

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

**EDİRNE BÖLGESİNDE HOLSTEİN-FRESIAN SIĞIRLARDA RASYONDAN  
KAYNAKLI AĞIR METAL STRESİNİN KAN DOKUSUNDA GENOTOKSİK  
ETKİLERİ**

**ERKAN ÖRT**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı: PROF. DR. OĞUZHAN DOĞANLAR**

**EDİRNE-[2019]**

Erkan ÖRT'ün hazırladığı “Edirne Bölgesinde Holstein-Fresian Sığırlarda Rasyondan Kaynaklı Ağır Metal Stresinin Kan Dokusunda Genotoksik Etkileri” başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalınca bir Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Juri Üyeleri

Prof.Dr.Oğuzhan Doğanlar

Doç.Dr. Süleyman KÖK

Yrd.Doç.Dr.Orhan Onur AŞKIN

Tez Savunma Tarihi: 06/09/2019

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli, şartları sağladığını onaylarım.

İmza,

Prof.Dr.Oğuzhan DOĞANLAR  
Tez Dinişmanı

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof.Dr.Murat YURTCAN  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**  
**DOĞRULUK BEYANI**

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğine, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığına, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığına, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığı ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

06.09.2019

Erkan ÖRT



Yüksek Lisans Tezi

Edirne Bölgesinde Holstein-Fresian Sığırlarda Rasyondan Kaynaklı Ağır Metal  
Stresinin Kan Dokusunda Genotoksik Etkileri

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

## ÖZET

Tez kapsamında, Edirne ilinde Holstein-Fresian Ruminant Hayvanlarda rasyondan kaynaklı ağır metal stresinin kan dokusunda genotoksik etkileri araştırılmıştır. Rasyon şu an için hayvan yetiştiriciliğinde, oldukça büyük bütçeler harcanarak oluşturulan çalışmaların ve bunun yanında güncel bilimsel verilerin, hayvanların fizyolojik özellikleri ile birleştirilerek oluşturulan özel bir besleme ürünüdür. Ancak yapılan onca çalışmaya rağmen, rasyon önemli ölçüde doğada yetişen yem bitkisi ürünlerine bağımlıdır. Bu sebeple günümüzde insanlığı tehdit eden en büyük sağlık problemi olan çevre kirliliğinden önemli düzeyde etkilenmektedir. Çevre kirliliği toprak, hava, su temel bileşenleri, sonrasında birincil etkilenen grup yem bitkileri, bir sonraki aşama, bu bitkilerle beslenen birincil tüketiciler son olarak son tüketici ekseninde incelenmesi gereken bir konudur. Bu sebeple tez kapsamında ağır metal döngüsünün bu 3 kaynağına da vurgu yapılmıştır. Bu tezin amacı Edirne bölgesinde ağır metallere maruz kalmış Holstein-Fresian ırkı sığırlarda ortaya çıkabilecek antioksidanlardan sorumlu [Mn-SOD, Katalaz(CAT) ve glutatyon sentataz (GS)] ve HSP genleri gen ekspresyonlarını araştırmak ve RAPD (rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA) yöntemiyle toplam DNA üzerine ağır metallerin genotoksik etkilerini değerlendirmektir. Tez kapsamında Edirne bölgesinde yapılan rasyonlarda tüm element içerikleri analiz ettirilmiştir. Analiz edilen rasyonların hemen tümünde düşük ya da yüksek düzeyde bir ağır metal kalıntısı belirlenmiştir.

Çalışmamızda kullandığımız ve ekosistemde ikincil tüketici olan Holstein-Fresian Ruminant hayvanlarda metal birikimlerinin bölgelere göre farklılık gösterdiği, genellikle en fazla birikimin tarımsal faaliyetlerin yoğun olarak yapıldığı alanlarda olduğu gözlemlenmiştir. Tez çalışmasında kan örnekleme yapılan hayvanlarda ağır metal miktarları analiz edilmiş ve kanda taşıdığı ağır metal miktarlarına göre hayvanlar 3 farklı gruba ayrılmıştır. Düşük-orta ve yüksek düzey olarak belirlenen bu hayvanlar, diğer çalışmalarda toksik düzey olarak gösterilen ağır metal birikimleri kullanılarak gruplanmışlardır. Yapılan gruplama sonunda genomik ve proteomik analizler gerçekleştirilmiştir.

Sonuç olarak tez bulgularımız, Edirne Bölgesi ruminantlarında, henüz akut bir tehlike yaratacak düzeyde bir ağır metal kirliliğinin oluşmadığını, ancak farklı bölgelerde yapılan yoğun tarımsal faaliyetler ve diğer antropojenik etkiler sebebiyle bu bölgelerde yaşayan hayvanlarda ağır metal birikiminin ve bu birikimin sebepleri olduğu genotoksitenin dikkat çekici boyuta ulaştığını göstermektedir. Bu sebeple özellikle yem bitkilerinin temiz alanlarda yetiştirilmesine dikkat edilmesi, yem analizlerinde özellikle ağır metal pestisit gibi, bölgede yüksek risk taşıyan kirleticilerinde takip edilmesinin önemli olduğu düşünülmektedir

Yıl : 2019

Sayfa Sayısı : 80

Anahtar Kelimeler : Holstein-Fresian, Ağır Metal, Genotoksik Etki, Antioksidan

Enzim Genleri, HSP, Edirne

Master's Thesis

Genotoxic effect of Heavy metal stress sources from feed ration in blood tissues of  
Holstein-Fresian ruminants in Edirne province  
Trakya University Institute of Natural Sciences  
Department of Biotechnology and Genetic

## **ABSTRACT**

In this work, genotoxic effects of heavy metal stress in the diet of Holstein-Fresian ruminants were investigated in the province of Edirne. The ration is a special feed that combines the latest scientific data with the physiological characteristics of the animals. Despite all studies, the ration is heavily dependent on naturally grown forage crops. For this reason, ration is severely affected by pollution, which is today the biggest health problem for humanity. Pollution is the main constituent of soil, air, water, then the primary concern group of forage crops, and the next stage is the primary consumers fed by these crops, finally an issue to be explored on the latest consumer's axis. For this reason, these three sources of the heavy metal cycle are highlighted in this work. We suggest that more attention should be given to investigating the genotoxic effects of environmental pollutants.

The aims of the present thesis will be to investigate the responses of Holstein-Fresian ruminants upon exposure to a heavy metals with reference to changes in antioxidant-responsible gene expression [Mn-superoxide dismutase (Mn-SOD), catalase (CAT), and glutathione synthetase (GS)] and HSPs family genes and to assess the genotoxic effects of a heavy metals on total DNA with random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay in Edirne province. We analyzed all elemental content in rations in the Edirne region. We found that in almost whole ration contain low or high levels of heavy metal residues.

In our study, it has been observed that metal enrichment in Holstein-Fresian ruminants, which are the secondary consumers in the ecosystem, varies by region and, in general, the greatest heavy metal accumulation occurs in areas with intensive agricultural activities. In this study, amount of heavy metals in whole blood samples were analyzed and the animals were divided into 3 different groups according to the amount of heavy metals in blood. These animals identified as low-medium and high-grade, were grouped using heavy metal accumulation level that have been shown to be toxic in other studies. At the end of the grouping process, genomic and proteomic analyzes were performed.

In conclusion, our results indicate that there is no acute risk of heavy metal contamination in ruminants in the Edirne region, but that the heavy metal accumulation and genotoxicity caused by this accumulation in animals in these regions has reached a notable level due to intense stress on agricultural activities and other anthropogenic effects in different regions shows. For this reason, it is important to consider the cultivation of fodder crops in clean areas. And also in feed analysis, is important to monitor high risk pollutants in the region, especially heavy metal pesticides.

Year : 2019

Number of page : 80

Keywords : Holstein-Fresian, Heavy Metals, Genotoxicity, Antioxidant

Enzymes genes, HSPs, Edirne

## TEŐEKKÖR

Yüksek lisans eğitimin süresince hiçbir zaman bilgi ve desteklerini esirgemeyen, tezimin her aşamasında yardımcı olan çok değerli hocam Prof. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR başta olmak üzere,

Yüksek lisansım süresince Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında eğitim veren tüm bilim insanlarına,

Çalışmamın deneysel aşamalarını gerçekleştirdiğim Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na,

Her zaman yanımda olup, beni maddi ve manevi hep destekleyen aileme teşekkürlerimi sunarım.

Erkan ÖRT

Edirne, Ağustos 2019



## İÇİNDEKİLER

ERKAN ÖRT .....	i
ÖZET .....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
BÖLÜM 1 .....	1
GİRİŞ .....	1
BÖLÜM 2 .....	3
GENEL BİLGİLER .....	3
2.Ağır Metaller.....	7
2.1. Kadmiyum.....	8
2.1.1. Kadmiyumun Toksikite Mekanizması: .....	9
2.1.2. Kadmiyum Toksikitesinde Böbrek hasarı: .....	11
2.1.3. Kadmiyum Ve Üreme Sistemi: .....	11
2.1.4. Kadmiyum Ve Kanserojenlik: .....	12
2.2. Arsenik .....	12
2.2.1. Arsenik Kaynaklı DNA Hasarının Biyobelirteçleri .....	13
2.2.2. Arsenik Kaynaklı Oksidatif Hasarın Biyobelirteçleri .....	14
2.2.3. $\delta$ -Aminolevulinik Asit Dehidrataz:.....	14
2.3. Kurşun.....	15
2.3.1. Kurşun Toksikite Biyobelirteçleri .....	17
2.3.2. Oksidatif Hasar $\delta$ -Aminolevulinik Asit Dehidratazın Biyobelirteçleri .....	17
2.4 Krom .....	18
2.4.1. Krom Kaynakları Ve Maruziyet .....	18
2.4.2. Krom Toksikite Mekanizması .....	18
2.5. Nikel.....	19
2.6. Antioksidan Savunma Sistemi Ve Gen Analizleri .....	20

2.6.1. Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres.....	20
2.6.2. Serbest Radikaller .....	21
2.6.3. Antioksidan Enzimler .....	22
2.7. Rasyon ve Rasyon-Ağır Metal İlişkisi .....	22
BÖLÜM 3 .....	24
MATERYAL VE METOD .....	24
3.1. Çalışma Popülasyonu.....	24
3.2. Kan Örneklerinin Alınması.....	24
3.3. ICP-MS Analizi.....	24
3.4 Genetik Analizler .....	25
3.4.1. DNA İzolasyonu .....	26
3.4.2. DNA Miktarının Belirlenmesi .....	26
3.4.3. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik Farklılık; RAPD Yöntemi .....	27
3.4.5. RNA İzolasyonu.....	28
3.4.7. cDNA Eldesi .....	29
3.4.8. Kantitatif Real Time-PCR (qRT-PCR) Analizleri .....	30
4.2 RAPD DNA Polimorfizmi .....	36
4.2.2 OPU 16 Primeri.....	36
4.2.3 1253 Primeri.....	36
4.2.4 23 OPC 193470 Primeri .....	37
4.2.5 B 18 Primeri .....	37
4.2.6 20 OPC 153260 Primeri .....	37
4.2.7 OPB 10 Primer 5 Primeri .....	37
4.3. Gen Ekspresyon Analizleri .....	38
BÖLÜM 5 .....	46
TARTIŞMA VE SONUÇLAR .....	46
KAYNAKLAR .....	55

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1 Edirne İli Haritası .....	3
Şekil 2. 1 Kadmiyum Toksite yolağı .....	10
Şekil 2. 2 Arsenik toksitesinin biyobelirteçlerini belirten başlıca hücrel etkileşimler.....	15
Şekil 2. 3 Mitokondri aracılı apoptotik yolağın genel görünümü .....	16
Şekil 2. 4 Krom Toksite Mekanizması .....	19
Şekil 3. 1 ICP-MS 7700xx .....	25
Şekil 3. 2 Real Time PCR (ABI Step One Plus).....	25
Şekil 3. 3 Nano Optizen Q Nanodrop cihaz görüntüsü.....	26
Şekil 3. 4 Termal döngü PCR cihazı.....	27
Şekil 3. 5 Soğutmalı santrifüj cihazı, Bioer Mixing Block cihazı .....	29
Şekil 4.1 Kan Serum Kadmiyum Düzeyleri .....	33
Şekil 4.2 Serum Arsenik Düzeyleri .....	34
Şekil 4.3 Kan Serum Kurşun Düzeyleri.....	34
Şekil 4.4 Kan Serum Krom Düzeyleri .....	35
Şekil 4.5 Kan Serum Nikel Düzeyleri.....	35
Şekil 4.6 Primerlere Ait Jel Görüntüsü .....	37
Şekil 4.7 Kontrol grubuna göre Orta ve Yüksek grup Mn-SOD gen ifadesi.....	40
Şekil 4.8 Kontrol grubuna göre Orta ve Yüksek grup KAT gen ifadesi .....	41
Şekil 4.9 Kontrol grubuna göre Orta ve Yüksek grup GS gen ifadesi.....	42
Şekil 4.10 Kontrol grubuna göre Orta ve Yüksek grup GPx gen ifadesi.....	43
Şekil 4.11 Kontrol grubuna göre Orta ve Yüksek grup HSP60 gen ifadesi .....	44
Şekil 4.12 Kontrol grubuna göre Orta ve Yüksek grup HSP70 gen ifadesi .....	45

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge1.1</b> Edirne Bölgesi Tahıllar, Otlar ve Yağlı tohum Üretim Miktarları	4
<b>Çizelge1.2</b> Edirne Bölgesi Ekilen Ürünler ve Alanları 2018.....	5
<b>Çizelge1.3</b> Edirne İli Büyükbaş Hayvan Varlığı .....	6
<b>Çizelge1.4</b> Türkiye'de Büyükbaş Hayvan Varlığı .....	6
<b>Çizelge 2.1</b> Antioksidan Enzimler/ Proteinler	22
<b>Çizelge3.1</b> RAPD PCR için gerekli malzemeler	27
<b>Çizelge3.2</b> RAPD analizinde kullanılan primerler ve baz dizileri.....	28
<b>Çizelge3.3</b> cDNA için gerekli malzeme ve miktarları.....	30
<b>Çizelge3.4</b> qRT-PCR da kullanılan antioksidan enzimler ve dizilişleri .....	31
<b>Çizelge4.1</b> Kan Serumunun özelliklerinin tanımlayıcı istatistikleri ve ağır metal içerikleri(mg.kg <sup>-1</sup> )	33
<b>Çizelge4.2</b> Mikrodalga ICP-MS Metodu İle Belirlenen Kaba ve Kesif Yem sonuçları.	36
<b>Çizelge4.3</b> Kullanılan Primerlere Göre Kaybolan Ve Yeni Çıkan Bantlar .....	38
<b>Çizelge4.4</b> Antioksidan genlerin istatistiksel gösterimi.....	39
<b>Çizelge4.5</b> Anova testine göre Antioksidan genlerin önem dereceleri.....	40

## KISALTMALAR DİZİNİ

<b>DNA</b> .....	: Deoksiribo Nükleik Asit
<b>RNA</b> .....	: Ribo Nükleik Asit
<b>GSH</b> .....	: Glutatyon
<b>GSSG</b> .....	: Okside Glutatyon
<b>GSH-Px</b> .....	: Glutatyon Peroksidaz
<b>GR</b> .....	: Glutatyon Redüktaz
<b>GST</b> .....	: Glutatyon S- Transferaz
<b>GPx</b> .....	: Glutatyon Peroksidaz
<b>PCR</b> .....	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>P-450</b> .....	: Sitokrom P450 Monooksijenaz
<b>ATP</b> .....	: Adenozin tri fosfat
<b>HSP</b> .....	: Isı Şok Proteinleri
<b>BAX</b> .....	: BCL2 ilişkili X, apoptoz düzenleyicisi
<b>BCL2</b> .....	: B-hücre CLL/lemfoma 2
<b>CAS3</b> .....	: Sistein Aspartik Asit Proteaz 3
<b>GS</b> .....	: Glutatyon Sentetaz
<b>CAT</b> .....	: Katalaz
<b>SOD</b> .....	: Süperoksid dismutaz 1 (Cu-Zn SOD)
<b>SOD2</b> .....	: Süperoksid dismutaz 2 (Mn-SOD)
<b>HSP60</b> .....	: Isı Şoku Proteini 60
<b>HSP70</b> .....	: Isı Şoku Proteini 70
<b>MRPK</b> .....	: Azotla Aktive Olan Protein Kinaz
<b>IARC</b> .....	: Uluslar Arası Kanser Araştırmalar Ajansı
<b>GIT</b> .....	: Gastro İntensital Sistem
<b>KKD</b> .....	: Kardeş Kromatit Değişimi
<b>ALA</b> .....	: Aminolevulinik Asit
<b>ALAD</b> .....	: Aminolevulinik Asit Dehidrataz
<b>ESR</b> .....	: Elektro Spin Rezonans

**ROS.....: Reaktif Oksijen Türleri**

## BÖLÜM 1

### GİRİŞ

Ağır metaller şu an için hava, karasal ve sulak ekosistemler ve bu sistemlerde var olan tüm canlı formlarında akut ve kronik düzeylerde bulunmaktadır. Bazı ağır metaller doğal olarak çevrede oluşabilirken diğer elementler endüstriyel faaliyetlerin ve sosyal yaşamın getirdiği çevre kirliliklerinden oluşabilirler (Fergusson, 1990). Antropojenik etkilerden kaynaklı ağır metal kirliliğinin ana kaynakları; motorin, kimyasal çözeltiler, boya, mürekkep, spreylere, pestisitler, gübre ve kuru temizleme ajanları gibi genellikle kentlerde kullanılan ev tipi kimyasallardır (Tchounwou, Yedjou, Patlolla, & Sutton, 2012).

Kadmiyum(Cd), Kurşun(Kurşun), Arsenik(As), Nikel(Ni), Alüminyum(Al), Krom(Cr), yeryüzü ana kayasının esasi bileşenleridir ve çevrede en sık bulunan metallere maruz kaldığında toksik, genotoksik, karsinojenik zararlar ortaya çıkmaktadır (Tchounwou vd., 2012). Önceki yapılan çalışmalarda ağır metal maruziyeti  $O_2^-$  (süperoksit anyon), OH (hidroksil radikal),  $H_2O_2$  (hidrojen peroksit) ve  $^1O_2$ (serbest oksijen) gibi hayvan ve hücre hattındaki reaktif oksijen türlerini tetiklediğini (ROS) ve bunun sonucunda oksidatif stres meydana getirdiği raporlanmıştır. Hücre seviyesinde ROS ların miktarının aşırı artması proteinler, genom ve mtDNA gibi farklı hücre komponentlerinin yapısını bozarak hücrede stres oluşturmaktadır (Nanduri et al., 2013).

Bulunan enzimatik (Süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz) yada enzimatik olmayan (glutatyon, askorbat, tokoferol) antioksidan sistemler ROS lar için öncelikli savunma mekanizmalarıdır. Genelde hatalı katlanan ve/veya katlanmayan proteinler ısı şok proteinleri tarafından tamir edilebilirler ya da hücreye zarar vermemesi için degrade edilir. Bazı genotoksik stresler sadece genetik stabiliteyi zarara uğratmazlar aynı

zamanda direk yada dolaylı olarak gen ekspresyonlarını etkilerler. Bu sebepten dolayı çevre kirliliğinin neden olduğu genotoksik etkilerinin araştırılmasına daha çok önem verilmelidir.

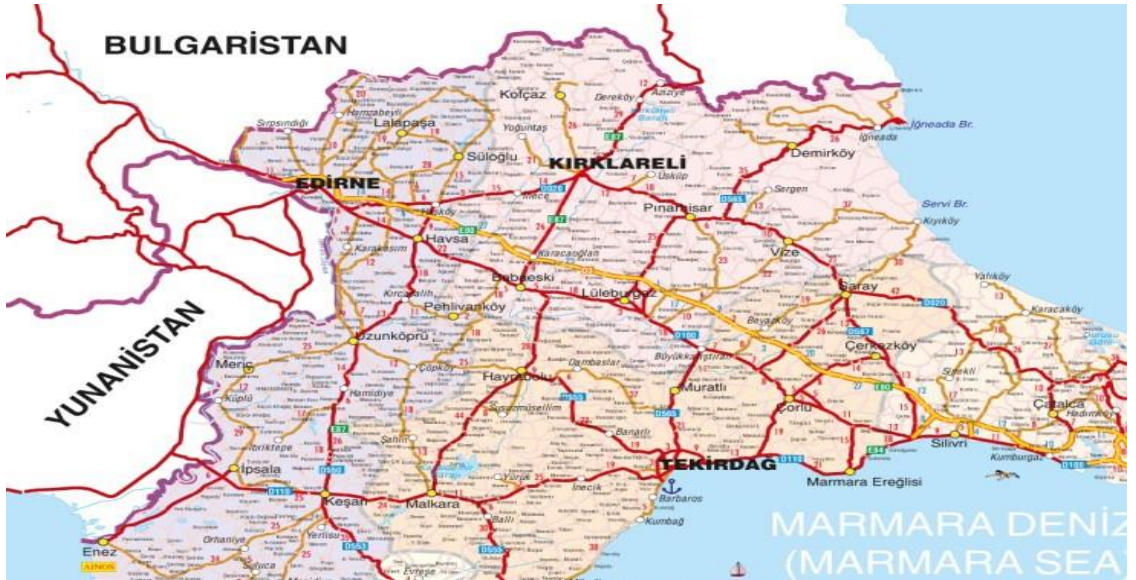
Bu tezin amacı Edirne bölgesinde rasyondan akaynaklı ağır metallere maruz kalmış Holstein-Fresian ırkı sığırlarda ortaya çıkabilecek antioksidanlardan sorumlu [Mn-SOD, Katalaz(CAT) ve glutatyon sentataz (GS)] ve HSP genleri gen ekspresyonlarını araştırmak ve RAPD (rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA) yöntemiyle toplam DNA üzerine ağır metallerin genotoksik etkilerini değerlendirmektir.



## BÖLÜM 2

### GENEL BİLGİLER

Edirne, Türkiye'nin Marmara Bölgesinde Trakya'da yer almaktadır. (Şekil 1.1). Nüfusu 2018 yılı itibari ile 411,528 dir. Edirne topraklarının % 61'i tarım yapılabilir alanlardan oluşmaktadır (Aydogdu, Asan, & Otkun, 2010; Edirne Aile, 2014).



Şekil 1. 1 Edirne İli Haritası (Ekvator Harita 2019)

Edirne'de 9 ilçe 248 köy bulunmaktadır. Bölgede üretimi yapılan tahıllar, otlar ve yağlı tohumların üretim miktarları gösterilmiştir (Çizelge1.1). Bunun yanı sıra bölgede büyükbaş hayvancılık ve küçükbaş hayvancılık yoğun olarak yapılmaktadır.

**Çizelge1 1** Edirne Bölgesi Tahıllar, Otlar ve Yağlı tohum Üretim Miktarları

YIL	BÖLGE ADI	Tahıllar ve diğer bitkisel ürünlerin üretim miktarı (ton) : Saman ve ot (yem bitkileri)	Tahıllar ve diğer bitkisel ürünlerin üretim miktarı (ton) : Tahıllar	Tahıllar ve diğer bitkisel ürünlerin üretim miktarı (ton) : Yağlı tohumlar
2010	Tekirdağ, Edirne, Kırklareli	1001000	2101068	810128
2011	Tekirdağ, Edirne, Kırklareli	1092090	2039533	691618
2012	Tekirdağ, Edirne, Kırklareli	1162804	2426062	543662
2013	Tekirdağ, Edirne, Kırklareli	1326935	2198963	611929
2014	Tekirdağ, Edirne, Kırklareli	1430573	2454018	768684
2015	Tekirdağ, Edirne, Kırklareli	1480282	2270408	771203
2016	Tekirdağ, Edirne, Kırklareli	1491329	2430461	760751
2017	Tekirdağ, Edirne, Kırklareli	1486056	2533854	839254
2018	Tekirdağ, Edirne, Kırklareli	1455437	2222313	855142
2010	Edirne	312127	1082856	346863
2011	Edirne	348421	867243	251703
2012	Edirne	400629	1011288	184191
2013	Edirne	437741	916739	183224
2014	Edirne	456346	1002821	265724
2015	Edirne	485042	921737	232773
2016	Edirne	485873	943933	229739
2017	Edirne	475284	944503	250131
2018	Edirne	478894	931066	248485

Tük 2019

Tarım alanlarının kullanımı konusunda çeşitlilik gösteren bölgede özellikle Ayçiçeği, Çeltik, Arpa, Buğday ve Kanola ekim alanları gösterilmiştir (Çizelge 1.2). Bu ürünler sayesinde bölgede birçok işleme tesisi kurulmuş ve insanlara istihdam sağlanmıştır.

Üretimin artması ile birlikte bölgede yetiştirilen ürünlerin verimliliğinin artırılması için kullanılan kimyasal gübreler, pestisitler ve çevresel kirleticilerle beraber ağır metallerin konsantrasyonunun artması kaçınılmaz hale gelmiştir (Tufan, 2008).

## Çizelge1 2 Edirne Bölgesi Ekilen Ürünler ve Alanları 2018

<b>Tahıllar Ve Diğer Bitkisel Ürünler</b>	<b>Dekar(Da)</b>
Buğday	1.393.895
Mısır	11,418
Arpa	51,830
Çavdar	2,486
Yulaf	1,421
Tritikale	11,923
Kanola veya Kolza Tohumu	31,361
Ayçiçeği Tohumu (Yağlık)	954,502
Çeltik	485,932
Şeker Pancarı	4,419
Fiğ Otu	12,523
Yonca Otu	16,540
Yulaf Yeşil Otu	3,877
Tritikale Yeşil Otu	4,674
Mısır Silajı	78,679
Buğday Hasılı	15,274
Arpa Otu	2,276
Yemlik Bezelye	5,828
İtalyan Çimi	264

### Tüik 2019

Son yıllarda bölgeye verilen teşvikler sayesinde yatırımlar artmış ve Çizelge 1.3 'den anlaşılacağı üzere Büyükbaş hayvan popülasyonunda onbeş yılda yüzde yüz'e yakın artış meydana gelmiştir. Bununla beraber bölgede ihtiyacı karşılayacak düzeyde kaba ve kesif yem hammadresi üretilmemektedir. Üretimin arttırılmasına yönelik çeşitli çalışmaların etkisi ile kullanılan kimyasal gübrelerin, pestisit ve insektisitlerin kullanım yoğunluğu doğru orantılı artarak yetiştirilen ürünlerde ağır metal yükünü arttırmıştır (Yolal, 2014)

### Çizelge1 3 Edirne İli Büyükbaş Hayvan Varlığı

Edirne İli Büyükbaş Hayvan Sayıları		
Büyükbaş Hayvan Sayısı	2002	2017
Sığır (Kültür)	59.321	116.720
Sığır (Melez)	64.931	36.348
Sığır (Yerli)	8.515	1.042
Sığır Toplam	132.767	154.110
Manda	224	393
Toplam	132.991	154.503

### (Hayvansal Üretim İstatistikleri, 2018)

Edirne ilinde büyükbaş hayvalardaki artış (Çizelge 1.4) özellikle kültür melezi hayvanlarda onbeş yılda yaklaşık yüzde yüz artmıştır. Dolayısı ile bu artış beraberinde yem ihtiyacını da arttırmıştır.

### Çizelge1 4 Türkiye'de Büyükbaş Hayvan Varlığı

Tür ve ırklarına göre hayvan sayıları			
Hayvan türleri	2017	2018	Değişim (%)
	Sayı (Baş)	Sayı (Baş)	
<b>Toplam</b>	48 153 636	63 614 512	100.0
<b>Büyükbaş</b>	16 105 025	17 220 903	6.9
<b>Sığır</b>	15 943 586	17 042 506	6.9
<b>Kültür</b>	7 804 588	8 419 204	7.9
<b>Kültür melezi</b>	6 536 073	7 030 297	7.6
<b>Yerli</b>	1 602 925	1 593 005	-0.6
<b>Manda</b>	161 439	178 397	10.5

### TÜİK, Hayvansal Üretim İstatistikleri, 2018

## 2.Ağır Metaller

Ağır metaller doğada doğal olarak bulunan, atom ağırlığı ve yoğunluğu yüksek metalik elementlerdir. Genel olarak sudan 5 kat daha yoğun veya daha fazla yoğunluğa sahip olan metaller ağır metal olarak isimlendirilirler (Fergusson, 1990).

Biyosferin antropojenik bozulmaları, hızla gelişen küresel sanayileşme, yoğun tarım, madencilik ve hızlı kentleşme sadece doğal kaynakları tahrip etmekle kalmamış, aynı zamanda hızla yaşam alanlarını azaltmış ve hayatın temel bileşenlerinin ciddi biçimde kirlenmesine neden olmuştur.

Ağır metaller, canlı biyolojik sistemlerle ilişkili çeşitli hayati fonksiyonlarda kritik bir rol oynamaktadır. Doğada her yerde bulunan bazı ağır metaller toptan bitkiye, ikincil olarak hayvanlara geçmektedir. Yoğun kullanımları ve yaygınlıkları, kanserojen de dahil olmak üzere çeşitli kronik sorunlara yol açmaktadır. Kurşun, arsenik, krom ve civa gibi birkaç ağır metal Uluslararası Kanseri Araştırmaları Ajansı tarafından insan kanserojenleri olarak sınıflandırılır (Koedrith & Seo, 2011). Teknolojideki son gelişmelerle birlikte, toksik metallere maruz kalma son yıllarda büyük ölçüde artmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) "toplam hastalık yükünün yüzde 25'inin toksik kimyasallara maruz kalma dahil olmak üzere çevresel faktörlerle bağlantılı olduğunu tahmin etmektedir. DSÖ'nün yakın tarihli bir analizinde, dünyada çevresel kirlenmenin etkisi ile yaklaşık 4,9 milyon ölümün (yüzde 8,3'ü) gerçekleştiği tahmin edilmektedir.

Topraklarda normal bitki gelişimi için iki çeşit metal bulunur. Bunlar temel mikro besinler olarak adlandırılan esasi elementler (Fe, Mn, Zn, Cu, Mg, ve Ni) ve fizyolojik fonksiyon için gerekli olmayan elementler ( Cd, Sb, Cr, Pb, As, Co, Ag, Se ve Hg). Bitkilerin hem toprak kaynaklı, hem de hava ve su kaynaklı ağır metalleri bünyelerine aldıkları görülmüştür (Patra, Bhowmik, Bandopadhyay, & Sharma, 2004). Bitkilerin, büyümeleri, metabolizmaları ve gelişmeleri için bazı ağır metallerin toprakta küçük miktarlarda bulunmaları gerekir. Bununla birlikte, hem esasi hem de esasi olmayan metallerin konsantrasyonu, bitkilerin yetiştirme sürecinde önemli bir faktördür, fazla miktarda bulunmaları, bitkilerin büyümesini ve gelişmesini inhibe etmektedir (Zengin & Munzuroglu, 2005).

Yem hammaddeleri ve hayvan yemlerinde bulunan ağır metaller civa, kadmiyum, kurşun ve metaloid arsenik toksik etkilere sahiptir. Bunlar gıda zincirlerinden kolayca transfer edilirler, toksik özelliklere sahiptirler ve herhangi bir temel fizyolojik ve biyolojik fonksiyona sahip değildir (Council, 2001).

Metaller hayvan vücuduna, yem, taze ot ve içme suyu ile girerler. Diğer kaynaklar ise kireç dökülmüş padoklar, yüksek miktarda iz metal içerikli mineral takviyeleri ve metalik pigmentler içeren boyalı yüzeylerin yalanması ile gerçekleşmektedir (Raikwar, Kumar, Singh, & Singh, 2008). Toprağın, suların, yiyeceklerin ve bitkilerin ağır metallerce kirlenmesi, bir sonraki aşamada tüketiciler tarafından tüketildiğinde, besin zincirine dahil olmalarına neden olur bu şekilde insan ve hayvan sağlığı için büyük bir tehdit oluşturur (Bilandžić, Gomerčić, Gomerčić, Sedak, & Đokić, 2011) Halen, çevre kirliliğinin artması, süt kontaminasyon sorunlarını ve sütün kalitesine ilişkin belirsizlikleri bu konuda çok sayıda çalışma ile araştırılmaktadır (Farid & Baloch, 2012).

## **2.1. Kadmiyum**

Özellikle elektronik aygıtlarda ve pil sanayinde, ayrıca tarımda artan miktarda gübre kullanımı ile gübrelere yoğun kadmiyum içerikleri özellikle son çeyrek yüzyılda Kadmiyum zehirlenmesi dünyanın birçok yerinde görülmesine neden olmuştur. Kadmiyuma hava, su, toprak ve yiyecek yoluyla uzun süre maruz kalmak, iskelet, idrar, üreme, kardiyovasküler, merkezi ve periferik sinir ve solunum sistemleri gibi kanser ve organ sistemi toksisitesine yol açar (Klaassen, Liu, & Diwan, 2009). Kadmiyum seviyeleri kan, idrar, saç, tırnak ve tükürük örneklerinde ölçülebilir. Kadmiyum toksisitesine sahip hastalar için uygun yeni şelatlama ajanları ve nanopartikül bazlı antidotlarla gastrointestinal sistem sulama, destekleyici bakım tedavisi gerekir. Tahıllar, yeşil yapraklı sebzeler, patatesler, havuçlar ve tütün gibi çeşitli bitki ürünlerinin de yüksek konsantrasyonlarda Cd içerdiği bildirilmiştir (Prozialeck & Edwards, 2007).

Kadmiyum, fosil yakıtların kullanımı, elektronik sanayi, piller, tarımsal gübreler, tarım ilaçları, metal cevheri yanması ve atık yakma gibi insan faaliyetlerinin bir sonucu olarak, çevrede önemli ölçüde mevcuttur. Kanalizasyon çamurunun tarımsal toprağa

sızması, besin zincirinde önemli bir rol oynayabilecek ve çeşitli insan ve hayvanların organlarında birikebilecek bitkilerin adsorbe ettiği kadmiyum bileşiklerinin transferine neden olabilir. Kadmiyum sigara içenlerin kan örneklerinde, sigara içmeyenlere göre 4-5 kat daha fazla birikim göstermiştir. (Rahimzadeh, Rahimzadeh, Kazemi, & Moghadamnia, 2017).

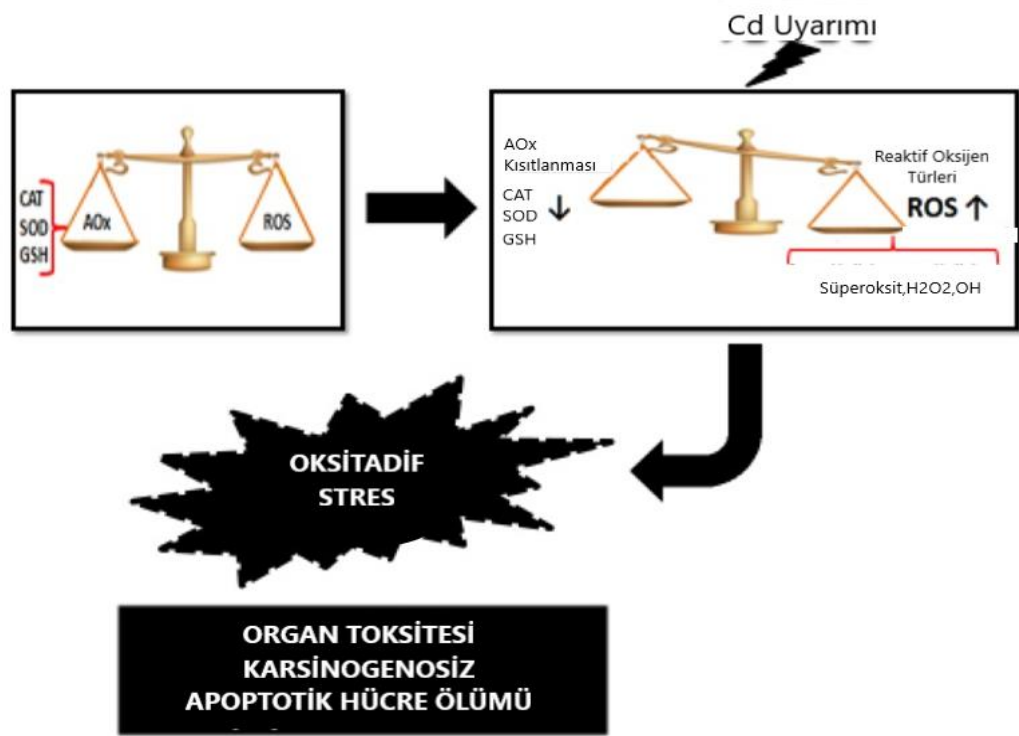
Ayrıca, kadmiyum kontaminasyonun meydana geldiği durumlarda, tarım ürünleri (sebzeler) ve deniz ürünleri (balık, vb.) gibi diğer kaynakları tüketme riski de artmaktadır (Türkdoğan, Kilicel, Kara, Tuncer, & Uygan, 2003).

### **2.1.1. Kadmiyumun Toksikite Mekanizması:**

Kadmiyum hücre proliferasyonunu, diferansiyelasyon ve programlı hücre ölümünü etkiler. Bu aktiviteler, DNA tamir mekanizması, reaksiyon oksijen türlerinin oluşumu (ROS) ve programlanmış hücre ölümünün uyarılması ile etkileşime girer (Rani, Kumar, Lal, & Pant, 2014). Kadmiyum mitokondriye bağlanarak düşük dozda hücrel ve solunumda oksidatif fosforilasyonu inhibe edebilmektedir. (Patrick, 2003) .

Kadmiyum potansiyel olarak mutasyonlara ve kromozomal silmelere neden olur. Kromozomal sapmalar, kardeş kromatid değişimi (KKD), DNA zincir kopmaları ve hücre dizilerinde DNA protein çapraz bağları ile sonuçlanır (Joseph, 2009). Toksikitesi, azaltılmış glutatyonun (GSH) tükenmesini içerir, sülfhidril gruplarını protein ile bağlar ve süperoksit iyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini arttırmaktadır. Kadmiyum ayrıca katalaz, manganez-süperoksit dismutaz (Mn-SOD) ve bakır / çinko-dismutaz (Cu-SOD / Zn-SOD) gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini de inhibe eder (C. Wang, Ma, & Su, 2013). Metallothionein, %33 sistein içeren çinko konsantreli bir proteindir. Metallothionein ayrıca serbest radikal temizleyici olarak görev yapabilir. Hidroksil ve süperoksit radikallerini temizler (Liu, Qu, & Kadiiska, 2009). Genel olarak, metalotiyonin içeren hücreler kadmiyum toksisitesine dirençlidir. Öte yandan, metalotiyoninleri sentezleyemeyen hücreler kadmiyum zehirlenmelerine duyarlıdır (Han vd., 2015). Kadmiyum,  $Ca^{+2}$  'un hücrel seviyesini ve bu işlemlerin dolaylı olarak apoptoza neden olduğu hücrelerde kaspazların ve azotla aktive olan protein kinazların (MRPK) aktivitelerini değiştirebilmektedir (Brama, Politi, Santini, Migliaccio, & Scandurra,

2012).P 53 mitokondriyal membran proteinlerine doğrudan bağlanarak hücre ölümüne neden olur. Mitokondride bir transmembran molekülü olan B hücreli lenfoma-ekstra-büyük (Bcl-xl) ekspresyonu, mitokondri aracılığıyla apoptozu bastırır ve kanser hücrelerini arttırır. Pozlama gözlemine meydan okumak için; P53'ün Bcl-xl'e bağlanması, protein ve apoptotik hücre ölümünü engelleyebilir (Staessen et al., 1999). Kadmiyum ROS üretimini tetikleyerek oksidatif stres oluşturabilir. Bu mekanizma kadmiyumun organ toksisitesi ve programlanmış hücre ölümü üzerindeki etkisini (Şekil 2.1) gösterebilmektedir.



**Şekil 2. 1** Kadmiyum Toksite yolağı (Rahimzadeh vd., 2017)

Farklı kadmiyum bileşiklerinin farklı klinik belirtileri ve aşağıdaki ayrıntılarda açıklanan toksik etkileri vardır. Kadmiyum kemiği ve Itai-itai hastalığı: .Kadmiyuma maruz kalınması, iskelet sisteminde mineral bozukluğa neden olur; böylece kemik hücreleri ile doğrudan etkileşime girebilir, mineralleşmeyi azaltır, aynı zamanda prokollajen C-proteinazları ve kollajen üretimini de engeller (Staessen vd., 1999). Ayrıca, azalmış kemik yoğunluğu kemik kırığı için daha fazla risk oluşturur (Ali, Khan, & Sajad, 2013; Nagajyoti, Lee, & Sreekanth, 2010).



Serum PTH düzeyleri daha yüksek kadmiyuma maruz kaldıkça, bu kemik dokusundan kalsiyum salınımına neden olabilir (Schutte vd., 2008). Kadmiyum, kalsiyum metabolizması, D3 vitamini ve kollajen ile etkileşime girebilir. Bu nedenle, kadmiyum zehirlenmesinin teşhisinde geç kalınmış belirtilerinde osteomalazi veya osteoporoz görülebilmektedir (Staessen vd., 1999).

### **2.1.2. Kadmiyum Toksisitesinde Böbrek hasarı:**

Kadmiyum genellikle böbrek ve karaciğerde birikim eğilimindedir, fakat kemik ve plasenta gibi diğer dokularda da bulunabilir. Kadmiyuma maruziyetin böbrek fonksiyon bozukluğunu etkilediği bununla birlikte ciddi hasarlar oluşturabileceği bildirilmiştir. (Järup, 2002). Kadmiyuma maruz kalma erken böbrek hasarı, proteinüri, kalsiyum kaybı ve tübüler lezyon belirtileri gösterebilir. İdrar analizi erken böbrek hasarı bulgularını kanıtlamaya yardımcı olabilir (Patrick, 2003).

### **2.1.3. Kadmiyum Ve Üreme Sistemi:**

Hayvan çalışmalarının yanı sıra insanlarda da, kadmiyum maruziyetinin artmasının sperm sayısını azalttığı ve olgunlaşmamış sperm biçimlerini arttırdığı iddia edilmektedir (Pizent, Tariba, & Živković, 2012). Bu problemleri spermatogenezde, sperm kalitesinde düşüklüğe yol açmaktadır. Ayrıca kızgınlık, doğurganlık ve serum testosteron seviyesini azaltır (Chandel & Jain, 2014). Kadmiyum CNS'de serbest radikallerin üretimini artırır ve oksidasyona karşı hücrel savunmayı azaltır (Lopez, Figueroa, Oset-Gasque, & Gonzalez, 2003). Hayvan çalışmaları, kadmiyum klorürün akciğer solunum kapasitesini azalttığını ve alveoler duvar kalınlığını arttırabildiğini göstermiştir. Antioksidanların yokluğunda buhar olarak kadmiyumun solunması, akciğer iltihabı ve amfizem ile sonuçlanabilir (Lampe vd., 2008) Toksik Maddeler ve Hastalık Kayıt Dairesi Ajansı (ATSDR) önerisine göre; kadmiyum insanlarda olası bir akciğer kanserojenidir (Lampe vd., 2008).

Kadmiyum gastrointestinal sistemden (GIT) emilir. Çözünürlüğü ve emilimi, mide ve / veya bağırsak pH'ından etkilenir. Aslında, kadmiyum HCl ve kadmiyum klorür formları ile reaksiyona girer. GIT'in iltihabına neden olabilir. H2 blokerleri

gastrik pH'ı yükselterek çözünürlüğün azalmasına ve kadmiyumun emilimini engelleyebilir (Waisberg, Black, Chan, & Hale, 2005).

#### **2.1.4. Kadmiyum Ve Kanserojenlik:**

Kadmiyum ve bileşikleri, Uluslararası Kanser Araştırmalar Ajansı (IARC) tarafından insanlarda kanserojen olarak sınıflandırılmıştır (Kellen, Zeegers, Den Hond, & Buntinx, 2007). Aynı zamanda prostatik veya böbrek kanserlerin de tetikleyicisi olan akciğer kanserojeni olarak düşünülmektedir.

Kadmiyum kanserojenliğini belirleyen hücresel ve moleküler yapılar, proto-onkogenlerin aktivasyonunu, tümör baskılayıcı genlerin etkisizleştirilmesini ve DNA onarımının inhibe edilmesi ile olmaktadır (Il'yasova & Schwartz, 2005). Aslında, DNA sarmalının hasarı veya DNA-protein çapraz bağları bozukluğu, hücre büyümesini tamamen engellemeye neden olabilir. Özetle, kadmiyuma maruz kalmanın hücre çoğalmasını, farklılaşmasını, apoptozu, hücre sinyali ve diğer hücresel aktiviteleri etkileyebileceği önerilmektedir. Bu faaliyetler doğrudan veya dolaylı olarak karsinogenez yapabilir (Waalkes, 2003).

Kan: Kadmiyum yarı ömrü (30 yıl) vücutta uzun süreli kadmiyum birikimine bağlı olabilir, ancak kandaki kadmiyumun kısa yarı ömrü (üç ila dört ay) yakın zamanda maruz kalmaya neden olabilir. Kan kadmiyum konsantrasyonu için saptama sınırı 0,3 µg / L'dir (Silver, Lozoff, & Meeker, 2013).

#### **2.2. Arsenik**

Arsenik (As)'in doğada çeşitli organik ve inorganik formlarda bulunduğu bilinmektedir. Ciddi etkileri olan oldukça toksik bir metaloiddir ve ölümcül bir zehir olarak kullanıldığı uzun yıllardır bilinmektedir. Ayrıca Çin, Hindistan, Yunanistan ve Roma'daki geleneksel tıbbi tedavilerde önemli bir yere sahiptir (Lynch & Braithwaite, 2005). Kronik arsenikoz şu anda uluslararası bir çevre sağlığı problemi olarak kabul edilmekte ve çevresel etkilerden dolayı kirlenen içme suları ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Bangladeş ve Hindistan'daki Gangetic Delta bölgesinde büyük çaplı arsenik kirliliği, 38 milyondan fazla insanın arsenikle ilgili sağlık tehlikesi riski altında olması nedeniyle, dikkat çekmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, 10 pbb, içme

suyunda verilen sınır değerdir; ancak, Arjantin, Meksika ve Hint-Bangladeş bölgesi gibi ülkelerde bu limit aşılmıştır (S. J. Flora, 2011). Bunun yanında özellikle sanayileşmiş birçok bölgede, As'in oluşturduğu toprak kirliliği konusunda artan bir farkındalık bulunmaktadır. (Liao, Chen, Xie, & Liu, 2005; Loska, Wiechuła, & Korus, 2004).

Serbest formdaki arsenik, lipit peroksidasyonuna, antioksidan enzimlerin tükenmesine ve DNA hasarına yol açan serbest radikalleri üretir, böylece Arsenik kaynaklı toksisite ve kanserojenliğin ana mekanizması olarak oksidatif stres oluşur (S. J. Flora, 2011). DNA molekülüne zarar veren oksidatif yaralanma ve çeşitli fosfolipidlerin çoklu doymamış yağ asidi kalıntıları, aminoasitler, peptidler ve proteinler gibi hücre bileşenleri, metal kaynaklı ROS saldırısının duyarlı hedeflerinden olan Arsenik maruziyetinin en önemli sonuçlarından biri olarak rapor edilmiştir.

### **2.2.1. Arsenik Kaynaklı DNA Hasarının Biyobelirteçleri**

Aşırı serbest radikal üretimi artmış karsinogenez/mutajenez ile ilişkilendirilmiştir (S. Flora, Mittal, & Mehta, 2008). Arsenik tarafından üretilen serbest radikallerin, DNA onarım enzimlerinin bozulmasına neden olduğu bildirilmiştir.

#### **8-hidroksiguanin, 8-hidroksiguanosin ve 8-hidroksi-2-deoksiguanozin oluşumu**

Guanin serbest radikaller için, DNA'da bulunan en hassas bazdır; oksidasyondan sonra 8-hidroksiguanin, 8-hidroksiguanosin ve 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) gibi çeşitli markörlere dönüştürülür (De Vizcaya-Ruiz, Barbier, Ruiz-Ramos, & Cebrian, 2009). Diğer tüm belirteçler arasında, 8-OHdG eklentisi, idrarla atılan en bol baz modifikasyonlarından biridir ve kolay toplanmasından dolayı uygun bir oksidatif DNA hasarlı biyolojik belirteç olarak kabul edilir. Raporlar, Arsenik'e maruz kalmanın, idrarda yüksek düzeyde As ve 8-OHdG seviyelerine yol açtığını, yüksek oksidatif DNA hasarını ortaya çıkardığını Şekil 2.2 de göstermektedir (Burgess ve ark. 2007). Arsenik'e maruz kalan hayvanların idrarında 8-oksoadenin, adenin oksidize formu da tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, İnsanlarda eksizyon onarımı çapraz komplementi 1 gibi DNA onarım enzimlerinin ekspresyonunu düşürdüğü de gösterilmiştir. Tüm bu belirteçlerin, kararlı son ürünlere dönüşürken mevcut analitik yöntemlerle tespit

edilmesi zordur. Tek hücreli jel elektroforezi gibi teknikler hala bu amaç için yaygın olarak kullanılmaktadır (Collins ve Azqueta, 2012).

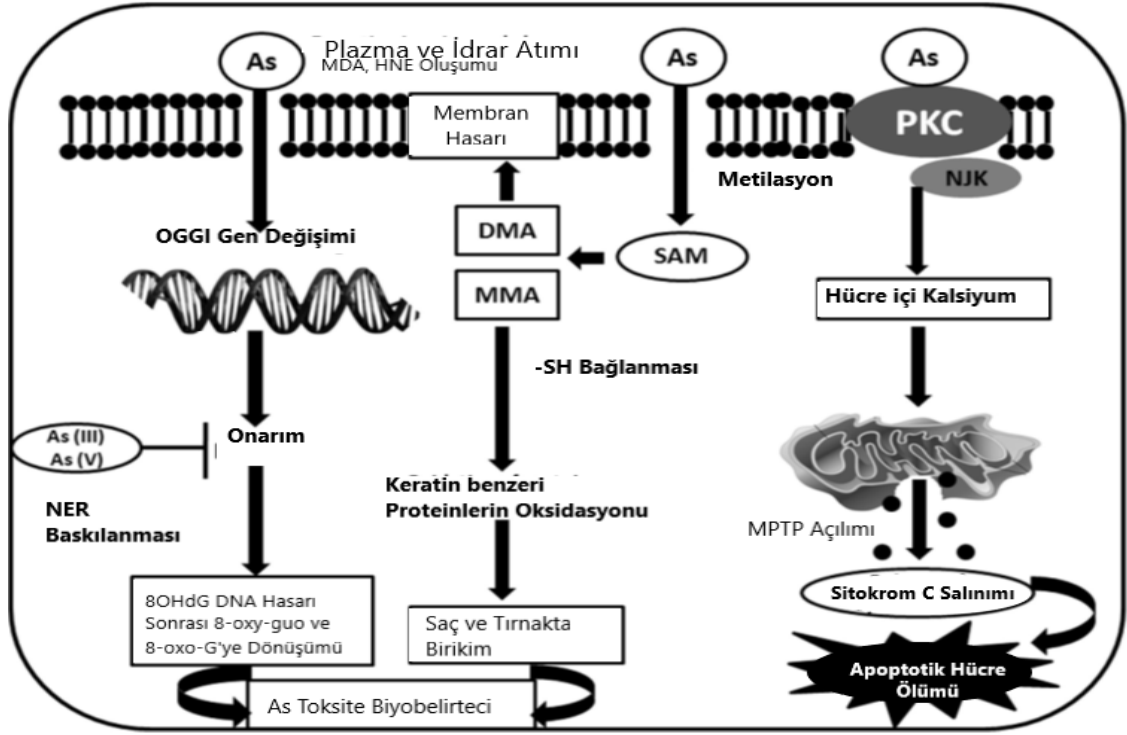
### **2.2.2. Arsenik Kaynaklı Oksidatif Hasarın Biyobelirteçleri**

Biyokimyasal düzeyde, MOS, HNE ve 2-propenal (akrolein) ve izoprostanlar gibi doymamış reaktif aldehytler, ROS seviyelerinde artış ile dolaylı olarak ölçülebilen Arsenik kaynaklı streste, kan ve yumuşak dokularda oksidatif hasar ilk tepkiler arasındadır. (Chauhan ve Flora, 2010). Bununla birlikte, serbest radikal oluşumunu ve oksidatif hasarı ölçmek için invaziv olmayan yöntemlerin kullanımı kolay değildir, çünkü örnek sınırlaması, teknik zorluklar ve veri yorumlama ile ilgili problemler vardır. Floresan problemlerin ve elektron spin rezonansının (ESR) kullanımını gösteren teknikler, oksidatif stresin erken bir göstergesi olarak hizmet veren ROS seviyelerini ölçmek için uygulanabilir. Fakat aynı zamanda normal metabolizma bile endojen olarak ROS üretir, bu da Arsenik toksisitesinin erken bir biyolojik işareti olarak kullanımını kısıtlar.

### **2.2.3. $\delta$ -Aminolevulinik Asit Dehidrataz:**

Arsenik, nükleofilik ligandlar için güçlü bir afiniteye sahiptir, bu, heme biyosentez yolunun, fonksiyonel sülfhidril grupları ile metal-merkapid bağı oluşumu yoluyla doğrudan inhibisyonu ile sonuçlanır.  $\delta$ -v ( $\delta$ -ALAD), sülfhidril kısmı sayesinde Arsenik varlığına karşı oldukça duyarlı bulunmuştur. Arsenik maruziyetinin ardından idrarla üroporfirin ve koproporfirin atılımında doza bağlı artış gözlenmiştir (Kalia ve Flora, 2005).

SOD, CAT ve GPx gibi enzimlerin antioksidan aktivitesi doğrudan veya maruz kalma dozu ve zamanına bağlı olarak toksisite ile ters orantılıdır (Ghosh vd., 2006). Tüm pulmoner biyobelirteç temelli değişiklikleri değerlendirdikten sonra, GST, Arsenik toksisitesi için potansiyel bir biyobelirteç olarak önerilmiştir.

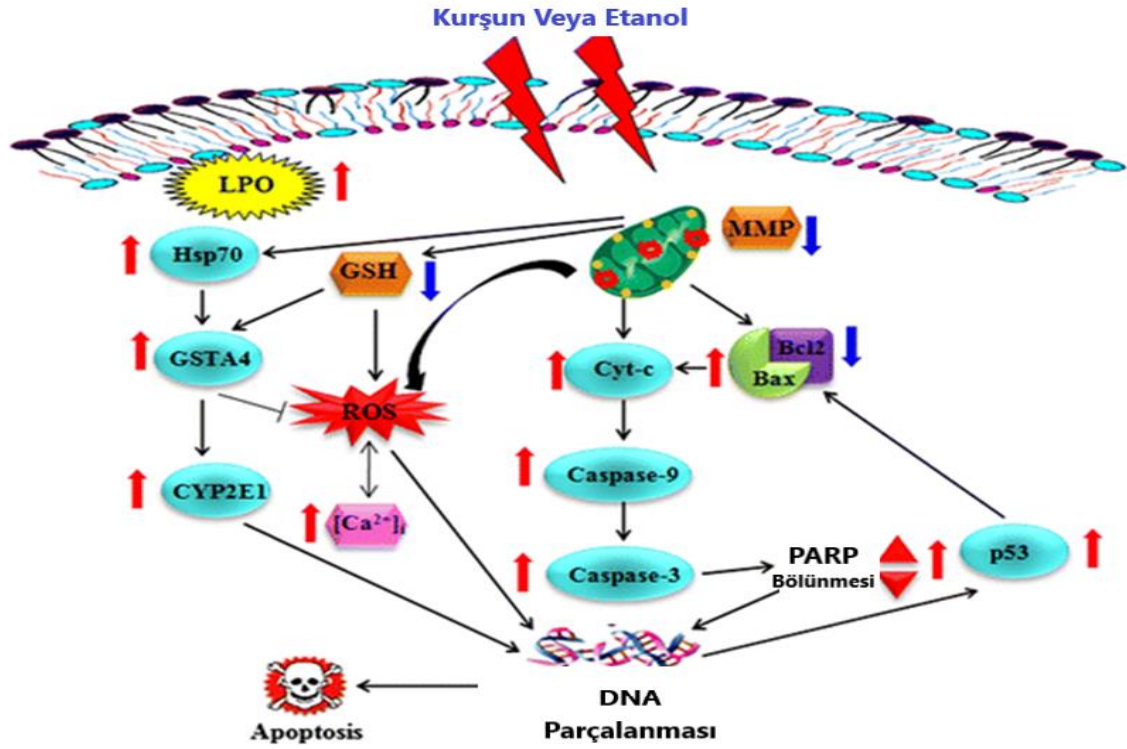


**Şekil 2. 2** Arsenik toksitesinin biyobelirteçlerini belirten başlıca hüresel etkileşimler. (S. J. Flora, 2011).

### 2.3. Kurşun

Kurşun, yaygın olarak kullanılan, dünya kabuğundaki en bol bulunan ağır metallere biridir. İnorganik kurşun, en eski mesleki toksik maddelerden biri olarak kabul edilir. Günlük hayatımızda kalemlerden, benzinli araçlara ve mutfağa kadar çok yönlü kullanım alanları kurşun maruziyetini kaçınılmaz hale getirmektedir. Boyalar birincil kurşun maruziyet kaynağı ve başlıca kurşun toksisite kaynağıdır (Hanif, Bhatti, & Hanif, 2009). Tek bir mekanizmadan ziyade kurşunun toksik belirtileri çeşitli biyokimyasal işlemlerin bozulmasıyla ortaya çıkar. Oksidatif stres, kurşunun toksik belirtilerini ortaya çıkarmada ana mekanizmalardan biri olarak bildirilmiştir (Saxena & Flora, 2004). Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ve glutatyondaki (GSH) ve diğer antioksidan enzim aktivitelerindeki değişiklikler kurşun zehirlenmesinde oksidatif stres oluşumuna katkıda bulunur. Bununla birlikte, serbest radikaller, spesifik olarak iki düzeyde toksisiteye neden olmaktadır: (i) aminolevulinik asit dehidrataz (ALAD) aktivitesinin inhibe edilmesi, böylece aminolevulinik asit (ALA) birikimine ve (ii)

demir varlığında lipid peroksidasyonunun uyarılmasına neden olur (Adonaylo & Oteiza, 1999). İnorganik kurşun herhangi bir şekilde metabolize edilmez ve temel olarak idrarda değişmeden atılır, organik veya alkil kurşun, oksidatif dağıtım işlemine maruz kalır, bu da trietil- ve trimetil-kurşun gibi yüksek derecede nörotoksik metabolitlere yol açar. Sitokrom P450'ye bağımlı monooksijenaz sistemi hepatic metabolizmadan sorumludur.



Şekil 2. 3 Mitokondri aracılı apoptotik yolağın genel görünümü (Kumar vd., 2015)

Kan kurşun düzeyi (esas olarak eritrosit kurşun), Kurşun maruziyetinin ve toksisitesinin değerlendirilmesinde kullanılan birincil ve en doğrulanabilir biyobelirteçlerden biridir. CDC, Zehirli Maddeler ve Hastalık Kayıt Ajansı ve Çevre Koruma Ajansı diğer tüm toksik maddeler arasında sadece Kurşun için hiçbir toksik eşik değeri yoktur. Kurşunun olumsuz etkileri 10 µg / dL kadar düşük kan konsantrasyonlarında bile görülür. Kan Kurşun seviyelerinin ≥10 µg/dL üzerindeki değerler bebekler, çocuklar ve çocuk doğurma çağındaki kadınlar için aşırı olduğu düşünülmektedir (Lanphear, Dietrich, Auinger, & Cox, 2000). Ancak, mesleki maruziyet kan seviyeleri 30 µg / dL'yi aştığında tehlikeli kabul edilir (Smith, Hernandez-Avila, Téllez-Rojo, Mercado, & Hu, 2002). Solunum yoluyla alınan kurşunun % 50'sine kadarı erişkin insanlarda kan dolaşımına transfer edilir, bunun ölçümü hem

son zamanlarda hem de geçmiş maruziyetleri yansıtır. Kurşun metalinin kemikten kana mobilizasyonu, kurşuna aşırı derecede maruz kalmayan kişilerde bile kan kurşun seviyelerinin arttırılmasına (% 45 - % 55) katkıda bulunur (Sanders, Liu, Buchner, & Tchounwou, 2009).

### **2.3.1. Kurşun Toksikite Biyobelirteçleri**

Kurşun zehirlenmesinin genel belirti ve semptomları arasında karın ağrısı, anoreksi, bulantı ve kabızlık, baş ağrısı, eklem ve kas ağrısı, konsantrasyon ve hafıza ile ilgili zorluklar, uyku bozuklukları, bazofilik stippling ile anemi, periferik nöropati ve nefropati yer alır (Rosin, 2009).

### **2.3.2. Oksidatif Hasar $\delta$ -Aminolevulinik Asit Dehidratazın Biyobelirteçleri**

İki değerli bir katyon olan Kurşun, sülfhidril gruplarına bağlanma kuvvetli bir eğilime sahiptir, bu nedenle en yaygın olanı heme sentetik yolunun bozulmasıyla birlikte bazı hayati yolların çeşitli enzimleri ve yapısal proteinleri ile etkileşime girer (Şekil 2.3). Hem sentezinden sorumlu çeşitli enzimler / enzimatik işlemler kurşun toksisitesi için potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılabilir; primer olan  $\delta$ -aminolevulinik asit dehidrataz ( $\delta$ -ALAD) olup, iki ALA molekülünün porfobilinojene yoğunlaşmasının katalize edilmesinde rol oynar (Sanders vd., 2009). Kan Kurşun seviyeleri  $20 \mu\text{g} / \text{dL}$ , ALAD'ın aktivitesini güçlü bir şekilde önler, bu da onu kurşun toksisitesinin en hassas ölçülebilir biyolojik indeksi yapar.

Kurşun ayrıca katalaz, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glukoz-6 fosfat dehidrojenaz ve GSH gibi çeşitli antioksidan enzimlerin işleyişini de engeller (Flora ve diğerleri, 2007a, b). Kırmızı kan hücreleri (RBC) mitokondrilerden yoksun olduklarından, pentoz fosfat yolunun kurşun ile indüklenen inhibisyonları onları oksidatif hasara ve kırmızı kan hücrelerinin (RBC) erken bozulmasına karşı hassas hale getirir, anemiye neden olur (Lachant, Tomoda, & Tanaka, 1984).

## 2.4 Krom

Krom(Cr), kayaların aşınması ve volkanik patlamalar nedeniyle çevrede her zaman bulunan, yer kabuğunda en bol bulunan elementtir; toprakta, deniz suyunda ve nehirlerde bulunur (Stohs, Bagchi, Hassoun, & Bagchi, 2001). Esas olarak iki oksidasyon durumu ile birlikte elemental formda oluşur: üç değerlikli [Cr (III)] ve altı değerlikli [Cr (VI)]. [Cr (VI)] krom kaplama, Inox çeliğinin kaynağı ve diğer özel çeliklerin kaynağı, boya, deri tabaklama ve ahşap koruma gibi yaygın endüstriyel uygulamalara sahiptir. Paslanmaz çeliğin birincil bileşenidir. Öte yandan Cr (III) ise çoğu taze gıdada, sebzelerde, tahıllarda, baharatlarda, ekmekte ve içme suyunda bulunur. İnsülin, glukoz ve lipid metabolizmasının biyolojik aktivitesi için temel bir mikro besin maddesidir ve eksikliği, hiperglisemi, glukozüri, diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli biyolojik durumlarında etkilemektedir (Levina, Codd, Dillon, & Lay, 2002).

### 2.4.1. Krom Kaynakları Ve Maruziyet

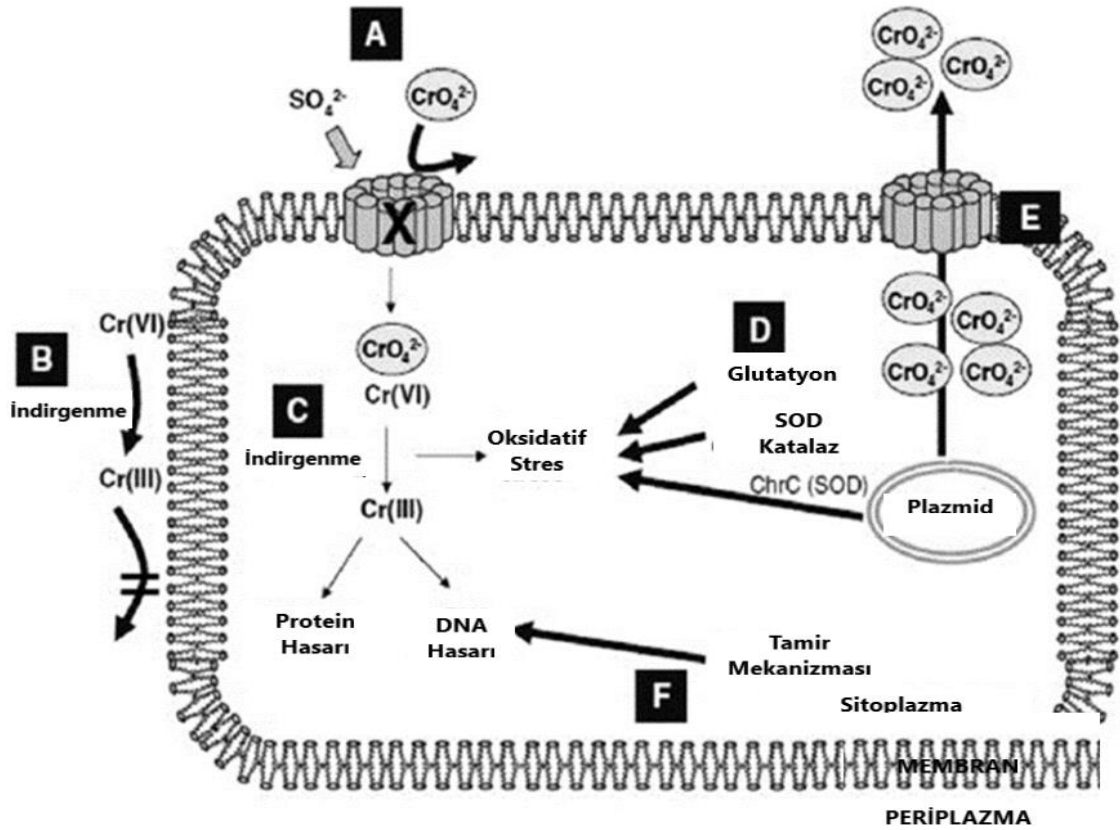
Sodyum kromat ve dikromat, deri tabaklama ve korozyon kontrolünde kullanılan kromik asit ve krom pigmentlerinin üretiminde temel olarak kullanılan en önemli krom ürünleridir. Cr (III), insanlarda önemli bir eser metal olarak kabul edilirken, çeşitli Cr (VI) bileşikleri, insan kanserojenleri olarak sınıflandırılır (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1993). Cr bileşiklerinin solunması, Cr (VI) 'nın kanserojen etkileri için birincil hedef organ olan solunum yollarının tahriş olmasına neden olur. Cr içeren aerosollerin solunması, nazal septum, kronik bronşit, solunum fonksiyonlarında azalma, zatüre ve diğer solunumsal faaliyetlerin bozulmasına neden olur (Caglieri vd., 2005).

### 2.4.2. Krom Toksikite Mekanizması

Cr (III) bileşiklerinin hücre zarından geçememesi nedeniyle nispeten toksik olmadığı kabul edilir; DNA gibi makromoleküllere bağlı hücrelerin içinde kalırlar. Cr (VI), Grup I insan kanserojen olarak sınıflandırılır ve hücrelerin içinde kromat olarak anyon kanallarından taşınır. Cr (III) 'ün aksine karboksilat, sülfat ve fosfat taşıyıcı sistemler yoluyla çeşitli biyolojik membranlara kolayca girebilir; ancak, zara girdikten



sonra, Cr (VI) hemen Cr (III) 'e dönüşür. Daha sonra, askorbik asit, indirgenmiş glutatyon (GSH) ve sisteinin varlığında, stabil Cr (III) ve kararsız Cr (IV) ve Cr (V) üretmek için hücresel indirgeyici varlığında bir veya iki elektron mekanizması ile hızlı bir metabolik azalmaya maruz kalır (X. Shi, 1999). Bu azalmanın Cr toksisitesi için en önemli mekanizmalardan biri olduğu düşünülmektedir (Eisler, 2000). Genel bir kural olarak, Cr [VI], Fenton ve Haber-Weiss tarafından ROS üretimi olarak Cr [III] 'den çok daha toksiktir, redüksiyon işlemi sırasında DNA lezyonları, nükleer transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, antioksidanlar ve Cr (VI) 'nın azaltılmasından sorumlu enzimlerin aktivasyonu önemli fizyolojik olaylardır (Ding & Shi, 2002). Şekil 2.4 de toksite mekanizması gösterilmiştir.



Şekil 2. 4 Krom Toksite Mekanizması(Ramírez-Díaz vd., 2008)

## 2.5. Nikel

Ağır metallere toprakların kirlenmesi, tarım arazilerinin kalitesini, aynı zamanda ürün verimini ve kalitesini azaltabilir (R. Nazir vd., 2015)( Khaliq vd., 2016; Rehman vd., 2016). Öte yandan, tarımsal toprakların ağır metallere kirlenmesi ciddi

çevre ve sağlık sorunlarına neden olmuştur (Khan, Khan, Masood, Per, & Asgher, 2016; Zafar vd., 2015). Diğer ağır metallerin çoğu gibi, nikel (Ni) de temel bir mikro besin maddesidir ve normal büyüme ve bitki gelişimi için gereklidir. Bununla birlikte, Ni toksisitesi, bitkilerde çeşitli fizyolojik bozukluklara yol açar (Guo vd., 2010; Kamran vd., 2016). Nikel ile kirlenmiş topraklarda yetişen bitkiler besin yoluyla insan vücudunda birikir. (Khan vd., 2016; Zafar vd., 2015). Önceki çalışmalar mısırın farklı bitki kısımlarında daha yüksek Ni konsantrasyonları göstermiştir (Guo vd., 2010; Marwa, Meharg, & Rice, 2012), Pirinç (H. Nazir, Asghar, Zahir, Akhtar, & Saleem, 2016), buğday (Y. Wang vd., 2015)(Wang ve diğerleri, 2015), *Eruca sativa* (Kamran vd., 2016) ve pamuk (Khaliq vd., 2016) Ni kaynağı ile yetiştirildiğinde, fazla Ni birikiminin kuru ağırlığı ve Ni ile kirlenmiş toprakta yetişen mısırın tahıl verimini azalttığını bildirmiştir. İnsanlarda ve kemirgenlerde yapılan deneyler, nikelin hem immünomodülatör hem de immünotoksik etkiler sergilediğini göstermiş ve allerjik dermatit ve immünolojik ürtiker meydana getirmiştir. Nikel maruziyeti bağışıklık sistemini hasara uğratarak allerjik reaksiyonlar olarak ortaya çıkabilir(Das, Das, & Dhundasi, 2008; Guimaraens, Gonzalez, & Condé-Salazar, 1994). Farelerin ömür boyu nikel okside maruz kalması ( $42 \text{ mg} / \text{m}^3$ ) amfizem ve diğer proliferatif ve enflamatuvar değişiklikler üretmiştir(Wehner, 1986). Vyskocil ve arkadaşları tarafından, içme suyunun, hem erkek hem de dişi sıçanlara  $100 \text{ mg} / \text{l}$  maruz kaldığında  $\text{NiSO}_4$  içerdiği, böbrek ağırlıklarında önemli artışlara neden olduğu bildirilmiştir. İdrar albümin atılımı dişi sıçanlarda anlamlı olarak artmış, ancak erkek sıçanlarda artış marjinal bir hal almıştır (Vyskočil, Senft, Viau, Cížková, & Kohout, 1994). Nikel, deney hayvanlarında gelişen embriyo / fetusu doğrudan etkileyen plasenta bariyerini geçmektedir Farelere ve sıçanlara, soluma yoluyla maruz kalmanın testis hasarına neden olduğu bilinmektedir(Benson, Henderson, & Pickrell, 1988).

## **2.6. Antioksidan Savunma Sistemi Ve Gen Analizleri**

### **2.6.1. Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres**

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) normalden fazla üretimi sonucunda meydana gelen ve antioksidan sistem tarafından toksik aktif moleküllerle mücadele edilemeyecek düzeyde hücrede redoks dengesinin bozulduğu durum oksidatif stres olarak tanımlanmaktadır(Sevcikova, Modra, Slaninova, & Svobodova, 2011). Reaktif oksijen

türleri normal metabolizma esnasında mitokondriyal oksidatif fosforilasyonda üretilmekte olup antioksidan sistem tarafından uzaklaştırılır. Ancak reaktif oksijen türlerin, metaller ve diğer çevresel kaynaklı maddeler nedeniyle normalden fazla artış hücrede oksidan/antioksidan dengesini bozar ve oksidatif stres oluşur. ROS'lar süperoksit anyon ( $O_2^-$ ), tekil oksijen ( $^1O_2$ ) hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikalının ( $OH\cdot$ ),yanısıra peroksinitrit, nitrik oksit ve lipit peroksil gibi radikallerdir(Nordberg & Arnér, 2001).

### 2.6.2. Serbest Radikaller

Serbest radikaller dış orbitallerinde tek sayıda elektron taşıyan molekül veya atomlardır (Valko, Izakovic, Mazur, Rhodes, & Telsler, 2004). Nötr, negatif ve pozitif durumda olabilen serbest radikallerin yarılanma ömürleri oldukça kısa ve reaksiyona girme isteği oldukça yüksektir(Castaner vd., 1990). Bu sebeple etraflarında bulunan moleküllerden elektron alma veya verme eğilimi gösterirler (Uysal, 1998).

Serbest radikaller; Süperoksit anyon( $O_2\cdot^-$ ), Hidroksi radikali( $\cdot OH$ ), Tekil oksijen( $^1O_2$ ) ve Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )olarak ortaya çıkmaktadır. Yüksek reaktif özelliklerinden dolayı reaktif oksijen türleri potansiyel olarak, mutajenik, karsinojenik veya toksik davranışlarda bulunabilmektedirler. Serbest radikallerin öncelikle hedef aldığı önemli biyomoleküller DNA, lipit ve proteinlerdir(Nordberg & Arnér, 2001). Reaktif oksijen türleri (ROS), tüm aerobik organizmalar tarafından oluşturulur ve indirgenir; bu, normal hücre fonksiyonu için gereken fizyolojik konsantrasyonlara veya oksidatif stres olarak adlandırılan aşırı miktarlara yol açar. ROS'lar, hem çeşitli proteinlerin biyomoleküllerin, lipid hem de lipoproteinlerin ve DNA'nın bütünlüğünü tehdit etmektedir. (Stadtman & Levine, 2000) (Marnett, 2000; YLÄ-HERTTUALA, 1999) (Marnett, 2000). Oksidatif stresin, hem mitokondriyal DNA'ya zarar verir hem de diğer mekanizmalarla yaşlanma sürecinde yer aldığı değerlendirilmiştir (Sies, 2000) (Finkel & Holbrook, 2000).

### 2.6.3. Antioksidan Enzimler

**Çizelge 1.1** Antioksidan Enzimler/ Proteinler

<b>Enzimler;</b> Katalaz Mitokondrial sitokrom oksidaz Süperoksit Dismutaz (SOD) Glutasyon peroksidaz Glutasyon S- transferaz
<b>Metal bağlayıcı proteinler;</b> Hemopeksin/Haptoglobulin Serüloplazmin Transferin Albumin Ferritin
<b>Yağda çözünen bileşikler;</b> $\alpha$ - tokoferol (Vitamin E) Flavonoidler Ubikinol $\beta$ -karoten Bilirubin
<b>Suda çözünen bileşikler;</b> Glutasyon Sistein Askorbik asit (Vitamin C) Ürik asit

(Yalçın, 1992)

### 2.7. Rasyon ve Rasyon-Ağır Metal İlişkisi

Büyükbaş Holstein sığırların beslenmesinde kullanılan hammadelerin doğru ve dengeli karışımına ve hayvanın bir günlük tüm ihtiyaçlarının karşılanmasına " Rasyon " adı verilmektedir. Özellikle sütçü olan Holstein-Fresian ırkı hayvanların günlük ihtiyaçlarını karşılamak için çok çeşitli hammaddeler kullanılmaktadır. Bunlar; Soya kütspesi, Kanola kütspesi, Şeker pancarı kütspesi, Ayçiçeği kütspesi, Mısır ve Mısır yan ürünleri, Arpa, Buğday ve Buğday yan ürünleri (Kepek, Razmol, Bonkalit), Mısır silajı, Yonca kuru otu, Çayır otu, Buğday samanı, vitamin ve mineral karmaları ile birlikte günlük ihtiyacı karşılayacak şekilde verilmektedir. Edirne bölgesinde entansif işletmelerde Holsetein-Fresian bir sığırın günlük süt verim ortalaması 30 lt düzeyindedir. Bu süt veriminin sürdürülebilir olması için öncelikle hayvanların sağlıklı

bir rasyonla beslenmeleri ve bu rasyon içeriğinin kaba yemi oluşturan kısmının yaklaşık %45 düzeyinde olması beklenmektedir. 30 lt süt verimi için rasyonda gerekli olan %15-16 ham protein, 1.58 Nel (Net Enerji Laktasyon) ve kuru maddesi %22-23 civarında olmaktadır.

Ancak yemlerde bulunan ağır metallerin hayvan beslemedeki olumsuz etkileri yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Süt ineklerinde meraya çıkarılan hayvanlarda mera kurşun konsantrasyonunun yükselmesi ile hayvanlarda yem tüketiminde düşme ve sindirim problemlerinde artış görülmüştür(Strojan & Phillips, 2002). Hindistanda sanayi işletmelerinin civarında bulunana tarım alanlarından elde edilen yemlerde kadmium ve kurşun düzeylerinin yüksek olduğu, bununla birlikte karaciğer ve hormonal sisteme zarar verdiği görülmüştür(Swarup vd., 2007). Polonyada koyunlarda yapılan bir çalışmada 10mg kadmiuma maruz kalan koyunların yirmidört saat içinde öldükleri bildirilmiştir. Yapılan otopside karaciğer, böbrek ve dalakta harsarlar meydana gelmiştir(Rogowska, Monkiewicz, & Kaszyca, 2008).Amerikada bulunan Wisconson eyaletinde yapılan bir çalışmada süt sığırlarının tükettiği TMR (Total Mixed Ration)'da ağır metal analizleri yapılmış ve örneklerde Cr, Pb, Cd, Zn, Cu ve Ni saptanmıştır. Süt sığırlarındaki kadmium ve kurşun seviyesi rasyonda belirlenen seviyeler ile anlamlı düzeyde ilişkili bulunmuştur(López vd., 2003). Mevcut bilgilere göre, Cd hayvansal büyüme için yem katkı maddesi olarak eklenmez. Genellikle, Cd çoğu zaman bir safsızlık olarak fosfatlar, çinko sülfat ve çinko oksit gibi mineral takviyelerinde bulunur. Bu nedenle Cd, bu besin bileşenleriyle birlikte hayvansal üretim sürecine girebilir ve bu durum ciddi diyet kontaminasyonuna neden olabilir. Pekin, Fuxin kentinde domuz, sığır ve tavuk yemlerinde ortalama Cd içeriğinin 2.29, 2.79 ve. 8.13 mg / kg olduğunu bildirmiştir(Li vd., 2010). Hayvansal yemlerdeki yüksek Cd seviyesinin yanı sıra, hayvansal gıda işletmelerinde Cd birikiminin Pekin ve Jiangsu pazarlarında <0.10 mg / kg gıda hijyeni kriterini aştığı ve hayvan üretiminde Cd oluşumunu doğruladığı bildirildimiş ve hayvan yemi ile yakından ilişkili olabileceği değerlendirilmiştir(Qin vd., 2006).Ratlarda yapılan bir çalışmada As kömürü ile pişirilmiş mısır ununun ratlarda vücut ağırlığında düşmeye sebep olduğu ve böbrek harabiyetine neden olduğu bildirilmiştir(Xu vd., 2016)

## BÖLÜM 3

### MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Çalışma Popülasyonu

Çalışma popülasyonu Edirne bölgesinde süt sığırcılığı yapan entansif dört işletmeden; laktasyon ortalamaları ikibuçuk yıl, süt verimleri 30 lt olan ve zorunlu kesime sevk edilen 94 baş Holstein-Fresian ırkı süt sığırlarından oluşmaktadır.

#### 3.2. Kan Örneklerinin Alınması

Kan numuneleri Edirne bölgesinde bulunan kesimhane'de kesildikten sonra alınmış ve akabinde soğuk zincir korunarak  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

#### 3.3. ICP-MS Analizi

Bu çalışmada ağır metal konsantrasyonları, endüktif olarak eşleşmiş plazma kütle spektrometresi (ICP-MS, Agilent 7700xx) ile belirlendi. Yem numunelerinin analizinde 0.5 gr yem numunesi Nitrik asit ile Cem Mars 6 mikrodalga yakma ünitesinde gıda yakma protokolüne göre hazırlanmıştır. Kan numuneleri ise 100 µl kan üzerine 200 µl nitrik asit konularak harırlanmıştır. Kalibrasyon eğrisi her bir element için Merck element standart (ABD) kullanılarak en az 8 nokta olarak çizilmiştir. Kalibrasyon eğrisi koeficient değeri en az %99 olarak kabul edilmiştir. Her numune en az 3 tekerrür olarak okunmuş ortalamaları alınarak kalıntı miktarı hesaplanmıştır.



**Şekil 3. 1** ICP-MS 7700xx

### **3.4 Genetik Analizler**

Çalışmada kullanılan Holstein Fresian ırkı hayvanlardan alınan kan örnekleri kullanılarak Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik Farklılık (RAPD) analizi ile Mn-SOD, CAT, GS, GPX, HSP60 ve HSP70 gen ifadeleri çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalardan RAPD analizi için kan örneklerinden izole edilen DNA, gen ekspresyonları çalışmalarında ise RNA kullanılmıştır. DNA ve RNA izolasyonunda her bir tekrar için tek bir birey kullanılmıştır. Çalışmada qRT-PCR (ABI Step One Plus-Thermo Pico) cihazı kullanılmıştır.



**Şekil 3. 2** Real Time PCR (ABI Step One Plus).

### 3.4.1. DNA İzolasyonu

Çalışmada kullanılan kan örnekleri, Genomik DNA'lar DNeasy® Tissue- Blood (Qiagen, USA) kit ile kit protokolü kullanılarak izole edilmiştir. Bu protokole göre, 1-100µl kan numunesi alınmış 180 µl ATL tamponu konulmuş örnekler bir süre çalkalanmıştır. Sonrasında tüp içine 20 µl proteinaz K eklenmiş, Bioneer çalkalamalı ısıtıcılı karıştırıcıda 56 °C'de 4 saat inkube edilmiştir.

2-Sonrasında tüp üzerine 200 µl Buffer AL eklenmiş kısa bir süre çalkalayıcıda çalkalanmıştır.

3-Aynı tüpe 200 µl etanol (96-100 %) ilave edilerek hızlı bir şekilde vortekslenmiştir.

4-Elde edilen karışım kolona yüklenmiş, iki sefer yıkama solüsyonları ile yıkanmış santrifüj işlemleri 6000 g de yapılmıştır. Son olarak kolonlar kurutma santrifüj işlemine tabi tutulmuştur.

5-Kuruyan kolonlara 50 µl Buffer AE eklenmiş, 1 dk oda sıcaklığında kaldıktan sonra 6000 g de 1 dk santrifüj edilerek ve toplam DNA 1.5 ml lik ependorph tüplere toplanmıştır.

### 3.4.2. DNA Miktarının Belirlenmesi

Toplam DNA'dan 2 µl alınmış DNA miktar ve saflık tayini NanoOptizen Q Nanodrop cihazı (Şekil 3.3) ile yapılmıştır. İzole edilen DNA örnekleri bir sonraki çalışmaya kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3. 3 Nano Optizen Q Nanodrop cihaz görüntüsü



### 3.4.3. Rastgele oğaltılmış Polimorfik Farklılık; RAPD Yöntemi

Toplam DNA'lar, PCR reaksiyonu öncesi içerisinde DNA ve RNA free su kullanılarak 25 ng/μl konsantrasyona eşitlenmiş ve kalıp DNA olarak her örnek için eşit miktarda DNA kullanılmıştır. RAPD-PCR analizinde 25 μl PCR reaksiyonu hazırlanmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge3 1 RAPD PCR için gerekli malzemeler

Malzeme	Miktar
Master mix (Amplitaq gold)	12,5 μl
Primer	0,5 μl
DNA	2 μl
Su	10 μl
<b>Toplam</b>	<b>25 μl</b>

Analizler Applied Biosystems® ProFlex™ PCR cihazına ile yapılmıştır (Şekil 3. 4). PCR döngüsü 95°C de 3 dk bir siklus, 95 °C de 30 sn kırk siklus, 37°C – 30 sn kırk siklus, 72°C – 90 sn kırk siklus ve 72°C – 30 dk bir siklus olarak ayarlanmıştır.



Şekil 3. 4 Termal döngü PCR cihazı

Çalışmada 9-15 bazlık 8 farklı RAPD primeri kullanılmış bunlardan 7 adet tekrarlanan denemelerde aynı bant profili göstermiş ve bu 7 adet primer de analizlerde kullanılmıştır (Çizelge 3.2)

**Çizelge3 2** RAPD analizinde kullanılan primerler ve baz dizileri

<b>Primer Adı</b>	<b>Primer Dizileri</b>
<b>1253</b>	5'-GTT CCG CCC C-3'
<b>M13</b>	5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3'
<b>OPU16</b>	5'-CTG CGC TGG A-3'
<b>B18</b>	5'-CCA CAG CAG T-3'
<b>20 OPC 15 32 60</b>	5'-GAC GGA TCA G-3'
<b>23 OPC 19 34 70</b>	5'-GTT GCC AGC C-3'
<b>OPB10 Primer 5</b>	5'-CTG CTG GGA C-3'

Çalışma sonucunda çoğaltılan PCR ürünleri % 2 agaroz jel + ethidium bromit, 2×TAE (Tris 1.6 M, asetik asit 0.8 M, EDTA 40 mM) tampon içerisinde 80 volt akımda yaklaşık 4-6 saat süre ile yürütülmüştür. Moleküler ağırlık standardı olarak 100 baz çiftlik DNA Ladder (Geneaid) kullanılmıştır. Meydana gelen bantlar UV transilluminator (Infinity Capture, Vilber Lourmat) ile fotoğraflanmış ve moleküler ağırlık analizleri yapılmıştır.

### **3.4.5. RNA İzolasyonu**

Kan örneklerinden toplam RNA izolasyonu Thermo RNA mini kit kullanılarak kit protokolüne göre yapılmıştır. EDTA'lı tüplerden 200 µl kan alınmış üzerine 600 µl lizis tamponu ve merkaptetanolden oluşan karışım eklenmiştir. Tüpler ısıtıcılı çalkalamalı karıştırıcıda örnek şeffaflaşınca kadar bekletilmiştir.(Bioer Mixing Block Mb-102-Şekil 3.5) Sonrasında protokol aşağıdaki şekilde uygulamıştır:

1-Örneğin üzerine lizis tamponu eklenmiş ve 26.000 g de 5 dk santrifüj edilmiştir.

2-Elde edilen homojen karışımdan 500 µl alınıp ependorf tüplerine konulmuş, üzerine 500 µl %70'lik etanol eklenerek vorteks işlemi gerçekleştirilmiştir.

3-Elde edilen karışım bitene kadar kit içerisinde bulunan kolonlu tüplere aktararak 12.000 g de 15 sn santrifüj edilmiş ve kalan sıvı uzaklaştırılmıştır.

4-Kolon üzerine 700 µl yıkama tamponu 1 eklenerek 12.000 g de 15 sn santrifüj edilmiş tüp ve kalan sıvı uzaklaştırılmıştır.

5-Kolon üzerine 500 µl yıkama tamponu 2 eklenerek 12.000 g de 15 sn santrifüj edilmiş ve altta kalan sıvı uzaklaştırılmıştır (Bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır).

6-Kolonun, kurutma işlemi için 12.000 g de 1-2 dk santrifüj edilmiş, alttaki tüp atılarak yerine yeni bir kapaklı tüp konulmuştur.

7-Kolonun merkezine 50 µl RNAaz içermeyen su pipetlenmiş ve oda sıcaklığında 1 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 12.000 g de 2 dk santrifüj edilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3. 5 Soğutmalı santrifüj cihazı, Bioer Mixing Block cihazı

### 3.4.6. RNA Miktarının Belirlenmesi

Toplam RNA'nın saflık tayini NanoOptizen Q Nanodrop cihazı ile yapılmıştır. İzole edilen RNA örnekleri bir sonraki çalışmaya kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

### 3.4.7. cDNA Eldesi

RNA İzolasyonu sonrasında örneklerin miktarları ölçülmüştür. RNA miktarları su ile 200 ng RNA olacak şekilde eşitlenmiştir. High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Invitrogen) protokolü kullanılarak üretici firmanın belirttiği şekilde cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Eşitlenmiş olan 10 µl RNA örneği PCR tüplerine konulmuş ve enzim, universal primer ve gereki nükleotitleri içeren 10 µl cDNA miksi

üzerine eklenmiştir. cDNA karışımı Çizelge 3.3.'te verilen kit içeriğine göre hazırlanmıştır.

**Çizelge3 3** cDNA için gerekli malzeme ve miktarları

<b>Malzeme</b>	<b>Miktar</b>
10X RT Buffer	2 µl
25X dNTP mix	0,8 µl
10X RT Random Primer	2 µl
Reverz Transkriptaz	1 µl
Nükleaz free su	4,2 µl
<b>Toplam</b>	<b>10 µl</b>

Toplam hacmi 20 µl (10 µl RNA örneği+10 µl cDNA kit karışımı) olan PCR tüp içerikleri PCR cihazında 25 °C'de 10 dk; 37 °C'de 120 dk ve 85 °C'de 5 dk tutularak cDNA sentezlenmiştir. Sentezlenen cDNA'lar bir sonraki çalışmaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

#### **3.4.8. Kantitatif Real Time-PCR (qRT-PCR) Analizleri**

Antioksidan enzimler ve ısı şok protein ailesine ait gen ifadeleri qRT-PCR protokolü ile analiz edilmiştir. Elde edilen cDNA'lar primerler ile SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems) kullanılarak gen ifadelerindeki değişimler belirlenmiştir. Buna göre her bir reaksiyon için toplam reaksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems), F ve R primerler ve DNAaz/RNAaz içermeyen karışım ve 2 µl cDNA ile reaksiyon başlatılarak qRT- PCR ile sonuçlar elde edilmiştir. Reaksiyonda kullanılacak primerlerin F ve R primer dizileri Çizelge 3.4'de verilmiştir;

**Çizelge3 4** qRT-PCR da kullanılan antioksidan enzimler ve dizilişleri

<b>Gen Adı</b>		<b>Primer Sekansları</b>		
<b>Antioksidan Savunma Genleri</b>				
Mn-SOD	F	5'	TCTGAAGAAGCCATCGAGT	3'
	R	5'	GCAGATAGTAGGCGTGCTCC	3'
CAT	F	5'	TACGAGCAGGCCAAGAAAGTT	3'
	R	5'	ACCTTGTACGGCAGTTCAC	3'
GS	F	5'	TGGGACCAGCAAGTAAAACC	3'
	R	5'	TCGCGAATGTAGAACTCGTG	3'
GPX	F	5'	AGTTCGGACATCAGGAGAATGGCA	3'
	R	5'	TCACCATTCACCTCGCACTTCTCA	3'
<b>Isı Şok Protein Ailesi Genleri</b>				
HSP60	F	5'	GTCGCGCCCCGTTAGCAC	3'
	R	5'	CATCGCGTCCCACCTTCTTCAT	3'
HSP70	F	5'	CGAGETCGACGCATTGTTTG	3'
	R	5'	GAGTGGATCCGCCGACGAGTA	3'
<b>Endojen Kontrol Genleri</b>				
GAPDH	F	5'	TTGGTATCGTGAAGGACTCA	3'
	R	5'	TGTCATCATATTTGGCAGGTTT	3'
B-ACTIN	F	5'	CCTCTGAACCCTAAGGCCAAC	3'
	R	5'	TGCCACAGGATTCCATACCC	3'

qRT-PCR programı; 1 siklus 2 dakika 50°C ve 10 dakika 95°C, devamında, 40 siklus denatürasyon (95°C 15 sn) ve anelling (primer eşleşmesi) ve elongasyon (primer uzaması) (60°C 'de 1 dakika) ile çoğaltılmıştır. qRT-PCR sonucu elde edilen veriler endojen kontrol olarak kullanılan  $\beta$ -ACTIN'e göre normalize edilmiş halde grafik olarak, kontrole göre oransal ifade edilmiştir.

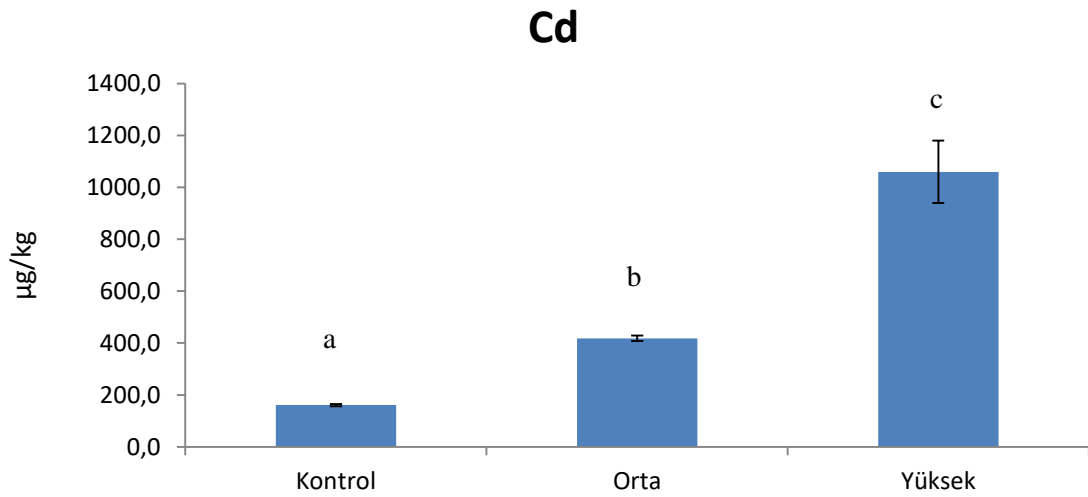
## BÖLÜM 4

### BULGULAR

Proje kapsamında Edirne bölgesinde Hostein-Fresian ırkı sığırlarda kan serumundan ve yemlerden gelen ağır metal seviyeleri bölgenin çeşitli çiftliklerinden toplanmış ICP-MS cihazıyla incelenmiş ve çizelgelerde gösterilmiştir. Doksan dört büyükbaş hayvandan alınan kanlarda ölçülen ağır metal seviyeleri incelenmiş ve grafiklerle sunulmuştur. Yapılan incelemede ağır metal seviyesi düşük çıkanlar kontrol grubu olarak ele alınmıştır. Çalışmada ağır metal seviyeleri Cd, As, Ni, Pb ve Cr için ayrı ayrı incelenmiş Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Elde edilen bulgulara göre kadmiuma maruz kalan hayvanlarda serum kadmiyum düzeyleri kontrol grubuna göre orta ve yüksek grupta istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ve Şekil 4.1 de gösterilmiştir. Bölgeden toplanan kaba yemlerdeki ağır metal miktarları kesif yemlere göre farklılık göstermiş ve Çizelge 4.2 de gösterilmiştir. Yapılan analizlerde en düşük ağır metal seviyesi Arsenik olarak tespit edilmiş ancak kan serumunda Arsenik düzeyi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ve Şekil 4.2 de gösterilmiştir. Çizelge 4.2'de sığır süt yeminde yasal limitlerin üzerinde nikel tespit edilmiştir. Kan serumunda yapılan analizlerde Nikel ağır metalinin yüksek gruplarda anlamlı bir şekilde yüksek olduğu Şekil 4.2 'de gösterilmiştir. Ayrıca Pamuk tohumu yeminde yapılan analizde Krom ve Nikel'in diğer ağır metallere göre miktarının fazla olması çalışma grubunda yapılan kan dokusu analizlerini desteklemektedir. Bununla beraber Fiğ silajında yapılan analizlerde ağır metal içeriklerine yüksek düzeyde rastlanmamıştır.

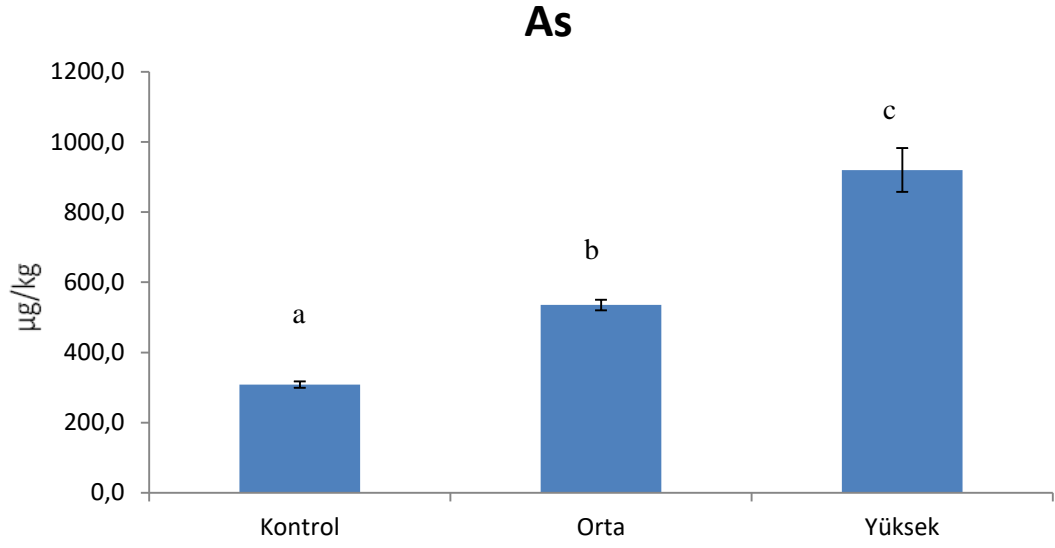
**Çizelge4 1** Kan Serumu özelliklerinin tanımlayıcı istatistikleri ve ağır metal içerikleri(mg.kg<sup>-1</sup>)

		Ortalama	Std. Sapma	Minimum	Maximum
Cr	Kontrol	0.40 <sup>a</sup>	0.05	0.23	0.46
	Orta	1.35 <sup>b</sup>	0.65	0.48	2.07
	Yüksek	3.76 <sup>c</sup>	3.27	2.28	15.58
Ni	Kontrol	1.91 <sup>a</sup>	0.81	0.36	3.96
	Orta	6.79 <sup>a</sup>	2.13	4.15	8.90
	Yüksek	298.02 <sup>b</sup>	137.44	141.01	396.58
As	Kontrol	0.31 <sup>a</sup>	0.07	0.13	0.39
	Orta	0.54 <sup>b</sup>	0.09	0.40	0.70
	Yüksek	0.92 <sup>c</sup>	0.16	0.73	1.15
Cd	Kontrol	0.16 <sup>a</sup>	0.04	0.08	0.28
	Orta	0.42 <sup>b</sup>	0.01	0.41	0.43
	Yüksek	1.06 <sup>c</sup>	0.24	0.75	1.28
Pb	Kontrol	2.20 <sup>a</sup>	0.53	1.32	3.34
	Orta	5.21 <sup>a</sup>	1.89	3.40	9.27
	Yüksek	36.84 <sup>b</sup>	41.57	12.64	99.05



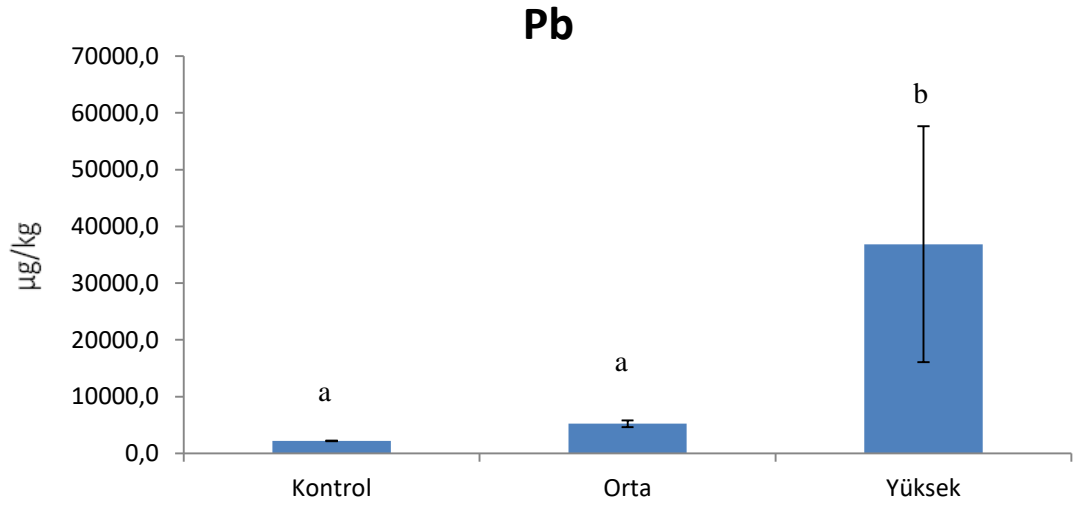
**Şekil 4 1** Kan Serumu Kadmiyum Düzeyleri

Kontrol grubuna göre orta ve yüksek grupta istatistiksel olarak fark bulunmaktadır. Anova testi yapılmış ve  $P < 0.0001$  olarak belirlenmiştir.



**Şekil 4 2** Kan Serumu Arsenik Düzeyleri

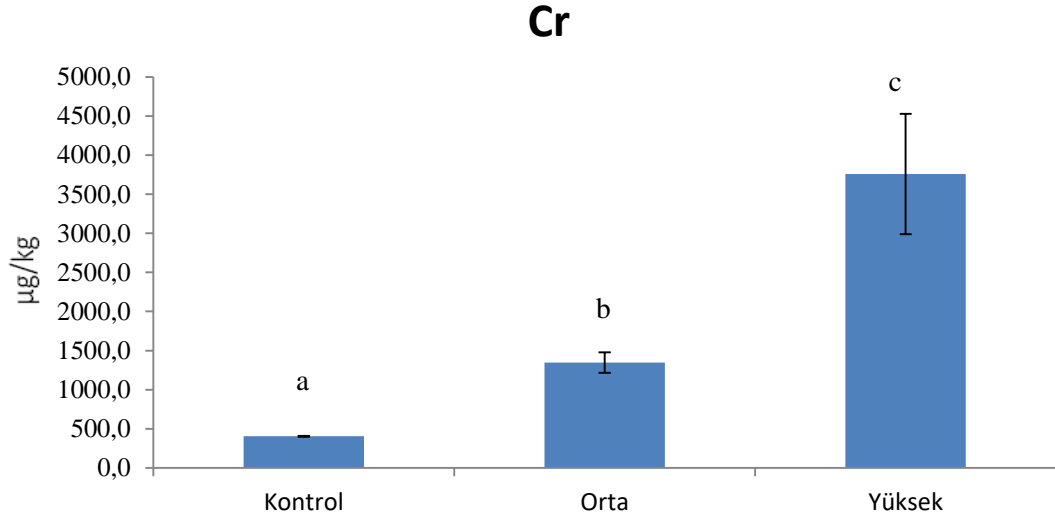
Kontrol grubuna göre orta ve yüksek grupta istatistiksel olarak fark bulunmaktadır. Anova testi yapılmış ve  $P < 0.0001$  olarak belirlenmiştir



**Şekil 4 3** Kan Serumu Kurşun Düzeyleri

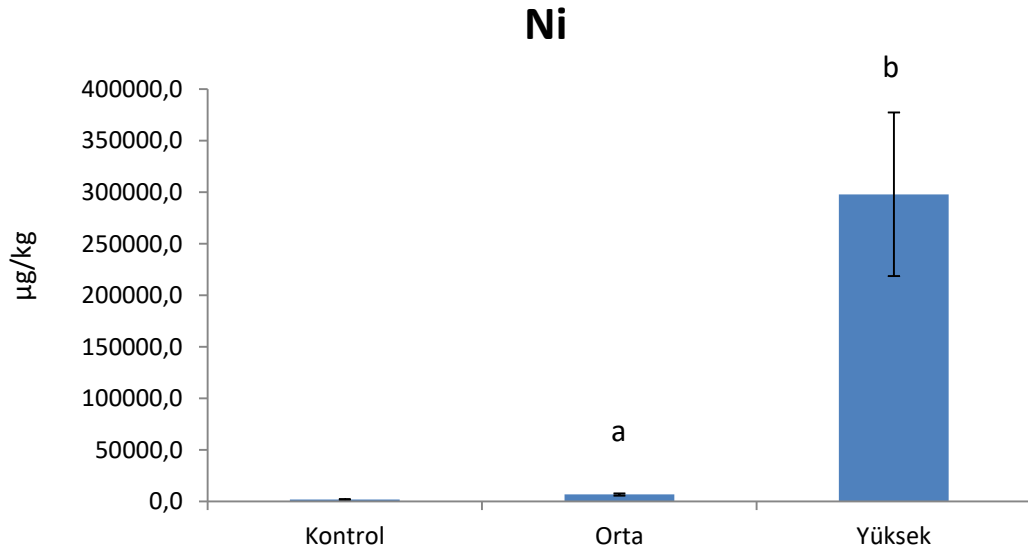


Kontrol grubuna göre orta ve yüksek grupta istatistiksel olarak fark bulunmaktadır. Anova testi yapılmış ve  $P<0.0001$  olarak belirlenmiştir



**Şekil 4 4** Kan Serumu Krom Düzeyleri

Kontrol grubuna göre orta ve yüksek grupta istatistiksel olarak fark bulunmaktadır. Anova testi yapılmış ve  $P<0.0001$  olarak belirlenmiştir.



**Şekil 4 5** Kan Serumu Nikel Düzeyleri

Kontrol grubuna göre orta ve yüksek grupta istatistiksel olarak fark bulunmaktadır. Anova testi yapılmış ve  $P<0.0001$  olarak belirlenmiştir

**Çizelge4 2** Mikrodalga ICP-MS Metodu İle Belirlenen Kaba ve Kesif Yem sonuçları

Kimyasal Parametreler	Birim	Sığır Süt Yemi	Fiğ Silajı	Süt TMR	Pamuk Tohumu (Çiğit)	Buzağı Fabrika Yemi
Arsenik (As)	(mg kg <sup>-1</sup> )	0.59	0.044	0.11	0.31	0.17
Kadmiyum ( Cd)	(mg kg <sup>-1</sup> )	0.08	0.05	0.07	0.07	0.08
Nikel (Ni)	(mg kg <sup>-1</sup> )	31.22	0.36	1.42	2.84	1.27
Krom (Cr)	(mg kg <sup>-1</sup> )	0.54	0.74	1.45	10.04	1.2
Kurşun (Pb)	(mg kg <sup>-1</sup> )	0.28	0.07	0.2	0.4	0.17

#### **4.2 RAPD DNA Polimorfizmi**

Kontrol, orta ve yüksek düzeyde ağır metallere maruz kalan hayvanlarda DNA polimorfizmlerinin belirlenmesinde 7 farklı primere ait agaroz jel fotoğrafı (Şekil 4.6) ve kontrole göre yeni oluşan ve kaybolan bantların baz çifti değerleri her bir primer için ayrı ayrı verilmiştir.

##### **4.2.1 M13 Primeri**

Çizelge 4.3'e göre M13 primerinde kontrolde 765-1330 baz çifti arasında 3 adet bant saptanmıştır. Bu verilere göre orta grupta bulunan bireylerde 1, yüksek grupta ise 4 adet yeni bant oluşmuştur. En fazla bant değişimi ağır metal içeriği yüksek bulunan grupta çıkmıştır. Bununla birlikte M13 primerinde kontrol grubuna göre orta ve yüksek grupta kaybolan bant olmamıştır.

##### **4.2.2 OPU 16 Primeri**

Çizelge 4.3'e göre OPU 16 primerinde kontrolde 84-1304 baz çifti arasında 5 adet bant saptanmıştır. Bu verilere göre orta ve yüksek grupta herhangi bir bant oluşumu ve kaybı olmamıştır.

##### **4.2.3 1253 Primeri**

Çizelge 4.3'e göre 1253 primerinde kontrolde 538-2438 baz çifti arasında 6 adet bant saptanmıştır. Bu verilere göre orta grupta bulunan bireylerde 1 bant oluşmuş, yüksek grupta ise 1 adet bant kaybolmuştur

#### 4.2.4 23 OPC 193470 Primeri

Çizelge 4.3'e göre 23 OPC 193470 primerinde kontrolde 579-1699 baz çifti arasında 8 adet bant saptanmıştır. Bu verilere göre orta grupta bulunan bireylerde bant değişimi oluşmamış bununla birlikte yüksek grupta 1 adet yeni bant oluşmuştur.

#### 4.2.5 B 18 Primeri

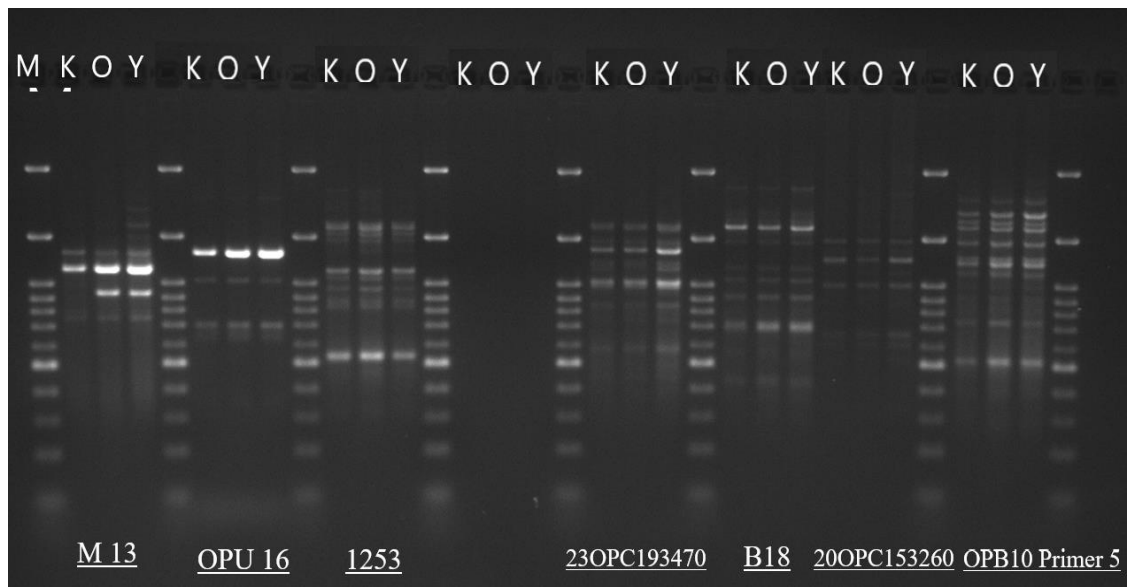
Çizelge 4.3'e göre B 18 primerinde kontrolde 418-2634 baz çifti arasında 11 adet bant saptanmıştır. Bu verilere göre orta ve yüksek grupta bulunan bireylerde bant değişimi oluşmamıştır.

#### 4.2.6 20 OPC 153260 Primeri

Çizelge 4.3'e göre 20 OPC153260 primerinde kontrolde 663-1515 baz çifti arasında 4 adet bant saptanmıştır. Bu verilere göre orta Grupta herhangi bir bant değişimi olmamıştır. Yüksek grupta bulunan bireylerde 3 adet yeni bant oluşmuştur.

#### 4.2.7 OPB 10 Primer 5 Primeri

Çizelge 4.3'e göre 20 OPC153260 primerinde kontrolde 524-2370 baz çifti arasında 11 adet bant saptanmıştır. Bu verilere göre orta grupta herhangi bir bant değişimi olmamıştır. Yüksek grupta bulunan bireylerde 2 adet yeni bant oluşmuştur



Şekil 4 6 Primerlere Ait Jel Görüntüsü

**Çizelge4 3** Kullanılan Primerlere Göre Kaybolan Ve Yeni Çıkan Bantlar

<b>M13 Primeri</b>		
<b>Kontrol</b>	<b>Orta Grup</b>	<b>Yüksek Grup</b>
1330;1133;765	Y 937	2021;1677; 1500;937
	K -	-
<b>OPU 16 Primeri</b>		
<b>Kontrol</b>	<b>Orta Grup</b>	<b>Yüksek Grup</b>
1304;1022;696;639 84	Y -	-
	K -	-
<b>1253 Primeri</b>		
<b>Kontrol</b>	<b>Orta Grup</b>	<b>Yüksek Grup</b>
2438;1696;1488 1099;963;839;538	Y 1310	-
	K -	2438
<b>23 OPC 19 34 70 Primeri</b>		
<b>Kontrol</b>	<b>Orta Grup</b>	<b>Yüksek Grup</b>
1699;1477;1364; 1201;1141;1016; 843;579	Y -	744
	K -	-
<b>B 18 Primeri</b>		
<b>Kontrol</b>	<b>Orta Grup</b>	<b>Yüksek Grup</b>
2634;1996;1719;1464;1159; 1039;914;822;696;554;418	Y -	-
	K -	-
<b>20 OPC 15 32 60 Primeri</b>		
<b>Kontrol</b>	<b>Orta Grup</b>	<b>Yüksek Grup</b>
1515;1268;1007;663	Y -	1388;1108;605
	K -	-
<b>OPB 10 Primer 5 Primeri</b>		
<b>Kontrol</b>	<b>Orta Grup</b>	<b>Yüksek Grup</b>
2370;2065;1902;1787;1500; 1254;1129;1007;922;737; 524	Y -	2834 2622
	K -	-

K:Kaybolan Bant

Y: Yeni Bant

### 4.3 Gen ekspresyon analizleri

Çalışmada kullanılan materyali, bölgenin çeşitli çiftliklerinden mezbahaneye gelen hayvanlar oluşturmuştur.

Çalışma kapsamında antioksidan savunma sistemi, ısı şok protein (HSP) genlerinin kontrol, orta ve yüksek ağır metal içeren gruplardaki gen ifadeleri araştırılmıştır. Kan örnekleri ile RNA izolasyonu ve sonrasında cDNA sentezi yapılmış

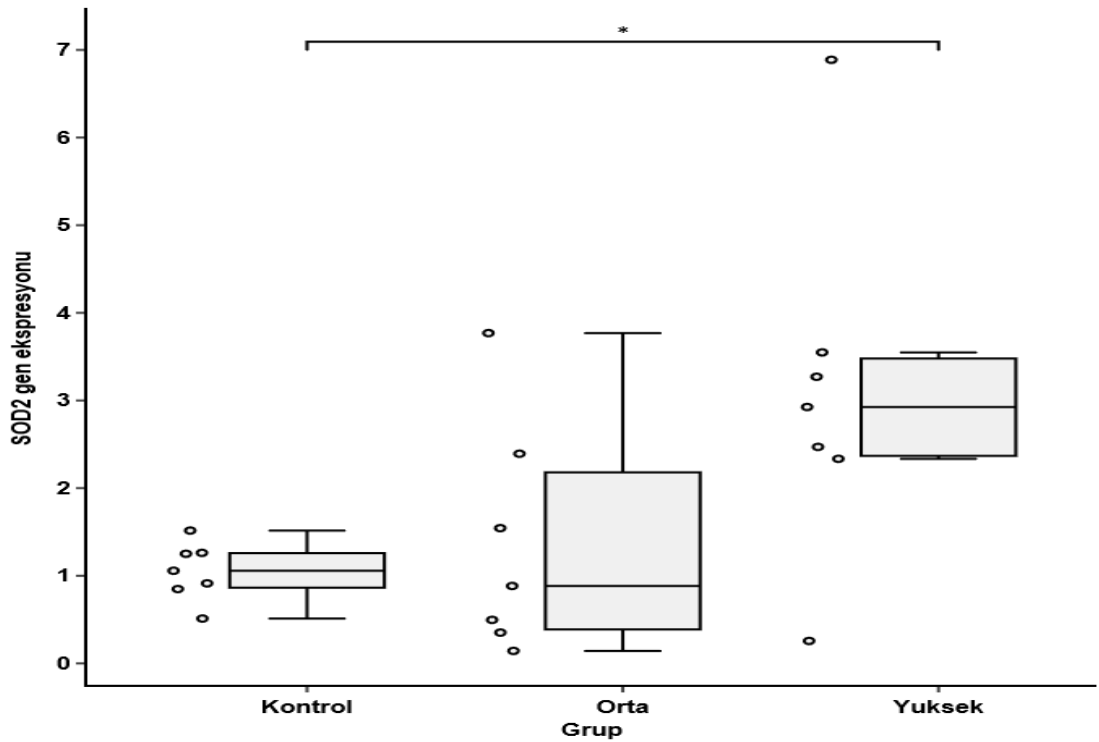
ve sonrasında gerçekleştirilen qRT-PCR yapılmış ve analiz sonuçları Çizelge 4.5’de verilmiştir.

**Çizelge4 4** Antioksidan gen ekspresyon seviyelerinin istatistiksel gösterimi

		N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	95% Güvenirlilik Aralığı		Minimum	Maximum
						Alt Sınır	Üst Sınır		
SOD2	Kontrol	7	1,05	0,33	0,12	0,75	1,36	0,51	1,52
	Orta	7	1,37	1,31	0,50	0,15	2,58	0,14	3,77
	Yüksek	7	3,10	1,99	0,75	1,26	4,94	0,26	6,89
	Toplam	21	1,84	1,61	0,35	1,11	2,57	0,14	6,89
CAT	Kontrol	7	1,14	0,61	0,23	0,57	1,70	0,12	1,78
	Orta	7	1,64	1,34	0,51	0,40	2,87	0,26	3,53
	Yüksek	7	4,16	0,69	0,26	3,52	4,79	3,11	5,18
	Toplam	21	2,31	1,62	0,35	1,57	3,05	0,12	5,18
GS	Kontrol	7	1,34	0,55	0,21	0,83	1,85	0,8	2,23
	Orta	7	6,80	2,51	0,95	4,47	9,12	2,82	9,92
	Yüksek	7	7,44	5,49	2,08	2,36	12,52	2,32	19,38
	Toplam	21	5,19	4,35	0,95	3,21	7,17	0,8	19,38
GPX	Kontrol	7	1,03	0,31	0,12	0,75	1,32	0,79	1,68
	Orta	7	0,99	0,76	0,29	0,28	1,69	0,15	1,96
	Yüksek	7	3,77	1,90	0,72	2,01	5,53	1,54	7,39
	Toplam	21	1,93	1,75	0,38	1,13	2,73	0,15	7,39
HSP60	Kontrol	7	1,03	0,27	0,10	0,78	1,28	0,64	1,3
	Orta	7	2,48	1,91	0,72	0,72	4,25	0,09	5,06
	Yüksek	7	10,28	8,64	3,27	2,29	18,27	3,74	28,96
	Toplam	21	4,60	6,39	1,39	1,69	7,51	0,09	28,96
HSP70	Kontrol	7	1,26	0,53	0,20	0,77	1,75	0,51	2,17
	Orta	7	2,50	1,80	0,68	0,84	4,16	0,55	4,96
	Yüksek	7	5,40	1,54	0,58	3,98	6,82	3,24	7,49
	Toplam	21	3,05	2,22	0,48	2,04	4,06	0,51	7,49

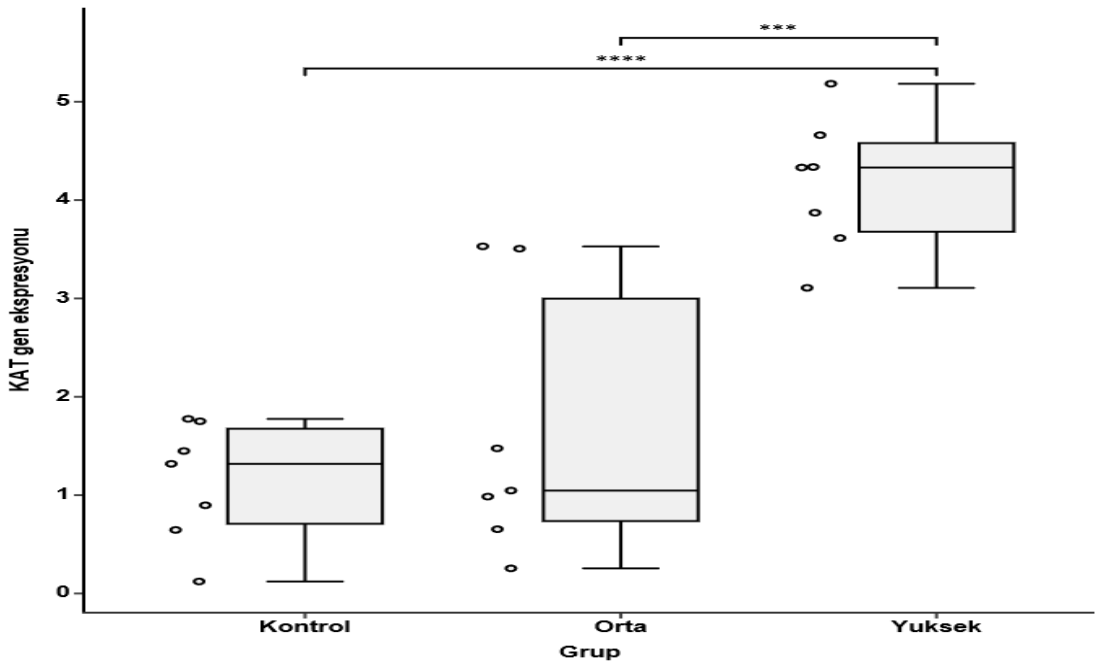
**Çizelge4 5** Anova testine göre Antioksidan genlerin önem seviyeleri

ANOVA						
		Kareler Toplamı	df	Kareler Ortalaması	F	P
SOD2	Gruplar Arası	17,01	2	8,50	4,41	0,028
	Grup İçi	34,70	18	1,93		
	Toplam	51,71	20			
CAT	Gruplar Arası	36,71	2	18,35	20,86	0
	Grup İçi	15,84	18	0,88		
	Toplam	52,55	20			
GS	Gruplar Arası	157,22	2	78,61	6,41	0,008
	Grup İçi	220,82	18	12,27		
	Toplam	378,04	20			
GPX	Gruplar Arası	35,62	2	17,81	12,45	0
	Grup İçi	25,76	18	1,43		
	Toplam	61,37	20			
HSP60	Gruplar Arası	346,45	2	173,22	6,63	0,007
	Grup İçi	470,05	18	26,11		
	Toplam	816,49	20			
HSP70	Gruplar Arası	63,30	2	31,65	16,16	0
	Grup İçi	35,24	18	1,96		
	Toplam	98,54	20			



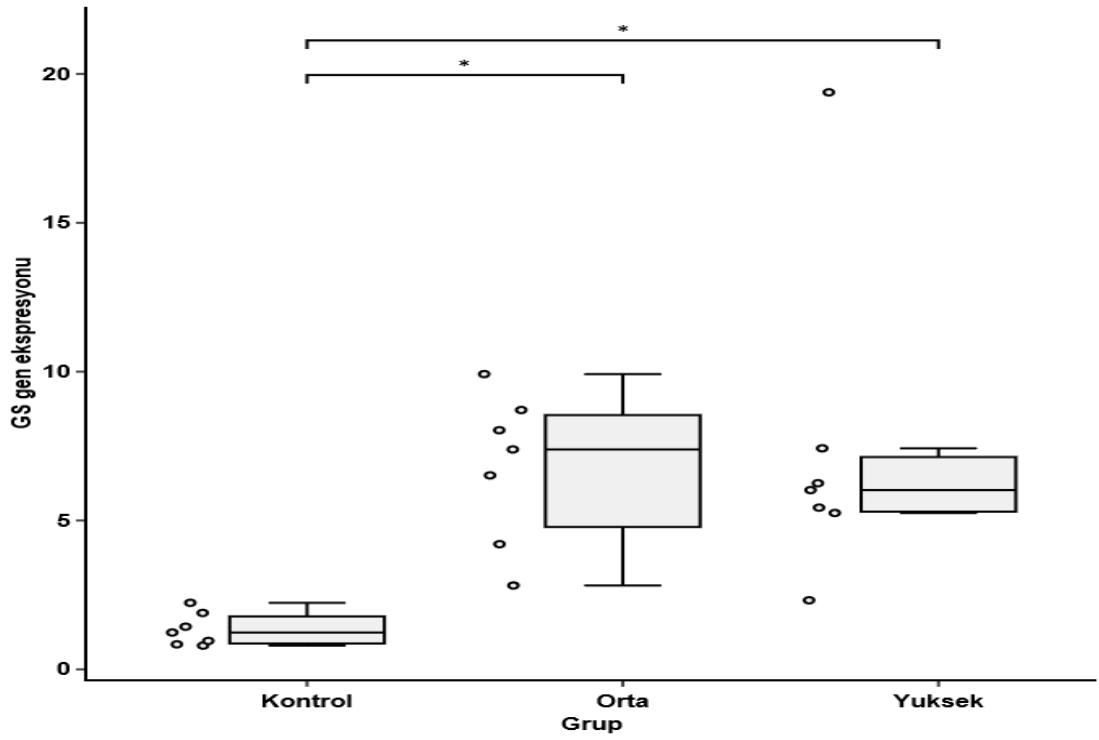
**Şekil 4 7** Kontrol grubuna göre Orta ve Yüksek grup Mn-SOD gen ekspresyonu

Tez kapsamında Edirne yöresi ruminantlarının kan dokularında belirlenen Mangan süperoksit dismutaz gen ekspresyonuna ait bulgular (şekil 4.7) sunulmuştur. Yapmış olduğumuz çalışmada kontrol bölgesi örneklerine kıyasla kanlarında istatistik olarak anlamlı seviyede daha fazla ağır metal içeren orta grupta Mn-SOD gen ekspresyonu  $1.36 \pm 0.49$  katlık bir artış saptanmış ancak oluşan bu fark istatistik olarak önemli bulunmamıştır. Kanlarında yüksek miktarda ağır metal içeren yüksek grubunda ise Mn-SOD ekspresyonu kontrole kıyasla  $3.09 \pm 0.75$  katlık bir artış göstermiş oluşan bu fark istatistik olarak anlamlı bulunmuştur. ( $F_{SOD2}=4.411$ ;  $sd:2;20$ ;  $P=0.028$ )



**Şekil 4 8** Kontrol grubuna göre Orta ve Yüksek grup KAT gen ekspresyonu

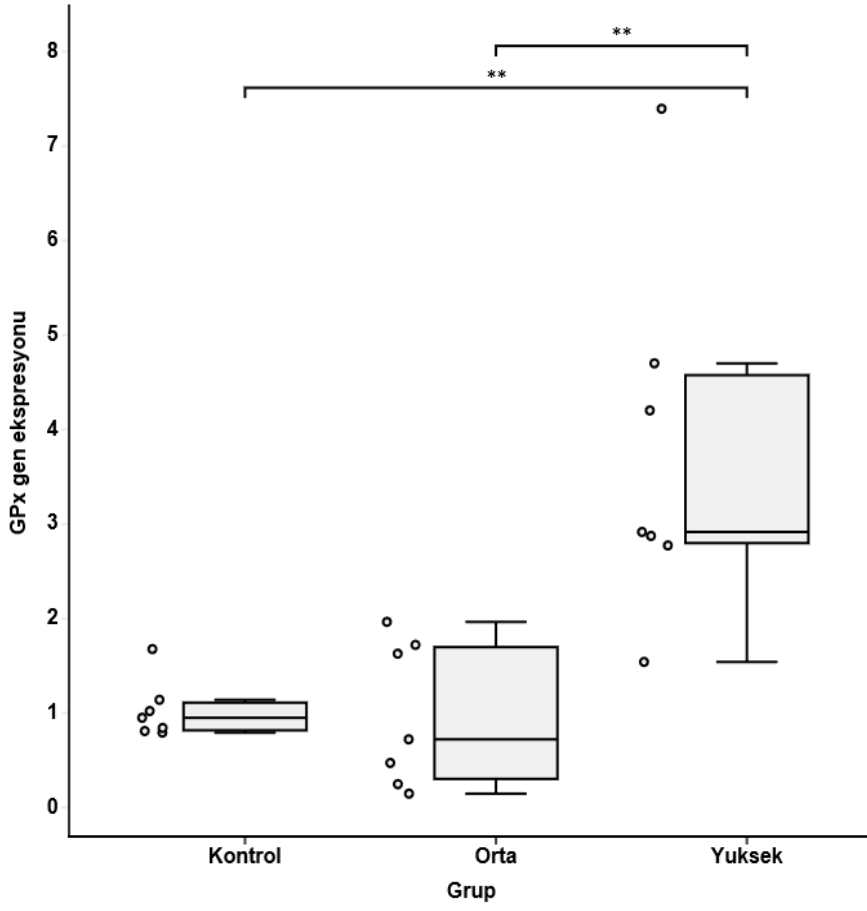
Kan dokularında belirlenen Katalaz gen ekspresyonu'na ait bulgular (Şekil 4,8) sunulmuştur. Yapmış olduğumuz çalışmada kontrol bölgesi örneklerine kıyasla kanlarında istatistik olarak anlamlı seviyede daha fazla ağır metal içeren orta grubunda KAT gen ekspresyonu  $1.63 \pm 0.50$  katlık bir artış saptanmış oluşan bu fark istatistik olarak önemli bulunmamıştır. Kanlarında yüksek miktarda ağır metal içeren yüksek grubunda ise KAT ekspresyonu kontrole kıyasla  $4.15 \pm 0.26$  katlık bir artış göstermiş oluşan bu fark istatistik olarak anlamlı bulunmuştur. ( $F_{CAT}=20.862$ ;  $sd:2;20$ ;  $P=0.0001$ )



**Şekil 4 9** Kontrol grubuna göre Orta ve Yüksek grup GS gen ekspresyonu

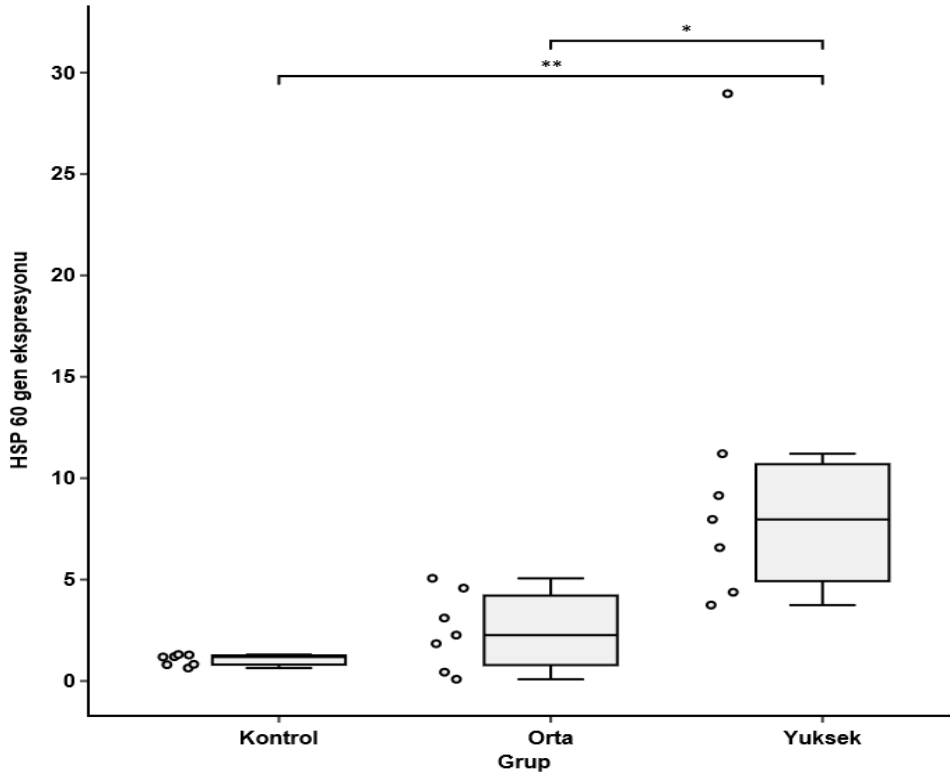
GS gen ekspresyonu'na ait bulgular (Şekil 4.9) sunulmuştur. Yapmış olduğumuz çalışmada kontrol bölgesi örneklerine kıyasla kanlarında istatistik olarak anlamlı seviyede daha fazla ağır metal içeren orta grubunda GS gen ekspresyonu  $6.79 \pm 0.59$  katlık bir artış saptanmış oluşan bu fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ( $P < 0.05$ ). Kanlarında yüksek miktarda ağır metal içeren yüksek grubunda ise GS ekspresyonu kontrole kıyasla  $4.15 \pm 0.26$  katlık bir artış göstermiş oluşan bu fark istatistik olarak anlamlı bulunmuştur ( $P < 0.05$ ).





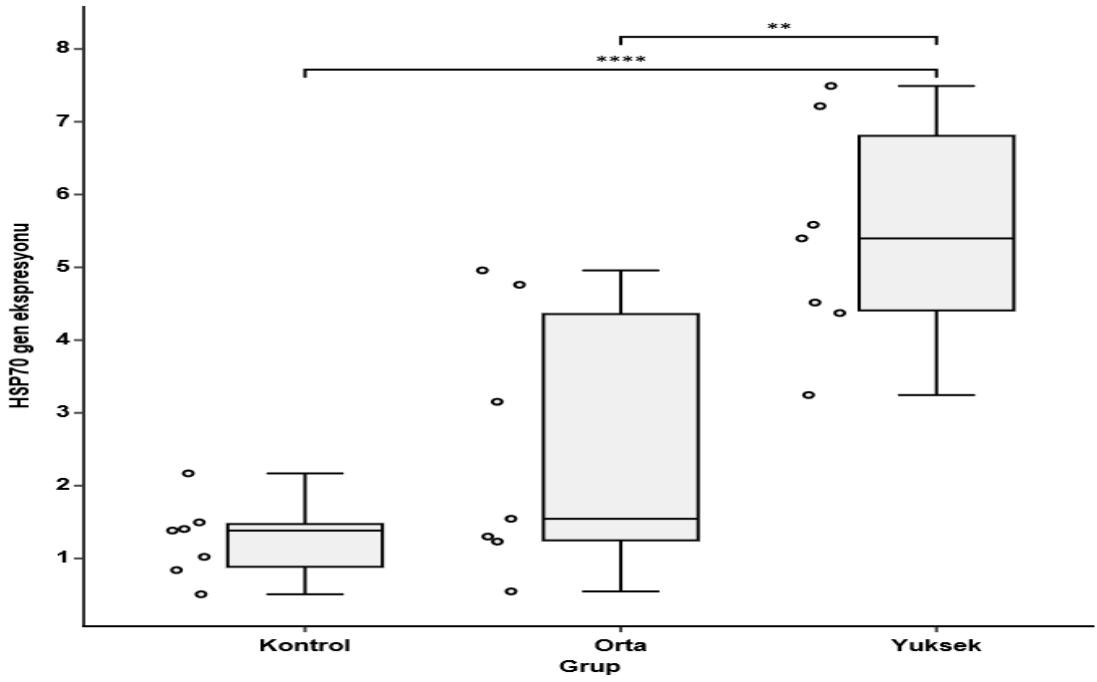
**Şekil 4 10** Kontrol grubuna göre Orta ve Yüksek grup GPx gen ekspresyonu

GPX gen ekspresyonu'na ait bulgular (Şekil 4.10) sunulmuştur. Yapmış olduğumuz çalışmada kontrol bölgesi örneklerine kıyasla kanlarında istatistik olarak anlamlı seviyede daha fazla ağır metal içeren orta grubunda GPX gen ekspresyonu 1.05 katlık bir azalma saptanmış olsada gruplar arasında anlamlı bir fark belirlenememiştir ( $P>0.05$ ). Kanlarında yüksek miktarda ağır metal içeren yüksek grubunda ise GPX ekspresyonu kontrole kıyasla 3.6 katlık bir artış göstermiş oluşan bu fark istatistik olarak anlamlı bulunmuştur ( $P<0.05$ ). GPx ekspresyonu yüksek grubunda orta grubuna kıyasla anlamlı bir artış gerçekleşmiştir ( $P<0.05$ ).



**Şekil 4 11** Kontrol grubuna göre Orta ve Yüksek grup HSP60 gen ekspresyonu

HSP60 gen ekspresyonu'na ait bulgular (Şekil 4.11) sunulmuştur. Yapmış olduğumuz çalışmada kontrol bölgesi örneklerine kıyasla kanlarında istatistik olarak anlamlı seviyede daha fazla ağır metal içeren orta grubunda HSP60 gen ekspresyonu 2.4 katlık bir artış saptanmış olsada gruplar arasında anlamlı bir fark belirlenememiştir ( $P>0.05$ ). Kanlarında yüksek miktarda ağır metal içeren yüksek grubunda ise HSP60 ekspresyonu kontrole kıyasla 9,9 katlık bir artış göstermiş oluşan bu fark istatistik olarak anlamlı bulunmuştur ( $P<0.05$ ). HSP60 ekspresyonu yüksek grubunda orta grubuna kıyasla anlamlı bir artış gerçekleşmiştir ( $P<0.05$ ).



**Şekil 4 12** Kontrol grubuna göre Orta ve Yüksek grup HSP70 gen ekspresyonu

HSP70 gen ekspresyonu'na ait bulgular (Şekil 4.12) sunulmuştur. Yapmış olduğumuz çalışmada kontrol bölgesi örneklerine kıyasla kanlarında istatistik olarak anlamlı seviyede daha fazla ağır metal içeren orta grubunda HSP70 gen ekspresyonu 1.9 katlık bir artış saptanmış olsada gruplar arasında anlamlı bir fark belirlenememiştir ( $P>0.05$ ). Kanlarında yüksek miktarda ağır metal içeren yüksek grubunda ise HSP70 ekspresyonu kontrole kıyasla 4.2 katlık bir artış göstermiş oluşan bu fark istatistik olarak anlamlı bulunmuştur ( $P<0.05$ ). HSP70 ekspresyonu yüksek grubunda orta grubuna kıyasla anlamlı bir artış gerçekleşmiştir ( $P<0.05$ ).

## BÖLÜM 5

### TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Tez kapsamında, Edirne ilinde Holstein-Fresian Ruminant Hayvanlarda Rasyondan Kaynaklı Ağır Metal Stresinin Kan Dokusunda Genotoksik Etkileri araştırılmıştır. Rasyon şu an için hayvan yetiştiriciliğinde, oldukça büyük bütçeler harcanarak oluşturulan çalışmalar, bunun yanında güncel bilimsel verilerin, hayvanların fiyolojik özellikleri ile birleştirilerek oluşturulan özel bir besleme ürünüdür. Ancak yapılan onca çalışmaya rağmen, rasyon önemli ölçüde doğada yetişen yem bitkisi ürünlerine bağımlıdır. Bu sebeple günümüzde insanlığı tehdit eden en büyük sağlık problemi olan çevre kirliliğinden önemli düzeyde etkilenmektedir.

Çevre kirliliği toprak, hava, su temel bileşenleri, sonrasında birincil etkilenen grup yem bitkileri, bir sonraki aşama, bu bitkilerle beslenen birincil tüketiciler (çalışma konumuz olan omurgalı ve omurgasız hayvanlar) son olarak son tüketici eksen ekseninde incelenmesi gereken bir konudur. Bu sebeple tez kapsamında ağır metal döngüsünün bu 3 kaynağında vurgu yapılmıştır.

Tarımsal üretimde birim alandan daha fazla ürün alma gereksinimi sebebiyle kullanılan tarım ilaçları ve kimyasal gübreler, kullanıcılarına sunduğu ekonomik faydanın yanı sıra biyolojik çeşitlilik üzerinde yıkıcı bir etkiye sebep (Isenring, 2010). Ekosistem oldukça istikrarlı bir yapıdır ve milyonlarca yıl içinde türlerin karşılıklı etkileşimi şeklinde kurulmuş doğadaki en güçlü dengelerden biridir (Tilman, 2000; Tilman, Cassman, Matson, Naylor, & Polasky, 2002). Ekosistem içinde her bir ekolojik niş ve bu nişteki popülasyonların besi, gıda ve barınma gibi olaylar için önemli görevleri bulunmaktadır (Cardinale vd., 2006). Bu nedenle ekosistemin en uzun sürede oluşabilen ve en çok canlılık barındıran etmeni olan toprakta, tarımsal kirlenici kaynaklı

olarak biyoçeşitliliğin bozulması, sonraki aşamada doğrudan ikincil ve son tüketicileri tehdit edecek hale gelecektir (Xie vd., 2016). Çin’de yapılan çalışmada yüksek düzeyde Zn, Cd ve Pb içeren topraklarda tarımsal alanlarda bu biyoçeşitliliğin kullanılan tarımsal kimyasallardan kaynaklı olarak hızla azaldığını bildirilmiştir, Nitekim tarım alanları ile tarım yapılmayan alanların karşılaştırıldığı bir çalışmada mikrobiyal çeşitliliğin en önemli göstergelerinden biri olan Shannon çeşitlilik indeksi, çayır alanlarda buğday tarımı yapılan alanlara kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Kennedy & Smith, 1995). Çin’de yapılan bir başka çalışmada yüksek düzeyde Zn, Cd ve Pb içeren topraklarda belirlenen Shannon çeşitlilik indeksinin kontrol bölgesi örneklerine kıyasla istatistik olarak anlamlı seviyede düşük olduğu belirlenmiştir (Xie vd., 2016). Çalışma bölgemiz olan Edirne bölgesinde yapılan bir çalışmada İpsala bölgesi örnekleri, kirliliğin çok az olduğu Dereköy ve İğne Ada örnekleri ile karşılaştırılmış, tarımsal alanlarda pestisit ve toksik metal kalıntılarının istatistiksel anlamda önemli olarak yüksek olduğu ve kirliliğin mikrobiyal çeşitliliğin azalmasına etki ettiği belirlenmiştir. Aynı çalışmada toprakta belirlenen Li, Cr, Ni, Pb miktarları ile toprak mikrobiyal çeşitliliği arasında negatif bir korelasyon olduğunu rapor etmişlerdir (Doğanlar vd., 2018).

Bir bölgede yaşayan bitki türlerinin tarım amaçlı yapılan uygulamalar sırasında kullanılan sentetik maddelere maruziyeti, doğrudan veya hava, su, toprak kalıntıları ile dolaylı yoldan olmaktadır. Tez kapsamında Edirne bölgesinde yapılan rasyonlarda tüm element içerikleri analiz ettirilmiştir. Analiz edilen rasyonların hemen tümünde düşük ya da yüksek düzeyde bir ağır metal kalıntısı belirlenmiştir. Tez çalışmalarının yapıldığı bölgede yapılan çalışmada araştırmacılar bölgede ağır metal kirliliğini *Centeura solstitialis*, *Raphanus* sp. ve *Populus* sp. Bitkilerini kullanarak monitörize etmişlerdir. Araştırmacılar bölgede yaptıkları örneklemede en fazla Mn, As, Co ve Cd birikiminin kavak bitkisinde, Al, Cr ve Pb düzeylerinin ise *C. solstitialis* bitkisinde diğer bitkilerden yüksek olduğu belirlemiştir. Aynı çalışmada bitkilerde oluşan bu toksik kirliliğinin, bitkide güçlü bir oksidatif stres ve bu stresten kaynaklanan önemli düzeyde bir DNA hasarı oluşturduğu bulunmuştur. Aynı zamanda bitkide stres bağımlı proteinlerin arttığı görülmüştür (Doğanlar vd., 2018). Nitekim tarımsal kirlleticilerin bitkilerde oksidatif strese bağımlı lipidlerin peroksidasyonuna ve antioksidan enzimlerin ekspresyonlarına neden olduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir (Baycu, Tolunay, Özden, & Günebakan,

2006; Doganlar, 2012; Doganlar, Cakmak, & Yanik, 2012; Doğanlar & Atmaca, 2011; Faheed, 2012; Fayez, 2000; Kielak, Sempruch, Mioduszevska, Klocek, & Leszczyński, 2011; Song, Le Yin, Chen, & Yang, 2007). Ağır metallerin bitkiye geçiş yollarının topraktan kökler vasıtasıyla, bunun haricinde hava ve yağmur suyu yoluyla foliar olduğu (Onder & Dursun, 2006), bitkinin ağır metal maruziyetinin yaprak yapısına, hiperkümülatör özelliklerine, bunun haricinde kök ve gövde morfolojilerine bağlı olduğu (Mulgrew & Williams, 2000), birçok bitkinin birçok canlı organizmaya göre kök, gövde ve yaprak özellikleri ile toprak, hava ve su kirliliğinin takip edilmesinde kullanılabilmesi (Aksoy & Öztürk, 1997; Celik, Kartal, Akdoğan, & Kaska, 2005; Tomašević, Vukmirović, Rajšić, Tasić, & Stevanović, 2005), önceki araştırmalarda gösterilmiştir. Tezin konusunu oluşturan yem bitkileri ise özellikle güçlü kök ve geniş yaprak yüzeyine sahip bitkilerden oluşmaktadır. Bunun yanında arpa, yulaf gibi bitkiler ise yüksek ağır metal dayanıklılığı gösteren bu sebeple yüksek düzeyde metal biriktirebilen bitkilerdir. Bu kapsamda rasyonlarda oluşan kirliliğin, çalışma bölgesi incelendiğinde toprak, su ve hava kaynaklı olduğu ve özellikle bölgede yapılan tarımsal faaliyetlerin buna sebep olduğu düşünülmektedir.

Tez kapsamında ekosistemde ikincil tüketici olan Holstein-Fresian Ruminant Hayvanlarda metal birikimlerinin bölgelere göre farklılık gösterdiği, genellikle en fazla birikimin tarımsal faaliyetlerin yoğun olarak yapıldığı alanlarda olduğu gözlemlenmiştir. Tez çalışmasında kan örnekleme yapılan hayvanlarda ağır metal miktarları birlikte analiz edilmiş ve kanda taşıdığı ağır metal miktarlarına göre hayvanlar 3 farklı gruba ayrılmıştır. Düşük-orta ve yüksek düzey olarak belirlenen bu hayvanlar, diğer çalışmalarda toksik düzey olarak gösterilen ağır metal birikimleri kullanılarak gruplanmışlardır. Tarımsal faaliyet ya da antropojenik etkiler ile kirlenmiş sahalarda omurgalı ve omurgasız hayvan türlerinde belirlenen ağır metal miktarları ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda tarımsal kirlilik yoğun alanlardan örneklenen omurgasız canlılarda yüksek düzeyde bir pestisit ve ağır metal birikimlerinin olduğu bildirilmiştir (Chauzat vd., 2011; Heliövaara & Väisänen, 1990; Nummelin, Lodenius, Tulisalo, Hirvonen, & Alanko, 2007; H. Sun, Zhou, Tang, Shu, & Zhang, 2008; Wan, Liu, Tang, & Cheng, 2014). Benzer şekilde Şeker kamışı tarımı yapılan bölgelere yakın alandan seçilmiş 13 örnekleme noktasında yaşayan canlılarda Al, Cd, Cr, Cu, Zn, Fe ve Mn içeriklerinin tümünün kontrol bölgesine kıyasla daha

yüksek olduğu rapor edilmiştir (Corbi, Froehlich, Trivinho-Strixino, & Dos Santos, 2011). Yine özellikle kirli alanlardan örneklenen *Chorthippus brunneus* dişi bireylerinin ovaryumlarında yüksek Zn içeriğinin saptanmıştır (Augustyniak & Migula, 2000). Bizim çalışmamızda da literatür verilerini doğrular şekilde tüm rasyonlarda bir ağır metal birikimi belirlendiği görülmektedir. Çalışmamızda Edirne bölgesinden örneklenen ruminantların kanlarında belirlenen ağır metal kalıntı miktarlarının tüm örnekleme dönemlerinde kontrol bölgesi bireylerine toksik metallere As, Cd, Pb, Mn, Ni, Cr ve Zn miktarları bölgelere bağlı olarak toksik seviyeye ulaşmıştır. Tarımsal faaliyetlerin yoğun olduğu alanlarda yaşayan yüksek yapılı omurgalılarda tarımsal faaliyetlerden kaynaklanan kirleticilerin çeşitli doku ve organlarda biriktiği bilinmektedir (Deziel vd., 2015; Lozano-Paniagua vd., 2016; Vodela, Renden, Lenz, McElhenney, & Kempainen, 1997; Wongsasuluk, Chotpantararat, Siriwong, & Robson, 2014). Tarımsal alanlarda kimyasal gübreler ve tarım ilaçları ağır metal kirliliğinin en önemli sebeplerinden birisidir (Rattan, Datta, Chhonkar, Suribabu, & Singh, 2005; Vodela vd., 1997). Bununla birlikte toprakta var olan ağır metallerin çok az bir kısmı zararsız forma dönüştürebilmekte önemli bir miktarı yeraltı suları, yüzey suları ile ikincil ve üçüncül tüketicilere ulaşmaktadır. (Chotpantararat, Ong, Sutthirat, & Osathaphan, 2011; Rashed, 2010; Taboada-Castro, Diéguez-Villar, Rodríguez-Blanco, & Taboada-Castro, 2012). Malezya'da tırnak örnekleri kullanılarak yapılan çalışmada Pb ve As birikimlerinin, yapılan tarımsal faaliyetlerin yoğunluğu ile doğrudan ilişkili olduğu saptanmıştır. (Ghazali vd., 2012). Ağır metallere maruziyet genellikle akut bir toksite oluşturmaz, tez konumuzdaki ruminantlar gibi omurgalılarda uzun süre içinde kronik düzeyde yavaş yavaş birikir ve hem önemli bir oksidatif stres, hem genotoksite kaynağı olarak işlev görür ancak çoğunlukla bu durum farkedilebilir değildir (Lebailly vd., 2015). Ancak bu durum hayvan sağlığı ve ekonomik açıdan hayvan verimliliği açısından son derece önemlidir. Bu kapsamda tez ile bu konunun araştırılması yapılmıştır. Çalışmamızda Edirne bölgesinden toplanan ruminantlarda önemli düzeyde bir genotoksite olduğu görülmüştür. Yapılan GTS analizinde ağır metal birikimleri kullanılarak yapılan düşük orta ve yüksek gruplarda, düşük gruplara kıyasla istatistik olarak anlamlı seviyede düşmüş %GST seviyeleri bu durumu açıkça göstermiştir. Bunun haricinde düşük metal birikimi taşıyan ruminantlara kıyasla orta ve yüksek gruplarında antioksidan enzim ve ısışok proteinlerinde istatistik olarak anlamlı farklar bulunmuştur. Özellikle yüksek

metal biriken gruplarda güçlü bir oksidatif stres ve hatalı katlanan protein cevabı ortaya konmuştur. Arsenik ve Cd, özellikle oksidatif stresi etkileyen birçok fizyolojik ve metabolik yolda bozulmalara neden olur. Ayrıca, güçlü DNA hasar kapasitesine sahip olduklarından hücre dokularının ve organlarının çoğunda hasara neden olurlar. Çalışmalarda Nikelin, T hücre sistemini etkileyerek bağışıklığı bozduğu, sıçanlar ve farelerde doğal öldürücü hücrelerin aktivitesini azalttığını göstermiştir(Condevaux, Guichard, Forichon, Aujoulat, & Descotes, 2001). Nikel kaynaklı serbest radikal üretiminin, lipid peroksidasyonunu teşvik ederek hücre hasarını arttırdığı da gösterilmiştir(Chen, Wang, Lin, & Yen, 2003). Nikel uygulamasının ardından glutatyon Stransferaz (GST) ve glutatyon redüktaz (GR) enzimlerinin aktivitelerindeki değişiklikler de bildirilmiştir(Athar, Hasan, & Srivastava, 1987) Ratlarda Nikel uygulandıktan sonra kan plazmasındaki bu enzimlerin artan seviyeleri, nikelin hücre zarı üzerindeki tahribatını göstererek, hücre zarı geçirgenliğinin artmasına ve hücre içi enzimlerin sızıntısının artmasına neden olmaktadır. (Misra, Rodriguez, & Kasprzak, 1990) Nikel, hücrelerde oldukça düşük, ancak ölçülebilir serbest radikal seviyeleri üretir (Bal & Kasprzak, 2002). Floresan yöntemleri, hem çözünür  $NiCl_2$  hem de çözünmeyen  $Ni_3S_2$ 'nin serbest radikal oluşumunu uyardığını göstermiştir (Salnikow, Su, Blagosklonny, & Costa, 2000). Birçok çalışma, oksidatif streste rol oynayan glutatyon'un (GSH) tükettiğini de ortaya koymuştur(Rodriguez, Misra, North, & Kasprzak, 1991)

Yapılan çalışmalarda kadmiyuma ve kurşuna oksidatif stres tepkilerini araştırmak için, tatlı su piresi *Daphnia magna*, 48 saat boyunca Cd ve Pb'ye maruz bırakıldıktan sonra hücre içi ROS seviyesinin 24 saatte değişmediğini, 48 saatte azaldığını göstermiştir. Özellikle, GST-sigma, HSP70 ve HSP90 genlerinin ekspresyon seviyeleri Cd ve Pb'ye maruz kalan yenidoğanlarda artmıştır(Kim, Kim, Kim, Won, & Lee, 2018).Keçilerde yapılan bir çalışmada seroplazmin ve mRNA ekspresyonunun incelenmesi amacıyla 30 mg molibden ve 0.5 mg kadmiyum uygulaması yapılmış kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde mRNA ekspresyonu gerçekleşmiştir. Bununla birlikte kadmiyumun bakır metalininin eksikliğine neden olduğu, karaciğerde harabiyet meydana getirdiği ve hayvanlarda canlı ağırlıkların düştüğü bildirilmiştir(Zhuang vd., 2016). Kadmiyumun kendisi direkt olarak serbest radikal üretmez, ancak dolaylı mekanizmalar yoluyla, gen ekspresyonunda serbest radikal kaynaklı hasara neden



olabilir. Kadmiyumun, hücrel protein kinazlarının (protein kinaz C) aktivasyonuna neden olduğu, bu da transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonunun artmasına neden olduğu ve sonuç olarak hedef gen ekspresyonunun transkripsiyonel aktivasyonuna yol açtığı bildirilmiştir (Pearson & Prozialeck, 2001). Ratlarda yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda kadmiyumun apoptoza neden olduğu bildirilmiştir(Wätjen, Haase, Biagioli, & Beyersmann, 2002). Testiste kadmiyuma bağlı apoptoz gözlenirken prostatta gözlenmemiştir. Testislerde apoptoz indüksiyonu, tümör baskılayıcı gen p53'ün ekspresyonu ile ters korelasyon göstermiştir. Yapılan çalışmalarda kadmiyumun DNA onarım aktivitesini bozduğu ve toksiteye yol açtığı bildirilmiştir(McMurray & Tainer, 2003). Yine ratlarda yapılan bir çalışmada kadmiyum toksitesinin Malondialdehit(MDA) ve glutatyon preksidaz oranının anlamlı bir şekilde arttığını bildirmişlerdir(Yang vd., 2003) ve DNA tek iplikçikli hücre sayısının kırıldığını, maruz kalan gruplarda hücrel DNA hasar seviyelerinin kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olduğunu ortaya koymuştur.

Birçok çalışma, hücrelerde arsenik metabolizması sırasında serbest radikal oluşumunu doğrulamıştır (S. J. Flora, 2011). Oksidatif stres, kanserler de dahil olmak üzere arsenik bağlantılı hastalıkların gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. Reaktif oksijen türlerine (ROS) ek olarak, ayrıca reaktif azot türlerinin (RNS), arseniklere maruz kalan hücrelerde lipidlere, proteinlere ve DNA'ya oksidatif hasarla doğrudan dahil olduğu düşünülmektedir. Pek çok yeni çalışma, arsenik kaynaklı serbest radikal oluşumunun oksidatif duyarlı sinyal yollarının aktivasyonu ile hücre hasarına ve ölüme neden olabileceğine dair deneysel kanıtlar sağlamıştır (H. Shi, Shi, & Liu, 2004). İnorganik arseniklerin genotoksisitesini belirlemeye yönelik birçok rat çalışması bulunmaktadır (Nandi, Patra, & Swarup, 2006),İnsan fibroblastları, lökositler, lenfositler ve hamster embriyo hücreleri üzerinde yapılan in vitro çalışmalarda, arsenikin kromozomal sapmaları ve kardeş kromatid değişimini indüklediğini göstermiştir (Helleday, Nilsson, & Jensen, 2000). İnsan, fare ve hamster hücrelerini kullanan benzer çalışmalarda, DNA hasarı, DNA onarım geliştirme veya DNA sentezinin inhibisyonunda potansiyel bir artış olduğunu göstermiştir.

Genotoksite analizi çevresel biyolojik izleme çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Amaeze vd., 2014; Forchhammer vd., 2012; Imanikia vd.,

2016; Lebailly vd., 2015). Canlı organizma ağır metaller gibi abiyotik bir stres etmenine maruz kaldığında metabolizmanın verdiği ilk cevap reaktif oksijen türlerinin oluşumudur. Reaktif oksijen türleri dış orbitalde çift oluşturmamış elektronları bulunan enerjisi yüksek oksijenli bileşiklerdir (ROS). ROS'lar hücrede öncelikle membrana saldırır ayrıca protein ve lipid dengesini bozarak enzim ve hormon mekanizmasını doğrudan etkiler, DNA nükleotid ve proteinler gibi birçok hayati biyolojik ürüne zarar verirler. Bu zarar sonucu, nörotoksite, kario ve kardiovasküler hastalıklar, immun yanıt bozuklukları ve son olarak çeşitli kanser gelişimi oluşabilir (Economos, Ballard, Miquel, Binnard, & Philpott, 1982; Le Bourg, 2001; Ruddle, Yengoyan, Miquel, Marcuson, & Fleming, 1988). Vücut bu hasarı tamir etmek için kullandığı en önemli savunma mekanizması antioksidan savunma sinyalidir. Sitosolik bakır çinko süperoksit dismutaz (Cu-ZNSOD), mitokondrial mangan süperoksit dismutaz (Mn-SOD) Katalaz (KAT), Glutasyon ve Glutasyon Peroksidaz (GSHPx) en önemli antioksidanlardır. Cu-SOD, Zn-SOD ve Mn-SOD süperoksit anyonunun ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), hidrojen perokside ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ve oksijene dönüşümünü katalize eder, KAT SOD ile birlikte çalışır ve toksik hidrojen peroksidi ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) su ve oksijene dönüştürür (Duthie, Wahle, & James, 1989; Le Bourg, 2001).

Ağır metal stresinin özellikle mitokondrial SOD ve KAT aktivitelerinin arttığı, benzer şekilde sorumlu genlerde önemli bir ekspresyon meydana geldiği belirlenmiştir. Farklı stres koşullarında insan, bitki ve hayvanlarda antioksidan gen ekspresyonları cevapları birçok çalışma ile rapor edilmiştir (Posgai vd., 2011; Reveillaud, Niedzwiecki, Bensch, & Fleming, 1991; Staveley, Phillips, & Hilliker, 1990; J. Sun & Tower, 1999).

Isı şok genleri genel olarak moleküler şaperonlar olarak birikirler, yanlış katlanmış veya hatalı katlanan proteinlerinin tamir edilmesi tamir edilemeyen proteinlerin ise degradasyon süreçlerinde rol oynarlar. Hsp70, Hsp26 ve Hsp 83 sitoplazmik proteinlerin şaperonundan sorumludur, Hsp 60 ise hem hasarlı mitokondrial proteinlerin düzeltilmesinden hem de proapoptotik moleküllerden sorumludur. (Chang vd., 2007; Macario & de Macario, 2005; Singh vd., 2010). Özellikle Hsp 70 kimyasal bileşiklere karşı oluşan stres cevabı nedeniyle stres spesifik ısı şok proteini olarak bilinir, ve önemli bir sinyal gendir. (Feng vd., 2010; Haap, Triebskorn, & Köhler, 2008; Shukla vd., 2014). Bizim çalışmamızda artış gösteren antioksidan ailesi gen

ekspresyonlarının ve yine ısı şok protein ekspresyonlarının önceki literatür bilgilerini doğrular şekilde, ruminantların yaşadığı bölgeden aynı zamanda yemlerden kaynaklanan ve serumlarında tespit edilen ağır metallere kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Yukarıdaki bilgiler ışığında bu tez çalışması ile

- 1- Edirne bölgesinde ruminant besiciliğinde kullanılan yemlerde henüz toksik düzeyde olmasa da kayda değer bir ağır metal kontaminasyonu olduğu belirlenmiştir. Bu kontaminasyonun yapılan literatür taramasında, bölgede uzun yıllar yapılan monokültür tarımı sonucunda toprak canlılığının azalmasından kaynaklanabileceği, bu sebeple toprakta yoğun olarak biriken metallerin yem bitkilerine daha fazla miktarda geçmesinden kaynaklı olduğu değerlendirilmiştir.
- 2- Edirne bölgesinin farklı yörelerinde yetiştirilen Holstein-Fresian Ruminant Hayvanlarda farklı bölgelerden gelen hayvanların serum materyallerinde farklı düzeyde ağır metal birikimi olduğu belirlenmiştir. Oluşan bu kirliliğin yapılan istatistik analizde 3 ana gruba ayrıldığı, özellikle yüksek ağır metal taşıyan hayvanlarda ağır metal kalıntılarının risk seviyesine ulaştığı görülmüştür.
- 3- Holstein-Fresian Ruminant Hayvanlarda kronik olarak serumda tespit edilen bu ağır metallere, hayvanlarda oksidatif stres oluşturacak seviyelere geldiği, oluşan bu oksidatif stresin DNA hasarı oluşturduğu ve açık bir genotoksite ortaya koyduğu değerlendirilmiştir.
- 4- Aynı zamanda oluşan bu DNA hasarının ısışok proteinleri eksprese ettiği, bunun sebebinin DNA hasarı kaynaklı yanlış protein kodlamaları olduğu değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak tez bulgularımız, Edirne Bölgesi ruminantlarında, henüz akut bir tehlike yaratacak düzeyde bir ağır metal kirliliğinin oluşmadığını, ancak farklı bölgelerde yapılan yoğun tarımsal faaliyetler ve diğer antropojenik etkiler sebebiyle bu bölgelerde yaşayan hayvanlarda ağır metal birikiminin ve bu birikimin sebebp olduğu genotoksitenin dikkat çekici boyuta ulaştığını göstermektedir. Bu sebeple özellikle yem

bitkilerinin temiz alanlarda yetiştirilmesine dikkat edilmesi, yem analizlerinde özellikle ağır metal pestisit gibi, bölgede yüksek risk taşıyan kirleticilerinde takip edilmesinin önemli olduğu düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Adonaylo, V., & Oteiza, P. (1999). Lead intoxication: antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain. *Toxicology*, *135*(2-3), 77-85.
- Aksoy, A., & Öztürk, M. (1997). Nerium oleander L. as a biomonitor of lead and other heavy metal pollution in Mediterranean environments. *Science of the Total Environment*, *205*(2-3), 145-150.
- Ali, H., Khan, E., & Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications. *Chemosphere*, *91*(7), 869-881.
- Amaeze, N. H., Schnell, S., Sozeri, O., Otitolaju, A. A., Egonmwan, R. I., Arlt, V. M., & Bury, N. R. (2014). Cytotoxic and genotoxic responses of the RTgill-W1 fish cells in combination with the yeast oestrogen screen to determine the sediment quality of Lagos lagoon, Nigeria. *Mutagenesis*, *30*(1), 117-127.
- Athar, M., Hasan, S., & Srivastava, R. (1987). Role of glutathione metabolizing enzymes in nickel mediated induction of hepatic glutathione. *Research communications in chemical pathology and pharmacology*, *57*(3), 421-424.
- Augustyniak, M., & Migula, P. (2000). Body burden with metals and detoxifying abilities of the grasshopper—Chorthippus brunneus (Thunberg) from industrially polluted areas. In *Trace Metals in the Environment* (Vol. 4, pp. 423-454): [https://doi.org/10.1016/S0927-5215\(00\)80019-3](https://doi.org/10.1016/S0927-5215(00)80019-3)
- Aydogdu, H., Asan, A., & Otkun, M. T. (2010). Indoor and outdoor airborne bacteria in child day-care centers in Edirne City (Turkey), seasonal distribution and influence of meteorological factors. *Environmental monitoring and assessment*, *164*(1-4), 53-66.
- Bal, W., & Kasprzak, K. S. (2002). Induction of oxidative DNA damage by carcinogenic metals. *Toxicology letters*, *127*(1-3), 55-62.
- Baycu, G., Tolunay, D., Özden, H., & Günebakan, S. (2006). Ecophysiological and seasonal variations in Cd, Pb, Zn, and Ni concentrations in the leaves of urban deciduous trees in Istanbul. *Environmental pollution*, *143*(3), 545-554.
- Benson, J., Henderson, R., & Pickrell, J. (1988). Comparative in vitro cytotoxicity of nickel oxides and nickel-copper oxides to rat, mouse, and dog pulmonary alveolar macrophages. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, *24*(3), 373-383.
- Bilandžić, N., Gomerčić, M., Gomerčić, T., Sedak, M., & Đokić, M. (2011). Toxic element concentrations in tissues of bottlenose (Tursiops truncatus) and striped dolphins (Stenella coeruleoalba) from the Adriatic Sea. *Veterinarska Stanica*, *42*(2), 129-137.
- Brama, M., Politi, L., Santini, P., Migliaccio, S., & Scandurra, R. (2012). Cadmium-induced apoptosis and necrosis in human osteoblasts: role of caspases and mitogen-activated protein kinases pathways. *Journal of endocrinological investigation*, *35*(2), 198-208.
- Caglieri, A., Goldoni, M., Acampa, O., Andreoli, R., Vettori, M. V., Corradi, M., Mutti, A. (2005). The effect of inhaled chromium on different exhaled breath

- condensate biomarkers among chrome-plating workers. *Environmental Health Perspectives*, 114(4), 542-546.
- Cardinale, B. J., Srivastava, D. S., Duffy, J. E., Wright, J. P., Downing, A. L., Sankaran, M., & Jouseau, C. (2006). Effects of biodiversity on the functioning of trophic groups and ecosystems. *nature*, 443(7114), 989.
- Castaner, A., Roig, E., Serra, A., De Flores, T., Magrina, J., Azqueta, M., . . . Betriu, A. (1990). Risk stratification and prognosis of patients with recent onset angina. *European heart journal*, 11(10), 868-875.
- Celik, A., Kartal, A. A., Akdoğan, A., & Kaska, Y. (2005). Determining the heavy metal pollution in Denizli (Turkey) by using Robinio pseudo-acacia L. *Environment international*, 31(1), 105-112.
- Chandel, M., & Jain, G. C. (2014). Toxic effects of transition metals on male reproductive system: A review. *Journal of Environmental and Occupational Science*, 3(4), 204-213.
- Chang, T.-C., Wentzel, E. A., Kent, O. A., Ramachandran, K., Mullendore, M., Lee, K. H., Lowenstein, C. J. (2007). Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Molecular cell*, 26(5), 745-752.
- Chauzat, M. P., Martel, A. C., Cougoule, N., Porta, P., Lachaize, J., Zeggane, S., . . . Faucon, J. P. (2011). An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to monitor pesticide presence in continental France. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(1), 103-111.
- Chen, C.-Y., Wang, Y.-F., Lin, Y.-H., & Yen, S.-F. (2003). Nickel-induced oxidative stress and effect of antioxidants in human lymphocytes. *Archives of toxicology*, 77(3), 123-130.
- Chotpantarat, S., Ong, S. K., Sutthirat, C., & Osathaphan, K. (2011). Effect of pH on transport of Pb<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup> through lateritic soil: column experiments and transport modeling. *Journal of Environmental Sciences*, 23(4), 640-648.
- Condevaux, F., Guichard, J., Forichon, A., Aujoulat, M., & Descotes, J. (2001). Compared effects of morphine and nickel chloride on NK cell activity in vitro in rats and monkeys. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, 21(5), 431-434.
- Corbi, J. J., Froehlich, C. G., Trivinho-Strixino, S., & Dos Santos, A. (2011). Evaluating the use of predatory insects as bioindicators of metals contamination due to sugarcane cultivation in neotropical streams. *Environmental monitoring and assessment*, 177(1-4), 545-554.
- Council, N. R. (2001). *Nutrient requirements of dairy cattle*, (syf. 405) National Academies Press.
- Das, K., Das, S., & Dhundasi, S. (2008). Nickel, its adverse health effects & oxidative stress. *Indian Journal of Medical Research*, 128(4), 412.
- De Vizcaya-Ruiz, A., Barbier, O., Ruiz-Ramos, R., & Cebrian, M. E. (2009). Biomarkers of oxidative stress and damage in human populations exposed to arsenic. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674(1-2), 85-92.
- Deziel, N. C., Friesen, M. C., Hoppin, J. A., Hines, C. J., Thomas, K., & Freeman, L. E. B. (2015). A review of nonoccupational pathways for pesticide exposure in

- women living in agricultural areas. *Environmental Health Perspectives*, 123(6), 515-524.
- Ding, M., & Shi, X. (2002). Molecular mechanisms of Cr (VI)-induced carcinogenesis. In *Oxygen/Nitrogen Radicals: Cell Injury and Disease* (pp. 293-300): Springer.
- Doganlar, Z. B. (2012). Physiological and genetic responses to pesticide mixture treatment of *Veronica beccabunga*. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223(9), 6201-6212.
- Doganlar, Z. B., Cakmak, S., & Yanik, T. (2012). Metal uptake and physiological changes in *Lemna gibba* exposed to manganese and nickel. *International Journal of Biology*, 4(3), 148.
- Doğanlar, Z. B., & Atmaca, M. (2011). Influence of airborne pollution on Cd, Zn, Pb, Cu, and Al accumulation and physiological parameters of plant leaves in Antakya (Turkey). *Water, Air, & Soil Pollution*, 214(1-4), 509-523.
- Doğanlar, Z. B., Doğanlar, O., Tozkir, H., Gökalp, F. D., Doğan, A., Yamaç, F., . . . Aktaş, Ü. E. (2018). Nonoccupational Exposure of Agricultural Area Residents to Pesticides: Pesticide Accumulation and Evaluation of Genotoxicity. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 75(4), 530-544.
- Duthie, G., Wahle, K., & James, W. (1989). Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease. *Nutrition research reviews*, 2(1), 51-62.
- Economos, A., Ballard, R., Miquel, J., Binnard, R., & Philpott, D. (1982). Accelerated aging of fasted *Drosophila* Preservation of Physiological function and cellular fine structure by thiazolidine carboxylic acid (TCA). *Experimental gerontology*, 17(2), 105-114.
- <https://edirne.ailevecalisma.gov.tr/edirne/cografidurum.2014>
- Eisler, R. (2000). *Handbook of Chemical Risk Assessment: Health Hazards to Humans, Plants, and Animals, Three Volume Set*: Boca Raton: CRC press.1.Baskı
- Faheed, F. A. (2012). Comparative effects of four herbicides on physiological aspects in *Triticum sativum* L. *African Journal of Ecology*, 50(1), 29-42.
- Farid, S., & Baloch, M. K. (2012). Heavy metal ions in milk samples collected from animals feed with city effluent irrigated fodder. *Greener Journal of Physical Sciences*, 2(2), 036-043.
- Fayez, K. (2000). Action of photosynthetic diuron herbicide on cell organelles and biochemical constituents of the leaves of two soybean cultivars. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 66(2), 105-115.
- Feng, H., Wang, L., Liu, Y., He, L., Li, M., Lu, W., & Xue, C. (2010). Molecular characterization and expression of a heat shock protein gene (HSP90) from the carmine spider mite, *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval). *Journal of Insect Science*, 10(1), 112.
- Fergusson, J. E. (1990). *Heavy elements: chemistry, environmental impact and health effects*: Pergamon: Oxford
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *nature*, 408(6809), 239.
- Flora, S., Mittal, M., & Mehta, A. (2008). Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian Journal of Medical Research*, 128(4), 501.
- Flora, S. J. (2011). Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free radical biology and medicine*, 51(2), 257-281.

- Forchhammer, L., Ersson, C., Loft, S., Möller, L., Godschalk, R. W., Van Schooten, F. J., Mistry, V. (2012). Inter-laboratory variation in DNA damage using a standard comet assay protocol. *Mutagenesis*, 27(6), 665-672.
- Ghazali, A. R., Razak, A., Ezzazulianie, N., Othman, M. S., Othman, H., Ishak, I., Harun, Z. (2012). Study of heavy metal levels among farmers of Muda Agricultural Development Authority, Malaysia. *Journal of environmental and public health*. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/758349>
- Ghosh, P., Basu, A., Mahata, J., Basu, S., Sengupta, M., Das, J. K., Ray, K. (2006). Cytogenetic damage and genetic variants in the individuals susceptible to arsenic-induced cancer through drinking water. *International journal of cancer*, 118(10), 2470-2478.
- Guimaraens, D., Gonzalez, M., & Condé-Salazar, L. (1994). Systemic contact dermatitis from dental crowns. *Contact Dermatitis*, 30(2), 124-125.
- Guo, Y., Huo, X., Li, Y., Wu, K., Liu, J., Huang, J., Wang, Y. (2010). Monitoring of lead, cadmium, chromium and nickel in placenta from an e-waste recycling town in China. *Science of the total environment*, 408(16), 3113-3117.
- Haap, T., Triebkorn, R., & Köhler, H.-R. (2008). Acute effects of diclofenac and DMSO to *Daphnia magna*: immobilisation and hsp70-induction. *Chemosphere*, 73(3), 353-359.
- Han, Y.-L., Sheng, Z., Liu, G.-D., Long, L.-L., Wang, Y.-F., Yang, W.-X., & Zhu, J.-Q. (2015). Cloning, characterization and cadmium inducibility of metallothionein in the testes of the mudskipper *Boleophthalmus pectinirostris*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 119, 1-8.
- Hanif, A., Bhatti, H. N., & Hanif, M. A. (2009). Removal and recovery of Cu (II) and Zn (II) using immobilized *Mentha arvensis* distillation waste biomass. *Ecological Engineering*, 35(10), 1427-1434.  
[https://www.trakyaka.org.tr/upload/Node/35520/.../EDIRNE\\_YATIRIM\\_ORTAMI.pdf](https://www.trakyaka.org.tr/upload/Node/35520/.../EDIRNE_YATIRIM_ORTAMI.pdf). 2014.
- Heliövaara, K., & Väisänen, R. (1990). Heavy-metal contents in pupae of *Bupalus piniarius* (Lepidoptera: Geometridae) and *Panolis flammea* (Lepidoptera: Noctuidae) near an industrial source. *Environmental Entomology*, 19(3), 481-485.
- Helleday, T., Nilsson, R., & Jensen, D. (2000). Arsenic [III] and heavy metal ions induce intrachromosomal homologous recombination in the hprt gene of V79 Chinese hamster cells. *Environmental and molecular mutagenesis*, 35(2), 114-122.
- Il'yasova, D., & Schwartz, G. G. (2005). Cadmium and renal cancer. *Toxicology and applied pharmacology*, 207(2), 179-186.
- Imanikia, S., Galea, F., Nagy, E., Phillips, D. H., Stürzenbaum, S. R., & Arlt, V. M. (2016). The application of the comet assay to assess the genotoxicity of environmental pollutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 45, 356-361.
- Isenring, R. (2010). Pesticides and the loss of biodiversity. *Pesticide Action Network Europe, London*.
- Järup, L. (2002). Cadmium overload and toxicity. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 17(suppl\_2), 35-39.
- Joseph, P. (2009). Mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology and applied pharmacology*, 238(3), 272-279.



- Kamran, M. A., Eqani, S. A. M. A. S., Bibi, S., Xu, R.-k., Monis, M. F. H., Katsoyiannis, A., Chaudhary, H. J. (2016). Bioaccumulation of nickel by *E. sativa* and role of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) under nickel stress. *Ecotoxicology and environmental safety*, 126, 256-263.
- Kellen, E., Zeegers, M. P., Den Hond, E., & Buntinx, F. (2007). Blood cadmium may be associated with bladder carcinogenesis: The Belgian case-control study on bladder cancer. *Cancer detection and prevention*, 31(1), 77-82.
- Kennedy, A. C., & Smith, K. (1995). Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and soil*, 170(1), 75-86.
- Khaliq, A., Ali, S., Hameed, A., Farooq, M. A., Farid, M., Shakoor, M. B., Rizwan, M. (2016). Silicon alleviates nickel toxicity in cotton seedlings through enhancing growth, photosynthesis, and suppressing Ni uptake and oxidative stress. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 62(5), 633-647.
- Khan, M., Khan, N. A., Masood, A., Per, T. S., & Asgher, M. (2016). Hydrogen peroxide alleviates nickel-inhibited photosynthetic responses through increase in use-efficiency of nitrogen and sulfur, and glutathione production in mustard. *Frontiers in plant science*, 7, 44. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00044>
- Kielak, E., Sempruch, C., Mioduszevska, H., Klocek, J., & Leszczyński, B. (2011). Phytotoxicity of Roundup Ultra 360 SL in aquatic ecosystems: Biochemical evaluation with duckweed (*Lemna minor* L.) as a model plant. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99(3), 237-243.
- Kim, H., Kim, J.-S., Kim, P.-J., Won, E.-J., & Lee, Y.-M. (2018). Response of antioxidant enzymes to Cd and Pb exposure in water flea *Daphnia magna*: Differential metal and age—Specific patterns. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 209, 28-36.
- Klaassen, C. D., Liu, J., & Diwan, B. A. (2009). Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, 238(3), 215-220.
- Koedrith, P., & Seo, Y. R. (2011). Advances in carcinogenic metal toxicity and potential molecular markers. *International journal of molecular sciences*, 12(12), 9576-9595.
- Kumar, V., Tripathi, V., Jahan, S., Agrawal, M., Pandey, A., Khanna, V., & Pant, A. (2015). Lead intoxication synergies of the ethanol-induced toxic responses in neuronal cells—PC12. *Molecular neurobiology*, 52(3), 1504-1520.
- Lachant, N. A., Tomoda, A., & Tanaka, K. R. (1984). Inhibition of the pentose phosphate shunt by lead: a potential mechanism for hemolysis in lead poisoning. *Blood*, 63(3), 518-524.
- Lampe, B. J., Park, S. K., Robins, T., Mukherjee, B., Litonjua, A. A., Amarasiriwardena, C., . . . Hu, H. (2008). Association between 24-hour urinary cadmium and pulmonary function among community-exposed men: the VA Normative Aging Study. *Environmental Health Perspectives*, 116(9), 1226-1230.
- Lanphear, B. P., Dietrich, K., Auinger, P., & Cox, C. (2000). Cognitive deficits associated with blood lead concentrations < 10 microg/dL in US children and adolescents. *Public health reports*, 115(6), 521.
- Le Bourg, É. (2001). Oxidative stress, aging and longevity in *Drosophila melanogaster*. *FEBS letters*, 498(2-3), 183-186.
- Lebailly, P., Mirey, G., Herin, F., Lecluse, Y., Salles, B., & Boutet-Robinet, E. (2015). DNA damage in B and T lymphocytes of farmers during one pesticide spraying

- season. *International archives of occupational and environmental health*, 88(7), 963-972.
- Levina, A., Codd, R., Dillon, C. T., & Lay, P. A. (2002). Chromium in biology: toxicology and nutritional aspects. *Progress in inorganic chemistry*, 51, 145-250.
- Li, Y.-x., Xiong, X., Chun-ye, L., Feng-song, Z., Wei, L., & Wei, H. (2010). Cadmium in animal production and its potential hazard on Beijing and Fuxin farmlands. *Journal of hazardous materials*, 177(1-3), 475-480.
- Liao, X.-Y., Chen, T.-B., Xie, H., & Liu, Y.-R. (2005). Soil As contamination and its risk assessment in areas near the industrial districts of Chenzhou City, Southern China. *Environment International*, 31(6), 791-798.
- Liu, J., Qu, W., & Kadiiska, M. B. (2009). Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicology and applied pharmacology*, 238(3), 209-214.
- Lopez, E., Figueroa, S., Oset-Gasque, M., & Gonzalez, M. (2003). Apoptosis and necrosis: two distinct events induced by cadmium in cortical neurons in culture. *British journal of pharmacology*, 138(5), 901-911.
- López, M. A., Prieto, F. M., Miranda, M., Castillo, C., Hernandez, J., & Benedito, J. (2003). Cadmium and lead accumulation in cattle in NW Spain. *Veterinary and human toxicology*, 45(3), 128-130.
- Loska, K., Wiechuła, D., & Korus, I. (2004). Metal contamination of farming soils affected by industry. *Environment international*, 30(2), 159-165.
- Lozano-Paniagua, D., Gómez-Martín, A., Gil, F., Parrón, T., Alarcón, R., Requena, M., . . . Hernández, A. F. (2016). Activity and determinants of cholinesterases and paraoxonase-1 in blood of workers exposed to non-cholinesterase inhibiting pesticides. *Chemico-biological interactions*, 259, 160-167.
- Lynch, E., & Braithwaite, R. (2005). A review of the clinical and toxicological aspects of 'traditional'(herbal) medicines adulterated with heavy metals. *Expert opinion on drug safety*, 4(4), 769-778.
- Macario, A. J., & de Macario, E. C. (2005). Sick chaperones, cellular stress, and disease. *New England Journal of Medicine*, 353(14), 1489-1501.
- Marnett, L. J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *carcinogenesis*, 21(3), 361-370.
- Marwa, E. M., Meharg, A. A., & Rice, C. M. (2012). Risk assessment of potentially toxic elements in agricultural soils and maize tissues from selected districts in Tanzania. *Science of the Total Environment*, 416, 180-186.
- McMurray, C. T., & Tainer, J. A. (2003). Cancer, cadmium and genome integrity. *Nature genetics*, 34(3), 239.
- Misra, M., Rodriguez, R. E., & Kasprzak, K. S. (1990). Nickel induced lipid peroxidation in the rat: correlation with nickel effect on antioxidant defense systems. *Toxicology*, 64(1), 1-17.
- Mulgrew, A., & Williams, P. (2000). *Biomonitoring of air quality using plants*: WHO Collaborating Centre for Air Quality Management and Air Pollution Control.
- Nagajyoti, P. C., Lee, K. D., & Sreekanth, T. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental chemistry letters*, 8(3), 199-216.
- Nandi, D., Patra, R., & Swarup, D. (2006). Oxidative stress indices and plasma biochemical parameters during oral exposure to arsenic in rats. *Food and chemical toxicology*, 44(9), 1579-1584.

- Nanduri, J., Vaddi, D. R., Khan, S. A., Wang, N., Makerenko, V., & Prabhakar, N. R. (2013). Xanthine oxidase mediates hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  degradation by intermittent hypoxia. *PloS one*, 8(10), e75838.
- Nazir, H., Asghar, H. N., Zahir, Z. A., Akhtar, M. J., & Saleem, M. (2016). Judicious use of kinetin to improve growth and yield of rice in nickel contaminated soil. *International journal of phytoremediation*, 18(7), 651-655.
- Nazir, R., Khan, M., Masab, M., Rehman, H. U., Rauf, N. U., Shahab, S., . . . Rafeeq, M. (2015). Accumulation of heavy metals (Ni, Cu, Cd, Cr, Pb, Zn, Fe) in the soil, water and plants and analysis of physico-chemical parameters of soil and water collected from Tanda Dam Kohat. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(3), 89.
- Nordberg, J., & Arnér, E. S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free radical biology and medicine*, 31(11), 1287-1312.
- Nummelin, M., Lodenius, M., Tulisalo, E., Hirvonen, H., & Alanko, T. (2007). Predatory insects as bioindicators of heavy metal pollution. *Environmental Pollution*, 145(1), 339-347.
- Onder, S., & Dursun, S. (2006). Air borne heavy metal pollution of Cedrus libani (A. Rich.) in the city centre of Konya (Turkey). *Atmospheric Environment*, 40(6), 1122-1133.
- Patra, M., Bhowmik, N., Bandopadhyay, B., & Sharma, A. (2004). Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 52(3), 199-223.
- Patrick, L. (2003). Toxic metals and antioxidants: Part II. The role of antioxidants in arsenic and cadmium toxicity. *Alternative medicine review*, 8(2).
- Pearson, C., & Prozialeck, W. (2001). E-cadherin,  $\beta$ -catenin and cadmium carcinogenesis. *Medical hypotheses*, 56(5), 573-581.
- Pizent, A., Tariba, B., & Živković, T. (2012). Reproductive toxicity of metals in men. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 63(Supplement 1), 35-46.
- Posgai, R., Cipolla-McCulloch, C. B., Murphy, K. R., Hussain, S. M., Rowe, J. J., & Nielsen, M. G. (2011). Differential toxicity of silver and titanium dioxide nanoparticles on Drosophila melanogaster development, reproductive effort, and viability: size, coatings and antioxidants matter. *Chemosphere*, 85(1), 34-42.
- Prozialeck, W. C., & Edwards, J. R. (2007). Cell adhesion molecules in chemically-induced renal injury. *Pharmacology & therapeutics*, 114(1), 74-93.
- Qin, Z., Tang, Z., Wu, Z., Li, J., Cheng, G., Huang, Z., & Yang, J. (2006). Survey on the cadmium levels in foodstuffs in Guangxi of 2002~ 2003. *Stud. Trace Elements Health*. Nanning: China.
- Rahimzadeh, M. R., Rahimzadeh, M. R., Kazemi, S., & Moghadamnia, A.-a. (2017). Cadmium toxicity and treatment: An update. *Caspian journal of internal medicine*, 8(3), 135-145.
- Raikwar, M. K., Kumar, P., Singh, M., & Singh, A. (2008). Toxic effect of heavy metals in livestock health. *Veterinary world*, 1(1), 28.
- Ramírez-Díaz, M. I., Díaz-Pérez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campos-García, J., & Cervantes, C. (2008). Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals*, 21(3), 321-332.

- Rani, A., Kumar, A., Lal, A., & Pant, M. (2014). Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. *International journal of environmental health research*, 24(4), 378-399.
- Rashed, M. (2010). Monitoring of contaminated toxic and heavy metals, from mine tailings through age accumulation, in soil and some wild plants at Southeast Egypt. *Journal of hazardous materials*, 178(1-3), 739-746.
- Rattan, R., Datta, S., Chhonkar, P., Suribabu, K., & Singh, A. (2005). Long-term impact of irrigation with sewage effluents on heavy metal content in soils, crops and groundwater—a case study. *Agriculture, ecosystems & environment*, 109(3-4), 310-322.
- Rehman, M. Z.-u., Rizwan, M., Ali, S., Fatima, N., Yousaf, B., Naeem, A., Ok, Y. S. (2016). Contrasting effects of biochar, compost and farm manure on alleviation of nickel toxicity in maize (*Zea mays* L.) in relation to plant growth, photosynthesis and metal uptake. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 133, 218-225.
- Reveillaud, I., Niedzwiecki, A., Bensch, K., & Fleming, J. (1991). Expression of bovine superoxide dismutase in *Drosophila melanogaster* augments resistance of oxidative stress. *Molecular and cellular biology*, 11(2), 632-640.
- Rodriguez, R. E., Misra, M., North, S. L., & Kasprzak, K. S. (1991). Nickel-induced lipid peroxidation in the liver of different strains of mice and its relation to nickel effects on antioxidant systems. *Toxicology letters*, 57(3), 269-281.
- Rogowska, K. A., Monkiewicz, J., & Kaszyca, S. (2008). Correlations in cadmium concentrations in the body of the sheep poisoned subcutely and nourished with or without a supplement of detoxicating preparation. *Bull Vet Inst Pulawy*, 52, 135-140.
- Rosin, P. L. (2009). A simple method for detecting salient regions. *Pattern Recognition*, 42(11), 2363-2371.
- Ruddle, D., Yengoyan, L., Miquel, J., Marcuson, R., & Fleming, J. (1988). Propyl gallate delays senescence in *Drosophila melanogaster*. *Age*, 11(2), 54-58.
- Salnikow, K., Su, W., Blagosklonny, M. V., & Costa, M. (2000). Carcinogenic metals induce hypoxia-inducible factor-stimulated transcription by reactive oxygen species-independent mechanism. *Cancer research*, 60(13), 3375-3378.
- Sanders, T., Liu, Y., Buchner, V., & Tchounwou, P. B. (2009). Neurotoxic effects and biomarkers of lead exposure: a review. *Reviews on environmental health*, 24(1), 15-46.
- Saxena, G., & Flora, S. (2004). Lead-induced oxidative stress and hematological alterations and their response to combined administration of calcium disodium EDTA with a thiol chelator in rats. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 18(4), 221-233.
- Schutte, R., Nawrot, T. S., Richart, T., Thijs, L., Vanderschueren, D., Kuznetsova, T., . . . Staessen, J. A. (2008). Bone resorption and environmental exposure to cadmium in women: a population study. *Environmental Health Perspectives*, 116(6), 777-783.
- Sevcikova, M., Modra, H., Slaninova, A., & Svobodova, Z. (2011). Metals as a cause of oxidative stress in fish: a review. *Vet Med*, 56(11), 537-546.
- Shi, H., Shi, X., & Liu, K. J. (2004). Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Molecular and cellular biochemistry*, 255(1-2), 67-78.

- Shi, X. (1999). Reduction of chromium (VI) and its relationship to carcinogenesis. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews*, 2(1), 87-104.
- Shukla, A. K., Pragma, P., Chauhan, H. S., Tiwari, A. K., Patel, D. K., Abdin, M. Z., & Chowdhuri, D. K. (2014). Heat shock protein-70 (Hsp-70) suppresses paraquat-induced neurodegeneration by inhibiting JNK and caspase-3 activation in *Drosophila* model of Parkinson's disease. *PLoS One*, 9(6), e98886.
- Sies, H. (2000). What is oxidative stress? In *Oxidative stress and vascular disease* (pp. 1-8) Boston: Springer.
- Silver, M. K., Lozoff, B., & Meeker, J. D. (2013). Blood cadmium is elevated in iron deficient US children: a cross-sectional study. *Environmental Health*, 12(1), 117.
- Singh, M. P., Ram, K. R., Mishra, M., Shrivastava, M., Saxena, D., & Chowdhuri, D. K. (2010). Effects of co-exposure of benzene, toluene and xylene to *Drosophila melanogaster*: alteration in hsp70, hsp60, hsp83, hsp26, ROS generation and oxidative stress markers. *Chemosphere*, 79(5), 577-587.
- Smith, D., Hernandez-Avila, M., Téllez-Rojo, M. M., Mercado, A., & Hu, H. (2002). The relationship between lead in plasma and whole blood in women. *Environmental Health Perspectives*, 110(3), 263-268.
- Song, N. H., Le Yin, X., Chen, G. F., & Yang, H. (2007). Biological responses of wheat (*Triticum aestivum*) plants to the herbicide chlorotoluron in soils. *Chemosphere*, 68(9), 1779-1787.
- Stadtman, E. R., & Levine, R. L. (2000). Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899(1), 191-208.
- Staessen, J. A., Roels, H. A., Emelianov, D., Kuznetsova, T., Thijs, L., Vangronsveld, J., & Fagard, R. (1999). Environmental exposure to cadmium, forearm bone density, and risk of fractures: prospective population study. *The Lancet*, 353(9159), 1140-1144.
- Staveley, B. E., Phillips, J. P., & Hilliker, A. J. (1990). Phenotypic consequences of copper-zinc superoxide dismutase overexpression in *Drosophila melanogaster*. *Genome*, 33(6), 867-872.
- Stohs, S. J., Bagchi, D., Hassoun, E., & Bagchi, M. (2001). Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*. DOI: 10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.v20.i2.10
- Strojan, S., & Phillips, C. (2002). The detection and avoidance of lead-contaminated herbage by dairy cows. *Journal of dairy science*, 85(11), 3045-3053.
- Sun, H., Zhou, Q., Tang, W., Shu, Y., & Zhang, G. (2008). Effects of dietary nickel on detoxification enzyme activities in the midgut of *Spodoptera litura* Fabricius larvae. *Chinese Science Bulletin*, 53(21), 3324.
- Sun, J., & Tower, J. (1999). FLP recombinase-mediated induction of Cu/Zn-superoxide dismutase transgene expression can extend the life span of adult *Drosophila melanogaster* flies. *Molecular and cellular biology*, 19(1), 216-228.
- Swarup, D., Naresh, R., Varshney, V., Balagangatharathilagar, M., Kumar, P., Nandi, D., & Patra, R. (2007). Changes in plasma hormones profile and liver function in cows naturally exposed to lead and cadmium around different industrial areas. *Research in veterinary science*, 82(1), 16-21.

- Taboada-Castro, M., Diéguez-Villar, A., Rodríguez-Blanco, M. L., & Taboada-Castro, M. T. (2012). Agricultural impact of dissolved trace elements in runoff water from an experimental catchment with land-use changes. *Communications in soil science and plant analysis*, 43(1-2), 81-87.
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. In *Molecular, clinical and environmental toxicology* (pp. 133-164). Basel: Springer.
- Tilman, D. (2000). Causes, consequences and ethics of biodiversity. *Nature*, 405(6783), 208.
- Tilman, D., Cassman, K. G., Matson, P. A., Naylor, R., & Polasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *nature*, 418(6898), 671.
- Tomašević, M., Vukmirović, Z., Rajšić, S., Tasić, M., & Stevanović, B. (2005). Characterization of trace metal particles deposited on some deciduous tree leaves in an urban area. *Chemosphere*, 61(6), 753-760.
- Tufan, M. (2008). *Tekirdağ ilinde üretilen yem hammaddelerinin ağır metal düzeylerinin belirlenmesi*. Namık Kemal Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Türkdoğan, M. K., Kilicel, F., Kara, K., Tuncer, I., & Uygan, I. (2003). Heavy metals in soil, vegetables and fruits in the endemic upper gastrointestinal cancer region of Turkey. *Environmental toxicology and pharmacology*, 13(3), 175-179.
- US Department of Health and Human Services. (2002). Agency for Toxic Substances and Disease Registry: Atlanta. GA, USA, 1-291.
- Uysal, M. (1998). Serbest radikaller, lipid peroksidleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengesi etkileyen koşullar. *Klinik gelisim*, 11(1-2), 336-341.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., & Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and cellular biochemistry*, 266(1-2), 37-56.
- Vodela, J., Renden, J., Lenz, S., McElhenney, W., & Kemppainen, B. (1997). Drinking water contaminants (arsenic, cadmium, lead, benzene, and trichloroethylene). 1. Interaction of contaminants with nutritional status on general performance and immune function in broiler chickens. *Poultry Science*, 76(11), 1474-1492.
- Vyskočil, A., Senft, V., Viau, C., Cížková, M., & Kohout, J. (1994). Biochemical renal changes in workers exposed to soluble nickel compounds. *Human & experimental toxicology*, 13(4), 257-261.
- Waalkes, M. P. (2003). Cadmium carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 533(1-2), 107-120.
- Waisberg, M., Black, W., Chan, D., & Hale, B. (2005). The effect of pharmacologically altered gastric pH on cadmium absorption from the diet and its accumulation in murine tissues. *Food and chemical toxicology*, 43(5), 775-782.
- Wan, T.-l., Liu, S., Tang, Q.-y., & Cheng, J.-a. (2014). Heavy metal bioaccumulation and mobility from rice plants to *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) in China. *Environmental entomology*, 43(3), 654-661.
- Wang, C., Ma, W., & Su, Y. (2013). NF-κB pathway contributes to cadmium-induced apoptosis of porcine granulosa cells. *Biological trace element research*, 153(1-3), 403-410.
- Wang, Y., Wang, J., Chai, G., Li, C., Hu, Y., Chen, X., & Wang, Z. (2015). Developmental changes in composition and morphology of cuticular waxes on

- leaves and spikes of glossy and glaucous wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLoS One*, 10(10), e0141239.
- Wätjen, W., Haase, H., Biagioli, M., & Beyersmann, D. (2002). Induction of apoptosis in mammalian cells by cadmium and zinc. *Environmental Health Perspectives*, 110(suppl 5), 865-867.
- Wehner, A. P. (1986). Biological effects and fate of inhaled man-made and natural aerosols in animal models. *Journal of Aerosol Science*, 17(3), 305-315.
- Wongsasuluk, P., Chotpantarat, S., Siriwong, W., & Robson, M. (2014). Heavy metal contamination and human health risk assessment in drinking water from shallow groundwater wells in an agricultural area in Ubon Ratchathani province, Thailand. *Environmental geochemistry and health*, 36(1), 169-182.
- Xie, Y., Fan, J., Zhu, W., Amombo, E., Lou, Y., Chen, L., & Fu, J. (2016). Effect of heavy metals pollution on soil microbial diversity and bermudagrass genetic variation. *Frontiers in plant science*, 7, 755.
- Xu, Y.-y., Zeng, Q.-b., Yao, M.-l., Yu, C., Li, J., & Zhang, A.-h. (2016). A possible new mechanism and drug intervention for kidney damage due to arsenic poisoning in rats. *Toxicology research*, 5(2), 511-518.
- Yalçın, A. (1992). Serbest radikaller ve patolojik etkileri. *Marmara Üniversitesi/Tıp Fak. Biyokimya ABD Sendrom*, 40.
- Yang, J.-M., Arnush, M., Chen, Q.-Y., Wu, X.-D., Pang, B., & Jiang, X.-Z. (2003). Cadmium-induced damage to primary cultures of rat Leydig cells. *Reproductive toxicology*, 17(5), 553-560.
- YLÄ-HERTTUALA, S. (1999). Oxidized LDL and Atherogenesis a. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 874(1), 134-137.
- Yolal, M. (2014). *Ergene Nehri çevresinde ve Trakya'da yaşayan ürotelyal tümörlü olguların tümörlü ve normal epitelinde, kanda ağır metallerin incelenmesi ve nehir kirliliği ile ilişkisinin araştırılması*. [dSPACE.trakya.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/1/1765/0126466.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://dSPACE.trakya.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/1/1765/0126466.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Zafar, M. N., Aslam, I., Nadeem, R., Munir, S., Rana, U. A., & Khan, S. U.-D. (2015). Characterization of chemically modified biosorbents from rice bran for biosorption of Ni (II). *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 46, 82-88.
- Zengin, F. K., & Munzuroglu, O. (2005). Effects of some heavy metals on content of chlorophyll, proline and some antioxidant chemicals in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 47(2), 157-164.
- Zhuang, Y., Liu, P., Zhang, C., Ye, S., Hu, G., & Cao, H. (2016). Effect of cadmium on the concentration of ceruloplasmin and its mRNA expression in goats under molybdenum stress. *Pak Vet J*, 36(2), 209-213.

## ÖZGEÇMİŞ

Erzurum ilinin Karaçoban ilçesinde 1976 yılında doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Erzurumda, tamamladım. 1996 yılında Akdeniz Üniversitesi Endüstriyel Elektronik Bölümünü kazandım. 2006'da Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü'nden mezun oldum. Özel bir firmada Teknik Müdür olarak çalışmaktayım. 2015'de Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimime başladım ve devam etmekteyim. Evli ve bir çocuk babasıyım.