

The Effects of Peroxiredoxin 6 Gene rs41055489 Variation on Oxidative Stress Mechanisms in Human Model Organism

İnsan Model Organizmada Peroksiredoksin 6 Geni rs41055489 Varyasyonunun Oksidatif Stres Mekanizmasına Etkileri

Zeynep ATASAYAR ÜNVERİ¹, Meliha KOLDEMİR GÜNDÜZ², Figen Esin KAYHAN¹, Güllü KAYMAK¹, Ülgen ZENGİN³, Penbe ÇAĞATAY⁴, Belgin SÜSLEYİCİ DUMAN²

¹Department of Hydrobiology, Marmara University Faculty of Arts and Sciences, İstanbul, Turkey

²Department of Molecular Biology, Marmara University Faculty of Arts and Sciences, İstanbul, Turkey

³Department of Anesthesiology and Reanimation, Bezmalem Vakıf University, İstanbul, Turkey

⁴Department of Biostatistics and Medical Science, İstanbul University İstanbul Faculty of Medicine, İstanbul, Turkey

ABSTRACT

Objective: Peroxiredoxins (Prx) belong to peroxidase type enzyme group which reduce redox active cysteine residues. The aim of this study was to determine the allele frequencies of Prx 6 gene rs41055489 polymorphism in zebrafish and in which extent may improve protective measures against oxidative stress indicators.

Methods: The Prx6 gene rs41055489 genotypes were determined with qPCR method in zebrafish exposed to different doses of heavy metals. Additionally, the glutathion (GSH), malondialdehyde (MDA) and catalase (CAT) levels were measured.

Results: The Prx6 gene rs41055489 genotype frequencies were determined respectively as 97.7% for homozygous wild type (A/A), 2.3% for heterozygous (A/C) in group. The polymorphic genotype (C/C) was not detected in our study group.

Conclusion: Prx6 rs41055489 heterozygous gene polymorphism have been observed to inhibit defence mechanisms.

Keywords: Zebra fish, Peroxiredoxins 6 gene, rs41055489 polymorphism, heavy metal, oxidative stress

ÖZET

Amaç: Peroksiredoksinler (Prx), aktif redoks sistein kalıntılarının hidrojen peroksidi indirgemesinde kullanılan peroksidaz enzim grubuna aittir. Bu çalışmanın amacı, zebra balığı solungaçlarında antioksidatif etkileri bilinen Prx6 geni rs41055489 genotiplerine bağlı olarak oksidatif stres belirteçlerine karşı geliştirilen koruyucu önlemleri araştırmaktır.

Yöntemler: Ağır metallerin farklı dozlarına maruz bırakılan zebra balıklarında Prx6 geni rs41055489 genotipleri kantitatif PZR (qPZR) yöntemiyle belirlendi. Ayrıca glutatyon (GSH), malondialdehid (MDA) ve katalaz (CAT) düzeyleri ölçüldü.

Bulgular: Prx6 geni rs41055489 polimorfizmi için genotip sıklıkları A/A (yabanıl tip), A/C (heterozigot) genotipler için sırasıyla %97,7, %2,3 olarak tespit edildi. Çalışma grubumuzda polimorfik genotipi homozigot formda (C/C) taşıyan bir balığa rastlanmadı.

Sonuç: Prx6 rs41055489 gen polimorfizmini heterozigot formda taşıyan balıkta, mevcut oksidatif stres savunma mekanizmalarının baskılandığı gözlemlendi.

Anahtar Sözcükler: Zebra balığı, Peroksiredoksin 6 geni, rs41055489 polimorfizmi, ağır metal, oksidatif stres

Giriş

Oksidatif stres birçok hastalığın oluşum ve gelişiminde rol oynar. Antioksidatif enzimler, süperoksit ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerini uzaklaştırarak, hücrel savunmada oksidatif strese karşı görev yaparlar. Antioksidan enzim düzeylerinin yükselmesiyle sonuçlanan sinyal yollarının aktivitelerindeki değişiklikler aynı zamanda artan oksidatif stres direnci ile birlikte yaşam kalitesinin yükselmesini sağlar (1,2).

Peroksiredoksinler (Prx) prokaryotik ve ökaryotik organizmalarda geniş bir dağılım gösteren peroksidaz enzim ailesinin üyelerindendir. Peroksiredoksinler, aktif redoks sistein kalıntılarındaki hidrojen peroksidin indirgenmesinde kullanılan enzimlerdir (3). Prx'in en önemli görevi, organik hidroperoksit (ROOH), peroksinitrit ve hidrojen peroksitlerin toksik etkisini azaltarak veya inhibe ederek antioksidatif etki göstermektir (4). Literatürde insan, maya ve Drosophila'da yapılan çalışmalarda, Prx reaktif oksijen türlerinin (ROS) enzimatik taşınmasında rol aldığı ve vücut hücrelerini oksidatif strese

Address for Correspondence / Yazışma Adresi: Belgin SÜSLEYİCİ DUMAN; Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye Phone: +90 535 291 33 19 E-mail: belgin.susleyici@marmara.edu.tr

©Copyright 2015 by Bezmalem Vakıf Üniversitesi - Available online at www.bezmalemscience.org

©Telif Hakkı 2015 Bezmalem Vakıf Üniversitesi - Makale metnine www.bezmalemscience.org web sayfasından ulaşılabilir.

karşı koruduğu bildirilmiştir (5-7). Peroksiredoksin enzimleri katalitik mekanizmalarına göre; tipik 2-Cys, atipik 2-Cys ve 1-Cys olmak üzere sınıflandırılırlar (8,9). Prx-6 ise, Prx ailesinin 1-Cys alt grubunda sınıflandırılmaktadır ve antioksidatif olaylarda görevlidir (7,10-12). Prx6 geni, *Laternula elliptica* (13), *Chinese shrimp*, *Fenneropenaeus chinensis* (14), *Halotis discusdiscus* (15), *Crassostrea giga* (16), ve *Arenicola marina* (17) gibi bazı sucul türlerde de tanımlanmıştır. Prx6 geni *Salmo salar* (GenBank kodu. ACI67571), *Oncorhynchus mykiss* (GenBank kodu. NP_001158604), *Ictalurus punctatus* (GenBank kodu. ABG77029), ve *Danio rerio* (GenBank kodu. NP_957099) olmak üzere sadece dört balık türünde dizilenmiştir (18). Peroksiredoksin geni rs41055489 polimorfizmi 20'inci kromozomun 1719953'inci pozisyonunda bulunmaktadır (19). rs41055489 polimorfizmi A-C nükleotid değişimi sonucunda oluşmaktadır (19). Literatürde, Prx-6 genine ait 100 adet tek nükleotid polimorfizmine (SNP) tanımlanmıştır (19).

Ağır metaller besin zinciri boyunca metabolik bakımdan aktif doku ve organlarda birikmektedir. Bu biyobirikim hücresel ve moleküler düzeyde işlevsel ve yapısal bozukluklara sebep olmaktadır. Kısa süreli kadmiyum etkisi sonrasında sucul canlılarda hemotolojik etkiler, kalsiyum dengesinde bozulmalar, böbrek, solungaç ve bağırsak gibi dokularda histopatolojik değişiklikler, hücre dışı sıvıların iyon seviye değişimleri ve osmoregülasyon kapasite farklılıkları gözlenebilmektedir (20). Kadmiyum, balıkların çeşitli enzim sistemlerini etkileyerek, nöroiletim, transepitelyal taşınma, bağışıklık sistemi, oksidazlar gibi temel fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmaları bozabilir. Kadmiyumun hücrelerdeki enzim havuzlarından çinko ve bakır ile yer değiştirerek, bakır ve çinko dengesini bozduğu bilinmektedir (21). Hücrelerde artan bakır seviyeleri genotoksik ve sitotoksik etkilere yol açmaktadır. Bakır toksik etkisini, lipid peroksidasyonuna yol açarak, DNA'da hasara neden olarak ve kalsiyum dengesini bozarak gerçekleştirmektedir (22). Tatlısu balıklarında sucul ortama giren bakır ilk olarak balığın solungaçları ile etkileşir, daha sonra karaciğer ve bağırsaklarda toksik etkisini gösterir (23,24).

Metabolik bir element olan çinkonun subletal ortam derişimlerinde balıkta büyüme yavaşlar, yüzme hareketleri ve kan biyokimyası değişir, aynı zamanda yumurtlama kapasitesi azalır (25). Çinko birikimi en sıklıkla solungaç ve bağırsaklarda gözlenmektedir.

Çalışmamızdaki amaç, omurgalı model organizma olan zebra balığının (*Danio rerio*) solungaçlarında antioksidatif etkileri bilinen Prx6 geni rs41055489 genotiplerine bağlı olarak oksidatif stres belirteçlerine karşı geliştirilen koruyucu önlemleri belirlemektir.

Yöntemler

Çalışma grubu

Ticari olarak temin edilen 43 adet zebra balığı, araştırma laboratuvarına poliüretan torba içerisinde getirilmiştir. Ze-

bra balıkları büyüklükleri 70x30x45 cm olan 7 adet cam deney akvaryumuna gruplara ayrılarak yerleştirildi. Balıkların bulunduğu akvaryumlardaki su sıcaklığı 26-28°C arasında ve pH 7 olacak şekilde sabitlenerek, akvaryumlara bir hava motoru yardımı ile yeterli düzeyde (9-12 mg/L) oksijen verildi. Deneyde balıkların beslenmesi için toz balık yemi kullanıldı. Yemleme, balıklar doyana kadar sabah ve akşam olmak üzere günde 2 kez tekrarlandı. Toksikolojik deneyler esnasında yemleme yapılmadı (26). Balıkların ortama uyumları sağlandıktan sonra akvaryumlara 24 saat süreyle artan farklı dozlarda bakır (0,1 ppm Cu, n=6; 0,5 ppm Cu, n=5), çinko (0,1 ppm Zn, n=7; 0,5 ppm Zn, n=6) ve kadmiyum (0,1 ppm Cd, n=8; 0,5 ppm Cd, n=5) eklendi. Kontrol grubuna da (n=6) aynı fiziksel şartlar uygulandı. Deney süresince balıklara herhangi bir stres önleyici anestetik madde verilmedi. Belirlenen deney süreleri sonunda balıklar -20°C'de 3-5 dakikalık soğuk şok ile uyuşturulduktan sonra solungaç dokuları hızlıca disekte edildi. Her balıktan alınan solungaç örnekleri ikiye ayrılarak biri genotip belirlenmesi, diğeri biyokimyasal analizler için kullanıldı.

DNA izolasyonu ve genotiplerin belirlenmesi

Solungaç dokularına ait DNA izolasyonu, High Pure PCR Template Preparation Kit protokolüne uygun olarak yapıldı (Roche, Almanya). rs41055489 polimorfizmi Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) yöntemi ile LightCycler 2.0 Instrument (Roche Diagnostics, Almanya) sistemi kullanılarak belirlendi. Çalışmada LightCycler 2.0 qPCR cihazına uygun LightCycler® FastStart DNA Master Hyb-Probe kiti ve Hibridizasyon prob (FRET) (TibMolBiol Kiti) kullanılarak Prx-6 geni rs41055489 polimorfizminin genotip belirlenmesi yapıldı. Cu, Zn, Cd gibi ağır metallere maruz bırakılan balık grupları ve kontrol grubu balıkların solungaç doku örneklerinden High Pure PCR Template Preparation Kit (ROCHE) kullanılarak genomik DNA'ları izole edildi (27). Çalışmamızda rs41055489 genotiplerini belirlemek amacıyla hibridizasyon prob ve primer dizileri kullanıldı. rs41055489 tek nükleotid polimorfizmine ait hibridizasyon prob kullanılarak LightCycler FastStart DNA Master kiti ile hedef bölge kantitatif olarak qPCR LightCycler 2.0 sistemi ile çoğaltıldı. Erime eğrisi (Melting curve) analizi kullanılarak, uygun erime sıcaklıklarının incelenmesiyle genotipler belirlendi.

%10 Doku homojenatının hazırlanması

Solungaç doku örnekleri ayrı ayrı serum fizyolojik ile yıkanıp kanı temizlendikten sonra bir süzgeç kağıdı ile kurutularak tartıldı. Gerekli miktarda serum fizyolojik ve cam boncuk yardımıyla dismembranatörde parçalandı. Her doku homojenatı ayrı ayrı ependorf tüpler içerisine konuldu, etiketlendi ve -20°C'de analiz edilene kadar saklandı.

Solungaç dokusunda malondialdehit (MDA) tayini

Dokularda oluşan lipid peroksidasyonunun (LPO) göstergesi olan MDA ile tiyobarbitirik asit arasındaki reaksiyon sonucu oluşan pembemsi rengin absorbansı spektrofotometrik olarak ölçüldü. Doku homojenatında LPO düzeyleri MDA

için saptanmış ekstinksiyon kat sayısı ($1.56.105 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanılarak nmol MDA/mg protein cinsinden hesaplandı (28).

Solungaç dokusunda indirgenmiş glutatyon (GSH) tayini

Elmann ayırıcı, 5-5' ditiyobis 1-2 nitro benzoik asid ile sülfidril gruplarının reaksiyonu sonucu oluşan renkli ürün spektrofotometrik olarak değerlendirilir. Homojenatta GSH düzeyleri, seyreltme faktörü ve oluşan sarı renkli ürünün 412 nm'de ekstinksiyon katsayısı ($13600/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanılarak GSH $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein cinsinden hesaplandı (29).

Solungaç dokusunda katalaz aktivitesi (CAT) tayini

Katalaz aktivitesi enzimi; H_2O_2 'nin, H_2O 'ya dönüşüm reaksiyonunu katalizler. Bu dönüşüm 240 nm'de absorbansın azalması ile takip edilebilir. Bir dakikadaki absorbans azalması katalaz aktivitesine karşılık gelir. Süpernatant'daki katalaz aktivitesi belirlenmiş ekstinksiyon katsayısı 0,004 (0,00394) $\text{mM}^{-1}/\text{mm}^{-1}$ kullanılarak, yapılan seyreltmeler ölçüsünde U/mg protein/dk cinsinden hesaplandı (30).

İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler SPSS (Statistical Package for the Social Sciences Chicago, IL, ABD) 17,0 paket programı kullanılarak yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler sürekli ölçümlü değişkenler için ortalama $\pm$ standart hata (SH) ve medyan (minimum-maksimum) olarak verildi. Kategorik değişkenler gözlem sayısı ve (%) değer olarak gösterildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda normal dağılım gösteren değişken için Student's-t testi, normal dağılım göstermeyen değişkenler için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Biyokimyasal parametrelerin gruplar arasındaki farklılıkları Varyans analizi ile tespit edildi. Bonferroni testi ile her bir parametre için gruplar bire bir karşılaştırıldı. $P < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Bu çalışma, ağır metallerle karşı antioksidatif savunma mekanizmalarının göstergesi olan antioksidan enzim seviyeleri ile peroksiredoksin6 (Prx6) rs41055489 gen polimorfizmi arasındaki ilişkilerin incelendiği ve ülkemizde rapor edilen ilk çalışmadır.

Çalışmamızda grup ayırmaksızın zebra balıklarına ait Prx6 geni rs41055489 genotip sıklıkları Tablo 1'de verildi. Prx6 geni rs41055489 polimorfizmi için genotip sıklıkları A/A (yabanıl tip), A/C (heterozigot) genotipleri için sırasıyla %97,7, %2,3 olarak tespit edildi. Çalışma grubumuzda polimorfik genotipi homozigot formda (C/C) taşıyan bir balığa rastlanmadı (Tablo 1).

Çalışmamızda yer alan kontrol ve ağır metal uygulanan zebra balıklarına ait Prx6 geni rs41055489 genotip sıklıkları Tablo 2'de verildi. Deney gruplarımızdaki 0,5 ppm Cd uygulanan (grup 7) grup içerisinde sadece bir balığın prx6 rs41055489 genotipi heterozigot olarak tespit edilmiş olup, diğer gruplarda yer alan balıkların tümü yabanıl tipte genotipe sahip bulunmuştur (Tablo 2).

Tablo 1. Zebra balıklarına ait prx6 geni rs41055489 genotip dağılımları

Prx6 geni rs41055489 genotip sıklıkları			
	Homozigot yabanıl tip (A/A), n (%)	Heterozigot (A/C), n (%)	Homozigot polimorfik (C/C), n (%)
Zebra Balığı	42 (97,7)	1 (2,3)	0 (0)
Sonuçlar sayısı (%) değer olarak ifade edilmiştir. n: Örnek sayısı.			

Tablo 2. Farklı dozlarda Cu, Zn ve Cd uygulanmış zebra balıklarında prx6 geni rs41055489 genotip dağılımları

Prx6 geni rs41055489 genotip sıklıkları			
	Homozigot yabanıl tip (A/A), n (%)	Heterozigot (A/C), n (%)	Homozigot polimorfik (C/C), n (%)
Grup 1 (Kontrol)	6 (100)	0 (0)	0 (0)
Grup2 (0,1 ppm Cu)	6 (100)	0 (0)	0 (0)
Grup 3 (0,5 ppm Cu)	5 (100)	0 (0)	0 (0)
Grup 4 (0,1 ppm Zn)	7 (100)	0 (0)	0 (0)
Grup 5 (0,5 ppm Zn)	6 (100)	0 (0)	0 (0)
Grup 6 (0,1 ppm Cd)	8 (100)	0 (0)	0 (0)
Grup 7 (0,5 ppm Cd)	4 (80)	1 (20)	0 (0)
Sonuçlar sayısı (%) değer olarak ifade edilmiştir. n: Örnek sayısı. Cu: Bakır, Zn: Çinko, Cd: Kadmiyum.			

Ticari olarak temin edilen zebra balıklarına farklı subletal dozlarda ağır metaller (bakır, kadmiyum ve çinko) uygulanmış ve solungaç dokularında lipid peroksidasyon (MDA), antioksidatif enzimler (GSH, CAT) ve total protein seviyeleri her bir ağır metal için ayrı tablolarda verilmiştir (Tablo 3). Heterozigot genotipte olduğu saptanan (grup 7) balığın GSH düzeyi 0,08804 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olup, aynı düzeyde Cd uygulanmış gruptaki balıklara kıyasla daha düşük; MDA düzeyi 0,36417 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olup, aynı düzeyde Cd uygulanmış gruptaki balıklara kıyasla daha yüksek; CAT düzeyi ölçülebilir sınırların altında olduğundan belirlenememiştir (Tablo 3).

Tartışma

Genetik toksikoloji, canlıların kalıtım materyali olan DNA üzerinde meydana gelen toksik etkileri inceleyen bilim dalıdır. DNA'da kodlanan genetik bilgiler, kopyalandıktan sonra aslına uygun olacak şekilde gelecek nesillere aktarılır. Normal biyolojik süreçte fiziksel, kimyasal ve biyolojik etkenlerin DNA ile etkileşimleri sonucunda genetik yapıda bozulmalar meydana gelebilir. Sucul ekosistemlerle ilişkili genotoksik etkilerin araştırılmasında balıklar son on yılda model organizma olarak sıklıkla kullanılmaktadır (31).

Glutatyon (GSH), oksijen radikali yakalayıcısı olarak antioksidan savunmada önemlidir. GSH düzeyindeki değişim, canlıların detoksifikasyon yeteneğinin önemli bir göstergesidir. GSH sistemi balıklarda oksidatif hasara karşı farklı yol-

Tablo 3. Farklı ağır metaller uygulanmış zebra balıklarındaki antioksidatif ve lipid peroksidasyon parametreleri

	Glutasyon (GSH) (µg/mL) Ort±SH; Medyan (minumum-maksimum)	Malondialdehit (MDA) (µg/mL) Ort±SH; Medyan (minumum-maksimum)	Katalaz (CAT) (µg/mL) Ort±SH; Medyan (minumum-maksimum)
Grup 1 (Kontrol)	0,0120±0,0026; 0,0109 (0,0043-0,0207)	0,2674±0,1361; 0,2052 (0,0688-0,5280)	6,8969±0,7585; 7,2008 (3,4611-9,0553)
Grup2 (0,1 ppm Cu)	0,1193±0,0837; 0,0391 (0,0152-0,5370)	0,1084±0,0703; 0,0353 (0,0167-0,4570)	6,2616±0,7627; 5,5614 (4,3627-9,3012)
Grup 3 (0,5 ppm Cu)	0,1532±0,1229; 0,0261 (0,0054-0,6413)	0,1606±0,0394; 0,1533 (0,0456-0,2664)	7,2469±7,9295; 4,0758 (2,0266-18,8094)
Grup 4 (0,1 ppm Zn)	Örnek sayısı yetersiz	0,0689±0,0383; 0,0893 (0,0246-0,928)	9,6189±0,8769; 8,9839 (7,3545-12,7848)
Grup 5 (0,5 ppm Zn)	0,0380±0,0224; 0,0222 (0,0119-0,0739)	0,1908±0,1590; 0,1890 (0,0066-0,3787)	7,7684±2,3059; 5,5102 (2,7438-15,5512)
Grup 6 (0,1 ppm Cd)	0,0154±0,0073; 0,0043 (0,0011-0,0478)	0,0432±0,0105; 0,0473 (0,0062-0,0806)	7,3622±0,9286; 7,8566 (4,0758-10,7151)
Grup 7 (0,5 ppm Cd)	0,1950±0,1597; 0,0239; (0,0142-0,8315)	0,0930±0,0679; 0,0285 (0,0163-0,3641)	3,7210±1,4188; 3,5840 (2,3750-5,2028)

Değerler ortalama ± standart hata (SH); medyan (minumum-maksimum) olarak ifade edildi. n: örnek sayısı; Cu: bakır; Zn: çinko; Cd: kadmiyum

lardan kofaktör gibi davranarak çalışır. Hücrelerde glutatyonun anti-oksidatif fonksiyonu konsantrasyon, reaksiyon hızı ve sentez hızına bağlı olarak ortaya çıkar. Metal-GSH konjugasyon işlemi metallerin safra ile atılmasını sağladığından, GSH'ı tüketmesine bağlı olarak antioksidan savunma kapasitesini azaltmaktadır (32). GSH miktarı hücresel işlevlerin korunmasında önemli olup detoksifikasyon ve oksidatif stres durumunda azalabilmektedir. Ancak devam eden stres durumunda GSH/GSSG (indirgenmiş/okside formdaki glutatyon) oranı adaptif mekanizmaların etkisi ile oksidatif strese karşı koyabilmek üzere artmaktadır (33). Pek çok enzimatik ve non-enzimatik detoksifikasyon reaksiyonlarının substratı olan glutatyon, kirleticilere maruz kalan balıklarda etkin bir biyobelirteç olarak ele alınmaktadır. GSH, yapısında bulunan yüksek oranda reaktif sülfidril gruplarına metalleri bağlayarak uzaklaştırır (34). Çalışmamızda balıklara uygulanan 0,1 ve 0,5 ppm'lik Cu dozlarının kontrol grubuna kıyasla daha yüksek seviyelerde olması, balık solungaçlarında bulunan GSH varlığına bağlı olarak bakırın tutulduğunu göstermektedir. Çalışmamızda, prx6 geni rs41055489 varyasyonu için yabancı tipte genotipe sahip balığa bakır uygulanan grupların hiçbirinde rastlamadığımız için, gen polimorfizminin glutatyon seviyeleri üzerine etkileri hakkında yorum yapılamamıştır.

Peroksiredoksin 6 rs41055489 gen polimorfizmi tüm çalışma gruplarında bulunan balıklardan sadece 0,5 ppm Cd uygulanmış grup içerisinde 1 adet heterozigot formda zebra balığında bulunmuştur. Gen polimorfizmini heterozigot olarak taşıyan bu balıkta ölçülen GSH düzeyi (0,08804 µg/mL), 0,5 ppm Cd uygulanan ve homozigot yabancı tipte

gen polimorfizmine sahip diğer balıklara (0,2217 µg/mL) kıyasla daha düşük bulunmuştur. GSH düzeyinde belirlen bu azalmanın, prx6 genindeki inaktif durumda olan allelin inhibitör etkisinden kaynaklanıyor olabileceği düşüncesindeyiz.

Malondialdehit, lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ürünlerden biridir ve oksidatif hasarı göstermede yaygın olarak kullanılan bir parametredir. MDA miktarının yüksek bulunması lipid peroksidasyonuna işaret etmektedir. Lipid peroksidasyonunun meydana gelmemesi veya düşük düzeylerde olması oksidatif enzimlerin koruyucu etkilerini ifade eder. MDA, DNA ve proteinler ile etkileşime girebildiğinden hücrenin fonksiyonel kapasitesini belirleyen mekanizmaların geri dönüşümsüz olarak bozulmasına neden olur (35). MDA'nın, DNA iplikleri arasında çapraz bağlar oluşturarak biyolojik etkiler gösterdiği rapor edilmiştir (36). Ayrıca MDA'nın DNA ve proteinler arasında da çapraz bağlar oluşturduğu bilinmektedir (37). MDA'nın bahsedilen genotoksik aktivitelerinin hücrelerde yol açtığı sonuçlar tam olarak bilinmemekle birlikte mutasyonlara sebep olduğu düşünülmektedir. Bakırın DNA'ya hasar verici etkisi MDA ile etkileşimi sonucu meydana gelir. Hücreye giren bakırın %95'i ilk 20 dakika içinde indirgenerek ya da okside olarak bilinen etkileri yapmak üzere aktifleştirilir. Çalışmamızda prx6 rs41055489 polimorfizmi için homozigot yabancı tipteki balıklarda uygulanan metallerin (Cu, Zn, Cd) artan dozları ile beraber MDA seviyelerinde saptanan azalmanın, metallerin solungaç dokusunda meydana getirdiği zararları ortadan kaldırmak üzere LPO aktivitesini azalttığı şeklinde yorumlanabilir. Oysa ki, prx6 rs41055489 polimorfizmi

için heterozigot balıkta saptanan belirgin düzeydeki MDA artışı (0,36417 µg/mL), polimorfik allelden dolayı beklenen düşüşün gerçekleşmemesini açıklamaktadır.

Balıkların karaciğer ve böbrek dokuları, metaller tarafından oluşan oksidatif stresten korunmak amacıyla CAT ve SOD gibi antioksidan savunma sistemlerince zengindir (38). Katalaz, H₂O₂'i substrat olarak kullanarak, oksijen ve suya parçalayan ve böylece H₂O₂ detoksifikasyonunu sağlayan peroksidadlardır. CAT, tüm biyolojik membranlardan geçip, bazı enzimleri inaktivite eder. İnorganik veya organik kirleticilere maruz kalan balıklarda doza bağlı olarak katalaz aktivite yanıtlarının indüklenme ya da inhibe olma yönünde farklılık gösterdiği rapor edilmiştir (39). Bu nedenle balıklarda zararlı etkiler oluşmadan hemen önce belirlenen CAT aktivitesi oksidatif stres için hassas bir biyobelirteç olarak kabul görmüştür (40). Ağır metaller tarafından zarar gören DNA harabiyetinin artan katalaz aktivitesi ile tamamen ortadan kaldırılmaya çalışıldığı hücre kültürü deneyleri ile gösterilmiştir. Tamir edilemeyen DNA kırıklarının bulunduğu hücreler programlı hücre ölümüne yönlendirilirken, transkripsiyonel aktivite tamamen durdurulur (41).

Metallerin (Cu, Cd, Fe ve Ni) *Channa punctata*'nın solungaçlarının biyokimyasal ve morfolojik özelliklerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada CAT, GST ve SOD gibi antioksidan enzim aktivitelerinde zamana bağlı azalmalar gözlenmiştir (42). Literatürde zebra balığında ağır metal ve genotoksik etkileşimi gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada 0,5 ppm Cd uygulanan ve prx6 rs41055489 heterozigot genotipli balıkta beklenen CAT aktivitesinin düşmesi nedeniyle; CAT aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülebilecek sınırın altında olduğu için belirlenemedi.

Sonuç

Bu çalışma ile ağır metallerin en düşük subletal dozlarının bile hücredeki antioksidan savunma mekanizmalarını aktive ettiği belirlenmiştir. Prx6 rs41055489 gen polimorfizminin heterozigot formunun, mevcut savunma mekanizmalarının çalışmasını engellediği gözlenmiştir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the ethics committee of Marmara University Animal Experiments.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - B.S.D., F.E.K., M.K.G., Z.A.Ü., G.K., P.Ç., Ü.Z.; Design - B.S.D., F.E.K., M.K.G., Z.A.Ü., G.K., P.Ç., Ü.Z.; Supervision - B.S.D., F.E.K., M.K.G., Z.A.Ü., G.K., P.Ç., Ü.Z.; Funding - Z.A.Ü., B.S.D., F.E.K.; Materials - F.E.K., B.S.D., Z.A.Ü.; Data Collection and/or Processing - Z.A.Ü., M.K.G.; Analysis and/or Interpretation - F.E.K., P.Ç., B.S.D.; Literature Review - A.Ü., M.K.G.; Writer - B.S.D., F.E.K., M.K.G., Z.A.Ü.; Critical Review - B.S.D., F.E.K.; Other - P.Ç., Ü.Z.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: The authors declared that this study has received no financial support.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınmıştır.

Hakem değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - B.S.D., F.E.K., M.K.G., Z.A.Ü., G.K., P.Ç., Ü.Z.; Tasarım - B.S.D., F.E.K., M.K.G., Z.A.Ü., G.K., P.Ç., Ü.Z.; Denetleme - B.S.D., F.E.K., M.K.G., Z.A.Ü., G.K., P.Ç., Ü.Z.; Kaynaklar - Z.A.Ü., B.S.D., F.E.K.; Malzemeler - F.E.K., B.S.D., Z.A.Ü.; Veri toplanması ve/veya işleme - Z.A.Ü., M.K.G.; Analiz ve/veya yorum - F.E.K., P.Ç., B.S.D.; Literatür taraması - A.Ü., M.K.G.; Yazıyı yazan - B.S.D., F.E.K., M.K.G., Z.A.Ü.; Eleştirel İnceleme - B.S.D., F.E.K.; Diğer - P.Ç., Ü.Z.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

Kaynaklar

1. Kenyon C. The plasticity of aging: Insights from long-lived mutants. *Cel* 2005; 120: 449-60. [\[CrossRef\]](#)
2. Wang Y, Feinstein SI, Manevich Y, Ho Y, Fisher AB. Peroxiredoxin 6 gene-targeted mice show increased lung injury with paraquat-induced oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 229-37. [\[CrossRef\]](#)
3. Chae HZ. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: Alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 7017-21. [\[CrossRef\]](#)
4. Wood ZA, Schroder E, Robin Harris J, Poole LB. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* 2003; 28: 32-40. [\[CrossRef\]](#)
5. Choi HJ, Kang SW, Yang CH, Rhee SG, Ryu SE. Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution. *Nat Struct Biol* 1998; 5: 400-6. [\[CrossRef\]](#)
6. Wong CM, Siu KL, Jin DY. Peroxiredoxin-null yeast cells are hypersensitive to oxidative stress and are genomically unstable. *J Biol Chem* 2004; 279: 23207-13. [\[CrossRef\]](#)
7. Radyuk SN, Klichko VI, Spinola B, Sohal RS, Orr WC. The peroxiredoxin gene family in *Drosophila melanogaster*. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 1090-100. [\[CrossRef\]](#)
8. Wood ZA, Schroder E, Haris JR, Poole LB. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* 2003; 28: 32-40. [\[CrossRef\]](#)
9. Chae HZ, Robison K, Poole LB, Church G, Storz G, Rhee SG. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 7017-21. [\[CrossRef\]](#)
10. David E, Tanguy A, Moraga D. Peroxiredoxin 6 gene: a new physiological and genetic indicator of multiple environmental stress response in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquat Toxicol* 2007; 84: 389-98. [\[CrossRef\]](#)
11. Wang Q, Chen KP, Yao Q, Zhao Y, Li YJ, Shen H, et al. Identification and characterization of a novel 1-Cys peroxiredoxin from silkworm. *Bombyx mori*. *Comp Biochem Physiol B* 2008; 149: 176-82. [\[CrossRef\]](#)
12. Kang SW, Baines IC, Rhee SG. Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine. *J Biol Chem* 1998; 273: 6303-11. [\[CrossRef\]](#)
13. Park H, Ahn IY, Kim H, Cheon J, Kim M. Analysis of ESTs and expression of two peroxiredoxins in the thermally stressed Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. *Fish Shellfish Immunol* 2008; 25: 550-9. [\[CrossRef\]](#)
14. Zhang, Q, LiF Zhang J, Wang B, Gao H, Huang B. Molecular cloning, expression of a peroxiredoxin gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and the antioxidant activity of its recombinant protein. *Mol Immunol* 2007; 44: 3501e9.

15. Nikapitiya C, De Zoysa M, Whang I, Ki CG, Lee YH, Kim SJ, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of peroxiredoxin 6 from disk abalone *Haliotis discus discus* and the antioxidant activity of its recombinant protein. *Fish Shellfish Immunol* 2009; 27: 239-49. [\[CrossRef\]](#)
16. David E, Tanguy A, Moraga D. Peroxiredoxin 6 gene: a new physiological and genetic indicator of multiple environmental stress response in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquat Toxicol* 2007; 84: 389-98. [\[CrossRef\]](#)
17. Loumaye E, Andersen AC, Clippe A, Degand H, Dubuisson M, Zal F, et al. Cloning and characterization of *Arenicola marina* peroxiredoxin 6, an annelid two-cysteine peroxiredoxin highly homologous to mammalian one-cysteine peroxiredoxins. *Free Radic Biol Med* 2008; 45: 482-93. [\[CrossRef\]](#)
18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>
19. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=41055489
20. Garcia-Santos S, Fontainhas-Fernandes A, Wilson JM. Cadmium tolerance in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following acute exposure: assessment of some ionoregulatory parameters. *Environ Toxicol* 2006; 21: 33-46. [\[CrossRef\]](#)
21. Bay S, Greenstein D, Szalay P, Brown D. Exposure of scorpionfish (*Scorpaena guttata*) to cadmium: biochemical effects of chronic exposure. *Aquatic Toxicol* 1990; 16: 311. [\[CrossRef\]](#)
22. Cousins RJ, Leinart AS. Tissue-specific regulation of zinc metabolism and metallothionein genes by interleukin-1. *FASEB J* 1998; 2: 2884-90.
23. Kamunde C, Clayton C, Wood CM. Waterborne vs. dietary copper uptake in rainbow trout and the effects of previous waterborne copper exposure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 283: R69-78. [\[CrossRef\]](#)
24. Gagnon A, Jumarie C, Hontela A. Effects of Cu on plasma cortisol and cortisol secretion by adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicol* 2006; 78: 59-65. [\[CrossRef\]](#)
25. Watson TA, Beamish FW. The effects of zinc on branchial adenosine triphosphatase enzymes in vitro from rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Comp Biochem Physiol C* 1981; 68: 167-73. [\[CrossRef\]](#)
26. OECD. 1999. Available from: <http://www.oecd.org/dac/environment-development/1884214.pdf>
27. Available from: www.roche-applied-science.com
28. Ledwozyw A, Michalak D, Stepień A, Kadziolka A. The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 1986; 155: 275-83. [\[CrossRef\]](#)
29. Beutler E. Glutathione in Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods. 2nd ed., Grune and Stratton, N.Y. 1975; 112-4.
30. Aebi H. Catalase in vitro. *Meth Enzymol* 1984; 105: 121-6. [\[CrossRef\]](#)
31. Akbulut C, Kızıl Ç, Yönlü ND. Effects of low doses of bisphenol A on primordial germ cells in zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2013; 19: 647-53. [\[CrossRef\]](#)
32. Fırat Ö, Çoğun HY, Aslanyavrusu S, Kargin F. Antioxidant responses and metal accumulation in tissues of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* under Zn, Cd and Zn + Cd exposures. *J Appl Toxicol* 2009; 29: 295-301. [\[CrossRef\]](#)
33. Zhang JF, Liu H, Sun YY, Wang XR, Wu JC, Xue YQ. Responses of the antioxidant defenses of the Goldfish *Carassius auratus*, exposed to 2,4-dichlorophenol. *Environ Toxicol Pharmacol* 2005; 19: 185-90. [\[CrossRef\]](#)
34. Viarengo A, Canesi L, Martinez PG, Peters LD, Livingstone DR. Pro-oxidant processes and antioxidant defence systems in the tissues of the Antarctic scallop (*Adamussium cobbecki*) compared with the Mediterranean scallop (*Pecten jacobaeus*). *Comp Biochem Physiol* 1995; 111: 119-26. [\[CrossRef\]](#)
35. Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1685e96.
36. Niedernhofer LJ, Daniels JS, Rouzer CA, Greene RE, Marnett LJ. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 31426e33.
37. Voitekun V, Zhitkovich A. Analysis of DNA-protein crosslinking activity of malondialdehyde in vitro. *Mutat Res* 1999; 424: 97e106.
38. Basha PS, Rani AU. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Ecotoxicol Environ Saf* 2003; 56: 218-21. [\[CrossRef\]](#)
39. Romeo M, Bennani N, Gnassia-Barelli M, Lafaurie M, Girard JP. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquat Toxicol* 2000; 48: 185-94. [\[CrossRef\]](#)
40. Gül Ş, Belge-Kurutaş E, Yıldız E, Şahan A, Doran F. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. *Environ Int* 2004; 30: 605-9. [\[CrossRef\]](#)
41. Vöhringer ML, Becker TW, Krieger G, Jacobi H, Witte I. Synergistic DNA damaging effects of malondialdehyde/Cu(II) in PM2 DNA and in human fibroblasts. *Toxicol Lett* 1998; 94: 159-66. [\[CrossRef\]](#)
42. Pandey S, Parvez S, Ansari RA, Ali M, Kaur M, Hayat F, et al. Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. *Chem Biol Interact* 2008; 174: 183-92. [\[CrossRef\]](#)