

Bazı Bor Bileşiklerinin Toprak Solucanlarında Doku ve Enzim Aktivitesi Üzerine Olası Etkileri

Özge Turgak

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Aralık 2011

The Possible Effect of Some Boron Compounds on Tissue and Enzyme Activity in
Earthworms

Özge Turgak

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

December 2011

Bazı Bor Bileşiklerinin Toprak Solucanlarında Doku ve Enzim Aktivitesi Üzerine Olası
Etkileri

Özge Turgak

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Yrd.Doç.Dr.Mustafa UYANOĞLU

Aralık 2011

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Özge Turgak' ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Bazı Bor Bileşiklerinin Toprak Solucanlarında Doku ve Enzim Aktivitesi Üzerine Olası Etkileri” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman : Yrd.Doç.Dr. Mustafa UYANOĞLU

İkinci Danışman : -

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye :Prof. Dr. Ahmet ÖZATA

Üye :Prof. Dr. Muhsin KONUK

Üye : Doç. Dr. Mediha CANBEK

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ayşe Pınar ÖZTOPÇU VATAN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

Bor zenginliği açısından dünyada ilk sırayı alan ülkemizde, bor bileşikleri birçok sanayi dalı ve tarımda geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Kullanım alanları bu kadar geniş olmasına rağmen canlılar üzerindeki etkilerini konu alan araştırmalar sınırlıdır. Bu nedenle, her birinde 10' ar adet *Eisenia fetida* türü toprak solucanının bulunduğu 10 deney grubundan oluşan deneysel çalışma planlandı. Negatif kontrol grubu (Grup I) ile kadmiyum nitrat tetra hidrat ağır metal bileşiğinin üç farklı dozunun uygulandığı Grup II, III ve IV' den oluşan pozitif kontrol grupları oluşturuldu. Kontrol grupları ile karşılaştırılmak üzere borik asitin üç farklı dozunun uygulandığı Grup V, VI ve VII ile bor oksitin üç farklı dozunun uygulandığı Grup VIII, IX ve X oluşturuldu.

Deneysel yaşam yerlerinde 7 gün yapılan uygulamaların sonunda, deney hayvanlarında ışık mikroskobu seviyesinde barsak epiteli ve klorojen doku histopatolojisi değerlendirildi. Bu dokuları oluşturan hücrelerde ise TEM incelemeleri yapılarak mitokondri ve düz endoplazmik retikulum (DER) yapısal değişimleri ile glukojen ve lipid damlacığı birikimleri değerlendirildi. Native (doğal) jel elektroforez tekniği kullanılarak katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimlerinin aktiviteleri incelendi.

Elde edilen bulgular, çalışmamızda kullanılan bor bileşiklerinin toksik etkilerinin, kadmiyum ağır metal bileşiğinin uygulandığı dozlardan daha fazla olduğunda ortaya çıktığını ve borik asit ile bor oksit bileşiklerinin bir ağır metal bileşiği kadar toksik etkili olamayacağını ortaya çıkarmıştır. Bulgularımız ayrıca, içeriğinde bor bulunan farklı bileşiklerin biyolojik etkilerinin de farklı olabileceğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Borik asit, Bor oksit, Kadmiyum nitrat tetra hidrat, *Eisenia fetida*, Histopatoloji, TEM, Katalaz (CAT), Glutatyon Peroksidaz (GPx).

SUMMARY

Our country is the leader in terms of boron richness in the world and boron compounds are used in numerous industrial and agricultural purposes. Although it has such a vast area of use, studies on its effects in living things are limited. Therefore, the present experimental study was planned composing of 10 groups (each group contained 10 *Eisenia fetida* earthworms). The study included two control groups; negative control group (Group I), and positive control groups (Groups II, III and IV). Positive controls were administered three different doses of cadmium nitrate tetrahydrate. Groups V, VI and VII were exposed with three different doses of boric acid, while Groups VIII, IX and X with boron oxide.

At the end of the applications, conducted for 7 days at experimental habitats, intestinal epithelium and chlorogenic tissue's histopathology were evaluated by using light microscope. In TEM examinations, the cells taken from these tissues were assessed regarding to both mitochondrial and smooth endoplasmic reticulum (SER) structural changes with glycogen and lipid droplet accumulations. Activities of catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) enzymes were also examined by using native gel electrophoresis technique.

The obtained findings revealed that the toxic effects of tested boron compounds were higher than that of cadmium when only used in high amount. Boric acid and boron oxide compounds were not toxic as much as cadmium. In addition, our findings also demonstrated that different boron content may have different toxic effects.

Keywords: Boric acid, Boric oxide, Cadmium nitrate tetra hydrate, *Eisenia fetida*, Histopatology, TEM, Catalase (CAT), Glutathione peroxidase(GPx).

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamın oluşmasını, yönlendirmesini ve sonuçlanmasını sağlayıp her konuda emeğini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Yrd.Doç.Dr. Mustafa UYANOĞLU' na en içten saygılarımla teşekkür ederim.

Aynı zamanda, çalışmamın şekillenmesinde, fikir geliştirmemde ve uygulama aşamasında bilgisini ve emeğini esirgemeyen hocam Doç.Dr. Mediha CANBEK' e teşekkür etmeyi kendime bir borç bilirim. Yüksek lisans tezimin deneysel aşamalarında yardımcı olarak hem fikirlerinden hem de tecrübelerinden faydalandığım hocam Arş.Gör.Dr. Emre CEYHAN' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamın her aşamasında benden desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Ayşe KARABEK, Ezgi GÖK, Hatice ÇALIŞKAN, Hasibe GÜRÇAN ile Özgül ÖZALP, Ahmet ÖZEN ve Başak DURMUŞ' a çok teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca her zaman yanımda olduklarını hissettiren, tez çalışmam sırasında da benden desteklerini, güvenlerini ve sabırlarını esirgemeyen, çok değerli AİLEM' e ve yakınlarıma sevgi dolusu teşekkürlerimi iletirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Bor Elementinin Yapısı ve Özellikleri	3
2.1.1. Bor elementinin doğada yayılış ve kullanım alanları	4
2.1.2. Bor elementinin canlılar üzerine etkisi	5
2.2. Kadmiyum Elementinin Yapısı ve Özellikleri	8
2.3. Toprak Solucanlarının Genel Özellikleri	11
2.4. Toksikite Çalışmaları	14
2.5. Serbest Radikaller	16
2.6. Antioksidan Savunma Sistemleri	19
2.6.1. Antioksidanlar	20
2.6.1.1. Endojen kaynaklı antioksidanlar	20
2.6.1.2. Eksojen kaynaklı antioksidanlar	22
3. MATERYAL VE METOD	23
3.1. Deney Hayvanları	23
3.2. Deneysel Uygulamalar	23
3.3. Doku Örneklerinin Alınması ve Değerlendirilmesi	24
3.3.1. Histopatolojik uygulamalar	24
3.3.2. TEM uygulamaları	25

3.4. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	26
3.4.1. Homojenizasyon.....	26
3.4.2. Native (Doğal) jel elektroforezi	26
3.4.2.1. CAT ve GPx aktivitelerinin belirlenmesi	28
4. SONUÇLAR.....	30
4.1. Histopatolojik Değerlendirmeler.....	30
4.2. TEM Değerlendirmeleri	39
4.3. Enzim Aktivitesi Değerlendirmeleri	49
5. TARTIŞMA	54
6. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	64

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.1. Negatif kontrol grubu (Grup I) hayvanlarına ait kesitte barsak lümenini (L) içten çevreleyen epitel ve barsağı dıştan çevreleyen klorogen doku (K) görünümü.	30
4.2. Grup I hayvanlarına ait kesitte barsak lümenini (L) içten çevreleyen epitel doku ve normal görünümlü klorogen doku (K).	31
4.3. Grup II hayvanlarına ait kesitte villus devamlığındaki kesintileri ile barsak epitelindeki kısmi bozulmalar. (K: Klorogen doku, L: Barsak lümeni).	32
4.4. Grup II hayvanlarına ait kesitte villuslarını kısmen kaybetmiş barsak epitel hücreleri ile parçalanmış klorogen dokunun (K) görünümü. (L: Barsak lümeni).	32
4.5. Grup III hayvanlarında hasar görmüş barsak epiteli ile klorogen dokunun (K) görünümü. (L: Barsak lümeni).	33
4.6. Grup IV hayvanlarında villus kayıpları ile gözlenen barsak epitel hücrelerinde parçalanmalar ve vakuolizasyon (V) ile klorogen dokuda (K) yüksek oranda hasarlanmış ve parçalanmış yapının görünümü (L: Barsak lümeni).	34
4.7. Grup V hayvanlarına ait kesitte kısmen hasarlanmış barsak epiteli ve villus devamlığındaki bölgesel kesintiler ile bütünlüğü devam eden klorogen doku (K) (L: Barsak lümeni).	35
4.8. Grup VI hayvanlarının villuslarını kaybetmiş barsak epitel hücreleri arasındaki kopukluklar ve klorogen doku (K) hasarı (L: Barsak lümeni).	35
4.9. Grup VII hayvanlarına ait kesitte kısmen atrofiye olmuş barsak epitel hücreleri ile bütünlüğünü devam ettiren klorogen dokunun (K) görünümü. (L: Barsak lümeni).	36
4.10. Grup VIII hayvanlarına ait kesitte hücreler arası kopmalardan kaynaklanan geniş boşlukların yer aldığı barsak epiteli ile bütünlüğünü yitirmiş klorogen dokunun (K) görünümü. (L: Barsak lümeni).	37
4.11. Grup IX hayvanlarına ait kesitte hücreler arası geniş boşlukların yer aldığı barsak epiteli ile klorogen dokuda (K) hücre kayıpları ve parçalanmalar. (L: Barsak lümeni).	38

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.12. Grup X hayvanlarının atrofiye olmuş barsak epiteli ile klorogen doku (K) harabiyetinin görünümü. (L: Barsak lümeni).....	38
4.13. Grup I hayvanlarının yoğun glikojen partikülü içeren klorogen doku hücrelerinde mitokondrilerin (Mt) iç ve dış zar yapılarıyla DER görünümleri.....	39
4.14. Grup I hayvanlarının klorosit sitoplazmalarının büyük bölümünü kaplamış olan yoğun lipit damlacıkları (L).	40
4.15. Grup II hayvanlarının morfolojik olarak uzama şeklinde değişmiş mitokondri (Mt) ve bazı lümen bölgelerinde genişlemeler gösteren DER yapısı.....	41
4.16. Grup III' e ait hayvanların TEM görüntüsünde şişmiş ve kristaları azalmış mitokondriler (Mt) ile glukojen partikülleri. (Ç: Çekirdek).....	41
4.17. Grup IV' e ait toprak solucanlarının klorositlerinde morfolojik olarak uzamış ve bazı bölgelerinde kristalarını kaybetmiş mitokondri (Mt) ile glukojen partikülleri.....	42
4.18. Grup IV' ün klorositlerinde rastlanan ağsı görünümde DER.....	43
4.19. Grup V' e ait toprak solucanlarının klorositlerinde mitokondri (Mt) ve glukojen partikülleri.....	43
4.20. Grup VI' ya ait hayvanların TEM görüntüsünde şişmiş ancak, kristaları hasar görmemiş mitokondriler (Mt).....	44
4.21. Grup VII hayvanlarının klorositlerindeki DER ve glukojen partikülleri.....	45
4.22. Grup VII hayvanlarının klorosit sitoplazmasında yoğun olduğu görülen lipit damlacıkları (L).....	45
4.23. Grup VIII' e ait klorositte krista yapılarını tamamen kaybetmiş mitokondriler (Mt). (L: Lipit damlacığı).....	46
4.24. Grup VIII hayvanlarının klorosit sitoplazmasındaki lipit damlacıkları (L).	47
4.25. Grup IX' a ait klorosit hücresinde krista yapılarını tamamen kaybetmiş mitokondriler (Mt).	48

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.26. Grup IX hayvanlarına ait klorositte glukojen partikülleri ve lipit damlacıkları (L).....	48
4.27. Deney gruplarına ait toprak solucanı örneklerinden doğal poliakrilamid jel elektroforezi ile saflaştırılmış CAT enzim aktivitesi bantlarının görünümü.	49
4.28. Deney gruplarına ait toprak solucanı örneklerinden doğal poliakrilamid jel elektroforezi ile saflaştırılmış CAT enzim aktivitesi bant alanı ortalama değerleri.....	51
4.29. Deney gruplarına ait toprak solucanı örneklerinden doğal poliakrilamid jel elektroforezi ile saflaştırılmış GPx izoenzimlerinin aktivite bant alanlarının görünümü.	52
4.30. Deney gruplarına ait toprak solucanı örneklerinden doğal poliakrilamid jel elektroforezi ile saflaştırılmış GPx izoenzimlerinin aktivite bant alanlarının ortalama değerleri.....	53

ÇİZELGELER DİZİNİ**Çizelge****Sayfa**

- 3.1. Test maddelerine göre deney grupları ve uygulanan doz miktarları. (n=10)..... 24
- 4.1. Deney gruplarına ait toprak solucanı örneklerinden izole edilen CAT ve GPx enzimlerinin poliakrilamid jel üzerindeki aktivite bant alanı değerleri. 50

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
B ⁺³	Bor iyonu (boron ion)
°C	Santigrat derece (Celcius degree)
Ca ⁺²	Kalsiyum iyonu (calcium ion)
Cd ⁺²	Kadmiyum iyonu (cadmium ion)
Cu ⁺²	Bakır iyonu (copper ion)
Mg ⁺²	Magnezyum iyonu (magnesium ion)
Mn	Mangan (manganese)
Na ⁺	Sodyum iyonu (sodium ion)
Zn ⁺²	Çinko iyonu (zinc ion)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
akb	Atomik kütle birimi (atomic mass unit)
CO ₂	Karbondioksit (carbondioxide)
dk	Dakika (minute)
DNA	Deoksiribonükleik asit (deoxyribonucleic acid)
EEC	Avrupa Ekonomi Topluluğu (European Economic Community)
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization)
G	Gravity
gr	Gram
HCl	Hidroklorik asit (hydrochloric acid)
H&E	Hematoksilen-Eozin
Ig	İmmunoglobulin
kg	Kilogram
L	Litre (liter)
M	Molarite (molar)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
mA	Miliamper (milliampere)
mg	Miligram (miligram)
mL	Mililitre (mililiter)
mm	Milimetre (millimeter)
mM	Milimolar (millimol)
n	Denek sayısı
nm	Nanometre (nanometer)
OECD	Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü (Organization for Economic Co-Operation and Development)
ppm	mg/L [parts per million (10^{-6})]
V	Volt
μ	Mikrometre (mikron) = 10^{-6} metre (micrometer)
μ g	Mikrogram (microgram)
μ L	Mikrolitre (microliter)

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Dünya üzerinde okyanuslarda, sedimenter kayalarda, yer altı sularında ve topraklarda farklı formlarda bulunan bor (Woods, 1994; Davis, et al., 2002; Yazbeck, et al., 2005) doğada daha çok borat ve H_3BO_3 (borik asit) olarak geniş bir yayılım gösterir. Çünkü bor elementi doğada serbest olarak bulunmaz, genelde oksijen ile bağlı şekilde bulunur (Çöl and Çöl, 2003).

Canlılarda bor ve/veya bileşiklerine olan gereksinim türler arasında değişkenlik gösterir. Bir tür için optimum olan bor miktarı bir başka tür için fazla olup toksik etki oluşturabilir ya da tam tersine canlının bu gereksinimini karşılamayabilir. Bu olasılıklar hem bitki hem de hayvansal organizmalar açısından önem arz eder. Bitkilerin büyümesi, çiçeklenmesi ve gelişmesi için zorunlu bir element (Apostol and Zwiazek, 2004) olan bor bileşiklerinin gereğinden fazla miktarda alınması halinde gelişimi olumsuz yönde etkileyebileceği bildirilmiştir (Nable, et al., 1997). Bitkilerde, yüksek konsantrasyonlarda oluşabilecek bor toksisitesi hücrelerde nekroz ve klorofil eksikliği olarak tanımlanan “chlorosis” oluşumlarına yol açabilmektedir (Apostol and Zwiazek 2004).

İnsanlarda bor alımının, bor bileşiklerinin bulunduğu bölgelerde yetişmiş bitkisel besin maddelerinin ve içme sularının tüketilmesi yoluyla olabildiği gibi, solunum yoluyla da olabilmektedir (Yazbeck, et al., 2005; Özen, 2009). Bor ile kontamine maddelerin uzun süreli kullanımları insan ve hayvanlarda kardio-vasküler sistem (Korkmaz, et al., 2007), sinir sistemi ve üreme sistemi ile sindirim sistemindeki epitel hücreleri üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır (Price, et al., 1996; Melnyk, et al., 2005). Bor bileşikleri insan ve hayvan dokularında kemik, beyin, kan, karaciğer ve böbrek haricinde düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır (Dupre, et al., 1994). Ayrıca bor enzim aktivitelerinin düzenlenmesinde, insülin, lipit metabolizmasında, immün sistemde, hücrelerde sinyal iletimi ve zar bütünlüğünün sağlanmasında, kalsiyum ve magnezyum minerallerinin düzenlenmesinde gereklidir (Kurtoglu, et al., 2002; Korkmaz, et al., 2007).

Toprak solucanları kendi yaşam ortamlarının kimyasal madde birikimlerini ortaya koymak ve bunların diğer canlılar üzerine olası etkilerinin belirlenmesinde indikatör (belirteç) canlılardır (OECD, 1984). *Eiseni fetida* organik madde bakımından zengin topraklarda bol bulunan ve ağır metaller için biyolojik belirteç/ayraç olarak kullanılan bir toprak solucanı türüdür (OECD, 1984; Abdel Salam Aly and Schröder, 2008). Toprakta bulunan herhangi bir ağır metal belirli bir seviyenin üzerine ulaştığında, toprak solucanının öncelikle deri ve barsağı üzerinde histopatolojik etkiye neden olur (Lukkari, et al., 2004). Bu etkiler *Eiseni fetida* türünde patolojik olarak kendini çabuk gösterir. Ayrıca, bu türün kolay elde edilebilir olması ekotoksikolojik çalışmalarda daha fazla kullanılır olmasını sağlar (Reddy and Rao, 2008).

Ülkemizde bazı bölgelerde yüksek oranda bulunan ve çok geniş kullanım alanlarına sahip olan bor, özellikle hammadde ve ürün olarak endüstri, sanayi, tarım, gıda, kimya, uzay teknolojileri, askeri ve nükleer alanlarda kullanılmaktadır (Acarkan, 2002; Kılıç, 2004; Yazbeck, et al., 2005; Bor Sektör Raporu, 2010). Böyle önemli sektörlerde kullanılan bor bileşiklerinin doz bağımlı olarak canlılar üzerine etkilerini konu alan bilimsel çalışmalar azınlıktadır. Bu nedenle çalışmamızda *Eiseni fetida* türü toprak solucanı üzerine bazı bor bileşiklerinin, toksik etkileri bilinen bir ağır metal bileşiği ile doz bağımlı etkilerinin karşılaştırılarak araştırılması planlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bor Elementinin Yapısı ve Özellikleri

Bor elementinin saf hali ilk defa 1808 yılında Fransız kimyager J.L. Gay-Lussac ve Baron L.J. Thenard ile İngiliz kimyager H. Davy tarafından elde edilmiştir. Elementel bor, periyodik tablonun IIIA grubunda yer alan ilk ve en hafif elementtir. İyonlaşma enerjisinin yüksek olması (Woods, 1994) ve grup içerisinde tek ametal özellik gösteren element (Nable, et al., 1997) olmasıyla ayrılır. B simgesi ile gösterilen bor elementinin atom numarası 5, atom ağırlığı 10,81 akb (WHO, 1998a)' dir. 2300 °C erime ve 4002 °C kaynama noktasına sahiptir. Bor elementi aynı zamanda yarı iletken olduğu için metal-ametal arası bir özellik gösterir. Kristal bir yapıya sahip olan bor, sertlik, görünüm ve optik özellikleri açısından elmasa benzer. Bor atomunun elektron düzeni $1s^2 2s^2 2p^1$ olup oksidasyon sayısı +3' dür. Bor elementi ^8B , ^{10}B , ^{11}B , ^{12}B , ^{13}B izotoplarından oluşur. Ancak doğada genellikle ^{10}B (%19.8) ve ^{11}B (%80.2) kararlı iki izotop şeklinde bulunur <http://www.boren.gov.tr/icerik.php?id=24>.

Bor, yeryüzünde en yaygın bulunan 51. elementtir (Kılınç, et al., 2001; ATSDR, 2010) ve doğada hiçbir zaman serbest olarak bulunmaz. Daima oksijene bağlı olarak (Woods, 1994; Çöl and Çöl, 2003) borosilikat, borik asit, boraks ya da diğer borat bileşikleri şeklinde bulunur (Davis, et al., 2002; Shaaban, 2010). Bor elementinin oksijene bağlanma isteğinin çok fazla olması, çok sayıda değişik oksijen bileşikleri oluşturmasına neden olur. Oluşan bu bileşiklere de borat adı verilir. Suda erime özelliği olan boratlar kokusuz, kristal granüller halinde ya da toz halindedir. Yaygın olarak bulunan borat bileşikleri borik asit, boraks ve B_2O_3 (bor oksit) tir (Saylı, et al., 1998; ATSDR 2010). Reaksiyonlar sonucu meydana gelen bor bileşiklerinin doğada yaklaşık olarak 230 çeşiti vardır (Bor Sektör Raporu, 2010). Mineraller de bünyelerinde içerdikleri bor oksite bağlı olarak bulunan Ca^{+2} , Na^+ , Mg^{+2} elementlerine göre sınıflandırılır (Kılıç, 2004).

Bor normal sıcaklıklarda hava, su ve hidroklorik / hidroflorik asitler ile reaksiyon vermez. Ancak, sıcak ortamda yüksek konsantrasyonlu nitrik asit ile reaksiyona girerek borik asiti; saf oksijen ile reaksiyona girerek bor oksiti ve diğer bileşikler meydana getirir (Kılıç, 2004; Bakirdere, et al., 2010). Bor oksit ve borik asit özellikle okyanuslardan buharlaşıp atmosfere karıştıktan sonra doğa olaylarıyla birlikte tekrar toprağa inerek yer altı ve yer üstü sularına ulaşır (Şaylı, et al., 1998).

2.1.1. Bor elementinin doğada yayılış ve kullanım alanları

Bor mineralleri genellikle sedimenter kayalarda, kömürde, su kaynaklarında ve bazı topraklarda bulunur. Doğada geniş bir yayılıma sahip olup yer kabuğundaki yaklaşık yoğunluğu 10 mg.kg^{-1} , okyanuslarda 4.5 mg L^{-1} ve tatlı su yüzeylerinde ise genellikle $<0.1-0.5 \text{ mg B L}^{-1}$ dir (Woods, 1994). Borun toprak ve sudaki emilim miktarları birçok çevresel faktöre bağlıdır. Toprak tarafından emilimi toprağın tipine, nemliliğine, asit-baz dengesine, tuzluluğuna, içerdiği organik madde miktarına, topraktaki demir ve alüminyum bileşiklerinin miktarına göre değişirken, su içinde pH ve çözülmüş bor miktarına bağlı olarak değişir (WHO, 1998b; Tariq and Mott, 2007; Becker, et al., 2011).

Bor doğada volkan aktivitelerinden ve deniz sularından borik asitin buharlaşması ve kayaların aşınması yoluyla oluştuğu için (Yazbeck, et al., 2005) geçmişte volkanik ve hidrotermal aktivitelerin görüldüğü kurak bölgelerde yoğun olarak görülür (Woods, 1994; Nable, et al., 1997).

Dünyada bor bolluğunun görüldüğü ülkelerin başında Türkiye, Amerika, Arjantin, Rusya, Kazakistan, Çin, Bolivya, Peru ve Şili gelir (Kistler and Helvacı, 1994; Kılıç, 2004). Bor minerallerini doğada en yüksek oranlarda bulunduran Türkiye (Çöl and Çöl, 2003) %72' lik bir kapasite oranıyla bu ülkelerin başında yer alır (Bor Sektör Raporu, 2010). Türkiye' de bilinen bor yataklarının %37' si Balıkesir-Bigadiç, %34' ü Kütahya-Emet, %28' i Eskişehir-Kırka, %5' i Bursa-Kestelek bölgesinde bulunur

(Kılıç, 2004). Bu alanlardan çıkarılan ve işlenen mineraller ise Bigadiç’ de; kolamanit ve üleksit, Kırka’ da; tinkal (boraks), Emet’ de; kolemanit ve Kestelek’ de; kolemanit, üleksit, probertit’ dir (Kılınç, et al., 2001).

Bor bileşenleri ve mineralleri çok eski zamanlardan beri kullanılmıştır. Araplar 16. asırda eritme işlemlerinde, Babiller 4000 yıl önce altın işletmeciliğinde, Çinliler seramiklerinde, Eski Mısırlılar ise ölüleri mumyalama, tıp ve metalurjik alanlarda boraks kullanmışlardır (Woods, 1994). Türkiye’ de ise bor bileşikleri 13. asırdan itibaren bilinmesine rağmen çok fazla kullanım alanı bulamamıştır (Özkan vd., 1997). Ancak, çevre ve canlılar üzerine olan önemi anlaşıldıkça, bor minerallerinin ticari olarak kullanım alanları da artmıştır. Günümüzde yaygın olarak endüstri, farmakoloji, kozmetik ve tarım başta olmak üzere 250’ yi aşkın alanda bor kullanılmaktadır. Bor, camların genleşmesini engellemek ve yüksek ısılara karşı dayanıklı olmasını sağlamak için en fazla cam sanayisinde kullanılır (Woods, 1994; Acarkan, 2002). Cam sanayi dışında kimya, deterjan ve beyazlatma sanayiinde, seramik, metalurji ve inşaat-çimento sektöründe, gıda, kağıt, kauçuk ve plastik sanayisinde, nükleer sanayide, uzay ve hava araçlarında, askeri ve zırhlı araç yapımında, elektrik-elektronik ve bilgisayar sanayiinde, iletişim teknolojilerinde, enerji sektörü ve otomobil sanayiinde kullanılır. Bor ısıya dayanıklı, esnek ve kolay bulunabilen bir element olduğundan tekstil sektöründe özellikle spor malzemelerinin ve kurşungeçirmez kumaşların yapımında çok fazla kullanılır. Günümüzde son nokta olarak tıp alanında geniş bir kullanım alanına ulaşmıştır. Antiseptik ilaçların içeriğinde ve kanser tedavisinde kullanılmaktadır (Yazbeck, et al., 2005; Carpenter, S.B. and Kistler, R.B., 2006; Bor Sektör Raporu, 2010; Becker, et al., 2011).

2.1.2. Bor elementinin canlılar üzerine etkisi

Bor elementinin bitkilerin büyümesi ve gelişmesi için esansiyel bir element olabileceğine ilişkin ilk bilgiler 1923 yılında Warington tarafından bildirilmiştir (WHO, 1998c; Armstrong, et al., 2002). Sonraki yıllarda hayvan ve insanlar üzerine etkilerini

konu alan çalışmalar da dikkate alınarak Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından insan sağlığı için bor esansiyel elementler sınıfına dahil edilmiştir (WHO 1996).

Her canlı türü için gerekli olan bor miktarı değişiktir. Bir türün metabolizması için alması gereken bor miktarı başka bir tür için toksik olabilir ya da yetersiz kalabilir. (Apostol and Zwiazek, 2004).

Bitkiler, yaşadıkları toprak içinde bulunan miktar kadar bünyelerine bor alabilirler (Moseman, 1994). Bitkilerde üreme, gelişme ve ürün kalitesi açısından alınması gereken yaklaşık bor miktarı 0,2 mg B/L' dir. Bitkilerin topraktan yeterli miktarda bor almaları metabolizmaları açısından oldukça önemlidir. Bor özellikle fotosentez ve karbonhidrat metabolizmasında, nükleik asit metabolizması üzerinde, hücre çeperi sentezinde, zar bütünlüğünün sağlanmasında, enzim aktivasyonunda ve bitkinin büyümesi için gerekli diğer minerallerle etkileşimlerde önemli rol oynar (Davis, et al., 2002; Hunt, 2005; Shaaban, 2010). Ancak, bitki yüksek konsantrasyonlarda bora maruz kaldığında klorofil miktarında azalmalara paralel olarak hücrelerde nekroz meydana gelir. Hücre çeperi ve zarında meydana gelen morfolojik değişimler sonucunda da bitki hasar görür (Nable, et al., 1997; Apostol and Zwiazek, 2004).

İnsanlarda ve hayvanlarda bor alımı, bor içeriği yüksek olan besin maddelerinin ve içme sularının tüketilmesi ya da solunum yoluyla gerçekleşir (Yazbeck, et al., 2005). WHO' nun (1994) bor ile ilgili çevre sağlığı kriterlerinde insanlar için bor alımının havadan 0,44 µg/gün, içme sularından 0,2-0,6 mg/gün ve besin maddeleri ile 1,2 mg/gün miktarlarında alınması gerektiği bildirilmiştir.

Bor içeriği yüksek olan besinler arasında meyveler, lifli sebzeler, fındık, bakliyat ürünleri ile şarap, elma suyu ve bira olmasına karşın et, balık, süt ve kahve bu elementten yoksundur (Moseman, 1994; Woods, 1994; Bakirdere, et al., 2010).

Bor ve bileşiklerinin tamamına yakını sindirim ve solunum sistemi aracılığıyla emilir (Huel, et al., 2004). Bor doku ve vücut sıvılarında çoğunlukla borik asit şeklinde bulunur (Korkmaz, et al., 2007a, 2007b; Barranco and Eckhert, 2006). Bor vücuda oral,

intravenöz, dermal ya da solunumla girdikten sonra en fazla kemikte depo edilir. Ayrıca kan, karaciğer, beyin, böbrek, lenfoid nodüller ve üreme organlarında yüksek konsantrasyonlarda bulunur (Dupre, et al., 1994; Eren, 2004). Vücuttaki yarılanma ömrü 4-28 saat arasında değişen borun %90' dan fazlası idrarla dışarı atılır (WHO, 1998d; npic, 2001, Yazbeck, et al., 2005).

İnsanlar ve hayvanlar üzerinde bor ile yapılan çalışmalarda, kemik gelişiminde (Armstrong, et al., 2002; Nielsen, 2008), mineral ve hormon metabolizmalarının düzenlenmesinde (Nielsen, et al., 1987; Dupre, et al., 1994; Kurtoglu, et al., 2002), lipid metabolizmasında, zar fonksiyonlarında (Şaylı, et al., 1998), savunma sistemi ve enzim aktivitesinde (Armstrong, et al., 2001; Korkmaz, et al., 2007a) önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Özellikle prostat kanserine karşı koruyucu etkisi olduğu (Barranco and Eckhert 2006; Bakirdere, vd., 2010) ve cilt hastalıklarının tedavisinde kullanıldığı gibi bazı biyokimyasal reaksiyonlarda da yardımcı rol üstlenmektedir (Acarkan, 2002).

Ancak bor, bitkilerde olduğu gibi insan ve hayvanlarda da yüksek dozlarda alındığı zaman toksik etki gösterir (Heindel, et al., 1992; Price, et al., 1996; See, et al., 2010). Fakat, bor toksisitesi hakkındaki bilgiler sınırlıdır. Yüksek miktarlarda bor bileşiklerine uzun süre maruz kalan insan ve hayvanların dokularında hasarlar meydana geldiğini gösteren çalışmalar vardır (Korkmaz, et al., 2007b; Bakirdere, et al., 2010).

Dokulardaki olası toksisite borun emilimi, taşınması, metabolize edilmesi ve atılımı sırasında gerçekleşir (Moseman, 1994). Bor içeriği yüksek olan maddelerin uzun süreli kullanımı; kardio-vasküler sistem bozulmaları (Korkmaz, et al., 2007b), sinir sisteminde depresyon ve şok gelişimi (Heindel, et al., 1992), üreme sisteminde özellikle testislerde spermatogenezin durması, ovulasyonun azalması (Price, et al., 1996; Burukoğlu and Bayçu, 2009; Bakirdere, et al., 2010), sindirim sistemi bozulmaları (Melnyk, et al., 2005), böbrek hasarları (Heindel, et al., 1992), diare sonucu kilo kaybı ve iskelet bozulmaları (Price, et al., 1996; Yazbeck, et al., 2005) gibi olumsuz etkilere neden olmaktadır. Ayrıca kan dokusunda önemli değişiklikler yaparak çocuklarda fiziksel ve zihinsel gerileme ile patolojik olarak doğumlardaki risk oranını artırmaktadır (Melnyk, et al., 2005).

Bor ve bileşiklerinin canlılar üzerine çok sayıda yararlarının yanında, yüksek dozlarda toksik etkilerinin olmasına karşılık özellikle ağır metallerin çok düşük dozlarda bile olumsuz etkiler yaptığı iyi bilinmektedir. Fakat, bor kaynaklı olumsuz etkilerin hangi dozlarda ve hangi canlı türünde ne şekilde ortaya çıktığı konusunda deneysel bulgular sınırlıdır. Bu nedenle bor ve diğer ağır metallerin canlılardaki etki düzeyleri arasında doza bağımlı özelliklerin belirlenmesi önem kazanmaktadır. Canlı organizmalar üzerine olumsuz etkileri iyi bilinen metallerden birisi kadmiyumdur.

2.2. Kadmiyum Elementinin Yapısı ve Özellikleri

Periyodik tablonun IIB grubunda çinko ve civa ile birlikte bulunan kadmiyum hafif, yumuşak ve gümüş ile beyaz renkte olabilen bir metaldir. Atom numarası 48, atom ağırlığı 112,41 akb olup nispeten düşük erime (320,9 °C) ve kaynama (765 °C) noktasına sahip olan kadmiyum periyodik tabloda Cd simgesi ile gösterilir (Krebs, 2006). Oksidasyon sayısı +2 olan kadmiyum oldukça reaktif bir elementtir ve kolaylıkla ametal elementlerle reaksiyona girebilir. Reaksiyon verdiği ametallerin başında oksijen, karbon ve klor gelir. Kadmiyum elementi sekiz tane izotopa sahiptir. Atom ağırlığı 112 akb ve 114 akb olan izotoplar doğada en yaygın bulunan izotoplardır ve tüm kadmiyum atomlarının yarısını oluştururlar (Cobb, 2007).

Doğada çok nadir saf halde bulunan kadmiyumun bu açıdan bor ile benzerliği vardır. Kadmiyumun ana kaynağı çinko, kurşun ve bakır madenleri olup çoğunlukla çinko ile birlikte bulunur (Stellman, 1998). Kadmiyum çevre koşullarına bağlı olarak ekosistemde çeşitli tuzlar halinde bulunur. Sülfür, karbonat ve oksitli kadmiyum bileşikleri suda çözünmezler. Bunlar ancak oksijen ve asitlerin etkisiyle çözünebilme özelliği kazanırlar. Sülfat, nitrat ve halojenli kadmiyum bileşikleri ise suda kolaylıkla çözünebilirler (WHO, 1992a). Kadmiyum yer kabuğundaki ortalama yoğunluğu 0,1 mg/kg' dır. Topraktaki yoğunluğu ise 0,1 ile 0,4 mg/kg arasında değişirken, sulardaki yoğunluğu 0,1 µg/L ya da daha azdır. Volkanik aktivitelerin görüldüğü yerlerde ise yoğunluğunun 4,5 mg/kg kadar çıktığı görülmüştür. Yüksek yoğunluklarda sedimentler

kayalarda, siyah şistte, kömürde, volkanik aktivilerin görüldüğü topraklar ile deniz ve göl tabanında birikim gösterir (Wadaan, 2005; WHO, 1992b).

Çevrede geniş bir yayılım alanına sahip olan kadmiyumun atmosfere salınımı başlıca volkanik aktivitelerden ve insan aktivitelerinden kaynaklanır. Özellikle metal üretimi, nikel-kadmiyum pillerinin üretimi, kömürün yanması ve endüstriyel işlemler sırasında oluşan kadmiyum atmosfere kolayca karışır (Fishbein, 1981; OSPAR, 2002).

Korozyona karşı dirençli olma özelliğine, düşük erime sıcaklığına ve elektriksel olarak hızlı iyon değiştirme aktivitesine sahip olan kadmiyum aynı zamanda yüksek elektrik ve ısı iletkenliği, yüksek sıcaklıklar ile değişen çevre koşullarına karşı dayanıklı olması ile endüstride kullanım alanı bulmuştur (Morrow, 2001).

Kadmiyum ve bileşikleri ilk yıllarda metallerin elektroliz yoluyla kaplanmasında, plastik, cam ve seramiklerin dayanıklı hale getirilmesi ile renklendirilmesinde kullanılırken günümüzde ise bu alanlara ilaveten nikel-kadmiyum pillerinin üretilmesi, polyvinylchlorid (PVC)' lerin dayanıklı hale getirilmesi, kimyasal madde üretimi gibi elektrik-elektronik, iletişim, kimya endüstrisi, güç üretimi ve uzay teknolojilerinin sayısız uygulamalarında kullanılır (Fishbein, 1981; Stellman, 1998; Krebs, 2006). Bu şekildeki yaygın kullanım ve kadmiyum tuzlarının suda kolay eriyebilme özelliği sayesinde madenlerden kaynak sularına ve oradan da göl, deniz ve okyanus sularına kolaylıkla ulaşan kadmiyumun sucul ve karasal çevrede bu yayılımı sayesinde birçok bölgesel kirlilikler meydana gelir (Rahimi, et al., 2008). Her tür kirliliğin canlı yaşamı üzerine kötü etkilerinin olduğu gibi kadmiyum kirliliğinin de yaşam üzerine olumsuz etkileri vardır.

Kadmiyum doğal yolla ya da insan aktiviteleri yoluyla havaya, suya ve en son olarak da toprağa karışır. Bu alanlarda yetişen bitkiler zorunlu olarak topraktan kadmiyumu alırlar (Järup, 2003). Diğer taraftan kadmiyum bitkiler için alınması zorunlu bir element değildir. Uzun süre kadmiyuma maruz kalan bitkiler, bünyelerinde kadmiyumu depolamaya başlar. Bitkiler için kadmiyum çeşitli toksik etkilere neden olmaktadır. Toksikolojik etkilerin başında ise klorofil eksikliği, bitki büyümesinin

engellenmesi, köklerin zarar görmesi ya da ölmesiyle topraktan besin alınımının engellenmesi, fotosentezde bozulmalar, protein ve lipid yapılarının bozulması, enzimlerin aktivasyonu ya da inaktivasyonu gibi etkiler gelir (Steward-Pinkham, 1991; Zhang, et al., 2009; Skorzynska-Polit, et al., 2010).

Kadmiyum bitkilerde olduğu gibi insan ve hayvanlar için de alınması zorunlu elementlerden biri değildir (Bouche, et al., 2000). Hayvanlar ve insanlar, besin zinciri (Järup, 2003; Zhang, et al., 2009) yoluyla, solunum ve deriden emilim aracılığıyla kadmiyumu vücutlarına alırlar. Kadmiyum vücuda alındıktan sonra kandan dokulara hızlı bir şekilde geçerek bir süre sonra dokuda akut ve kronik etkiler gösterir (Liu, et al., 1996; Wadaan, 2005). Vücuda alınan kadmiyum tüm iç organlarda birikebilme özelliğine sahiptir (Ribas, et al., 2004). Toksik etkili olan kadmiyum başta karaciğer, böbrek ve kemikte olmak üzere akciğerde, sindirim sisteminde, merkezi sinir sisteminde ve üreme organlarında çeşitli hasarlar ile bazı kanserlere neden olur (Liu, et al., 1996; Shimada, et al., 2000; Zhang, et al., 2009). Yüksek dozlarda kadmiyuma maruz kalınması durumunda böbreklerde filtrasyon oranının azalması ile glomerular hasarlar ve tübüllerde difüzyon bozuklukları ortaya çıkar. Bu hasarlar dışında ayrıca glikozüri, aminoasidüri, hiperfosfatüri ve hiperkalsiüri gibi nefrotoksik etkiler de ortaya çıkar (Stellman, 1998; Järup, 2002). Kadmiyumun kemikler üzerine etkisi iki şekilde gerçekleşir. İlk etkisi böbreklerde meydana getirmiş olduğu hasar nedeniyle kalsiyum ve D vitamini metabolizmasını bozması; ikinci etkisi ise osteoblast ve osteoklast aktivitelerini etkileyerek hasara neden olmasıdır (Alfvén, 2002; Çömelekoğlu, vd., 2007).

Hücre sitoplazmasında aşırı miktarda kadmiyum birikmesi hücre zarına, organellerine, hücrenin taşıma sistemlerine ve DNA yapısına zarar verir. DNA' da zincir kırıkları, mutasyon ve kromozom yapısında bozukluklar meydana getirir (Ribas, et al., 2004). Hücrede mitokondri fonksiyon bozukluğuna (Miccadei and Floridi 1993), hücre için gerekli olan demir, çinko ve bakır gibi elementlerin fonksiyonlarını yitirmesine neden olur (Ribas, et al., 2004).

Kadmiyumun karsinojenik etkisi insan ve hayvan deneylerinde kanıtlanmış olup 1993 yılında Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından birinci grup karsinojen sınıfına alınmıştır (Järup, 2002; 2003).

Doğada yayılımı geniş olan bor ve kadmiyum gibi element ya da bileşiklerin canlılardaki toksik etkilerinin belirlenmesinde toprak solucanları önemli bir indikatör canlıdır. Toprak solucanları yaşam ortamlarından gerekli organik veya inorganik maddeleri vücutlarına alırlarken başta ağır metaller olmak üzere başka kirleticileri de alırlar. Toprak solucanları yapıları gereği buldukları ortam ile sürekli ilişki içindedir ve bu nedenle deneysel çalışmalar için önemli bir canlı grubunu oluşturur.

2.3. Toprak Solucanlarının Genel Özellikleri

Annelida şubesinin Oligochaeta sınıfının Lumbricidae ailesi içinde bulunan toprak solucanları halkalı solucan olarak bilinirler. Toprak solucanlarının vücutları genelde 100-200 arası değişen segmentten meydana gelir (Kılıç, 2007). Baş ve anal segmentleri dışındaki tüm gövde segmentleri yapısal olarak birbirine benzer. Halkalı solucanlar uzun ve hemen hemen silindirik vücuda sahip olmaları, bilateral simetri ve homonom segmentasyon göstermeleri ile karakterize edilir (Mısırlıoğlu, 2001a).

Toprak solucanlarının vücut yüzeyleri iki ya da daha fazla tabakadan oluşan hücresel yapıda olmayan ince bir kütikula ile örtülüdür (Sims and Gerard, 1985). Bu yapı hayvanı topraktan gelen fiziksel ve kimyasal etkenlere karşı korur (Rastogi and Kishore, 1997). Kütikulanın böyle bir koruyucu özelliği olmasına rağmen gaz ve sıvılara karşı geçirgendir. Bu yüzden toprak solucanları nemli topraklarda yaşarlar (Pechenik, 1996). Kütikulanın altında birkaç farklı türde hücre içeren tek tabakalı bir epidermis bulunur (Sims and Gerard, 1985). Epidermisin altında yer alan kas tabakası ile beraber bu yapı birlikteliği deri-kas kılıfı olarak bilinir (Edwards and Bohlen, 1996). Toprak solucanlarında kompleks bir solunum sistemi görülmediği için solunum vücut duvarı aracılığıyla gerçekleşir (Ruppert, et al., 2004). Vücudun dışında bulunan

kütikulanın ince ve nemli olması gaz değişimine olanak tanır. Toprak solucanlarında su ve suda çözülmüş maddelerin canlı ile bire bir temas ettiği vücut bölgeleri temel olarak deri ve en önemlisi sindirim kanalı olarak dikkat çekmektedir.

Toprak solucanlarında herhangi bir kıvrılma yapmayan düz, basit ve segmentsiz tüp şeklinde bir yapıda olan sindirim sistemi önemli bir yere sahiptir (Sims and Gerard, 1985; Ruppert, et al., 2004; Pechenik, 1996). Sindirim sistemi ağızla başlar, daha sonra bunu farinks takip eder. Farinks, besinlerin ıslatılmasında ve sindirilmesinde görev yapan bezler içerir. Bezler mukus ve içerisinde enzimleri içeren tükürük salgısını üretir (Ruppert, et al., 2004). Farinksin bittiği yerden başlayan özafagusda kalsiyum karbonat taneleri içeren bezler vardır (Sims and Gerard, 1985). Bu bezlerin besinle alınan fazla kalsiyumu sindirim kanalına salmada ve solunum sırasında meydana gelen CO₂' in kalsiyum iyonları ile birleşerek kanın pH dengesini düzenlemede görev aldığı düşünülür (Pechenik, 1996; Ruppert, et al., 2004). Özafagusun son kısımları ise kursak ve katıyı oluşturmak için farklılaşır. Kursak ince bir duvara sahiptir ve besinlerin depo edilmesinden sorumluyken, katı, çok kaslı bir yapı gösterir. Bu yapı da besinlerin mekanik olarak parçalanmasından ve barsağa iletilmesinden sorumludur (Ruppert, et al., 2004). Sindirim sisteminin son bölümünü oluşturan ince barsak ise ince duvarlı, geniş ve silli bir yapı gösterir. Siller sayesinde ve kasların kasılması ile besinler barsak boyunca iletilir (Pechenik, 1996). Barsağın ilk yarısı enzim salgılanması ve sindirimin gerçekleştiği temel bölgedir, son kısmı ise özellikle emilimin yapıldığı bölümdür (Ruppert, et al., 2004). Barsağın dorsal tarafı emilim yüzeyini arttırabilmek için tiflosolis adı verilen bir girinti içerir (Demirsoy, 2002). Ayrıca toprak solucanlarında barsağın çevresinde klorogen doku olarak adlandırılan yapı memelilerdeki karaciğer gibi görev yapar. Protein, karbonhidrat ve lipit metabolizmasından (Pechenik, 1996) sorumlu olan bu dokunun hücreleri glikojeni sentezleyip depo ederlerken aynı zamanda ürenin, yağın ve silisik asidin sentezini de yapar. Bunun dışında atık maddelerde bu hücreler içinde biriktirilir. Atık maddelerle dolu bu hücreler daha sonra vücut boşluğuna bırakılarak boşaltım organlarıyla dışarıya atılır (Ruppert, et al., 2004). Sindirim sistemi toprağın filtrelenmesi sırasında alınan organik maddelerin barsaktan emiliminden sonra kalan mineral kısmın anüsten dışarıya atılması ile son bulur (Demirsoy, 2002).

Toprak solucanlarında sindirim kanalı ve vücut duvarı arasında uzanan ve içi sıvıyla dolu sölom adını alan büyük bir boşluk bulunur (Edwards and Bohlen, 1996; Rastogi and Kishore, 1997). Sölom boşluğu kompartmanlara ayrılmıştır (Salman, 2007; Verma, 2005) ve sölom sıvısı hidrostatik bir iskelet görevi görür (Salman, 2007). Bazı tuz ve proteinlerden meydana gelmiş olan bu sıvının içinde savunma sisteminde rol oynayan çeşitli hücreler yer alır (Rastogi and Kishore, 1997).

Toprak solucanları iyi gelişmiş bir kapalı dolaşım sistemine sahiptir. Özelleşmiş bir kalbe sahip olmayan toprak solucanlarında, damarlar kasılma özelliği gösterirler (Ruppert, et al., 2004). Solunum pigmenti ise hemoglobindir (Pechenik, 1996).

Boşaltım organı olarak toprak solucanlarında her segmentte bir çift halinde bulunan nefridyumların bir ucu söloma açılırken diğer ucu ise son bağırsağa ya da vücut yanlarından dışarı açılır (Salman, 2007). Boşaltım ürünlerinin başında yaşadığı ortam koşullarına bağlı olarak değişen üre, amonyak ve kreatin gelir (Ruppert, et al., 2004).

Toprak solucanlarının sinir sistemi ön kısımda yer alan serebral ganglion ve sonraki her segmentte buna bağlı bulunan birer çift gangliondan oluşur. Bu hayvanların duyu organı olmamasına rağmen sahip oldukları duyu hücreleri aracılığıyla ısı, ışık, titreşim ve kimyasallara karşı duyarlıdır (Mısırlıoğlu, 2001a).

Toprak solucanları hermafrodit canlılardır. Vücut içerisinde oluşturdukları gametleri de eşeyssel açıklardan dışarı verirler (Pechenik, 1996). Ayrıca, toprak solucanlarının vücutlarından kopan parçaları yenileyebilme gibi yüksek bir rejenerasyon yeteneği vardır (Morowati, 2000; Mısırlıoğlu, 2001a).

Açıklanan tüm bu özelliklere sahip toprak solucanları toprak altında belli katmanlarda açtıkları galerilerde yaşarlar. Yaşadıkları katmanlara göre epijeik, endojenik ve anesik türler olmak üzere 3'e ayrılırlar;

- Epijeik türler; yüzeye yakın türlerdir ve yüzey organik maddeleriyle beslenirler,

- Endojenik türler; yüzeyden yaklaşık 20 cm aşağıdaki galerilerde toprak içerisinde biriken organik maddelerle beslenirler,
- Anesik türler; derin galeri açan büyük solucanlardır. Bunlarda epijeik türler gibi yüzey organik maddeleriyle beslenirler (Paoletti, 1999; Mısırlıoğlu, 2001b).

Toprakta bulunma yoğunlukları ise çevresel faktörlere ve toprak yapısına göre değişmektedir. Toprak solucanlarının bulunma yoğunluğuna etkili bir faktör pH toleransıdır ve bu tolerans türden türe farklılık göstermektedir. Genellikle pH 4.5-8.7 arasındaki değerlerde yayılış göstermelerine rağmen nötr topraklarda yoğun bulunurlar. Bu yüzden toprak solucanları nemli ve humuslu topraklarda bol; asitli, kumlu ve kurak topraklarda ise daha az bulunmaktadır.

Toprak solucanları yaşadıkları ortamda toprağın yapısı ve verimliliği üzerine önemli katkılar sağlarlar. Besin amacıyla toprağı karıştırmaları ve galeriler açarken toprağı havalandırmaları, azot döngüsünde ve erozyonun azaltılmasında rol almaları nedeniyle önemli organizmalar arasındadır. Bitkilerin kök gelişimini de olumlu yönde etkilerler (Mısırlıoğlu, 2001a).

Toprak solucanları Perm-Karbon devirlerinden önce evrimleştiği, mutasyon oluşturan etkilerden uzak kalması sonucu kalıtsal yapısını günümüze kadar değiştirmemiş ya da çok az değiştirmiş bir grup olmasıyla da toksik araştırmalarda biyoindikatör canlılar arasına girer (Demirsoy, 2002). Bunlar toprakta birikmiş olan kimyasal maddelerden etkilenmektedir. Bu yüzden kimyasal maddelerin canlılar üzerine toksik etkilerinin araştırılmasında toprak solucanları OECD, FAO ve EEC gibi uluslararası kuruluşlar tarafından deney hayvanı olarak kullanılmaktadır (Saint-denis, et al., 1998).

2.4. Toksikite Çalışmaları

Tüm canlı sistemler kendi metabolizması için gerekli olmayan yabancı birçok kimyasal maddeye maruz kalmaktadır. Bu yüzden toksikoloji bilimi organizmalar için

zararlı olan maddelerin araştırılması, tanımlanması ve meydana getirdikleri etkiler ve bu etkilerin giderilmesi için geliştirilmiştir (Dökmeci, 1994).

Günümüzde tıp, endüstri, tarım ve ev gereksinimleri için kullanılan kimyasal maddelerdeki artış, nükleer enerjinin kullanılması ve bunların sonucunda meydana gelen çevre kirliliği tüm canlılarda toksik etkilerin görülmesine neden olmaktadır (Vural, 2005).

Bir maddenin toksik etki göstermesi maddenin miktarına, etkileşim süresinin uzunluğuna ve hangi yolla vücuda alındığına bağlıdır. Toksik etki sonucu canlı hücrelerde birçok yapısal ve biyokimyasal değişiklikler yanında ileri seviyede ölümler de meydana gelebilir. Kimyasal maddelere bağlı olarak görülen bu etkilerin ortaya çıkarılması ve çözümlenebilmesi için toksikolojik testlere gereksinim vardır ve bu testler genel olarak test süresinin uzunluğuna göre sınıflandırılır (Saygı, 2003). Buna göre;

- Akut toksisite testleri: Kimyasal bir maddeye maruz kaldıktan sonra kısa bir süre içinde oluşan etkilerini belirlemede kullanılan testlerdir. Bu testin amacı, kimyasal bir maddeyle etkileşim sonunda ortaya çıkabilecek toksik olguları, derecelerini veya öldürücü dozu (letalite) belirlemektir (Saygı, 2003). Akut toksisite deneylerinde etkili olan birçok faktör bulunmaktadır. Bunların başında deney hayvanlarının türü, cinsiyetleri, kimyasal maddelerin veriliş yolu, çözücünün niteliği ve sıcaklık gibi etkenler gelmektedir (Dökmeci, 1994). Deneysel olarak kimyasal bir maddenin tek bir dozunun, çalışılan hayvan grubunun %50' sinin ölümüne neden olan ve istatistiksel olarak tayin edilen doz medyan letal doz (LD₅₀) olarak tanımlanır (OECD, 1984). LD₅₀ genellikle kullanılan kimyasalların toksik etkilerini karşılaştırmak ve bunları sınıflandırmak amacıyla kullanılır (Duffus and Worth, 2006). Medyan letal konsantrasyon (LC₅₀) ise belirli koşullarda ve çevrede bulunan deney havanlarının %50' sinin ölümüne neden olan madde konsantrasyonu olarak tanımlanır (Duffus and Worth, 2006).

- Subakut toksisite testleri: Kimyasal maddelerin farklı dozlarının deney hayvanlarına tekrarlanan şekillerde verilmesiyle oluşturulan bir toksisite testidir. Genellikle kemirgenlerde kullanılan bu testte kimyasal maddeler hayvana oral yolla ve 14 günlük bir periyodla verilebilir (Vural, 2005).
- Subkronik toksisite testleri: Deney hayvanlarına kimyasal maddenin tekrarlanan dozlarının 90 günlük bir periyotta ve genellikle oral yolla verilmesiyle gerçekleştirilen bir toksisite testidir (Saygı, 2003).
- Kronik toksisite testleri: Deney hayvanlarına uygulanacak olan kimyasal maddelerin tekrarlanan dozlarda 3 aydan fazla olacak şekilde kurulan bir test sisteminden oluşur (Dökmeci, 1994).

Denekler üzerinde yapılan toksisite testlerinde kullanılan ve toksik etkili olabileceği düşünülen kimyasal maddeler, biyolojik sistemin iskeletini oluşturan diğer kimyasal moleküller ile etkileşime girerek etkilerini gösterirler. Bu etkilerin çok sayıda mekanizmaları bulunur. Bunlardan birisi de organizmanın metabolik faaliyetleri sırasında meydana gelen serbest radikal oluşumunun hızlandırılması, artırılması ya da zararlı etkilerinin kuvvetlendirilmesi olarak düşünülebileceği gibi farklı serbest radikallerin oluşumu da düşünülebilir.

Metallerin metabolizmada serbest radikal oluşturma mekanizmalarının benzer olduğu, antioksidan savunma sisteminde görev alan enzimler üzerine etkilerinin de zamana ve doza bağımlı olarak değişiklikler gösterdiği bildirilmiştir (Galaris and Evangelou, 2002)

2.5. Serbest Radikaller

Dış orbitallerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kararsız, kısa ömürlü ve kimyasal reaktivitesi yüksek atom veya moleküllere serbest radikaller adı verilir (Auroma, 1998; Evans and Halliwell, 1999; Valko, 2006) ve ortaklanmamış

elektronlar genel olarak atom ya da molekülün üst kısmına koyulan bir nokta ile gösterilir (Akkuş, 1995).

Hücre metabolizmasındaki reaksiyonlar sırasında ortaya çıkan kararsız yapıdaki serbest radikaller kararlı hale geçebilmek için çevredeki diğer biyolojik materyallerle etkileşim halindedirler (Halliwell, 1989; Çavdar, et al., 1997; Galaris and Evangelou, 2002).

Süperoksit anyonları ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali (OH^{\cdot}) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türleri biyolojik sistemlerde hücre sel solunumun yan ürünleri olarak meydana gelen en önemli serbest radikallerdir (Cheeseman and Slater, 1993; Mates and Sanchez-Jimenez, 1999; Valko, et al., 2004, 2007). Bunların dışında reaktif nitrojen türlerinden olan nitrik oksit (NO^{\cdot}) ve peroksil (RO_2^{\cdot}) de serbest radikal olarak görev yapmaktadır. Peroksinitrit ($ONOO$), hipoklorik asit ($HOCl$), singlet oksijen (1O_2) ve ozon (O_3) ise normalde serbest radikal olmadıkları halde serbest radikal reaksiyonlarına yol açarlar (Auroma, 1998; Pham-Huy, et al., 2008).

Serbest oksijen radikalleri endojen ve eksojen kaynaklı olabilirler. Endojen kaynakların başında mitokondrideki elektron taşıma sistemi, sitokrom P450 metabolizması, peroksizom, fagositoz ile oksidan enzimler gelirken (Çavdar, vd., 1997; Curtin, et al., 2002; Valko, et al., 2006; Pham-Huy, et al., 2008) eksojen kaynakların başında ise radyasyon, virüsler, stres, çevre kirliliği, metaller, çeşitli kimyasallar, pestisitler, toksinler, ilaç, alkol ve sigara kullanımı, yangınlar ve volkanik aktiviteler gelmektedir (Delibaş ve Özcankaya, 1995; Sen, et al., 2010).

Demir, bakır, kadmiyum, nikel ve krom gibi geçiş metallerinin serbest radikal oluşumu üzerine önemli etkileri vardır (Mercan, 2004; Flora, et al., 2008). Geçiş metalleri oksidasyon basamaklarında yer aldığı için serbest radikal oluşum reaksiyonlarını hızlandıran katalizör işlevi görürler. Bu özellikleri sayesinde serbest radikallerin hücrede daha fazla hasara neden olmalarını sağlarlar (Akkuş, 1995).

Hücrelerde Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları sayesinde metal iyonları süper oksit anyonları ve H_2O_2 ile tepkimeye girerek $OH\cdot$ ' ni bunun yanında metal-oksijen komplekslerini oluştururlar (Leonard, et al., 2004; Mercan, 2004). Meydana gelen serbest radikaller ile metal toksisitesi sonucu antioksidan savunma sistemlerindeki bozulmalar hücrelerdeki makromoleküllerde hasarlara neden olur (Wolf and Baynes, 2006; Flora, et al., 2008).

Serbest radikaller nükleik asit, lipit, protein, enzim ve karbonhidrat gibi hücrelerin tüm önemli elemanlarında hasara yol açabilir (Valko, et al., 2006). Bu hasarların başında lipit peroksidasyonu gelmektedir. Zarlardaki kolestrol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest oksijen radikalleri ile kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluşturur. Poliansatüre yağ asitlerinin bu oksidatif yıkımı lipit peroksidasyonu olarak adlandırılır ve çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Hücre zarının geçirgenliğini, akıcılığını, iyon transportunu ve enzim aktifliğini engelleyerek çeşitli doku hasarlarına neden olur (Akkuş, 1995; Gutteridge, 1995).

Serbest radikaller aminoasitlerin yan zincirlerinin oksidasyonuna neden olarak protein-protein bağlarının oluşmasına, proteinlerin parçalanmasına ve çökmesine neden olur. Özellikle membran proteinleri ile reaksiyona girerler ve enzim, nörotransmitter, reseptör proteinleri ile IgG' nin üç boyutlu yapısını bozarlar (Delibaş ve Özçankaya, 1995). DNA zincirlerin kırılmasında, mutasyonlara açık hale getirilmesinde, kromozomların yapısal değişimlerinde ve kanser oluşumunda serbest radikaller önemli rol oynamaktadır (Valko, et al., 2004; Karihtala and Soini, 2007).

Serbest radikallerin bu zararlarına karşı canlı organizmalarda da savunma sistemleri gelişmiştir. Sağlıklı bir organizmada serbest radikaller ve bunları etkisiz hale getirmeye çalışan antioksidan savunma sistemi bir denge içindedir (Çavdar, vd, 1997; Leonard, et al., 2004). Bu denge serbest radikaller lehine bozulduğunda oluşacak oksidatif hasarları önlemek, serbest oksijen radikallerini yakalamak ve kararlı hale getirebilmek için antioksidan savunma sistemi devreye girer (Cheeseman and Slater, 1993; Gutteridge, 1995; Evans and Halliwell, 1999).

2.6. Antioksidan Savunma Sistemleri

Antioksidanlar genel olarak lipid peroksidasyonunu, peroksidasyon zincir reaksiyonlarını engelleme ya da reaktif oksijen türlerini toplama yoluyla etki ederler (Akkuş, 1995). Kavramsal olarak bu etki biçimleri 4 kategoride toplanır;

- Toplayıcı (scavenging) etki: Serbest radikalleri daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek ya da etkisiz hale getiren bir etki türüdür. Antioksidan enzimler ve küçük moleküller bu grupta yer almaktadır (Gökpınar, vd., 2006).
- Bastırıcı (quencher) etki: Serbest radikallere bir hidrojen aktararak aktivitelerini sınırlandıran ya da inaktif hale getirmesine denir. Vitaminler, flavanoidler, trimetazidin ve mannitol böyle bir etkiye sahiptir (Akkuş, 1995).
- Onarıcı (repair) etki: Oksidatif hasar görmüş olan molekülleri onarma şeklinde bir etki gösterirler (Gökpınar, vd., 2006).
- Zincir kırıcı (chain breaking) etki: Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlama yolu ile zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleme şeklinde ortaya çıkan bir etki türüdür. Hemoglobin, seruloplazmin, mineraller ve E vitamini bu şekilde serbest radikallere etki ederler (Akkuş, 1995; Young and Woodside, 2001; Valko, et al., 2004).

Antioksidan etki şekilleri içinde yer alan bazı antioksidan örneklerinin organizmanın kendisine ait ürünler olduğu, bazılarının ise organizma tarafından oluşturulamayan ancak kendisinin dışında başka organizmalar tarafından sentezlenmiş ürünler olduğu görülür. Bu durumda antioksidan savunma sisteminde etkili moleküllerin etki şekilleri kadar kimyasal yapısı ve kaynağı da önem kazanmaktadır.

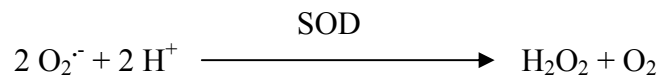
2.6.1. Antioksidanlar

Endojen ve eksojen kaynaklı olmak üzere başlıca 2 ana gruba ayrılır (Pham-Huy, et al., 2008). Endojen olan antioksidanlar da kendi arasında enzim olan ve olmayan antioksidanlar şeklinde sınıflandırılır (Karihtala and Soini, 2007).

2.6.1.1. Endojen kaynaklı antioksidanlar

Bu grupta yer alan enzimler süperoksit dismutaz (SOD), CAT, GPx, glutatyon S-Transferaz (GST), mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi ve hidroksiperoksidazdır (Valko, et al., 2007).

Antioksidan enzimler arasında ilk savunmaya geçen, süperoksit radikallerini ($O_2^{\cdot-}$) H_2O_2 ' ye ve moleküler oksijene (O_2) çevirerek bu radikalın etkisini azaltan endojen kaynaklı enzim SOD' tur (Bandyopadhyay, et al., 1999). İnsan hücrelerinde katalizledikleri reaksiyonlar aynı olan fakat yapısına katılan elementler ve hücrede bulunma yerleri farklılık gösteren 2 farklı SOD tipi bulunmaktadır. Bunlardan biri sitozolde yer alan ve yapısında bakır (Cu) ile çinko (Zn) içeren Cu-ZnSOD, diğeri ise mitokondride yer alan ve mangan (Mn) içeren MnSOD' tur (Evans and Halliwell, 1999; Karihtala and Soini, 2007). SOD oksijenin fazla kullanıldığı hücrelerde meydana gelen süperoksit radikallerini yok ederek hücreyi bu radikallerden korur ve bunu lipid peroksidasyonunu engelleyerek gerçekleştirir (Akkuş, 1995).

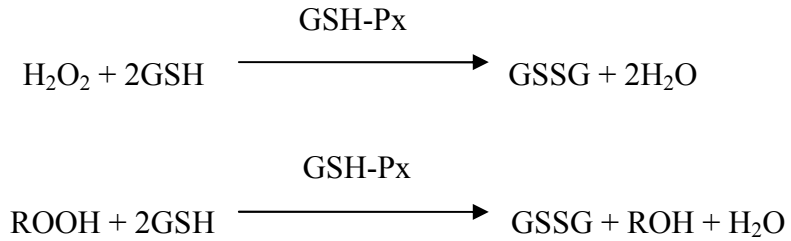


Enzim olan endojen kaynaklı bir diğeri antioksidan CAT' dir. Yapısında 4 hemoglobin grubu bulunduran bir hemoprotein olarak tüm memeli hücrelerinin peroksizomlarında yer alır. SOD enziminin oluşturduğu H_2O_2 ' nin su ve O_2 parçalanmasında görev alır (Bandyopadhyay, et al., 1999; Matés and Sánchez-Jiménez, 1999). Aynı zamanda CAT enzimi bir molekül H_2O_2 ' yi elektron verici olarak

kullanırken diğ er H_2O_2 ' yi de oksidan veya elektron alıcı olarak kullanabilir. CAT miktarı H_2O_2 ' nin konsantrasyon yoğunluğ una paralel olarak artıp azalır ve H_2O_2 ' den baş ka hiçbir peroksiti katalizlemez (Delibaş ve Özcankaya, 1995).



Selenyum bağımlı antioksidan bir enzim olan GPx' in 2/3' ü sitozolde yer alırken, kalan kısmı mitokondride bulunur (Bandyopadhyay, et al., 1999). GPx, H_2O_2 ya da organik peroksitlerin indirgenmesine özgü bir enzimdir. Canlı sistemlerde GPx, H_2O_2 ' yi suya indirgeme aşamasında hidrojen almak için redükte glutatyona (GSH) ihtiyaç duyar. GSH' ın glutatyon disülfide (GSSH) dönüştürülmesi sırasında H_2O_2 de suya dönüştürülür. GSSG ise glutatyon redüktaz (GR) enziminin katalizlediğ i tepkimeyle NADPH harcanarak tekrar redüksiyona uğratılır (Urso and Clarkson, 2003; Valko, et al., 2006; Sen, et al., 2010). Normal koşullarda hücrede meydana gelen düşük yoğunluktaki H_2O_2 ilk olarak GPx tarafından yok edilir, CAT enziminin ise H_2O_2 oluşumunun artığ ı durumlarda etkinlik gösterdiğ i kabul edilmektedir (Çavdar, et al., 1997). Ayrıca GPx H_2O_2 ' yi indirgemesi yanında diğ er antioksidanlar ile birlikte solunum sonucunda oluş an serbest radikallerin fagositik hücrelere zarar vermesini engellemektedir (Masella, et al., 2005).



Endojen olduğ u halde enzim olmayan antioksidanlar arasında ise α - tokoferol (E vitamini), β -karoten gibi lipitlerde eriyen ve suda eriyen askorbik asit (C vitamini) gibi vitaminler ile melatonin, sistein, seruloplazmin, transferrin, miyogloblin, hemogloblin, ferritin, metionin, albumin, bilirubin gibi hücre sitozolünde ve kan plazmasında bulunan moleküller yer alır (Akkuş, 1995).

2.6.1.2. Eksojen kaynaklı antioksidanlar

Eksojen kaynaklı antioksidanlar arasına ilaç olarak kullanılan ksantin oksidaz inhibitörleri, NADPH oksidaz inhibitörleri, rekombinant süperoksit dismutaz, E vitamini analogu olan trolox-C, endojen aktiviteyi arttıran maddeler, enzimatik olmayan serbest radikal toplayıcıları, demir redoks döngüsünün inhibitörleri, nötrofil adezyon inhibitörleri, sitokinler ile butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA), sodium benzoate, ethoxyquin, propylgalate, Fe-süperoksit dismutase gibi gıda antioksidanları girmektedir (Akkuş, 1995).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Deney Hayvanları

Tüm deney hayvanları Çanakkale Esenler mevkiinde, kirleticilerden uzak olduğu düşünölen bir bahçeden toplandı ve ağzı hava geçiren bir metaryalle kapatılmış olarak cam kaplarda laboratuvara ulaştırıldı. Deneyin başlama sürecine kadar solucanlar oda sıcaklığında hafif nemli topraklarda yaşatıldı.

3.2. Deneysel Uygulamalar

Çalışmamızda borik asit, bor oksit ve $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ (kadmiyum nitrat tetra hidrat) bileşiklerinin sulu çözeltileri kullanıldı. Deney sürecinde kullanılan dozlar OECD 207 “Toprak Solucanı Akut Toksisite” (1984) protokolüne göre tasarlanarak daha önceden yapmış olduğumuz deneydeki LD_{50} değerleri göz önüne alınarak belirlendi. Buna göre, borik asit bileşğinin 5000, 6000, 7000 ppm; bor oksit bileşğinin 3000, 4000, 5000 ppm ve pozitif kontrol için kadmiyum nitrat tetra hidrat bileşğinin 1000, 2000, 3000 ppm derişimlerde saf sulu çözeltileri hazırlandı (Çizelge 3.1). Her madde ve bunların dozlarına göre hazırlanan çözeltiler, OECD 207 protokolüne uygun olarak cam kaplarda bulunan 750 gr toprak içine 20’ şer mL eklenerek homojen dağılımı sağlandı. Negatif kontrol grubu için ise sadece 20 mL saf su uygulaması yapıldı. Sağlıklı görünen ve benzer vücut büyüklüklerine sahip her biri $1,8 \pm 0,2$ gr olan toprak solucanlarından rastgele $n=10$ ’ ar adet seçildi. Cam kaplar içerisine konulan toprak solucanlarının 7 günlük akut toksisite deney sürecini tamamlamaları sağlandı.

Çizelge 3.1. Test maddelerine göre deney grupları ve uygulanan doz miktarları. (n=10)

Gruplar		Dozlar (ppm)		1000	2000	3000	4000	5000	6000	7000

Negatif Kontrol	I	√								
Pozitif Kontrol Cd(NO ₃) ₂ .4H ₂ O (kadmiyum nitrat tetra hidrat)	II		√							
	III			√						
	IV				√					
H ₃ BO ₃ (borik asit)	V							√		
	VI								√	
	VII									√
B ₂ O ₃ (bor oksit)	VIII				√					
	IX					√				
	X						√			

3.3. Doku Örneklerinin Alınması ve Değerlendirilmesi

Deneyel uygulamaların ardından, tüm gruplara ait deney hayvanları barsak içeriklerini boşaltmaları amacıyla, içinde nemli filtre kağıdı bulunan ortamlarda 24 saat bekletildi. Süre sonunda ise deney hayvanları ışık ve TEM incelemeleri ile enzim aktivitesinin belirlenmesine yönelik çalışmalar için kısımlara ayrıldı.

Histolojik çalışmalar için alınan doku örnekleri %10' luk nötral formaldehit sıvısı içine alınarak tespit edildi. TEM çalışmaları için alınan doku örnekleri ise 0,1 M fosfat tamponu (pH 7.4) ile %4' lük glutaraldehit (pH 7.2) çözeltisi içinde hızlı bir şekilde küçük parçalara ayrılarak tespit edilmeleri sağlandı.

3.3.1. Histopatolojik uygulamalar

Toprak solucanlarının orta barsak kısmına gelen vücut bölgelerinin kimyasal fiksasyonu sağlandıktan sonra histolojik doku takibi gerçekleştirildi. Doku örnekleri

musluk suyu altında yıkamanın ardından 60 dk %70' lik, 30 dk %80' lik, 30dk %90' lık ve 30 dk %96' lık artan etil alkol serilerinden geçirilerek dehidratasyonları sağlandı. Dehidratasyon işleminden sonra doku örnekleri 10 dk ksilol-etanol karışımına ve arkasından 10' ar dk 2 kez değiştirilerek ksilole alındı. Parafinizasyon işlemleri için 57 °C etüvde sırasıyla 30 dk, 30 dk ve 50 dk parafin serisinde bekletilerek bloklandı. Parafin bloklardan mikrotom yardımıyla 5 µ kalınlığında enine kesitler alınarak Poly-L-Lysine kaplı lamalar üzerine aktarıldı. Alkol serilerinden geçirilerek hidratasyonu sağlanan kesitlerin standart H&E boyaması yapılarak daimi hale getirildi.. Hazırlanan tüm doku kesitleri Olympus marka, CH40 model ışık mikroskobu yardımıyla histopatolojik olarak incelendi. Histopatolojik bulgular “1; yok, 2; az var, 3; var ve 4; çok var” biçiminde skorlandı. Negatif ve pozitif kontrol grupları ile karşılaştırmalı şekilde incelenen örnek kesit alanları, Spot Insight marka 3.2.0 model kamera ve Spot Advanced 4.0.6 programı kullanılarak fotoğraflandırıldı.

3.3.2. TEM uygulamaları

%4' lük gluteraldehit ile 24 saat boyunca ilk tespiti gerçekleştirilmiş toprak solucanı doku örnekleri 3 kez 15' er dk aralıklarla değiştirilen 0,1 M fosfat tamponu (pH 7.4) ile yıkandı. Osmium tetroksit içerisinde 2 saat boyunca ikinci tespiti yapılan örnekler aynı tampon çözeltisinde tekrar yıkandı. Doku örnekleri +4 °C' de 15' er dk %50, %70, %90 etil alkol serilerinden, 30' ar dk da %96, %100 etil alkol serilerinden 2' şer kez değiştirilerek geçirildi. Bu şekilde dehidratasyonu sağlanan dokular propilen oksitte 2 kez 30' ar dk, 1:1 oranındaki propilen oksit ve araldit karışımı içinde 2 saat bekletildi. Dokular daha sonra saf araldit içine alınıp bloklandı.

Hazırlanan bloklardan ultramikrotom yardımıyla 700 nm' lik yarı ince kesitler alınarak toluidin blue ile 7 dk boyama yapıldı. Distile su içinde 2-3 dk yıkanan kesitler lamlara alınarak kurutuldu. Kesitlerden ışık mikroskobunda inceleme yapılarak ince kesitler için bölge seçimi yapıldı. Bloklarda belirlenen bölgelerden 60 nm kalınlığında ince kesitler alındı ve 300 mesh bakır gridler üzerine yerleştirildi. Boyama işlemleri ise 60 dk boyunca %2' lik uranil asetat ile sağlandı. Gridler fosfat tamponu ile yıkanıp 15

dk kurşun asetat ile muamale edildi (Gao, et al., 2007; Eagles and Chapman, 2007). İnce kesitler JEOL-JEM-1220 marka Transmisyon Elektron Mikroskopta incelenerek Olympus marka, Megaview G2 model kamera yardımıyla fotoğraflandırıldı.

3.4. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Çalışmamızda enzim aktivitesi Doğal Jel Elektroforez tekniği kullanılarak belirlendi (Jayakumar, et al.,2007).

3.4.1. Homojenizasyon

Enzim aktivitesinin belirlemesine yönelik çalışmalar için ayrılmış olan dokular, 2-3 hacim/gram olacak şekilde soğuk ekstraksiyon tamponu (PO_4) içerisinde homojenizatör yardımıyla parçalandı. Eppendorf 5804 R santrifüjde homojenatların 5000 G' de 60 dk santrifüjlenmesinin ardından elde edilen süpernatant kısmı polietilen tüplere bölünerek Doğal Jel Elektroforezi uygulamalarında kullanılmak üzere $-80\text{ }^\circ\text{C}$ derin dondurucuya konuldu.

3.4.2. Native (Doğal) jel elektroföresi

Proteinlerin elektriksel alanda yüklerine göre ayrılmaları temeline dayanan bir tekniktir. Doğal jel elektroföresinde kullanılan tamponlar deterjan ya da diğer denatüre edici maddeleri içermediği için doğal koşullarda gerçekleşir ve enzim aktivitesinin belirlenmesini sağlar.

Doğal jel elektroföresi için gerekli tüm çözeltiler deiyonize saf su ile hazırlanıp filtre edildi. Trizma base içeren tampon çözeltilerinin pH' ları ise HCl ile ayarlandıktan sonra kullanıldı (Temizkan ve Arda, 2004).

1. %10' luk amonyum persülfat çözeltisi (APS):

Amonyum persülfat.....	0,1 gr
Distile su (dH ₂ O).....	1 mL

2. Tris-borat tamponu (TBE5x):

Trisma-base.....	54 gr
Borik asit.....	27,5 gr
0,5M Etilen daimin tetra asetik asit (EDTA).....	20 mL (pH 8.0)
Distile su (dH ₂ O).....	1000 mL

3. Alt tank tamponu (pH 7.5):

Tris.....	22,7 gr
1N HCl.....	150 mL
Distile su.....	3 L

4. Üst tank tamponu (pH 8.9):

Tris.....	4,56 gr
Glisin.....	3 gr
Distile su.....	1 L

5. Sükroz boya çözeltisi:

Sükroz.....	5 gr
% 1 Bromofenol mavisi.....	1 mL
Distile su.....	10 mL

6. % 8' lik Poliakrilamid jel:

Distile su.....	5,2 mL
TBE5x.....	750 µL
Akrilamid / Bisakrilamid (19:1' lik).....	1,5 mL
APS.....	50 µL
TEMED.....	7,5 µL

7. %10' luk Poliakrilamid jel:

Distile su.....	6,5 mL
TBE5x.....	940 µL
Akrilamid / Bisakrilamid (19:1' lik).....	1,87 mL
APS.....	62,5 µL
TEMED.....	9,4 µL

Çalışmada kullanılan jeller monomer (akrilamid) ve çapraz bağlayıcı (bis) yüzdelerinden hesaplanan %T (total akrilamid yüzdesi) ve %C_{bis} (bis' in monomere oranı) oranları göz önüne alınarak yukarıdaki miktarlarda su, tampon, monomer, APS ve TEMED' in karıştırılmasıyla hazırlandı (Temizkan ve Arda, 2004).

Polimerizasyonu henüz gerçekleşmemiş olan dikey jel elektroforez aletinin jel dökme aparatında kullanılan 2 cam (jel kaseti) arasına pipet yardımıyla dolduruldu. Örneklerin uygulanması için kuyucukların oluşumunu sağlayan tarak, hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek jel içerisine yerleştirildi (Temizkan ve Arda, 2004).

Jel polimerizasyonu tamamlandıktan sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve kuyucukların içi üst tank tamponuyla yıkandı. İzleme işleminin gerçekleştirilmesinde kullanılan sükröz boya çözeltisinden kuyucuklara 1 µL ve hazırlanan örneklerden 10 µL olacak şekilde mikropipet yardımıyla yükleme yapıldı. Bu yöntem ile her bir kuyucuğun 15-100 µg protein içermesi sağlandı. Jel kasetleri tanka yerleştirildikten sonra tankın alt ve üst tank tamponları ilgili yerlerine koyuldu. Anot ve katot bağlantıları takılarak sistem çalıştırıldı (Temizkan ve Arda, 2004).

3.4.2.1. CAT ve GPx aktivitelerinin belirlenmesi

Çalışmamızda CAT aktivitesini belirleyebilmek için Woodbury ve arkadaşlarının (1971) metodu kullanıldı. CAT aktivitesi için, protein örnekleri %8' lik poliakrilamid jelde 170 V, 80 mA' de 1 saat yürütüldü. Kasetten çıkarılan jel 5 mM H₂O₂ substratı

içerisinde 30 dk bekletilip yıkandıktan sonra %1' lik potasyum ferrik siyanid ile %1' lik ferrik kloridden oluşan çözelti karışımında boyandı ve metanollü yıkama solüsyonuyla yıkandı. Jelde, koyu yeşil boyanan zeminde CAT aktivitesi gösteren protein bantları sarı renkte gözlendi.

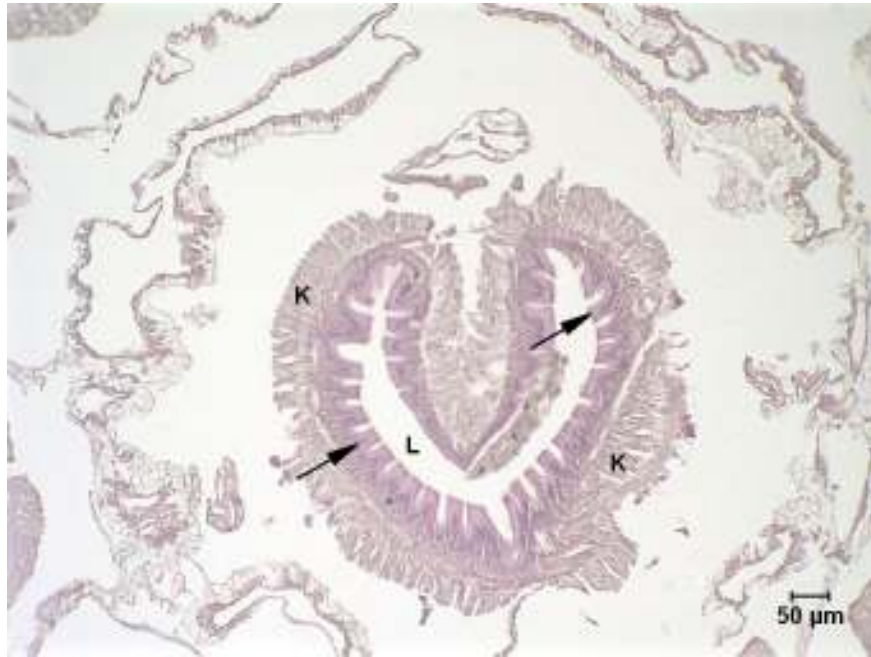
GPx aktivitesinin belirlenmesi ise Lin ve arkadaşlarının (2002) metodu kullanılarak gerçekleştirildi. Protein örneklerinin %10' luk poliakrilamid jelde 200 V, 80 mA' de 2 saat yürümesi sağlandı. Jel kasetten çıkarıldıktan sonra, 50 mL Tris-HCl tamponu (pH 8.0) içerisine 0,2 gr L-Glutatyon ve 8 µL %30' luk H₂O₂ konularak hazırlanan substrat içerisinde 30 dk bekletildi. Substrattan çıkarıldıktan sonra jel 50 mL Tris-HCl tamponu (pH 8.0), 0,025 gr NBT (nitrobluetetrazolium) ve 0,025 gr PMS (phenozinmetasülfat) ile hazırlanan boya çözeltisine konuldu. GPx aktivitesini gösteren bantlar beyaz renkte gözlendi.

Yapılan deney sonucunda, jelde CAT ve Gpx enzim aktivitelerini ortaya koyan bantların görüntülenmesi Kodak Gel Logic 1500 Imaging System Jel görüntüleme sistemi kullanılarak, Kodak Molecular Imaging Software paket programı yardımıyla gerçekleştirildi ve enzim aktiviteleri sonucu meydana gelen bölgelerin alanları hesaplandı.

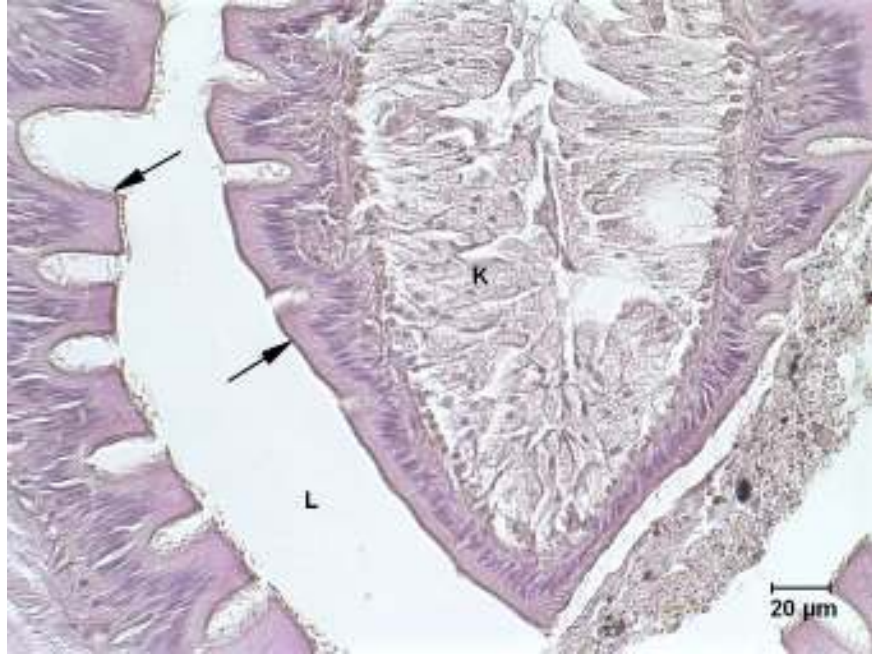
4. SONUÇLAR

4.1. Histopatolojik Değerlendirmeler

Çalışmamızın deneysel uygulama yapılmamış negatif kontrol grubu (Grup I) hayvanlarının histolojik kesitlerinde herhangi bir patoloji görülmedi. Grup I hayvanlarının deri, kas ve barsak dokularında bütünlüğün olduğu ayrıca, barsak lümeninde yer alan mikrovilluslar ile klorogen dokusunun normal histolojik yapıda olduğu tespit edildi (Şekil 4.1, Şekil 4.2).

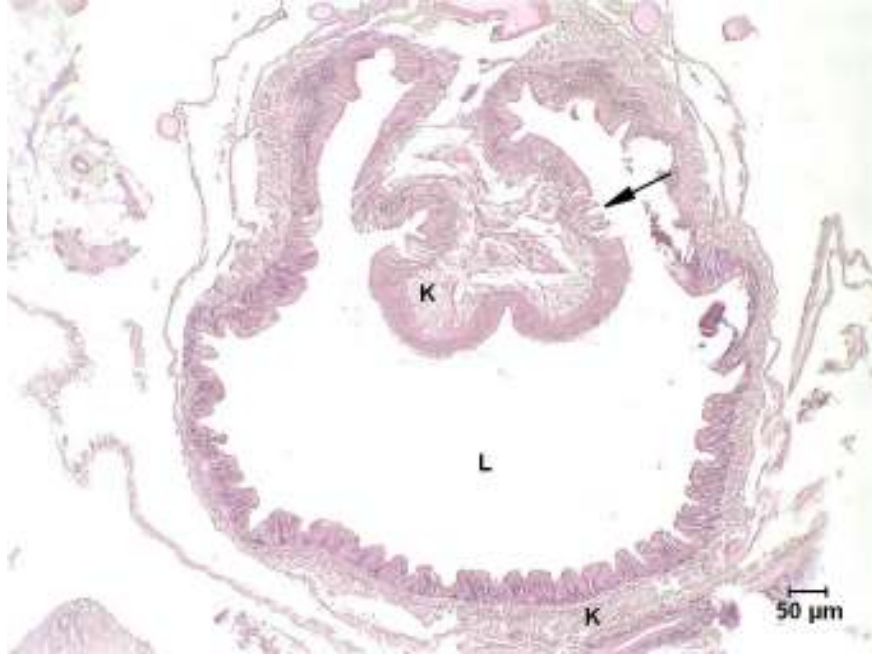


Şekil 4.1. Negatif kontrol grubu (Grup I) hayvanlarına ait kesitte barsak lümenini (L) içten çevreleyen epitel (↗) ve barsağı dıştan çevreleyen klorogen doku (K) görünümü.

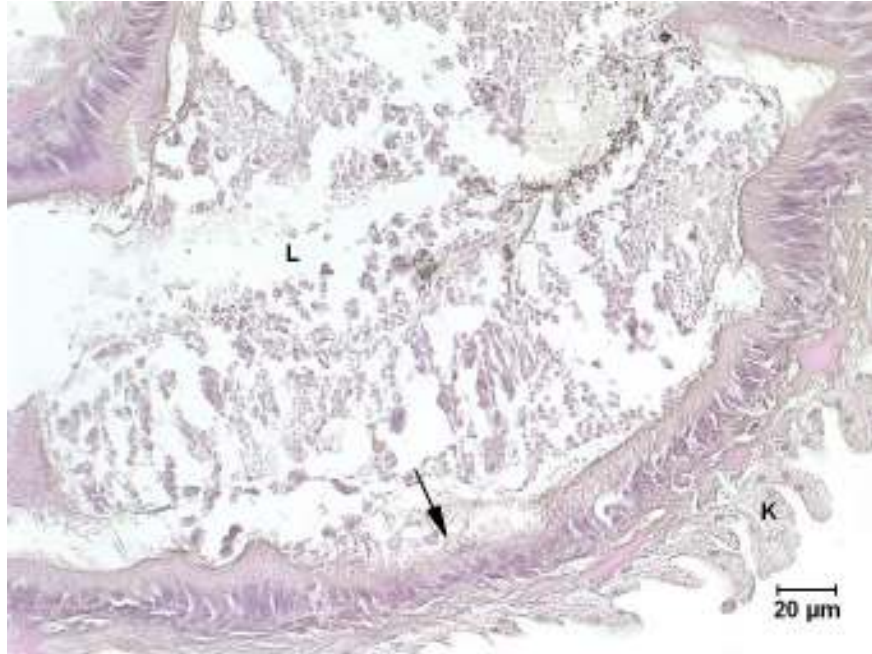


Şekil 4.2. Grup I hayvanlarına ait kesitte barsak lümenini (L) içten çevreleyen epitel doku (↗) ve normal görünümlü klorogen doku (K).

Kadmiyum nitrat tetra hidrat' ın üç farklı dozunun uygulandığı Grup II, III ve IV' e ait histolojik kesitlerde Grup I' e göre farklı görünümeler tespit edildi. Grup II' ye ait toprak solucanlarının barsak epitelinde yer yer bozulmalar, villuslardaki devamlılıkta kesintiler ve kısmi hücre enkazları görüldü (Şekil 4.3). Villuslarını kısmen kaybetmiş barsak epitel hücreleri yapısında ve çevresinde yer alan klorogen dokuda yer yer parçalanmalar saptandı (Şekil 4.4).

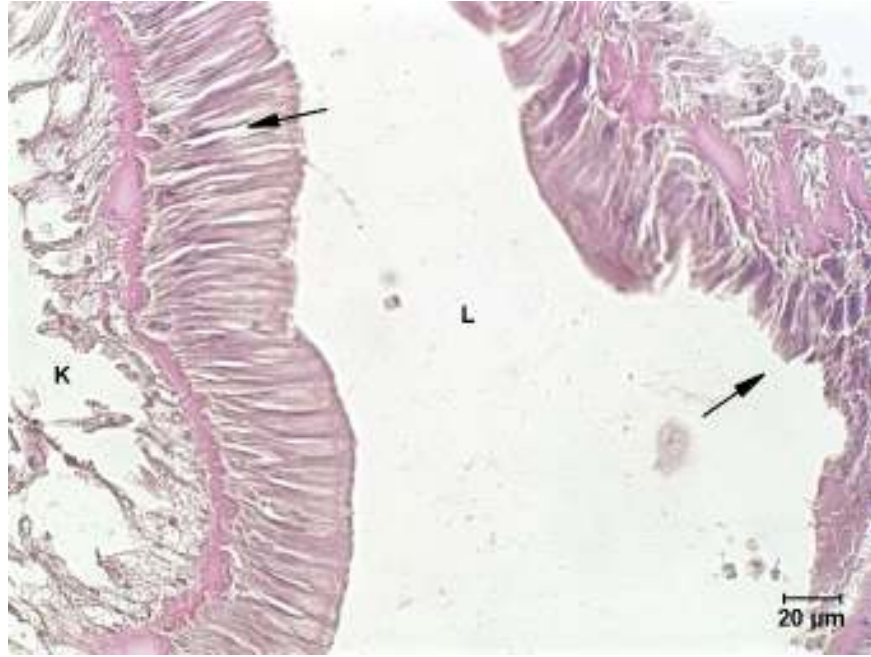


Şekil 4.3. Grup II hayvanlarına ait kesitte villus devamlığındaki kesintileri ile barsak epitelindeki kısmi bozulmalar (↗). (**K**: Klorogen doku, **L**: Barsak lümeni).



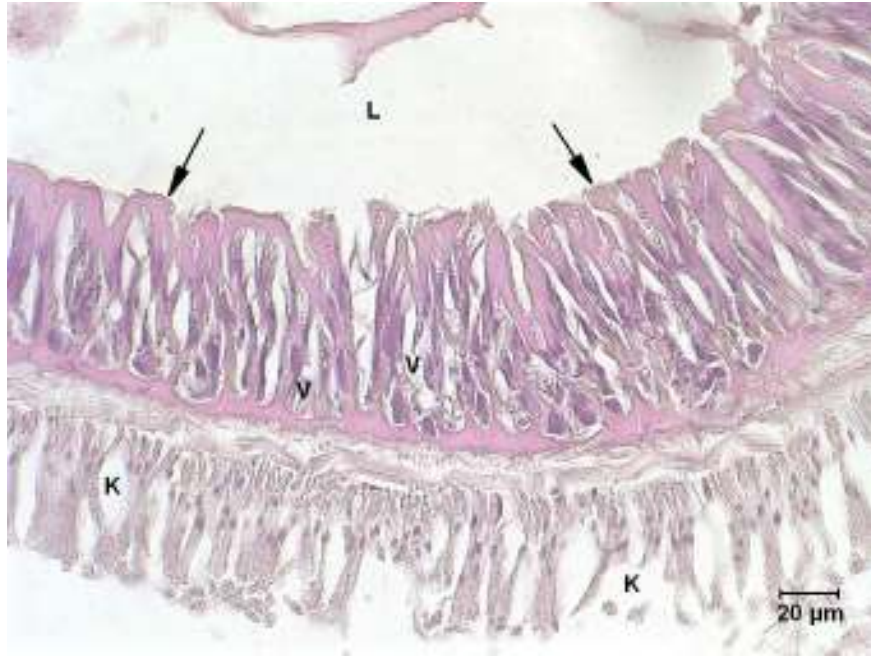
Şekil 4.4. Grup II hayvanlarına ait kesitte villuslarını kısmen kaybetmiş barsak epitel hücreleri (↗) ile parçalanmış klorogen dokunun (**K**) görünümü. (**L**: Barsak lümeni).

Grup III' e ait hayvanların kesitlerinde doku bütünlüğündeki bozulmaların Grup II ile benzer olduğu belirlendi. Barsak duvarını oluşturan epitel hücreleri arasında sıkı bağlantıların kısmen yok olduğu, bazı bölgelerde villuslardaki devamlılığın ve klorogen dokuda bütünlüğün kaybolduğu belirlendi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Grup III hayvanlarında hasar görmüş barsak epiteli (↗) ile klorogen dokunun (**K**) görünümü. (**L**: Barsak lümeni).

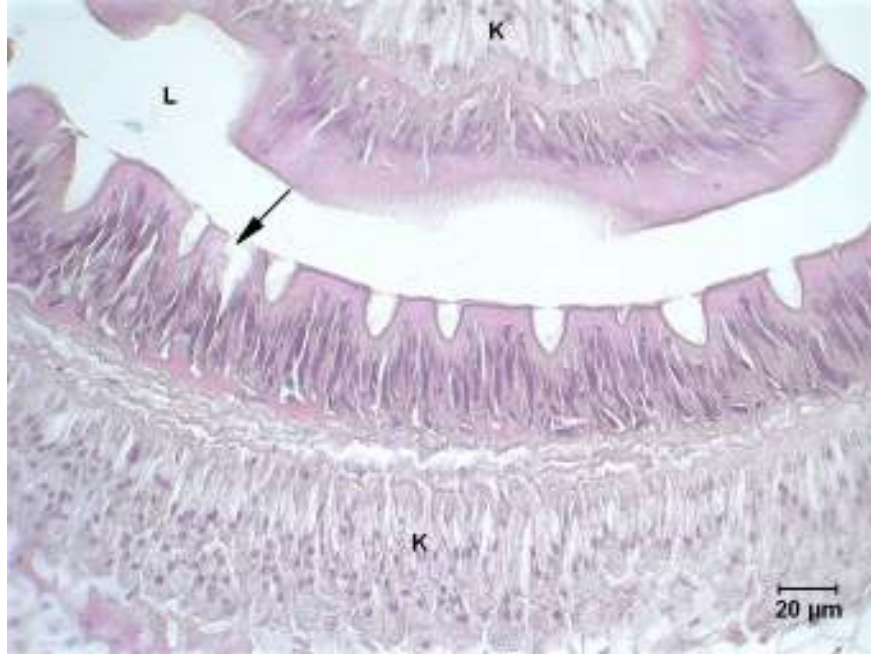
Grup IV toprak solucanı örneklerinin histolojik kesitlerinde Grup II ve III' e göre dokusal bütünlüğün tamamen ortadan kalktığı görüldü. Barsak epitel hücre zarlarında parçalanmaların arttığı ve çoğu bölgede hücre ölümlerinin gerçekleştiği, varlığını devam ettiren epitel hücrelerinde vakuolleşme ile villusların tamamen erimesi sonucu devamlılığının ortadan kalktığı gözlemlendi. Klorogen dokunun ise yüksek oranda hasar gördüğü belirlendi (Şekil 4.6).



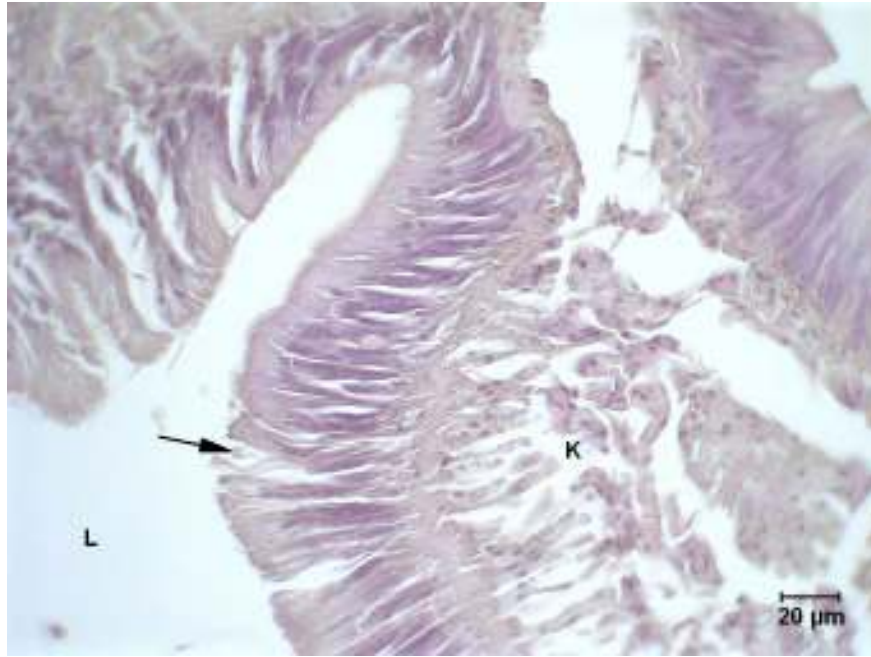
Şekil 4.6. Grup IV hayvanlarında villus kayıpları ile gözlenen barsak epitel hücrelerinde (↗) parçalanmalar ve vakuolizasyon (V) ile klorogen dokuda (K) yüksek oranda hasarlanmış ve parçalanmış yapının görünümü (L: Barsak lümeni).

Deneysel aşamada borik asidin 3 farklı dozunun uygulandığı Grup V, VI ve VII' ye ait toprak solucanı histolojik kesitlerinde ışık mikroskop düzeyinde incelemeler yapıldı. Grup V' in kesitlerindeki histolojik doku bütünlüğünün devam ettiği gözlemlendi. Ancak, barsak epitelinde yer yer parçalanmalar ve villuslarda bazı bölgelerde erimeler meydana geldiği belirlendi. Klorogen dokuda ise dikkate değer hasarlanma gözlenmedi (Şekil 4.7).

Grup VI hayvanlarının histolojik incelemelerinde barsak epitel bütünlüğünün bozulduğu, epitel hücreleri arasında belirgin boşlukların oluştuğu belirlendi (Şekil 4.8). Hücre ölümü ve kayıplarının gerçekleştiği Grup VI histolojik kesitlerinde villusların parçalandığı görüldü. Ayrıca, klorogen dokuda meydana gelen hasar seviyesinin ise az oranda olduğu tespit edildi (Şekil 4.8).

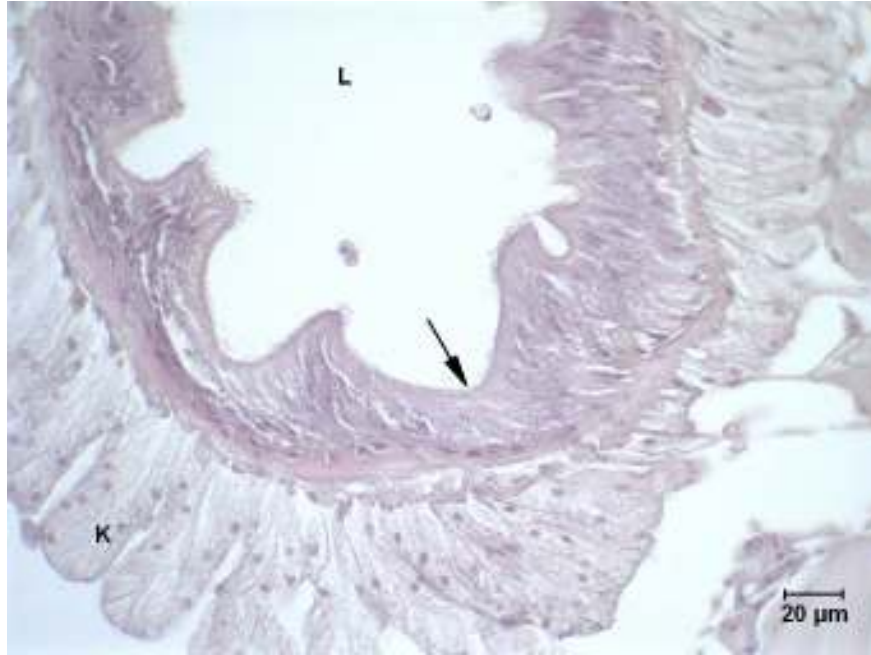


Şekil 4.7. Grup V hayvanlarına ait kesitte kısmen hasarlanmış barsak epiteli (↗) ve villus devamlığındaki bölgesel kesintiler ile bütünlüğü devam eden klorogen doku (K) (L: Barsak lümeni).



Şekil 4.8. Grup VI hayvanlarının villuslarını kaybetmiş barsak epitel (↗) hücreleri arasındaki kopukluklar ve klorogen doku (K) hasarı (L: Barsak lümeni).

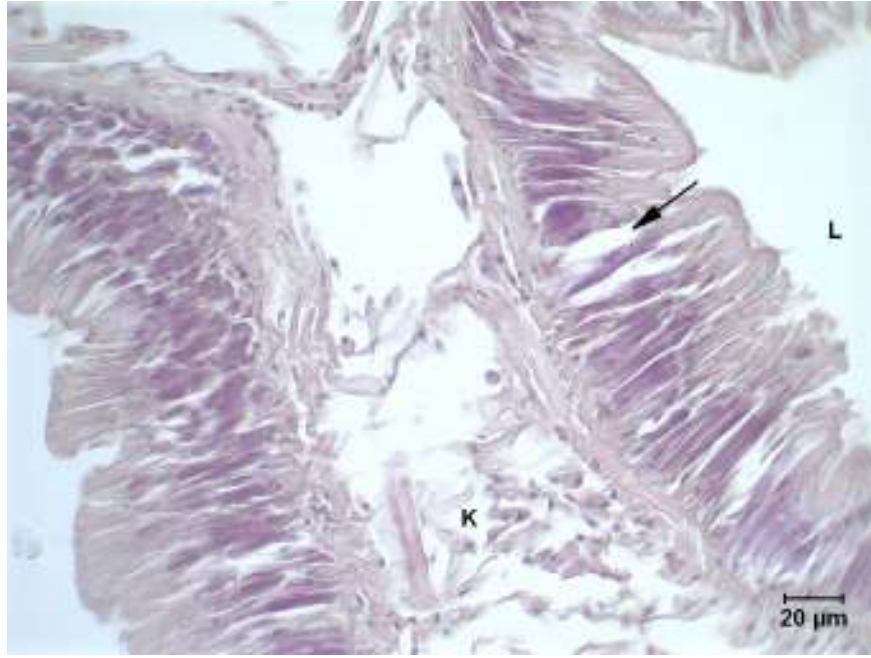
Grup VII' e ait toprak solucanı histolojik kesitlerinde yapılan ışık mikroskopik incelemelerde barsak epitel hücrelerinden çoğunun atrofiye olduğu, hücresel sınırların kaybolduğu ve hücre ölümlerinin meydana geldiği ayrıca, villuslarda erimelerin kadmiyum nitrat tetra hidrat' ın en yüksek dozunun uygulandığı Grup IV' e oranla daha az miktarda meydana geldiği gözlemlendi (Bkz. Şekil 4.6, Şekil 4.9). Ancak, Grup IV' de tespit edilen vakuolizasyon görünümüne Grup V ve VI' da rastlanmadığı gibi Grup VII' de de rastlanmadı. Borik asitin en yüksek dozunun uygulandığı Grup VII kesitlerinde klorogen yapıdaki bütünlük dikkat çekici bulundu (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Grup VII hayvanlarına ait kesitte kısmen atrofiye olmuş barsak epitel (↗) hücreleri ile bütünlüğünü devam ettiren klorogen dokunun (K) görünümü. (L: Barsak lümeni).

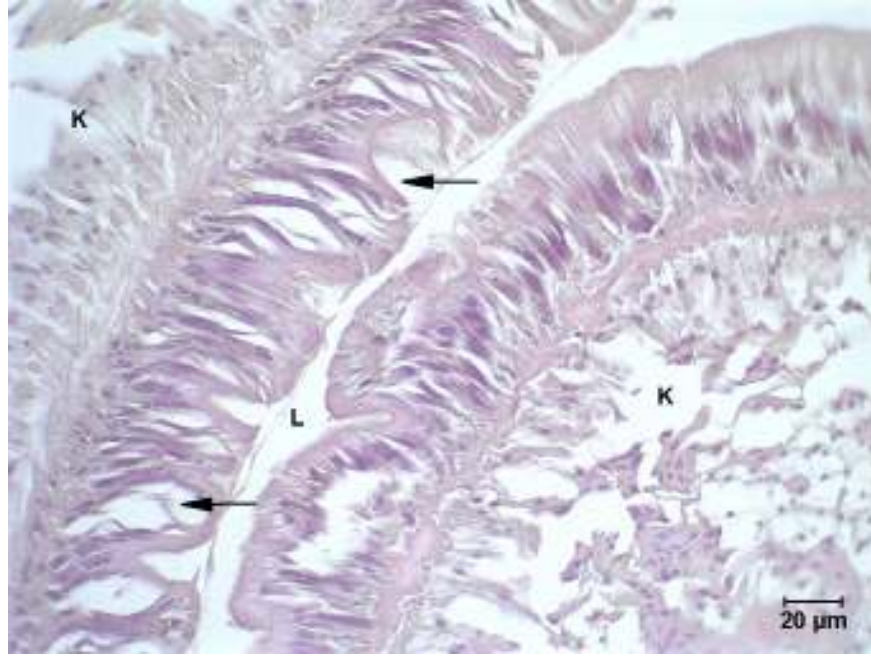
Bor oksit uygulanan Grup VIII, IX ve X' a ait hayvanların histolojik kesitlerinde ışık mikroskop düzeyde incelemeler yapıldı. Grup VIII hayvanlarının histolojik kesitlerinde barsak epitel hücrelerinin yıkıma uğradığı, hücreler arasındaki bağlantıların koparak geniş boşluklar meydana geldiği saptandı. Hücre sınırlarının ve villusların yok

olmaya başladığı, klorogen doku bütünlüğünün de buna paralel olarak önemli derecede bozulduğu belirlendi (Şekil 4.10).

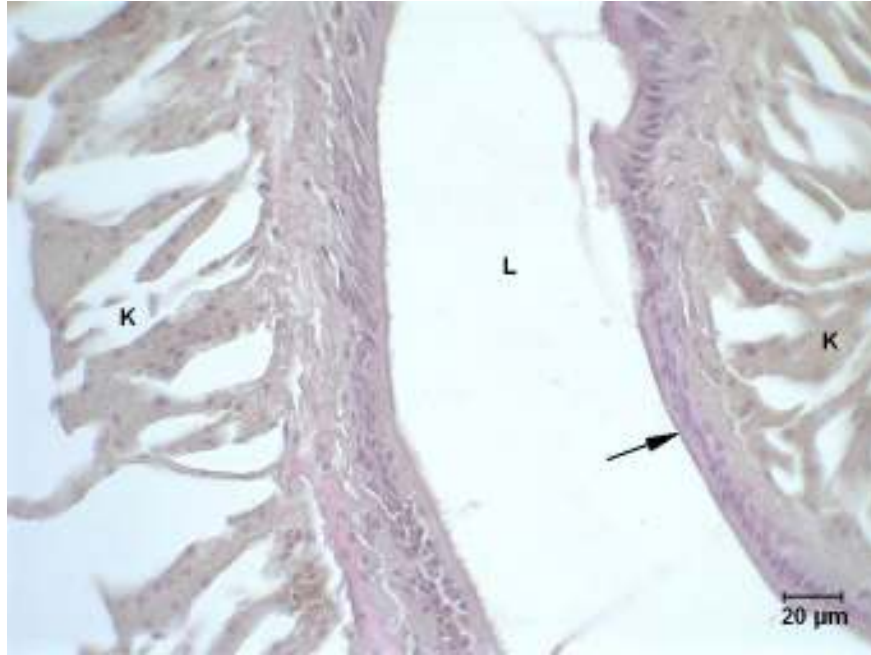


Şekil 4.10. Grup VIII hayvanlarına ait kesitte hücreler arası kopmalardan kaynaklanan geniş boşlukların yer aldığı barsak epiteli (↗) ile bütünlüğünü yitirmiş klorogen dokunun (K) görünümü. (L: Barsak lümeni).

Grup IX hayvanlarının barsak epiteli bütünlüğündeki bozulmaların, hücreler arasındaki kopmaların ya da hücre ölümlerinin neden olduğunu düşündüğümüz hücreler arasında meydana gelmiş olan geniş boşlukların ve klorogen doku hasarlanmalarının, Grup VIII’ de tespit edilen benzer bulgulardan daha ileri seviyede olduğu görüldü (Şekil 4.11). Grup X’ da ise hem Grup VIII hem de Grup IX’ da tespit edilen bulgulara ek olarak epitel hücrelerinin büyük bir çoğunluğunun atrofiye olduğu tespit edildi (Şekil 4.12).



Şekil 4.11. Grup IX hayvanlarına ait kesitte hücreler arası geniş boşlukların yer aldığı barsak epiteli (↗) ile klorogen dokuda (K) hücre kayıpları ve parçalanmalar. (L: Barsak lümeni).

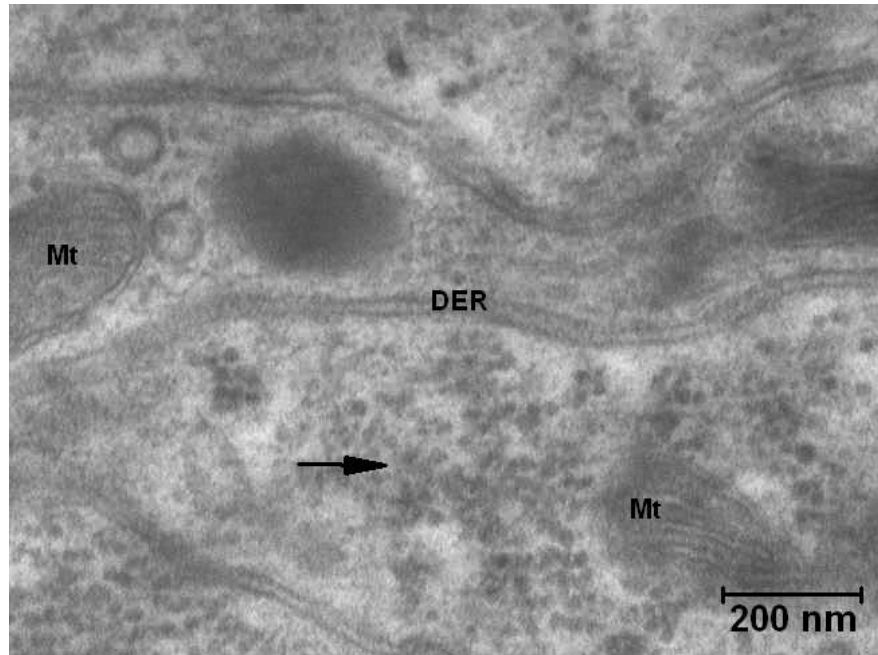


Şekil 4.12. Grup X hayvanlarının atrofiye olmuş barsak epiteli (↗) ile klorogen doku (K) harabiyetinin görünümü. (L: Barsak lümeni).

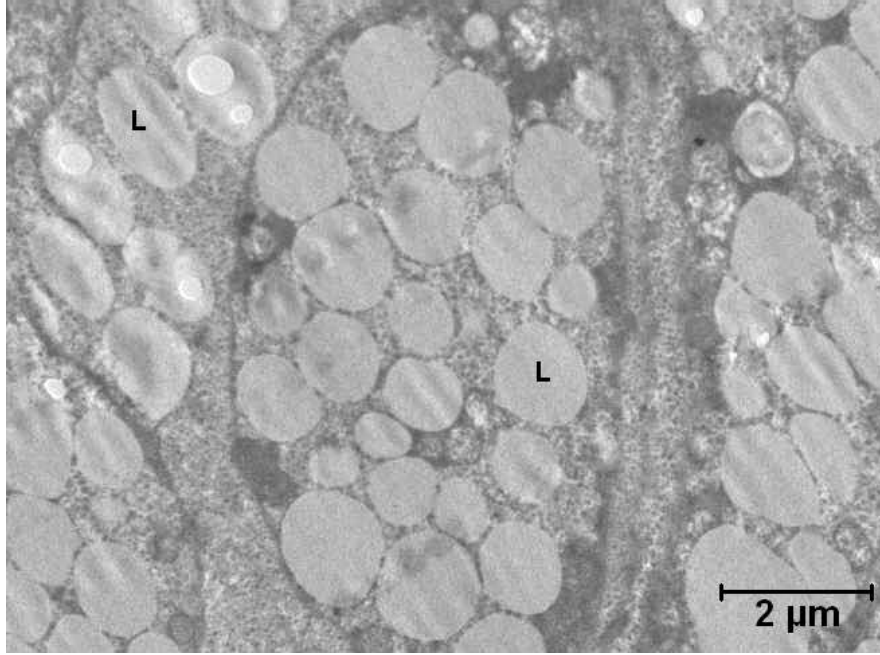
4.2. TEM Değerlendirmeleri

Deneyimizde toprak solucanlarına uygulanmış olan kimyasal bileşiklerin hücre organelleri üzerine olası etkileri TEM incelemeleri ile değerlendirildi.

Grup I hayvanlarının klorogen doku hücrelerinde mitokondrilerin iç ve dış zar yapılarıyla DER görünümünün normal olduğu, ayrıca sitoplazmalarında depolanmış glikojen partiküllerinin yoğun olduğu belirlendi (Şekil 4.13). Klorogen dokuyu oluşturan klorositlerin sitoplazmalarında lipit damlacıklarının da yoğun olduğu tespit edildi (Şekil 4.14).



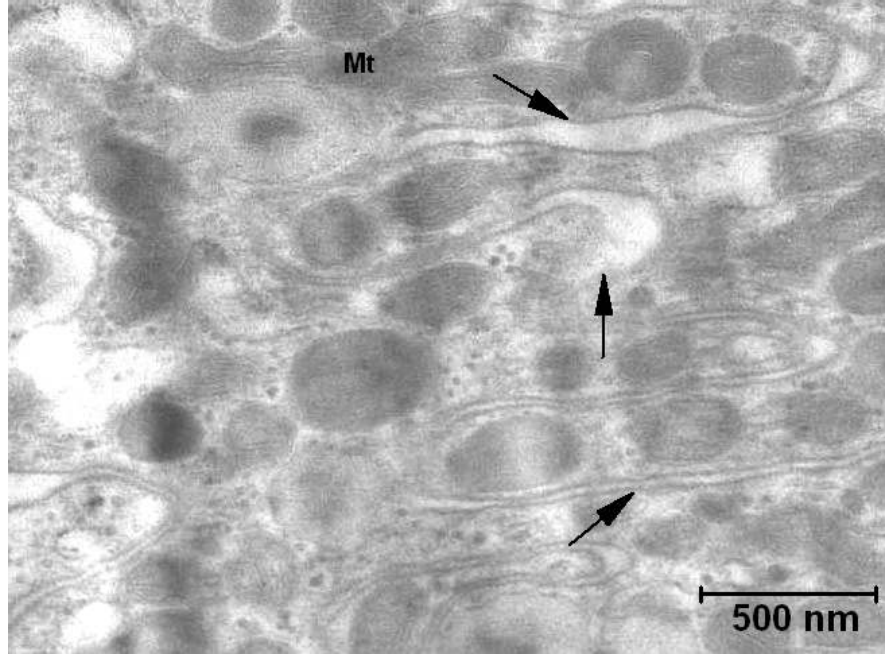
Şekil 4.13. Grup I hayvanlarının yoğun glikojen partikülü (↗) içeren klorogen doku hücrelerinde mitokondrilerin (Mt) iç ve dış zar yapılarıyla DER görünümü.



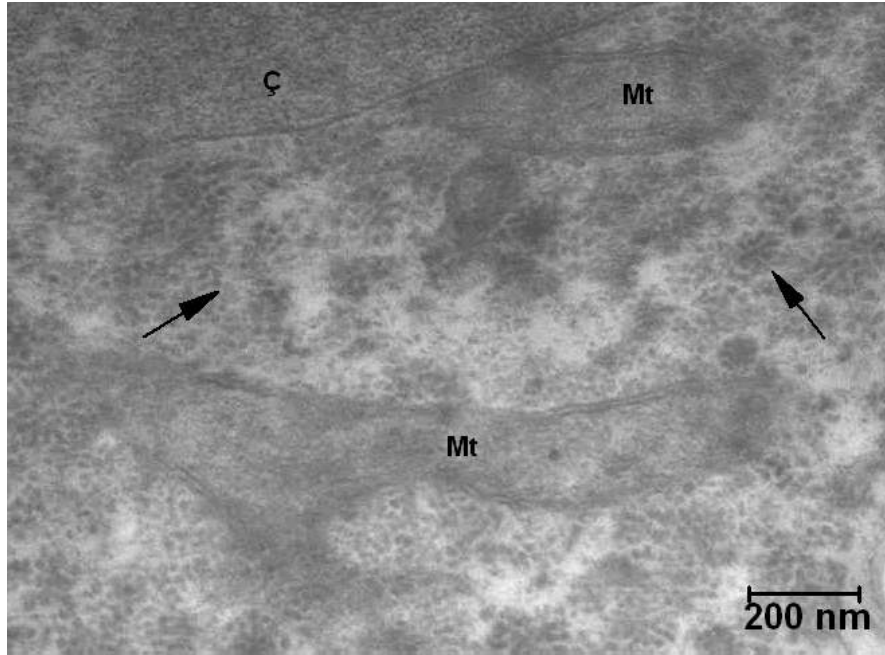
Şekil 4.14. Grup I hayvanlarının klorosit sitoplazmalarının büyük bölümünü kaplamış olan yoğun lipit damlacıkları (L).

Kadmiyum nitrat tetra hidrat'ın en düşük dozunun uygulanmış olduğu Grup II toprak solucanlarının barsak epitel hücreleri ve klorositlerindeki mitokondrilerde iç ve dış zar bütünlüğü normal olmasına karşın, mitokondrilerden bazılarının morfolojik olarak uzama şeklinde değiştikleri belirlendi. DER lümenlerinin bazı bölgelerinde genişlemeler olduğu saptandı (Şekil 4.15). Klorositlerde birikim gösteren lipit ve glikojen miktarlarında Grup I' e göre azalma görüldü.

Grup III' e ait hayvanların TEM incelemelerinde mitokondri dış zar bütünlüğü olmasına karşılık morfolojik olarak şişme ve kristalarda azalma olduğu gözlemlendi (Şekil 4.16). DER lümeninde gözlenen genişlemeler ile lipit damlacıkları ve glikojen miktarının Grup II ile benzer olduğu saptandı (Şekil 4.15).



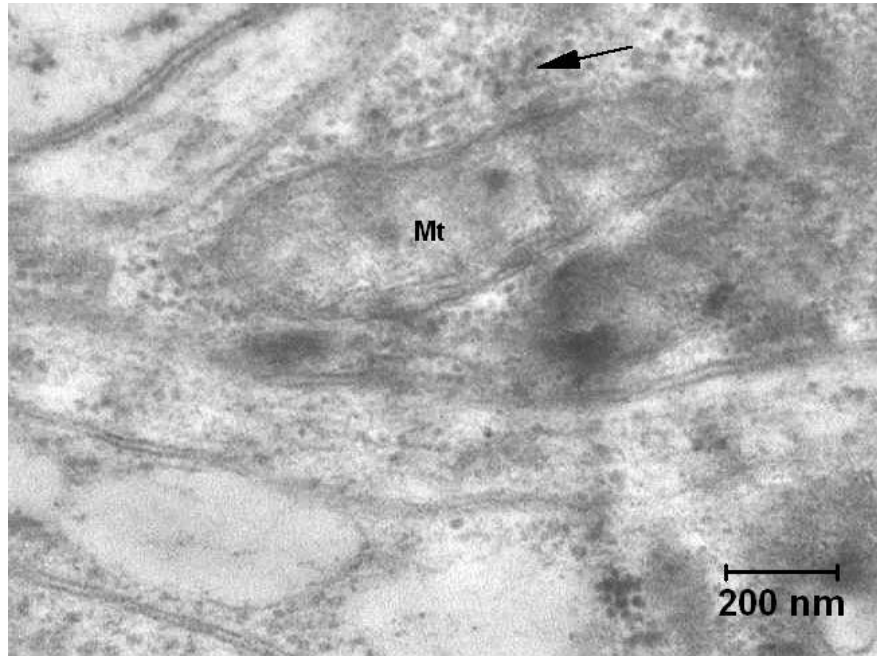
Şekil 4.15. Grup II hayvanlarının morfolojik olarak uzama şeklinde değişmiş mitokondri (**Mt**) ve bazı lümen bölgelerinde genişlemeler gösteren DER (\nearrow) yapısı.



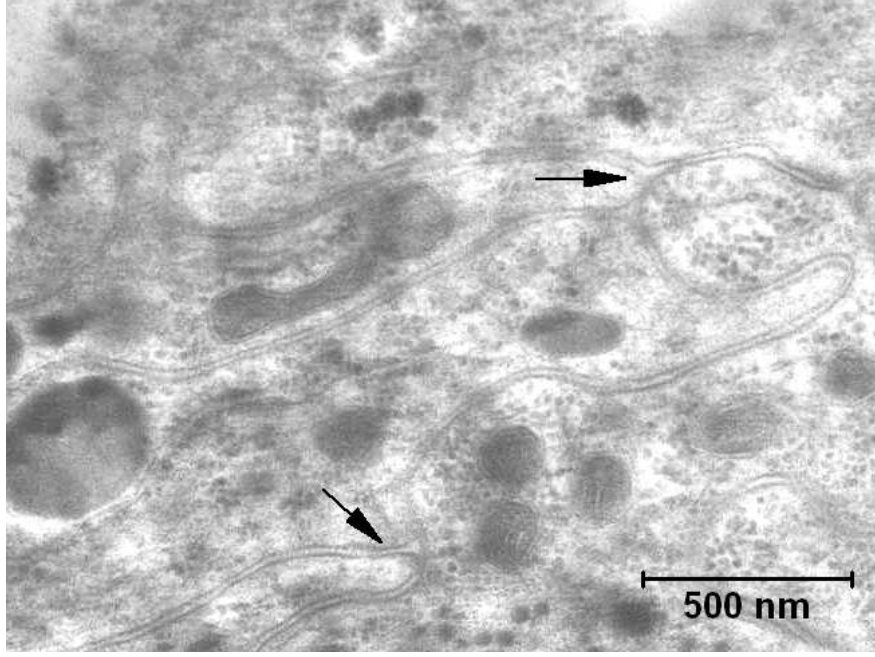
Şekil 4.16. Grup III' e ait hayvanların TEM görüntüsünde şişmiş ve kristalleri azalmış mitokondriler (**Mt**) ile glukojen partikülleri (\nearrow). (**Ç**: Çekirdek).

Grup IV' e ait toprak solucanlarının TEM incelemelerinde Grup II ve III' e göre mitokondrilerdeki yapısal hasarın daha çok olduğu tespit edildi. Mitokondrilerin uzadığı ve bazı bölgelerdeki kristalarda erime belirlendi (Şekil 4.17). DER' in ise ağsı görünüm aldığı saptandı (Şekil 4.18). Klorositlerdeki lipit damlacıkları ile glukojen miktarının Grup II ve III' e uygulanan dozlara göre azaldığı saptandı (Bkz. Şekil 4.16; Şekil 4.17).

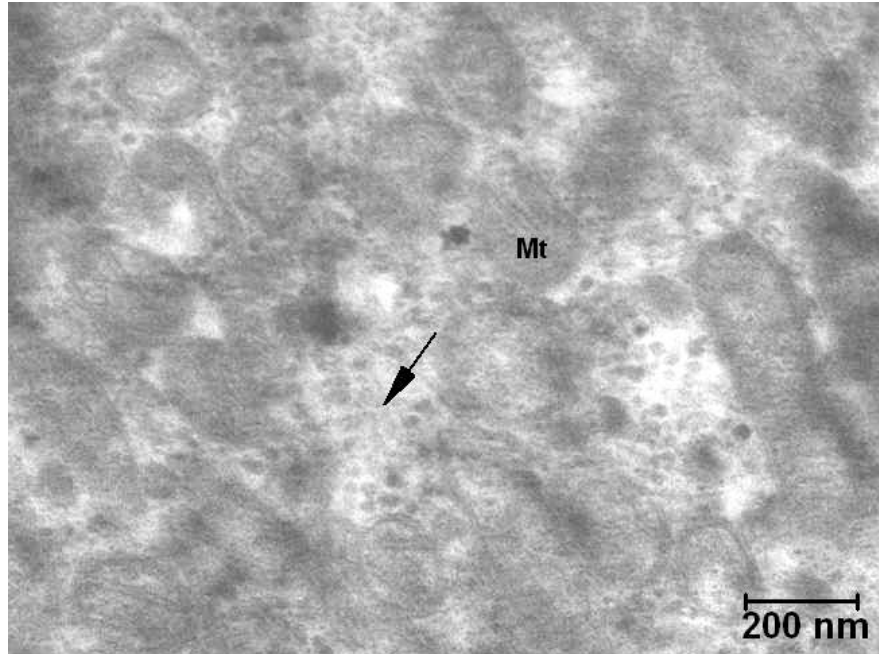
Grup V hayvanlarının klorogen doku hücrelerindeki mitokondri yapılarının genel olarak normal morfolojiye uygun olduğu, dış zar bütünlüğünün korunmasına karşın bazı mitokondrilerde krista yapılarında bölgesel kayıpların olduğu gözlemlendi (Şekil 4.19). Bu gruba ait hayvanların DER yapılarında ise morfolojik anormalliklere rastlanmadı. Lipit damlacıklarının miktarı Grup I' de tespit edilen miktarla aynı, glukojen partikülü miktarının ise az olduğu belirlendi.



Şekil 4.17. Grup IV' e ait toprak solucanlarının klorositlerinde morfolojik olarak uzamış ve bazı bölgelerinde kristalarını kaybetmiş mitokondri (Mt) ile glukojen partikülleri (↗).

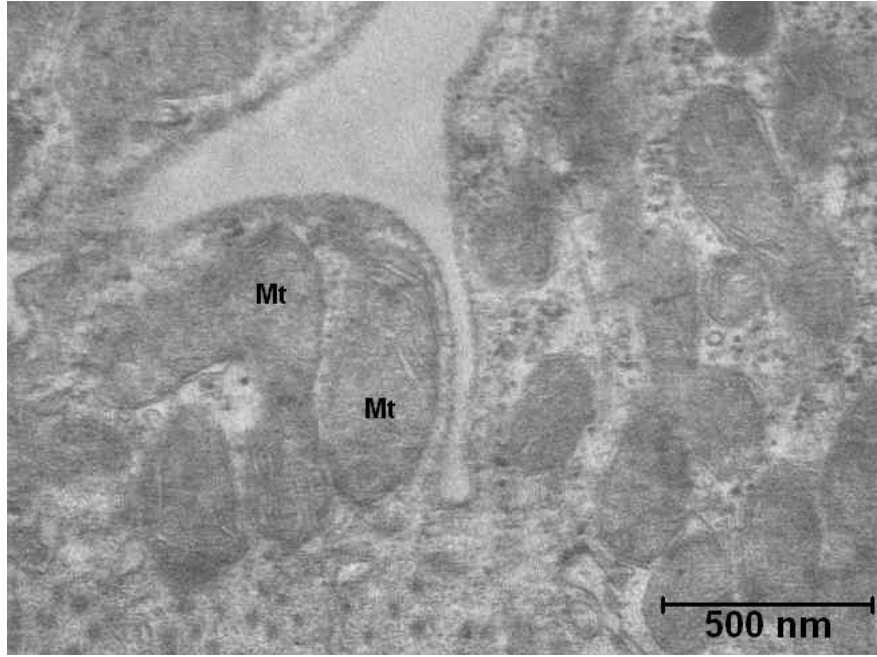


Şekil 4.18. Grup IV' ün klorositlerinde rastlanan ağısı görünümde DER (↗).

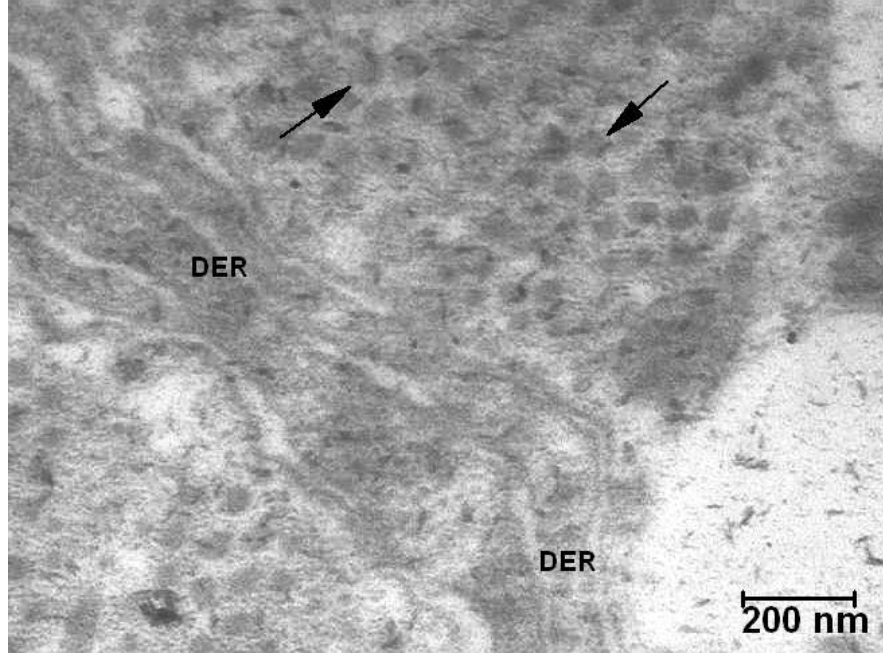


Şekil 4.19. Grup V' e ait toprak solucanlarının klorositlerinde mitokondri (Mt) ve glukojen partikülleri (↗).

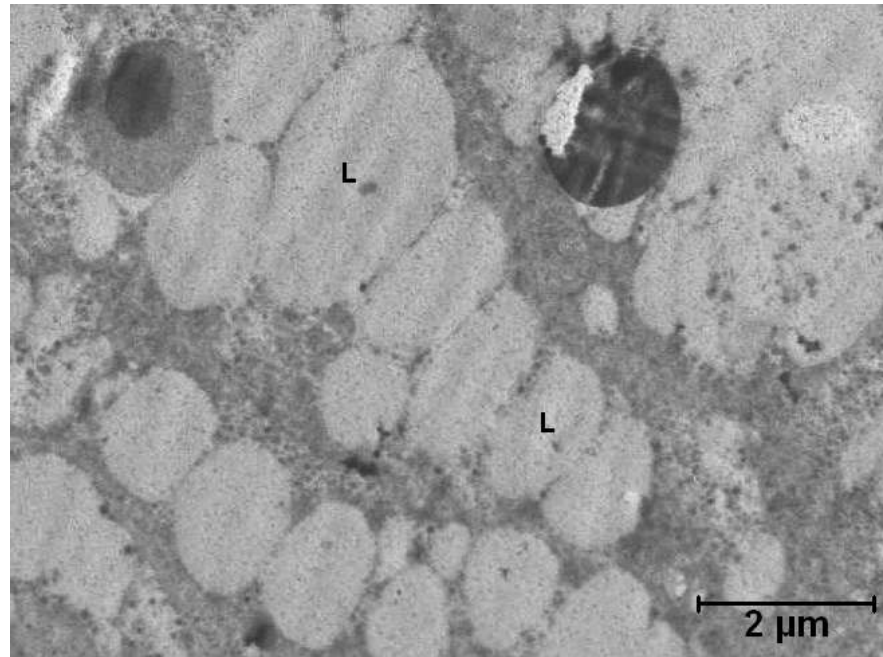
Elektron mikroskop incelemelerinde Grup VI ve Grup VII' ye ait hücrelerin mitokondrilerinde gözlenen uzama ve şişme şeklindeki yapısal bozulmaların Grup III ile benzerlik gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.20, Bkz. Şekil 4.16). Ancak, krista yapısının genel olarak korunduğu saptandı. DER lümeninde görülen genişlemeler hem Grup VI hem de Grup VII' de, kadmiyum nitrat tetra hidrat uygulanan gruplarda gözlenenden daha az oranda bulundu. Klorositlerin içerdiği glukojen miktarlarının ise Grup IV ile benzer olduğu ancak, lipid damlacığı miktarlarının oldukça fazla olduğu görüldü (Şekil 4.21, Şekil 4.22).



Şekil 4.20. Grup VI' ya ait hayvanların TEM görüntüsünde şişmiş ancak kristaları hasar görmemiş mitokondriler (**Mt**).



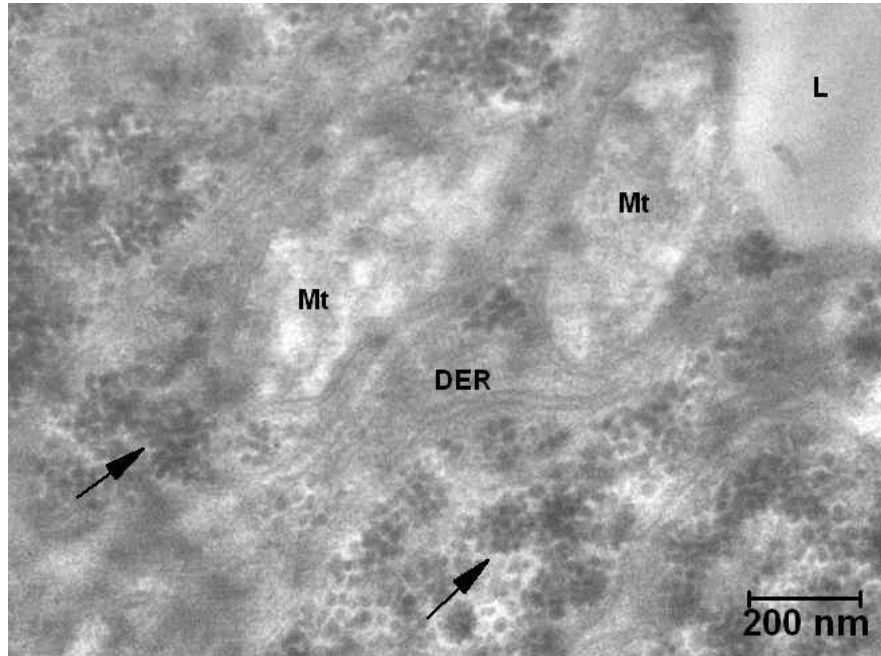
Şekil 4.21. Grup VII hayvanlarının klorositlerindeki DER ve glukojen partikülleri (↗).



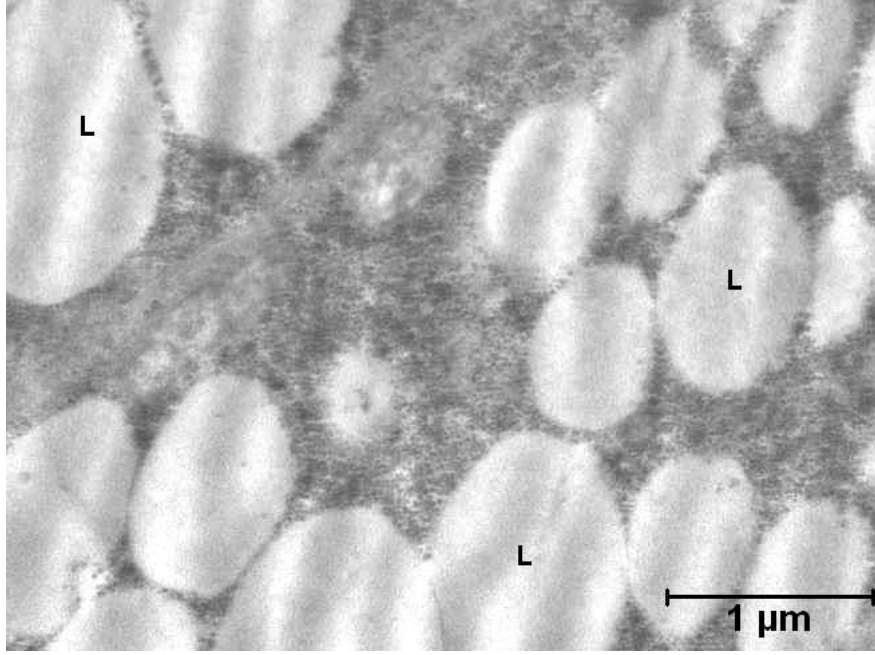
Şekil 4.22. Grup VII hayvanlarının klorosit sitoplazmasında yoğun olduğu görülen lipit damlacıkları (L).

Deneysel süreçte Grup VIII, IX ve X' un mitokondrilerinde meydana gelen hasarın benzer ve diğer tüm gruplarda görülen hasarlardan daha fazla olduğu tespit edildi. Mitokondrilerde krista yapılarının tamamen yok olduğu fakat çift zar yapısının ise korunduğu belirlendi (Şekil 4.23).

Grup VIII' in hücrelerinde şişme şeklinde görülen DER hasarı, Grup IX ile benzer, kadmiyum nitrat tetra hidratin tüm dozlarından (Grup II, III, IV) ve Grup X' dan az olarak saptandı. Grup VIII ve IX' da belirlenen lipid damlacığı miktarları ise kadmiyum nitrat tetra hidrat ve borik asidin tüm dozlarından fazla ancak Grup I ile aynıdır (Bkz. Şekil 4.14; Şekil 4.24) Grup X' da belirlenen lipid damlacıkları miktarı Grup VIII ve IX' da belirlenen miktardan az tespit edildi. Yapılan incelemelerde hücrelerde depolanmış glukojen miktarlarının Grup VIII, IX ve X' da sırasıyla azalan şekilde olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.23. Grup VIII' e ait klorositte krista yapılarını tamamen kaybetmiş mitokondriler (Mt). (↗ : Glukojen partikülleri, L: Lipid damlacığı).

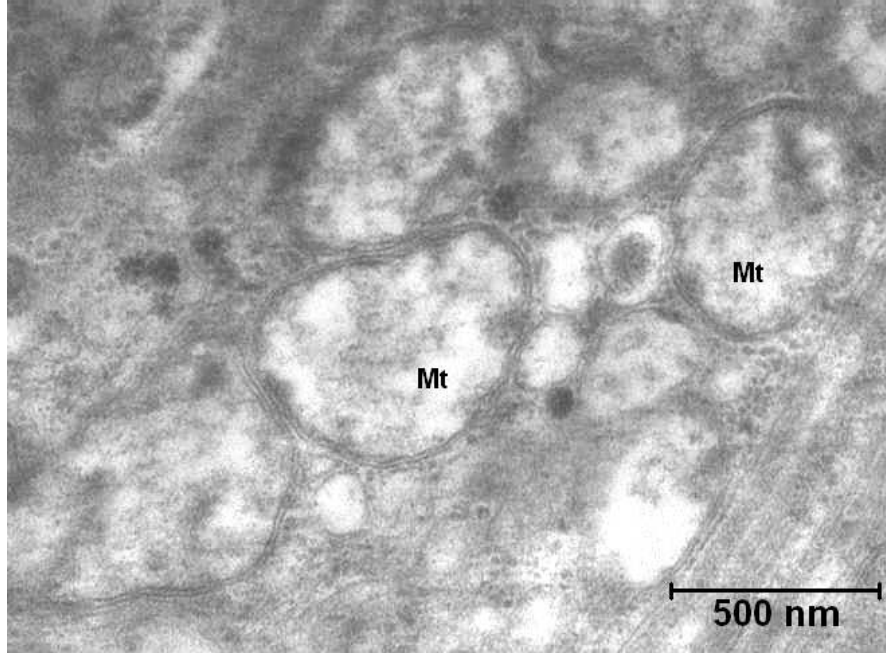


Şekil 4.24. Grup VIII hayvanlarının klorosit sitoplazmasındaki lipit damlacıkları (L).

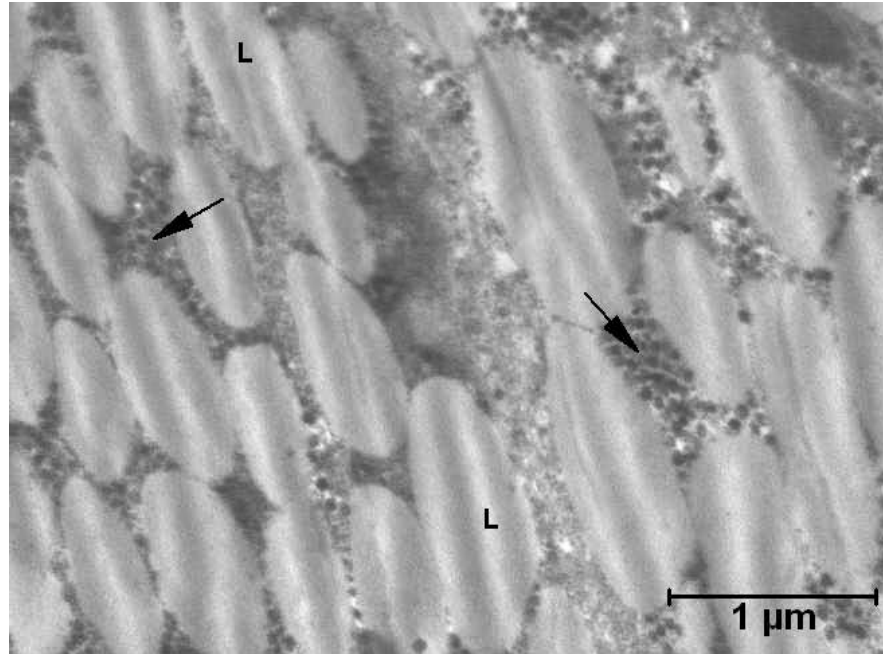
Grup IX' un mitokondrilerinde krista yapısının tamamen yok olması şeklindeki hasarlar Grup VIII' in hasarları ile benzerlik göstermekte, DER lümenlerinde görülen şişme şeklindeki hasarlar da Grup VI, VII ve VIII' de tespit edilen hasarlar ile benzerlik göstermektedir (Şekil 4.25). Grup IX hayvanlarına ait hücrelerde bulunan lipid damlacığı miktarı Grup I ile VIII' e benzer, diğer gruplardan daha fazla olduğu ve glukojen miktarının ise sadece Grup I ile benzerlik gösterdiği saptandı (Şekil 4.26).

Grup X' daki elektron mikroskop incelemelerinde, mitokondrilerde görülen hasarın Grup VIII ve IX' a benzer şekilde kristalarını kaybettiği görüldü. DER' in almış olduğu ağsı görünümün de Grup IV ile benzerliği dikkat çekici bulundu (Bkz. Şekil 4.18). Grup V, VI ve VII ile miktarları aynı olan lipit damlacıkları miktarının Grup I' den az olduğu belirlendi. Benzer şekilde Grup X hücrelerindeki glukojen miktarlarının da Grup I' den az olduğu tespit edildi.

Bor oksit uygulanan tüm gruplarda belirlenen lipit damlacığı ile glukojen partikülü miktarları, mitokondri ve DER hasarlarının genel olarak diğer tüm deney gruplarından fazla olduğu bulundu.



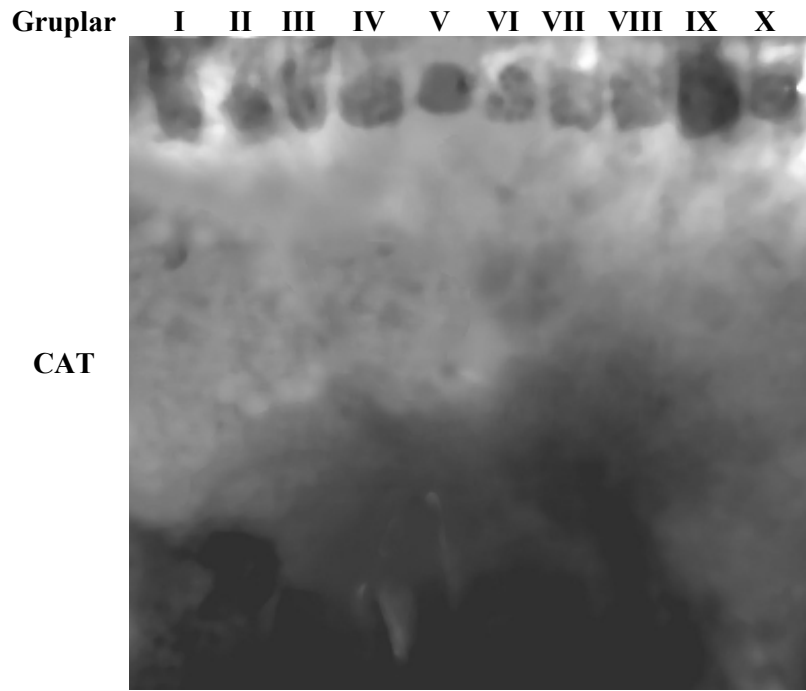
Şekil 4.25. Grup IX' a ait klorosit hücresinde krista yapılarını tamamen kaybetmiş mitokondriler (Mt).



Şekil 4.26. Grup IX hayvanlarına ait klorositte glukojen partikülleri (↗) ve lipit damlacıkları (L).

4.3. Enzim Aktivitesi Değerlendirmeleri

Yapılan doğal jel elektroforez analizleri sonucunda kadmiyum nitrat tetra hidrat, borik asit ve bor oksit' in uygulandığı toprak solucanı örneklerinin doku CAT enzimlerinin tüm gruplarda 1' er aktivite bandı oluşturduğu görüldü (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. Deney gruplarına ait toprak solucanı örneklerinden doğal poliakrilamid jel elektroforezi ile saflaştırılmış CAT enzim aktivitesi bantlarının görünümü.

Deney gruplarının doku örneklerindeki CAT enzim aktiviteleri, poliakrilamid jel üzerinde oluşturduğu bantların alan hesapları yapılarak belirlendi (Çizelge 4.1). Enzim aktiviteleri sonucu oluşan bantların alan hesaplamaları yapıldığında kadmiyum nitrat tetra hidrat uygulanmış Grup II, III ve IV' de doz bağımlı olarak bant alanlarının Grup I' e göre arttığı tespit edildi. Grup II' nin bant alanı Grup I' e yakın olarak bulunurken, Grup IV' ün bant alanının ise en geniş olduğu görüldü. Bu bulgular ışığında Grup II, III

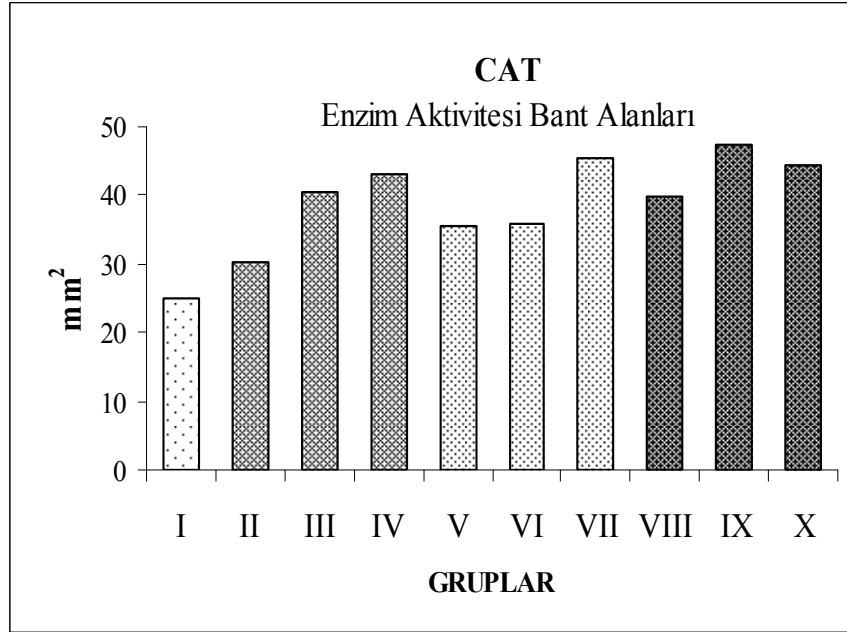
ve IV' de tespit edilen CAT enzim aktivitelerinin negatif kontrol grubu olan Grup I' e göre doza bağımlı olarak sırasıyla artış gösterdiği saptandı (Şekil 4.28).

Borik asit uygulaması yapılan deney hayvanlarının CAT enzim aktivitelerinde de Şekil 4.28' de belirtildiği gibi doza bağlı bir artış görülmüş olup Grup V ile VI' nın birbirine çok yakın ve Grup III ile benzer bant alanı sergilediği ve bant alanlarının Grup I' den daha geniş olduğu, en geniş bant alanının ise Grup VII' ye ait ve Grup IV ile benzer olduğu belirlendi. Buna göre, CAT enzim aktivitesi değerleri Grup V ve VI' da aynı iken Grup VII' de bu gruplardan daha fazla bulundu.

Bor oksit uygulanmış Grup VIII hayvanlarının CAT enzim aktivitesi sonucu ortaya çıkan bant alanının Şekil 4.28' de görüldüğü gibi Grup I' den oldukça yüksek ve Grup III ile benzer olduğu, bant alan değerleri yakın olan Grup IX ve X' un ise Grup IV ile benzer olduğu tespit edildi. Alan hesaplamalarına göre, Grup IX ve X' da CAT enzim aktivitesinin benzer ve oldukça yüksek olduğu ancak, Grup VIII' de aktivitenin bu gruplardan biraz düşük olduğu belirlendi.

Çizelge 4.1. Deney gruplarına ait toprak solucanı örneklerinden izole edilen CAT ve GPx enzimlerinin poliakrilamid jel üzerindeki aktivite bant alanı değerleri.

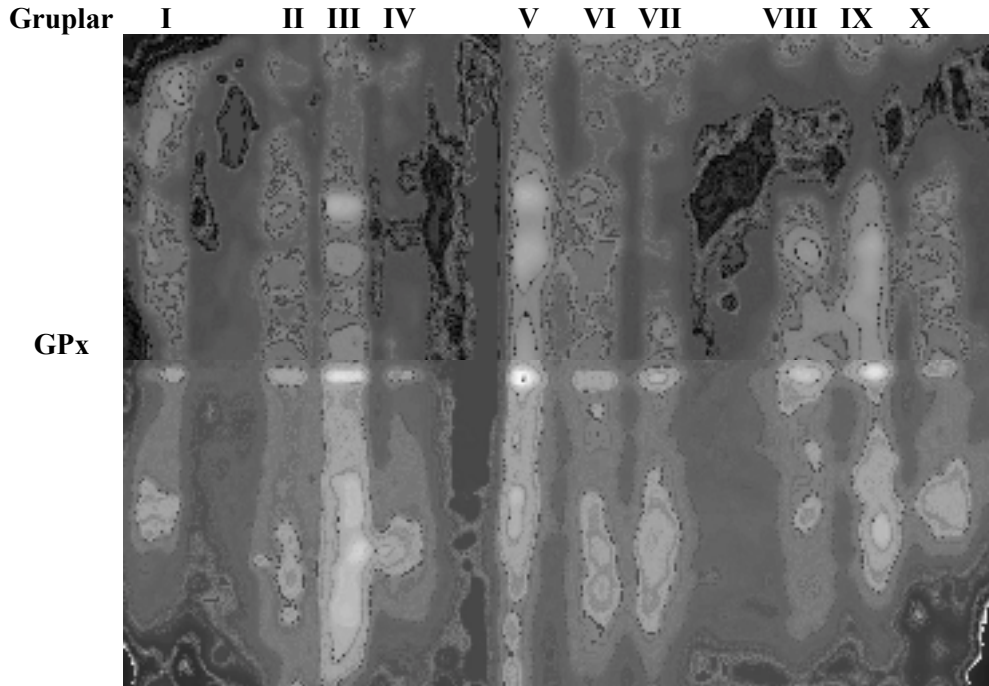
Enzim Aktivite Bant Alanları (mm ²)		CAT	GPx1	GPx2	GPx3	GPx4	GPx5
Gruplar							
Negatif Kontrol	I	24,96	11,63	11,63	8,87	10,47	10,07
Pozitif Kontrol Cd(NO ₃) ₂ .4H ₂ O (kadmium nitrat tetra hidrat)	II	30,36	18,27	18,20	13,41	7,72	16,55
	III	40,36	19,86	18,12	14,90	10,56	18,93
	IV	42,94	18,00	22,86	13,11	12,00	14,47
H ₃ BO ₃ (borik asit)	V	35,63	18,77	19,58	12,38	10,81	13,90
	VI	35,73	19,96	22,24	12,74	17,21	13,41
	VII	45,32	21,45	18,30	12,89	20,36	20,11
B ₂ O ₃ (bor oksit)	VIII	39,65	25,91	21,45	25,32	16,11	23,50
	IX	47,51	20,47	15,73	15,51	10,72	18,12
	X	44,54	18,07	20,12	19,23	12,16	13,83



Şekil 4.28. Deney gruplarına ait toprak solucanı örneklerinden doğal poliakrilamid jel elektroforezi ile saflaştırılmış CAT enzim aktivitesi bant alanı ortalama değerleri.

Toprak solucanı dokularından doğal jel elektroforezi ile izole edilen GPx enziminin Şekil 4.29’ da görüldüğü üzere GPx1, GPx2, GPx3, GPx4 ve GPx5 olarak isimlendirilen 5 izoformuna ait aktivite bantları tespit edildi. Elde edilen 5 izoformun her bir grup için ortalama bant alanı değerleri hesaplanarak deney grupları arasında karşılaştırmalar yapıldı (Bkz. Çizelge 4.1).

GPx enzim aktiviteleri sonucu oluşan bant alanları değerlendirildiğinde Grup II, III ve IV’ de bant alanlarının birbirlerine benzer ve Grup I’ e göre oldukça artmış olduğu tespit edildi (Şekil 4.30). Bu bulgu kadmiyum nitrat tetra hidrat bileşiğinin dokularda GPx enzim aktivitesini artırdığını gösterir niteliktedir.



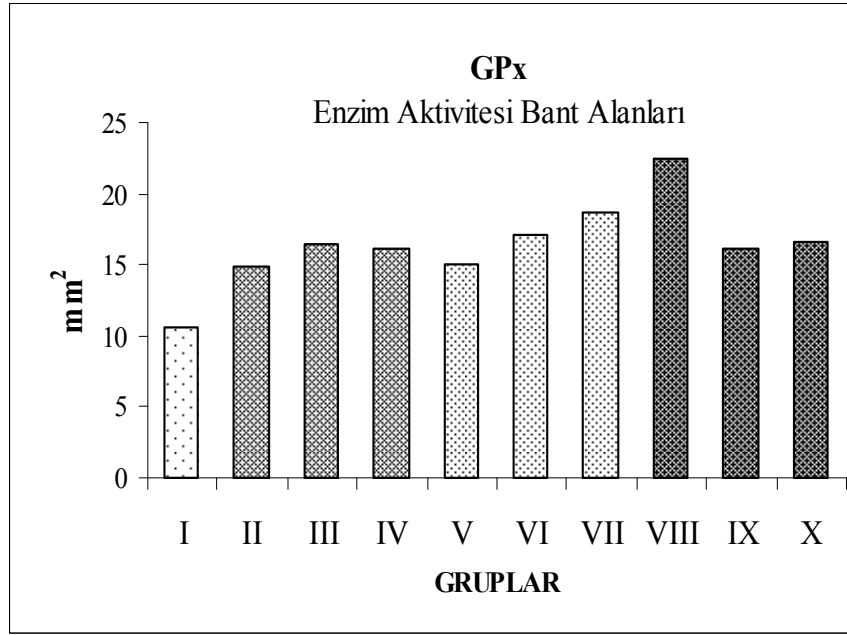
Şekil 4.29. Deney gruplarına ait toprak solucanı örneklerinden doğal poliakrilamid jel elektroforezi ile saflaştırılmış GPx izoenzimlerinin aktivite bant alanlarının görünümü.

Borik asit uygulaması yapılan deney hayvanlarının GPx enzim aktivitelerinde doza bağlı bir artış görülmüş olup Grup V' in Grup II ile Grup VI' nın ise Grup III ile birbirine çok yakın aktivite değerlerine sahip olduğu saptandı. Grup VII' nin aktivite değerini gösteren bant alanının kadmiyum bileşiğinin ve diğer borik asit dozlarının uygulandıkları gruplardan yüksek değerde bulundu (Şekil 4.30).

Bor oksit uygulanmış Grup VIII hayvanlarının GPx enzim aktivitesi sonucu Şekil 4.30' da görüldüğü gibi şaşırtıcı şekilde diğer tüm gruplardan yüksek bulundu. Birbirine benzer aktivite bant alanlarına sahip Grup IX ve X' un kadmiyum nitrat tetra hidrat gruplarına yakın değerlerde oluşu dikkate değer bulundu.

Deneysel çalışmamızda CAT ve GPx enzim aktiviteleri üzerine de olası etkilerini araştırdığımız kimyasal bileşiklerin Bkz. Şekil 4.28 ve Şekil 4.30' da görüldüğü

biçimde genel olarak negatif kontrol grubuna göre endojen kaynaklı her iki antioksidan enzimin de aktivitelerini artırdıkları göze çarpmaktadır.



Şekil 4.30. Deney gruplarına ait toprak solucanı örneklerinden doğal poliakrilamid jel elektroforezi ile saflaştırılmış GPx izoenzimlerinin aktivite bant alanlarının ortalama değerleri.

5. TARTIŞMA

Bor bileşikleri yeryüzünde okyanuslardan, farklı toprak türlerine kadar geniş bir yayılım alanına sahiptir. Türkiye ise dünya bor depoları açısından zengin ülkeler arasında ilk sırayı almaktadır. Bu sayede bor bileşikleri hammadde ve ürün olarak geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Bor bileşiklerinin bu kadar geniş kullanım alanına sahip olması bu bileşiklerin çevre, insan ve diğer canlılar üzerine etkilerinin araştırılmasına neden olmuştur. Araştırmalar, bor bileşiklerinin özellikle insan sağlığı üzerine etkileri, farklı çevrelerdeki birikim oranları ve bitki metabolizmasındaki önemi üzerine yoğunlaşmıştır. Borun diğer canlılar üzerine etkileri de çalışılmış olmasına rağmen bu araştırmalardan elde edilen deneysel bulgular henüz sınırlıdır (Li, et al., 2008). Borun canlılar üzerine etkilerinin ağır metal bileşiklerinin etkileriyle muhtemel benzerliğinin ne seviyede olduğunu belirlemeye yönelik olan çalışmamızda doz bağımlı uygulamalar yapılmıştır. Diğer taraftan Çöl and Çöl (2003)' ün bildirdiği gibi, borun doğada başka elementler ile bileşik halinde bulunması, çalışmamızda bor içeren farklı bileşiklerin in vivo koşullarda biyolojik sistemler üzerine etkilerini de araştırmamızı gerektirmiştir.

7 günlük akut toksisite süresince toksik etkileri bilinen ve ağır metal bileşiği olan kadmiyum nitrat tetra hidrat (1000, 2000 ve 3000 ppm sırasıyla Grup II, III, IV) ile borik asit (5000, 6000, 7000 ppm sırasıyla Grup V, VI, VII) ve bor oksit (3000, 4000, 5000 ppm sırasıyla Grup VIII, IX, X) bileşiklerinin doza bağlı olası histolojik, sitolojik ve enzim aktivitesi üzerine etkilerinin negatif kontrol grubuyla (Grup I) karşılaştırmalı olarak araştırıldığı çalışmamızda *Eiseni fetida* türü toprak solucanları kullanılmıştır. Toprak yüzeyine yakın kısımlarda yüzey organik maddeleriyle beslenen *Eiseni fetida*, epijeik türler grubundan toprak solucanları arasında yer almaktadır. OECD (1984) ve Abdel Salam Aly and Schröder (2008) tarafından organik madde bakımından zengin topraklarda geniş bir popülasyona sahip olduğu belirtilen *Eiseni fetida* türünün ayrıca, ağır metaller için biyolojik bir belirteç/ayraç olduğu rapor edilmiştir. Bunun yanında Lukkari, et al. (2004) ve Gao, et al. (2007) da toprak solucanlarının metaller ya da diğer kimyasal maddelere karşı fizyolojik ve biyokimyasal tepkiler verebilen biyolojik bir belirteç olduğunu bildirmiştir.

Topraktaki ağır metal kirliliğinin toprak solucanlarında öncelikle deri ve barsak üzerinde histopatolojik etkiye neden olduğu bildirilmiştir (Vijver, et al., 2003; Lukkari, et al., 2004). Çalışmamızda, kadmiyum bileşiğinin üç farklı dozunun uygulandığı pozitif kontrol gruplarına ait toprak solucanı örneklerinin histolojik kesitlerinde, barsak epiteli ve klorogen doku hasarlarının doza bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Amaral, et al., (2006) volkanik topraklarda yaşayan toprak solucanlarıyla yaptıkları çalışmalarında, topraktaki çinko ve kadmiyum birikimiyle ilişkilendirdikleri barsak epiteli ile klorogen doku hasarı ve kayıpları çalışmamıza paralellik göstermektedir. Muthukaruppan and Gunesekearan (2010), bir herbisit olan butaklorun doz artışına bağlı olarak toprak solucanlarının barsak villuslarında erime, klorogen dokularında enkaz oluşumu ve doku içerisinde boşlukların meydana geldiğini gözlemlemiştir. Çalışmamızda da Grup IV toprak solucanı örneklerinin histolojik kesitlerinde Grup II ve III' e göre benzer hasarların artması doza bağımlılığı gösterir nitelikte bulunmuştur. Ancak, yapılan araştırmalardan bazılarında çalışmamızda da olduğu gibi test maddelerinin uygulama süreleri sabit tutulmuş ve farklı doz denemeleri yapılmıştır. Diğer taraftan toprak solucanlarının barsaklarında (Morowati, 2000; Sharma and Satyanarayan, 2010) ve kas tabakasında (Rao, et al., 2003; Reddy and Rao, 2008) hasar oluşumunun zamana bağlı olarak da meydana geldiği belirtilmiştir. Morowati (2000), toprak solucanlarında bir herbisit olan glifosat uygulamasının birinci ve ikinci haftalarında barsak epitel hücre membranlarının bazı bölgelerinde kayıplar, hücrelerde çekirdek erimesi, hücre ölümü ve sitoplazmik vakuolizasyon bulguları tespit etmiş fakat, uygulamaların devam ettiği üçüncü ve dördüncü haftalarda söz konusu hasarların yenilenme yoluyla azaldığını gözlemlemiştir. Araştırmacının bildirdiği bulgular, çalışmamızın histopatolojik bulguları ile hem bor bileşiklerinin hem de kadmiyum bileşiğinin doz artışına uyumlu olarak paralellik göstermektedir. Akut toksisite tespiti planlanarak yapılmış çalışmamızda, test maddelerimizin uygulanmış dozları latel doza yakın seviyede olup, kronik etkilerinin sözü edilen çalışma ile paralellik göstermesinin sadece uyguladığımız dozların çok daha düşük seviyelerde olmasıyla mümkün olabileceği düşüncesindeyiz. Diğer yandan toprak solucanlarına uygulanan test maddelerinin kimyasal yapısı ve biyolojik makromoleküller ile ilişkisinin de önemli olduğu kanısındayız. Sharma and Satyanarayan (2010), çeşitli ağır metallerin farklı uygulama sürelerinde ve dozlarda toprak solucanları üzerine etkilerini konu alan

arařtırmalarında, çalıřmamızda kullanılan daha dūřuk dozda kadmiyum tuzunun 100 gūn boyunca uygulanması sonucunda barsak epiteli ve villuslarda meydana gelen doku hasarlarını saptamıřlardır. Bildirilen bu patolojik olgular sadece 7 gūn sūren alıřmamızdaki Grup IV, VI, VII ve VIII ile benzerlik gōsterirken, 60 gūnlük ve 80 gūnlük deney sūresinin vermiř olduėu hasar bulguları ise çalıřmamızda yer alan Grup II, III ve V ile benzerlik gōstermektedir.

ōzen ve arkadaşları (2009) tarafından sucul bir indikatōr canlı tūrū olan *Limnodrilus hoffmeisteri* üzerinde borik asit ve sodyum borat bileřikleri ile bazı aėır metal tuzlarının çalıřmamıza benzer řekilde sabit dozda ve farklı uygulama sūrelerinde etkilerini arařtırmıřlardır. Arařtırmanın sonucunda canlının barsak epitel hūcreleri ve salgı bezi hūcrelerinde zamana baėlı olarak dejenerasyonun arttıėını, hūcre ۆlūmlerinin meydana gelerek ۆlūmcūl olan geri dōnūřsūz hasarlanmanın olduėunu vurgulamıřlardır. Arařtırmacılar bu bulgularının yanında, uyguladıkları aėır metal bileřiklerinin bu etkilerini hem doz hem de uygulama sūresi olarak bor bileřiklerinden çok daha dūřuk dozda ve daha kısa sūrede tespit ettiklerini bildirmiřlerdir. Çalıřmamızın borik asit ile bor oksit uygulanmıř gruplarında ve kadmiyum bileřiėinin uygulandıėı pozitif kontrol gruplarının hayvanlarında tespit edilenler ile benzer olan histopatolojik bulgular, anlatılan çalıřmaya benzerlik gōstermektedir. Deneylerimizde aynı sūrelerde uygulanmıř olmasına raėmen kadmiyum bileřiėinin neden olduėu doku hasarları ve hasarın derecesi, bor bileřiklerinin daha yūksək dozlarında tespit edilebilmiřtir. Histolojik kesitlerde ıřık mikroskop dūzeyinde yapılan incelemelerde Grup V' de gōzlenen patolojik bulguların Grup II' de gōzlenen patolojik bulgular ile paralel olduėu ve doku būtnlūėinde kısmen bozulma, barsak epitelinde kısmi parçalanma ve ayrılmalar, villuslarda bazı bōlgelerde erimeler meydana geldiėi belirlendi. Grup VI ve VII' de ise bu hasarların derecesinde aynı sıralama ile artıř kaydedildi. Buna karřın 3000 ppm kadmiyum bileřiėinin neden olduėu doku ve hūcre hasarına, borik asitin en yūksək dozu olan 7000 ppm' de rastlanılmıř olması ve klorojen doku hasarının çok daha az olması nedeniyle histopatolojik açıdan borik asitin toksik etkilerinin oldukça az olduėunu gōstermiřtir. Ancak, bor oksit bileřiėi için benzer ifadeleri kullanmanın yanlıř olabileceėi dūřūncesindeyiz. 3000 ppm kadmiyum bileřiėinin neden olduėu histopatolojik bulguların, aynı deriřimde uygulanmıř olan bor

oksit ile benzer hasar derecelerine sahip oluşu ilginç bulunmuştur. Grup IX ve X' da da tespit edilen hasar görüntüleri Grup VIII' den farksız bulunmuştur. Bu nedenle bulgularımız kapsamında, bileşiminde bor bulunan kimyasal madde ya da bileşiklerin canlı sisteme etkilerinin aynı olamayacağını düşünmek mümkündür.

Canlı organizmalar, yaşam ortamlarında bulunan ağır metal ve bunun gibi toksik özelliğe sahip kimyasal maddelerden korunmak için iki yol kullanırlar. Bunlardan ilki, besin tüketimini azaltarak toksik bileşenlerin vücuda fazla girişini engellemek, ikincisi ise vücuda giren toksik maddelerin detoksifikasyonunu sağlamaktır (Maryański, et al., 2002). Organizmada vücuda alınan bir kimyasal maddenin etkilediği organellerin başında mitokondriler ve detoksifikasyondan sorumlu DER gelmektedir (Gao, et al., 2007). Mitokondriler elektron taşınması, oksidatif fosforilasyon, yağ asitlerinin yıkımı ve amino asit metabolizması gibi temel teşkil eden bütün metabolik süreçlerde yer alır (Reichert and Neupert 2002). Bu yüzden mitokondriler, kimyasal madde zehirlenmelerine karşı en hassas organel kabul edilmekte, yapısında ya da fonksiyonlarında meydana gelebilecek hasarların, hücre için gerekli enerjinin karşılanamamasına ve sonunda hücrenin ölümüne neden olacağından söz edilmektedir (Yongcan, et al., 1998).

Çalışmamızda kadmiyum nitrat tetra hidrat ağır metal bileşiğinin uygulanmış olduğu Grup II ve Grup III' e ait hayvanların TEM incelemelerinde, toprak solucanlarının barsak epitel hücreleri ve klorositlerindeki mitokondrilerde meydana gelmiş olan yapısal bozulmaların, Grup IV' de daha fazla artarak kristalarda kayıpların olduğu tespit edilmiştir. Toprak solucanlarının barsak hücreleri üzerine metal kirliliğinin etkilerini çalışmış olan Yongcan, et al. (1998), bulgularımıza benzer biçimde, mitokondrilerin iç ve dış zarı arasındaki boşluğun arttığını, krista yapılarının bozulduğunu ve kirliliğin artmasıyla mitokondrilerin krista yapılarını tamamen kaybettiğini rapor etmişlerdir. Bir başka çalışmada Hu, et al. (2010), toprak solucanlarında titanyum ve çinko ağır metal bileşiklerinin toksik etkilerini incelemişler ve çalışmamızın mitokondrilerinde görülen anormallikleri rapor etmişlerdir. See, et al. (2010), borik asitin mitokondrinin bazı kısımlarına hasar verdiğini, oluşan hasarın ve

ATP için gerekli metabolitlerin yokluğunun hücre yaşam ve fonksiyonlarında zararlı etkisinin olabileceğini bildirmiştir.

Çalışmamızda tespit edilen mitokondriyal hasarların pozitif kontrol ve borik asit gruplarında doza bağlı olarak arttığı buna karşın, uygulanmış tüm bor oksit dozlarında bu hasarın en üst seviyede olduğu belirlenmiştir. Buna göre, bor oksit gruplarında histolojik bulgularda rastlanılan patolojik olgular gibi mitokondriyal hasarların da aynı dozda kadmiyum uygulanmış grupta rastlanan hasarlar doğrultusunda olduğu görülmüştür.

Toprak solucanlarında albendazol maddesinin iki farklı dozunu test eden Gao, et al. (2007), mitokondrilerin yanında DER' lerde, doza bağlı olarak aşamalı bir dejenerasyon gözlediklerini belirtmişlerdir. Bu araştırmacılar, yüksek dozda DER' lerin ağsı görünümde patolojik bir görünüm yanında DER lümenlerinde genişleme sergilediklerinden söz etmişlerdir. Çalışmamızda da Grup IV' e ait toprak solucanlarının TEM incelemelerinde DER' in ağsı görünümde olması, kadmiyum bileşiğinin toksik özelliğini ortaya koymaktadır. Bunun yanında Grup II ve III hayvanlarının DER lümenlerinin bazı bölgelerinde tespit edilen genişlemelere, her iki bor bileşiğinin de uygulandığı gruplarda rastlanılmamıştır. Gao, et al. (2007) DER lümeninde gözledikleri genişlemenin nedeni olarak ileri seviyede detoksifikasyon olaylarını göstererek bundan kaynaklanan sıra dışı biyokimyasal süreçlere mitokondriyal hasarların da eşlik ettiğini savunmuşlardır.

Toksik maddelerin detoksifikasyonu aşamasında hücrelerin enerji harcaması arttığı için organizmaların enerji metabolizmalarında değişiklikler meydana gelir. Organizmalar enerjilerinin çoğunu büyüme, üreme ve temel metabolik işlemleri için kullanmalarının yanında, kimyasal toksik maddeleri vücutlarından uzaklaştırabilmek için de kullanırlar. Organizmaların enerji depolarının başında ise glukojen, yağ ve protein geldiği vurgulanmıştır (Maryański, et al., 2002; Holmstrup, et al., 2010). Toprak solucanlarında yapılan araştırmalarda özellikle glukojen depoları üzerinde durulmuştur. Glukojenin en çok, temel detoksifikasyon işlemlerinin gerçekleştiği klorogen dokuda bulunduğu bildirilmiştir (Morgan and Turner, 2005; Adamowicz, 2005). Holmstrup et al.(2010), yaptıkları bir çalışmanın sonucuna dayalı olarak, metal

bileşikleri ile bu bileşiklerle kirlenmiş bölgelerden alınan toprak solucanlarının vücutlarındaki glukojen miktarının azalması arasında bir bağlantı olduğunu rapor etmişlerdir.

Yapılmış araştırmalar ile uyumlu olarak çalışmamızda, özellikle klorositlerde birikim gösteren lipit ve glikojen miktarlarında eş zamanlı olarak Grup I' e göre, sırasıyla Grup II, III ve IV hayvanlarında azalma görülmüştür. Bu gruplarda gözlenen DER hasarı göz önünde bulundurulduğunda detoksifikasyon çabasının hızlandığını düşünmek mümkündür. Organizmaların enerji kaynağı olarak öncelikle karbonhidratları ve sonra sırasıyla yağ ve proteinleri kullandığı göz önüne alınacak olursa, kadmiyum bileşiğinin uygulandığı pozitif kontrol gruplarında hem glukojen hem de yağ katabolizmasının mitokondriyal hasara paralel şekilde artışı dikkat çekicidir. Mitokondriyal hasarın bir getirisi olarak enerji üretiminde de aksaklıklar beklenebilir. Fakat, bu durumda hayatta kalma çabası içinde olan hücrelerin enerji eldesi için mitokondrilerden bağımsız biçimde oksijensiz fosforilasyon yolunu kullanmış olabilecekleri düşünülmektedir. Epitel doku ve villus hasarı da dikkate alındığında, Maryański, et al., (2002)' in belirttiği gibi besin tüketiminin azaltılması söz konusu olmuş olabilir. Ancak bunu, çalışmamızda bu dokuların hasarıyla değil, vücuda giren toksik maddelerin detoksifikasyonu ile ilişkilendirmenin daha doğru bir yaklaşım olacağı kanısındayız. Çünkü, epitel doku ve villus hasarıyla ilişkili olarak azalan besin alınımı ve diğer taraftan detoksifikasyon amaçlı artan enerji gereksiniminin hem lipid hem de glukojen depolarının azalmasıyla sonuçlanabileceğini düşünmekteyiz. Pozitif kontrol grubundaki toprak solucanlarının, deney süreci sonunda tespit edilen vücut ağırlıklarındaki azalma da bu düşüncemizle uyumluluk göstermektedir.

Borik asit uygulanmış tüm gruplarda (Grup V, VI, VII) lipid damlacığı miktarının Grup I' e benzer, glukojen miktarının ise doz bağımlı olarak azalmış olması, toksik etkinin kadmiyum bileşiğine göre daha az olduğunu gösterir niteliktedir. Detoksifikasyon sırasında gerekli olan enerjinin sadece glukojen depolarından karşılanabildiği ve bu nedenle yağ katabolizmasına gerek kalmadığı düşünülebilir. Geyikoğlu ve Turkez (2007) yaptıkları çalışmalarında borik asitin kaslarda ATP

üretimini azalttığını, glukoz, glukojen ve laktat gibi bazı metabolitlerin yoğunluklarında azalışa sebep olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Bor oksit gruplarında (Grup VIII, IX, X) yer alan hayvanlar için buraya kadar söz edilen ifadeleri kullanmak oldukça güç gözükmektedir. Bor oksitin uygulandığı gruplarda, diğer tüm deney gruplarına göre lipid ve glukojen miktarları yüksek seviyede bulunmuş olmasının yanında, mitokondri ve DER hasarının da oldukça fazla oluşu dikkatte değerlidir. Bu bulgular yorumsal anlamda detoksifikasyonun neredeyse başarısız olduğunu ve oksijensiz yoldan enerji eldesinin de aksadığını ortaya koyar niteliktedir. Çünkü, mevcut lipid ve glukojenin miktar olarak fazla bulunması, bu inklüzyonların katabolize edilemediğinin, dolayısıyla mitokondri ve özellikle DER' in fonksiyonlarını yerine getiremediğinin birer göstergesidir. Richards and Ireland (1978) yaptıkları çalışmalarında benzer bulgu ortaya koyarak, glukojenez başta olmak üzere karbonhidrat metabolizmasını katalizleyen enzimlerin, kurşun zehirlenmesi sonucu aktivitelerini kaybetmiş olabileceklerini düşünmüşlerdir. Bor oksit gruplarında gözlenen ileri seviyedeki epitel doku hasarı, bu gruptaki hayvanların beslenmelerinde de sorunlar olabileceğini, bunun yanısıra uygulamalardan önce hayvanların biriktirmiş oldukları lipid ve glukojenin neredeyse hiç kullanılmadığını düşündürmektedir. Çalışmalarımıza başlamadan önce vücut ağırlıkları belirlenen toprak solucanlarının deney sonrasındaki vücut ağırlıklarının yaklaşık 1/3' ü kadar azalmış olması da bor oksit gruplarındaki bulgularımızı desteklemektedir.

Toprak solucanları ortamlarında bulunan tüm kimyasal maddeler ya da ağır metaller ile sürekli bir temas halindedir. Bu yüzden toprak solucanlarının maddeler tarafından zehirlenmesi ile serbest radikallerin oluşumu süreci, radikallere karşı savunma sistemlerinin gelişimi ve glutatyon mekanizması arasında önemli bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Laszczyca, et al., 2004; Liu, et al., 2010). Valko, et al. (2006), serbest radikallerin nükleik asit, lipid, protein, enzim ve karbonhidrat gibi hücrelerin tüm önemli elemanlarında hasara yol açabileceğini açıklamıştır. Organizmaların enzimatik aktivitelerindeki değişimlerin, çevre kirliliğinde belirteç olabileceğini bildiren Hu, et al. (2010), özellikle serbest oksijen radikallerinin olumsuz etkilerine karşı hücreyi koruyan ve antioksidan savunma sisteminde görev alan enzimlerin iyi bir belirleyici parametre

olduğunu vurgulamıştır. Toprak solucanları üzerinde son yapılan araştırmalarda da özellikle metallerin CAT ve GPx aktivitesi üzerinde durulmuş ve bu iki enzimin antioksidan savunma sistemlerinde potansiyel birer belirteç olarak kullanılması önerilmiştir (Saint-Denis, et al., 1998).

Kadmiyum nitrat tetra hidrat, borik asit ve bor oksit bileşiklerinin farklı dozlarının uygulandığı çalışmamızda da doğal jel elektroforezi ile saflaştırılmış CAT ve GPx enzimlerinin aktivitelerindeki değişimler değerlendirildi. Grup I hayvanlarının her iki enziminin aktivitesine göre diğer tüm bileşiklerin uygulandığı gruplarda doza bağlı olarak aktivite artışları tespit edildi. Nitekim, çalışmamız sonuçlarına benzer biçimde, Zhang, et al. (2009) yaptıkları araştırmada 48 saat kadmiyum uygulanan toprak solucanlarında CAT aktivitesinin doz bağımlı şekilde arttığı sonucuna ulaşmışlardır. Sucul bir tür olan *Tubifex tubifex* üzerinde yapılan bir başka çalışmada, ağır metal olan kadmiyum ve demir metallerinin 48. saatte CAT enzim aktivitesini arttırıcı yönde etki ettiği ancak demir ve kadmiyum metalleri karıştırılarak deney hayvanlarına verildiğinde ise enzim aktivitesindeki artışın 2 gün sonunda olduğu rapor edilmiştir (Dhainaut and Scaps, 2001). Benzer şekilde *Tubifex tubifex* türünün kullanıldığı bir başka çalışmada, fenhexamid maddesinin CAT ve glutatyon redüktaz enzimlerinin aktivitesinde doz artımıyla birlikte yükselme gözlenmiştir (Mosleh, et al., 2005). Çalışmamızda da, CAT ve GPx enzimlerinin aktiviteleri kadmiyum ve borik asit gruplarında doz bağımlı artış göstermiştir. Ancak, bor oksit gruplarında CAT aktivitesi doz bağımlı artış gösterirken, GPx aktivitesinde azalma meydana gelmiştir. Hu, et al. (2010)'ın toprak solucanlarına uyguladığı farklı dozlarda hem çinko oksit hem de titanyum oksit bileşiklerinin ayrı ayrı, CAT aktivitesini doz artışına paralel olarak kontrol grubuna göre önemli derecede artırdığı, fakat dozun artmasıyla aktivitede düşüş olduğu hatta kontrol grubunda belirlenen miktarın da altına düştüğü bildirilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarıyla da destek bulmuş olan çalışmamızın bor oksit gruplarındaki GPx enzim aktivitesi değerlerindeki artan doz bağımlı düşüş için, bor oksitin GPx üzerinde inhibisyon etkisini düşündürmektedir. Zarlardaki kolestrol ve yağ asitlerinin doymamış bağları ile kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluşturan serbest oksijen radikallerinin, hücre zarının geçirgenliğini, akıcılığını, iyon transportunu ve enzim aktivitelerini engelleyerek doku ve hücre hasarlarına neden olduğu belirtilmiştir (Akkuş,

1995; Gutteridge, 1995). Bu anlamda bor oksit gruplarında toksik etki nedeniyle GPx enzim aktivitesinin azalması şaşırtıcı bulunmamıştır. Farklı hayvan gruplarında kadmiyum konsantrasyonu artışı ile birlikte, spektrofotometrik ölçümlerde CAT aktivitesinin kontrol gruplarına göre arttığı, GPx aktivitesinin ise azaldığına dikkat çekilmiştir (Lijun, et al., 2005). Ancak daha önce belirtildiği gibi çalışmamızda kadmiyum bileşiğinin en yüksek konsantrasyonunda enzim aktivitesinde bir azalma görülmemiştir.

Laszczyca, et al. (2004) yaptığı çalışmada ise ağır metal içeren bölgelere doğru gidildikçe GPx enzim aktivitesinin artışına dikkat çekilmiştir. Bu durum, çalışmamızın kadmiyum nitrat tetra hidrat ve borik asit grupları ile benzerlik göstermesine rağmen bor oksit gruplarıyla bu yönden farklı bulunmuştur.

Toprak solucanlarında yapılan bazı çalışmalarda spektrofotometrik olarak CAT ve GPx enzim aktivitelerinin çevresel kirliliğin yanı sıra mevsim değişimlerine, sıcaklık ve pH' na bağlı olarak da değiştiği de belirtilmiştir (Saint-Denis, et al., 1998; Laszczyca, et al., 2004). Bu çalışmalarda CAT enzim aktivitesinin 30 °C' de maksimum düzeye ulaşırken, daha yüksek sıcaklıklarda azaldığı, GPx enzim aktivitesinin ise 40 °C' de maksimuma ulaşmış daha sonra düşüş gösterdiği ifade edilmiştir. pH değişimlerinde ise CAT aktivitesinin nötr pH' lara kadar arttığı daha sonra düşüşe geçtiği, GPx aktivitesinde ise nötre yakın pH' larda yüksek, bazik pH' lara doğru ise düşüş gösterdiği rapor edilmiştir.

Serbest oksijen radikallerinin temel kaynağı olarak gösterilen mitokondrilerin, çalışmamızdaki bor oksit gruplarında ileri seviyede hasar görmüş olması, serbest oksijen radikali kaynağının farklı olduğunu düşündürmektedir. Leonard, et al. (2004) ve Mercan (2004)' in belirttikleri gibi hücrelerde Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları sayesinde metal iyonlarının süper oksit anyonları ve H₂O₂ ile tepkimeye girerek OH· ' radikalini oluşturabilirler. Ayrıca, çalışmamızın deney gruplarında histopatolojik olarak tespit edilmiş olan barsak epitel hasarı, villus hasarı ve hücreler arası boşlukların artmasıyla meydana gelen hasarların temel nedeni olarak da hücrelerde meydana gelmiş olan serbest oksijen radikallerinin olabileceğini düşünmekteyiz. Meydana gelen serbest

radikaller ile metal toksisitesi sonucu antioksidan savunma sistemlerindeki bozulmaların hücrelerdeki makromoleküllerde hasarlara neden olduğunu vurgulayan Wolf and Baynes, (2006) ve Flora, et al. (2008) da bu düşüncemizi destekler niteliktedir.

Deneysel çalışmamızda kullanılmış olan materyal ve metodlar kapsamında elde edilen bulgulara genel olarak bakıldığında, besi yeri ile bire bir temas halinde bulunan toprak solucanlarının, farklı bor bileşiklerinden farklı seviyelerde benzer patolojik olgular göstererek etkilendiğini söyleyebiliriz. Bunun yanında, çalışmamızda kullanılan bor bileşiklerinin toksik etkileri, kadmiyum ağır metal bileşiğinin uygulandığı dozlardan daha fazla olduğunda ortaya çıkmıştır. Bu sonuçlar, çalışmamızda toprak solucanları üzerinde sadece iki farklı türünü kullandığımız bor bileşiklerinin bir ağır metal bileşiği kadar toksik etkili olamayacağını göstermiştir. Bu nedenle, gelecekte planlanacak olan benzer çalışmalarda, diğer bor bileşiklerinin farklı dozlarda ve farklı canlı organizma türlerinde karşılaştırmalı biçimde araştırılması, ayrıca daha moleküler seviyede parametreler kullanılarak yapılması hem bor zenginliği olan ülkemiz için hem de bu maddenin daha verimli kullanılabilmesi için ön görülmektedir.

6. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdel Salam Aly, M. and Schröder, P., 2008, Effect of herbicides on glutathione S-transferases in the earthworm, *Eisenia fetida*, *Env Sci Pollut Res*, 15, 2, 143-149.
- Acarkan, N., 2002, Bor ürün çeşitleri ve kullanım alanları, 1. Uluslar arası Bor sempozyumu, Kütahya, 1-5.
- Adamowicz, A., 2005, Morphology and ultrastructure of the earthworm *Dendrobaena veneta* (Lumbricidae) coelomocytes, *Tissue and Cell*, 37, 125-133.
- Akkuş, İ., 1995, Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, 1.baskı, Mimoza yayınları, 157 s.
- Alfvén, T., 2002, Bone and kidney effects from cadmium exposure, dose effect and dose response relationships, PhD. thesis, Environmental Medicine Karolinska Institutet, 60p.
- Amaral, A., Soto M., Cunha, R., Marigo'mez, I. and Rodrigues, A., 2006, Bioavailability and cellular effects of metals on *Lumbricus terrestris* inhabiting volcanic soils *Environmental Pollution*, 142, 103-108.
- Apostol, K.G. and Zwiazek, J.J., 2004, Boron and water uptake in jack pine (*Pinus banksiana*) seedlings, *Environmental and Experimental Botany*, 51, 145-153.
- Armstrong, T.A., Flowers, W.L., Spears, J.W. and Nielsent, F.H., 2002, Long-term effects of boron supplementation on reproductive characteristics and bone mechanical properties in gilts, *Journal of Animal Science*, 80, 154-161.
- Armstrong, T.A., Spears J.W. and Lloyd, K.E., 2001, Inflammatory response, growth, and thyroid hormone concentrations are affected by long-term boron supplementation in gilts, *Journal of Animal Science*, 79, 1549-1556.
- Aruoma, O.I., 1998, Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease, *JAOCS*, 75, 199 -212.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- ATSDR, 2010, Public health statement for boron, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 8p.
- Bakirdere, S., Örenay S. and Korkmaz M., 2010, Effect of boron on human health, The Open Mineral Processing Journal, 3, 54-59.
- Bandyopadhyay, U., Das D. and Banerjee R.K., 1999, Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis, Current Science, 77, 5, 10, 658-666.
- Barranco, W.T. and Eckhert, C.D., 2006, Cellular changes in boric acid-treated DU-145 prostate cancer cells, British Journal of Cancer, 94, 884-890.
- Becker, L., Scheffczyk, A., Förster, B., Oehlmann, J., Princz, J., Römbke, J. and Moser, T., 2011, Effects of boric acid on various microbes, plants and soil invertebrates, J. Soils Sediments 11:238–248.
- Bouche, M.L., Habets, F., Biagianti-Risbourg, S. and Vernet G., 2000, Toxic effects and bioaccumulation of cadmium in the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex*, Ecotoxicology and Environmental Safety, 46, 246-251.
- Burukoğlu, D. ve Bayçu C., 2009, Borun sıçan testis dokusuna etkileri, Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi, 10, 1, 145-150.
- Carpenter, S.B. and Kistler, R.B., 2006, Boron and borates, industrial minerals and rocks: commodities, markets, and use, 7th Edition, J. E. Kogel, N.C. Trivedi, J. M. Barker, S. T. Krukowski (Eds), Society for Mining, Metallurgy, and Exploration (U.S.), 1548p.
- Cheeseman, K.H. and Slater, T.F., 1993, An introduction to free radical biochemistry, British Medical Bulletin, 49, 3, 481-493. ABSTRACT
- Cobb, A., 2007, The elements cadmium, Marshall Cavendish Corporation, 32.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Curtin, J., Donovan, M. and Cotter T., 2002 Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis, *J. Immunol. Methods*, 265, 1-2, 49-72.
- Çavdar, C., Sifil, A. ve Çamsarı T., 1997, Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma, *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 3-4, 92-95.
- Çöl, M. and Çöl, C., 2003, Environmental boron contamination in waters of Hisarcik area in the Kutahya Province of Turkey, *Food and Chemical Toxicology*, 41, 1417-1420.
- Çömelekoğlu, Ü., Yalın, S., Bağış, S., Yıldız, A., Ögenler, O., Yılmaz, B.C. and Hatungil, R., 2007, Kadmiyumun kortikal kemik mineral yoğunluğu ve biyomekanik parametreleri üzerine etkisi: ovariektomili sıçan modeli ile karşılaştırma, *Türk Fiz. Tıp Rehab. Derg.*, 53, 1-4.
- Davis S.M., Drake K.D. and Maier K.J., 2002, Toxicity of boron to the duckweed, *Spirodella polyrrhiza*, *Chemosphere*, 48, 615–620.
- Delibaş, N. ve Özçankaya, R., 1995, Serbest radikaller, *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 2, 3, 11-17.
- Demirsoy, A., 2002, Genel zoocoğrafya ve Türkiye zoocoğrafyası 'Hayvan coğrafyası', Metaksan A.Ş., Ankara, 1007s.
- Dhainaut A. and Scaps, P., 2001, Immune defense and biological responses induced by toxics in Annelida, *Can. J. Zool.*, 79, 233–253.
- Dökmeci, İ., 1994, Toksikoloji-Akut zehirlenmelerde tanı ve tedavi, 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, 547 s.
- Duffus, J.H. and Worth, H.G.J., 2006, Fundamental toxicology, Royal Society of Chemistry, 409 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Dupre, J. N., Keenan, M.J., Hegsted, M. and Brudevold, A.M., 1994, Effects of dietary boron in rats fed a vitamin D-deficient diet, *Environmental Health Perspectives*, 102, 7, 55-58.
- Eagles, D.A. and Chapman, G.B., A light- and electron-microscope study of hepatocytes of rats fed different diets, *C. R. Biologies*, 330, 62-70, 2007.
- Edwards, C.A. and Bohlen, P.J., 1996, *Biology and ecology of earthworms*, Springer, 426p.
- EPA, 2004, *Toxicological review of boron and compounds*, U.S. Environmental Protection Agency, 134p.
- Eren, M., 2004, Borun biyolojik önemi ve metabolizma üzerine etkileri, *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1,1, 55-59.
- Eti Maden İşletmeleri, 2010, Bor sektör raporu, Eti Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğü, Ankara, 1-12.
- Evans P. and Halliwell B., 1999, Free radicals and hearing: cause, consequence, and criteria, *Annals New York Academy of Sciences*, 28, 884,19-40.
- Fishbein, L., 1981, Sources, transport and alterations of metal compounds: an overview. I. arsenic, beryllium, cadmium, chromium, and nickel, *Environmental Health Perspective*, 40, 43-64.
- Flora, S.J.S., Mittal, M. and Mehta, A., 2008, Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy, *Indian J Med Res*, 128, 501-523.
- Galaris, D. and Evangelou, A., 2002, The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis, *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 42, 93-103.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Gao, Y., Sun, Z., Sun, X., Sun, Y. and Shi, W., 2007, Toxic effects of albendazole on adenosine triphosphatase activity and ultrastructure in *Eisenia fetida*, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67, 378–384.
- Geyikoğlu, F. and Turkez, H., 2007, Acute toxicity of boric acid on energy metabolism of the breast muscle in broiler chickens, *Biologia*, 62, 112-117.
- Gökpınar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T. ve Durmaz, Y., 2006, Algal antioksidanlar, *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 23, 1, 85-89.
- Gutteridge, J.M., 1995, Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage *Clin. Chem.* 41, 12, 1819-1828.
- Halliwell, B., 1989, Tell me about free radicals, doctor:a review, *Journal of the Royal Society of Medicine*, 82, 742-752.
- Heindel, J.J., Price, C.J., Field E.A., Marr,M.C., Myers,C.B., Morrissey, R.E. and Schwetz, B.A., 1992, Developmental toxicity of boric acid in mice and rats, *Fundamental and Applied Toxicology*, 18, 266-277.
- Holmstrup, M., Sorensen, J.G., Overgaard, J., Bayley, M., Bindesbol, A.M., Slotsbo, S., Fisker, K.V., Maraldo, K., Waagner, D., Labouriau, R. and Asmund, G., 2011, Body metal concentrations and glycogen reserves in earthworms (*Dendrobaena octaedra*) from contaminated and uncontaminated forest soil, *Environmental Pollution*, 159, 190-197.
- Hu, C.W., Lia, M., Cui, Y.B., Li, D.S., Chen J. and Yang, L.Y., 2010, Toxicological effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*, *Soil Biology & Biochemistry*, 42, 586-591.
- Huel, G., Yazbeck, C., Burnel, D., Missy P. and Kloppmann, W., 2004, Environmental boron exposure and activity of d-Aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) in a newborn population, *Toxicological Sciences*, 80, 304-309.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Hunt C.D., 2005, Boron, Encyclopedia of dietary supplements, P.M. Coates, M.R. Blackman, G.M. Cragg, M. Levine, J. Mass, J.D. White, Marcel Decker, 842, 55-63.
- Järup, L., 2002, Cadmium overload and toxicity, Nephrology Dialysis Transplantation, 17, 2, 35-39.
- Järup, L., 2003, Hazard of heavy metal contamination , British Medical Bulletin, 68, 167-182
- Jayakumar, T., Thomas, P.A. and Geraldine, P., 2007, Protective effect of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on antioxidants of major organs of aged rats. Exp Gerontol. 42:183-91.
- Karihtala P. and Soini Y., 2007, Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies, APMIS, 115, 81-103.
- Kılıç, A.M., 2004, Bor madeninin Türkiye açısından önemi ve gelecekteki yeri, 2. Uluslararası Bor Sempozyumu, Eskişehir, 31-41.
- Kılıç, A.Y., 2002, Genel biyoloji laboratuvarı, Anadolu Üniversitesi Yayınları, Eskişehir, 154s.
- Kılıç, A.Y., 2007, Omurgasız hayvanlar sistematığı ve biyolojisi, Anadolu Üniversitesi Yayınları, Eskişehir, 363s.
- Kılınç, E., Mordoğan, R. and Tanrıverdi, M., 2001, Bor minerallerinin önemi, potansiyeli, üretimi ve tüketimi, 4. Endüstriyel Hammaddeler Sempozyumu, İzmir, 226-235.
- Kistler B.R. and Helvacı C, 1994. Boron and borates, Industrial Minerals and Rocks, 6" Edition, USA, 1214p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Korkmaz, M., Saylı, U., Saylı, B.S., Bakırdere, S., Titretir, S., Ataman, O.Y. and Keskin, S., 2007b, Estimation of human daily boron exposure in a boron-rich area, *British Journal of Nutrition*, 98, 3, 1-5.
- Korkmaz, M., Uzgören, E., Bakırdere, S., Aydın, F. and Ataman, O.Y., 2007a Effects of dietary boron on cervical cytopathology and on micronucleus frequency in exfoliated buccal cells, *Environmental Toxicology*, 22, 17-25.
- Krebs, R.E., 2006, *The history and use of our earth's chemical elements: a reference guide*, 2th edition, Greenwood Press, 422p.
- Kurtoglu, V., Kurtoglu, F., Coskun, B., Seker, E., Balevi, T. and Çetıngul, I.S., 2002, Effects of boron supplementation on performance and some serum biochemical parameters in laying hens, *Revue Méd. Vét.*, 153, 12, 823-828.
- Laszczyca, P., Augustyniak, M., Babczyn'ska, A., Bednarska, K., Kafel, A., Migula, P., Wilczek, G. and Witas, I., 2004, Profiles of enzymatic activity in earthworms from zinc, lead and cadmium polluted areas near Olkusz (Poland), *Environment International* 30, 901– 910.
- Leonard, S.S., Harris, G.K. and Shi, X., 2004, Metal-induced oxidative stress and signal transduction, *Free Radical Biology and Medicine*, 37, 12, 1921-1942.
- Li, E., Xiong, Z., Chen, L., Zeng, C. and Li, K., 2008, Acute toxicity of boron to juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at two salinities, *Aquaculture*, 278, 175–178.
- Lijun, L., Xuemei L., Yaping G. and Enbo, M., 2005, Activity of the enzymes of the antioxidative system in cadmium-treated *Oxya chinensis* (Orthoptera Acridoidae), *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 20, 412–416.
- Lin, H.C., Chen, H.J. and Hou, W.C., 2002, Activity staining og gluttathione peroxidase after electrophoresis on native and sodium dedocylsulfate polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. 23:513-16.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Liu Y., Zhou, Q., Xie, X., Lin, D. and Dong, L., 2010, Oxidative stress and DNA damage in the earthworm *Eisenia fetida* induced by toluene, ethylbenzene and xylene, *Ecotoxicology*, DOI 10.1007/s10646-010-0540-x.
- Liu, J. and Klaassen, C.D., 1996, Absorption and distribution of cadmium in metallothionein-I transgenic mice, *Fundamental and Applied Toxicology*, 29, 294-300.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1):265-75.
- Lukkari, T., Taavitsainen, M., Soimasuo, M., Oikari, A. and Haimi, J., 2004, Biomarker responses of the earthworm *Aporrectodea tuberculata* to copper and zinc exposure: differences between populations with and without earlier metal exposure, *Environmental Pollution*, 129, 377–386.
- Maryński, M., Kramarz, P., Laskowski, R. and Niklinska, M., 2002, Decreased energetic reserves, morphological changes and accumulation of metals in *Carabid Beetles (Poecilus cupreus L.)* exposed to zinc-or cadmium- contaminated food, *Ecotoxicology*, 127-139.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C. and Giovannini C., 2005, Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, 577-586.
- Matés J.M. and Sánchez-Jiménez, F., 1999, Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes, *Frontiers in Bioscience*, 4, 339-345.
- Melnyk, L., Goncharuk, V., Butnyk, I. and Tsapiuk, E., 2005, Boron removal from natural and wastewaters using combined sorption/membrane process, *Desalination*, 185, 147-157.
- Mercan U., 2004, Toksikolojide serbest radikallerin önemi, *YYU Vet. Fak. Derg.*, 15(1-2), 91-96.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Mısırlıoğlu, İ.M., 2001a, Doğanın gönüllü bahçivanları: toprak solucanları, Tübitak Bilim ve Teknik Dergisi, 408: 78-80.
- Mısırlıoğlu, İ.M., 2001b, Toprak solucanı ve Ekolojik Önemleri, Popüler Bilim, 96: 21-23.
- Miccadei, S. and Floridi, A., 1993, Sites of inhibition of mitochondrial electron transport by cadmium, Chem. Biol. Interact, 89, 159-67.
- Morgan A.J. and Turner M.P., 2005, Quantitative ultrastructure of metal sequestering cells reflects intersite and interspecies differences in earthworm metal burdens, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 49, 45-52.
- Morowati, M., 2000, Histochemical and histopathological study of the intestine of the earthworm (*Pheretima elongata*) exposed to a field dose of the herbicide glyphosate, The Environmentalist, 20, 105-111.
- Morrow H. 2001. Cadmium and cadmium alloys. In: Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology. John Wiley & Sons, Inc., 4, 471-507.
- Moseman, R.F., 1994, Chemical disposition of boron in animals and humans, Environmental Health perspectives, 102, 7, 113-117.
- Mosleh, Y.Y., Paris-Palacios, S., Couderchet, M., Biagianti-Risbourg, S. and Vernet, G., 2005, Metallothionein induction, antioxidative responses, glycogen and growth changes in *Tubifex tubifex* (Oligochaete) exposed to the fungicide, fenhexamid, Environmental Pollution, 135, 73-82.
- Muthukaruppan, G. and Gunasekaran P., 2010, Effect of butachlor herbicide on earthworm *Eisenia fetida*- Its histological perspicuity, Applied and Environmental Soil Science, Article ID 850758, 4.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Muthukaruppan, G., Janardhanan S. and Vijayalakshmi G.S., 2005, Sublethal toxicity of the herbicide butachlor on the earthworm *Perionyx sansibaricus* and its histological changes, J Soils & Sediments, 5, 2, 82-86.
- Nable, R.O, Banuelos, G.S. and Paull, J.G., 1997, Boron toxicity, Chapter 12, Plant and Soil, 193, 181-198.
- Nielsen, F.H., Hunt, C.D., Mullen, L.M., Hunt, J.R., 1987, Effect of dietary boron on mineral, estrogen, and testosterone metabolism in postmenopausal women, FASEB J., 1, 394-397.
- Nielsen F.H., 2008, Is boron nutritionally relevant?, Nutrition Reviews, 66, 4, 183–191.
- NPIC, 2001, Boric acid, National Pesticide Information Center, 7p.
- OECD, 1984, Test no. 207 Earthworms acute toxicity test, Guidelines for testing of chemicals, OECD, Paris, 9 p.
- OSPAR, 2002, OSPAR background document on cadmium-hazardous substances series OSPAR Commission.
- Özen, A., Canbek, M., Uyanoğlu, M., Arslan N. ve Çiçek, A., 2009, İndikatör bir canlı olan *Limnodrilus hoffmeisteri* üzerinde ağır metal ve bor bileşiklerinin toksik etkilerinin incelenmesi, IV. Uluslararası Bor Sempozyumu, 421-427.
- Özkan, Ş.G., Çebî, H., Delice, H.S. ve Doğan, M., 1997, Bor minerallerinin özellikleri ve madenciliği, 2. Endüstriyel Hammaddeler Sempozyumu , İzmir, 224-228.
- Paoletti, M.G., 1999, The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators, Agriculture, Ecosystems and Environment, 74, 137–155.
- Pechenik, J.A., 1996, Biology of the invertebrates, Wm. C. Brown Publishers, Dubuque IA, 513p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Pham-Huy, L.A., He, H. and Pham-Huy, C., 2008, Free radicals, antioxidants in disease and health, *International Journal of Biomedical Science*, 4, 2, 89-96.
- Price, C.J., Marr, M.C., Myers, C.B., Seely, J.C., Heindel, J.J. and Schwetz, B.A., The developmental toxicity of boric acid in rabbits, *Fundamental and Applied Toxicology*, 34, 176-187.
- Rahimi, E. and Rokni, N., 2008, Measurement of cadmium residues in muscle, liver and kidney of cattle slaughtered in Isfahan abattoir using graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS): a preliminary study, *Iranian Journal of Veterinary Research*, 9, 2, 23, 2008.
- Rao, J.V., Kavitha P. and Rao A.P., 2003, Comparative toxicity of tetra ethyl lead and lead oxide to earthworms, *Eisenia fetida* (Savigny), *Environmental Research*, 92, 271-276.
- Rastogi, V.B. and Kishore, B., 1997, A complete course in ISC biology, Pitambar Publishing, 592p.
- Reddy, N.C. and Rao, J.V., 2008, Biological response of earthworm, *Eisenia foetida* (Savigny) to an organophosphorous pesticide, profenofos, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71, 574-582.
- Reichert, A.S. and Neupert, W., 2002, Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria-role in protein transport, *Biochimica and Biophysica Acta*, 1592, 41-49.
- Ribas, J.P., Lopes, R.A., Sala, M.A., Ribas, L.M.R., Mattos, M.G.C., Semprini, M., Watanabe, I.S. and Regalo, S.C.H., 2004, Effect of cadmium on rat maxillary molar junctional epithelium during lactation, *Int. J. Morphol.*, 22, 4, 257-262.
- Richards K.S. and Ireland M.P., 1978, Glycogen-lead relationship in the earthworm *Dendrobaena rubida* from a heavy metal site, *Histochemistry*, 56, 55-64.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Ruppert, E.E., Fox, R.S. and Barnes, R.D., 2004, Invertebrate zoology: a functional evolutionary approach, Thomson-Brooks/Cole, USA, 989p.
- Saint-Denis, M., Labrot, F., Narbonne, J.F. and Ribera, D., 1998, Glutathione, glutathione-related enzymes, and catalase activities in the earthworm *Eisenia fetida andrei*, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 35, 4, 602–614.
- Salman, S., 2007, Omurgasız hayvanlar biyolojisi, Palme yayıncılık, Ankara, 512s.
- Saygı, Ş., 2003, Deneysel toksikolojide toksisite testleri ve test sonuçlarının önemi, Gülhane Tıp Dergisi, 45 (3), 291-298.
- Saylı, B.S., Tüccar, E. and Elhan, A.H., 1998, An assessment of fertility in boron-exposed Turkish Subpopulations, Reproductive Toxicology, 12, 3, 297-304.
- See, A.S., Salleh, A.B., Bakar, F.A., Yusof, N.A., Abdulamir, A.S. and Heng, L.Y., 2010, Risk and health effect of boric acid, American Journal of Applied Sciences 7, 620-627.
- Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y.S.R. and De, B., 2010, Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect, International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 3, 1, 91-100.
- Shaaban, M.M., 2010, Role of boron in plant nutrition and human health, American Journal of Plant Physiology, 5, 5, 224-240.
- Sharma, V.J. and Satyanarayan, S., 2010, Effect of selected heavy metals on the histopathology of different tissues of earthworm *Eudrillus eugeniae*, Environ Monit Assess, DOI 10.1007/s10661-010-1786-8.
- Shimada, H., Funakoshi, T. and Waalkes, M.P., 2000, Acute, nontoxic cadmium exposure inhibits pancreatic protease activities in the mouse, Toxicological Sciences, 53, 474-480.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Sims, R.W. and Gerard, B.M., 1985, Earthworms: keys and notes for the identification and study of the species, Brill Archive, 171p.
- Skorzyńska-Polit, E., Drazkiewicz, M. and Krupa, Z., 2010, Lipid peroxidation and antioxidative response in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium and copper, Acta Physiol Plant, 32, 169-175
- Stellman, J.M., 1998, Encyclopaedia of occupational health and safety: chemical, industries and occupations, 4th edition, International Labour Organization, 1253p.
- Steward-Pinkham, S.M., 1991, Detecting ambient cadmium toxicity in an ecosystem, Plants for toxicity assessment, 2th edition, J. W. Gorsuch, W. Wang, W. R. Lower, M. A. Lewis (Eds.), ASTM International, 401, 161-171.
- Tariq, M. and Mott, C.J.B., 2007, The significance of boron in plant nutrition and environment- A review, Journal of Agronomy, 6,1, 1-10.
- Temizkan, G. ve Arda, N., 2004, Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler, 2. baskı, Nobel Tıp Kitapevi.
- Urso, M.L. and Clarkson, P.M., 2003, Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation, Toxicology 189, 41-54.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncola, J., Cronin, M.T.D., Mazura, M. and Telser, J., 2007, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 39, 44-84.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J. and Telser, J., 2004, Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, Molecular and Cellular Biochemistry, 266, 37-56.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncola, J., Izakovic M. and Mazura, M., 2006, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chemico-Biological Interactions* 160, 1- 40.
- Verma, A., 2005, *Invertebrates: protozoa to echinodermata*, Alpha Science International Ltd., Harrow,UK., 510p.
- Vijver, M.G., Vink, J.P.M., Miermans, C.J.H. and Van Gestel, C.A.M., 2003, Oral sealing using glue: a new method to distinguish between intestinal and dermal uptake of metals in earthworms, *Soil Biology & Biochemistry*, 35, 125–132.
- Vural, N., 2005, *Toksikoloji*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 73, 659s.
- Wadaan M.A.M, 2005, Heavy metal cadmium and its implication on the developmental stages and abnormalities in freshwater snail *Lymnaea auricularia* (Lymnaeidae: Gastropoda) from Al-Hasa, the eastern province of Saudi Arabia, *Pakistan Journal of Biological Science*, 8, 6, 785-789.
- WHO, 1992a, Cadmium, physical and chemical properties, *Environmental Health Criteria* 135, Geneva, World Health Organization.
- WHO, 1992b, Cadmium, natural occurrence, *Environmental Health Criteria* 135, Geneva, World Health Organization.
- WHO, 1994, *Assessing human health risks of chemicals: derivation of guidance values for health-based exposure limits*. *Environmental Health Criteria* 170. Geneva, World Health Organization, IPCS.
- WHO, 1996, *Trace elements in human nutrition and health*, World Health Organization Expert Committee on Trace Elements in Human Nutrition, Geneva.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

WHO, 1998a, Boron, physical and chemical properties, Environmental Health Criteria 204, Geneva, World Health Organization.

WHO, 1998b, Boron, environmental transport, distribution and transformation (soil), Environmental Health Criteria 204, Geneva, World Health Organization.

WHO, 1998c, Boron, Effects on other organisms in the laboratory and field, Environmental Health Criteria 204, Geneva, World Health Organization.

WHO, 1998d, Boron, kinetics and metabolism in laboratory animals and humans, Environmental Health Criteria 204, Geneva, World Health Organization.

Wolf, M.B. and Baynes, J.W., 2007, Cadmium and mercury cause an oxidative stress-induced endothelial dysfunction, *BioMetals*, 20, 73-81.

Woodbury, W., Spencer, A.K. and Stahman, M.A., 1971, An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Anal Biochem.*, 44:301-5.

Woods, W.G., 1994, An introduction to boron: history, sources, uses and chemistry, *Environmental Health Perspectives*, 102, 7, 5-11.

www.boren.gov.tr/icerik.php?id=24

Yazbeck, C., Kloppmann, W., Cottier, R., Sahuquillo, J., Debotte, G. and Huel, G., 2005, Health impact evaluation of boron in drinking water: a geographical risk assessment in Northern France, 27, 419-427.

Yongcan, G., Zhenzhong, W., Youmei, Z. and Xiaoyang M.O., 1998, Bioconcentration effects of heavy metal pollution in soil on the mucosa epithelia cell ultrastructure injuring of the earthworm's gastrointestinal tract, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 60, 280-284.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

Young, I.S. and Woodside, J.V., 2001, Antioxidants in health and disease, *J. Clin. Pathol.*, 54, 176-186.

Zhang, S., Hu, F., Li, H. and Li, X., 2009, Influence of earthworm mucus and amino acids on tomato seedling growth and cadmium accumulation, *Environmental Pollution*, 157, 2737-2742.

Zhang, X., Luab, Y., Shia, Y., Chenab, C., Yangc, Z., Lid Y. and Fengab, Y., 2009, Antioxidant and metabolic responses induced by cadmium and pyrene in the earthworm *Eisenia fetida* in two different systems: contact and soil tests, *Chemistry and Ecology*, 25, 3, 205–215.