

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AĞIR METAL MİKS UYGULANAN VASKÜLER DÜZ KAS HÜCRELERİNDE
ANTIÖKSİDAN SİSTEM VE APOPTOZ YOLAĞI ARASINDAKİ
MOLEKÜLER ETKİLEŞİMLER**

EMRAH YAVUZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: DOÇ. DR. ZEYNEP BANU DOĞANLAR

EDİRNE-2018

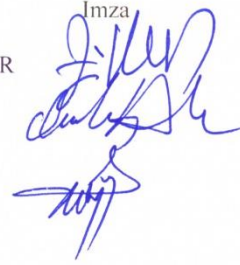
Emrah YAVUZ'un hazırladığı "Ağır Metal Miks Uygulanan Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Antioksidan Sistem ve Apoptoz Yolağı Arasındaki Moleküler Etkileşimler" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliğı açısından Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında bir Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri:

Doç. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR

Dr. Öğr. Üys. Orhan Onur AŞKIN

Dr. Öğr. Üys. Süleyman KÖK

İmza


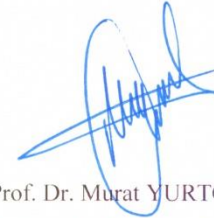
Tez Savunma Tarihi: 19/03/2018

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylıyorum.

Doç. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR
Tez Danışmanı

İmza


Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

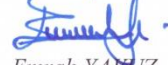


Prof. Dr. Murat YURTCAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

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 edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

19/03/2018


Emrah YAVUZ

Yüksek Lisans Tezi

Ağır Metal Miks Uygulanan Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Antioksidan Sistem ve Apoptoz Yolağı Arasındaki Moleküler Etkileşimler

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

Ağır metaller en yaygın kirletici maddeler olup, özgül ağırlıkları 5 g cm^{-3} den fazla olan maddelerdir. İnsanların ağır metallere maruziyeti en fazla ağır metal içeren yiyecek ve suların tüketimi ile olmaktadır. İçme suyu ile alınan metaller vücutta genotoksisite ve çeşitli hastalıklara neden olabilmektedir. Bu nedenle insani tüketim amaçlı kullanılan sularda izin verilen ağır metal limitleri yasa ve yönetmeliklerle belirlenmiştir.

Çalışmamızda insan sağlıklı aorta düz kas hücrelerinde (TG-HA-VSMC) içme sularında izin verilen limitlerde metal karışımı (Cu, Zn, Pb ve Fe) uygulamalarının etkilerinin moleküler düzeyde belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla hücrelere içme sularında izin verilen konsantrasyon ve 10 kat yüksek konsantrasyonda metal karışımı 24 ve 48 saat süre ile uygulandı ve antioksidan enzimler, ısı şok proteinleri ve apoptoz yolak genlerinin ifadeleri ile DNA polimorfizmi belirlendi.

Çalışma sonucunda ağır metal karışımına maruz kalan hücrelerde DNA polimorfizminin arttığı, antioksidan enzim gen ifadelerinin ve apoptotik hücre oranı ile birlikte apoptoz yolak genlerinin ifadelerinde artışın olduğu saptandı.

Sonuç olarak, içme sularında izin verilen limitlerde ağır metal karışımının aorta düz kas hücrelerinde oksidatif stres, genotoksisite ve apoptoza neden olduğu belirlendi. Vasküler düz kas hücrelerinde apoptozun arteroskleroz, hipertansiyon gibi hastalıkların patofizyolojisinde rol oynadığı göz önünde bulundurulduğunda bu limitlerin daha kapsamlı çalışmalarda araştırılarak değerlendirilmesi gerektiği düşünüldü.

Yıl : 2018

Sayfa Sayısı : 82

Anahtar Kelimeler : Demir, Bakır, Kadmiyum, Kurşun, Apoptoz, Genotoksisite

Master's Thesis

Molecular Interactions between Antioxidant System and Mitochondrial Apoptosis

Pathway in Heavy Metal Mix Exposed Vascular Smooth Muscle Cells

Trakya University Institute of Natural Sciences

Department of Biotechnology and Genetic

ABSTRACT

Heavy metals are the most common pollutants with specific gravity greater than 5 g cm⁻³. Exposure of people to heavy metals is mostly caused by the consumption of food and water containing heavy metals. Metals taken with drinking water can cause genotoxicity and various diseases in the body. For this reason, the permissible heavy metal limits in water used for human consumption have been determined by laws and regulations.

In our study, it was aimed to determine the effects of metal mixture (Cu, Zn, Pb and Fe) application at the limits allowed in drinking water of human healthy aorta smooth muscle cells (TG-HA-VSMC) at the molecular level. For this purpose, the mixture of metal in the drinking water and the ten fold higher concentration in the drinking water was applied for 24 and 48 hours and DNA polymorphism was detected with the expressions of antioxidant enzymes, heat shock proteins and apoptosis pathway genes.

At the end of the research it was stated that the expression of DNA polymorphism, antioxidant enzyme gene expression and apoptotic cell ratio as well as apoptosis pathway genes were increased in cells exposed to heavy metal mixture.

As a result, it was determined that heavy metal mixture caused oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in aorta smooth muscle cells at the limits allowed in drinking water. Considering that it played a role in the pathophysiology of diseases such as apoptosis atherosclerosis and hypertension in vascular smooth muscle cells, it was

thought that these limits should be investigated and evaluated in more comprehensive studies.

Year : 2018

Number of page : 82

Keywords : Iron, Copper, Cadmium, Lead, Apoptosis, Genotoxicity

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince hiçbir zaman bilgi ve desteklerini esirgemeyen, tezimin her aşamasında yardımcı olan çok değerli hocam Doç. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR başta olmak üzere, değerli hocam Prof. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR'a, 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,

Yüksek lisans eğitimim süresince bana destek verip anlayış gösteren Uzunköprü Kaymakamı Sayın Kemal YILDIZ başta olmak üzere, vakıf müdürümüz Fatih ERKOL'a

Her zaman yanımda olup, beni maddi ve manevi destekleyen anneme, babama ve eşim Pınar YAVUZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Emrah YAVUZ

Edirne, Mart 2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER.....	ix
KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
BÖLÜM 1: GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2: GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türleri (ROT)	6
2.1.1. Serbest Radikaller	7
2.1.1.1. Tekil Oksijen.....	8
2.1.1.2. Süperoksit Radikali	9
2.1.1.3. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)	9
2.1.1.4. Hidroksil Radikal (OH [•])	10
2.2. Antioksidan Sistem	12
2.2.1.Enzimatik Antioksidanlar	14
2.2.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD).....	14
2.2.1.2. Katalaz (KAT).....	15
2.2.1.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px).....	15
2.2.1.4. Glutatyon Redüktaz (GSH-Rd).....	16
2.2.1.5. Glutatyon S-Transferaz (GST).....	17
2.2.1.6. Glutatyon Sentaz	18
2.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar.....	18
2.2.2.1. Glutatyon (GSH).....	18

2.2.2.2. E Vitamini	18
2.2.2.3. C Vitamini	19
2.2.2.4. Melatonin	19
2.2.2.5. Albümin	19
2.3. Kadmiyum, Kurşun, Demir ve Bakırın Genotoksisite İle İlişkisi	19
BÖLÜM 3: MATERYAL VE METOD	23
3.1. Hücre Hattı	23
3.1.1. Hücre Hattı Besiyeri.....	23
3.1.2. Hücrelerin Kültüre Alınması.....	24
3.1.3. Hücrelerin Pasajlanması.....	24
3.1.4. Hücrelerin Dondurulması.....	24
3.1.5. Hücrelere Metal Uygulaması	25
3.2. Genetik Analizler	25
3.2.1. DNA İzolasyonu.....	25
3.2.2. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik Farklılık; RAPD Yöntemi	26
3.2.3. RNA İzolasyonu.....	27
3.2.4. cDNA Eldesi	28
3.2.5. Kantitatif Real Time-PCR (qRT-PCR) Analizleri	28
3.2.6. Tali Görüntü Tabanlı Sitometre Analizi	30
3.3. İstatistik Analiz	31
BÖLÜM 4: SONUÇLAR.....	32
4.1. 24. ve 48. Saatte Farklı Konsantrasyonlarda Hazırlanan Ağır Metal Karışımlarının İnsan Aorta Düz Kas Hücre Morfolojisi Üzerine Etkileri	32
4.2. RAPD DNA Polimorfizmi	33
4.2.1. P2, OPB05, 1OPA Primerleri.....	33
4.2.2. 2OPA, M13, ALU-2 Primerleri	35
4.2.3. 1253, SP2,7OPA Primerleri	38
4.2.4. 23OPC, RAPD1 ve RAPD6 Primerleri.....	41
4.3. Tali Görüntü Tabanlı Sitometre Analizi	43
4.3.1. 24. Saatte Tali Görüntü Tabanlı Sitometre Analizi.....	43
4.3.2. 48. Saatte Tali Görüntü Tabanlı Sitometre Analizi.....	45
4.4. Cu Zn-SOD Gen İfadesi.....	47

4.5. Mn-SOD Gen İfadesi	48
4.6. KAT Gen İfadesi	49
4.7. GST Gen İfadesi.....	50
4.8. HSP27 Gen İfadesi	51
4.9. HSP60 Gen İfadesi.....	52
4.10. HSP70 Gen İfadesi	53
4.11. P53 Gen İfadesi	54
4.12. PUMA Gen İfadesi.....	55
4.13. NOXA Gen İfadesi.....	56
4.14. BCL2 Gen İfadesi	57
4.15. BAX Gen İfadesi.....	58
4.16. SİTOKROM C Gen İfadesi.....	59
4.17. KASPAZ-8 Gen İfadesi	60
4.18. EXO1 Gen İfadesi	61
4.19. P21 Gen İfadesi	62
BÖLÜM 5: TARTIŞMA.....	63
KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ	82

SİMGELER

mg	: Miligram
kg	: Kilogram
µg	: Mikrogram
nm	: Nanometre
L	: Litre
%	: Yüzde değer
O₂⁻	: Süperoksit anyonu
¹O₂	: Tekil oksijen
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
OH[·]	: Hidroksil radikali
O₂	: Moleküler oksijen
HOCl	: Hipokloröz asit
Cd	: Kadmiyum
Fe⁺²	: Demir
α	: Alfa
β	: Beta
δ	: Delta
Zn	: Çinko
Mm	: Mikromolar
ml	: Mililitre
dNTP	: Deoksinükleotit fosfat
Pb	: Kurşun
Cu	: Bakır
Mn	: Mangan
Se	: Selenyum
Co	: Kobalt

Cr	: Krom
Mg	: Magnezyum
Mo	: Molibden
Ni	: Nikel
Se	: Selenyum
As	: Arsenik
Hg	: Civa
NO	: Nitrik oksit

KISALTMALAR

ATSDR	: Toksik Maddeler ve Hastalıklar Kayıt Ajansı
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
PVC	: Poli Vinil Klorür
HA-VSMC	: İnsan Aortik Vasküler Düz Kas Hücreleri
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Dehidrogenaz
SOD	: Süperoksit Dismutaz
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	: Ribo Nükleik Asit
GSH	: Redükte Glutatyon
-SH	: Sülfidril
GSSG	: Okside Glutatyon
KAT	: Katalaz
GS	: Glutatyon Sentaz
GSH-Px	: Glutatyon Peroksidaz
Mn-SOD	: Mangan-SOD
Cu Zn-SOD	: Bakır Çinko-SOD
GSH-Rd	: Glutatyon Redüktaz
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
FAD	: Flavın Adenin Dinükleotid
GST	: Glutatyon S- Transferaz
γ-Glu-Cys	: γ -Glutamil Sistein
RAPD	: Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qRT – PCR	: Kantitatif Real Time-PCR
UV	: Ultra Viyole
ATP	: Adenozin Trifosfat
IARC	: Amerika Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Antioksidan ve serbest radikal molekülünün karşılaştırılması	7
Şekil 2.2. Abiyotik stresin ROT üretimini ve hücre ölümünü tetiklemesi	8
Şekil 2.3. Hidojen peroksit (H ₂ O ₂) molekülü	9
Şekil 2.4. Glutasyon redüktaz (GR) enziminin katalizlediği tepkimede GSSG NADPH oluşumu	16
Şekil 2.5. Glutasyon redüktaz aktivitesi	17
Şekil 2.6. Mitokondriyel kontrol ve apoptoz ilişkisi	22
Şekil 3.1. Çalışmamızda kullandığımız T/G HA-VSMC ATTC®CRL-1999 fibroblastoma hücrelerinin invert ışık mikroskobu altındaki görüntüsü	23
Şekil 3.2. Kantitatif gerçek zamanlı PCR cihazı (qRT PCR)	30
Şekil 3.3. Tali sitometre cihazı	31
Şekil 4.1. Kontrol grubu hücreleri ile ağır metal miks uygulanan hücrelerin morfolojik karşılaştırılması	32
Şekil 4.2. P2, OPB05, 1OPA primerleri jel görüntüleri	33
Şekil 4.3. 2OPA, M13, ALU-2 primerleri jel görüntüleri	36
Şekil 4.4. 1253, SP2, 7OPA primerleri jel görüntüleri	39
Şekil 4.5. 23OPC, RAPD1, RAPD6 primerleri jel görüntüleri	41
Şekil 4.6. Kontrol ve uygulama yapılan deney hücrelerinde uygulamanın 24. saatinde belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücrelerin oranları	43
Şekil 4.7. TALİ görüntü tabanlı sitometre analizde 24. saat sonunda aort düz kas hücre hattına ait canlı, ölü ve apoptotik hücre görüntüleri	44
Şekil 4.8. Kontrol ve uygulama yapılan deney hücrelerinde uygulamanın 48. saatinde belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücrelerin oranları	45
Şekil 4.9. TALİ görüntü tabanlı sitometre analizde 48. saat sonunda aort düz kas hücre hattına ait canlı, ölü ve apoptotik hücre görüntüleri	46

Şekil 4.10. 24 ve 48 saat süre ile metal miks uygulaması yapılan deney hücrelerinde Cu Zn-SOD gen ifadesinin değişimi.....	47
Şekil 4.11. 24 ve 48 saat süre ile metal miks uygulaması yapılan deney hücrelerinde Mn-SOD gen ifadesinin değişimi.....	48
Şekil 4.12. 24 ve 48 saat süre ile metal miks uygulaması yapılan deney hücrelerinde KAT gen ifadesinin değişimi	49
Şekil 4.13. 24 ve 48 saat süre ile metal miks uygulaması yapılan aort düz kas hücrelerinde GST gen ifadesinin değişimi.....	50
Şekil 4.14. 24 ve 48 saat süre ile metal miks uygulaması yapılan deney hücrelerinde HSP27 gen ifadesinin değişimi	51
Şekil 4.15. 24 ve 48 saat süre ile metal miks uygulaması yapılan aort düz kas hücrelerinde HSP60 gen ifadesinin değişimi	52
Şekil 4.16. 24 ve 48 saat süre ile metal miks uygulaması yapılan deney hücrelerinde HSP70 gen ifadesinin değişimi	53
Şekil 4.17. 24 ve 48 saat süre ile metal miks uygulaması yapılan deney hücrelerinde P53 gen ifadesinin değişimi	54
Şekil 4.18. 24 ve 48 saat süre ile metal miks uygulaması yapılan aort düz kas hücrelerinde PUMA gen ifadesinin değişimi.....	55
Şekil 4.19. 24 ve 48 saat süre ile metal miks uygulaması yapılan deney hücrelerinde NOXA gen ifadesinin değişimi.....	56
Şekil 4.20. 24 ve 48 saat süre ile metal miks uygulaması yapılan deney hücrelerinde BCL2 gen ifadesinin değişimi.....	57
Şekil 4.21. 24 ve 48 saat süre ile metal miks uygulaması yapılan deney hücrelerinde BAX gen ifadesinin değişimi	58
Şekil 4.22. 24 ve 48 saat süre ile metal miks uygulaması yapılan deney hücrelerinde SİTOKROM C gen ifadesinin değişimi.....	59
Şekil 4.23. 24 ve 48 saat süre ile metal miks uygulaması yapılan deney hücrelerinde KASPAZ-8 gen ifadesinin değişimi.....	60
Şekil 4.24. 24 ve 48 saat süre ile metal miks uygulaması yapılan deney hücrelerinde EXO1 gen ifadesinin değişimi	61
Şekil 4.25. 24 ve 48 saat süre ile metal miks uygulaması yapılan deney hücrelerinde P21 gen ifadesinin değişimi	62

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Kardiyovasküler hastalıklarda risk faktörlerinin sınıflandırılması.....	5
Çizelge 2.2. İnsani tüketim amaçlı kullanılan sulardaki tolerans sınırları.....	6
Çizelge 2.3. Serbest radikal kaynakları ve antioksidan moleküllerin karşılaştırılması ..	14
Çizelge 3.1. Hücrelere uygulanan miks 1 ve miks 2'nin içeriği ve miktarları	25
Çizelge 3.2. RAPD PCR için gerekli malzemeler.	26
Çizelge 3.3. RAPD analizinde kullanılan primerler ve baz dizileri	27
Çizelge 3.4. Bir reaksiyonluk cDNA ana karışımı için gerekli malzemeler.....	28
Çizelge 3.5. qRT PCR için kullanılan primer çiftleri, dizileri ve uzunlukları.....	29
Çizelge 4.1. Ağır metal miks uygulaması yapılan insan aorta düz kas hücrelerinde P2, OPB05 ve 1OPA primerlerinde kontrole göre yeni oluşan (Y) ve kaybolan (K) bantlar	34
Çizelge 4.2. Ağır metal miks uygulaması yapılan insan aorta düz kas hücrelerinde 2OPA, M13, ALU-2 primerlerinde kontrole göre yeni oluşan (Y) ve kaybolan (K) bantlar.....	37
Çizelge 4.3. Ağır metal miks uygulaması yapılan insan aorta düz kas hücrelerinde 1253, SP2 ve 7OPA primerlerinde kontrole göre yeni oluşan (Y) ve kaybolan (K) bantlar	40
Çizelge 4.4. Ağır metal miks uygulaması yapılan insan aorta düz kas hücrelerinde 23OPC, RAPD1 ve RAPD6 primerlerinde kontrole göre yeni oluşan (Y) ve kaybolan (K) bantlar	42

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Ağır metaller, yüksek atom ağırlığına ve suya oranla beş kat daha fazla yoğunluğa sahip olan elementlerdir. Birçok endüstriyel atık, tarımda kullanılan ilaçlar, tıbbi ve teknolojik uygulamalar, çevredeki geniş alanda etkisini göstererek insan sağlığı ve doğadaki canlılar üzerinde ciddi tehditler oluşturmaktadır. Ağır metallerin toksik etkisi doza ve kimyasal maddenin cinsine bağlı olurken, bireyin yaşı, cinsiyeti, genetik ve beslenme durumları da dolaylı olarak toksisiteyi etkileyen çeşitli faktörlerdir. Yüksek toksik etkisi nedeniyle, arsenik (As), kadmiyum (Cd), kurşun (Pb), krom (Cr) ve cıva (Hg) gibi ağır metaller insanlar için ciddi tehlike oluşturabilmektedir. Bu metalik elementlere düşük oranda maruz kalınması bile genetik mekanizmada bozulma ve ilerleyen süreçte organ hasarları ile birlikte ölüme neden olabilmektedir. Son yıllarda yaşadığımız çevrede sanayileşme ve endüstrileşme ile birlikte ağır metal kirliliğinde bir artışın olduğu hava, su ve toprağın kirlenmesinin insan sağlığı için ciddi tehdit oluşturduğu görülmektedir (Tchounwou, Yedjou, Patlolla & Sutton, 2012).

Kobalt (Co), bakır (Cu), Cr, demir (Fe), magnezyum (Mg), mangan (Mn), molibden (Mo), nikel (Ni), selenyum (Se) ve çinko (Zn), çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyonlar için gerekli olan besin elementleridir. Bu metaller bazı enzimlerin önemli bileşenleri olup çeşitli oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarında önemli rol oynamaktadır. Örneğin Cu; katalaz, süperoksit dismutaz, peroksidaz, sitokrom c oksidazlar, ferrokسيدazlar, monoamin oksidaz ve dopamin β -monooksijenaz gibi çeşitli oksidatif stresi etkileyen enzimler için önemli bir yardımcı faktör olarak görev yapmaktadır. Cu'nun oksidasyon hali Cu (II) ve indirgenmiş hal Cu (I) arasında dönüşebilme kabiliyetine bağlı geçişler, süperoksit ve hidroksil radikallerinin oluşumuyla sonuçlanabileceği için potansiyel olarak toksik etki gösterebilmektedir. Ayrıca Cu'nun vücutta fazla birikmesi hücrel hasarlara neden olur ve Wilson hastalığını tetikler (Godt vd., 2006).

İlk olarak 1817 yılında Friedrich Stromeyer tarafından tarif edilen Cd zehirlenmesine göre; yüksek miktarda Cd'nin birikimi sonucunda böbrek, kemik ve akciğerlerde doku hasarlarına yol açabildiği bildirilmiştir. Volkanik aktivite ve endüstriyel proseslerin kullanımı, çevredeki Cd miktarında ciddi artışlara sebep olmaktadır. Örneğin PVC (polivinil klorür) ürünlerinde, renk pigmenti oluşumunda, fosfatlı gübre kullanımında, nükleer enerji santrallerinde nötron absorbe edici ve nikel-kadmiyum pillerin imalatında kullanılan Cd, çevreye zarar verdiği gibi insan sağlığını da olumsuz yönde etkilemektedir. Ayrıca sigara içenlerin Cd kan seviyelerinin genellikle sigara içmeyenlerinkinden 4-5 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (Alissa ve Ferns, 2011; Vasallo vd., 2011).

Hg ve Pb'nin dokularda birikimi insanlarda ve hayvanlarda kardiyovasküler sistemi etkileyerek hipertansiyona neden olur ve endotel fonksiyonlarını etkiler. Ağır metallere maruz kalmış hücrelerde nefropati ve kardiyovasküler riskin olduğu bildirilmiştir. İnsan ve hayvan hücrelerinde yapılan çalışmalarda dokularda ağır metal birikiminin, anjiotensin I dönüştürücü enzim aktivitesini uyararak, serbest radikal üretimini ve oksidatif stresi arttırdığı tespit edilmiştir (Ercal, Gurer-Orhan ve Aykin-Burns, 2001).

Kardiyovasküler sistem, ağır metallerin primer hedefi olmasa da ağır metaller oksidatif strese neden olmaları ve antioksidan sistemi bozmaları nedeni ile kardiyovasküler toksisiteye neden olmaktadır (Britton, Leicester ve Bacon, 2002). Ayrıca aort düz kas hücrelerinde ağır metal uygulamasına bağlı olarak meydana gelebilecek genotoksik etkilerin dolaşım sistemi hastalıkları, hipertansiyon, aritmi, taşikardi, kalp yetersizliği, diyabet, kalp krizi, kalp spazmı, ani kalp durması gibi çeşitli kalp ve damar hastalıklarının oluşumunda rol alabileceği nedeni ile çalışmamızda insan aorta düz kas hücrelerine (T/G HA-VSMC; ATCC® CRL-1999™) içme sularında izin verilen limitlerde Fe, Cu, Cd ve Pb karışımının antioksidan ve apoptoz üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

Artan sanayileşme ile birlikte metallerin birçok alanda kullanılması ve yaşadığımız çevreye çeşitli tarımsal ve sanayi atıkları ile yayılması gündeme gelmiştir. İnsanlar toksik metallere; kirli hava, su, toprak ve gıda dahil olmak üzere çok sayıda kaynaktan maruz kalabilir. Son yıllardaki araştırmalarda, geçiş metallerinin biyolojik makromoleküllerin oksidatif reaksiyonlarında katalizör görevi üstlendiği, bu metallerle ilişkili toksisitenin oksidatif doku hasarına neden olabileceği bildirilmiştir (Ercal vd., 2001; Alissa ve Ferns, 2011).

Fe, Cu ve Cr gibi redoks-aktif metaller, redoks döngüsü üzerinde etkisini gösterirken; Pb, Cd, Hg gibi redoks-aktif olmayan metaller hücrelerin başlıca antioksidanları, özellikle de tiol içeren antioksidanları ve enzimleri üzerinde etkilidir. Redoks aktif veya redoks-aktif olmayan metaller, hidroksil radikali (OH[·]), süperoksit radikali (O₂^{·-}) veya hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretiminde artışa neden olabilir. ROT' un gelişmiş formları, hücrelerin asli antioksidan savunmalarını zorlar ve "oksidatif stres" olarak bilinen bir duruma neden olabilir. Oksidatif stres altındaki hücrelerde, ROT' un lipitlere, proteinlere ve DNA'ya bağlı oluşturduğu lezyonlar çeşitli işlev bozukluklarına sebep olmaktadır (Ercal vd., 2001; Britton, Leicester ve Bacon, 2002).

Fe, hücresel fizyoloji için vazgeçilmez bir mineraldir ancak Fe fazlalığı hücrelerin yaralanmasına ve hasar görmesine neden olabilir. Düşük moleküler ağırlıklı formdaki Fe, serbest radikal reaksiyonlarının başlatılmasında katalitik bir rol oynayabilir. Ortaya çıkan serbest radikal molekülleri, hücresel lipidlere, nükleik asitlere, proteinlere ve karbonhidratlara zarar vererek hücresel işlev ve bütünlüğün geniş kapsamlı bozulmasına neden olabilir. Serbest radikal üretimi, hasar oluşmadan önce hücrelerin savunma mekanizmalarını bastıracaktır. Fe konsantrasyonu eşik seviyesini

aştığında, deney hayvanlarında yapılan Fe yüklemesinde lipid mekanizmasında oksidatif zarara neden olduğu rapor edilmiştir. Karaciğerde bu lipid peroksidasyonu; mitokondri ve lizozomların membrana bağlı işlevlerinin bozulmasıyla ilişkilendirilebilir. Fe'nin fazlalığı, SİTOKROM C oksidaz aktivitesinde bir azalmaya neden olur ve bu hepatik mitokondriyal solunumu olumsuz etkileyerek hepatosellüler kalsiyum homeostazını, mitokondriyal ve mikrosomal kalsiyum sekestrasyonuna zarar verir. DNA, Fe kaynaklı hasarın hedefi olabilir. Örneğin; Fe yüklü hastaların karaciğer DNA'sında, tümör süpresör geni p53'te mutasyonlar olduğu gözlemlenmiştir (Britton vd., 2002; Gaetke ve Chow, 2003).

Cu biyolojik süreçte yer alan enzimler için önemli bir metaldir. Normal şartlarda proteinlere bağlı olarak bulunur fakat oksidatif stres altında reaktif hidroksil köklerinin oluşumunu katalize edebilmek için proteinlerden ayrılıp tek başına işlev görebilir. İn vitro ve hücre kültürü çalışmalarından elde edilen veriler yüksek miktarda Cu'nun oksidatif hasar başlatma kapasitesini arttırdığı ve önemli hücreyel olayları tetiklediği rapor edilmiştir. Cu kaynaklı oksidatif hasar, anormal Cu metabolizması ve nörodejeneratif değişikliklerle ilişkili bozukluklarla ilişkilendirilmiştir (Gaetke ve Chow, 2003).

Pb kullanım alanı oldukça yaygın toksik bir metaldir. Pb'ye maruziyet başlıca endüstri alanında, yiyecek ve içeceklerde, içme sularında görülebilmektedir. Pb kaynakları benzin, ev boyası, sıhhi tesisat boruları, akümülatör bataryaları ve bazı oyuncaklardır. Dünya'da en fazla ABD'de, yılda 100.000-200.000 ton arasında Pb atmosfere serbest bırakılmaktadır ve bu bazı bitki türleri için oldukça toksik olabilmektedir (Varol, Davraz ve Varol, 2008).

Cd, Toksik Maddeler ve Hastalıklar Kayıt Ajansı (ATSDR) sıralamasında en zehirli yedinci ağır metaldir. Başta sigara olmak üzere, tütün dumanında, şarj edilebilir pillerde, özel alaşımların üretiminde, elektron pillerde elektrot bileşeni olarak, kaplamalarda Cd bulunmaktadır. Cd yer altı sularından ve topraktan sebze ve meyvelere geçerek bu besinleri tüketen insanlarda düşük oranlarda bile toksik olabilmektedir. Cd oranı kabuklular ve bazı mantarlarda oldukça fazladır (Sies, 1986).

Dünyada her yıl yaklaşık bir milyon ölüm kardiyovasküler sistemden kaynaklı olup EUREKA çalışmasına göre ülkemizdeki hipertansiyon kaynaklı ölümler % 66,5

oranındadır. Kardiyovasküler sistemden kaynaklı ölümlerin sayısının 2030 yılına kadar 23.6 milyona ulaşması beklenmektedir. Düşük seviyelerde ağır metallere sürekli maruz kalma sağlık için olumsuz etkilere neden olabilir. Kardiyovasküler risk faktörlerinin spektrumunu incelediğimizde davranışsal, genetik ve çevresel etmenlerin etkisi altında olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 2.1.). Özellikle davranışsal ve çevresel faktörler kardiyovasküler sistemin bozulmasında genomik faktörleri etkilediğinden büyük öneme sahiptir (Alissa ve Ferns, 2011).

Çizelge 2.1. Kardiyovasküler hastalıklarda risk faktörlerinin sınıflandırılması (Alissa ve Ferns, 2011).

Kategori	Örnekler
Değiştirilemeyen risk faktörleri	İlerleyen yaş Erkek cinsiyeti Aile öyküsü/Genotip
Metabolik risk faktörleri	Hipertansiyon Diabetes mellitus Metabolik sendrom Hiperlipidemi Obezite
Yaşam tarzı risk faktörleri	Sigara içmek Fiziksel aktivite Diyet
Yeni risk faktörleri	Lipoprotein Homosistein İnflamatuvar belirteçler (örn. C-reaktif protein) Protrombotik faktörler (örn. fibrinojen) İz elementleri (örn. bakır, krom, selenyum, çinko) Ağır metaller (örn. kadmiyum, cıva arsenik, kurşun)

Canlılar yaşamlarını sürdürebilmek için ekosistemde ve yaşam alanlarında kendilerine zarar verecek ajanlardan uzak durmalıdır. Herhangi bir kirleticinin varlığı, çevrede bulunan insanlar için önem teşkil eder. Yediğimiz gıdaların içtiğimiz suyun ve soluduğumuz havanın doğrudan ya da dolaylı olarak kirlenmesi sonucu, yaşam kalitesinin düştüğü ve ölümlerle sonuçlanabileceği bildirilmiştir. Madencilik faaliyetlerindeki çalışmalar dolaylı olarak içtiğimiz suya, topraktan ise yediğimiz besinler aracılığıyla vücudumuza alınmaktadır. Özellikle ağır metaller çevre üzerindeki kirleticiler sıralamasında ilk sıradadır. Ağır metallerin dokularda birikimi, üst sınır limitlerini aştığında hücrelerde apoptoza neden olabilir ve bu kanserle sonuçlanabilir. Ağır metallerin varlığı belirlenen veya tolerans sınırının ötesinde bulunmamalıdır. Bu bağlamda insani tüketim amaçlı kullanılan sulardaki kimyasal parametrelerin

ülkemizdeki tolerans sınırları Çizelge 2.2. 'de gösterilmektedir (Varol, Davraz ve Varol, 2008).

Çizelge 2.2. İnsani tüketim amaçlı kullanılan sulardaki tolerans sınırları (Varol, Davraz ve Varol, 2008).

Parametre	Parametrik Değer	Birim
Arsenik	10	µg/L
Kadmiyum	5,0	µg/L
Bakır	2	mg/L
Krom	50	µg/L
Kurşun	10	µg/L
Civa	1,0	µg/L
Demir	200	µg/L

2.1. Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Aerobik yaşamın içinde oksidatif reaksiyonların bir sonucu olarak çeşitli organik bileşiklerde (DNA, proteinler, karbonhidratlar ve lipidler) yapısal hasarlar meydana gelebilir. Reaktif oksijen türlerinin oksidatif hasarına "oksidatif stres" denir. Biyolojik sistemler güçlü enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemleri içerir ve oksidatif stres, prooksidan-antioksidan dengesinin bozularak prooksidan lehine kayması anlamına gelir (Sies, 1986).

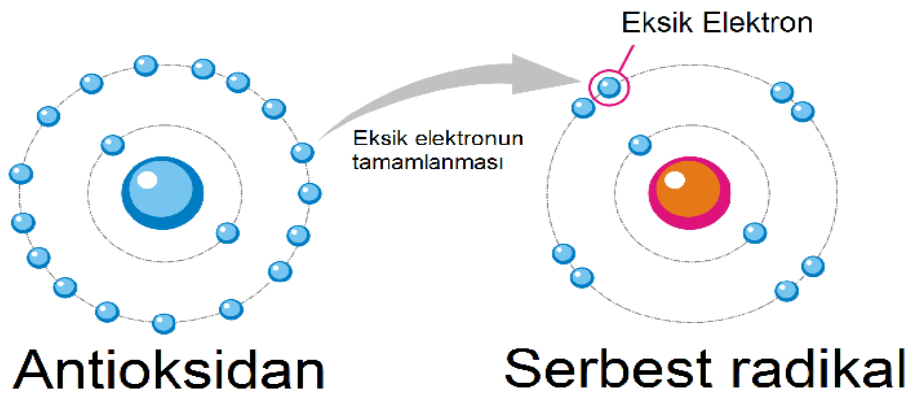
Reaktif oksijen türleri (ROT), aerobik metabolizmanın yan ürünleridir. ROT, hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikalleri (OH^-), tekil (singlet) oksijen (1O_2) gibi molekülleri içerir; bu moleküllerin hepsi, farklı biyolojik olaylara tepki veren doğal kimyasal özelliklere sahip moleküllerdir. ROT sıklıkla oksidatif stresle ilişkilidir ve lipidlere, proteinlere, DNA'ya zarar vererek patolojiye neden olmaktadır. ROT metabolizma sırasında mitokondride oksijenli solunumun son evresinde üretilmekte olup antioksidan mekanizmalar tarafından parçalanıp hücrelerden atılmaktadır. Hücrelerde ksenobiyotikler, metaller ve diğer maddelerden dolayı aşırı miktarda toksik madde birikimi, oksidan/antioksidan dengesinin bozulmasına neden olur (Nordberg ve Arnér, 2005; Schieber ve Chandel, 2014). İnsanlarda bu dengenin bozulması sonucu hücrelerde oksidatif strese bağlı hasarlar oluşur ve alzheimer, parkinson, diabetes mellitus, romatoid artirit gibi hastalıklar meydana gelir. Hücrelerde

serbest radikal moleküllerinin artması, DNA'daki hasarların çoğalmasına, bir süre sonra ise DNA tamir mekanizmalarının işlevini kaybederek hücre yaşlanmasına neden olabileceği rapor edilmiştir. Antioksidanlar, serbest radikallere karşı etkilidir ve insanlarda birçok hastalığın ve kanserin önlenmesinde büyük öneme sahiptir (Çaylak, 2011).

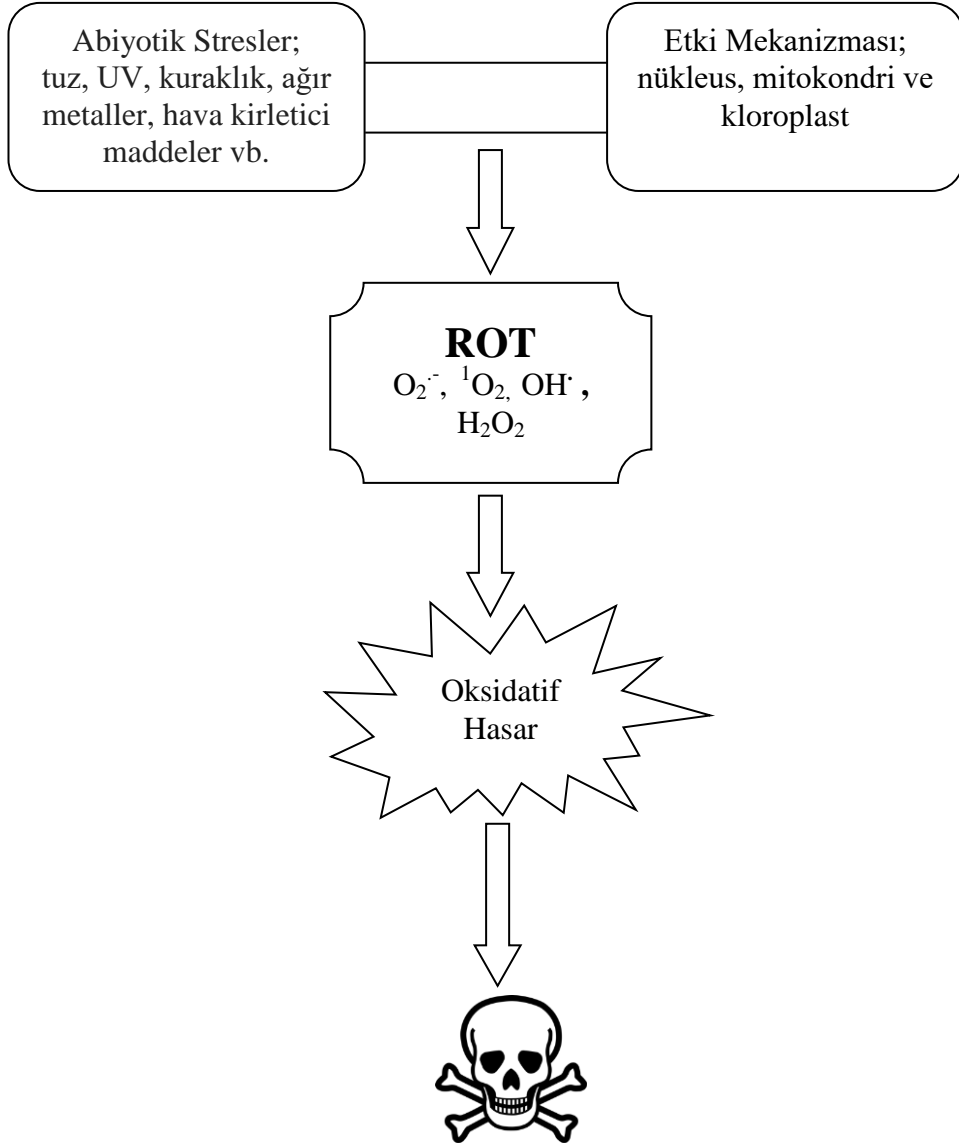
2.1.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, bağımsız bir şekilde varolan, dış orbitallerinde en az bir eşleşmemiş elektron bulunduran kimyasal türler olarak tanımlanır. Anaerobik canlılar haricinde tüm canlılar hayatlarını devam ettirebilmeleri için enerji ve oksijene ihtiyaç duyarlar. Oksijen molekülünün hücreler tarafından sağlıklı ve dengeli kullanılması gerekir. Hücrelerde eşleşmemiş, eksik elektron barındıran oksijen atomu ve türevleri ROT olarak adlandırılır. Reaktif oksijen türleri; süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH^\cdot) ve tekil (singlet) oksijen (1O_2)'dir (Gill ve Tuteja, 2010).

Diğer biyolojik olarak önemli serbest radikalleri veya bunların eşdeğerleri, membran lipidleri ile bağlantılı lipid hidroperoksit (ROOH), lipid peroksil radikal (ROO^\cdot) ve lipid alkoksil radikalini (RO^\cdot) içerir; nitrik oksit (NO) ise reaktif azot türlerine örnektir. ROT' ta, antioksidan mekanizmalar eşleşmemiş ve eksik elektron barındıran moleküllerin yükünü telafi edemezse, hücrenin içinde veya dışında oksidatif strese neden olur. Son yıllarda yapılan araştırmalara göre düşük seviyelerdeki oksidatif stresin hücrelerin çoğalmasını arttırıcı etki gösterdiği rapor edilmiştir (Toyokuni, 1999).



Şekil 2.1. Antioksidan ve serbest radikal molekülünün karşılaştırılması (Url-1, 2018)



Şekil 2.2. Abiyotik stresin ROT üretimini ve hücre ölümünü tetiklemesi (Gill ve Tuteja, 2010).

2.1.1.1. Tekil Oksijen

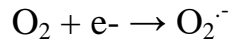
Elektronik olarak uyarılan bir oksijen türü olan tekil (singlet) oksijeninin (¹O₂) biyolojik önemi yalnızca son yirmi yılda açıklanabilmiştir (Epe, 1991).

Tekil oksijen, biradikal oksijen molekülünün elektronlarından birinin ortamdaki enerjiyi kullanarak spininin tersi yönündeki başka bir orbitalle yer değiştirmesi sonucu oluşur. Eşleşmemiş elektronu bulunmadığı için radikal özellik göstermezler, delta ve sigma olmak üzere iki türü vardır. Tekil oksijen (¹O₂), serbest radikal olarak kabul edilmez ancak kuvvetli okside edici özelliği diğer moleküllerle etkileşime girmesi ve enerjiyi transfer edebilmesi gibi özellikleri bu moleküle serbest radikal özellik

kazandırır. Ayrıca hücrelerin membranlarındaki lipitlere etki eder ve peroksit (lipit peroksidasyonu) oluşumunda etkilidir (Jacobson, 1996). Doymamış yağ asitleri ile tepkimesi sonucu da peroksi radikalini oluşturur (Fialkow, Wang ve Downey, 2007).

2.1.1.2. Süperoksit Radikali

Moleküler oksijenden oluşan süperoksit anyonu (O_2^-), moleküler oksijene (O_2) bir elektron eklenmesiyle oluşur. Yüksek derecede reaktif olmayan bir serbest radikaldir (Davies, 2003).

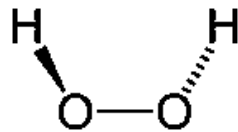


Lipid membranlara nüfuz eder ve difüzyon oluşturamadığından dışarı çıkamaz. İç mitokondriyal membranın solunum zincirinde enerji üretilirken kullanılan oksijene elektron bakımından zengin aerobik ortamda bir elektron gider. Özellikle elektron taşıyıcıları koenzim Q ve nikotinamid adenin dinükleotid dehidrogenaz (NADH) gibi koenzimlerden, oksijene elektron gider (Nordberg ve Arnér, 2005; Gill ve Tuteja, 2010).

Bazı moleküller elektronlarını kaybederek kendilerini oksitleyebilir. Bu aşamada süperoksit oluşumu gözlenir. Süperoksit oluşturan enzimler; flavoenzimler, ferrodoksinler, ksantin oksidaz, lipoksijenaz ve siklooksijenazdır. Fagositik NADPH'ye bağlı oksidaz hücreler de süperoksit üretebilir (Dranka vd., 2011; Guevara, Gianotti, Oliver, Roca, 2011).

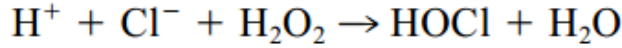
2.1.1.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit oksitleyici, beyazlatıcı ve mikroorganizmalar üzerinde öldürücü etki gösterir ve biyolojik membranlardan geçebilme özelliğinden dolayı da son derece önemlidir (Kavas, 1994; Mercan, 2004).



Şekil 2.3. Hidrojen peroksit (H_2O_2) molekülü (Bagchi vd., 2000)

Miyeloperoksidaz enzimi tarafından hidrojen peroksit, hipokloröz asite (HOCl) dönüştürülebilmektedir. Bu aşamada okside olan geçiş metalleri OH[·] radikalinin oluşmasına neden olur ve ROT moleküllerinin oluşumunda dolaylı olarak görev alır (Sies, 1997; Bagchi vd., 2000).



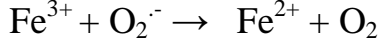
Hücreler arasındaki sinyal iletiminde H₂O₂ önemli rol oynamaktadır. Elektron almış oksijen molekülüne bir elektron eklenmesiyle ya da nötr oksijen molekülüne iki elektron aktarılmasıyla H₂O₂ oluşur. H₂O₂'nin bulunduğu ortamdan temizlenme işi katalaz, glutatyon peroksidaz ve peroksiredoksinler olarak adlandırılan antioksidan enzim sitemleri tarafından gerçekleşmektedir (Aruoma, 1994; Dreher ve Junod, 1996; Pham-Huy, He, 2008).



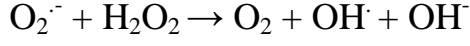
Cu içeren süperoksit dismutaz (SOD) enzimi, süperoksitleri hidrolize ederek H₂O₂'ye ve oksijen molekülüne dönüştürür. Süperoksit gruplarından en zayıf etkiye sahip H₂O₂, dokularda bulunan peroksidaz, glutasyon peroksidaz (GPx) ve katalaz enzimleri aracılığıyla su ve oksijen gibi etkisi daha düşük ürünlere dönüştürülerek oluşacak hücre hasarı minimuma indirilebilmektedir (Anderson, Yu, Phillips ve Schmezer, 1994; Mates, 2000).

2.1.1.4. Hidroksil Radikal (OH[·])

Hidroksil radikali (OH[·]) bilinen en reaktif ve genotoksik etkisi oldukça yüksek serbest radikal türüdür. Biyokimyasal maddelerden aminoasit, fosfolipid, şeker, nükleik asit ve organik asit gibi maddelerle reaksiyona girme eğilimi gösterir (Memişoğulları, 2005). Hidroksil radikali O₂⁻ ve H₂O₂'nin en az bir çiftleşmemiş elektron taşıyan geçiş metalleriyle tepkimeye girmesiyle oluşur (Çaylak, 2011). Hidroksil radikali dört DNA bazına da saldırı yapabilme özelliğine sahipken tekil oksijen çok daha seçici davranmaktadır. Hidroksil radikali pirimidin ve pürin bazlarına etki ederek modifikasyonlar oluşturmaktadır (Burçak ve Andican, 2004; Atmaca ve Aksoy 2009).



(Fenton reaksiyonu)



(Haber-Weiss reaksiyonu) (Kehrer, 2000).

Reaktif oksijen türlerinin aşırı üretilmesi (mitokondriyal elektron taşıma zincirinde ya da aşırı NAD(P)H stimülasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır) ve hücrede reaktif nitrojen türleri varlığı oksidatif stres ile sonuçlanmaktadır. Oksidatif stres, hücre yapılarına, lipidlere, membranlara, proteinlere etki ederek yapılarının bozulmasına ve DNA'nın hasar görerek işlevselliğini kaybetmesine neden olur. Hücrelerdeki ROS kanser hücrelerinin onkojenik fenotipini indükler ve hücre içi sinyal şelalelerinde ikincil haberci olarak görev alır. ROS'un ayrıca hücre yaşlanma ve apoptozu indükleyebileceği yapılan araştırmalarla kanıtlanmıştır. Ayrıca ROS üretimi kanser, kalp-damar hastalığı, ateroskleroz, yüksek tansiyon, iskemi-reperfüzyon hasarı, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar (alzheimer ve parkinson hastalığı) ve romatoid artrit gibi hastalıkların oluşumunda etkilidir (Freeman, Crapo, 1982; McCord, 1985; Halliwell, 1994; Valko vd., 2007).

Oksidatif stres, normal hücrelere kıyasla çeşitli kanser hücrelerinde görülen hücre redoks dengesizliğine neden olur; bu nedenle redoks dengesizliği, onkojenik uyarı ile ilişkili olabilmektedir. DNA mutasyonu karsinogenezdeki kritik bir adımdır ve yükseltilmiş oksidatif DNA lezyonları seviyeleri (8-OH-G) kanser etiolojisinde bu tür hasarların oluşumuna neden olarak kötü huylu (malign) tümörler meydana getirebilmektedir (Harraan, 1955; Halliwell, Gutteridge, Cross, 1992; Georges, Veregin, Kazmaier, Hamer, 1993; Valko, Rhodes, Moncol, Izakovic ve Mazur, 2006).

Bir molekülün elektron vererek yükseltgenmesi oksidasyon olayı, bir molekülün elektron alarak indirgenmesi olayı da redüksiyon olayı olarak adlandırılmaktadır. Okside olmuş ajanlar yüksek elektrofilik özellik taşımaları nedeniyle diğer moleküllerin elektronlarını alarak eşleşmemiş elektronlara sahip serbest radikal molekülünü oluştururlar (Kehrer, 1993; McCord, 2000; Raha ve Robinson, 2000).

DNA molekülü günde ortalama 1000 kez oksidatif hasara maruz kalabilmektedir. Çok düşük düzeylerde bile DNA'da meydana gelebilecek hasar, onarım mekanizmasının yetersiz kaldığı durumlarda doku hasarına neden olabilir. Hücrelerdeki antioksidan enzim seviyesinin azalması ve DNA onarım mekanizmalarının işlevselliğini yitirmesi, oksidatif DNA hasarının yükselmesine ve ROT oluşumuna neden olur. DNA molekülünde oksidatif strese bağlı olarak; şeker hasarı, abazik alanlar, tek ve çift dal kırıkları, baz modifikasyonları ve DNA ile protein arasında çapraz bağ oluşması gibi nedenler bu molekülün oksidatif modifikasyonlardan korunması için Fe şelatörleri ve radikal temizleyicilerinin düzenli çalışmasını gerektirmektedir (Oberley, 1988; Wolff, 1993; Conner, Grisham, 1996; Pryor, 2012).

Hücrelerde serbest radikal miktarının artması somatik mutasyonlara neden olur ve bu hücrenin fonksiyonlarını bozmaktadır. Özellikle mutasyonların, DNA'nın geçiş metallerini bağladığı bölgelerde kümelenmeler oluşturduğu gözlemlenmiştir (Kamata ve Hirata, 1999). Aerobik canlıların yaşamlarının devamı için DNA onarım enzimlerinin doğru şekilde çalışması ve oluşan mutasyonların giderilmesi gerekmektedir. Düşük düzeylerde oksidatif DNA hasarları onarılabilmektedir. DNA onarım enzimlerinin ve DNA polimeraz'ın hasar görüp aktivitesini kaybetmesi sonucu, doğru replikasyon ve transkripsiyon olasılığının azalması ve hücrelerde hasar düzeyinin artması yüksek düzeylerde apoptozu tetiklemektedir (Cortopassi ve Wong, 1999; Yla-Herttuala, 1999; Betteridge, 2000).

2.2. Antioksidan Sistem

Sağlıklı hücrelerde oluşan serbest radikaller ve bunları yok etmekle görevli antioksidan savunma mekanizmaları arasında bir denge vardır (Burçak, Andican, 2004). Genetik bilgiyi taşıyan DNA molekülünün oksidasyonu önleyerek serbest radikallerin oluşmasını engelleyen maddelere antioksidan madde, bu olayı gerçekleştiren sisteme de antioksidan sistem denir. ROT'un aşırı üretimi; hücrelerde lipid peroksidasyonuna, DNA molekülünde mutasyona, enzimlerin işlevselliğinin yitirilmesine ve protein oksidasyonuna yol açar (Hopkins, 1999; Çömelekoğlu, Mazmancı, Arpacı, 2000; Dündar, 2000; Irshad, Chaudhuri, 2002; Touyz, 2004; Karaca ve Guder 2009). Serbest radikallerin proteinler ve enzimlerin yapısında oluşturduğu değişimler sonucu oluşan

onkojenik mutasyonlar, hücrenin hormonlar ve nörotransmitterlere verdiği cevabı değiştirmesi gibi olaylar Çizelge 2.3.'te verilen antioksidan sistemler tarafından onarılmaktadır (Erenel, Erbaş, Arıcıoğlu, 1992; Buettner, 1993; Meister, 1994; Lander, Ogiste, Teng, Novogrodsky, 1995; Aruoma, 1998; Valko vd., 2007; Tamer, Polat, Eskandari, Ercan, Atik, 2012; Karabulut, Gülay, 2016).

Hücrelerdeki serbest radikalın oluşturduğu zararlı etkinin giderilmesi antioksidan sistemler tarafından gerçekleşmektedir. Bu savunma mekanizması 4 farklı şekilde etki göstermektedir; bu etki mekanizması aşağıdaki gibidir:

1. **Temizleme:** Antioksidan enzim varlığında serbest radikallerin daha küçük moleküllere dönüştürülerek ortamdan temizlenmesi olayıdır.
2. **Baskılama:** Bir hidrojen ekleyerek ortamda oluşmuş oksidanların etkisiz hale getirilmesi işlemidir.
3. **Onarma:** Oksidasyon sonucu oluşan hasarın giderilmesi için hedef hücrelerin tamir edilmesi işlemidir.
4. **Zincir koparma:** E vitamini ve seruloplazmin gibi enzimler tarafından oksidasyona neden olan moleküllere metal iyonlar bağlanarak radikal grupların oluşması önlenir (Halliwell, Gutteridge, 1990; Bunker, 1992; Maxwell Lip, 1997; Pinzino, vd., 1999; Bahorun, Soobrattee, Luximon-Ramma, Aruoma, 2006; Rahman, 2007; Rao, Kalva, Yerramilli, Mamidi, 2011; Shinde, Ganu, Naik, 2012; Nimse, Pal, 2015).

Serbest radikallerin oluşumunu önlemek için;

- Başlatıcı reaktif türleri ve oksijen uzaklaştırılmalı,
- Oksijen türevlerinin derişimi azaltılmalı,
- Katalitik metal iyonları uzaklaştırılmalıdır (McCay, 1985; Sevim, 2011).

Çizelge 2.3. Serbest radikal kaynakları ve antioksidan moleküllerin karşılaştırılması (Al-Gubory, Fowler, Garrel, 2010).

Serbest Radikal Kaynakları	Antioksidan Moleküller
<ul style="list-style-type: none">• Sigara kullanımı• Aşırı alkol tüketimi• Elektromanyetik radyasyon• Güneş ışınları (UV)• Aşırı Fe yüklemesi• Kronik inflamasyonlar• Doğum kontrol hapları• Aşırı fiziksel egzersiz• Yaşlanma	<ul style="list-style-type: none">• Enzimler (SOD, KAT, GSH-Px)• Selenyum• Tokoferoller (E vitamini)• Proteinler (albumin, serüloplazmin)• Askorbik asit (C vitamini)• Flavonoidler• Karotenoidler• Glutasyon ve tiyoller• Koenzim Q, ubikinon ve türevleri

Antioksidan savunma sistemleri enzim varlığına göre iki ana başlık altında toplanmaktadır.

2.2.1. Enzimatik Antioksidanlar

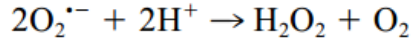
Hücrelerdeki oksidan maddelerin oluşturduğu oksidasyonu önleyen ve hücre hasarının engellenmesinde görevli enzimlere antioksidan enzim denir. Enzim varlığına bağlı önemli antioksidan enzimler; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutasyon peroksidaz (GSH-Px), glutasyon redüktaz (GSH-Rd), glutasyon S-transferaz (GST) ve glutasyon sentaz (GS)'dir (Al-Gubory vd., 2010).

2.2.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Hücrelerde süperoksit radikallerini etkisizleştirerek bu radikalın zararlı etkilerinden korumakla görevlidir. SOD enziminin diğer bir görevi ise süperoksit ile Fe^{3+} 'ün, Fe^{2+} 'ye indirgenmesi sonucunda hidroksil radikalının oluşmasının engellenmesidir. 3 tip SOD bulunmaktadır. Birincisi vücutta bol miktarda bulunan siyanide duyarlı Cu-Zn içeren SOD sitoplazmada, ikincisi Mn içeren SOD mitokondride, üçüncüsü ise Cu varlığında plazmada bulunan süperoksit radikallerini metabolize edebilen Cu-SOD' dur. Mn-SOD içeriği genellikle metabolik aktivitenin

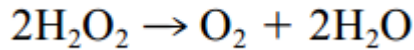
yüksek olduğu beyin, böbrek, kalp, karaciğer gibi dokularda, Cu Zn-SOD içeriği ise merkezi sinir sistemi, karaciğer ve eritrosit hücrelerinde fazla miktarda bulunmaktadır (Ames, Shigenaga, Hagen, 1993; Pietta, 2000; Cuypers vd., 2010; Tekeli, 2013).

SOD, ROT' lardan süperokside bir elektron vererek H₂O₂ 'ye indirgenir (Risom, 2005).



2.2.1.2. Katalaz (KAT)

Peroksizomlarda etkisini gösteren katalaz enzimi Fe⁺³ ve 4 hem grubundan oluşmuş bir hemoproteindir. H₂O₂'yi parçalayıp moleküler oksijen ve suya dönüşümünü sağlayarak oksijen radikallerinin oluşmasını engeller. Karaciğer ve eritrositlerin peroksizomlarında yüksek oranda lokalize olmuştur. Düşük konsantrasyonlardaki H₂O₂'yi GSH-Px parçalarken yüksek konsantrasyonlarında ise KAT enzimi aktiftir. Eritrosit, karaciğer ve böbrekte KAT enzim aktivitesi daha yoğundur (Knight, 2000; Koca, Karadeniz, 2003; Koç ve Üstün, 2008; Meral, Doğan, Kanberoğlu, 2012; Sachdeva, Karan, Singh, Dhingra, 2014).

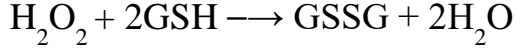


2.2.1.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)

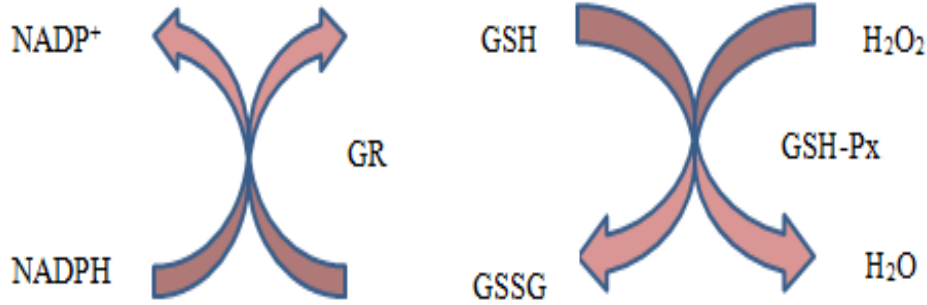
Tetramerik yapıda olan glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimi 4 adet selenyum atomundan oluşmaktadır. Hidroperoksitlerin indirgenmesini sağlar. Redükte glutatyonu yükseltger ve hidrojen peroksidi suya çevirerek membran lipidlerini ve hemoglobini oksidatif strese karşı korur. E vitaminin yetersiz olduğu durumlarda ise hücre membranını peroksidasyonlara karşı korur. Solunumsal patlama sırasında serbest radikallerin oluşturduğu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. Hücrede GSH-Px aktivitesinin azalması H₂O₂ birikimine ve hücre hasarına yol açar. GSH-Px ayrıca lipid peroksidasyonun başlamasını önlemektedir. Etkisini en çok eritrositlerde gösterir.

Ortamda düşük H_2O_2 konsantrasyonunda GSH-Px, KAT'a göre daha aktiftir (Shi, Hudson, Liu, 2004; Stohs ve Bagghi, 2005; Ahmad, Maria, Oliveira, Pacheco, Santos, 2006; Bertin ve Averbek, 2006).

GSH-Px



Peroksidaz enzimi H_2O_2 'yi suya indirgeyerek redükte glutatyonun (GSH) okside glutatyona (GSSG) dönüşümünde öneme sahiptir. Glutatyon redüktaz (GR) enziminin katalizlendiği tepkimede GSSG NADPH varlığında tekrar indirgenmiş hale gelebilmektedir (Şekil 2.4.) (Batır, 2014).

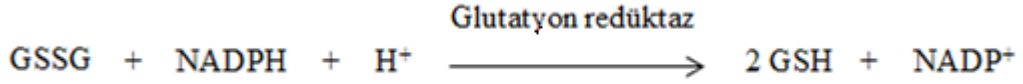


Şekil 2.4. Glutatyon redüktaz (GR) enziminin katalizlediği tepkimede GSSG NADPH oluşumu (Batır, 2014).

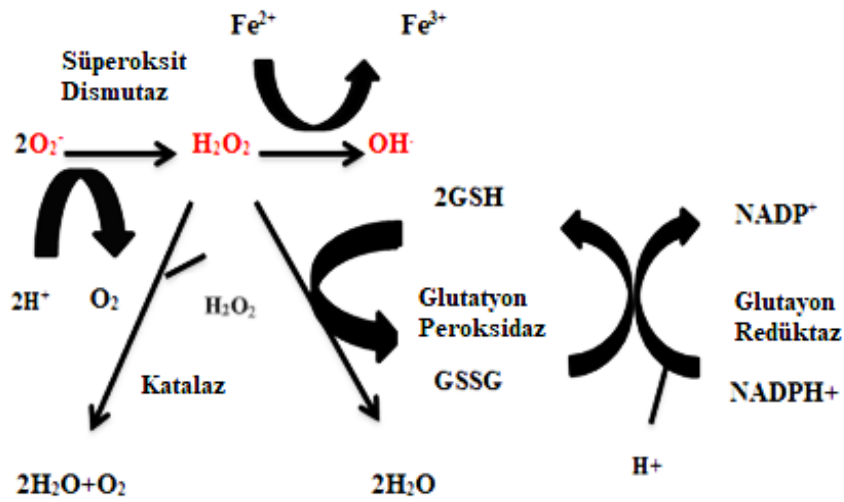
2.2.1.4. Glutatyon Redüktaz (GSH-Rd)

Bir flavoprotein olan glutatyon redüktaz, okside glutatyonun (GSSG) NADPH varlığında tekrar indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüşümünü sağlayan bir dimerdir (Mittler, 2002; Köken, Kahraman, Serteser, Gökçe, 2004; Gök, Kayacıer ve Telli, 2006).

Glutatyonun indirgenme reaksiyonlarında elektronlar NADPH' den FAD' ye aktarılır ve okside glutatyona transfer edilerek disülfidler indirgenir (Aksoy, 2002; Orhan vd., 2003; Gürgöze, Şahin ve Durak, 2007).



Glutatyon enziminin indirgenmiş hali birçok antioksidan enzim (GSH-Px ve KAT) aktivitesi için önemlidir. KAT enzimi azaldığında GSH bağımlı enzimler aktive olur. Selenyum (Se) düzeyindeki azalmada ise GSH-Px ve GSH-Rd aktivitesinde düşüş gözlemlenir (Fleury, Mignotte, Vayssière, 2002; Sayın, Arslan, Güner, 2008; Sabuncuoğlu ve Özgüneş, 2011; Sezer, Keskin, 2014).



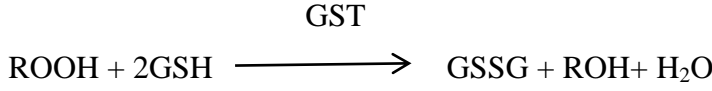
Şekil 2.5. Glutatyon redüktaz aktivitesi (Fleury vd., 2002).

2.2.1.5. Glutatyon S-Transferaz (GST)

Yabancı bileşiklerin karaciğerde merkaptürik asitlere dönüşümünde ve uzaklaştırılmasında rol oynar. Oksidasyon sonucu oluşan ürünlerin, yabancı toksik maddelerin, vücutta bulunan diğer makromoleküller ile birleşmesini önleyip, hücre komponentlerine zarar vermeden vücuttan atılmasını sağlarlar (Fleury vd., 2002).

Glutatyon S-transferazların (GST) indirgeme özelliği, koruyucu etki göstererek membran bileşenlerini lipit peroksidasyonundan korur. GST'ler peroksidaz aktivitesiyle de lipit peroksitlere karşı koruma sağlar. Glutatyon S-transferazların çeşitli bileşikleri metabolize ederek parçalama yetenekleri bulunur. Özellikle pestisid, herbisid, kimyasal kanserojenler, antikanser ilaçları ve çevresel kirlilik gibi ksenobiyotiklerin

detoksifikasyonunda öneme sahiptir (Reiter, Guerrero, Garcia, Acuna-Castoveijo, 1998; Taniyama, Griendling, 2003; Becker, L. B. 2004; Sugamura, Keaney Jr, 2011).



2.2.1.6. Glutasyon Sentaz

Glutasyon sentaz (GST), glutasyonun γ -glutamil sistein (γ -Glu-Cys) ve glisinden ATP-bağımlı sentezini katalizleyerek glutasyonun sentezinden sorumlu enzimdir. Oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı ksenobiyotikleri, karsinojenleri ve ROT'u metabolize ederek korur (Abe, Berk, 1998).

2.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

2.2.2.1. Glutasyon (GSH): Glutasyon; glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan düşük molekül ağırlığa sahip tripeptit yapıdadır. GSSG de indirgenmiş glutasyonun (GSH) yükseltgenmesiyle oluşur. Organizmanın bütün hücrelerinde bulunmakla birlikte özellikle karaciğerde daha aktiftir. Hücrede zararlı bileşiklerin etkisizleştirilmesinde ve toksik metabolitleri uzaklaştırılmasında görev alır. Hücrenin korunabilmesi için glutasyonun büyük kısmının redükte halde tutulması gereklidir. Antioksidan enzimlere substrat görevi yapar ve radikal tutucusu gibi davranır. Özellikle peroksidaz ve redüktaz enzimlerinin aktiviteleri için önemli olup hücrenin okside-redüksiyon dengesini sağlar. Oksidatif stresin belirlenmesinde glutasyon düzeyleri önemli bir parametredir (Von Harsdorf, Li, Dietz, 1999; Cai ve Harrison, 2000; Giordano, 2005; Taverne, Bogers, Duncker, Merkus, 2013).

2.2.2.2. E Vitamini: E vitamini önemli bir antioksidan olup bileşiminde alfa, beta, gama ve delta tokoferollerini bulundurur. En yaygın ve en aktif olanı d- α -tokoferoldür. Hücre membranlarında oksijen radikallerinin ana temizleyicisidir ve lipit peroksidasyonunu önler. Zincir kırıcı antioksidan olarak da fonksiyon görür. E vitamini

formları sadece yağda çözünür (Kukreja, Hess, 1992; Muscari, Giaccari, Giordano, Clô, Guarnieri, Caldarera, 1996; Sabri, Hughie, Lucchesi, 2003; Chen ve Keaney, 2012).

2.2.2.3. C Vitamini: Hücre zarında bulunup seçici geçirgen özelliği sayesinde zarı geçebilir ve suda eriyebilmektedir. Süperoksit ve hidroksil radikalleriyle reaksiyona girip onları temizler. Bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi, kemik ve dişlerin gelişimi, yaraları iyileştirmesi ve dokuları yenilemesi gibi önemli görevleri vardır. Ayrıca kalp hastalıklarına karşı koruyucudur (Kukreja, Hess, 1992; Muscari vd., 1996; Sabri vd., 2003; Chen ve Keaney, 2012).

2.2.2.4. Melatonin: Lipofilik bir antioksidan olup pineal bezden salgılanır. Tümör oluşumunu engellemesi, hidroksil radikallerini temizlemesi, immun sistemin düzenlemesi ve üreme fonksiyonlarının kontrolü gibi çeşitli görevlere sahiptir (Kukreja, Hess, 1992; Muscari vd., 1996; Sabri vd., 2003; Chen ve Keaney, 2012).

2.2.2.5. Albümin: Hipokloröz asit (HOCl) radikalini toplama, proteinleri ve Cu gibi geçiş metallerini bağlama görevi vardır (Kukreja, Hess, 1992; Muscari vd., 1996; Sabri vd., 2003; Chen ve Keaney, 2012).

2.3. Kadmiyum, Kurşun, Demir ve Bakırın Genotoksisite İle İlişkisi

Cd hücresele düzeyde çoğalmayı, farklılaşmayı etkiler ve apoptoza neden olur. Amerika Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı (IARC) tarafından kanserojen olarak sınıflandırılmış ve insan toksinojeni olarak kabul edilmiştir. Hücrelerde Cd birikimi iskelet sisteminde tahribata neden olur osteoporozu tetikler. Kadmiyumun dolaylı etkileri incelendiğinde reaktif oksijen türlerinin oluşumunu tetiklediği ve DNA'da tek zincir kırıklıkları gibi genotoksik mekanizmaları aktive ederek DNA tamirinin inhibe edilmesine neden olduğu bildirilmiştir (Dimmeler ve Zeiher, 2000). Cd ayrıca gen ekspresyonunu ve sinyal iletimini modüle ederek antioksidan savunma sisteminde görevli proteinlerin aktivitesini azalttığı rapor edilmiştir (Seddon, Looi, Shah, 2007). Ayrıca protoonkogen aktivasyonunu tetikleyerek apoptozun inhibe edilmesine ve kanserleşmeye neden olabileceği bildirilmiştir (Dimmeler ve Zeiher, 2000). Cd birikimi

böbrek, testis, karaciğer, akciğer ve plasenta gibi dokularda hasarlar oluşturabilmektedir. Cd'nin kardiyovasküler sistem üzerine yapılmış olan çalışmalarında, hastalıklar açısından riski arttırdığı ileri sürülmüştür. Cd birikimi kan hücrelerindeki bozukluklara ve anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) seviyesinin yükselmesine bağlı olarak hipertansiyon ve diğer kardiyovasküler hastalıkların artmasını tetikleyebileceği rapor edilmiştir (Basta vd., 2005).

Fe, birçok canlının yaşamsal faaliyetlerini devam ettirebilmesi için gerekli bir elementtir. Erişkin bir insan vücudunda ortalama 3-4 gram Fe bulunmakta olup günlük Fe ihtiyacı yaklaşık 10 mg.'dır. Kadın ve çocukların Fe ihtiyacı erkeklere göre daha fazla olup kalp hücrelerinde Fe miktarı daha yoğundur. Hücrelerdeki Fe seviyesi çok yükseldiğinde toksik etkisi; DNA'da hasar, protein, lipid ve karbonhidrat metabolizmasında bozulma, hücre proliferasyonundaki bozukluklar şeklinde görülebilmektedir. Ayrıca parkinson, alzheimer gibi hastalıklar ve kolon kanserinin oluşum mekanizmasında da Fe'nin toksik etkisi rapor edilmiştir. Fe fazlalığı sonucu ortamdaki serbest Fe, prooksidan olarak serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olabilmektedir. Vücutta Fe depolanma hastalığı olan hemakromatoziste ölüm sebebinin kalp yetmezliği ve aritmiler olduğu bildirilmiştir (Basta vd; 2005; Atsak, 2006).

Jüvenil Hemokromatozis (JH) (Tip 2), genellikle 30 yaşından önce görülen ve otozomal resesif genlerle taşınabilen bir hastalıktır. Hücrelerde hızlı ve yüksek oranda Fe birikimi JH'de kalp yetersizliğine, hipogonadizm ve kardiyomiopatiye neden olabileceği rapor edilmiştir (Atsak, 2006).

Fe'nin tümör hücreleri tarafından kullanılıp özellikle bağırsakta iltihaplanmayı başlatarak kolon kanserinin oluşum mekanizmasında etkili olabileceği rapor edilmiştir (Çelen, Şenol, Müezzinoğlu, 2011). Yapılan çalışmalarda kanserin Fe miktarını arttırdığı gözlemlenmiştir. İndirgeyici aktif bir iyon olan Fe biyolojik sistemlerde reaktif oksijen radikallerinin oluşumunda rol oynar. Fe eksikliği de oksidatif DNA hasarı meydana getirebilmektedir (Türküzü ve Şanlıer, 2014).

İnsan vücudu günde 1-2 mg kadar Pb'yi vücuttan uzaklaştırabilme yeteneğine sahiptir. Kandaki Pb konsantrasyonunun 0.2 µg/ml limitini aşması, sağlık üzerinde olumsuz etki oluşturur. Bebekler ve çocuklarda Pb oranı düşük olup, ilerleyen yaşla

birlikte artış gösterdiği bildirilmiştir (Parlakpınar, Koç, Acet, 2004; Türközü ve Şanlıer, 2014).

Yüksek konsantrasyondaki Pb'ye maruziyet; akut olarak proksimal renal tübüler hasara, sinir sistemi bozukluklarına, anemiye, böbrek yetmezliğine, görme bozukluklarına, akciğer ve mide kanserine, beyinde tümör oluşumuna ve D vitamini metabolizmasında bozukluklara neden olmaktadır (Türközü ve Şanlıer, 2014).

Ratlarda yapılan bir çalışmada Pb'ye maruz kalmış türlerde, oksidatif stres ile beyindeki histopatolojik değişimler arasındaki ilişki incelenmiş, kurşun asetatın ratların beyinlerinde oluşturduğu hasarın önemli bir bölümünün oksidatif stres kaynaklı olduğu sonucuna varılmıştır (Türközü ve Şanlıer, 2014).

Cu, organizmalar için hem esansiyel hem de toksik bir mineral olup birçok protein için kofaktör özellik gösterir. İnsanlarda ortalama 1,5–2,5 mg kadar Cu bulunur. Organizmalarda hemoglobin sentezi için gerekli olup Fe'nin serbest hale geçmesini ve kolay absorpsiyonunu sağlar. Vücutta Cu fazlalığının özellikle karaciğerde etkisini gösterdiği rapor edilmiştir (Parlakpınar, Koç, Acet, 2004). Cu'nun absorpsiyonu çok yavaş olup yüksek dozları toksik olabilmektedir. Karaciğerde yüksek Cu konsantrasyonunun kandaki serbest Cu miktarında artışa neden olduğu, kırmızı kan hücrelerinin hemolize olmasına ve sarılık hastalığının oluşumunu tetikleyebileceği rapor edilmiştir (Özkan, 2005).

Yapılan çalışmalarda kadınların kan serumundaki yüksek miktarda Cu'nun kardiyovasküler hücrelerde trombotik trombositopenik purpura hastalığına yakalanma riskini arttırabileceği rapor edilmiştir (Özkan, T. B. 2005; Tuzun, 2009).

Cu, mitokondrial enerji üretiminde (sitokrom-c oksidaz), Fe homeostazında, serbest oksijen detoksifikasyonunda, bağ doku formasyonunda, dopamin ve melanin biyosentezinde rol oynar (Güven, Kahvecioğlu, Kartal, Timur, 2004; Alpkent ve Demir, 2006)

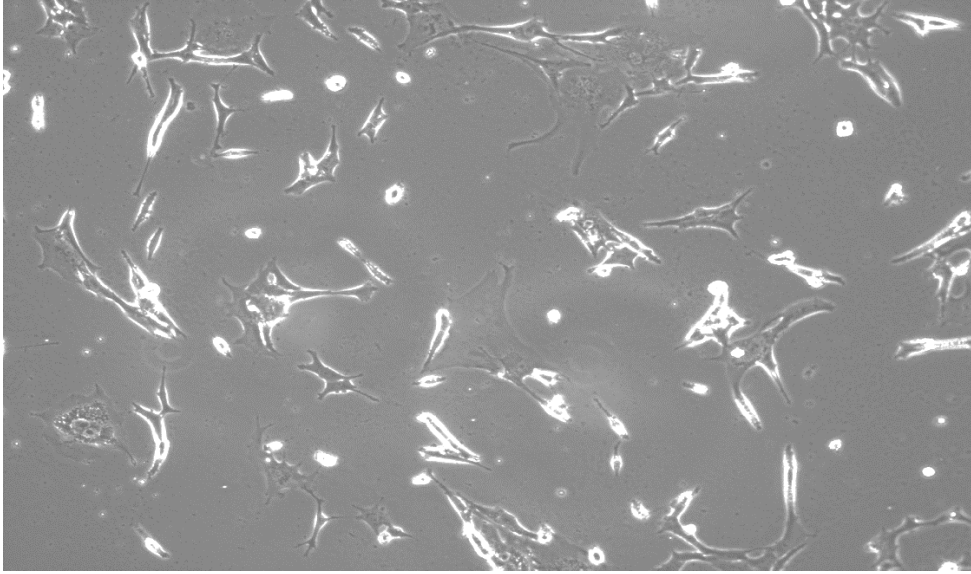
Apoptoz, programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır. Sağlıklı bireylerin hücrelerinde yapım ve yıkım olayları bir denge içerisinde olup programlı bir döngü halinde çalışmaktadır. Hücreler bazı durumlarda program dışı da apoptoza gidebilmektedir. Özellikle yediğimiz hormonlu gıdalar, çevreden ağır metallerle maruz kalma, sigara tüketimi, kirli hava ve stres gibi durumlarda hücreler oksidatif strese bağlı

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD

3.1. Hücre Hattı

Çalışmada Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonundan (ATCC) temin edilen insan aorta düz kas T/G HA-VSMC ATCC®CRL-1999 hücre hattı kullanıldı (Şekil 3.1.). Bu hücrelerin kadın aorta düz kas dokusundan izole edildiği bildirilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmamızda kullandığımız T/G HA-VSMC ATCC®CRL-1999 fibroblastoma hücrelerinin invert ışık mikroskobu altındaki görüntüsü (10X büyütme ile)

3.1.1. Hücre Hattı Besiyeri

T/G hücreleri için uygun besiyeri modifiye edilmiş Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM), içerisinde 56°C'de sıcaklıkta 30 dakika (dk) bekletilen

Fetal Sığır Serum (FBS) % 5 alınarak Penisilin/Streptomisin antibiyotik karışımından % 1 olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyeri kontaminasyondan uzaklaştırmak için 4°C sıcaklıkta 50 ml hacminde falkon tüplere bölünerek dolapta muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Hücrelerin Kültüre Alınması

Donmuş olarak bekletilen hücreler çözündürülüp üzerine besiyeri eklenmiştir. 1.500 rpm' de 2 dk santrifüj edilmiştir. Dimetil sülfoksit (DMSO) içeren besiyeri çöken hücrelerden dikkatli bir şekilde ayrılıp atılmıştır. Hücre pelletinin üzerine besiyeri eklenip iyice karışmaları sağlanmıştır. 25 cm²'lik flakslara ekilmiştir. Hücre ekimi yapılan flakslar 37°C'de % 5 CO₂ içeren steril inkübatörde kültüre alınmıştır.

3.1.3. Hücrelerin Pasajlanması

Yeterli yoğunluğa ulaşmış hücreler oluşturulmak için flaksta bulunan besiyeri dökülmüştür. 37°C sıcaklığa getirilmiş Tripsin-EDTA eklenerek hücrelerin tabandan kalkması için 10 dk etüvde bekletilmiştir. Hücre tripsin karışımı 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktararak 1.500 rpm' de 2 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre pelleti besiyerinde karıştırılıp flakslara ekilmiş ve invert ışık mikroskopunda yoğunluğu kontrol edilmiştir.

3.1.4. Hücrelerin Dondurulması

Hücreler kaldırılıp tripsinize edilerek santrifüjde çöktürülmüştür. %5 DMSO içeren besiyeri üzerine eklenip iyice karışması sağlanmıştır. 2 ml'lik kriyojenik viallere bölünüp, kriyojenik vialler 24 saat -80°C'de derin dondurucuda bekletilmiş ve sıvı azota alınmıştır.

3.1.5 Hücrelere Metal Uygulaması

Fe, Cu, Pb ve Cd ağır metallerin Çizelge 3.1.'de verilen konsantrasyonlarda karışımları hazırlanmış 24 ve 48 saat süre ile uygulama yapılmıştır.

Çizelge 3.1. Hücrelere uygulanan Miks 1 ve Miks 2'nin içeriği ve miktarları

Ağır Metal	Miks 1	Miks 2
Demir (Fe)	200 µg/L	2000 µg/L
Bakır (Cu)	2000 µg/L	20000 µg/L
Kurşun (Pb)	10 µg/L	100 µg/L
Kadmiyum (Cd)	5 µg/L	50 µg/L

3.2. Genetik Analizler

3.2.1. DNA İzolasyonu

Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda ağır metal karışımı uygulanan T/G HA-VSMC hücrelerinin 24 ve 48 saatlik kültürlerinden genomik DNA'lar DNeasy® Tissue- Blood (Qiagen, USA) kit ile kit protokolü kullanılarak aşağıdaki protokole göre izole edilmiştir (Öngören, 2016).

1. Hücreler uygulama sürelerinin sonunda tripsin ile flaks tabanından kaldırılarak 2ml'lik tüplere alınmış ve paslanmaz çelik bilya ile doku parçalayıcıda parçalanmıştır.
2. Parçalanmış hücrelerin üzerine 180 µl ATL tamponu eklenip karıştırıldıktan sonra 56°C'de 20 µl proteinaz K eklenerek 3 saat bekletilmiştir.
3. Bekletilen karışımın üzerine 200 µl AL tamponu eklenerek iyice vortekslenmiştir.
4. Üzerine 200 µl etanol (96-100 %) eklenerek vortekslenmiştir.
5. Tüm karışım kit içerisinde bulunan kolonlu yeni tüpe konularak 6000 g de santrifüj edilmiş, kolonun altındaki tüp ve sıvı atılarak yeni tüp konmuştur.
6. Kolona 500 µl AW1 tamponu eklenmiş ve 6000 g de 1 dk santrifüj edilerek alttaki tüp atılmıştır.

7. Kolona 500 µl AW2 tamponu eklenmiş ve 20.000 g de 3 dakika santrifüj edilerek alttaki tüp atılmış ve kolon yeni bir kapaklı tüpe alınmıştır.
8. Membranın tam ortasına 60 µl AE tamponu eklenmiş, oda sıcaklığında 1 dk bekletildikten sonra 6000 g de 1 dakika santrifüj edilerek DNA izole edilmiş ve miktarı (Optizen, Nano Q) ile belirlenmiştir.

3.2.2. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik Farklılık; RAPD Yöntemi

DNA izolasyonu sonucunda kontrol ve uygulama gruplarından elde edilen total DNA'lar, PCR reaksiyonu öncesi nükleaz içermeyen su kullanılarak 25 ng/µl konsantrasyona sulandırılmış ve kalıp DNA olarak kullanılmıştır. RAPD-PCR analizi için 25 µl PCR reaksiyonu hazırlanmıştır (Çizelge 3.2.) (Öngören, 2016).

Çizelge 3.2. RAPD PCR için gerekli malzemeler

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

Tüm örnekler PCR tüplerine pipetlendikten hemen sonra tüpler Applied Biosystems® ProFlex™ PCR cihazına konulup PCR işlemi yapılmıştır. PCR işleminde döngüler sırasıyla; 95°C - 3 dk 1 defa, 95°C - 30 saniye (sn) 40 defa, 37°C - 30 sn 40 defa, 72°C 90 sn 40 defa ve son olarak 72°C - 30 dk 1 defa olacak şekildedir. Çalışmada Çizelge 3.3.'te dizileri verilen 10-15 bazlık 12 farklı RAPD primeri kullanılmıştır (Çizelge 3.3.).

Çizelge 3.3. RAPD analizinde kullanılan primerler ve baz dizileri

Primer İsmi	Baz Dizisi
P₂	5' GTA GTC GAC G-3'
OPB05	5' TGC GCC CTT C-3'
1OPA	5' CAG GCC CTT C-3'
2OPA	5' TGC CGA GCT G-3'
M13	5' GAG GGT GGC GGT TCT-3'
ALU-2	5' GAC CCG CAC C-3'
1253	5' GTT CCG CCC C-3'
SP₂	5' GGG CAT CGG C-3'
7OPA	5' GAA ACG GGT G-3'
23OPC	5' GTT GCC AGC C-3'
RAPD₂	5' CCG ATA TCC C-3'
RAPD6	5' CAG GCC CTT C-3'

Elde edilen PCR ürünleri % 2 agaroz jel + ethidium bromit, 2×TAE (Tris 1.6 M, asetik asit 0.8 M, EDTA 40 mM) tampon içerisinde 6 saat süre ile yürütülmüştür.

Moleküler ağırlık standardı olarak 100-3000 bp'lik DNA Ladder (Geneaid) kullanılmıştır. Elde edilen bantlar UV transilluminator (Infinity Capture, Vilber Lourmat) ile fotoğraflanmış ve moleküler ağırlık (baz çifti) analizleri yapılmıştır (Öngören, 2016).

3.2.3. RNA İzolasyonu

Kontrol ve uygulama yapılan hücrelerden uygulamanın 24. ve 48. saatlerinde RNA izolasyonu Ambion® RNA Kiti (Life Technologies) kit protokolüne göre yapılmıştır. Bu protokole göre; her 1 ml lizis tamponu içerisinde % 2'lik 2-merkaptoetanol olacak şekilde lizis solüsyonu hazırlanmıştır. 25 cm²'lik flakslarda kontrol ve uygulama yapılmış olan hücrelerin besiyeri uzaklaştırılmış, lizis solüsyonu eklenmiş ve 20 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra lizis olan hücrelerden RNA izolasyonu yapılmıştır. Hücre lizatının üzerine 1:1 oranında % 70'lik etanol eklenip vortekslenmiştir. Oluşan karışım spin kolonlara aktararak 25°C'de 12.000 g de 15 sn santrifüj edilmiş ve altta biriken sıvı atılmıştır. Kolon üzerine 700 µl birinci yıkama tamponu eklenerek 25°C' de 12.000 g de 15 sn santrifüj edilmiş ve santrifüj sonrası spin kolonların alt tüpleri içindeki sıvıyla birlikte atılmıştır. Kolon üzerine 500 µl ikinci yıkama tamponu eklenerek 25°C'de 12.000 g de 15 sn santrifüj edilerek santrifüj

sonrası altta kalan sıvı atılmıştır (Bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır). Kolon üzerindeki membranın kuruması için 25°C'de 2 dk 12.000 g'de santrifüj edilmiş ve alttaki tüp atılarak kuruyan kolon 1,5 ml hacminde steril toplama tüplerinin içine alınmıştır. Kolonun tam merkezine 30 µl RNaz içermeyen su pipetlenerek oda ısısında bir dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası oda sıcaklığında 12.000 g de 2 dk santrifüj edilerek tüpün dibinde toplanan RNA miktarları Nanodrop cihazında (Optizen, Nano Q) ölçülmüş ve cDNA sentezlenmiştir (Öngören, 2016).

3.2.4. cDNA Eldesi

Kontrol ve uygulama yapılan deney hücrelerinden elde edilen RNA'ların, komplementer DNA'sının elde edilebilmesi için High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) kullanılmıştır. PCR reaksiyonu kit protokolüne göre gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.4. Bir reaksiyonluk cDNA ana karışımı için gerekli malzemeler

Malzeme	Miktar
10X Ters transkripsiyon tamponu	2 µl
25X dNTP karışımı (100 mM)	0,8 µl
10X Ters transkripsiyon rastgele primerleri	2 µl
Multi Scribe™ Ters transkriptaz	1 µl
Nükleaz içermeyen H ₂ O	4,2 µl
Toplam	10 µl

200 µl'lik PCR striplerine, 10 µl RNA, 10 µl cDNA ana karışımından pipetlenmiştir. Reaksiyon karışımı PCR cihazında (Applied Biosystems) 25°C'de 10 dk; 37°C'de 120 dk ve 85°C'de 5 dk tutularak cDNA sentezlenmiştir. Elde edilen cDNA'lar analizlerde kullanılmak üzere -20°C dondurucuda saklanmıştır.

3.2.5. Kantitatif Real Time-PCR (qRT-PCR) Analizleri

İnsan aorta düz kas hücrelerinde, Cd, Pb, Fe ve Cu gibi elementlerin karışımının farklı konsantrasyon uygulamaları sonucunda Cu Zn-SOD, Mn-SOD, KAT, GST,

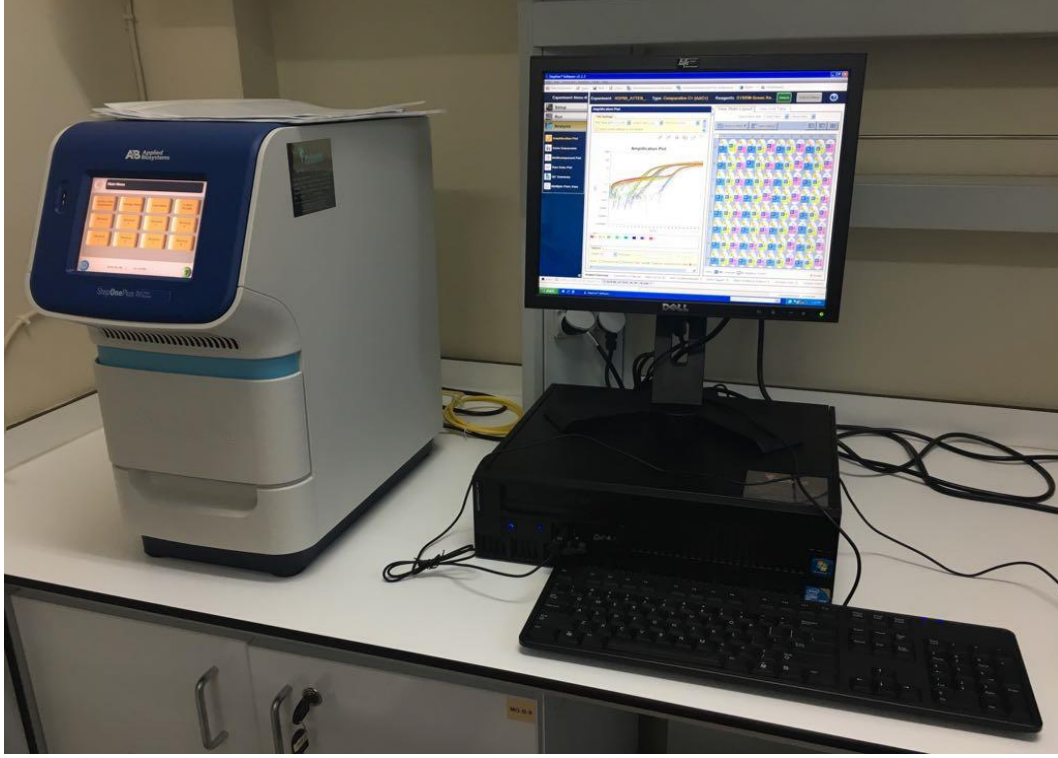
HSP27, HSP60, HSP70, P53, PUMA, NOXA, BCL2, BAX, SİTOKROM-C, KASPAZ-8, EXO1 ve P21'in, gen ifadelerindeki değişimler qRT-PCR yöntemi ile Çizelge 3.5.'te dizileri verilen primerler ile analiz edilmiştir. Kalibrasyon ve düzeltme faktörü olarak ise GAPDH (gliseraldehid 3 fosfat dehidrojenaz) geninin anlatımı kullanılmıştır.

Çizelge 3.5. qRT PCR için kullanılan primer çiftleri, dizileri ve uzunlukları

Gen Adı		Primer Dizilimi	Primer Uzunluğu (bç)
GAPDH	İleri	CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT	24
	Ters	AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC	24
CuZn-SOD	İleri	GTTTCGGTGACAACACCAATG	20
	Ters	GGAGTCGGTGATGTTGACCT	20
Mn-SOD	İleri	TCTGAAGAAGGCCATCGAGT	20
	Ters	GCAGATAGTAGGCGTGCTCC	20
KAT	İleri	TACGAGCAGGCCAAGAAGTT	20
	Ters	ACCTTGTACGGGCAGTTCAC	20
GST	İleri	TTCCTTACTGGTCCACATCTC	23
	Ters	TCACCGGATCATGGCCAGCA	20
HSP27	İleri	GCCCCGACGCCCATCTACGAG	22
	Ters	GAGCACGCCATCCGACGACAGC	22
HSP60	İleri	GTCGCGCCCCGTTAGCAC	18
	Ters	CATCGCGTCCCACCTTCTTCAT	22
HSP70	İleri	CGAGETCGACGCATTGTTTG	20
	Ters	GAGTGGATCCGCCGACGAGTA	21
P53	İleri	CACGAGCGCTGCTCAGATAGC	21
	Ters	ACAGGCACAAACACGCACAAA	21
PUMA	İleri	CAGACTGTGAATCCTGTGCT	20
	Ters	ACAGTATCTTACAGGCTGGG	20
NOXA	İleri	GTGCCCTTGGAACCGGAAGA	20
	Ters	CCAGCCGCCAGTCTAATCA	20
BCL2	İleri	ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA	20
	Ters	ACAGTTCCACAAAGGCATCC	20
BAX	İleri	TTCATCCAGGATCGAGCAGA	20
	Ters	GCAAAGTAGAAGGCAACG	18
SİTOKROM-C	İleri	AGTGGCTAGAGTGGTCATTATTACA	27
	Ters	TCATGATCTGAATTCTGGTGTATGAGA	26
KASPAZ-8	İleri	AGAGTCTGTGCCAAATCAAC	21
	Ters	GCTGCTTCTCTTTGCTGAA	21
EXO ₂	İleri	GACCATTTACCACCCACTTT	21
	Ters	TGAGACTCATCGTCACTGGACTC	23
P21	İleri	GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA	20
	Ters	GACTCTCAGGGTCGAAAACG	20

qRT-PCR analizinde daha önce elde ettiğimiz cDNA'lar kullanılmıştır. 96 kuyucuklu reaksiyon plakasında, her bir kuyucuğa toplam hacim 12 µl olacak şekilde primer, syber green, su ve cDNA pipetlenmiştir. qRT-PCR cihazında (Şekil 3.2.) reaksiyon; 1 defa tekrarlanan 2 dk 50°C ve 10 dk 95°C, bunu takiben 40 defa

tekrarlanan denatürasyon 95°C’ de 15 sn ve annelling (primer eşleşmesi), elongasyon (primer uzaması) (60°C ‘de 1 dk) olacak şekilde başlatılmıştır.



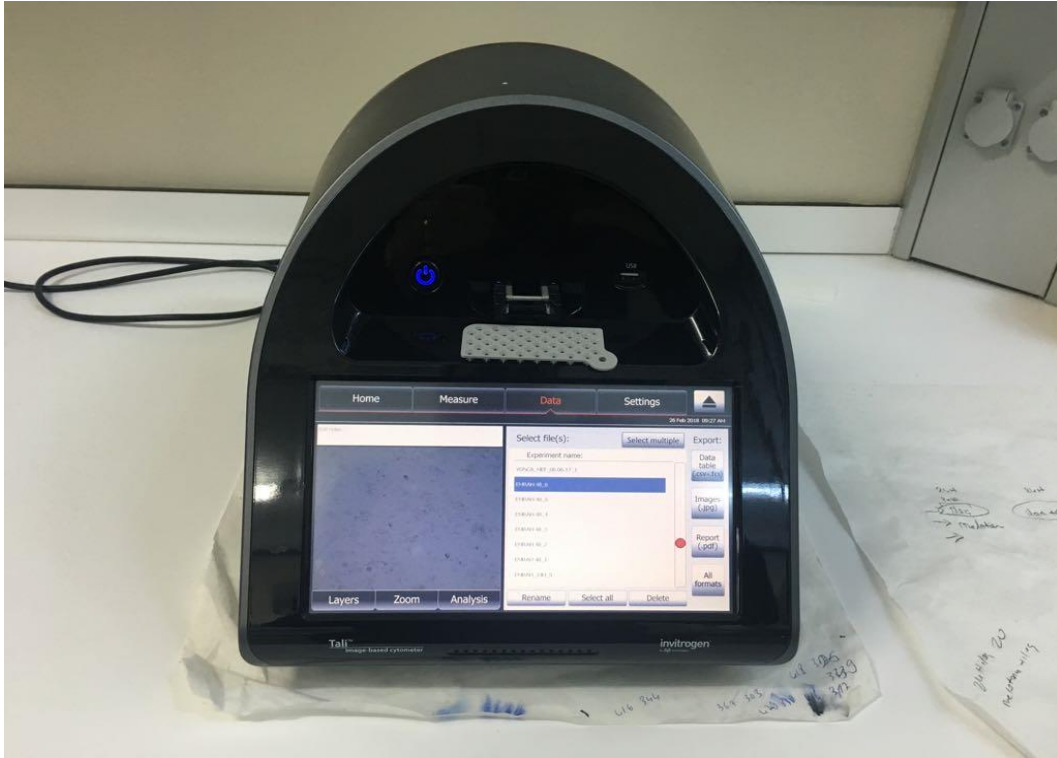
Şekil 3.2. Kantitatif gerçek zamanlı PCR cihazı (qRT PCR)

3.2.6. Tali Görüntü Tabanlı Sitometre Analizi

Tali görüntü tabanlı sitometre ile apoptoz tayin çalışmaları Tali® Apoptosis Kit-Anneksin V (AlexaFluor® 488) ve Propidyum İyodid (Life Technologies) kiti kullanılarak kit prosedürüne göre yapılmıştır. Anneksin V yalnızca apoptotik hücelere bağlanan ve Tali sitometre cihazında (Şekil 3.3.) yeşil floresanda ışımaya yapan bir moleküldür. Propidyum İyodid ise yalnızca ölü hücelerin zarlarından geçen ve Tali sitometre cihazında kırmızı ve (veya) sarı ışımaya veren bir moleküldür.

Ekimi yapılan hücelere belirlenen konsantrasyonlarda madde uygulaması yapılmış, 24 ve 48 saat inkübasyona bırakılan hüceler flakslardan alınmıştır. Tali® Apoptosis Kit protokolüne göre; flakslardan besiyeri uzaklaştırılıp tripsinize edilen hüceler 1.000 g de 2 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Çöken hücelerin üzerine 100 µl 1X Annexin bağlanma tamponu ilave edilmiş ve bu karışımın her 100 µl’si için 5

μl Annexin V ilave edilerek vortekslenmiştir. Oda sıcaklığında karanlık ortamda 20 dk inkübe edildikten sonra hücre karışımı 1.500 g de 2 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Pelletin üzerine 100 μl 1X Annexin bağlanma tamponu eklenerek vortekslenmiştir. Bu karışıma 1 μl Propidyum İyodür solüsyonu eklenerek karanlık ortamda 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında tüpler içerisindeki hücre karışımından 25 μl alınarak TALİ® kiti ile alınan özel lamlara pipetlenerek Tali sitometre cihazı (Invitrogen, TALİ® Image Based Cytometer) ile analizi yapılmıştır.



Şekil 3.3. Tali sitometre cihazı

3.3. İstatistik Analiz

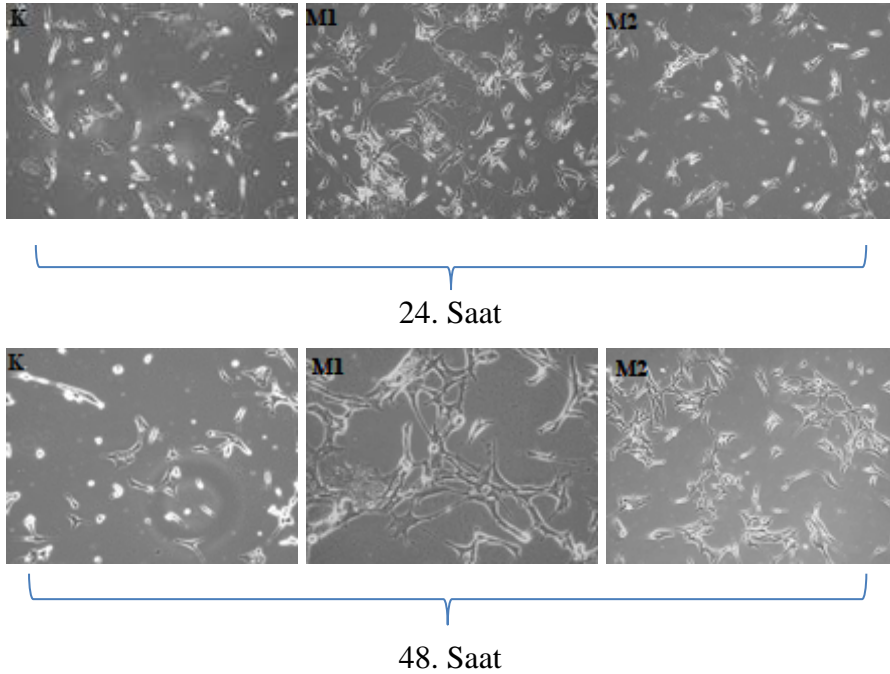
Real Time PCR çalışmalarında gruplar arasında gen ekspresyon farklarının belirlenmesinde $\Delta\Delta\text{Ct}$ metodu ayrıca kalibrasyon eğrisi ve düzeltme faktörü olarak GADPH gen ekspresyonu kullanılmıştır. Kontrol grubu ve deneme gruplarının karşılaştırılmasında tek yönlü ANOVA testi yapılmış ve ortalamaların girdiği gruplar Duncan Testi ($p \leq 0.05$) ile belirlenmiştir. Yapılan analizlerin tamamında SPSS 20 (üniversite lisanslı) ve PAUP demo versiyon istatistik paket programları kullanılmıştır (Öngören,2016).

BÖLÜM 4

SONUÇLAR

4.1. 24. ve 48. Saatte Farklı Konsantrasyonlarda Hazırlanan Ağır Metal Karışımlarının İnsan Aorta Düz Kas Hücre Morfolojisi Üzerine Etkileri

Kontrol grubu hücreler ile ağır metal karışımı uygulanan 24 ve 48 saatlik hücrelerin morfolojilerini mikroskopik olarak karşılaştırdığımızda kontrol grubu hücrelerin daha net, keskin ve bir bütün halinde olduğu, ağır metal uygulanan hücrelerin ise artan konsantrasyon ve zamana bağlı olarak morfolojilerinde parçalanmalar ve küçülmeler olduğu gözlemlenmiştir.



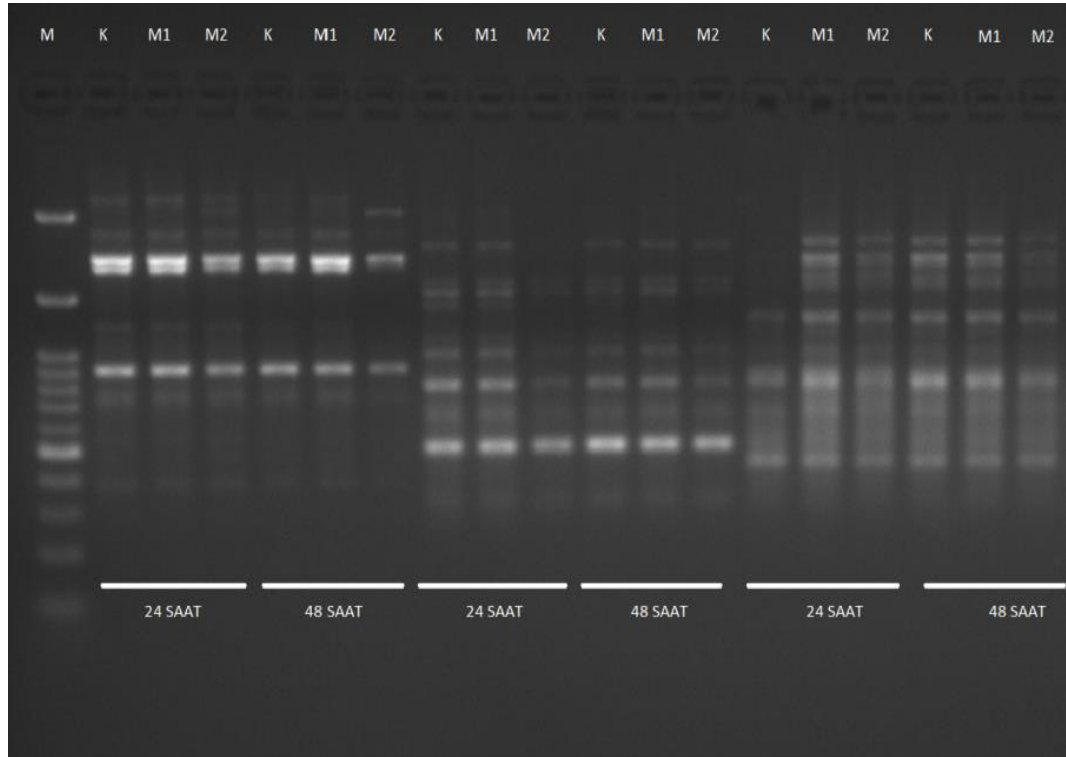
Şekil 4.1. Kontrol grubu hücreleri ile ağır metal miks uygulanan hücrelerin morfolojik karşılaştırılması (K: kontrol, M1: miks1, M2: miks2)

4.2. RAPD DNA Polimorfizmi

İki ayrı zamanda, farklı konsantrasyonlarda Cd, Pb, Fe, Cu karışımı uygulanan deney hücreleri T/G HA-VSMC'nin kontrole göre DNA polimorfizmlerinin tespit edilmesinde anlamlı sonuç veren 12 farklı primere ait agaroz jel görüntüleri, kontrole göre kaybolan ve yeni oluşan bantların baz çifti değerleri her bir primer için tek tek analiz edilmiştir.

4.2.1. P2, OPB05, 1OPA Primerleri

Kontrol ve ağır metal miks uygulanan deney hücrelerinde farklı konsantrasyonlardaki 24 ve 48 saatlik hücre kültürlerinde sırasıyla P2, OPB05 ve 1OPA primerlerine ait agaroz jel görüntüsü Şekil 4.2.'de verilmiştir. Agaroz jel görüntüsüne göre yapılan analizler sonucunda ağır metal miks uygulanan hücrelerde kontrole göre yeni bantların oluştuğu veya varolan bantların kaybolduğu tespit edilmiş ve bu bantların baz çifti değerleri Çizelge 4.1.'de verilmiştir.



Şekil 4.2. P2, OPB05, 1OPA primerleri jel görüntüleri (M; marker, K; kontrol, M1; miks 1, M2; miks 2)

Çizelge 4.1. Ağır metal miks uygulaması yapılan insan aorta düz kas hücrelerinde P2, OPB05 ve IOPA primerlerinde kontrole göre yeni oluşan (Y) ve kaybolan (K) bantlar (baz çifti)

P2							
24. saat				48. saat			
Kontrol		Miks 1	Miks 2	Kontrol		Miks 1	Miks 2
3331;2683; 2185;2005; 1537;1231; 917;757; 381	Y K	1258	-	3331;2654; 2185;2055; 1258;925; 766	Y K	2005;1244	3153;2265
		1537;1231; 381	2005;1537; 381			2055;1258	3331;2185; 1258;766
OPB05							
24. saat				48. saat			
Kontrol		Miks 1	Miks 2	Kontrol		Miks 1	Miks 2
2484;1789; 1616;1471; 1141;1029; 842;663; 521	Y K	2541	538	2541;1767; 1596;1105; 1019;933; 842;527	Y K	2512;1009;532	2573;1906; 1576
		2484	2484;1471; 1141;1029; 663;521			2541;1019;527	2541;1767; 1596;1105;933
IOPA							
24. saat				48. saat			
Kontrol		Miks 1	Miks 2	Kontrol		Miks 1	Miks 2
1341;842; 467	Y K	2569;2132; 1931;1313	2512;2132; 198;170	2569;2132; 1931;1722; 1327;825; 457	Y K	2055;817	2484
		1341	-			1931;825	2569;1931

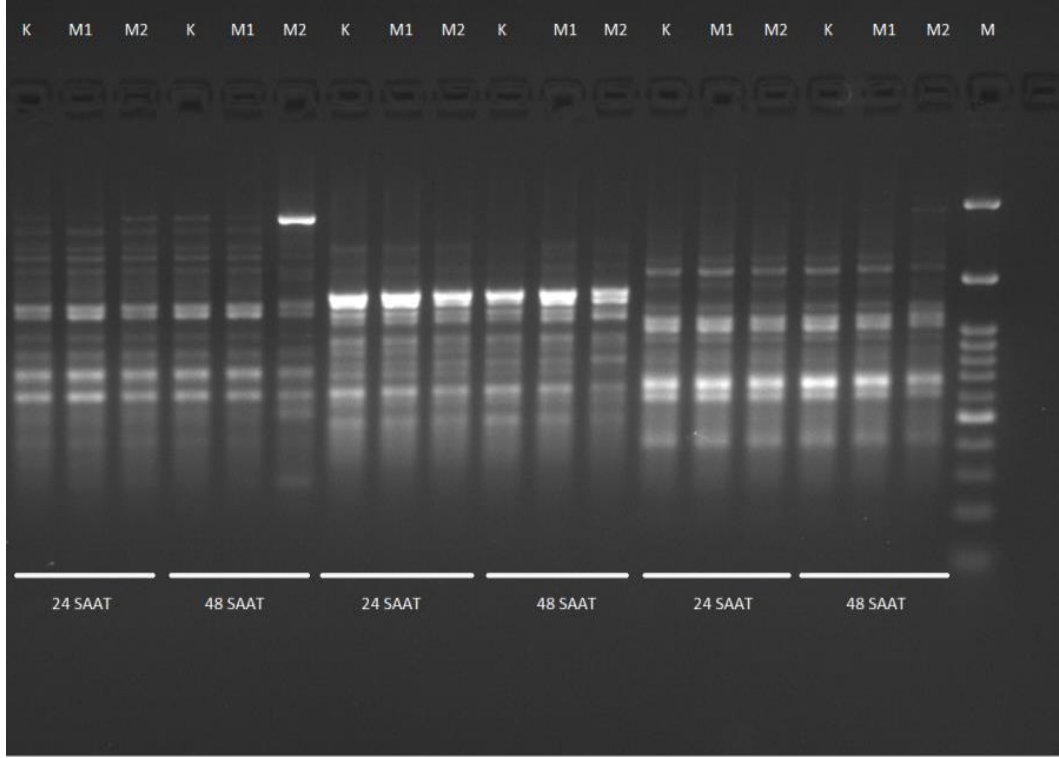
Çizelge 4.1.'e göre P2 primerinde kontrolde 766-3331 bç. arasında 7 tane bant tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 24 ve 48 saatlik ağır metal miks uygulanan hücrelerde en fazla bant değişimi, uygulamanın 48. saatinde miks 2'de olduğu belirlenmiştir. Belirtilen karışım ve uygulama süresinde 48 saat bekletilen miks 2 karışımındaki hücrelerde 2 tane bantın yeni oluştuğu 4 tane bantın ise kaybolduğu, toplam 6 tane bantta değişim görüldüğü tespit edilmiştir.

OPB05 primerinde kontrolde 527-2541 bç. arasında 8 tane bant tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 24 ve 48 saatlik ağır metal miks uygulanan hücrelerde en fazla bant değişimi uygulamanın 48. saatinde miks 2’de olduğu belirlenmiştir. Belirtilen karışım ve uygulama süresinde 48 saat bekletilen miks 2 karışımındaki hücrelerde 3 tane bantın yeni oluştuğu 4 tane bantın ise kaybolduğu, toplam 6 tane bantta değişim görüldüğü tespit edilmiştir.

1OPA primerinde kontrolde 467-1341 bç. arasında 3 tane bant tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 24 ve 48 saatlik ağır metal miks uygulanan hücrelerde en fazla bant değişimi uygulamanın 24. saatinde miks 1’de olduğu belirlenmiştir. Belirtilen karışım ve uygulama süresinde 24 saat bekletilen miks 1 karışımındaki hücrelerde 4 tane bantın yeni oluştuğu 1 tane bantın ise kaybolduğu, toplam 5 tane bantta değişim görüldüğü tespit edilmiştir.

4.2.2. 2OPA, M13, ALU-2 Primerleri

Kontrol ve ağır metal miks uygulanan deney hücrelerinde farklı konsantrasyonlardaki 24 ve 48 saatlik hücre kültürlerinde sırasıyla 2OPA, M13 ve ALU-2 primerlerine ait agaroz jel görüntüsü Şekil 4.3.’te verilmiştir. Agaroz jel görüntüsüne göre yapılan analizler sonucunda ağır metal miks uygulanan hücrelerde kontrole göre yeni bantların oluştuğu veya varolan bantların kaybolduğu tespit edilmiş ve bu bantların baz çifti değerleri Çizelge 4.2.’de verilmiştir.



Şekil 4.3. 2OPA, M13, ALU-2 primerleri jel görüntüleri (M; marker, K; kontrol, M1; miks 1, M2; miks 2).

Çizelge 4.2. Ağır metal miks uygulaması yapılan insan aorta düz kas hücrelerinde 2OPA, M13, ALU-2 primerlerinde kontrole göre yeni oluşan (Y) ve kaybolan (K) bantlar (baz çifti)

2OPA							
24. saat			48. saat				
Kontrol		Miks 1	Miks 2	Kontrol		Miks 1	Miks 2
2798;2512; 2158;1931; 1299;1231; 1019;950; 892;800; 656	Y	2541;1722; 1327;198	2654;2429; 2005;766	2826;2457; 2185;2030; 1835;1313; 1218;950; 850;774; 663	Y	2292;2081;1537; 1413;1009	1327;933;808; 700;634;566
	K	2798;2512; 1931;1299	2512;1931; 800		K	2185;2030	2457;2185; 2030;1835; 1313;950;850; 734;663
M13							
24. saat			48. saat				
Kontrol		Miks 1	Miks 2	Kontrol		Miks 1	Miks 2
2106;1370; 1285;1231; 1729;1009; 942;800; 670;549	Y	2158;1767; 1413;1191; 908;	1413;908; 825;724;648	1442;1341; 1129;983; 892;817; 693;560	Y	1258;1179;1060; 741;678	1204;1060
	K	2106;1285; 1231;1129; 942;549	2106;1285; 1231;942; 800;670;549		K	1341;1129;983; 817;693	1129;817;560
ALU-2							
24. saat			48. saat				
Kontrol		Miks 1	Miks 2	Kontrol		Miks 1	Miks 2
1767;1060; 992;700; 634;452	Y	1980;1744; 1218;791	1244;1117; 774,	1931;1744; 1341;1204; 1071;1000; 783;700; 656;467	Y	1271;1094;648	2913;724
	K	1767;992	992		K	1341;783;656	1931;1341; 1204;1071; 1000;783,700

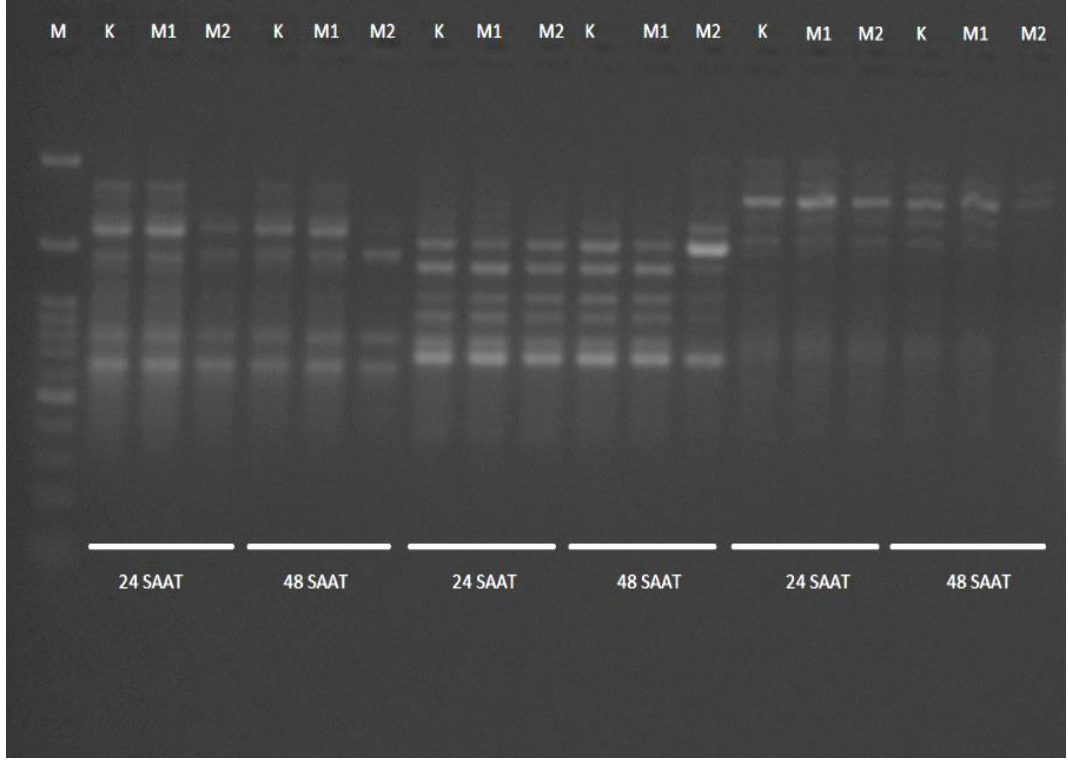
Çizelge 4.2.'ye göre 2OPA primerinde kontrolde 663-2826 bç. arasında 11 tane bant tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 24 ve 48 saatlik ağır metal mik s uygulanan hücrelerde en fazla bant değ iş imi, uygulamanın 48. saatinde mik s 2'de oldu ğ u belirlenmiştir. Belirtilen karış im ve uygulama süresinde 48 saat bekletilen mik s 2 karış imındaki hücrelerde 6 tane bantın yeni oluş tu ğ u 9 tane bantın ise kayboldu ğ u, toplam 15 tane bantta değ iş im görüldü ğ ü tespit edilmiştir.

M13 primerinde kontrolde 549-2106 bç. arasında 10 tane bant tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 24 ve 48 saatlik ağır metal mik s uygulanan hücrelerde en fazla bant değ iş imi uygulamanın 24. saatinde mik s 2'de oldu ğ u belirlenmiştir. Belirtilen karış im ve uygulama süresinde 24 saat bekletilen mik s 2 karış imındaki hücrelerde 5 tane bantın yeni oluş tu ğ u 7 tane bantın ise kayboldu ğ u, toplam 12 tane bantta değ iş im görüldü ğ ü tespit edilmiştir.

ALU-2 primerinde kontrolde 467-1931 bç. arasında 10 tane bant tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 24 ve 48 saatlik ağır metal mik s uygulanan hücrelerde en fazla bant değ iş imi uygulamanın 48. saatinde mik s 1'de oldu ğ u belirlenmiştir. Belirtilen karış im ve uygulama süresinde 48 saat bekletilen mik s 2 karış imındaki hücrelerde 2 tane bantın yeni oluş tu ğ u 7 tane bantın ise kayboldu ğ u, toplam 9 tane bantta değ iş im görüldü ğ ü tespit edilmiştir.

4.2.3. 1253, SP2,7OPA Primerleri

Kontrol ve ağır metal mik s uygulanan deney hücrelerinde farklı konsantrasyonlardaki 24 ve 48 saatlik hücre kültürlerinde 1253, SP2 ve 7OPA primerlerine ait agaroz jel görüntüsü Ş ekil 4.4.'te verilmiştir. Agaroz jel görüntüsüne göre yapılan analizler sonucunda ağır metal mik s uygulanan hücrelerde kontrole göre yeni bantların oluş tu ğ u veya varolan bantların kayboldu ğ u tespit edilmiş ve bu bantların baz çifti değ erleri Ç izelge 4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.4. 1253, SP2, 7OPA primerleri jel görüntüleri (M; marker, K; kontrol, M1; miks1, M2; miks 2)

Çizelge 4.3. Ağır metal miks uygulaması yapılan insan aorta düz kas hücrelerinde 1253, SP2 ve 7OPA primerlerinde kontrole göre yeni oluşan (Y) ve kaybolan (K) bantlar (baz çifti)

1253							
24. saat				48. saat			
Kontrol		Miks 1	Miks 2	Kontrol		Miks 1	Miks 2
2526;2234; 1740;1381; 800;624	Y	2297;653	1820;666	2593;1820; 1483;840; 673	Y	2394;1961	849
	K	624	2526;2234; 1740;1381; 624		K	-	2593;840
SP2							
24. saat				48. saat			
Kontrol		Miks 1	Miks 2	Kontrol		Miks 1	Miks 2
2362;2140; 1875;1688; 1398;1128; 979;830; 741	Y	1820;1415; 849	2049;1714; 1415;849	2019;1714; 1432;1157; 990;858; 764	Y	753	1688;1398
	K	2362;2140; 1875;1398; 830	2362;2140; 1875;1688; 1398;830		K	2019;764	1714;1432;858
7OPA							
24. saat				48. saat			
Kontrol		Miks 1	Miks 2	Kontrol		Miks 1	Miks 2
3270;3000; 2626;2234; 1875;1128; 810	Y	3330	3390;2897; 2297;1932	3330;2966; 2626;2266; 1903;800	Y	2693;1847	2932;2693
	K	3270;1128	3000;1875; 1128		K	3330;2626;1903	3330;2966; 2626;2266; 1903;800

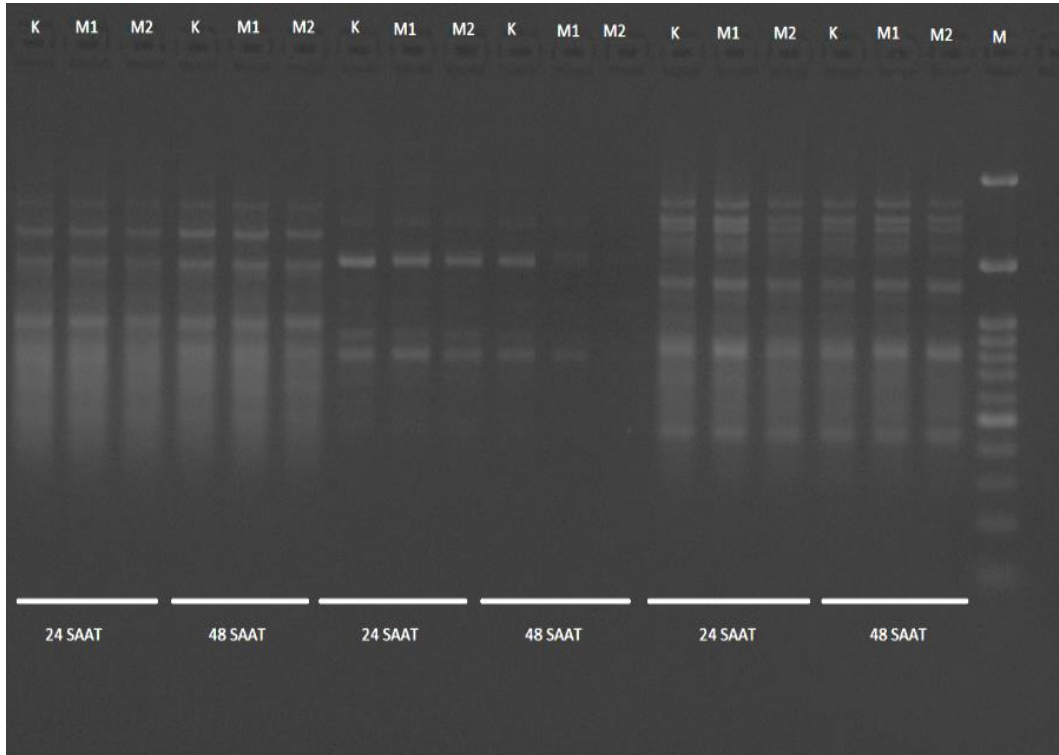
Çizelge 4.3.'e göre 1253 primerinde kontrolde 624-2526 bç. arasında 6 tane bant tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 24 ve 48 saatlik ağır metal miks uygulanan deney hücrelerinde en fazla bant değişimi, uygulamanın 24. saatinde miks 2'de olduğu belirlenmiştir. Belirtilen karışım ve uygulama süresinde 24 saat bekletilen miks 2 karışımındaki hücrelerde 2 tane bantın yeni oluştuğu 5 tane bantın ise kaybolduğu, toplam 7 tane bantta değişim görüldüğü tespit edilmiştir.

SP2 primerinde kontrolde 741-2362 bç. arasında 9 tane bant tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 24 ve 48 saatlik ağır metal miks uygulanan deney hücrelerinde en fazla bant değişimi uygulamanın 24. saatinde miks 2'de olduğu belirlenmiştir. Belirtilen karışım ve uygulama süresinde 24 saat bekletilen miks 2 karışımındaki hücrelerde 4 tane bantın yeni oluştuğu 6 tane bantın ise kaybolduğu, toplam 10 tane bantta değişim görüldüğü tespit edilmiştir.

7OPA primerinde kontrolde 800-3330 bç. arasında 6 tane bant tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 24 ve 48 saatlik ağır metal miks uygulanan deney hücrelerinde en fazla bant değişimi uygulamanın 48. saatinde miks 2’de olduğu belirlenmiştir. Belirtilen karışım ve uygulama süresinde 48 saat bekletilen miks 2 karışımındaki hücrelerde 2 tane bantın yeni oluştuğu 6 tane bantın ise kaybolduğu, toplam 8 tane bantta değişim görüldüğü tespit edilmiştir.

4.2.4. 23OPC, RAPD1 ve RAPD6 Primerleri

Kontrol ve ağır metal miks uygulanan deney hücrelerinde farklı konsantrasyonlardaki 24 ve 48 saatlik hücre kültürlerinde sırasıyla 23OPC ve RAPD1 ve RAPD6 primerlerine ait agaroz jel görüntüsü Şekil 4.5.’te verilmiştir. Agaroz jel görüntüsüne göre yapılan analizler sonucunda ağır metal uygulanan hücrelerde kontrole göre yeni bantların oluştuğu veya varolan bantların kaybolduğu tespit edilmiş ve bu bantların baz çifti değerleri Çizelge 4.4.’te verilmiştir.



Şekil 4.5. 23OPC, RAPD1, RAPD6 primerleri jel görüntüleri (M; marker, K; kontrol, M1; miks 1, M2; miks 2)

Çizelge 4.4. Ağır metal miks uygulaması yapılan insan aorta düz kas hücrelerinde 23OPC, RAPD1 ve RAPD6 primerlerinde kontrole göre yeni oluşan (Y) ve kaybolan (K) bantlar (baz çifti)

23OPC							
24. saat				48. saat			
Kontrol		Miks 1	Miks 2	Kontrol		Miks 1	Miks 2
2493;1990; 1544;1000	Y	1522	2019;1011	2460;2019; 1544;1000	Y	2493;	1023
	K	1544	1990;1000		K	2460;1000	1000
RAPD1							
24. saat				48. saat			
Kontrol		Miks 1	Miks 2	Kontrol		Miks 1	Miks 2
2234;1614; 959;849	Y	-	-	2266;1663; 990;849	Y	2297	830
	K	-	-		K	2266;990	849
RAPD6							
24. saat				48. saat			
Kontrol		Miks 1	Miks 2	Kontrol		Miks 1	Miks 2
2693;2362; 1415;929; 866;473	Y	2171;979; 883	2660;2171; 883	2626;2427; 2171;1398; 883;489	Y	2727;1415;479	2727;2266; 1847;1415;479
	K	929;866	2693;929; 866		K	2626;1398;489	2626;2171; 1398;489

Çizelge 4.4.'e göre 23OPC primerinde kontrolde 1000-2493 bç. arasında 4 tane bant tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 24 ve 48 saatlik ağır metal miks uygulanan deney hücrelerinde en fazla bant değişimi, uygulamanın 24. saatinde miks 2'de olduğu belirlenmiştir. Belirtilen karışım ve uygulama süresinde 24 saat bekletilen miks 2 karışımındaki hücrelerde 2 tane bantın yeni oluştuğu 2 tane bantın ise kaybolduğu, toplam 4 tane bantta değişim görüldüğü tespit edilmiştir.

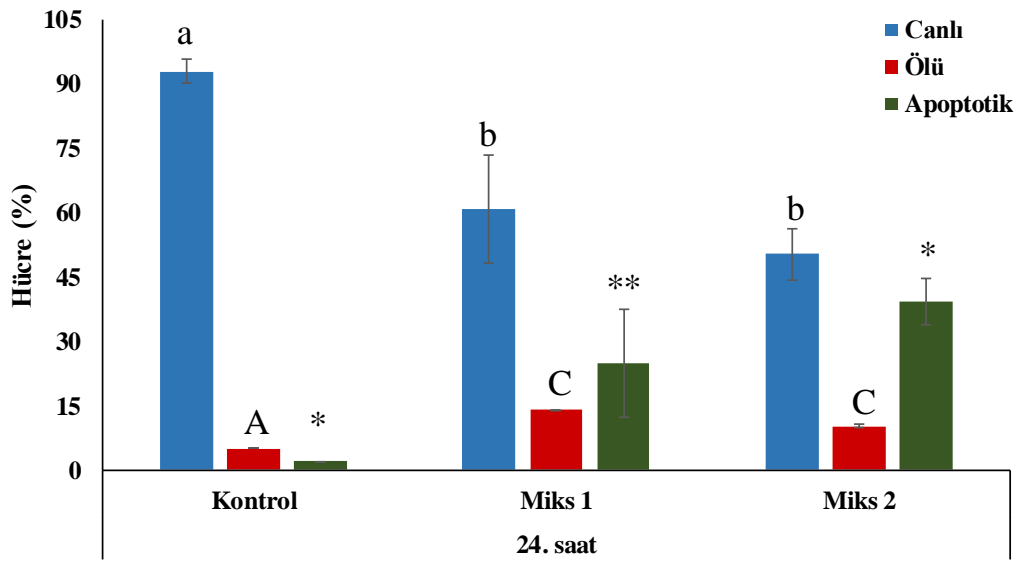
RAPD1 primerinde kontrolde 849-2266 bç. arasında 4 tane bant tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 24 ve 48 saatlik ağır metal miks uygulanan deney hücrelerinde en fazla bant değişimi uygulamanın 48. saatinde miks 1'de olduğu belirlenmiştir. Belirtilen karışım ve uygulama süresinde 48 saat bekletilen miks 1 karışımındaki hücrelerde 1 tane bantın yeni oluştuğu 2 tane bantın ise kaybolduğu, toplam 3 tane bantta değişim görüldüğü tespit edilmiştir.

RAPD6 primerinde kontrolde 489-2626 bç. arasında 6 tane bant tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 24 ve 48 saatlik ağır metal miks uygulanan hücrelerde en fazla bant değişimi uygulamanın 48. saatinde miks 2'de olduğu belirlenmiştir. Belirtilen

karışım ve uygulama süresinde 48 saat bekletilen miks 2 karışımındaki hücrelerde 5 tane bantın yeni oluştuğu 4 tane bantın ise kaybolduğu, toplam 9 tane bantta değişim görüldüğü tespit edilmiştir.

4.3. Tali Görüntü Tabanlı Sitometre Analizi

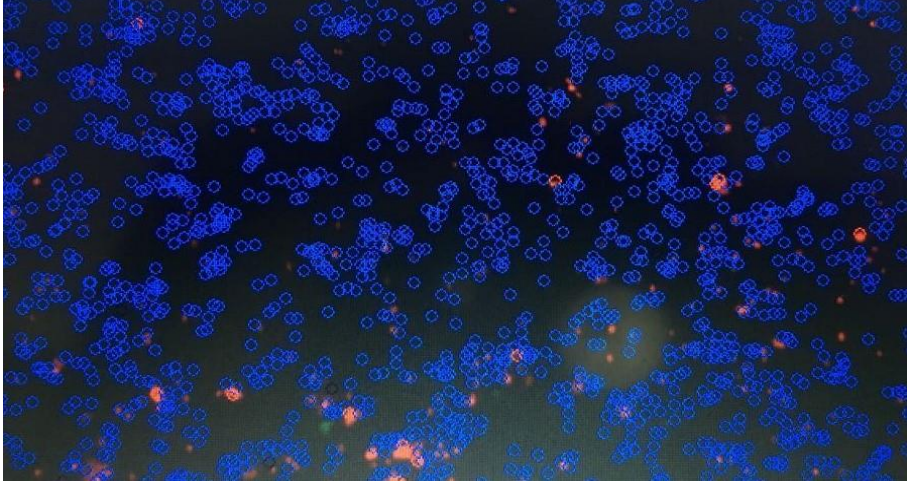
4.3.1. 24. Saatte Tali Görüntü Tabanlı Sitometre Analizi



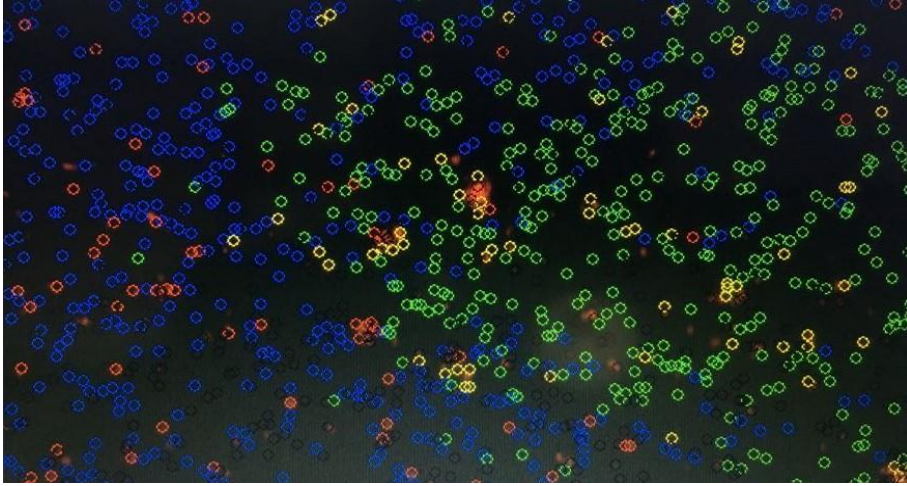
Şekil 4.6. Kontrol ve uygulama yapılan deney hücrelerinde uygulamanın 24. saatinde belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücrelerin oranları (%) (n=3) ortalama±standart hata * Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi, $P \leq 0.05$)

Cu, Fe, Pb ve Cd ağır metallere sahip mikş 1 ve bunun 10 katı daha fazla konsantrasyona sahip mikş 2 karışımını uygulanmış hücre hatlarında 24. saat sonundaki apoptotik değişimler incelendiğinde (Şekil 4.6.) apoptoz oranı % 39,33 oranla en yüksek değişim mikş 2 karışımında gözlemlenmiştir. Artan konsantrasyona bağlı olarak apoptoza uğramış hücre oranı da artmıştır.

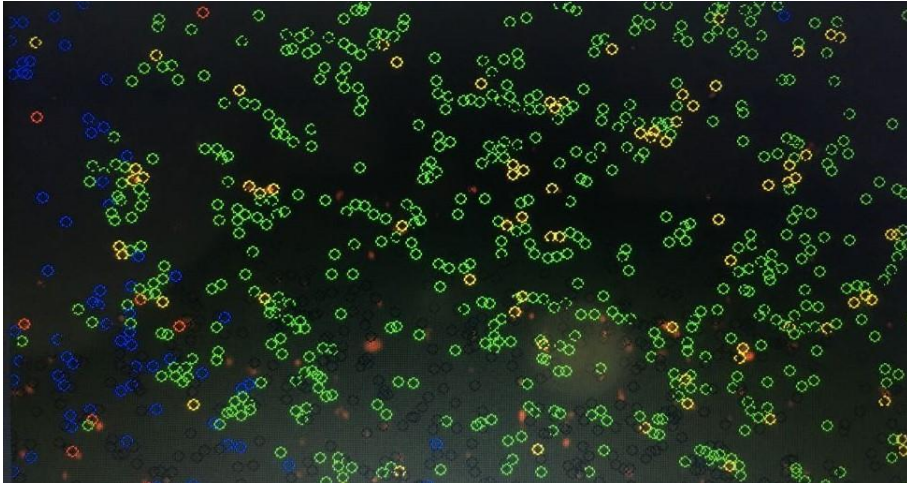
a)



b)

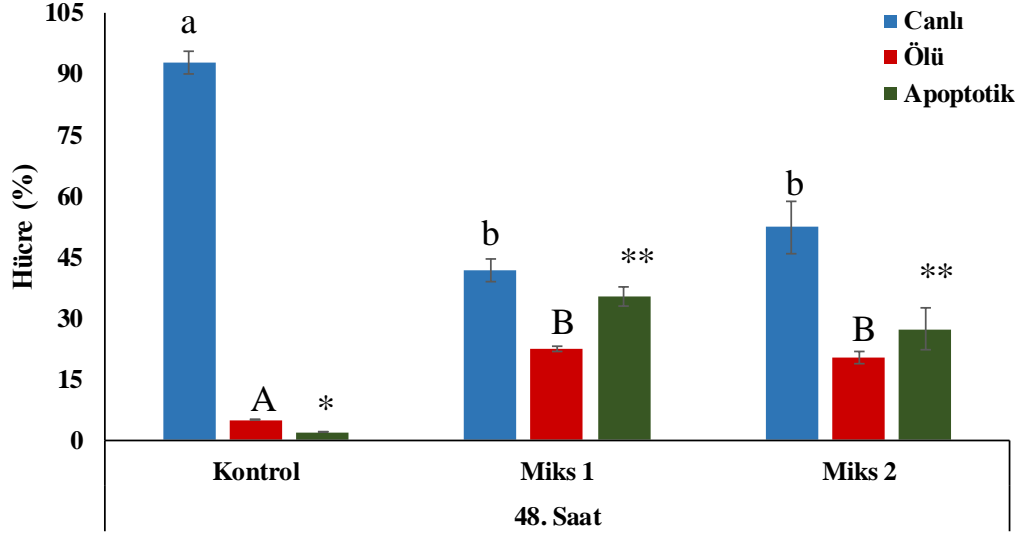


c)



Şekil 4.7. TALİ görüntü tabanlı sitometre analizde 24. saat sonunda aort düz kas hücre hattına ait canlı, ölü ve apoptotik hücre görüntüleri. Annexin V ve Propidyum İyodür (PI) floresan yoğunluğu a) Kontrol b) Miks 1 karışımı c) Miks 2 karışımı

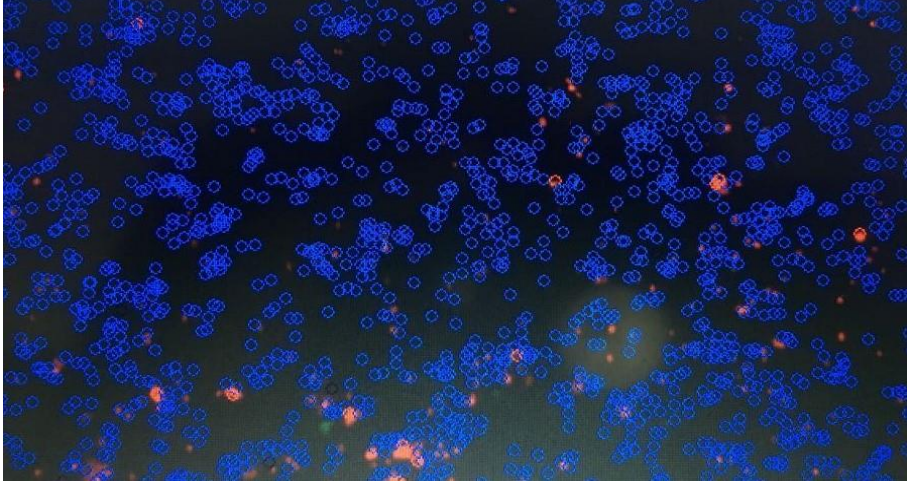
4.3.2. 48. Saatte Tali Görüntü Tabanlı Sitometre Analizi



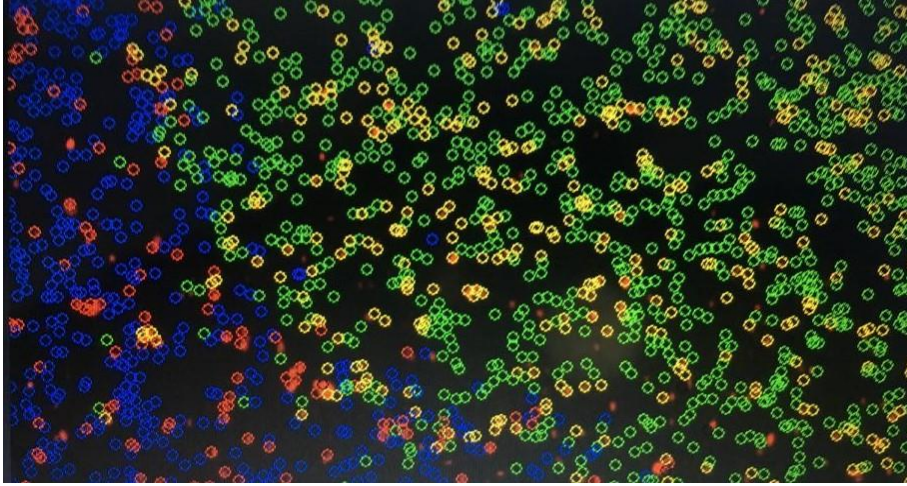
Şekil 4.8. Kontrol ve uygulama yapılan deney hücrelerinde uygulamanın 48. saatinde belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücrelerin oranları (%) (n=3) ortalama±standart hata * Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi, $P \leq 0.05$)

Cu, Fe, Pb ve Cd ağır metallere sahip mikş 1 ve bunun 10 katı daha fazla konsantrasyona sahip mikş 2 karışımı uygulanmış hücre hatlarında 48. saat sonundaki apoptik değişimler incelendiğinde (Şekil 4.8.) apoptoz oranı % 35,33 oranla en yüksek değişim mikş 1 karışımında gözlemlenmiştir.

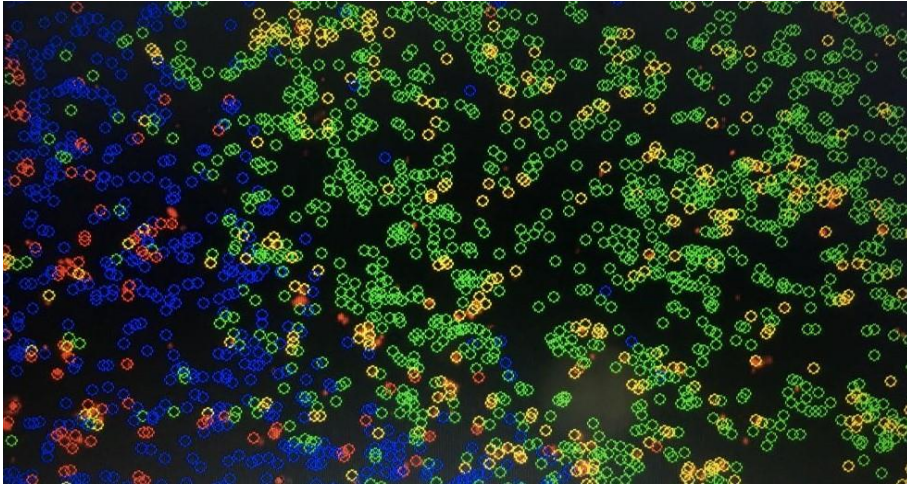
a)



b)



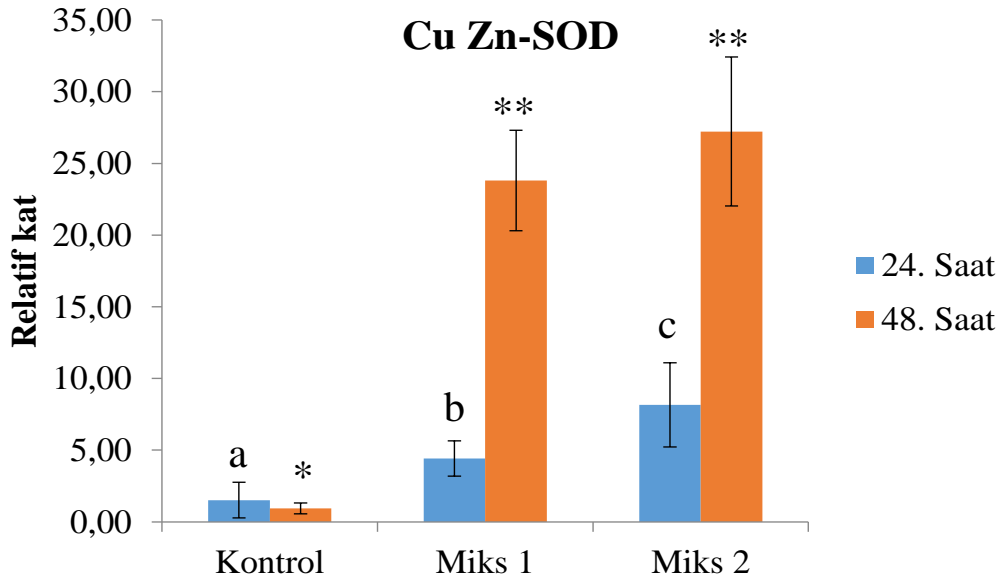
c)



Şekil 4.9. TALİ görüntü tabanlı sitometre analizde 48. saat sonunda aort düz kas hücre hattına ait canlı, ölü ve apoptotik hücre görüntüleri. Annexin V ve Propidyum İyodür (PI) floresan yoğunluğu a) Kontrol b) Miks 1 karışımı c) Miks 2 karışımı.

4.4. Cu Zn-SOD Gen İfadesi

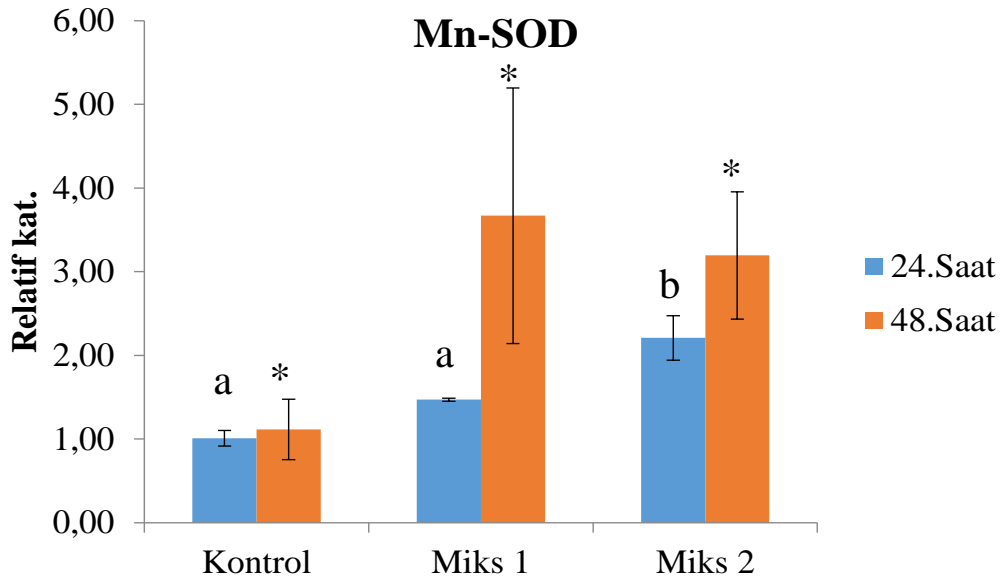
Farklı konsantrasyonlarda ağır metal karışımı uygulanan hücrelerde uygulamanın 24. ve 48. saatlerinde belirlenen Cu Zn- SOD gen ifadeleri Şekil 4.10.'da verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi en yüksek gen ifadesi miks 2 konsantrasyonunda ve uygulamanın 48. saatinde saptanmıştır (kontrole göre 27.2 ± 5.19 kat). 24. saatte miks 1 ve miks 2 konsantrasyonlarında ise en yüksek gen ifadesi miks 2 konsantrasyonunda görülmüştür (kontrole göre 8.15 ± 2.93 kat). Ayrıca kontrole göre miks 1 ve miks 2 karışımlarında zamana ve konsantrasyona bağlı olarak artış gözlemlenmiştir.



Şekil 4.10. 24 ve 48 saat süre ile metal miks uygulaması yapılan deney hücrelerinde Cu Zn-SOD gen ifadesinin değişimi, relatif kat artış $n=3$, ortalama±standart hata * Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi, $P \leq 0.05$)

4.5. Mn-SOD Gen İfadesi

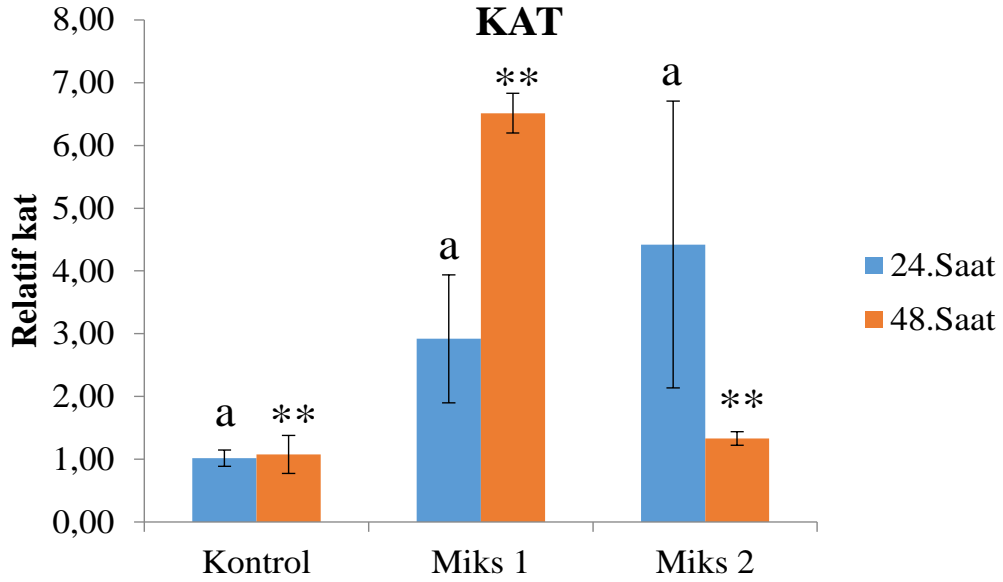
Farklı konsantrasyonlarda ağır metal karışımı uygulanan deney hücrelerinde uygulamanın 24. ve 48. saatlerinde belirlenen Mn-SOD gen ifadeleri Şekil 4.11.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi en yüksek gen ifadesi miks 1 konsantrasyonunda ve uygulamanın 48. saatinde saptanmıştır (kontrole göre 3.66 ± 1.52 kat). 24. saatte miks 1 ve miks 2 konsantrasyonlarında ise en yüksek gen ifadesi miks 2 konsantrasyonunda görülmüştür (kontrole göre 2.20 ± 0.26 kat). Ayrıca kontrole göre 24. saatte karışımlarda konsantrasyon artışına bağlı olarak orantılı bir artış gözlemlenmiştir.



Şekil 4.11. 24 ve 48 saat süre ile metal miks uygulaması yapılan deney hücrelerinde Mn-SOD gen ifadesinin değişimi, relatif kat artış $n=3$, ortalama \pm standart hata * Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi, $P\leq 0.05$)

4.6. KAT Gen İfadesi

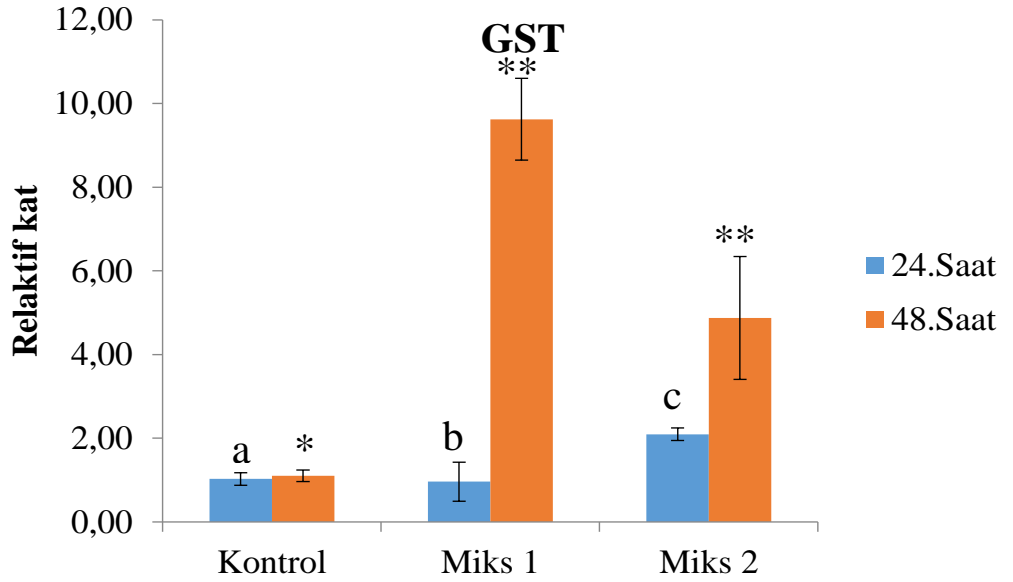
Farklı konsantrasyonlarda ağır metal karışımı uygulanan deney hücrelerinde uygulamanın 24. ve 48. saatlerinde belirlenen KAT gen ifadeleri Şekil 4.12.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi en yüksek gen ifadesi miks 1 konsantrasyonunda ve uygulamanın 48. saatinde saptanmıştır (kontrole göre 6.51 ± 0.31 kat). 24. saatte miks 1 ve miks 2 konsantrasyonlarında ise en yüksek gen ifadesi miks 2 konsantrasyonunda görülmüştür (kontrole göre 4.41 ± 2.28 kat). Ayrıca kontrole göre 24. saatte karışımlarda konsantrasyon artışına bağlı olarak orantılı bir artış gözlemlenmiştir.



Şekil 4.12. 24 ve 48 saat süre ile metal miks uygulaması yapılan deney hücrelerinde KAT gen ifadesinin değişimi, relatif kat artış $n=3$, ortalama \pm standart hata * Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi, $P \leq 0.05$)

4.7. GST Gen İfadesi

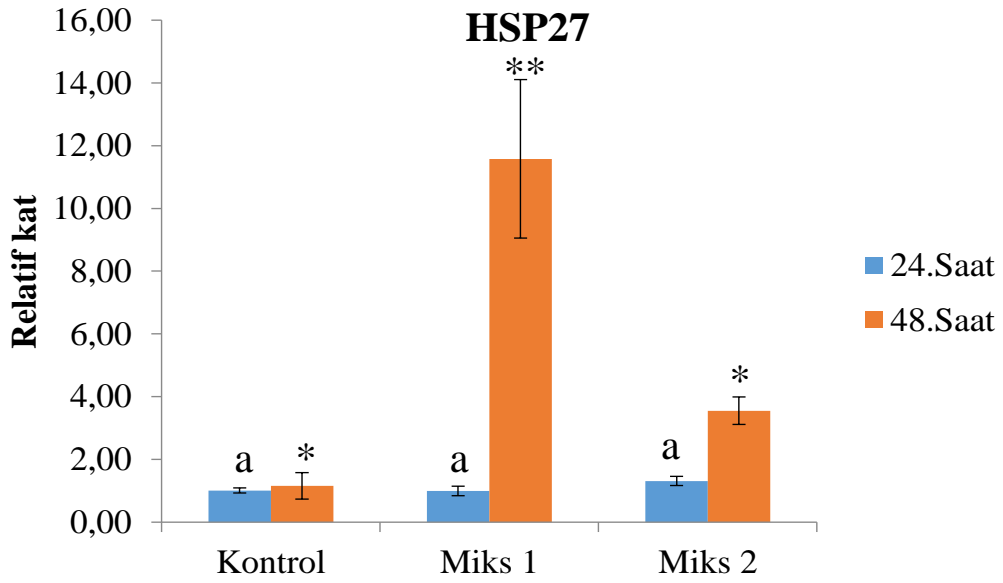
Farklı konsantrasyonlarda ağır metal karışımı uygulanan deney hücrelerinde uygulamanın 24. ve 48. saatlerinde belirlenen GST gen ifadeleri Şekil 4.13.'te verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi en yüksek gen ifadesi miks 1 konsantrasyonunda ve uygulamanın 48. saatinde saptanmıştır (kontrole göre 9.62 ± 0.97 kat). 24. saatte miks 1 ve miks 2 konsantrasyonlarında ise en yüksek gen ifadesi miks 2 konsantrasyonunda görülmüştür (kontrole göre 2.09 ± 0.15 kat).



Şekil 4.13. 24 ve 48 saat süre ile metal miks uygulaması yapılan aort düz kas hücrelerinde GST gen ifadesinin değişimi, relatif kat artış $n=3$, ortalama \pm standart hata * Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi, $P \leq 0.05$)

4.8. HSP27 Gen İfadesi

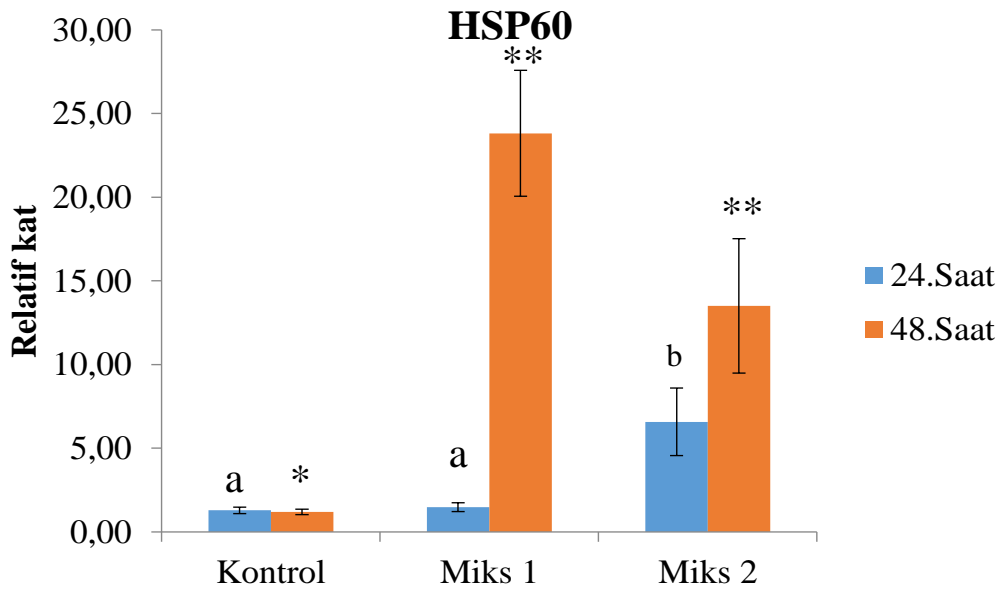
Farklı konsantrasyonlarda ağır metal karışımı uygulanan deney hücrelerinde uygulamanın 24. ve 48. saatlerinde belirlenen HSP27 gen ifadeleri Şekil 4.14.'te verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi en yüksek gen ifadesi miks 1 konsantrasyonunda ve uygulamanın 48. saatinde saptanmıştır (kontrole göre 11.57 ± 2.52 kat). 24. saatte miks 1 ve miks 2 konsantrasyonlarında ise en yüksek gen ifadesi miks 2 konsantrasyonunda görülmüştür (kontrole göre 1.30 ± 0.14 kat).



Şekil 4.14. 24 ve 48 saat süre ile metal miks uygulaması yapılan deney hücrelerinde HSP27 gen ifadesinin değişimi, relatif kat artış $n=3$, ortalama \pm standart hata * Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi, $P \leq 0.05$)

4.9. HSP60 Gen İfadesi

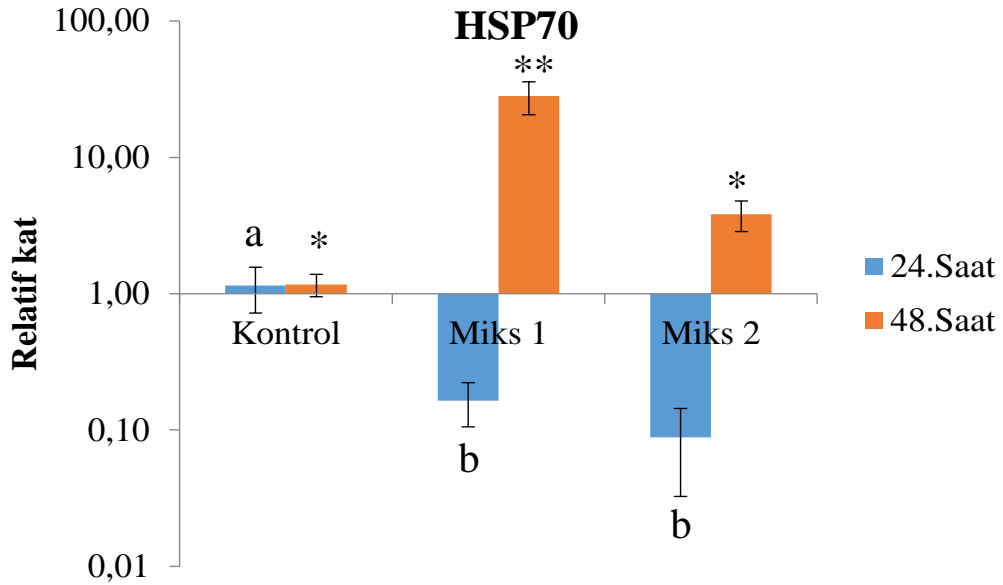
Farklı konsantrasyonlarda ağır metal karışımı uygulanan deney hücrelerinde uygulamanın 24. ve 48. saatlerinde belirlenen HSP60 gen ifadeleri Şekil 4.15.'te verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi en yüksek gen ifadesi miks 1 konsantrasyonunda ve uygulamanın 48. saatinde saptanmıştır (kontrole göre 23.81 ± 3.76 kat). 24 saatlik miks 1 ve miks 2 konsantrasyonlarında ise en yüksek gen ifadesi miks 2 konsantrasyonunda görülmüştür (kontrole göre 6.57 ± 2.02 kat).



Şekil 4.15. 24 ve 48 saat süre ile metal miks uygulaması yapılan aort düz kas hücrelerinde HSP60 gen ifadesinin değişimi, relatif kat artış $n=3$, ortalama \pm standart hata * Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi, $P \leq 0.05$)

4.10. HSP70 Gen İfadesi

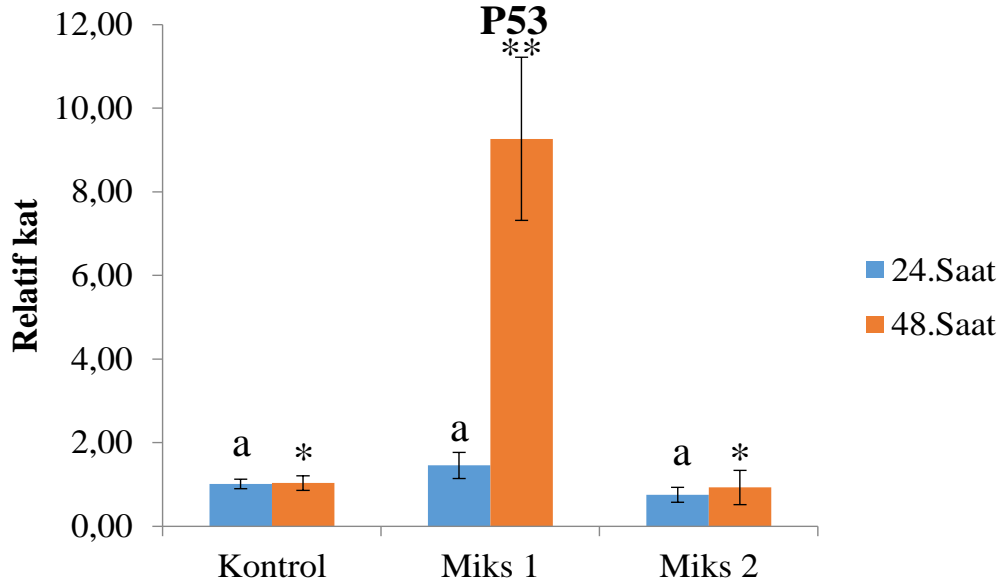
Farklı konsantrasyonlarda ağır metal karışımı uygulanan deney hücrelerinde uygulamanın 24. ve 48. saatlerinde belirlenen HSP70 gen ifadeleri Şekil 4.16.'da verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi en yüksek gen ifadesi miks 1 konsantrasyonunda ve uygulamanın 48. saatinde saptanmıştır (kontrole göre 28.23 ± 7.64 kat). Uygulamanın 24. saatinde ise hem miks 1 hem de mik 2 karışımlarında kontrole göre gen ifadelerinde azalma görülmüş, en düşük gen ifadesi miks 2 konsantrasyonunda ve uygulamanın 24. saatinde saptanmıştır (kontrole göre $0.08 \pm 0,05$ kat).



Şekil 4.16. 24 ve 48 saat süre ile metal miks uygulaması yapılan deney hücrelerinde HSP70 gen ifadesinin değişimi, relatif kat artış $n=3$, ortalama \pm standart hata * Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi, $P \leq 0.05$)

4.11. P53 Gen İfadesi

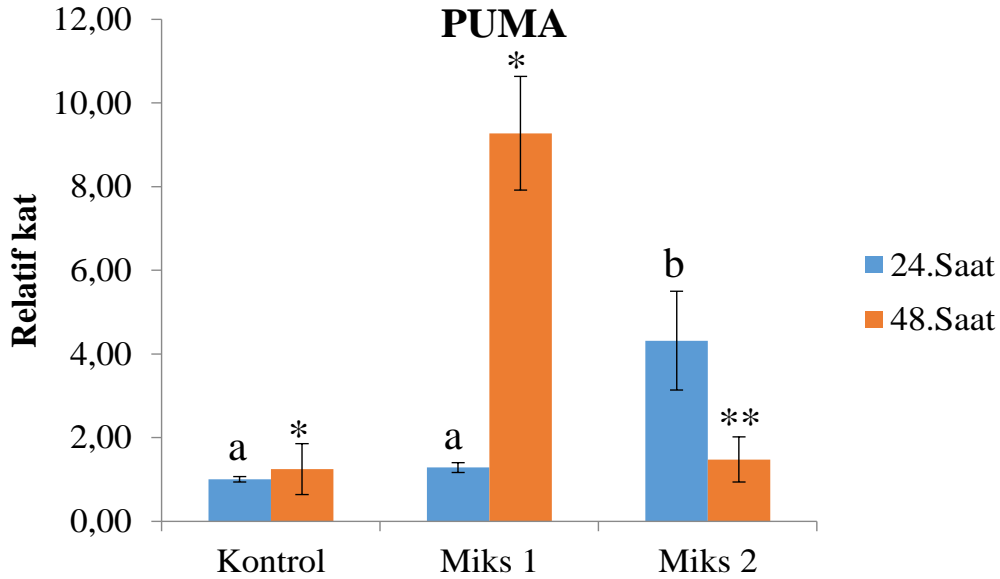
Farklı konsantrasyonlarda ağır metal karışımı uygulanan deney hücrelerinde uygulamanın 24. ve 48. saatlerinde belirlenen P53 gen ifadeleri Şekil 4.17.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi en yüksek gen ifadesi miks 1 konsantrasyonunda ve uygulamanın 48. saatinde saptanmıştır (kontrole göre 9.26 ± 1.95 kat). 24. saatte miks 1 ve miks 2 konsantrasyonlarında ise en yüksek gen ifadesi miks 1 konsantrasyonunda görülmüştür (kontrole göre 1.45 ± 0.30 kat).



Şekil 4.17. 24 ve 48 saat süre ile metal miks uygulaması yapılan deney hücrelerinde P53 gen ifadesinin değişimi, relatif kat artış $n=3$, ortalama \pm standart hata * Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi, $P \leq 0.05$)

4.12. PUMA Gen İfadesi

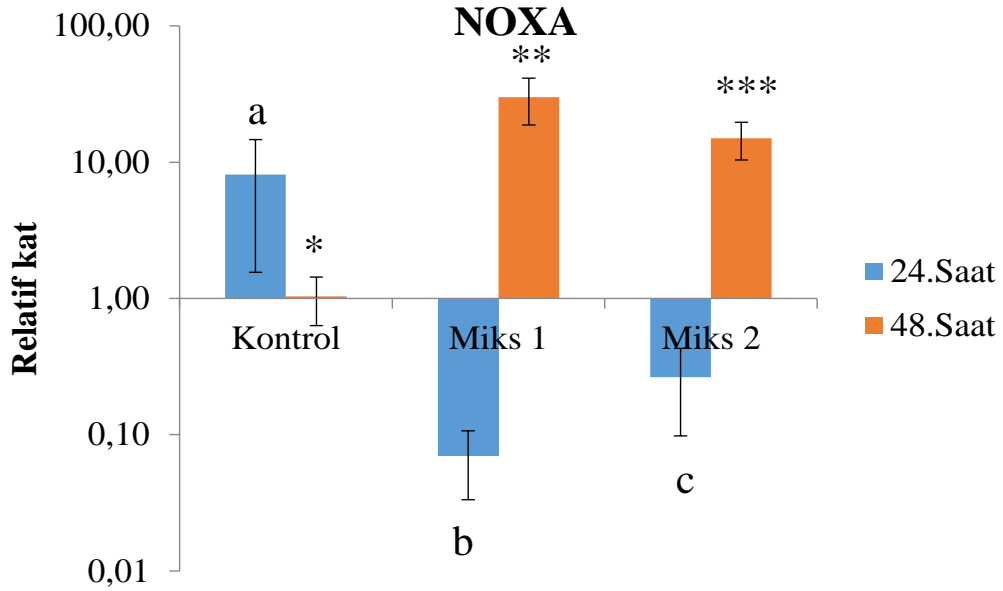
Farklı konsantrasyonlarda ağır metal karışımı uygulanan deney hücrelerinde uygulamanın 24. ve 48. saatlerinde belirlenen PUMA gen ifadeleri Şekil 4.18.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi en yüksek gen ifadesi miks 1 konsantrasyonunda ve uygulamanın 48. saatinde saptanmıştır (kontrole göre 9.27 ± 1.36 kat). 24. saatte miks 1 ve miks 2 konsantrasyonunda ise en yüksek gen ifadesi miks 2 konsantrasyonunda görülmüştür (kontrole göre 4.31 ± 1.17 kat). Ayrıca kontrole göre 24. saatte karışımlarda konsantrasyon artışına bağlı olarak orantılı bir artış gözlemlenmiştir.



Şekil 4.18. 24 ve 48 saat süre ile metal miks uygulaması yapılan aort düz kas hücrelerinde PUMA gen ifadesinin değişimi, relatif kat artış $n=3$, ortalama±standart hata * Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi, $P \leq 0.05$)

4.13. NOXA Gen İfadesi

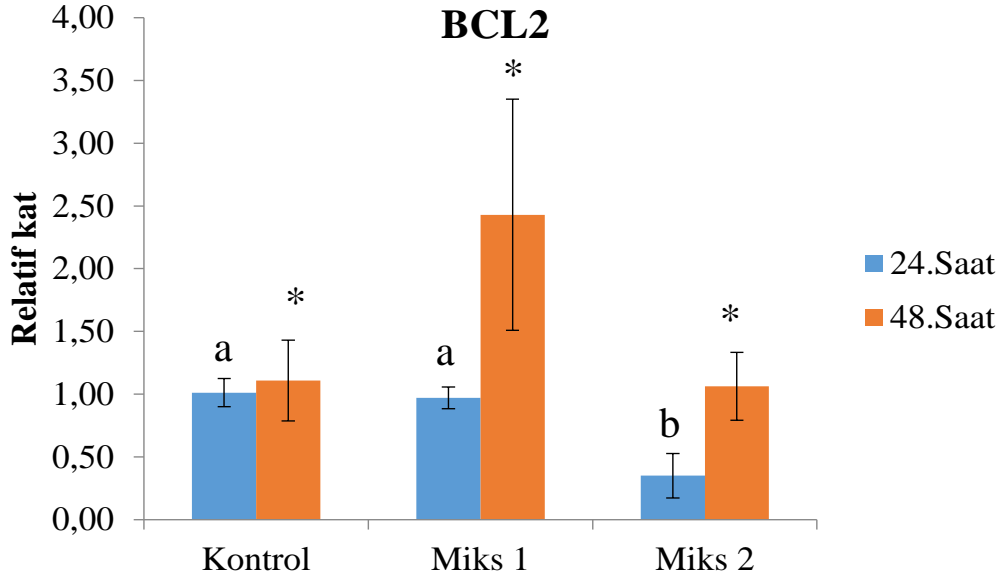
Farklı konsantrasyonlarda ağır metal karışımı uygulanan deney hücrelerinde uygulamanın 24. ve 48. saatlerinde belirlenen NOXA gen ifadeleri Şekil 4.19.'da verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi en yüksek gen ifadesi miks 1 konsantrasyonunda ve uygulamanın 48. saatinde saptanmıştır (kontrole göre 30.00 ± 11.28 kat). Uygulamanın 24. saatinde ise hem miks 1 hem de mik 2 karışımlarında kontrole göre gen ifadelerinde azalma görülmüş, en düşük gen ifadesi miks 1 konsantrasyonunda ve uygulamanın 24. saatinde saptanmıştır (kontrole göre $0.07 \pm 0,03$ kat).



Şekil 4.19. 24 ve 48 saat süre ile metal miks uygulaması yapılan deney hücrelerinde NOXA gen ifadesinin değişimi, relatif kat artış $n=3$, ortalama \pm standart hata * Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi, $P \leq 0.05$)

4.14. BCL2 Gen İfadesi

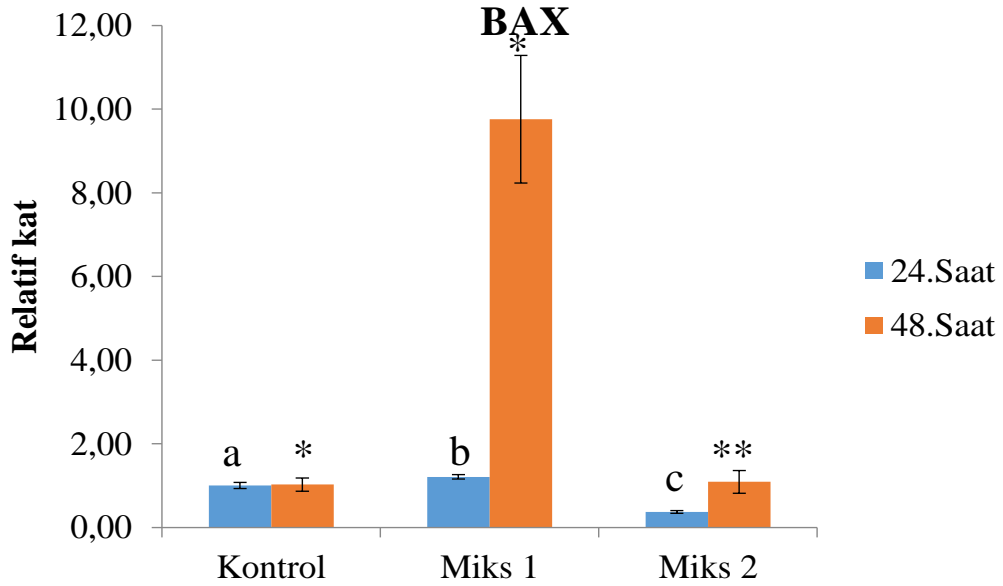
Farklı konsantrasyonlarda ağır metal karışımı uygulanan deney hücrelerinde uygulamanın 24. ve 48. saatlerinde belirlenen BCL2 gen ifadeleri Şekil 4.20.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi en yüksek gen ifadesi miks 1 konsantrasyonunda ve uygulamanın 48. saatinde saptanmıştır (kontrolle göre 2.42 ± 0.92 kat).



Şekil 4.20. 24 ve 48 saat süre ile metal miks uygulaması yapılan deney hücrelerinde BCL2 gen ifadesinin değişimi, relatif kat artış $n=3$, ortalama \pm standart hata * Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi, $P \leq 0.05$)

4.15. BAX Gen İfadesi

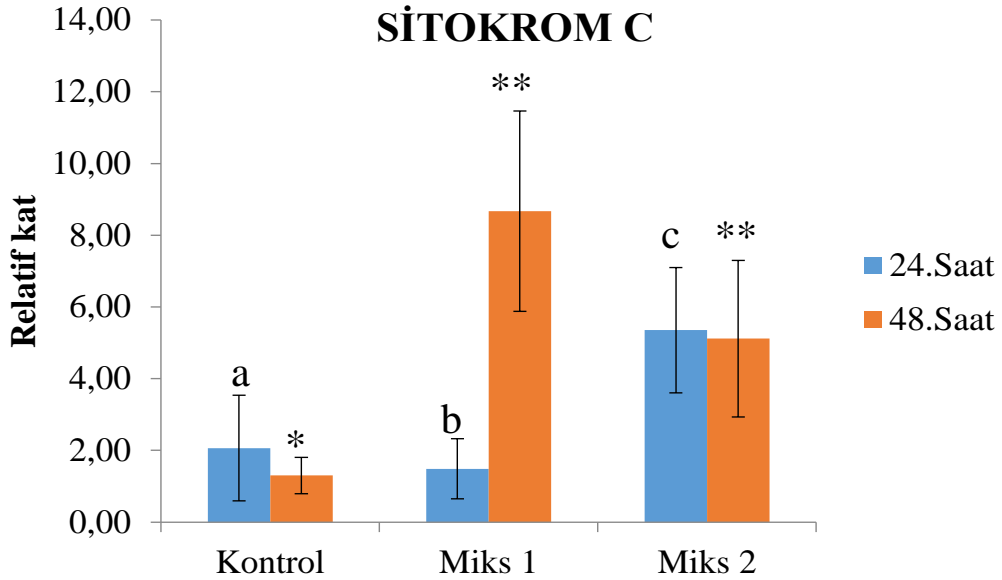
Farklı konsantrasyonlarda ağır metal karışımı uygulanan deney hücrelerinde uygulamanın 24. ve 48. saatlerinde belirlenen BAX gen ifadeleri Şekil 4.21.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi en yüksek gen ifadesi miks 1 konsantrasyonunda ve uygulamanın 48. saatinde saptanmıştır (kontrole göre 9.76 ± 1.52 kat). 24. saatte miks 1 ve miks 2 konsantrasyonlarında ise en yüksek gen ifadesi miks 1 konsantrasyonunda görülmüştür (kontrole göre 1.20 ± 0.54 kat).



Şekil 4.21. 24 ve 48 saat süre ile metal miks uygulaması yapılan deney hücrelerinde BAX gen ifadesinin değişimi, relatif kat artış $n=3$, ortalama \pm standart hata * Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi, $P \leq 0.05$)

4.16. SİTOKROM C Gen İfadesi

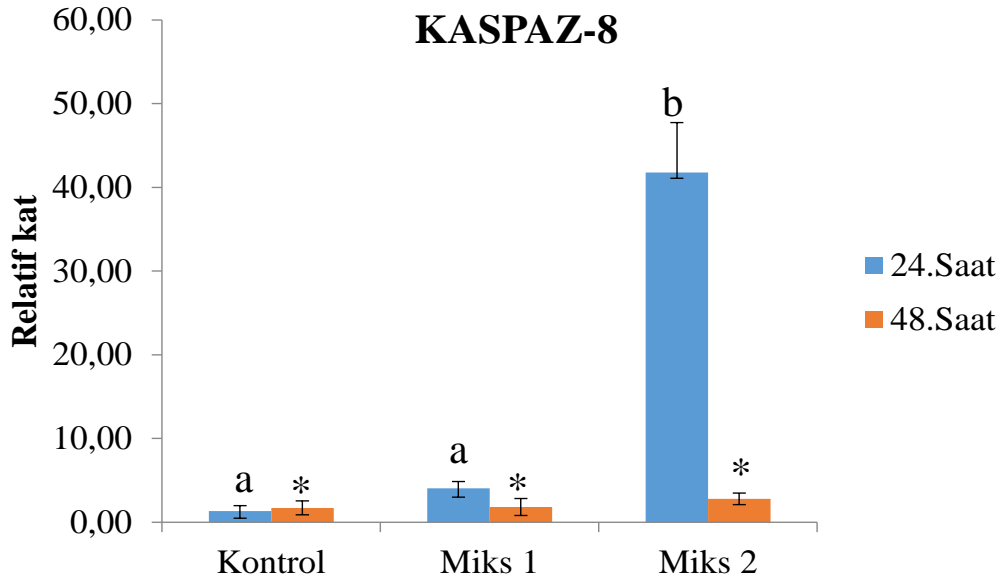
Farklı konsantrasyonlarda ağır metal karışımı uygulanan deney hücrelerinde uygulamanın 24. ve 48. saatlerinde belirlenen SİTOKROM C gen ifadeleri Şekil 4.22.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi en yüksek gen ifadesi miks 1 konsantrasyonunda ve uygulamanın 48. saatinde saptanmıştır (kontrole göre 8.67 ± 2.79 kat). 24. saatte miks 1 ve miks 2 konsantrasyonlarında ise en yüksek gen ifadesi miks 2 konsantrasyonunda görülmüştür (kontrole göre 5.35 ± 1.74 kat).



Şekil 4.22. 24 ve 48 saat süre ile metal miks uygulaması yapılan deney hücrelerinde SİTOKROM C gen ifadesinin değişimi, relatif kat artış $n=3$, ortalama±standart hata * Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi, $P \leq 0.05$)

4.17. KASPAZ-8 Gen İfadesi

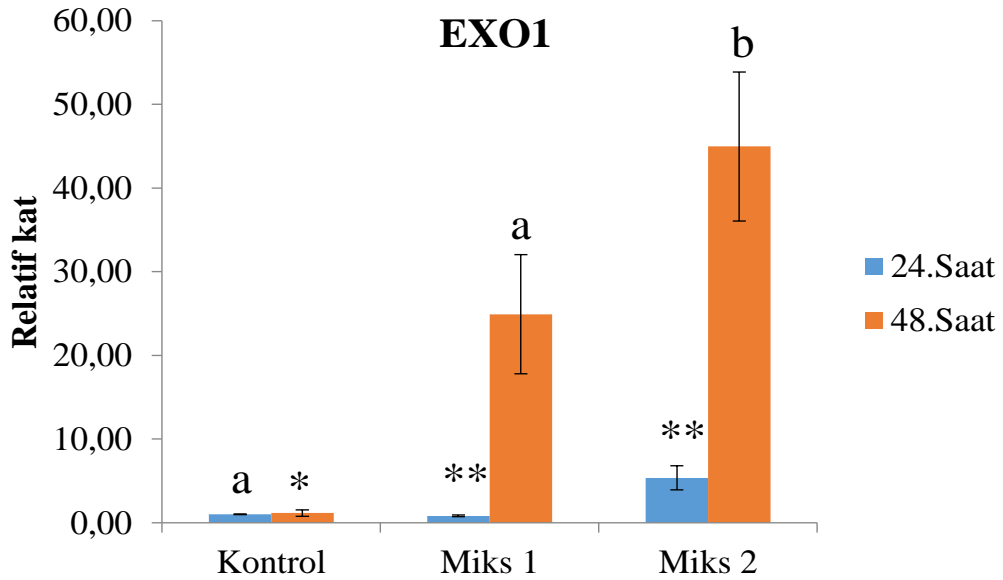
Farklı konsantrasyonlarda ağır metal karışımı uygulanan deney hücrelerinde uygulamanın 24. ve 48. saatlerinde belirlenen KASPAZ-8 gen ifadeleri Şekil 4.23.' te verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi en yüksek gen ifadesi miks 2 konsantrasyonunda ve uygulamanın 24. saatinde saptanmıştır (kontrole göre 41.79 ± 5.94 kat). 48. saatte miks 1 ve miks 2 konsantrasyonlarında ise en yüksek gen ifadesi miks 2 konsantrasyonunda görülmüştür (kontrole göre 2.79 ± 0.68 kat). Ayrıca kontrole göre miks 1 ve miks 2 karışımlarında konsantrasyon artışına bağlı olarak orantılı bir artış gözlemlenmiştir.



Şekil 4.23. 24 ve 48 saat süre ile metal miks uygulaması yapılan deney hücrelerinde KASPAZ-8 gen ifadesinin değişimi, relatif kat artış $n=3$, ortalama \pm standart hata * Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi, $P \leq 0.05$)

4.18. EXO1 Gen İfadesi

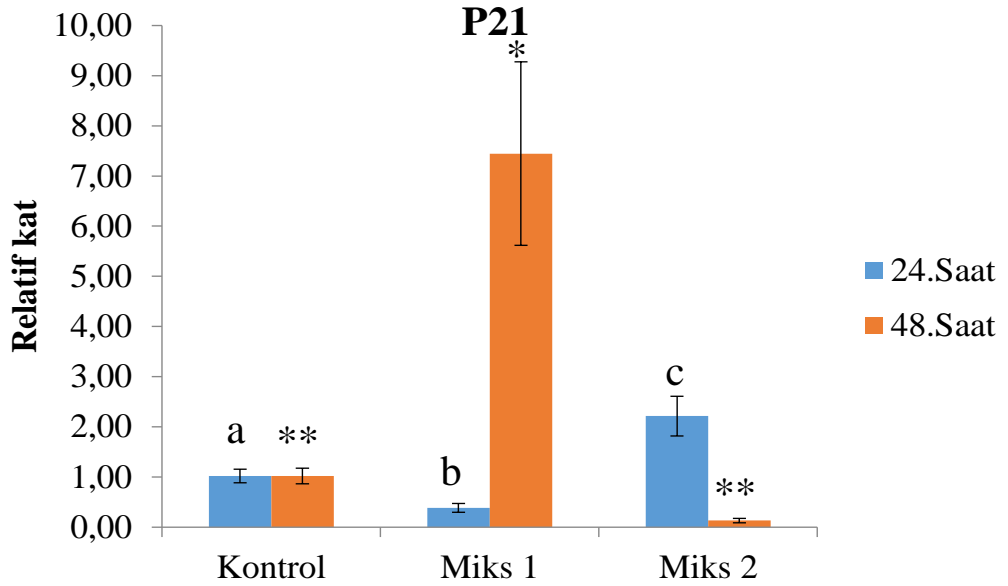
Farklı konsantrasyonlarda ağır metal karışımı uygulanan deney hücrelerinde uygulamanın 24. ve 48. saatlerinde belirlenen EXO1 gen ifadeleri Şekil 4.24.'te verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi en yüksek gen ifadesi miks 2 konsantrasyonunda ve uygulamanın 48. saatinde saptanmıştır (kontrole göre 44.97 ± 8.89 kat). 24. saatte miks 1 ve miks 2 konsantrasyonlarında ise en yüksek gen ifadesi miks 2 konsantrasyonunda görülmüştür (kontrole göre 5.34 ± 1.44 kat). Ayrıca uygulamanın 48. saatinde artan konsantrasyona bağlı olarak artış saptanmıştır.



Şekil 4.24. 24 ve 48 saat süre ile metal miks uygulaması yapılan deney hücrelerinde EXO1 gen ifadesinin değişimi, relatif kat artış $n=3$, ortalama \pm standart hata * Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi, $P \leq 0.05$)

4.19. P21 Gen İfadesi

Farklı konsantrasyonlarda ağır metal karışımı uygulanan hücrelerde uygulamanın 24. ve 48. saatlerinde belirlenen P21 gen ifadeleri Şekil 4.25.'te verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi en yüksek gen ifadesi miks 1 konsantrasyonunda ve uygulamanın 48. saatinde saptanmıştır (kontrole göre 7.44 ± 1.82 kat). 24. saatte ise en yüksek gen ifadesi miks 2 konsantrasyonunda görülmüştür (kontrole göre 2.21 ± 0.39 kat).



Şekil 4.25. 24 ve 48 saat süre ile metal miks uygulaması yapılan deney hücrelerinde P21 gen ifadesinin değişimi, relatif kat artış $n=3$, ortalama \pm standart hata * Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi, $P \leq 0.05$)

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Yaşamı boyunca sürekli çevre ile etkileşim içerisinde olan insanoğlunun sağlığı üzerinde şüphesiz çevre şartlarının önemli etkileri bulunmaktadır. Çevre kirliliği insan sağlığını etkileyen önemli problemlerden biridir. Yaşadığı çevrede kirlenmiş hava, su veya toprak nedeni ile çeşitli kirlleticilerin vücut tarafından alınarak biriktirilmesi sonucunda kanser, kemik erimesi, nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığa maruz kalan insanlar için ağır metaller önemli bir toksisite nedenidir (Khan, Cao, Zheng, Huang, Zhu, 2008). Sanayileşmenin etkisiyle atık suların sebze ve meyve veren toprağa karışması, deniz ürünlerinde oluşturduğu ağır metal birikimi, hazır gıdalar ile tükettiğimiz koruyucu ve katkı maddeleri, bu ürünleri tüketen insanlar için ciddi tehlikeler oluşturabilmektedir (Påhlsson, 1989). Ayrıca doğada dönüşümü bulunmayan petrol atıkları, zirai ilaçlar, gübre ve evsel atıkların da çoğalan nüfusla birlikte artışı çevre kirliliğini beraberinde getirir ve insanlarda düşük konsantrasyonlarda bile toksik etki gösterebilmektedir (Wuana ve Okieimen, 2011).

Gıdalarla ve solunan havayla dokularda biriken ağır metaller ilerleyen yaşla birlikte hücrelerde oksidatif strese bağlı serbest radikal oluşturmaktadır. Serbest radikal oluşumu ve miktarının artması hücrelerde zarara neden olabilir. Özellikle Cd, Pb, Fe ve Cu gibi ağır metallerin vücutta birikimi sonucu hücrelerde toksik etki görülebilmektedir (Järup, 2003). Hava, su ve besinler aracılığıyla vücuda alınan ağır metallerin birikimi insanlarda çeşitli hastalıklara neden olabilmektedir. Kemik erimesi, merkezi sinir sistemi ve solunum yolu hastalıkları, sarılık, görme bozuklukları, hemofili gibi hastalıkların sebebidir. Özellikle dolaşım sistemi üzerindeki etkileri incelendiğinde kalpte aritmi, hipertansiyon, anemi gibi kalp ve damar hastalıklarına neden olabilir. Ayrıca dokularda tümör oluşumunda da etkilidir (Panigrahi, 2014).

Metaller proteinlerle etkileşim kurabilir ve proteinlerin fonksiyonlarını bozabilir. Ağır metallerin dokularda birikimi DNA protein çapraz bağları oluşturabilir ve mutasyonlara sebep olup genlerin ifade edilebilirliğinde değişikliğe neden olabilmektedir (Panigrahi, 2014).

Cu makinelerde bir metal veya alaşım olarak, inşaat yapımında, ulaşım araçlarında, silah yapımında, beyaz altının önemli bir bileşeni olarak, taklit mücevheratta, kozmetik ürünlerinde ve dişçilik ürünlerinde kullanılmaktadır. Cu, proteinlerin önemli bir bileşenidir (Panigrahi, 2014; Bathla ve Jain, 2016). Yüksek Cu konsantrasyonlarına maruz kalma toksisitesini öncelikle karaciğerde gösterir ve karaciğer sirozu oluşturur. Kanda yüksek orandaki Cu oranı kanın yapısını bozarak hemolize, böbrek ve beyinde ise hasara neden olmaktadır. Ayrıca beyinde ve kardiyovasküler sistemdeki etkileri ölümle sonuçlanabilmektedir (Gaetke ve Chow, 2003).

Demir Dünya’da en çok bulunan ikinci metaldir. Tüm canlı organizmaların büyümesi ve hayatta kalması için gereklidir. Redoks tepkimelerinde geçiş metalidir. İnşaat, otomotiv ve sanayide önemli oranda Fe’den yararlanılmaktadır. Dokularda artan Fe konsantrasyonu özellikle beyin, karaciğer ve kalp hücrelerinde hasara neden olur. Hücrelerde fazla bulunan serbest Fe hidrojen iyonlarının üretilip serbest kalmasını sağlayarak lipid peroksidasyonuna sebep olur. Ayrıca serbest hidrojen iyonları enzimleri inaktive eder ve genetik materyal DNA’da mutasyonlar oluşturarak bir dizi malign hücre oluşturabilmektedir. Süperoksit molekülü demir ferritinden salınır ve bu molekül ortamdaki serbest demir ile reaksiyona girerek daha fazla süperoksit ve hidrojen peroksit radikali oluşturabilmektedir (Doganlar ve Doganlar, 2015; Bathla ve Jain, 2016).

Kurşun kanda 40 mg/l seviyesini aştığında kan basıncını yükseltmektedir. Vücutta Pb fazlalığı hemoglobin sentezini bozar ve hipertansiyona neden olur. Ayrıca kandaki Pb seviyesinin artması sol ventrikül hipertrofisinin elektrokardiyografik bulgularına ve aritmilere de sebep olabilmektedir (Türküzü ve Şanlıer, 2014).

Kadmiyum konsantrasyonu hücrelerde 3.000 kat arttığında metallothionein gibi sistein açısından zengin proteine bağlanır ve karaciğerde sistein-metallothionein kompleksi oluşturarak hepatotoksisiteye ve ardından böbrekte birikerek nefrotoksisiteye

neden olur. İnsan vücudunda 40 mg kadar Cd bulunmakta olup vücutta Cd birikimi böbrek hasarı olan kişilerde kardiyovasküler hastalık riskini arttırmaktadır. İlerleyen yaşla birlikte böbreklerdeki Cd birikimi yüksek tansiyona sebep olabilmektedir. Kronik Cd zehirlenmesinde akciğer ve prostat kanseri görülme riski yüksektir. Kemik erimesi, diş dökülmesi, kansızlık ve koku duyumunun yitirilmesinde de etkilidir (Kukreja ve Hess, 1992; Dimmeler ve Zeiher, 2000).

Ülkemizde insani tüketim amaçlı kullanılan sulardaki mevzuat yönetmeliğine göre belirlenen tolerans sınırları Cd için 5 µg/L, Pb için 10 µg/L, Fe için 200 µg/L, Cu için ise 2000 µg/L olarak belirlenmiştir. Bu sınırlar ışığında tez çalışması kapsamında Cd, Pb, Fe ve Cu ağır metallere oluşan miks karışımı ve bu değerlerin 10 katı kadar ağır metal uygulanan insan aorta düz kas hücrelerindeki değişimler gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda ağır metal uygulamasının genotoksik etkilerinin analizi için RAPD-PCR yöntemi kullanılmış, farklı konsantrasyon ve zamana bağlı olarak uygulama sürelerinde ağır metal maruziyetinin kontrole göre yeni bantlar oluşturduğu, bantların kaybolduğu, bantların yoğunluğunda artışa ve azalmalara neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.4., Şekil 4.5.). Bant değişiminin en fazla gözlemlendiği karışım miks 2 karışımı olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1., Çizelge 4.2., Çizelge 4.3., Çizelge 4.4.). Konu ile ilgili yapılan benzer bir çalışmada *D. melanogaster* bireylerine uygulanmış uçucu organik bileşiklerden oluşan miks karışımında, kontrole göre yeni bantların oluştuğu, bazı bantların kaybolduğu, bazı bantların ise yoğunluklarında değişimler görüldüğü rapor edilmiştir (Doğanlar ve Doğanlar, 2015). Dietilditiokarbamik asit (DDC) uygulanmış aort düz kas hücrelerinde reaktif oksijen türlerinden olan süperoksit oluşumu gözlemlendiği ve yeni bantlar oluştuğu rapor edilmiştir (Liv vd., 2005). As ve Cd'ye maruz bırakılan zebra balıklarının solungaç dokularında yapılan RAPD analizinde Cd'nin genomik karalılığı azalttığı rapor edilmiştir (Doğanlar ve Doğanlar, 2016). Bizim çalışmamızda ağır metal miks uygulamasına bağlı olarak RAPD-DNA profillerinde meydana gelen bant değişiklikleri daha önce yapılan bu çalışmalar ile desteklenmektedir. Elde edilen veriler ve literatür bilgilerine göre RAPD bantlarında kontrole göre değişimin görülmesinin oligonükleotitlerin bağlanma bölgelerinde meydana gelen varyasyonların, genomun yeniden tasarımı nedeni ile oluştuğu düşünülmektedir (Conte vd., 1998; Atienzar vd.,

1999). Ayrıca hücrelerde oluşan metal toksisitesinin DNA molekülünde oksidatif strese bağlı mutasyonlarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir

Ağır metal miks uygulanan hücrelerde apoptoz düzeyi sitometrik Annexin V/PI yöntemi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen verilere göre metal uygulamasına maruz kalan hücrelerde apoptotik değişim sonuçlarına göre 24 saat süre ile uygulama yapılan gruplarda kontrole göre miks 1 ve miks 2 karışımlarında sırasıyla % 25 ve % 39,33 oranında artış tespit edilmiş olup 48 saatlik gruplarda ise bu artış % 35,33 ve % 27,33 oranındadır (Şekil 4.6., Şekil 4.8.). Bu verilere göre kontrole göre 24 saatlik kültürlerde artan konsantrasyon oranı apoptotik hücre sayısında artışa neden olmuştur. 48 saatlik kültürlerde ise miks 1 oranında artış görülmüş ancak artan konsantrasyon miks 2'de zamanla ölen hücre sayısını arttırdığından apoptotik hücre sayısında miks 1'e göre azalmaya neden olmuştur. Ayrıca hücre kültürlerinde ağır metal karışımı kontrole göre canlı hücre sayısında zamanla azalmaya neden olmuştur (miks 1' de 0,72 ve miks 2'de 0,61 kat). Böbrek yetmezliği olan 20 hastadan alınan radyal arter hücrelerinde kontrole göre apoptotik hücrelerde artış gözlemlenmiş, bu artışın BAX ifadesinin aşırı artışı sonucunda ve BAX/BCL2 oranındaki artıştan kaynaklanabileceği, indüklenen apoptozun ateroskleroz ve arteriovenöz riskini arttırabileceği rapor edilmiştir (Hayakawa vd., 1999). BAX/BCL2 oranı bize hücrenin hayatta kalması veya ölüme gitmesi hakkında bilgi verebilmektedir (Liv vd., 2002). Ağır metal uygulamasının apoptotik değişimler üzerine yapılan çalışmalarındaki bulgularla, çalışmamız paralellik göstermektedir.

Yapılan çalışmada ağır metal miks uygulamasının sağlıklı hücrelerde oksidatif strese neden olduğu ve bu stres sonucu antioksidan enzimlerin aktivitesinde artış gözlemlenmiştir. Özellikle Cu-Zn-SOD, Mn-SOD, KAT ve GST gibi antioksidan enzimlerin gen ifadesindeki değişimlerin, strese giren hücrenin etkisini azaltabilmek için zamanla kontrole göre genin ifadesinde anlamlı pozitif bir artışa gittiği düşünülmektedir (Şekil 4.10., Şekil 4.11., Şekil 4.12., Şekil 4.13.). Konu ile ilgili, olarak sıçanlarda yapılmış olan bir çalışmada, kronik ağır metal uygulamasının Cu-Zn-SOD, katalaz, GST gibi antioksidanların gen ifadelerinde artışa neden olabileceği rapor edilmiştir (Ognjanovic vd., 2008). Doğal ortamlarında farklı seviyelerde metal karışımlarına maruz bırakılan üç kahverengi alabalık popülasyonunda (*Salmo trutta*); Cd, Cu ve Zn'ye maruz kalan alabalıkların karaciğerinde SOD, CAT ve GPx

seviyelerinde yükselme görüldüğü rapor edilmiştir (Hansen vd., 2006). Yine yapılan bir çalışmada 170 µM klorin e6 maddesi uygulanmış aort düz kas hücrelerinde 672 nm diyot lazer ışığı ile fotodinamik terapi altında reaktif oksijen türlerinin oluştuğu, antioksidan enzimlerin gen ifadesinde ve apoptotik hücre sayısında artışlar gözlemlendiği rapor edilmiştir (Wawrzyńska vd., 2010). Çalışmamız Ognjanovic ve ark. (2003) Hansen ve ark. (2006), Wawrzyńska ve ark. (2010) ile paralellik göstermektedir. Ayrıca 10 kat fazla ağır metal karışımı uygulanan miks 2 hücrelerinde 48. saatte 24. saate göre Mn-SOD, KAT ve GST gen ifadelerindeki azalmanın, uzun süreli maruziyete bağlı olarak hücrelerin işlevselliğini kaybettiği ya da antioksidan sistemin baskılanarak etkin çalışmamasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Şekil 4.11., Şekil 4.12., Şekil 4.13.) (Cadenas ve Davies, 2000).

Isı şoku proteinleri olarak bilinen HSP27, HSP60 ve HSP70 genlerinin ifadesinde meydana gelen artışların ağır metal toksisitesi sonucunda proteinlerin yanlış katlanmalarında meydana gelen hasarın tamir edilmesi esnasında oluştuğu düşünülmektedir (Şekil 4.14., Şekil 4.15., Şekil 4.16.). Ancak HSP70 gen ifadesinde hem miks 1 hem miks 2 karışımlarında 24. saatte genin ifadesinde azalma olması da bu konsantrasyonlarda HSP mekanizmasının zarar görmüş olabileceğini düşündürmektedir (Şekil 4.20.).

Tümör baskılayıcı genlerden olan P53 geninde meydana gelebilecek bir mutasyonun kanser habercisi olabileceği düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda P53 gen ifadesinde kontrole göre özellikle miks 1 karışımında zamanla artış tespit edilmiştir (Şekil 4.17.). Yapılan bir çalışmada insan aort düz kas hücrelerinde P53 gen ifadesinde meydana gelen artışın DNA'da meydana gelen hasar sonucunda oluşan mutasyonların ateroskleroz (damar sertliği) oluşumuyla ilişkilendirilebileceği rapor edilmiştir (Boyle, 1999). İnsan aort düz kas hücrelerinde P53 gen aktivitesindeki artışın stres kaynaklı olduğu ve tümör oluşumunun engellenmesinde düzeyinin arttığı ateroskleroz ile apoptoz yolağı arasında ilişkisinin olduğu düşünülmektedir.

BCL2 ailesi pro-apoptotik üyelerinden PUMA, NOXA ve BAX'a ait gen ifadelerini incelediğimizde BAX gen ifadesinde (Şekil 4.21.) ağır metal uygulamasına bağlı artışın görüldüğü, anti apoptotik etkiye sahip BCL2 gen ifadesindeki artışın daha düşük düzeyde olduğu, çalışmamızda 48.saatte miks 1 karışımlarında görülen

BAX/BCL2 oranının ise yaklaşık 4 kat olduğu, böbrek yetmezliği görülen 20 hastada radyal arter hücrelerinde kontrole göre gözlemlenmiş BAX/BCL2 oranında da önemli bir artış rapor edilmiş (Hayakawa vd., 1999) meydana gelen bu artışların toksik maddelerin apoptoz yollarında meydana getirdiği değişimlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. P21 gen ifadesi hücre siklusunda G1 evresinin daha uzun sürmesini tetikler ve sentez evresine geçişi geciktirerek hücre bölünmesini yavaşlatır (Von Harsdorf vd., 1999). Çalışmamızda P21 gen ifadesinde kontrole göre genellikle artışın görülmesi hücrelerin DNA hasarını tamir için döngüyü durdurduklarını ve böylece DNA tamirine zaman tanıdıklarını düşündürmektedir (Şekil 4.25.) (Dimmeler ve Zeiher, 2000).

Kaspaz-8 apoptozu indükleyen bir gen dir. Çalışmamızda kaspaz-8 gen ifadesinde hücrelerde kontrole göre genellikle pozitif yönde bir artış görülmüş olup özellikle 24. saatte miks 2’de bu ifade yaklaşık 41 kat artış göstermiştir (Şekil 4.23.). Li ve ark. (2002)’nin DDC uygulamasına tabi tuttukları aort düz kas hücrelerinde kaspaz-8 gen ifadesinde kontrole göre artışın gözlemlendiği, bizim çalışmamız ile Li ve ark.’nın çalışmasında görülen bu artışların toksik madde türlerinin insan aort düz kas hücrelerinde toksik etkisi sonucunda apoptozu indükleyebileceği, toksik maddelerin aort düz kas hücrelerinde apoptoz yolları üzerinde etkisinin olabileceği düşünülmektedir.

Kardiyovasküler hücreler ile apoptoz arasındaki ilişki incelendiğinde, yapılan klinik çalışmalarda insan aort düz kas hücrelerinde oluşan apoptozun; ateroskleroz, aritmi, hipertansiyon, anevrizma, anjiyoplasti restenozu ve taşikardi gibi çeşitli hastalıkların oluşumunu tetikleyebileceği rapor edilmiştir (Boyle vd., 1999). Bu hücrelerde meydana gelen apoptoz; damar hasarı, pıhtılaşmayı ve inflamasyonu tetiklese de apoptoz genellikle damar yaralanmasına ve kan akış hızındaki değişikliklere neden olabileceği gibi bu hastalıklara kesin katkısı tam olarak bilinmemektedir.

Sonuç olarak elde ettiğimiz bulgulara göre insani tüketin amaçlı sularda verilen limitler baz alınarak Cd, Fe, Cu ve Pb ağır metallere oluşturulan miks karışımına maruziyetin, konsantrasyon ve zamana bağlı olarak aort düz kas hücrelerinde genotoksisiteye neden olduğu ve bu genotoksisitenin apoptozu tetiklediği, bu limitler dahilinde başka canlılarla yapılacak daha kapsamlı çalışmalar ile desteklendiği takdirde revize edilmesi gerektiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abe, J. I., & Berk, B. C. (1998). Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in cardiovascular disease. *Trends in cardiovascular medicine*, 8(2), 59-64.
- Ahmad, I., Maria, V. L., Oliveira, M., Pacheco, M., & Santos, M. A. (2006). Oxidative stress and genotoxic effects in gill and kidney of *Anguilla anguilla* L. exposed to chromium with or without pre-exposure to β -naphthoflavone. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 608(1), 16-28.
- Aksoy, Y. (2002). Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 22(4), 442-448.
- Al-Gubory, K. H., Fowler, P. A., & Garrel, C. (2010). The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(10), 1634-1650.
- Alissa, E. M., & Ferns, G. A. (2011). Heavy metal poisoning and cardiovascular disease. *Journal of toxicology*, 2011.
- Alpkent, Z., & Demir, M. (2006). Gıdalarda bulunan antioksidan maddeler ve insan sağlığı üzerine etkileri. *Türkiye 9. Gıda Kongresi Bildiriler Kitabı*, 24-26.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(17), 7915-7922.
- Anderson, D. Y. T. W., Yu, T. W., Phillips, B. J., & Schmezer, P. (1994). The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 307(1), 261-271.

- Aruoma, O. I. (1994). Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 32(7), 671-683.
- Aruoma, O. I. (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American oil chemists' society*, 75(2), 199-212.
- Atienzar, F. A., Conradi, M., Evenden, A. J., Jha, A. N., & Depledge, M. H. (1999). Qualitative assessment of genotoxicity using random amplified polymorphic DNA: comparison of genomic template stability with key fitness parameters in *Daphnia magna* exposed to benzo [a] pyrene. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(10), 2275-2282.
- Atmaca, E., & Aksoy, A. (2009). Oksidatif DNA hasarı ve kromatografik yöntemlerle tespit edilmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20(2), 79-83.
- Atsak, P. (2006). *Egzersiz yapan sıçanlarda kadmiyumun etkileri* (Master's thesis, Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü).
- Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S. J., Das, D. K., Ray, S. D., Kuszynski, C. A. & Pruess, H. G. (2000). Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, 148(2-3), 187-197.
- Bahorun, T., Soobrattee, M. A., Luximon-Ramma, V., & Aruoma, O. I. (2006). Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease. *Internet Journal of Medical Update*, 1(2), 25-41.
- Basta, G., Lazzerini, G., Del Turco, S., Ratto, G. M., Schmidt, A. M., & De Caterina, R. (2005). At least 2 distinct pathways generating reactive oxygen species mediate vascular cell adhesion molecule-1 induction by advanced glycation end products. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 25(7), 1401-1407.
- Bathla, S., & Jain, T. (2016). Heavy Metals Toxicity. *International Journal of Health Sciences and Research (IJHSR)*, 6(5), 361-368.
- Batır, M. B. (2014). *Kurşun (Pb) ve Bakır (Cu) ağır metal stresi uygulanan enginar (cynara scolymus L.) tohumlarının fidelerinde oluşan DNA değişikliklerinin belirlenmesi* (Master's thesis, ESOGÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Becker, L. B. (2004). New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovascular research*, 61(3), 461-470.

- Bertin, G., & Averbeck, D. (2006). Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (areview). *Biochimie*, 88(11), 1549-1559.
- Betteridge, D. J. (2000). What is oxidative stress?. *Metabolism*, 49(2), 3-8.
- Boyle, J. J. (1999). Vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis. *International journal of experimental pathology*, 80(4), 197-203.
- Britton, R. S., Leicester, K. L., & Bacon, B. R. (2002). Iron toxicity and chelation therapy. *International journal of hematology*, 76(3), 219-228.
- Buettner, G. R. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Archives of biochemistry and biophysics*, 300(2), 535-543.
- Bunker, V. W. (1992). Free radicals, antioxidants and ageing. *Medical laboratory sciences*, 49(4), 299-312.
- Burçak, G., & Andican, G. (2004). Oksidatif Dna Hasarı ve Yaşlanma. *Cerrahpaşa tıp dergisi*, 35(4).
- Cadenas, E., & Davies, K. J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging1. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(3-4), 222-230.
- Cai, H., & Harrison, D. G. (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circulation research*, 87(10), 840-844.
- Chen, K., & Keaney, J. F. (2012). Evolving concepts of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Current atherosclerosis reports*, 14(5), 476-483.
- Conner, E. M., & Grisham, M. B. (1996). Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition*, 12(4), 274-277.
- Conte, C., Mutti, I., Puglisi, P., Ferrarini, A., Regina, G., Maestri, E. A., & Manmiroli, N. (1998). DNA fingerprinting analysis by a PCR based method for monitoring the genotoxic effects of heavy metals pollution. *Chemosphere*, 37(14-15), 2739-2749.
- Cortopassi, G. A., & Wong, A. (1999). Mitochondria in organismal aging and degeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1410(2), 183-193.

- Cuypers, A., Plusquin, M., Remans, T., Jozefczak, M., Keunen, E., Gielen, H., & Nawrot, T. (2010). Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals*, 23(5), 927-940.
- Çaylak, E. (2011). Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tip Araştırmaları Dergisi*, 9(1), 73-83.
- Çelen, İ., Şenol, F., & Müezzinoğlu, T. (2011). Prostat kanserinde eser elementlerin rolü. *Üroonkoloji Bülteni*, 2, 27-35.
- Çömelekoğlu, Ü., Mazmancı, B., & Arpacı, A. (2000). Erythrocyte Superoxide Dismutase and Catalase Activities in Agriculture Workers Who Have Been Chronically Exposed to Pesticides. *Turkish Journal of Biology*, 24(3), 483-488.
- Davies, M. J. (2003). Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and biophysical research communications*, 305(3), 761-770.
- Dimmeler, S., & Zeiher, A. M. (2000). Reactive oxygen species and vascular cell apoptosis in response to angiotensin II and pro-atherosclerotic factors. *Regulatory peptides*, 90(1-3), 19-25.
- Doganlar, O., & Doganlar, Z. B. (2015). Effects of a mixture of volatile organic compounds on total DNA and gene expression of heat shock proteins in *Drosophila melanogaster*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 68(2), 395-404.
- Doganlar, O., Doganlar, Z. B., Muranlı, F. D. G., & Guner, U. (2016). Genotoxic Effect and Carcinogenic Potential of a Mixture of As and Cd in Zebrafish at Permissible Maximum Contamination Levels for Drinking Water. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227(3), 87.
- Dranka, B. P., Benavides, G. A., Diers, A. R., Giordano, S., Zelickson, B. R., Reily, C., ... & Landar, A. (2011). Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(9), 1621-1635.
- Dreher, D., & Junod, A. F. (1996). Role of oxygen free radicals in cancer development. *European Journal of cancer*, 32(1), 30-38. [31] Mates, J. M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153(1-3), 83-104.

- Dünder, Y. (2000). *Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar*. Afyon Kocatepe Üniversitesi.
- Epe, B. (1991). Genotoxicity of singlet oxygen. *Chemico-biological interactions*, 80(3), 239-260.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., & Aykin-Burns, N. (2001). Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current topics in medicinal chemistry*, 1(6), 529-539.
- Erenel, G., Erbaş, D., & Arıcıoğlu, A. (1992). Serbest radikaller ve antioksidan sistemler. *Gazi medical journal*, 3(4).
- Fialkow, L., Wang, Y., & Downey, G. P. (2007). Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radical Biology and Medicine*, 42(2), 153-164.
- Fleury, C., Mignotte, B., & Vayssière, J. L. (2002). Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie*, 84(2-3), 131-141.
- Freeman, B. A., & Crapo, J. D. (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 47(5), 412-426.
- Gaetke, L. M., & Chow, C. K. (2003). Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189(1-2), 147-163.
- Georges, M. K., Veregin, R. P., Kazmaier, P. M., & Hamer, G. K. (1993). Narrow molecular weight resins by a free-radical polymerization process. *Macromolecules*, 26(11), 2987-2988.
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in a biotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Giordano, F. J. (2005). Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *The Journal of clinical investigation*, 115(3), 500-508.
- Godt, J., Scheidig, F., Grosse-Siestrup, C., Esche, V., Brandenburg, P., Reich, A., & Groneberg, D. A. (2006). The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *Journal of occupational medicine and toxicology*, 1(1), 22.
- Gök, V., Kayacıer, A., & Telli, R. (2006). Hayvansal ve mikrobiyal kaynaklı doğal antioksidanlar. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2, 35-40.

- Guevara, R., Gianotti, M., Oliver, J., & Roca, P. (2011). Age and sex-related changes in rat brain mitochondrial oxidative status. *Experimental gerontology*, 46(11), 923-928.
- Gürgöze, S. Y., Şahin, T., & Durak, M. H. (2007). Memelilerde Ortalama Yaşam Süresi ve Yaşlanma Sürecinde Serbest Radikallerin Rolü. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 33(1), 43-49.
- Güven, A., Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Timur, S., & Metalurji, İ. T. Ü. (2004). Metallerin çevresel etkileri-III. *Metalurji Dergisi*, 138, 64-71.
- Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?. *The lancet*, 344(8924), 721-724.
- Halliwell, B. A. R. R. Y., Gutteridge, J. M., & Cross, C. E. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 119(6), 598-620.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1990). [1] Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. In *Methods in enzymology* (Vol. 186, pp. 1-85). Academic Press.
- Hansen, B. H., Rømme, S., Garmo, Ø. A., Olsvik, P. A., & Andersen, R. A. (2006). Antioxidative stress proteins and their gene expression in brown trout (*Salmo trutta*) from three rivers with different heavy metal levels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 143(3), 263-274.
- Harraan, D. (1955). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry.
- Hayakawa, Y., Takemura, G., Misao, J., Kanoh, M., Ohno, M., Ohashi, H., & Minatoguchi, S. (1999). Apoptosis and overexpression of bax protein and bax mRNA in smooth muscle cells within intimal hyperplasia of human radial arteries: analysis with arteriovenous fistulas used for hemodialysis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 19(9), 2066-2077.
- Hopkins, W. G. (1999). *Introduction to plant physiology* (No. Ed. 2). John Wiley and Sons.
- Irshad, M., & Chaudhuri, P. S. (2002). Oxidant-antioxidant system: role and significance in human body.

- Jacobson, M. D. (1996). Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends in biochemical sciences*, 21(3), 83-86.
- Järup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British medical bulletin*, 68(1), 167-182.
- Kamata, H., & Hirata, H. (1999). Redox regulation of cellular signalling. *Cellular signalling*, 11(1), 1-14.
- Karabulut, H., & Gülay, M. Ş. (2016). Serbest radikaller. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(1).
- Karaca, S., & Guder, H. (2009). Antioxidant system in dermatology/Dermatolojide antioksidan sistem. *Turkish Journal of Dermatology*, 32-40.
- Kavas, G. Ö. (1994). Reaktif oksijen metabolitlerine fizyopatolojik yaklaşım. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 47(04).
- Kehrer, J. P. (1993). Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical reviews in toxicology*, 23(1), 21-48.
- Kehrer, J. P. (2000). The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149(1), 43-50.
- Khan, S., Cao, Q., Zheng, Y. M., Huang, Y. Z., & Zhu, Y. G. (2008). Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. *Environmental pollution*, 152(3), 686-692.
- Knight, J. A. (2000). Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 30(2), 145-158.
- Koca, N., & Karadeniz, F. (2003). Production mechanisms of free radical and antioxidant defence systems in the body. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 16, 32-37.
- Esra, K. O. Ç., & ÜSTÜN, A. S. (2008). Patojenlere karşı bitkilerde savunma ve antioksidanlar. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 24(1), 82-100.
- Köken, T., Kahraman, A., Serteser, M., & Gökçe, Ç. (2004). Hemodiyaliz ve oksidatif stres. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 5, 9-13.
- Kukreja, R. C., & Hess, M. L. (1992). The oxygen free radical system: from equations through membrane-protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovascular Research*, 26(7), 641-655.

- Lander, H. M., Ogiste, J. S., Teng, K. K., & Novogrodsky, A. (1995). p21ras as a common signaling target of reactive free radicals and cellular redox stress. *Journal of Biological Chemistry*, 270(36), 21195-21198.
- Li, J., Li, P. F., Dietz, R., & Von Harsdorf, R. (2002). Intracellular superoxide induces apoptosis in VSMCs: role of mitochondrial membrane potential, cytochrome C and caspases. *Apoptosis*, 7(6), 511-517.
- Mates, J. M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153(1-3), 83-104.
- Maxwell, S. R., & Lip, G. Y. (1997). Free radicals and antioxidants in cardiovascular disease. *British journal of clinical pharmacology*, 44(4), 307-317.
- McCay, P. B. (1985). Vitamin E: interactions with free radicals and ascorbate. *Annual review of nutrition*, 5(1), 323-340.
- McCord, J. M. (1985). Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New England Journal of Medicine*, 312(3), 159-163. [41]
- McCord, J. M. (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American journal of medicine*, 108(8), 652-659.
- Meister, A. (1994). Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *Journal of Biological Chemistry-Paper Edition*, 269(13), 9397-9400.
- Memişoğulları, R. (2005). Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* 3: 30-39.
- Meral, R., Doğan, İ. S., & Kanberoğlu, G. S. (2012). Fonksiyonel gıda bileşeni olarak antioksidanlar. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2(2).
- Mercan, U. (2004). Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(1), 91-96.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9), 405-410.
- Muscari, C., Giaccari, A., Giordano, E., Clô, C., Guarnieri, C., & Caldarera, C. M. (1996). Role of reactive oxygen species in cardiovascular aging. In *Biochemical Mechanisms in Heart Function* (pp. 159-166). Springer, Boston, MA.
- Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Rsc Advances*, 5(35), 27986-28006.

- Nordberg, J., & Arnér, E. S. (2005). Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin System. *Free Radical Biology and Medicine*, 39(10), 1287.
- Nordberg, J., & Arnér, E. S. (2005). Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin System. *Free Radical Biology and Medicine*, 39(10), 1287.
- Oberley, L. W. (1988). Free radicals and diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*, 5(2), 113-124.
- Ognjanovic, B. I., Markovic, S. D., Pavlovic, S. Z., Zikic, R. V., Stajn, A. S., & Saicic, Z. S. (2008). Effect of chronic cadmium exposure on antioxidant defense system in some tissues of rats: protective effect of selenium. *Physiological research*, 57(3), 403.
- Orhan, Z., Köksal, N., Gökırmak, M., Hacıevliyagil, S. S., Hasanoğlu, H. C., Mehmet, N., & Yıldırım, Z. (2003). KOAH akut alevlenmesinde oksidatif stres ve tedavinin oksidan-antioksidan denge üzerine etkisi. *Solunum Hastalıkları*, 14, 5-10.
- Öngören, G. (2016). *Multijenerasyonel kadmiyum (cd) uygulamasına maruz kalan Drosophila melanogaster 'de bazı moleküler yanıtların belirlenmesi*, (Master's thesis, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Özkan, T. B. (2005). Çocuklarda Wilson Hastalığı. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 31(3), 163-170.
- Påhlsson, A. M. B. (1989). Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants. *Water, Air, and Soil Pollution*, 47(3-4), 287-319.
- Panigrahi, A. (2014). Heavy metal toxicity. *Everyman's Science*, 418.
- Parlakpınar, H., Koç, M., & Acet, A. (2004). Yaşlanmada Apoptozis Ve Melatoninin Etkisi. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 24(1), 62-67.
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS*, 4(2), 89.
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7), 1035- 1042.

- Pinzino, C., Capocchi, A., Galleschi, L., Saviozzi, F., Nanni, B., & Zandomeneghi, M. (1999). Aging, free radicals, and antioxidants in wheat seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1333-1339.
- Pryor, W. (Ed.). (2012). *Free radicals in biology* (Vol. 6). Elsevier.
- Raha, S., & Robinson, B. H. (2000). Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends in biochemical sciences*, 25(10), 502-508.
- Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical interventions in aging*, 2(2), 219.
- Rao, P. S., Kalva, S., Yerramilli, A., & Mamidi, S. (2011). Free radicals and tissue damage: role of antioxidants. *Free radicals and antioxidants*, 1(4), 2-7.
- Reiter, R. J., Guerrero, J. M., Garcia, J. J., & Acuna-Castovejjo, D. A. R. I. O. (1998). Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging: relation to melatonin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854(1), 410-424.
- Risom, L., Møller, P., & Loft, S. (2005). Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 592(1), 119-137.
- Sabri, A., Hughie, H. H., & Lucchesi, P. A. (2003). Regulation of hypertrophic and apoptotic signaling pathways by reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Antioxidants and Redox Signaling*, 5(6), 731-740.
- Sabuncuoğlu, S., & Özgüneş, H. (2011). Kemoterapi, Serbest Radikaller Ve Oksidatif Stres. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 31(2), 137-150.
- Sachdeva, M., Karan, M., Singh, T., & Dhingra, S. (2014). Oxidants and antioxidants in complementary and alternative medicine: A review. *Spatula DD*, 4(1), 1-16.
- Sayın, O., Arslan, N., & Güner, G. (2008). Resveratrol ve Kardiyovasküler Sistem. *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem]*, 33(3), 117-121.
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology*, 24(10), R453-R462.
- Seddon, M., Looi, Y. H., & Shah, A. M. (2007). Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart*, 93(8), 903-907.
- Sevim, D. (2011). Antioksidanlar ve Zeytinyağı. *Zeytin Bilimi*, 1(1) 43-47

- Sezer, K., & Keskin, M. (2014). Serbest Oksijen radikallerinin hastalıkların patogenezisindeki rolü. *FÜ Sağ. Bil. Vet. Dergisi*, 28(1), 49-56.
- Shi, H., Hudson, L. G., & Liu, K. J. (2004). Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(5), 582-593.
- Shinde, A., Ganu, J., & Naik, P. (2012). Effect of free radicals & antioxidants on oxidative stress: a review. *Journal of Dental and Allied Sciences*, 1(2), 63.
- Sies, H. (1986). Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie International Edition*, 25(12), 1058-1071.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology*, 82(2), 291-295.
- Stohs, S. J., & Bagghi, D. (2005). Oxidative Mechanisms in the Toxicity of Metal Ions. *Free Radical Biology and Medicine*, 39(10), 1267-1268.
- Sugamura, K., & Keaney Jr, J. F. (2011). Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(5), 978-992.
- Tamer, L., Polat, G., Eskandari, G., Ercan, B., & Atik, U. (2012). Serbest radikaller. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 1(1), 52-58.
- Taniyama, Y., & Griendling, K. K. (2003). Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*, 42(6), 1075-1081.
- Taverne, Y. J., Bogers, A. J., Duncker, D. J., & Merkus, D. (2013). Reactive oxygen species and the cardiovascular system. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013.
- 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). Springer, Basel.
- Tekeli, H. (2013). *Karbon tetraklorür ile oluşturulan karaciğer hasarında glutatyon (GSH) ve glutatyon s-transferaz (GST) aktivitesi üzerine n-asetil sisteinin etkisi* (Master's thesis, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü).
- Touyz, R. M. (2004). Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance?. *Hypertension*, 44(3), 248-252.
- Toyokuni, S. (1999). Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathology international*, 49(2), 91-102.

- Tuzun, Y. (2009). Yakut M. Demir metabolizması ve herediter hemokromatozis. *Güncel Gastroenteroloji*, 13(2), 94-100.
- Türközü, D., & Şanlıer, N. (2014). Gıdalardaki Ağır Metal Kontaminasyonları: Bulaşma Kaynakları, Sağlık Riskleri ve Ulusal/Uluslararası Standartlar. *Electronic Journal of Food Technologies*, 9(3), 29-46.
- Url-1: www.fitekran.com/antioksidanlar-hakkinda-hersey/, erişim tarihi 12.02.2018
- Url-2: media.cellsignal.com/www/pdfs/science/pathways/Apoptosis_Mitochondrial.pdf, erişim tarihi 19.11.2017
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
- Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), 1-40.
- Varol, S., Davraz, A., & Varol, E. (2008). Yeraltı suyu kimyası ve sağlığa etkisinin tıbbi jeoloji açısından değerlendirilmesi. *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 7(4), 351-356.
- Vassallo, D. V., Simões, M. R., Furieri, L. B., Fioresi, M., Fiorim, J., Almeida, E. A. S., ... & Salaices, M. (2011). Toxic effects of mercury, lead and gadolinium on vascular reactivity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 44(9), 939-946.
- Von Harsdorf, R., Li, P. F., & Dietz, R. (1999). Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis. *Circulation*, 99(22), 2934-2941.
- Wawrzyńska, M., Kałas, W., Biały, D., Zioło, E., Arkowski, J., Mazurek, W., & Strzdała, L. (2010). In vitro photodynamic therapy with chlorin e6 leads to apoptosis of human vascular smooth muscle cells. *Archivum immunologiae et therapiaeexperimentalis*, 58(1), 67-75.
- Wolff, S. P. (1993). Diabetes mellitus and free radicals: free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. *British medical bulletin*, 49(3), 642-652.

- Wuana, R. A., & Okieimen, F. E. (2011). Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *Isrn Ecology, 2011*.
- Yla-Herttuala, S. E. P. P. O. (1999). Oxidized LDL and atherogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences, 874*(1), 134-137.

ÖZGEÇMİŞ

12 Şubat 1988 yılında Tekirdağ'da doğdum. İlköğrenimimi Cafer Tayyar İlköğretim Okulu, ortaöğrenimimi ise 50.Yıl İlköğretim Okulunda tamamladım. 2005 yılında da Uzunköprü Anadolu Lisesini bitirdim. 2 yıl sonra Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazanıp, 2011 yılında lisans eğitimimi tamamladım. 2013 Eylül ayında Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimime başladım ve halen devam etmekteyim. 2011 yılında Pedagojik Formasyon eğitimimi tamamladım. 2012-2014 yılları arasında Sağlık Meslek ve İmam Hatip Liselerinde ücretli öğretmenlik yaptım. 2014 yılı Haziran ayında atanmış olduğum Uzunköprü Kaymakamlığında Sosyal Yardım ve İnceleme Görevlisi olarak çalışmaktayım.