ethylen-diamine)	Sigma T-8133
albumin from hen egg white (ovalbumin)	grade III, min. %90,Sigma A5378
Ethyl-m-aminobenzoate methanesulfonate salt (tricaine)	ICN-MP Biomedicals– 03106

III.8. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizinde GraphPad Yazılım Şirketinin, GraphPad Instant for Windows, v 3.05, yazılım programı kullanılmıştır.

IV. BULGULAR

Bölüm III.1’de de verildiği ve şekil 13’de de gösterildiği üzere avlanma alanı olarak seçilen A, I ve G bölgeleri petrol rafinerisinin hemen iç alanında yer almaktadır. B ve D bölgelerinden yalnız 1’er adet balık avlanması bu bölgelerin değerlendirme dışında kalmasına neden olmuştur. Kontrol bölgesi olarak seçilen Foça bölgesi, Aliağa Körfezi dışında yer almaktadır. Bulgular ve tartışma kısmında sonuçlar verilirken A+I+G alanlarının toplu değerlendirmesine Aliağa Körfezi bölgesi adı verilmiştir.

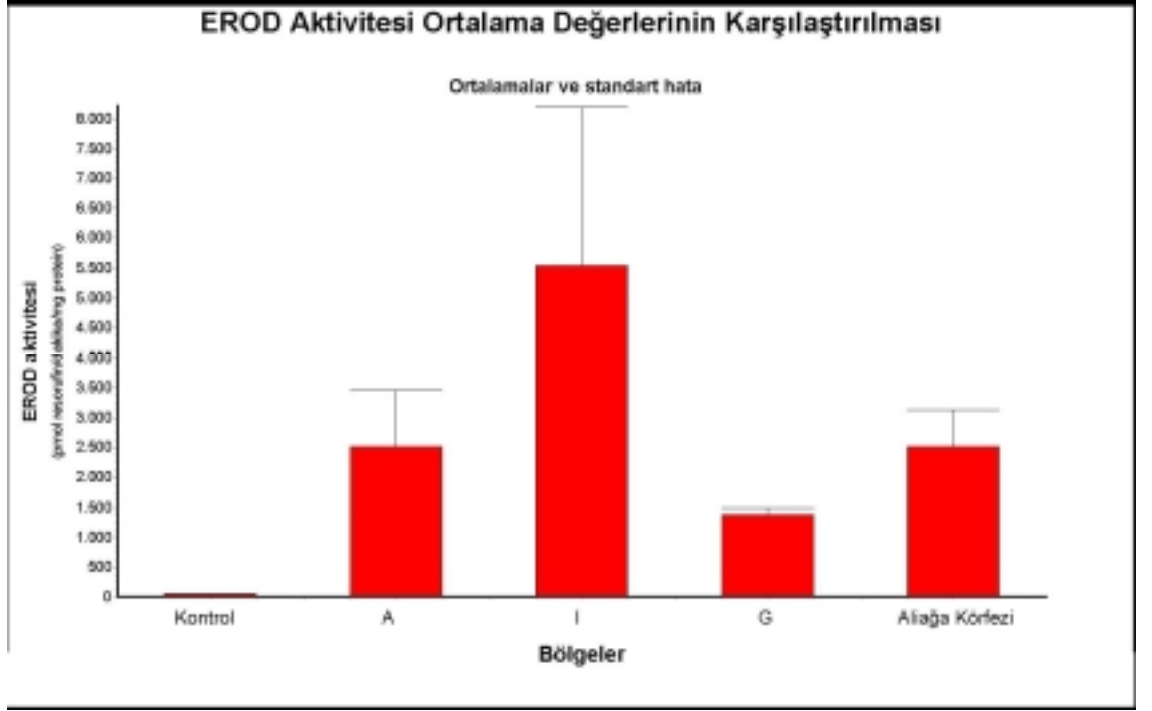
IV.1. Karaciğer EROD Aktivitesi Ölçüm Sonuçları:

Değişik bölgelerden balıkçılar tarafından avlanmış olan bölge kefal balıklarında (*Lisa saliens*) ölçülen karaciğer EROD aktivitesi ölçüm sonuçlarından elde edilen ortalama değerler, standart hatalar ve örnek sayıları Tablo 11’de toparlanmıştır.

Tablo 11: Avlanma bölgelerinde kefal balığı karaciğer EROD aktivitesi ölçüm sonuçlarında elde edilen ortalama değerler ve standart hataları verilmiştir (değerler pmol res./dak./mg protein cinsindendir).

<i>Bölge:</i>	<i>Kontrol bölgesi</i>	<i>A</i>	<i>I</i>	<i>G</i>	<i>Aliağa Körfezi</i>
Ortalama:	46,33	2521,0	5555,3	1378,2	2531,1
N:	27	13	5	13	31
Std hata:	3,114	950,15	2644,2	118,12	609,83

Şekil 19’de çalışma bölgelerinden elde edilen kefal balıklarının karaciğer dokularında ölçülen EROD aktivitesi ortalama değerlerinin toplu karşılaştırılması yapılmıştır.



Şekil 19: EROD aktivitesi ortalama değerlerinin toplu karşılaştırması (EROD aktivitesi pmol resorufin/dakika/mg protein cinsinden verilmiştir)

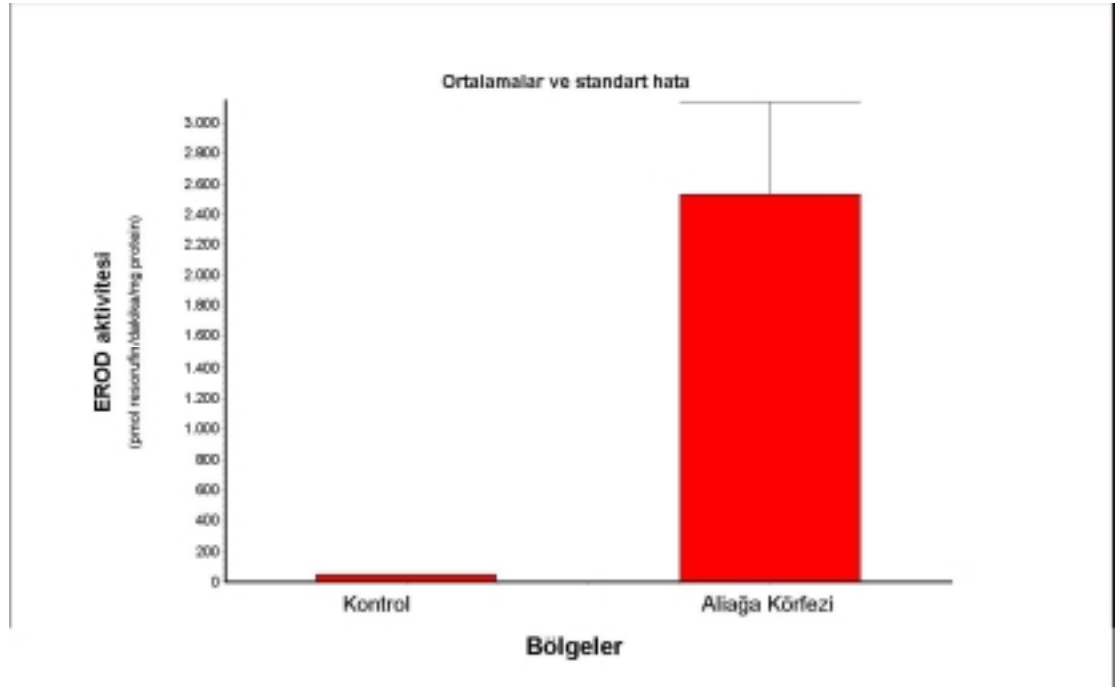
İstatistiksel analiz için ölçüm sonuçları unpaired t testi ile karşılaştırılmıştır. Test sonuçları tablo 12’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Kontrol bölgesi olarak kullanılan Foça’dan avlanan kefal balıklarının karaciğer EROD aktivitesi değerleri, Aliğa Körfezi için bulunan EROD aktivitesi değerlerinden istatistiksel olarak oldukça farklıdır ($p=0.0004$). Rafineri bölgesi içinde farklı avlanma bölgeleri olan A, I ve G, ayrı ayrı kontrol ile kıyaslandığında, bu bölgelerin değerlerinin yine istatistiksel olarak oldukça anlamlı olduğu görülmektedir (sırasıyla $p=0.0005$, $p<0.0001$ ve $p<0.0001$).

Tablo 12: EROD ölçümleri istatistiksel değerlendirme sonuçları
(pmol_res./dak./mg_protein, ortalama $\pm$ standart hata)

Kontrol (Foça) (46,33 $\pm$ 3,114)	A bölgesi (2521.0 $\pm$ 950,15)	p=0.0005
Kontrol (46,33 $\pm$ 3,114)	I bölgesi (5555.3 $\pm$ 2644,2)	p<0.0001
Kontrol (46,33 $\pm$ 3,114)	G bölgesi (1378.2 $\pm$ 118,12)	p<0.0001
Kontrol (46,33 $\pm$ 3,114)	Aliağa Körfezi (2531.1 $\pm$ 609,83)	p=0.0004

* : unpaired t test

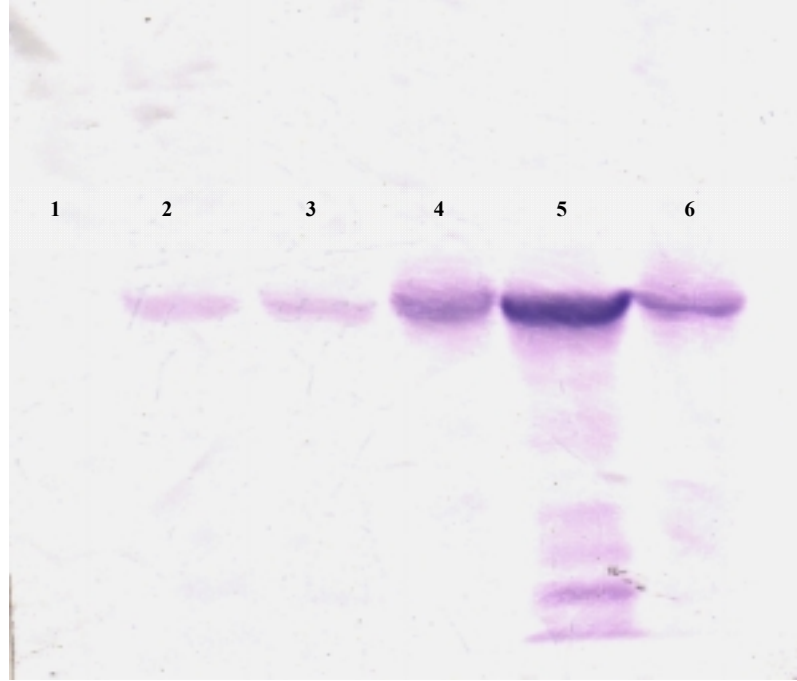
Şekil 20: Kontrol Bölgesi ve Aliağa Bölgesi EROD aktivite ortalamaları karşılaştırılmıştır
(değerler pmol res./dakika/mg prot. cinsindendir)



IV.2. Balık Karaciğer Mikrozomlarının SDS-PAGE ve Western Blot ile Analizleri

Aliağa Körfezi ve çevresinden yakalanan *Liza saliens* karaciğer mikrozomlarının SDS-poliakrilamit jel elektroforezi ve anti-CYP1A1 IgG'leri kullanılarak gerçekleştirilen Western blot sonucu Şekil 21'de gösterilmektedir. Western blot ile enzimatik (EROD aktivitesi) olarak gerçekleştirilen analizlerin protein düzeyinde de takibi ve doğrulanması araştırılmıştır.

Şekil 13'de de görülebileceği gibi değişik noktalardan yakalanan balıklarda elde edilen EROD aktivite profilleri, protein düzeyinde de benzer sonuçlar vermiştir. Bu sonuçlar ölçülen EROD aktivitesinin başlıca CYP1A tarafından katalize edildiğini doğrulamaktadır. Burada sadece artmış olan enzimatik aktivitenin gözlenmesi amaçlanmıştır, CYP1A miktar tayini yapılmamıştır.



Şekil 21: Aliağa Körfezinden yakalanan kefal balıklarının karaciğer mikrozomlarının (sitokrom P4501A1'in) poliklonal anti-CYP1A1 IgG kullanılarak immüno blot analiz sonucu verilmiştir. Kuyu 1: standart proteinleri [BSA, yumurta albumini, gliseralehit 3-fosfat

dehidrojenaz ve sitokrom c], Kuyu 2: Kontrol bölgesinden, Kuyu 3: G bölgesinden, Kuyu 4: A bölgesinden, Kuyu 5: I bölgesinden, Kuyu 6: A bölgesinden yakalanan Liza saliens karaciğer mikrozomlarını içermektedir. Tüm örnekler kuyucuklara 150 µg protein olacak şekilde uygulanmıştır.

IV.3. Kefal Balığı Kas Dokusunda Cr, Hg, Cd, Pb Ölçüm Bulguları

Çalışmamızda metal ölçümleri için balıkların kas dokularından yararlanılmıştır. Değişik bölgelerden balıkçılar tarafından avlanmış olan bölge kefal balıkların kas dokularında ölçülen Cr, Hg, Cd, Pb metal seviyesi sonuçları toplu olarak Tablo 13'de yer almaktadır. Tablo 13, bir sonraki sayfada yer almaktadır.

Tablo 13: Her bir metalin balık kas dokusunda ölçüm sonucunda bulunan değerleri verilmiştir.

Balık #	Hg (ng/g)	Cr (ng/g)	Cd (ng/g)	Pb (ng/g)
A1	117.2 ± 7.5	71.5±5.4	15.7±1.1	682.3±30.2
A2	43.8 ± 1.8	137.3±4.2	61.1±3.4	672.0±24.7
A3	56.3 ± 9.5	108.6±7.6	61.0±3.9	695.7±4.9
A4	39.2±2.7	379.6±26.1	47.1±3.2	590.0±17.9
A5	38.6 ± 4.3	81.8±1.5	4.4±0.2	574.3±10.2
A6	41.8 ± 2.4	225.8±16.3	3.4±0.3	561.5±31.9
A7	39.7±0.5	98.3±7.2	4.3±0.2	620.2±8.9
A8	45.7±3.0	186.1±8.0	3.7±0.3	559.5±26.6
A9	43.0±11.7	110.6±6.3	22.2±2.0	622.0±29.4
A10	48.6±3.4	59.4±4.3	3.8±0.2	748.9±26.6
A11	42.3±3.3	279.9±10.6	26.7±1.1	830.9±34.0
A12	16.0±0.7	293.3±20.1	16.2±1.0	671.5±20.9
A13	17.7±3.2	277.2±15.4	13.5±0.3	683.7±21.5
A14	45.6±0.5	120.5±2.3	56.3±0.9	865.3±37.9
A15	18.0±1.8	100.1±3.5	16.1±0.7	1105.8±53.3
A16	35.9±8.3	89.9±0.7	38.3±0.3	774.2±15.4
A17	33.1±0.2	78.2±2.3	30.6±0.2	945.9±28.3
I-1	47.0±1.5	42.0±3.2	62.0±4.4	1361.8±42.5
I-2	51.8±1.2	65.7±2.6	37.4±1.9	1331.9±30.3
I-3	6.47±0.3	50.8±2.9	44.0±2.8	1022.9±29.8
I-4	37.0±2.1	41.5±2.0	15.5±0.4	1501.5±42.3
I-5	TDA	49.1±3.7	14.6±0.5	1496.2±19.9
G1	0.7±0.1	123.4±9.9	39.1±0.4	713.9±19.8
G2	2.6±0.2	53.4±4.8	32.0±0.8	759.9±15.8
G3	18.3±0.7	83.2±3.2	46.4±3.0	964.0±33.9
G4	5.5±0.6	47.3±1.0	52.0±1.9	281.3±9.4
G5	16.7±0.1	53.8±2.0	24.6±1.1	212.8±11.3
G6	26.3±0.3	11.4±0.1	18.8±1.0	259.4±10.1
G7	35.1±2.0	37.0±0.9	8.2±0.3	279.9±14.3
G8	14.9±0.1	37.4±1.4	17.5±0.3	271.4±22.1
K1	32.2±0.5	11.9±0.9	15.0±0.5	206.6±12.4
K2	54.5±4.8	30.2±1.7	32.5±2.2	452.8±29.8
K3	47.7±2.5	TDA	28.5±1.2	427.8±17.2
K4	31.3±1.6	20.9±0.4	20.5±0.7	324.9±19.0
K5	34.3±1.0	8.5±0.4	15.6±0.9	303.4±15.4
K6	49.0±3.2	23.9±2.0	25.7±1.0	379.1±22.1
K7	9.96±1.4	7.5±0.5	42.0±1.5	365.5±12.3

K8	61.2±2.4	10.7±0.5	35.3±2.4	544.4±16.4
K9	35.0±3.4	60.7±4.5	22.0±1.1	203.4±14.1
K10	21.0±0.4	22.3±0.9	10.6±0.1	580.0±18.3
K11	43.0±1.2	39.3±0.1	20.5±0.6	577.8±22.0
K12	44.5±1.2	18.2±1.1	11.60.5	593.7±30.3
K13	56.1±4.5	17.7±0.8	11.6±0.8	539.4±21.9
K14	31.1±2.4	49.1±3.5	10.3±0.5	461.9±9.9
K15	46.3±3.8	16.5±0.8	15.0±0.3	663.3±31.5

TDA: tespit edilebilen değerin altında (Tayin sınırları, (kör değeri/eğim)x3 hesabı ile bulunmuştur)

IV.3.1 Kefal Balığı Kas Dokusunda Cr Ölçüm Bulguları

Kefal balığı kas dokusunda AAS ile krom metali ölçümü sonucu elde edilen verilerin özeti Tablo 14’de verilmiştir.

Tablo 14: Avlanma bölgelerinde kefal balığı kas dokusunda ölçülen Cr metal değerleri (değerler ng/g cinsindendir)

<i>Bölge</i>	<i>Kontrol bölgesi</i>	<i>A</i>	<i>I</i>	<i>G</i>	<i>Aliğa Körfezi</i>
Ortalama:	22,49	158,71	49,82	55,86	113,14
N:	15	17	5	8	30
Std sapma:	16,408	96,6	9,79	33,94	90,85

Değerler non parametrik Anova testi olan Kruskal-Wallis yöntemi ile her bölgenin değeri sınıflandırılıp ortalamaları alınmış, bu değerler arasında Dunn Çoklu Karşılaştırma Yöntemi ile istatistiksel hesaplamalar yapılmıştır. (Tablo 14) Bu hesaplamalar sonucunda, kontrol bölgesi Foça ile Aliğa Körfezi arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir fark ortaya çıkmaktadır ($p<0.001$). Körfez içinde yer alan avlanma bölgeleri ayrı ayrı değerlendirildiğinde, G bölgesinden elde edilen değerlerin ($p<0.05$) kontrol bölgesi ile karşılaştırıldığında yüksek düzeyde farklılık bulunmuştur. Bu

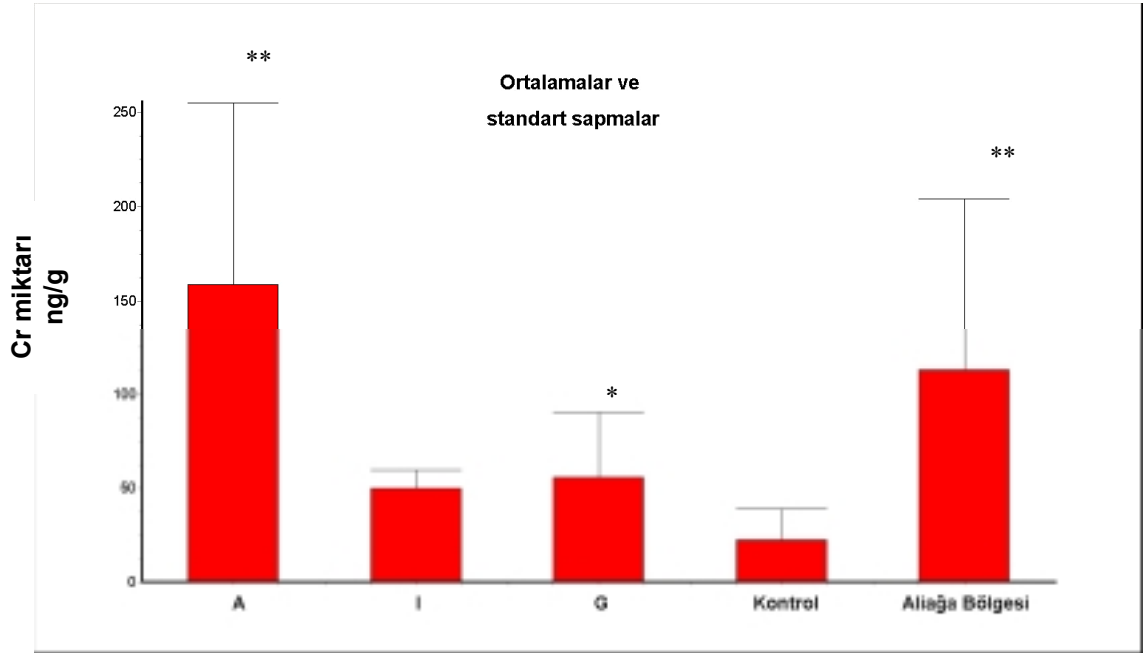
farklılık yüksek düzeyde anlamlılık göstermektedir. Diğer taraftan I bölgesinden elde edilen değerler ile kontrol bölgesi değerleri arasında oldukça fark olmasına rağmen ($p=0.0707$) bu fark anlamlı bulunamamıştır ($p>0.05$).

Tablo 15: Cr için Dunn'un Çoklu Karşılaştırma testi sonucu bölgeler arasında oluşan farkların istatistiksel sonuçları (ng/g, ortalama $\pm$ standart sapma)

Kontrol (Foça) (22,49 $\pm$ 16,408)	A bölgesi (158,71 $\pm$ 96,6)	p<0.001
Kontrol (22,49 $\pm$ 16,408)	I bölgesi (49,82 $\pm$ 9,79)	p>0.05
Kontrol (22,49 $\pm$ 16,408)	G bölgesi (55,86 $\pm$ 33,94)	p<0.005
Kontrol (22,49 $\pm$ 16,408)	Aliağa bölgesi (113,14 $\pm$ 90,85)	p<0.001

* : Anova (Kruskal-Wallis) ve Dunn Çoklu Karşılaştırma Yöntemi

Şekil 22: Kefal balık kas dokularında Cr ölçüm sonuçlarının karşılaştırılması (değerler ng/g yaş ağırlık cinsindendir)



*: $p<0.005$ Anova (Kruskal-Wallis) ve Dunn Çoklu Karşılaştırma Yöntemi

** : $p<0.001$ Anova (Kruskal-Wallis) ve Dunn Çoklu Karşılaştırma Yöntemi

IV.3.2 Kefal Balığı Kas Dokusunda Cd Ölçüm Bulguları

Kefal balığı kas dokusunda AAS ile kadmiyum metali ölçümü sonucu elde edilen verilerin özeti Tablo 16'de verilmiştir.

Tablo 16: Avlanma bölgelerinde kefal balığı kas dokusunda ölçülen Cd metal değerleri sonuçlarından elde edilen ortalama değerleri, standart sapma değerleri (değerler ng/g üzerindendir).

<i>Bölge</i>	<i>Kontrol bölgesi</i>	<i>A</i>	<i>I</i>	<i>G</i>	<i>Aliğa Körfezi</i>
Ortalama:	21,11	24,96	34,7	29,82	27,88
N:	15	17	5	8	30
Std sapma:	9,85	20,74	20,07	15,23	19,05

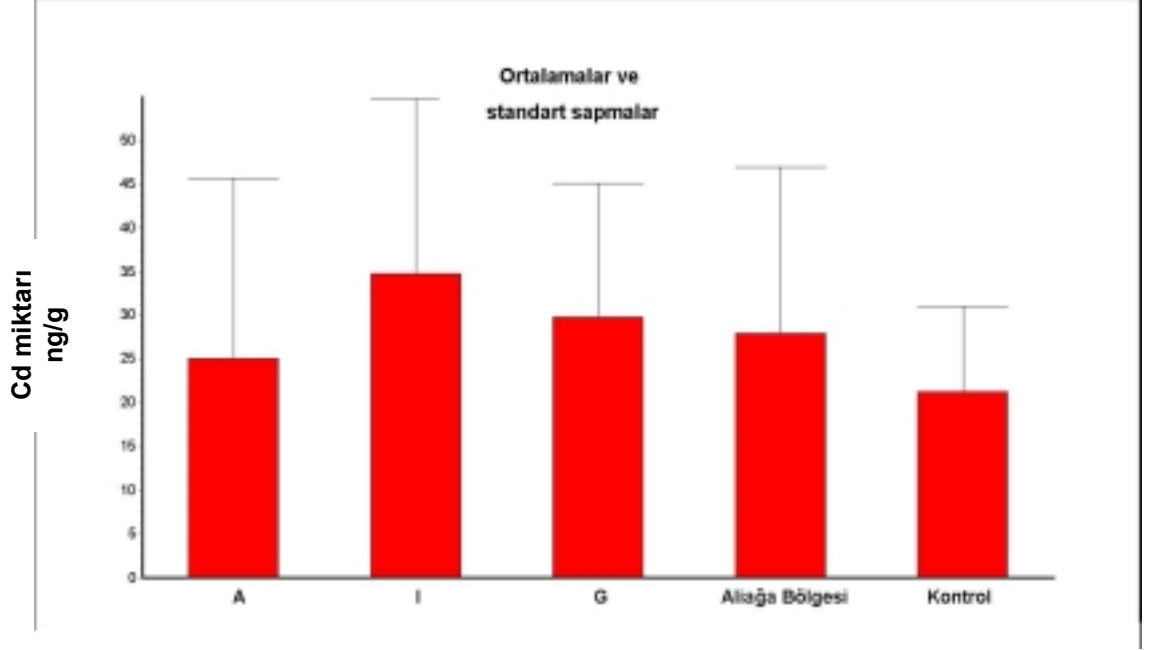
Değerler non parametrik Anova testi olan Kruskal-Wallis yöntemi ile her bölgenin değeri sınıflandırılıp ortalamaları alınmış, bu değerler arasında Dunn Çoklu Karşılaştırma Yöntemi ile istatistiksel hesaplamalar yapılmıştır. Cd değerleri açısından kontrol bölgesi ile karşılaştırılan Aliğa Körfezi değerleri arasında fark oldukça düşük kalmaktadır. Bu fark, istatistiksel olarak anlamlı olarak bulunmamıştır. Rafineri bölgesi içinde yer alan avlanma bölgeleri ayrı ayrı kontrolle karşılaştırılmasında da, herhangi bir istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilememiştir ($p>0.05$).

Tablo 17: Dunn'un Çoklu Karşılaştırma testi sonucu Cd ölçümlerinde bölgeler arasında oluşan farkların istatistiksel değerler (ng/g, ortalama $\pm$ standart sapma)

Kontrol (Foça) (21,11 $\pm$ 9,85)	A bölgesi (24,96 $\pm$ 20,74)	p>0.05
Kontrol (21,11 $\pm$ 9,85)	I bölgesi (34,7 $\pm$ 20,07)	p>0.05
Kontrol (21,11 $\pm$ 9,85)	G bölgesi (29,82 $\pm$ 15,23)	p>0.05
Kontrol (21,11 $\pm$ 9,85)	Aliğa bölgesi (27,88 $\pm$ 19,05)	p>0.05

* : Anova (Kruskal-Wallis) ve Dunn Çoklu Karşılaştırma Yöntemi

Şekil 23: Kefal balık kas dokularında Cd ölçüm sonuçlarının karşılaştırılması (değerler ng/g yaş ağırlık üzerindendir)



IV.3.3 Kefal Balığı Kas Dokusunda Hg Ölçüm Bulguları

Kefal balığı kas dokusunda AAS ile cıva metali ölçümü sonucu elde edilen verilerin özeti Tablo 18’de verilmiştir.

Tablo 18: Avlanma bölgelerinde kefal balığı kas dokusunda ölçülen Hg metal değerleri (değerler ng/g üzerindendir)

Bölge:	<i>Kontrol bölgesi</i>	<i>A</i>	<i>I</i>	<i>G</i>	<i>Aliğa Körfezi</i>
Ortalama:	39,81	42,5	28,45	15,01	32,83
N:	15	17	5	8	30
Std sapma:	13,79	22,24	23,74	11,91	23,03

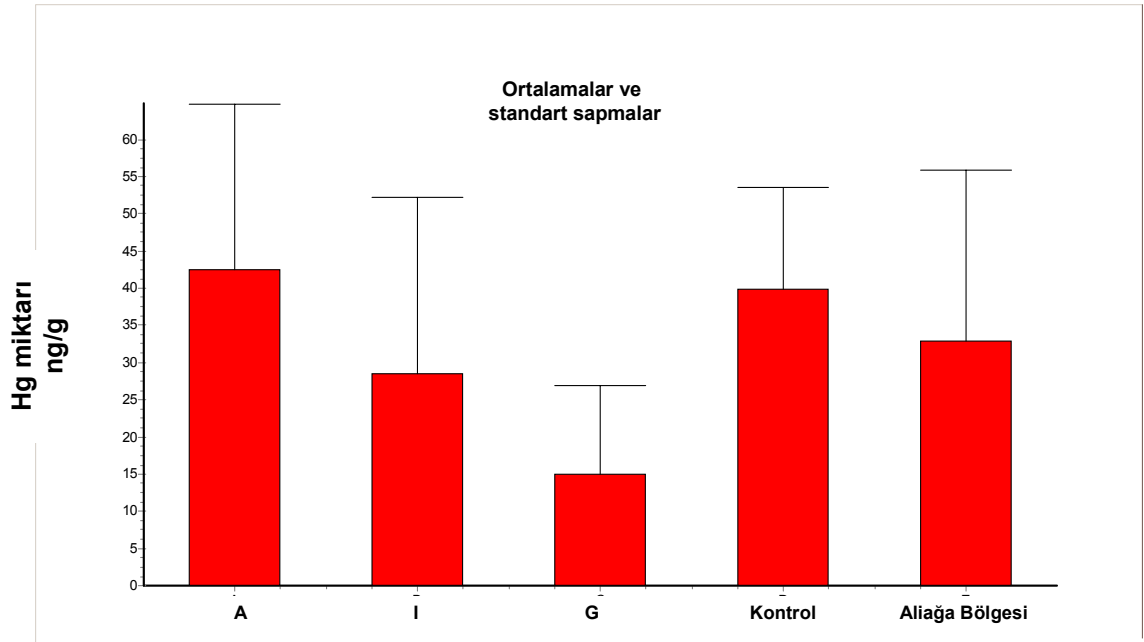
Non parametrik Anova testi olan Kruskal-Wallis yöntemi ile her bölgenin değeri sınıflandırılıp ortalamaları alınmış, bu değerler arasında Dunn Çoklu Karşılaştırma Yöntemi ile istatistiksel hesaplamalar yapılmıştır. Cıva için hesaplanan bu değerler incelendiğinde, kontrol bölgesinde bulunan sonuçlar ile, Aliağa Körfezinin tamamında, ya da ayrı ayrı avlanma bölgeleri sonuçları arasında anlamlı bir fark elde edilememiştir ($p>0.05$).

Tablo 19: Cıva için Dunn'un Çoklu Karşılaştırma testi sonucu bölgeler arasında oluşan farkların istatistiksel sonuçları (ng/g, ortalama $\pm$ standart sapma)

Kontrol (Foça) (39,81 $\pm$ 13,79)	A bölgesi (42,5 $\pm$ 22,24)	p>0.05
Kontrol (39,81 $\pm$ 13,79)	I bölgesi (28,45 $\pm$ 23,74)	p>0.05
Kontrol (39,81 $\pm$ 13,79)	G bölgesi (15,01 $\pm$ 11,91)	p>0.05
Kontrol (39,81 $\pm$ 13,79)	Aliağa bölgesi (32,83 $\pm$ 23,03)	p>0.05

* : Anova (Kruskal-Wallis) ve Dunn Çoklu Karşılaştırma Yöntemi

Şekil 24: Kefal balık kas dokularında Hg ölçüm sonuçlarının karşılaştırılması (değerler ng/g yaş ağırlık üzerindendir)



IV.3.4 Kefal Balığı Kas Dokusunda Pb Ölçüm Bulguları

Kefal balığı kas dokusunda AAS ile kurşun metali ölçümü sonucu elde edilen verilerin özeti tablo 20’de verilmiştir.

Tablo 20: Avlanma bölgelerinde kefal balığı kas dokusunda ölçülen Pb metal değerleri sonuçları (değerler ng/g üzerindendir).

<i>Bölge</i>	<i>Kontrol bölgesi</i>	<i>A</i>	<i>I</i>	<i>G</i>	<i>Aliağa Körfezi</i>
Ortalama:	441,6	717,86	1342,86	467,82	755,35
N:	15	17	5	8	30
Std sapma:	142,74	148,65	194,64	295,01	348,6

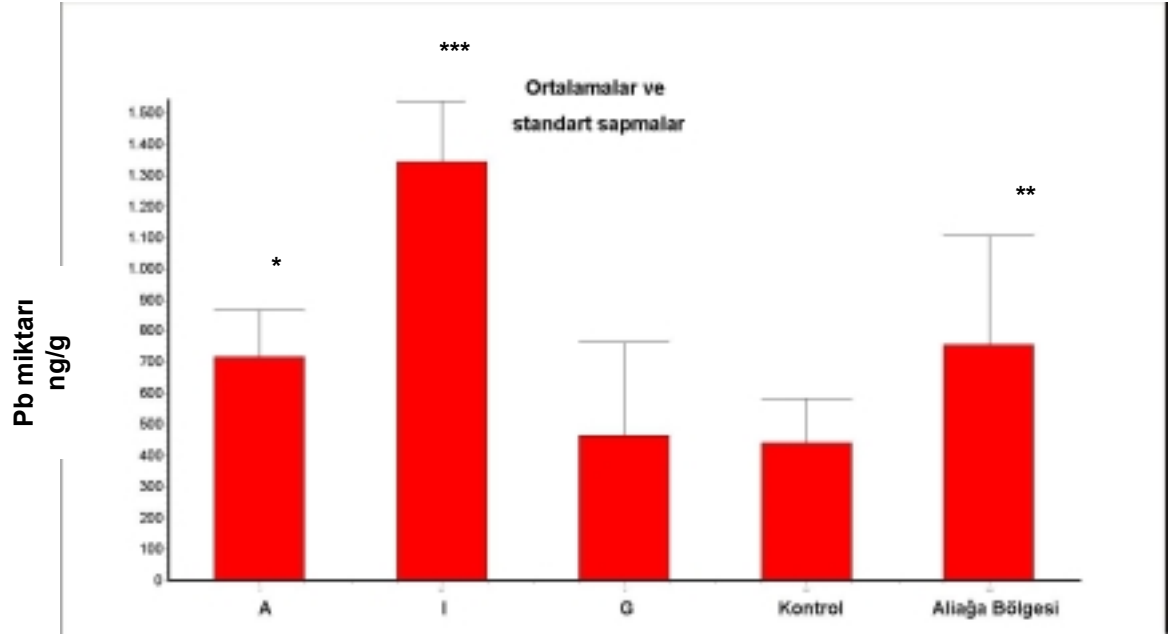
Değerler non parametrik Anova testi olan Kruskal-Wallis yöntemi ile her bölgenin değeri sınıflandırılıp ortalamaları alınmış, bu değerler arasında Dunn Çoklu Karşılaştırma Yöntemi ile istatistiksel hesaplamalar yapılmıştır. Kurşun için hesaplanan bu değerlerin arasındaki fark değerlendirildiğinde, Aliağa Körfezinin, kontrol bölgesine göre anlamlı derecede kirli olduğu saptanmıştır ($p<0.001$). Körfez içi kendi arasında değerlendirildiğinde, I bölgesi değerlerinin kontrol grubu değerlerinden çok yüksek olduğu ($p<0.0001$) saptanmıştır. Yalnız G balık avlanma bölgesinden elde edilen sonuçlar, kontrol bölgesinden elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında, istatistiksel bir anlamlılık bulunamamıştır ($p>0.05$).

Tablo 21: Pb içib Dunn’un Çoklu Karşılaştırma testi sonucu bölgeler arasında oluşan farkların istatistiksel sonuçları (ng/g, ortalama $\pm$ standart sapma).

Kontrol (Foça) (441,6 $\pm$ 142,74)	A bölgesi (717,86 $\pm$ 148,65)	p<0.05
Kontrol (441,6 $\pm$ 142,74)	I bölgesi (1342,86 $\pm$ 194,64)	p<0.001
Kontrol (441,6 $\pm$ 142,74)	G bölgesi (467,82 $\pm$ 295,01)	p>0.05
Kontrol (441,6 $\pm$ 142,74)	Aliağa bölgesi (755,35 $\pm$ 348,6)	p<0.01

* : Anova (Kruskal-Wallis) ve Dunn Çoklu Karşılaştırma Yöntemi

Şekil 25: Kefal balık kas dokularında Pb ölçüm sonuçlarının karşılaştırılması



*: $p < 0.05$ Anova (Kruskal-Wallis) ve Dunn Çoklu Karşılaştırma Yöntemi

** : $p < 0.01$ Anova (Kruskal-Wallis) ve Dunn Çoklu Karşılaştırma Yöntemi

***: $p < 0.001$ Anova (Kruskal-Wallis) ve Dunn Çoklu Karşılaştırma Yöntemi

V. TARTIşMA

Günümüzde teknolojik ve endüstriyel gelişmelere paralel olarak çok çeşitli insan aktiviteleri sonucu sucul çevre, oldukça fazla sayıda kimyasal veya ksenobiyotik tarafından gittikçe artan oranda tehdit edilmektedir. Bu kimyasallar başta ortamda yaşayan sucul organizmalar olmak üzere onları besin kaynağı olarak tüketen insanlar ve bütün ekosistem için büyük tehlike arz etmektedir.

Deniz ekosisteminin yaklaşık 60,000 farklı kimyasal bileşige maruz kalmış olduğu tahmin edilmekte olup¹, yüksek derecede kirlenmiş alanlarda yaşayan balık popülasyonlarında patolojik lezyonlar ve neoplasmlar görülmekte; bu lezyonların sıklığının sedimetlerdeki toksik kontaminantların düzeyi ile ilgili olduğunu düşünülmektedir¹.

Sunulan araştırma Aliağa Körfezinden sağlanan kefal (*Liza saliens*) balıklarında yürütülmüştür. Aliağa Körfezi Ege Denizi kıyılarında İzmir şehrine yakın, petrol rafinerisi, kağıt endüstrisi gibi geniş miktarda endüstriyel aktivitelerin olduğu bir bölgedir. Bu endüstrileşmenin getirileri, kentsel atıkların körfeze boşalmasının yanı sıra, dünyanın beşinci büyük gemi söküm tesisleri de bu bölgenin yakınında yer almaktadır. Daha önceden bu bölgedeki kirliliğin sonuçlarına yönelik ulusal bir bilgi mevcut değildir. Bu yönü ile yapılan çalışma, bu bölgenin kirliliği hakkında ilk bilgileri sağlaması açısından önem taşımaktadır.

Bu bölge ülkemiz için ekonomik değeri yüksek pek çok sanayi kuruluşunun bir arada bulunduğu bir bölgedir. Bu çalışmanın amaç ve sonuçları arasında, sanayinin yoğun olarak yaşandığı bu bölgedeki sucul kirlenmenin belirlenmesi, gerek bu bölgede gelişebilecek insana ve çevreye yönelik risklerin belirlenmesi açısından gerekse

bölgede yapılacak olan ileri çalışmalarda sorunun kaynağının belirlenmesine yardımcı olmak da yer almaktadır.

Çalışmalarımızda kefal (*Liza saliens*) balığı kullanılmıştır. Kefal, pelajik yaşayan ve kirli sulara olan tolerasından dolayı çevresel biyoizleme için tercih edilen bir balık türüdür¹⁰². Kefal balığı mikrozomal EROD aktivitesi ölçümü, balık karaciğerinden elde edilen mikrozomlardaki CYP1A1 proteinin, substrat 7-etoksiresorufinden oluşturduğu reaksiyon neticesinde meydana gelen resorufin miktarının, florometrik tayini ile gerçekleştirilmiştir.

Biyogöstergelerin geniş alandaki organizmalara uygulanabilmeleri, erken uyarıcı testler olmaları, duyarlı ve özgün özellikte olmaları en önemli özellikleri olarak sıralanabilir. EROD enzim aktivitesi bu biyogöstergelerden biridir ve özellikle karaciğerde bulunan CYP1A'nın PAH'lar, PCB'ler, PCDD/F'lere maruziyette indüksiyonunun bir göstergesi olarak balıklarda, kuşlarda ve insanda kullanılmaktadır^{2, 13, 14}.

Biyoizleme aracı olarak EROD aktivitesi, toksik düzlemsel yapılara (örneğin PAH'lara) yakın zaman içindeki maruziyet hakkında bilgi vermektedir. Bu nedenlerden dolayı EROD, çoğunlukla erken uyarı sistemi olarak tanımlanmaktadır¹⁵.

Çalışmalar açıkça göstermiştir ki, balık sitokrom P450 veya monoksijenazları memeli benzerleri ile ortak özellikler paylaşmaktadırlar¹. Sitokrom P450 formları arasında sitokrom P4501A1 karsinojenlerin, mutajenlerin ve çevresel kirleticilerin metabolizmasındaki rollerinden dolayı bir üstünlüğe sahiptir. Bu özelliğinden dolayı, kimyasal kirleticilere maruziyetin belirlenmesinde şimdiye kadar en iyi karakterize edilmiş ve en sık kullanılan biyokimyasal gösterge sitokrom P4501A bağımlı Karma Fonksiyonlu Oksidazların indüksiyonudur⁷⁵.

Ksenobiyotiklerin metabolizması için balıkta gerekli enzimlerin azlığı veya yokluğunun ilk kez ileri sürüldüğü 1962 yılından bu yana, özellikle petrol-yağ hidrokarbonları, kağıt hamuru fabrika pis suyu, endüstriyel ve şehir kanalizasyonu ile kontamine bölgelerden elde edilen balıklarda artmış CYP1A ve bununla bağlantılı arilhidrokarbon hidroksilaz (AHH)ve/veya 7-etoksiresorufin O-deetilaz (EROD) aktiviteleri, adı geçen bölgelerdeki kimyasalların yarattığı çevresel kontaminasyonun biyolojik izlenmesinde balıkta en çok yararlanılan biyokimyasal ölçüm yöntemleridir^{11, 12}. Özellikle CYP1A subfamilyası, karsinogenik ve mutajenik etkili PAH'lar ve poliklorlanmış hidrokarbonların (PCB, PCDD/F'ler, pestisitler gibi) yarattığı çevre kirliliği sonuçlarının değerlendirilmesinde biyolojik tanımlayıcı "biyogösterge" olarak son derece önemli bir role sahiptir^{13, 14, 39, 75}.

Özellikle P4501A izozimi, PAH, PCB ve dioksin gibi kimyasalların reaktif ara ürünlere dönüşümlerini kataliz eder. PAH'ların bir üyesi olan ve petrol ürünlerinde ve endüstriyel atık materyallerinde bulunan benzo-a-piren, mutajenik ve karsinogenik forma CYP1A1 tarafından kataliz neticesinde dönüşmektedir¹¹.

Bir çok PCDD ve PCDF izomeri balıkta EROD aktivitesini indüklemektedir. Laboratuarda 2,3,7,8-TCDD gibi prototip AhR ligandı ile yapılan çalışmalar, bir çok türde EROD indüksiyonuna yol açtığını göstermektedir (Tablo 5). Alabalık ile yapılan çalışmalar ile oral 0.072 µg/kg.bw 2,3,7,8-TCDD dozun, EROD indüksiyonu için eşik değer olarak bulunmuş olup, çalışmalar yalnız alabalık ile sınırlı olmayıp, diğer balık türlerinde de balıkların bu kimyasala EROD indüksiyonu olarak hassas olduğunu göstermektedir^{15, 75, 176}.

Balıklardaki PCB konsantrasyonları PCDD/F'ler ile karşılaştırıldığında, kontamine bölgelerde µg/kg'dan mg/kg seviyelerine kadar çıkmakta olup, dünya

genelinde bir çok balık türünde saptanmıştır¹⁶⁸. PCDD ve PCDF'lere benzer olarak PCB'lerin de EROD indüklenme potansiyelleri AhR afinitelerine bağlı olmaktadır. Lateral klor sübstütüsyonlarını 4 ve 4' konumda içeren ve en az bir klor pozisyonunda olduğu türler potent Ahr ligandlarıdır¹⁵. 3,3',4,4'-tetraklorobifenil (PCB77), 3,3',4,4',5-pentoklorobifenil (PCB126) ve 3,3',4,4',5,5'-hekzaklorobifenil (PCB169), çevresel örneklerde sürekli saptanan ve güçlü AhR agonistleri olan örnekler¹⁶⁸ olup, balıklarda genellikle orta ve güçlü EROD indükleyicisi olarak bilinirler (Tablo 5).

Yurdumuzda 1998 yılında yapılan bir çalışmayla Arınç ve Şen¹⁶⁹, İzmir Körfezinin en çok kirlenmiş bölgesinden yakalanmış kefal balıklarından CYP4501A'yı saflaştırıp, katalitik, spektral, elektroforetik ve immunokimyasal özelliklerini analiz ederek karakterize etmişlerdir. Bu çalışmanın ardından, İzmir körfezinin çeşitli bölgelerinden sağlanan dil balığı ve kefal balıklarında CYP1A ile ilişkili EROD aktivitesi indüksiyonu ve CYP1A'nın immünokimyasal saptanması yönünde çalışmalar yapmışlardır. Arınç ve Şen'in yapmış olduğu çalışmalar sonucunda İzmir Körfezinin Pasaport bölgesinin ve diğer numune alınan körfez içindeki diğer bölgelerin temiz kabul edilen referans noktasına göre anlamlı derecede kirli olduğu saptanmıştır ($p<0.001$). Bu çalışmalar sonucunda tespit edilen artmış EROD aktivitesinin, İzmir Körfezinin PAH'lar, PCB'ler ve diğer organik kirleticilerle kirlendiği şeklinde yorumlamışlardır⁹³. Arınç ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptıkları İzmir Körfezinin kirliliğini ortaya koyan diğer bir çalışmada⁹⁸ da, İzmir Körfezi içindeki Pasaport bölgesinin EROD aktivitesinin referans bölgede ölçülene göre anlamlı derecede farklı olması ($p<0.0001$), İzmir Körfezi içindeki yüksek hidrokarbon kirliliğine bağlanmıştır. Arınç ve arkadaşlarının İzmir Körfezinin yapmış olduğu bu çalışmalar dışında^{93, 98, 99, 169} yurdumuzda, EROD aktivitesi ölçülerek kirliliğin belirlenmeye çalışıldığı başka çalışmalar bulunmamaktadır.

Yurdumuzda yapılmış ve yukarıda bildirilen EROD aktivitesi ile ilgili çalışmaların ölçüm sonuçları ile bu çalışmada bulunan değerlerin karşılaştırılması Tablo 22’de sunulmuştur.

Tablo 22: Türkiye’de yapılan EROD aktivitesi ölçüm sonuçlarının, bu çalışmanın sonuçları ile karşılaştırılması

Tür	EROD enzim aktivitesi (pmol rez./dak/mg protein)	Referans
Liza saliens	2531.1 ±3395.4	Bu çalışma (Aliağa Körfezi değeri)
Liza saliens	46,33 ±16,180	Bu çalışma (kontrol bölgesi değeri)
Liza saliens	1293 ±298	93 (İzmir Körfezi Pasaport bölgesi)
Liza saliens	25 ±9	93 (körfez dışı referans bölge)
Liza saliens	883 ±172	98 (İzmir Körfezi Pasaport bölgesi)
Liza saliens	11 ±2	98 (körfez dışı referans bölge)

Bu çalışmada elde edilen EROD aktivitesi sonuçları ile Arınç ve ark. çalışmaları arasında paralellik mevcuttur. Çünkü sunulan çalışma da dahil olmak üzere bu çalışmaların hepsinde temiz olduğu düşünülen kontrol bölgesi ile kirli olduğu düşünülen bölgeler arasında istatistiksel olarak büyük anlamlılık taşıyan EROD aktiviteleri farklılıkları balık karaciğerinde belirlenmiştir.

Bu konuda dünyada yapılmış pek çok araştırma vardır^{90-92, 94, 95}. Bu araştırmalarda her ne kadar farklı balık türleri kullanılmış olsa da elde edilen sonuçlar, bu çalışmanın sonuçlarını destekler niteliktedir. Nitekim Sole ve arkadaşları, sazan balığında gerçekleştirdikleri çalışmalarında¹⁷⁰, 347 ±95 (pmol rez/dak/mg protein) EROD aktivitesi ölçüm değeri ile, referans bölge arasında anlamlı bir fark tespit edebilmişlerdir. Orrego’nun 2006 yılında Şili’de alabalıklarla yapmış olduğu araştırmalarında¹⁷¹, kirliliğe bağlı olarak, EROD aktivitesinde 2 ila 4 kat artma tespit etmişlerdir. Tüm bu çalışmalar,

EROD aktivitesinde meydana gelen indüksiyonun kirlilik nedeniyle gerçekleştiğini ve tespit edilen bölgelerde kirliliğin göstergesi olduğunu belirtmişlerdir.

Kefal balıklarında elde edilen EROD aktiviteleri ışığında, Aliağa Körfezinde başta PAH ve klorlu hidrokarbonlar olmak üzere bu tip kimyasal maddelerle kirlendiği ileri sürülebilir. Bu kirliliklerin kaynağının belirlenmesi ise ileride yapılacak çalışmaların sorumluluğundadır. Bu kaynaklardan ilk akla gelenler petrol işleme tesisleri ve kentsel atıkların neden olabileceğidir.

EROD aktivitesi çalışmalarında hata yapılmadığının gösterilmesi Western blot analizi ile gerçekleştirilebilmektedir. Farklı yakalanma noktasından yakalanan Liza saliens karaciğer mikrozomlarında yapılan Western blot analizi sonuçlarında, P4501A1 antikorunun kefal karaciğer mikrozomlarına oldukça güçlü biçimde bağlandığını ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar, bize çalışma alanlarından toplanan kefal balıklarının yüksek EROD aktivitesine paralel olarak yüksek sitokrom P4501A1 protein seviyesine de sahip olduklarını göstermekte olup, böylece EROD aktivitesi ölçümleri ile bulunan sonuçların sağlaması yapılmıştır.

Biyolojik gelişimleri süresince canlılar etrafında karşılaştıkları metallerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinden faydalanarak hayati fonksiyonlarını gerçekleştirmede kullanmışlardır. Ancak gelişen endüstri ve sanayi çevrede bulunan metallerin dağılımını (miktar ve çeşit olarak) değiştirmesi neticesinde değişen maruz kalma, canlılarda toksik etkilere neden olmaktadır. Düşük dozlarda hayati önem arz eden ve esansiyel element olan bir metal yüksek dozlarda biyolojik yapılarla geri dönüşümsüz etkileşimler neticesinde konformasyonel değişiklikler yaparak toksik etkilere neden olmaktadır.

Çeşitli endüstriyel faaliyetlerden kaynaklanan atık suların içinde bazen eser miktarda, bazen de yüksek konsantrasyonlarda metaller bulunur. Metaller, ortamdaki

canlı yaşam üzerinde konsantrasyonları ile orantılı olarak toksik etki yaparlar¹⁸. Bu maddeler arasında en önemli grubu, ağır metaller olarak adlandırılan Sb, Ag, As, Be, Cd, Cr, Cu, Pb, Mn, Hg, Ni, Se, T, U, V, Zn elementleri oluşturur. Bu metaller balıkların başta karaciğer ve kas dokuları olmak üzere çeşitli dokularında kimyasal kirliliğe bağlı olarak çeşitli konsantrasyonlarda saptanabilmektedirler^{5, 16, 17}. Bu metaller içinde Cr, düşük dozlarda yaşamsal döngü için gerekli olduğu bulunmuştur ama Hg, Cd, ve Pb gibi bazı metallerin, hücrelerde hiçbir görev tanımlanmamıştır¹⁷². Hücrede görevi olmayan bu tür metaller genel olarak hücrenin normal işleyiş mekanizmasını bozarak etki gösterirler.

Sucul çevreye ağır metaller antropojenik aktiviteler, atmosferik taşınma ve erozyon yoluyla ulaşmaktadır. Yıkılımları mümkün olmadığı ve sucul organizmalarda birikme eğilimi gösterdikleri için sucul ekosistemin en önemli kirleticileri arasında yer almaktadırlar¹⁷².

Sucul çevrenin metaller ile kirlenmesinin araştırılmasında suyun metal tayini analizleri, örnekleme anındaki konsantrasyonu verdiği için belirli aralıklarla tekrarlanma gerekliliği doğurmaktadır. Bunun yanında balıklar gibi suda yaşayan organizmalarda yapılacak metal tayinleri, kirliliğin derecesini daha iyi yansıtmaktadır¹⁷³.

Çalışmamızda da balıklarda maruz kaldıkları metal miktarlarının tespiti amacıyla kas dokularında metal ölçümlerine gidilmiştir. Kas dokusunda metallerin tayinin yapıldığı pek çok çalışma mevcuttur¹⁵⁵⁻¹⁶³. Bunun yanı sıra bu çalışmada karaciğerde metal analizlerinin yapılmama nedeni olarak doku yetersizliği gösterilebilir. EROD tayini yapılması nedeniyle yeterli karaciğer örnekleri sağlanamamıştır.

Sunulan çalışmada değerlendirilen metallerden biri **kurşundur**. Elde edilen değerler sonucunda, bölgede en yüksek kurşun değerleri rafineri bölgesi içinde yer alan "I" avlanma bölgesinde (1342,86 ±194,64 ng/g) ve rafineri bölgesinde (755,35

$\pm 348,6$ ng/g) gözlenmiş olup kontrol bölgesi değerlerinden ($441,6 \pm 142,74$ ng/g) farkı istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.01$).

Tablo 8'den de görülebileceği üzere, Türkiye'de bir çok çalışmada balıklarda ölçülen kurşun değerleri bu çalışmada ölçülen değerlerden daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu çalışmada da kurşun değerleri, avlanma bölgeleri arasında oldukça değişmekte olup, kontrol bölgesi ile kıyaslandığında rafineri bölgesi içinde yer alan I bölgesinden avlanan balıklarda en yüksek kurşun düzeyleri saptanmıştır ($p < 0.01$). Aynı karşılaştırma "G" bölgesi için yapılmış, istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememektedir.

"I" bölgesinde balıkların, bölgeye gelen gemilerden ve rafineri atıklarından ve kentsel atıklardan aldığı kurşun miktarı ile kirlenmiş olduğu düşünülmektedir. Bölgenin şehir kanalizasyonunun bir bölümü bu bölgeye akmaktadır. Aliağa Körfezi için ölçülen toplam kurşun değerleri, Türk Gıda Kodeksinin izin vermiş olduğu 1mg/kg'lık değeri geçmemekteyken, rafineri bölgesi içinde yer alan I bölgesinde ölçülen kurşun değerleri Türk Gıda Kodeksinin izin vermiş olduğu 1mg/kg'lık değeri geçmektedir. Kabul edilebilir seviyelerin üstünde kurşun tüketimi özellikle gençlerde gelişim problemleri yaratabileceği unutulmamalıdır.

Çalışmamızda değerlendirmeye alınan diğer bir metal **cıva**dır. Metalik haldeyken bakteriler nedeniyle metillenerek organik türlere çevrilen ve organizmalarca rahatlıkla alınan cıva, bu özelliği nedeniyle besin zincirinde birikme eğilimindedir¹⁹. İnsana kadar ulaşp toksik etkilerini gösterebilen cıva en geniş çaplı toksik etkisini, Japonya'nın Minamata Körfezinde yaşayan halkta göstermiştir. Çevreye endüstriyel atıklar içinde salınan metalik cıva, organizmaların organik hale dönüşüp, balıklar tarafın absorblanmıştır. Besin zinciri boyunca biriken ve bu balıklarla beslenen bölge halkında en

yüksek seviyeye ulaşan cıva, 10000'den fazla insanın zehirlenmesine, 2000'e yakın kişinin ölümüne neden olmuştur.

Sunulan çalışmada rafineri bölgesi cıva değerleri ile ($32,83 \pm 23,03$ ng/g), kontrol bölgesinde ölçülen cıva değerleri ($39,81 \pm 13,79$ ng/g) arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Değerler, Türk Gıda Kodeksinin belirlediği 0.5mg/kg değerinin altındadır. Bu değerler ışığında, ileride cıva için miktar tayininin, karaciğer örneklerinde yapılması daha yararlı olabilecektir.

Soğuk buhar oluşturmali AAS ile cıva tayinlerinde tüm organik cıva bileşiklerinin yıkılama işlemi sırasında mineralize edilmesi ve örneği parçalarken kaçırılmaması önem arz etmektedir. Mobilitesi yüksek olan bu elementin yıkılama işlemi sonucunda bekletilmemesi daha uygun olmaktadır¹⁷⁴. Bunun yanında soğuk buhar yöntemi cıva tayininde oldukça tekrarlanabilir sonuçlar vermektedir. Çalışmalarımızda bu konulara dikkat edilmiş, yıkılama sırasında çözelti buharı ile cıvanın uçmaması için, yıkılama sıcaklıkları basamak basamak yükseltilmiş ve numuneler bekletilmeden çalışmıştır.

Doğal cıva kirlenmesi için balıklarda 0.5 mg/kg'a kadar kabul edilebilir sayılmakta¹⁷⁵ olup bu değer, Türk Gıda Kodeksinde de limit değer olarak kabul edilmiştir.

Krom esansiyel özellikte bir element olup, ölçümü yapılan diğer metallerden bu özelliği nedeniyle ayrılmaktadır. Fakat kromun +6 değerlikli yapısı, oldukça toksiktir. Krom(VI) insan karsinojeni olarak sınıflandırılmaktadır¹²⁹. Sıvı krom +6 bileşiklerinin bakterilerde gen mutasyonlarına yol açtığı, insan epidemiyolojik çalışmalarında da akciğer kanseri insidansını arttırdığı bilinmektedir¹³².

İçme sularında, WHO tarafından içme suyunda bulunacak krom(VI) miktarı için maksimum değer 0.05 mg/L olarak belirlenmiştir.

Krom, Cd ve Pb tayininde olduğu gibi, Elektrottermal Atomlaştırıcılı Atomik Absorpsiyon Spektrometresi kullanılarak tayin edilmiştir. Çalışmamızda rafineri bölgesi için ölçülen değerler ($113,14 \pm 90,85$ ng/g), kontrol bölgesinde ölçülen değerlerden ($22,49 \pm 16,408$ ng/g) istatistiksel olarak anlamlı olacak derecede farklıdır ($p < 0.001$). Türkiye'de sucul canlılarda krom ölçümleri İskenderun körfezinde yapılmış bir çalışma ile sınırlı kalmaktadır. Yılmaz ve arkadaşlarının¹⁶⁶ İskenderun Körfezinde gerçekleştirdiği bu çalışmada krom değerleri ortalamasını 1.46 ± 0.53 µg/g cinsinden bulmuşlardır. Ölçülen değerler açısından, Cr için, insan aktiviteleri ve sanayileşmenin oldukça yoğun olduğu İskenderun körfezi ile Aliağa körfezi arasında bir paralellik görülmektedir.

Kadmiyum ağır metal kirliliğinden sorumlu önemli metallerden biridir. Pillerin yapımında yaygın olarak kullanılan kadmiyumun mesleksel maruziyeti hakkında tutarlı ve birbiri ile uyumlu epidemiyolojik çalışmalardan akciğer kanseri için yeterli fakat diğer kanser türleri için kısıtlı delillerin varlığı ortaya konmuştur. Bunun yanı sıra deney hayvanı çalışmaları da; kadmiyumun karsinogenik etkileri hakkında yeterli veri elde edilmesine yardımcı olmuştur^{118, 119}.

Yarattığı toksisitenin ana nedenleri arasında çinko içeren enzimlerle vücutta yarışmasıdır. Çinko, biyolojik sistemde oldukça önemli bir element olduğu halde, kimyasal yapısı çinkoya bu kadar benzer olan kadmiyum, biyolojik sistemde çinkonun işlevlerini hiçbir şekilde yerine getiremez¹¹⁸.

Kadmiyum için Türk Gıda Kodeksine göre, balıklarda bulunabilecek limit değeri 0.1 mg/kg olarak belirlenmiştir.

Kontrol bölgesi kadmiyum değerleri (21,11 $\pm$ 9,85 ng/g) ile rafineri bölgesi kadmiyum değerleri (27,88 $\pm$ 19,05 ng/g) arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (p>0.05). Yine Türkiye’de yapılan çalışmalar ile karşılaştırmalar yapacak olursak, Kargın’ın¹⁶⁸ Seyhan nehrindeki Capoeta barroisi balığı kas dokusunda ölçmüş olduğu 2.9g/g ila 10.9g/g arasındaki Cd seviyelerine göre, Aliağa körfezinde ölçülmüş olan Cd seviyeleri oldukça düşük kalmakta olup, Türk Gıda Kodeksinin belirlemiş olduğu 0.1 mg/kg değerinin de oldukça altındadır.

Çalışmada balık kas dokusunda kurşun ve krom değerlerinin temiz bölgeden sağlanan balıklardaki değerlerle karşılaştırıldığında oldukça yüksek çıkması bu bölgede bu metallere istenmeyen bir maruziyetin söz konusu olduğu şeklinde yorumlanabilir. Bu metallere ait kirlilik kaynakları olarak da şehir atık suları, yakınlardaki gemi söküm merkezi, körfeze giren tanker ve diğer gemiler gösterilebilir. Gelecekte bu kaynakların belirlenmesine yönelik araştırmalara ihtiyaç vardır.

Sunulan alışma gerek saptanan EROD aktiviteleri gerekse belirlenmeye çalışılan ağır metaller göz önüne alındığında yurdumuzda bu konuda yapılmış ilk çalışmadır. Bu yönüyle de daha önce çok az sayıda da olsa yapılmış çalışmalardan üstünlük göstermektedir. Yurdumuzda bu tür çalışmaların artmasına ihtiyaç vardır. Özellikle sonuçların kirlilik yaptığından şüphelenilen kimyasalların miktar tayinleri ile desteklenmesi, kirlilik kaynakları ve ilgili sorumluları, sağlıklı bir evre ve gelecek nesiller için önlemler almaya itecektir.

VI. Ö Z E T

20. yüzyılın başında kullanılan 1000 kadar kimyasal maddenin büyük bölümü bitkisel, hayvansal ve mineral kaynaklı iken bugün çoğunluğu sentetik olmak üzere çevremizi saran kimyasal maddelerin sayısı 100.000 geçmekte ve her yıl bu sayıya 1000 kadar yeni kimyasalın eklendiği hesaplanmaktadır. Bu kimyasalların başlıcaları pestisitler, poliklorlanmış bifeniller (PCB'ler), poliklorlanmış dibenzodoksinerler (PCDD'ler), polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH'ler), radyonüklidler ve ağır metaller olarak sayılabilir. Bu bileşiklerin yaygın kullanım ve çeşitliliğinin sonucu gerek akut gerekse kronik maruziyete bağlı olarak başta insan olmak üzere balık, kuş vb. hayvanlarda pek çok istenmeyen etkiler ortaya çıkmaktadır. Çünkü bu bileşiklerin çoğu doğa koşullarında yıllarca dayanıklılık gösterip, doğada sediment, su toprak gibi çeşitli kompartımanlarda birikme özelliğine sahip bileşiklerdir. Özellikle günümüz sucul çevresi sürekli ve artan miktarlarda bu kimyasallarca kirletilmektedir. Çevrenin önemli bir kompartmanı olan suların sayılan bu çevre kirleticileri ile değişik konsantrasyonlarda kirlenmesi insan ve yaban hayat açısından beklenmeyen tehlikelerin doğmasına neden olabilmekte, su flora ve faunasını olumsuz yönde etkilemektedir. Bir bölgedeki kirliliğin varlığı ve hatta derecesi biyogöstergelerin kullanımı ile sağlanabilmektedir. EROD aktivitesi de, sucul kirlenmenin izlenmesinde dünyada en çok kullanılan biyogöstergeleri arasındadır.

Aliağa Körfezi Ege denizi kıyılarında İzmir şehrine yakın petrol rafinerisi, kağıt endüstrisi gibi geniş miktarda endüstriyel aktivitelerin olduğu bir bölgedir. Bu endüstrileşmenin atıkları, kentsel atıkların körfeze boşaltılmasının yanı sıra dünyanın beşinci büyük gemi söküm tesisleri de bu bölgenin yakınında yer almaktadır. Bu bölgedeki endüstriyel aktivitelerden kaynaklanan kirliliğin sonuçlarına yönelik olarak ulusal bir bilgi mevcut değildir. Bu çalışmada Aliağa Körfezinde kefal balıklarında (Liza saliens) EROD aktivitesi tayini ile Cr, Hg, Pb ve Cd metalleri ölçümleri yapılarak, bölgenin

metal kirliliği ve sucul sistemin PAH tipi kirlilikten etkilenip etkilenmediği değerlendirilmiştir.

Aliağa Körfezi EROD aktivitesi değerleri (2531.1 ± 609.83 pmol res./dak./mg protein), kontrol bölgesi değerlerinden ($46,33 \pm 3.11$ pmol res./dak./mg protein) istatistiksel olarak oldukça farklıdır ($p=0.0004$). Sonuçlar Aliağa Körfezinde kirliliğin boyutlarına yönelik ilk bilgiler olup, bölgenin PAH tipi kirleticiler ile yoğun bir kirliliğe maruz kaldığını göstermektedir. Aliağa Körfezi Cr ve Pb lm sonuçlarının (113.14 ± 90.85 ng/g ve 755.35 ± 348.6 ng/g) kontrol bölgesi değerlerine göre (22.49 ± 16.408 ng/g ve 441.6 ± 142.74 ng/g) farkı istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.001$ ve $p<0.01$). Aliağa Körfezinde, kontrol bölgesine göre Pb ve Cr kontaminasyonunu işaret ederken, Hg (Aliağa: 32.83 ± 23.03 ng/g, kontrol: 39.81 ± 13.79 ng/g, $p>0.05$) ve Cd (Aliağa: 27.88 ± 19.05 ng/g, kontrol: 21.11 ± 9.85 ng/g, $p>0.05$) lm sonuçlarında aynı istatistiksel fark bulunamamıştır.

VII. S U M M A R Y

There were around 1000 chemicals from plant, animal and mineral sources used in the beginning of 20th century. Meanwhile the number of chemical substances around the environment is over than 100.000 and every year roughly 1000 new chemicals are predicted to be added to the existed ones. These chemicals mostly are pesticides, Polychlorinated biphenyls (PCBs), Polychlorinated dibenzodioxines/Furanes, (PCDDs/Fs), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), radio nuclides and heavy metals. As a result of common use and varieties of these compounds, with regard to both acute and chronic exposure, numerous toxic effects on human being, and on animals such as fish, bird etc. appears. Because most of these compounds are persistent in the natural conditions and could accumulate in various compartment such as sediment, water and soil in environment. The pollution of water, which is important compartment of environment, with various concentrations of environmental pollutants, would load to unexpected threats on human and wild life and also affect the water flora and fauna in a negative way. Induction of cytochrome P4501A and of its monooxygenase activity, namely 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity, is widely used as a biochemical marker in biomonitoring of environmental contaminants.

Aliağa Bay at the west coast of Aegean Sea nearby İzmir, hosting a wide range of industrial activities such as oil-refinery, paper factory. Although waste of these industrialization, city sewer system are common causes of pollution, also World's fifth biggest ship-breaking area has been located near of this region. There is no national documentation or research on determination of pollution resulted from industrial activities in this area. In this study, the degree of induction of CYP4501A-associated EROD activity in the liver and measurement of Cr, Hg, Cd, Pb metals will be used pollution deposit of Aliağa Bay.

Difference EROD activity results between Aliağa Bay(2531.1 ± 609.83 pmol res/min/mg protein) and reference point(46.33 ± 3.11 pmol res/min/mg protein) is statistically significant ($p=0.0004$). Thus obtained results from this study would be the first information regarding Aliağa Bay, the results indicates that, Aliağa Bay has been heavily polluted with PAH type contaminants. Aliağa Bay, Results of Cr and Pb analyzes for Aliağa Bay (113.14 ± 90.85 ng/g and 755.35 ± 348.6 ng/g) are significantly different from reference point(22.49 ± 16.408 ng/g and 441.6 ± 142.74 ng/g) results ($p<0.001$ and $p<0.01$). Outcomes indicate that the Bay has been contaminated with Pb and Cr, beside there is no significant difference for the results of Hg(Aliağa: 32.83 ± 23.03 ng/g, control: 39.81 ± 13.79 ng/g, $p>0.05$) and Cd (Aliağa: 27.88 ± 19.05 ng/g, control: 21.11 ± 9.85 ng/g, $p>0.05$) metal measurements.

VI. KAYNAKLAR

1. GOKSOYR, A., FORLIN, L.: The Cytochrome P-450 System in Fish, Aquatic Toxicology and Environmental Monitoring, Aquatic Toxicology, 22, 287-312. (1992)
2. LIVINGSTONE, D.R.: Biotechnology and Pollution Monitoring: Use of Molecular Biomarkers in the Aquatic Environment, J. Chem. Tech. Biotechnol., 57, 195-211. (1993)
3. VAN DER OOST, R., LOPES, S.C.C., KOMEN, H., SATUMALAY, K., VAN DEN BOS, R., HEIDA, H. et al.: Assessment of Environmental Quality and Inland Water Pollution Using Biomarkers Responses in Caged Carp (Cyprinus Carpio): Use of a Bioactivation: Detoxification Ratio as a Biotransformation Index (BTI)., Marine Environmental Research, 46, 315–319. (1998)
4. KURT, P.B. , ÖZKOÇ, H.B.: A Survey to Determine Levels of Chlorinated Pesticides and PCBS in Mussels and Seawater from The Mid-Black Sea Coast Of Turkey, Mar. Pollut. Bull., 48, 1076-83. (2004)
5. AYAS, Z., BARLAS, N., KOLONKAYA, D.: Determination of Organochlorine Pesticide Residues in Various Environments and Organisms in Göksu Delta, Turkey, Aquatic Toxicology, 39, 171-181. (1997)
6. FİLAZİ, A., BASKAYA, R., KUM, C.: Metal Concentrations in Tissues of The Black Sea Fish Mugil Auratus from Sinop-Icliman, Turkey, Human and Experimental Toxicology, 22, 85-87. (2003)
7. TURKMEN, A., TURKMEN, M.: Heavy Metals in Three Commercially Valuable Fish Species From İskenderun Bay, Northern East Mediterranean Sea, Turkey, Food Chemistry, 91, 167–172. (2005)
8. TANABE, S., MORI, T., TATSUKAWA, R., MIYAZAKI, N.: Global Pollution of Marine Mammals of PCBS, DDTs and HCHS (BHCS), Chemosphere, 12, 1269–1275. (1983)

9. POON, B.H.T., LEUNG, C.K.M., WONG, C.K.C., WONG, M.H.: Polychlorinated Biphenyls and Organochlorine Pesticides in Human Adipose Tissue and Breast Milk Collected in Hong Kong, *Archives Of Environmental Contamination and Toxicology*, 49, 274 – 282. (2005)
10. STEGEMAN, J.J., KLOEPPER-SAMS, P.J.: Cytochrome P-450 Isozymes and Monooxygenase Activity in Aquatic Animals, *Environ. Health Perspect.*, 71, 87-95. (1987)
11. JULKUNEN, A., SCHILLER, F., MULLER, D., KLINGER, W., HANNINEN, O.: Monooxygenase Activity of Fish Liver in Biomonitoring Aquatic Environment, *Arch. Toxicol.* 9, 378-81. (1986)
12. STEGEMAN, J.J.: Monooxygenase Systems in Marine Fish, in *Pollutant Studies in Marine Animals*, (GIANI C.S., ed.). Crc. Pres, 66-92. (1987)
13. FENT, K.: Ecotoxicological Effects at Contaminated Sites, *Toxicology*, 205, 223-40. (2004)
14. NILSEN, B.M., BERG, K., GOKSOYR, A.: Induction of Cytochrome P450 1A in Fish, A Biomarker for Environmental Pollution, *Methods Mol. Biol.*, 107, 423-38. (1998)
15. WHYTE, J.J., JUNG, R.E., SCHMITT, C.J.: Ethoxyresorufin O-Deethylase (EROD) Activity in Fish as a Biomarker of Chemical Exposure, *Critical Reviews in Toxicology*, 30, 347-570. (2000)
16. CANLI, M., ATLI, G.: The Relationships Between Heavy Metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) Levels and the Size of Six Mediterranean Fish Species, *Environmental Pollution*, 121, 129–136. (2003)
17. ZYADAH, M. and CHOUIKHI, A.: Heavy Metal Accumulation in *Mullus Barbatus*, *Merluccius Merluccius* and *Boops Boops* Fish From The Aegean Sea, Turkey, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50, 429–434. (1999)

18. YİĞİT, S., ALTINDAG, A.: Accumulation of Heavy Metals in The Food Web Components of Burdur Lake, Turkey, Fresenius Environmental Bulletin, 11, 12a. (2002)
19. VURAL, N.: Toksikoloji, Ankara Üni. Eczacılık Fak. Yayınları No:73, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara. (1996)
20. http://en.Wikipedia.Org/Wiki/Minamata_Disease (10.01.2007)
21. PITOT, H.C., DRAGAN, Y.P.: Chemical Carcinogenesis in Casarett And Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons, 6th Edition, (KLAASSEN C.D., ed), p:241-321, The Mcgraw-Hill Companies, New York. (2001)
22. KARAKAYA, A.E.: Toksikolojinin Temel Kavramları in Türk Farmakoloji Derneği, Farmakoloji Ders Kitabı, (BÖKESÖY, T.A., ÇAKICI, İ., MELLİ, M., eds.), p:80-105, Gazi Kitabevi, Ankara. (2000)
23. ÇOK, İ., ŞARDAS, S., KADIOĞLU, E., CİVELEK, E.: Assessment of DNA Damage in Glue Sniffers, Mutation Research, 557, 131-136. (2004)
24. BURGAZ, S., ÇOK, İ., ÇOBAN, T., BÜLBÜL, D., İŞCAN, M.: Occurrence of Organochlorine Pesticides in Cancerous and Noncancerous Breast Tissue, Fresenius Environmental Bulletin, 14, 804-810. (2005)
25. ÇOK, İ., Dumansız Tütün Kullanımının İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri, Türkiye Klinikleri, 1, 24-29. (1998)
26. ÇOK, İ., SATIROĞLU, M.H.: Polychlorinated Biphenyl Levels in Adipose Tissue of Primiparous Women in Turkey, Environment International, 30, 7-10. (2004)
27. İŞCAN, M., ÇOBAN, T., ÇOK, İ., BÜLBÜL, D., EKE, B.C., BURGAZ, S.: The Organochlorine Pesticide Residues and Antioxidant Enzyme Activities in Human Breast Tumors: Is There Any Association? Breast Cancer Research and Treatment, 72, 173-182. (2002)

28. VINDIMION, E., GARRIC, J.: Freshwater Fish Cytochrome P450 Dependent Enzymatic Activities: A Chemical Pollution Indicator, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 18, 277-85. (1989)
29. SARKAR, A., RAY, D., SHRIVASTAVA, A.N.: Molecular Biomarkers: Their Significance And Application in Marine Pollution Monitoring *Exotoxicology*, 15, 333-340. (2006)
30. CARLSON, D.L, HITES, R.A: Polychlorinated Biphenyls in Salmon and Salmon Feed: Global Differences and Bioaccumulation *Environmental Science and Technology*, 39, 19, 7389-7395. (2005)
31. WAFO, E., SARRAZIN, L., DIANA, C.: Accumulation and Distribution of Organochlorines (PCBs and DDTs) in Various Organs of *Stenella Coeruleoalba* and a *Tursiops Truncatus* From Mediterranean Littoral Environment (France), *Science of the Total Environment*, 348, 115-127. (2005)
32. KUCKLICK, J.R., STRUNTZ, W.D.J., BECKER, P.R.: Persistent Organochlorine Pollutants in Ringed Seals and Polar Bears Collected From Northern Alaska *Science of The Total Environment*, 287, 45-59. (2002)
33. WELLS, P.G., DEPLEDGE, M.H., BUTLER, J.N.: Rapid Toxicity Assessment and Biomonitoring of Marine Contaminants - Exploiting the Potential of Rapid Biomarker Assays and Microscale Toxicity Tests, *Marine Pollution Bulletin*, 42, 799-804. (2001)
34. CAJARAVILLE, M.P., BEBIANNO, M.J., BLASCO, J., PORTE, C., SARASQUETE, C., VIARENGO, A.: The Use of Biomarkers to Assess the Impact of Pollution in Coastal Environments of The Iberian Peninsula: A Practical Approach, *Sci. Total Environ.*, 2, 295-311. (2000)
35. MENEZES, S., SOARES, A.M.V.M., GUILHERMINO, L.: Biomarker Responses of the Estuarine Brown Shrimp *Crangon Crangon* L. to Non-Toxic Stressors: Temperature, Salinity and Handling Stress Effects, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 335, 114-122. (2006)

36. BODIN, N., BURGEOT, T., STANISIERE, J.Y., BOCQUENE, G., MENARD, D., MINIER, C., BOUTET, L., AMAT, A., CHEREL, Y., BUDZINSKI, H.: Seasonal Variations of a Battery of Biomarkers And Physiological Indices for The Mussel *Mytilus Galloprovincialis* Transplanted into The Northwest Mediterranean Sea, *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, 138, 411-27. (2004)
37. VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N.P.E.: Fish Bioaccumulation and Biomarkers in Environmental Risk Assessment: A Review, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13, 57-149.(2003)
38. DİZDAROĞLU, M., KARAKAYA, A.E.: *Advances in DNA Damage and Repair. Oxygen Radical Effects, Cellular Protection, and Biological Consequences*, Kluwer Academic / Plenum Publishers, 233 Spring Street, New York.
39. SANDVIK, M., BEYER, J., GOKSOYR, A.: Interaction of Benzo(a)pyrene 2,3,3,4,4,5-Hexachlorobiphenyl (PCB-156) and Cadmium on Biomarker Responses in Flounder, *Biomarkers*, 2, 153-160. (1997)
40. SANDVIK, M., HORSBERG, T.E.: Hepatic CYP1A Induction in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) After Exposure to Benzo(a)pyrene in Water, *Biomarkers* 2, 175-180. (1997)
41. KIM, G.B., ANDERSON, J.W., BOTHNER, K.: Application of P450RGS (Receptor Gene System) as a Bioindicator of Sediment PAH Contamination in The Vicinity of Incheon Harbor, Korea, *Biomarkers*, 2, 181-188. (1997)
42. MONDON, J.A., DUDA, S., NOWAK, B.F.: Histological, Growth and 7-Ethoxyresorufin O-Deethylase (EROD) Activity Responses of Greenback Flounder *Rhombosolea Tapirina* to Contaminated Marine Sediment and Diet, *Aquatic Toxicology*, 54, 231-247. (2001)
43. GUYONNET, B., ALIAUME, C., ALBARET, J.J.: Biology of *Ethmalosa Fimbriata* (Bowdich) and Fish Diversity in The Ebrie Lagoon (Ivory Coast), a Multipolluted Environment *Ices, Journal of Marine Science*, 60, 259-267. (2003)

44. SIROKÁ, Z., DRASTICHOVÁ, J.: Biochemical Markers of Aquatic Environment Contamination - Cytochrome P450 in Fish. A Review, *Acta Vet. Brno.*, 73, 123-132. (2004)
45. KUIPER, R., BERGMAN, A., VOS, J.G.: Some Polybrominated Diphenyl Ether (PBDE) Flame Retardants with Wide Environmental Distribution Inhibit TCDD-Induced EROD Activity in Primary Cultured Carp (*Cyprinus Carpio*) Hepatocytes, *Aquatic Toxicology*, 68, 129-139. (2004)
46. WHITE, R. D., SHEA, D., STEGEMAN, J.J.: Metabolism of the Aryl Hydrocarbon Receptor Agonist 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl by The Marine Fish Scup (*Stenotomus Chrysops*) in Vivo And in Vitro, *Drug Metabolism and Disposition*, 25, 564-572. (1997)
47. CHEN, G., WHITE, P.A.: The Mutagenic Hazards of Aquatic Sediments: A Review, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 567, 151-225. (2004)
48. UDROIU, L.: The Micronucleus Test in Piscine Erythrocytes, *Aquatic Toxicology*, 79, 201-204. (2006)
49. LUBET, R.A.: The Induction of Alkoxyresorufin Metabolism: A Potential Indicator of Environmental Contamination, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 19, 157-163. (1990)
50. PAYNE, J.F.: Field Evaluation of Benzopyrene Hydroxylase Induction as a Monitor for Marine Petroleum Pollution, *Science*, 191, 945-6 (1976)
51. JONSSON, E.M., ABRAHAMSON, A., BRUNSTROM, B.: Cytochrome P4501A Induction in Rainbow Trout Gills and Liver Following Exposure to Waterborne Indigo, Benzo[A]Pyrene and 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl, *Aquatic Toxicology*, 79, 226-232. (2006)
52. CONNOR, K.T., AYLWARD, L.L.: Human Response to Dioxin: Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) Molecular Structure, Function, and Dose-Response Data for Enzyme Induction Indicate an Impaired Human AHR, *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews*, 9, 147-171. (2006)

53. BINELI, A., RICCIARDI, F., RIVA, C.: Screening of POP Pollution by Ache and EROD Activities in Zebra Mussels From The Italian Great Lakes, *Chemosphere*, 61, 1074-1082. (2005)
54. PARENTE, T.E.M., DE-OLIVEIRA, A.C.A.X., SILVA, I.B.: Induced Alkoxyresorufin-O-Dealkylases in Tilapias (*Oreochromis Niloticus*) from Guandu River, Rio De Janeiro, Brazil, *Chemosphere*, 54, 1613-1618. (2004)
55. FISHER, T., CRANE, M., CALLAGHAN, A.: Induction of Cytochrome P-450 Activity in Individual Chironomus Riparius Meigen Larvae Exposed to Xenobiotics, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54, 1-6. (2003)
56. GIULIO, R.T.D., BENSON, W.H., SANDERS, B.M.: Biochemical Mechanisms: Metabolism, Adaptation, and Toxicity, in *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, Second Edition (RAND, G.M., ed) Taylor & Francis Press, Washington, (2000).
57. PARKINSON A.: Disposition of Toxicants, in Casarett and Doull's *Toxicology The Basic Science of Posisons*, 6th Edition (KLAASSEN C.,D. ed) McGraw-Hill Medical Publishing, New York, (2001).
58. KLOTZ, A. V., STEGEMAN, J.J., WOODIN, B.R.: Cytochrome P450 Isozymes from the Marine Teleost *Stenotomus Chrysops*: Their Roles in Steroid Hydroxylation and the Influence of Cytochrome b5, *Arch. Biochem. Biophys.*, 249, 326-338. (1986)
59. <http://Drnelson.Utmem.Edu/Nelsonhomepage.Html> (10.01.2007)
60. NEBERT, D.W., GONZALEZ, F.J.: P-450 Genes: Structure, Evolution And Regulation, *Ann. Rev. Biochem.*, 56, 945-993. (1987)
61. NEBERT, D.W., ADESNIK, M., COON, M.J.: The P450 Gene Superfamily: Recommended Nomenclature, *DNA*, 6, 1-11. (1987)
62. NEBERT, D.W., NELSON, D.R., COON, M.J., ESTABROOK, R.W.: The P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping and Recommended Nomenclature, *DNA Cell Biol*, 10, 1-14. (1991)

63. NELSON, D.R., KAMATAKI, T., WAXMAN, D.J. GUENGERICH, F.P.: The P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, Accession Numbers, Early Trivial Names of Enzymes and Nomenclature, *DNA Cell Biol.*, 12, 1-51. (1993)
64. FENT, K., WOODIN, B.R., STEGEMAN, J.J.: Effects of Triphenyltin and Other Organotins on Hepatic Monooxygenase System in Fish, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 121, 277-288. (1998)
65. PAYNE, J.F.: Review and Perspective on the Use of Mixed-Function Oxygenase Enzymes In Biological Monitoring, *Comp. Biochem. Physiol.*, 86c, 233-245. (1987)
66. HECHT, S.S., CHEN, M.A., YODER, A.: Longitudinal Study of Urinary Phenanthrene Metabolite Ratios: Effect of Smoking on The Diol Epoxide Pathway *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 14, 2969-2974. (2005)
67. WANG, X.D.: Alcohol, Vitamin A and Cancer, *Alcohol*, 35, 251-258. (2005) - Abstract
68. PAYNE, J.F., MARTINS, I., RAHIMTULA, A.: Crankcase Oils: Are They a Major Mutagenic Burden in The Aquatic Environment?, *Science*, 200, 329-330. (1978)
69. MYERS, M.S., JOHNSON, L.L., COLLIER, T.K.: Establishing The Causal Relationship Between Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Exposure and Hepatic Neoplasms and Neoplasia-Related Liver Lesions in English Sole (*Pleuronectes Vetulus*), *Human and Ecological Risk Assessment*, 9, 67-94. (2003)
70. FRAGOSO, N.M., HODSON, P.V., ZAMBON, S.: Evaluation of an Exposure Assay to Measure Uptake of Sediment PAH by Fish, *Environmental Monitoring and Assessment*, 116, 481-511. (2006)
71. SHAW, G.R., CONNELL, D.W.: DNA Adducts as a Biomarker of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Exposure in Aquatic Organisms: Relationship to Carcinogenicity, *Biomarkers*, 6, 64-71. (2001)

72. AMAT, A., PFOHL-LESZKOWICZ, A., BURGEOT, T.: DNA Adducts as a Biomarker of Pollution: Field Study on the Genotoxic Impact Evolution of The Erika Oil Spill on Mussels (*Mytilus Edulis*) Over a Period of Eleven Months, *Polycyclic Aromatic Compounds*, 24, 713-732. (2004)
73. KLOTZ, V.A.: An Alternative 7-Ethoxyresorufin O-Deethylase Activity Assay: A Continuous Visible Spectrophotometric, *Analytical Biochemistry*, 140, 138-145. (1984)
74. STEGEMAN, J.J., HAHN, M.E.: Biochemistry and Molecular Biology of Monooxygenases: Current Perspectives on Forms, Functions, and Regulation of Cytochrome P450 In Aquatic Species. in *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives* (MALINS, D.C., OSTRANDER, G.K. eds), p:206, Lewis Publishers, Boca Raton (1994).
75. BUCHELI, T.D., FENT, K.: Induction of Cytochrome P450 as a Biomarker for Environmental Contamination in Aquatic Ecosystems, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 25, 201-68. (1995)
76. VIARENGO, A.: Heavy Metal Inhibition of EROD Activity in Liver Microsomes from The Bass *Dicentrarchus Labrax* Exposed to Organic Xenobiotics: Role of GSH in The Reduction of Heavy Metal Effects, *Marine Environmental Research*. 44, 1-11. (1997)
77. CANTRELL, S.M., LUTZ, L.H., TILLITT, D.E., HANNINK, M.: Embryotoxicity of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin (TCDD): The Embryonic Vasculature is a Physiological Target for TCDD-Induced DNA Damage and Apoptotic Cell Death in Medaka (*Orizias Latipes*), *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 141, 23-34. (1996)
78. STEGEMAN, J.J., LECH, J.J.: Cytochrome P-450 Monooxygenase Systems in Aquatic Species: Carcinogen Metabolism and Biomarkers for Carcinogen and Pollutant Exposure, *Environ. Health. Perspect.*, 90, 101-9. (1991)

79. HAHN, M.E., KARCHNER, S.I.: Evolutionary Conservation of the Vertebrate Ah (Dioxin) Receptor: Amplification and Sequencing of the Pas Domain of a Teleost Ah Receptor cDNA, *Biochem. J.*, 310, 383–7. (1995)
80. PHELAN, D., WINTER, G.M., ROGERS, W.J., LAM, J.C., DENISON, M.S.: Activation of the Ah Receptor Signal Transduction Pathway by Bilirubin and Biliverdin, *Arch. Biochem. Biophys.*, 357, 155–63. (1998)-Abstract
81. CHANG, C.Y., PUGA, A.: Constitutive Activation of The Aromatic Hydrocarbon Receptor. *Mol. Cell. Biol.*, 18, 525- 35. (1998)
82. BRADFELD, C.A., POLAND, A.: A Competitive Binding Assay for 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and Related Ligands of the Ah Receptor, *Mol. Pharmacol.*, 34, 682–8. (1988)-Abstract
83. DEVITO, M.J., BIRNBAUM, L.S.: Dioxins: Model Chemicals for Assessing Receptor-Mediated Toxicity, *Toxicology*, 102, 115–23. (1995)
84. POLAND, A., KNUTSON, J.C.: 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzop-Dioxin and Related Halogenated Aromatic Hydrocarbons: Examination of the Mechanism of Toxicity, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 22, 517–54. (1982)
85. WALKER, M.K., PETERSON, R.E.: Potencies of Polychlorinated Dibenzo-p-dioxin, Dibenzofuran, and Biphenyl Congeners, Relative To 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin, for Producing Early Life Stage Mortality in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*), *Aquatic Toxicol.*, 21, 219–38. (1991)
86. HENDRICKS, J.D., MEYERS, T.R., SHELTON, D.W., CASTEEL, J.L., BAILEY, G.S.: Hepatocarcinogenicity of Benzo[a]pyrene to Rainbow Trout by Dietary Exposure and Intraperitoneal Injection, *J. Nat. Cancer Inst.*, 74, 839–52. (1985)
87. HOLDWAY, D.A., BRENNAN, S.E., AHOKAS, J.T.: Use of Hepatic MFO and Blood Enzyme Biomarkers in Sand Flathead (*Platycephalus Bassensis*) as Indicators of Pollution in Port Phillip Bay, Australia, *Mar. Pollut. Bull.*, 28, 683–95. (1994)

88. VAN DER OOST, R., HEIDA, H., OPPERHUIZEN, A., VERMEULEN, N.P.E.: Interrelationships Between Bioaccumulation of Organic Trace Pollutants (PCBs, Organochlorine Pesticides and PAHs), and MFO-Induction in Fish, *Comp. Biochem. Physiol.*, 100(1/2), 43-47. (1991)
89. PIKKARAINEN, A.L.: Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity and bile metabolites as Contamination Indicators in Baltic Sea Perch: Determination by HPLC, *Chemosphere*, 65: 1888-1897. (2006)
90. FENT, K., BATSCHER, R.: Cytochrome P4501A Induction Potencies of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in a Fish Hepatoma Cell Line: Demonstration of Additive Interactions, *Environ. Toxicol. and Chem.*, 19, 2047-2058. (2000)
91. NARBONNE, J.F., GARRIGUES, P., RIBERA, D.: Mixed-Function Oxygenase Enzymes as Tools for Pollution Monitoring: Field Studies on the French Coast of the Mediterranean Sea, *Comp. Biochem. Physiol.*, 100(1/2), 37-42. (1991)
92. GUNTHER, A.J., SPIES, R.B., STEGEMAN, J.J., WOODIQB, B., CARNEY, D., OAKDEN, J., HAI, L.: EROD Activity in Fish as an Independent Measure of Contaminant-Induced Mortality of Invertebrates in Sediment Bioassays, *Marine Environ. Res.*, 44, 41-49. (1997)
93. ARINÇ, E., ŞEN, A.: Hepatic Cytochrome P4501A and 7-Ethoxyresorufin O-Deethylase Induction in Mullet and Common Sole as an Indicator of Toxic Organic Pollution in İzmir Bay, Turkey, *Marine Environ. Res.*, 48, 147-160. (1999)
94. FERREIRA M., et al.: The Effect Of Long-Term Depuration On Phase I And Phase II Biotransformation In Mullet (Mugil Cephalus) Chronically Exposed to Pollutants in River Douro Estuary, Portugal *Marine Environmental Research*, 61, 326–338. (2006)
95. AARAB, N., CHAMPEAU, O., MORA, P.: Scoring Approach Based On Fish Biomarkers Applied To French River Monitoring, *Biomarkers*, 9, 258-270. (2004)

96. KUCUKSEZGİN, F., KONTAS, A., ALTAY, O., ULUTURHAN, E., DARILMAZ E.: Assessment Of Marine Pollution in Izmir Bay: Nutrient, Heavy Metal And Total Hydrocarbon Concentrations, *Environment International*, 32, 41 – 51. (2006)
97. YILMAZ, A.B.: Levels of Heavy Metals (Fe, Cu, Ni, Cr, Pb, And Zn) in Tissue Of Mugil Cephalus and Trachurus Mediterraneus From Iskenderun Bay, Turkey, *Environmental Research*, 92, 277–281. (2003)
98. ARINÇ, E., KOCABIYIK, S., SU, E.: Induced Cyp1A mRNA, Protein and Catalytic Activity in The Liver Of Feral Fish, Leaping Mullet, Liza Saliens, *Comp Biochem And Physiol Part C*, 128, 281-290. (2001)
99. BOZCAARMUTLU, A., ARINÇ, E.: Inhibitory Effects Of Divalent Metal Ions On Liver Microsomal 7-Ethoxyresorufin O-Deethylase (Erod) Activity Of Leaping Mullet, *Marine Environ Research*, 58, 521-524. (2004)
100. TORTELLI, V., COLARES, E.P., ROBALDO, R.B., NERY, L.E.M., PINHO, G.L.L., BIANCHINI, A., MONSERRAT, J.M.: Importance Of Cholinesterase Kinetic Parameters in Environmental Monitoring Using Estuarine Fish, *Chemosphere*, in press. (2006)
101. CHEUNG, C.C.C, ZHENG, G.J., RICHARDSON, B.J., LAM, P.K.S.: Relationship Between Tissue Concentrations Of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Antioxidative Responses of Marine Mussels, *Perna Viridis*, *Aquatic Toxicol.*, 52, 189-203. (2001)
102. ASLI KIRIKBAKAN, Sitokrom P4501A ve Glutasyon S-Transferazların Mavri Kefal Balığında (Liza Saliens) Karakterizasyonu ve Değişik Dokularda İmmünolojik Tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji AbD, Denizli (2004)
103. BERTHET, B., MOUNEYRAC, C, PEREZ, T., AMIARD-TRIQUET, C.: Metallothionein Concentration in Sponges (*Spongia Officinalis*) as a Biomarker of Metal Contamination, *Comparative Biochemistry And Physiology, Part C*, 141, 306-313. (2005)

104. SARKAR, A., RAY, D., SHRIVASTAVA, A.N.: Molecular Biomarkers: Their Significance And Application in Marine Pollution Monitoring, *Ecotoxicology*, 15, 333-40. (2006)
105. ZORÍŤA, I., STROGYLOUDI, E., BUXENS, A., MAZON, L.I., PAPATHANASSFOO, E., SOTO, M., CAJARAVILLE, M.P.: Application of Two Sh-Based Methods For Metallothionein Determination in Mussels And Intercalibration of The Spectrophotometric Method: Laboratory And Field Studies in The Mediterranean Sea, *Biomarkers*, 10, 342-359. (2005)
106. NARBONNE, J.F., AARAB, N., CLERANDEAU, C, DAUBEZE, M., NARBONNE, J., CHAMPEAU, O., GARRGUES, P.: Scale Of Elassification Based On Biochemical Markers in Mussels: Application To Pollution Monitoring in Mediterranean Coasts and Temporal Trends, *Biomarkers*, 10, 58-71. (2005)
107. TOIDE, K., YAMAZAKI, H.: Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Represents Cyp1B1, And Not Cyp1A1, in Human Freshly Isolated White Cells, *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 12, 219-222. (2003)
108. FLOREA, A.M., BÜSSELBERG, D.: Occurence, Use And Potential Toxic Effects Of Metals And Metal Compounds, *Biometals*, 19, 419-427. (2006)
109. GOYER, R.A.: Toxic Effects of Metals in Casarett and Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons, 3rd edition, MacMillan Publisng Company, New York (1986)
110. MASS, R.P.: Reducing Lead Exposure From Drinking Water: Recent History And Current Status, *Public Health Reports*, 120, 316-321. (2005)
111. NEEDLEMAN, H.: Lead Poisoning, *Annu Rev Med.*, 55, 209-22. (2004)
112. <http://www.Atsdr.Cdc.Gov/Cercla/05list.Html> (10.01.2007)
113. <http://www.Webelements.Com/Webelements/Elements/Text/Cd/Key.Html> (10.01.2007)
114. <http://en.wikipedia.org/wiki/Cadmium.htm> (10.01.2007)

115. BERMAN, E.: Cadmium in Toxic Metals and Their Analysis, p:65, Heyden & Sons Press, London, (1980).
116. Toxicological Profile For Cadmium. U.S. Department Of Health And Human Services Public Health Service Agency For Toxic Substances And Disease Registry. July 1999.
117. <http://www.Epa.Gov/Enviro/Html/Emci/Chemref/7440439.Html> (10.01.2007)
118. <http://www.Epa.Gov/Iris/Subst/0141.Htm> (10.01.2007)
119. http://www.Cancer.Wisc.Edu/Uwccc/Article_Cadmium.Asp (10.01.2007)
120. Summary Of Toxic Effects On Fish Condensed From U.S. Environmental Protection Agency. 1999b. Biological Assessment Of The Idaho Water Quality Standards For Numeric Water Quality Criteria For Toxic Pollutants. U.S. Epa, Region 10, Seattle Wa.
121. ZELIKOFF, J.T., BOWSER, D., SQUIBB, K.S., FRENKEL, K.: Immunotoxicity of Low Level Cadmium Exposure in Fish: An Alternative Animal Model For Immunotoxicological Studies, J Toxicol Environ Health., 45, 235-48, Abstract. (1995)
122. BABICH, H., SHOPSIS, C., BORENFREUND, E.: In Vitro Cytotoxicity Testing Of Aquatic Pollutants (Cadmium, Copper, Zinc, Nickel) Using Established Fish Cell Lines, Ecotoxicol Environ Saf., 11, 91-9. (1986)
123. Çevre Ve Orman Bakanlığı, Su Kirliliği Kontrol Yönetmeliği: www.Bcm.Org.Tr/Pdf/Su_Kir_Kont_Yon.Pdf (10.01.2007)
124. T.C. Tarım Ve Köyşleri Bakanlığı – Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği. www.Okyanusbilgiambari.Com/Tgm/Yonet/Y-Kodeks-Turkgidakodeksiyonetmeligi.Pdf (10.01.2007)
125. Parlayıcı, Patlayıcı, Tehlikeli ve Zararlı Maddelerle Çalışılan İşyerlerinde ve İşlerde Alınacak Tedbirler Hakkında Tüzük. (1973)
126. <http://en.Wikipedia.Org/Wiki/Chromium> (10.01.2007)

127. Chromium(VI) Compounds Fact Sheet, National Pollution Inventory, Australian Government Department Of The Environment And Heritage.
128. VINCENT, J.B.: Recent Advances in The Nutritional Biochemistry of Trivalent Chromium, Proceedings of The Nutrition Society, 63, 41-47. (2004)
129. OSHA: Health Effects Of Hexavalent Chromium, Chromium Hexavalent Compounds, Reports On Carcinogen, 11th, Osha Factsheet.
130. FRIBERG, L., NORDBERG, G.F., KESSLER, E. and VOUG, V.B: Chromium Metabolism, HSDB Tox Net Database.
131. www.Potters.Org/Subject70884.Htm (10.01.2007)
132. IARC: Chromium Hexavalent Compounds, IARC vol 49, Reports On Carcinogen, 11th.
133. EISLER, R.: Chromium Hazards To Fish, Wildlife, And Invertebrates: A Synoptic Review, U.S. Fish And Wildlife Service Biological Report, 85, p:60. (1986)
134. AL-SABTI, K., FRANKO, M.: Chromium Induced Micronuclei in Fish, Journal of Applied Toxicology, 14, 333-336. (1994)
135. <http://en.Wikipedia.org/wiki/Lead.htm> (10.01.2007)
136. BERMAN, E.: Lead in Toxic Metals and Their Analysis, p:117, Heyden & Sons Press, London, (1980).
137. HSDB Tox Net Database: Tetra Ethyl Lead, Best Sections.
138. BRUENGER, F.W., STEVENS, W.: Lead Health Effects in HSDB Tox Net Database
139. ZENZ, C., DICKERSON, O.B., HORVATH, E.P.: Lead Compounds, Biological Half Time, HSDB Tox Net Database.
140. BRACKEN, W.M., KLAASSEN, C.D.: Lead Compounds, Mechanism Of Action, in HSDB Tox Net Database
141. EREN CİVELEK: Kurşuna Maruz Akü Fabrikası İşçilerinde Genotoksik Hasarın Challenge Tekniği İle Araştırılması, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, F. Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara, (2001).

142. CELİK, U., CAKLİ, S., OEHLENSCHLUGER, J.: Determination Of The Lead and Cadmium Burden in Some Northeastern Atlantic and Mediterranean Fish Species by Dpsav, Eur Food Res Technol, 218, 298–305. (2004)
143. KUCUKSEZGİN, F., KONTAS, A., ALTAY, O., ULUTURHAN, E., DARILMAZ, E.: Assessment Of Marine Pollution in Izmir Bay: Nutrient, Heavy Metal and Total Hydrocarbon Concentrations, Environment International, 32, 41-51. (2006)
144. <http://www.Answers.Com/Topic/Mercury> (10.01.2007)
145. Epa Mercury Page: <http://www.Epa.Gov/Mercury/Faq.Htm> (10.01.2007)
146. Epa Mercury Reduction Page: <http://www.Epa.Gov/Epaoswer/Non-Hw/Reduce/Epr/Products/Mercury.Htm> (10.01.2007)
147. Glacial Ice Cores Reveal A Record Of Natural And Anthropogenic Atmospheric Mercury Deposition For The Last 270 Years, Usgs Fact Sheet Fs-051-02. (2002)
148. BERMAN, E.: Mercury in Toxic Metals and Their Analysis, p:149, Heyden & Sons Press, London, (1980).
149. ATESAGAOGLU, A.: Mercury Exposure in Dental Practice, Operative Dentistry, 31, 666-669. (2006)
150. http://En.Wikipedia.Org/Wiki/Minamata_Disease (10.01.2007)
151. IARC Monograph 58. <http://www.inchem.Org/Documents/Iarc/Vol58/Mono58-3.Html> (10.01.2007)
152. National Institute For Minamata Disease, http://www.Nimd.Go.Jp/Archives/English/Tenji/E_Corner.Html (10.01.2007)
153. FDA/EPA: What You Need To Know About Mercury in Fish And Shellfish. (2004) (<http://www.Cfsan.Fda.Gov/~Dms/Admehg3.Html> (10.01.2007))
154. EPA: Summary Of Toxic Effects On Fish Condensed From U.S. Environmental Protection Agency. 1999b. Biological Assessment Of The Idaho Water Quality Standards For Numeric Water Quality Criteria For Toxic Pollutants. U.S. EPA.
155. ALTINDAG, A., YİĞİT, S.: Assessment Of Heavy Metal Concentrations in The Food Web Of Lake Beysehir, Turkey, Chemosphere, 60, 552–556. (2005)

156. AYGUN, O., YARSAN, E.: Lead And Copper Levels in Muscle Meat of Crucian Carp (*Carassius Carassius*, L. 1758) From Yarseli Dam Lake, Turkey, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 72, 135-140. (2004)
157. BARLAS, N.: A Pilot Study Of Heavy Metal Concentration in Various Environments, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 62, 287-285. (1999)
158. COGUN, H., YUZEREROGLU, T.A., KARGIN, F., FIRAT, O.: Seasonal Variation and Tissue Distribution of Heavy Metals in Shrimp And Fish Species From The Yumurtalik Coast Of Iskenderun Gulf, Mediterranean, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 75, 707-715. (2005)
159. DALMAN, O., DEMİRRAK, A., BALCI, A.: Determination of Heavy Metals (Cd, Pb) and Trace Elements (Cu, Zn) in Sediments and Fish of The Southeastern Aegean Sea (Turkey) By Atomic Absorption Spectrometry, *Food Chemistry*, 95, 157–162. (2006)
160. FİLAZİ, A., BASKAYA, R., KUM, C., HİSMİOGULLARI, S.E.: Metal Concentrations in Tissues of The Black Sea Fish *Mugil Auratus* From Sinop-Icliman, Turkey, *Human & Experimental Toxicology*, 22, 85-87. (2003)
161. KARADEDE, H., UNLU, E.: Concentrations of Some Heavy Metals in Water, Sediment and Fish Species From The Atatürk Dam Lake (Euphrates), Turkey, *Chemosphere*, 41, 1371-1376. (2000)
162. KARGIN, F.: Metal Concentrations in Tissues of the Freshwater Fish *Capoeta Barroisi* From The Seyhan River (Turkey), *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 60, 822-828. (1998)
163. BASMIŞOĞLU-KOCA, Y., KOCA, S., YILDIZ, Ş., GURCU, B., OSANC, E.: Investigation of Histopathological and Cytogenetic Effects On *Lepomis Gibbosus* (Pisces: Perciformes) in the Çine Stream (Aydın/Turkey) With Determination of Water Pollution. Published Online in Wiley Interscience (www.Interscience.Wiley.Com).Doi 10.1002/Tox.20145.

164. TUZEN, M.: Determination Of Heavy Metals in Fish Samples of The Middle Black Sea (Turkey) by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry, Food Chemistry, 80, 119–123. (2003)
165. KUCUKSEZGIN, F., ALTAY, O., ULUTURHAN, E., KONTAS, A.: Trace Metal and Organochlorine Residue Levels in Red Mullet (*Mullus Barbatulus*) From The Eastern Aegean, Turkey, Wat. Res., 35, 2327–2332. (2001)
166. YILMAZ, A.B.: Levels Of Heavy Metals (Fe, Cu, Ni, Cr, Pb, And Zn) in Tissue of *Mugil Cephalus* and *Trachurus Mediterraneus* From Iskenderun Bay, Turkey, Environmental Research, 92, 277–281. (2003)
167. YILMAZ, A.B.: Comparison Of Heavy Metal Levels Of Grey Mullet (*Mugil Cephalus* L.) And Sea Bream (*Sparus Aurata* L.) Caught in Üskenderun Bay (Turkey), Turk J Vet Anim Sci., 29, 257-262. (2005)
168. METCALFE, C.D., HAFFNER, G.D.: The Ecotoxicology Of Coplanar Polychlorinated Biphenyls, Environ Rev., 3, 171–90. (1995)
169. ŞEN, A., ARINÇ, E.: Preparation of Highly Purified Cytochrome P4501A1 From Leaping Mullet (*Liza Saliens*) Liver Microsoms and its Biocatalytic, Molecular And Immunochemical Properties, Comp Biochem And Physiol Part C., 121, 249-265. (1998)
170. SOLE, M., RALDUA, D., PIFERRER, F.: Feminization of Wild Carp, *Cyprinus Carpio*, in a Polluted Environment: Plasma Steroid Hormones, Gonadal Morphology and Xenobiotic Metabolizing System, Comp Biochem Physiol 136c., 145-156. (2003)
171. ORREGO, R., BURGOS, A., MORAGA-CID, G., INZUNZA, B., GONZALEZ, M., VALENZUELA, A., BARRA, R., GAVILAN, J.F.: Effects of Pulp and Paper Mill Discharges On Caged Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*): Biomarker Responses Along A Pollution Gradient in The Biobio River, Chile, Environ Toxicol Chem., 25, 2280-7. (2006)

172. YIGIT, S., ALTINDAG, A.: Accumulation of Heavy Metals in The Food Web Components Of Burdur Lake, Turkey, Fresenius Environmental Bulletin, 11, 1048-1052. (2002)
173. GAWLIK, B., DRUGES, M., BIANCHI, M.: Tuna Fish (T-30)- A New Proficiency Testing Material for that Determination of As and Hg in Seafood, Fresenius J Anal Chem., 358, 441-445. (1997)
174. WELZ, A., MELCHER, M.: Decomposition of Marine Biological Tissues for Determination of Arsenic, Selenium and Mercury Using Hydride-Generation and Cold-Vapor Atomic Absorption Spectrometries, Analytical Chemistry, 57, 427-431. (1985)
175. WHO: Environmental Health Criteria I. Mercury, Geneva 1976.
176. HINCK, J.E., SCHMITT, C.J., BLAZER, V.S., DENSLOW, N.D., BARTISH, T.M., ANDERSON, P.J., COYLE, J.J., DETHLOFF, G.M., TILLITT, D.E.: Environmental Contaminants and Biomarker Responses in Fish From The Columbia River and its Tributaries: Spatial and Temporal Trends, Sci Total Environ., 366, 549-78. (2006)

Ö Z G E Ç M İ Ş

31 Mayıs 1982 tarihinde Ankara'da dünyaya geldim. İlk, orta ve lise öğrenimimi Ankara'da tamamladıktan sonra 1999 yılında Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'ne girdim. Bu fakülteden 2004 yılında mezun olduktan sonra Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde Farmasötik Toksikoloji Yüksek Lisans öğrenimime başladım. 2004 yılında Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi kadrosuna atandım. Halen aynı Anabilim Dalı'nda görevimi sürdürmekteyim.