

Antropojenik Kaynaklı Sucul Toksisitenin Belirlenmesinde Alternatif ve Yeni Bir Yaklaşım Olarak PLHC-1 ve RTG-2 Hücre Hatlarının Kullanılması ve CYP1A1 Biyobelirteci ile Birlikte Değerlendirilmesi

Begüm YURDAKÖK DİKMEN¹, Farah Gönül AYDIN², Hidayet TUTUN³, Sedat SEVİN⁴,

^{1,2,4}Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı İrfan Baştuğ Caddesi 06110 Dışkapı, Ankara, ³Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı İstiklal Yerleşkesi, 15030 BURDUR

¹<https://orcid.org/0000-0002-0385-3602>, ²<https://orcid.org/0000-0002-0068-2078>, ³<https://orcid.org/0000-0001-9512-8637>,

⁴<https://orcid.org/0000-0003-0475-9092>

✉: farahgonul.aydin@gmail.com

ÖZET

Kalıcı organik kirleticiler (KOK), insan, hayvan ve çevre sağlığını olumsuz etkileyen doğada uzun süre bozulmadan kalabilen ve çoğunlukla yağ dokuda birikme özelliği olan kimyasallardır. Bu araştırmada, 12 ay boyunca Ankara Çayı'ndan toplanan su (6 istasyon) ve sediment (12 istasyon) örneklerinin balık gonadal (RTG-2) ve balık hepatoselüler karsinom (PLHC-1) hücre hatlarında sitotoksitesi ve 7-etoksirezoruflin O-deetilaz (EROD) etkinliği araştırılmıştır. Sitotoksik etkinliğin numune alınan bölge ve döneme göre değişkenlik göstermiştir. Bu araştırma ile biyomarker olarak kullanılan CYP1A düzeyi ve sitotoksosite değerlendirmelerinin balık hücrelerinde, çevresel örnekler üzerinde çalışılması ile kirlilik durumu ve kirleticiler hakkında ucuz, hızlı, tekrar edilebilir ve güvenilir bir ön-değerlendirme olduğu; ilgili kurumlar tarafından risk haritalarının çıkarılması amacıyla kullanılabilirliği önerilmektedir.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihiçesi

Geliş Tarihi : 22.04.2019

Kabul Tarihi : 05.08.2019

Anahtar Kelimeler

RTG2

PLHC

CYP1A1

Sitotoksosite

Ankara Çayı

Evaluation of Antropogenic Aquatic Toxicity by and Alternative and New Approach; using PLHC-1 and RTG-2 cell lines and CYP1A1 Biomarker

ABSTRACT

Permanent organic pollutants (POPs) are chemicals that can remain intact in nature for a long time and affect the health of humans, animals and the environment. In this study, cytotoxicity and 7-Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity of water (6 stations) and sediment (12 stations) samples collected from Ankara Stream for 12 months were evaluated on fish gonadal (RTG-2) and fish hepatocellular carcinoma (PLHC-1) cell lines. Cytotoxic activity were found to vary according to the sampling region and period. This study, provide important information for the methodology used in the detection of environmental contaminants and evaluation of pollution from environmental samples using sensitive, cheap, fast and trustable method by cytotoxicity and EROD activity in fish cells. It is recommended that these results could be optimized and used by legal authorities for risk evaluation

Research Article

Article History

Received : 22.04.2019

Accepted : 05.08.2019

Keywords

RTG2

PLHC

CYP1A1

Cytotoxicity

Ankara Stream

To Cite : Yurdakök Kökmen B, Aydın FG, Tutun H, Sevin S 2019. Antropojenik Kaynaklı Sucul Toksisitenin Belirlenmesinde Alternatif ve Yeni Bir Yaklaşım Olarak PLHC-1 ve RTG-2 Hücre Hatlarının Kullanılması ve CYP1A1 Biyobelirteci ile Birlikte Değerlendirilmesi KSÜ Tarım ve Doğa Derg 23 (1): 247-258. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.556762.

GİRİŞ

Gelişen sanayinin taleplerini karşılamak için kimyasalların sentezlenmesi ve üretiminde 20. Yüzyılın ortalarından bu yana büyük artış bulunmaktadır. Bu kimyasalların büyük çoğunluğunu ise vücuda yabancı olan ksenobiyotikler oluşturur.

Potansiyel çevresel sağlık etkileri göz önüne alındığında özellikle önem taşıyan bir grup çevresel toksik madde, dioksin benzeri kimyasallardır (DLCs). Bu her yerde bulunan bileşikler, hidrofobik, lipofilik ve biyolojik ve kimyasal yıkımlanmaya karşı dirençlidir, kalıcılık ve biyoakkümülyasyon eğilimi ve zararlı

etkiler oluşturabilecek konsantrasyona ulaşma özelliklerine sahiptirler. DLC'ler içerisinde poliklorlanmış dibenzo-p-dioksinler ve dibenzo furanlar (PCDD/Fs), dioksin benzeri poliklorlanmış bifeniller (DL-PCB'ler), polisiklik aromatik hidrolarbonlar (PAH'lar) ve diğer kısmen bilinen ve bilinmeyen bileşikler vardır (Eichbaum ve ark., 2014). Denizler, kentsel ve tarımsal dönüşüm içerisinde, evsel ve endüstriyel atıklar ile gemi ve hidrolojik ve atmosferik işlemler sonrası oluşan bu kimyasalların (ksenobiyotiklerin) deşarj edildiği yerler haline gelmiştir. Dünyanın %70'ini kaplayan deniz ortamı bazı kimyasalların nötralize edebilir; ancak bu kimyasalların çoğu uzun yıllar yıkılmadan kaldığı için sucul ortamda birikmektedir. Bu bileşiklerin çoğunun lipofilik özellikte olması nedeniyle diğer sucul canlılarda ise kümülatif toksik etki oluşturmaktadır (Bols ve ark., 2005).

Biyotransformasyon, çeşitli çevresel kimyasal sınıflarının biyoakümülyasyon ve toksisitesinde belirgin bir rol oynamaktadır. Sitokrom P450 (CYP) bağımlı enzimler, lipofilik ksenobiyotiklerin daha fazla suda çözünen ve dolayısıyla kolayca atılabilen ve detoksifiye edilebilen oksidatif dönüşümü katalize eder (Sijm ve ark., 1993; Scholz ve Segner, 1999). Çoklu CYP formları arasında özellikle toksikolojik olarak önemli olan, CYP1A alt ailesi, çoklu çekirdek aromatik hidrokarbonlar (PAH'lar) ve dioksinler, furanlar ve poliklorlu bifeniller (PCB'ler) de dahil olmak üzere halojenli aromatik hidrokarbonlar (HAH'lar) tarafından yüksek derecede tetiklenebilen alt ailesidir. Sitokrom P4501A'nın (CYP1A) indüksiyonu, bir takım çevresel açıdan toksik maddelere maruziyetin duyarlı bir markırı olarak kabul edilmiştir (Scholz ve Segner, 1999; Behrens ve ark., 2001; Uno ve ark., 2012). CYP1A aktivitesi bazı toksik bileşiklerin etkilerine oldukça duyarlı olduğu için, su ortamında kimyasal kontaminasyon tespiti için en yaygın kullanılan biyobelirteçlerden biridir (White ve ark., 1997; García-Tavera ve ark., 2013; Soares-Rocha ve ark., 2015).

In vitro sistemler, CYP1A'nın fizyolojik regülyasyonunu ve ksenobiyotiklerin indüktif potensini ve aynı zamanda tür farklılıklarını araştırmak için değerli modellerdir (Dubois ve ark., 1996; Clemons ve ark., 1997; Scholz ve Segner, 1999). Bu amaçla, CYP1A'yı ekspresse eden hücre hatları kullanılabilir. PLHC-1 (clearfin livebearer hepatocellular karsinoma) gibi karaciğer kökenli birçok kalıcı hücre hatları ve RTG-2 gibi bazı fibroblastik hücreler, ksenobiyotik metabolizmanın araştırılması için en az bir temel CYP450-bağımlı monooksijenaz aktivitesini muhafaza etmektedir (Fent, 2007). CYP1A, PLHC-1 (Bruschweiler ve ark., 1996; Hahn ve ark., 1996) ve RTG-2 (Babin ve Tarazona, 2005) hücre hatları poliklorlu bifenil (PCB) konjenerlerine maruz bırakıldığında indüklenir.

PLHC-1 veya RTG-2 hücrelerinin *in vitro* toksikolojik araştırmalarda faydaları çoktur. Hücre kültür sistemi, çevresel koşulların daha iyi kontrol edilmesini sağlar, etkileşimli sistemik etkileri ortadan kaldırır, yüksek düzeyde tekrarlanabilir sonuçlar verir, sadece az miktarda kimyasal madde gerektirir ve kullanımda nispeten hızlı ve ucuzdur (Baksi ve Frazier 1990; Scholz ve Segner, 1999). Hücre kültürleri aynı zamanda bir kimyasalın suda yaşayan organizmalar üzerinde olumsuz etkilere neden olduğu konsantrasyon aralığı hakkında bilgi sağlayabilir (Isomaa ve Lilius, 1995). Bu bilgi, risk değerlendirmesinde öngörülerde bulunmak ve güvenlik faktörleri oluşturmak için gereklidir. Buna ek olarak, hücre kültür biyolojik tahlilleri, taksona özgü verileri sağlayabilir. Dahası, PLHC-1 biyolojik tahlilleri, balıklarda PAH'lar ve/veya HAH'ların interaktif etkilerini incelemek için faydalı olabilir (Hahn ve ark., 1996; Huuskonen ve ark., 2000). Yeni izole edilen hepatositler, tüm faz I ve faz II biyotransformasyon reaksiyonları için kapasiteye sahiptirler (Cravedi ve ark., 1996) ve birincil tek katlı kültürler, ksenobiyotik metabolize eden enzimlerin eksojen (Pesonen ve ark., 1992) ve endojen bileşikler (Devaux ve ark., 1992) tarafından düzenlenmesini incelemek için kullanılabilir. Bununla birlikte, kısa kültür periyotları, enzim aktivitelerinin düzenleme sistemleri ile ilgili mekanik çalışmalara sınırlama getirmektedir (Cravedi ve ark., 1996).

Projenin amacını; Ankara Çayı çevresinden bir yıl boyunca her ay toplanacak su ve sediment numunelerinin, çevre toksikolojisi çalışmalarında kullanılan balık hücrelerinden RTG2 (*Oncorhynchus mykiss* gonad hücre hattı) ve PLHC1 (Poeciliopsis lucida hepatoselüler karsinom hücresi) hücre hatlarına uygulanması ile sitotoksik etki ve EROD etkinliğinin su-çevre kirliliği yönüyle değerlendirmesi oluşturmaktadır. Bu kapsamda, sitotoksikite değerlendirilmesinde Nötral Kırmızı, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) ve Laktat dehidrogenaz (LDH) testleri yapılmış; CYP1A düzeyini belirlemek için ise, bu enzim etkinliğinin göstergesi olarak kabul edilen ve *in vitro* koşullarda etoksirezorufinden 7-hidroksietoksirezorufine dönüştürülmesini katalize eden EROD etkinliği değerlendirilmiştir. Böylece evsel/tarımsal endüstriyel atıkların kirlittiği ve gerekli önlemlerin alınmaya çalışıldığı Ankara Çayı'nda kirlilik mevsimsel ve bölgesel olarak değerlendirmeye alınmış ve olası riskli bölgeler tespit edilmiştir. Projenin amacı ayrıca, biyomonitöring (biyoizleme) programları için güvenilir ve uygun model test sistemlerinin denenmesi ve karşılaştırılmasını kapsamaktadır.

MATERYAL ve METOT

Numunelerin Toplanması

Numuneler Ankara Çayı üzerinde belirlenen 12 farklı

istasyondan bir yıl boyunca (Mayıs 2014 ile Mayıs 2015) aylık periyotlarla su ve sediman örnekleri alınarak yapıldı. Belirlenen istasyonların hepsinden su numunesi alınmasına rağmen belediyenin kanal çalışması yapması ve zeminin beton olması nedeniyle sadece belirli istasyonlardan sediman numunesi alımı yapıldı. İstasyonların koordinatları ile su ve sediment örneklerinin alındığı bölgeler Çizelge 1 ve Şekil 1’de gösterilmektedir.

Su örnekleri 10.10.2009 tarih ve 27372 sayılı Resmî

Gazete’de yayımlanan “Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği Numune Alma ve Analiz Metodları Tebliği”ne; sediment numuneleri ise “TS 9547 ISO 5667-12 Su Kalitesi- Numune Alma- Bölüm 12: Dip Sedimanlarından Numune Alma Klavuzu”nda belirtilen yöntemlere göre yapıldı. Su örnekleri Teflon kapaklı amber cam kaplara, taban yüzeyinin 0-5 cm üzerinden alınan sediment örnekleri ise polietilen numune kaplarına konuldu. Numuneler soğuk zincir altında laboratuvara ulaştırıldı, porsiyonlanarak -20 °C derin dondurucuya aktarıldı.

Çizelge 1. Numunelerin toplandığı koordinatlar

Table 1. Sampling coordinates

| Bölge Region | Numune Sample | Enlem Latitude | Boylam Longitude | Bölge Region | Numune Sample | Enlem Latitude | Boylam Longitude |
|-----------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------|------------------|----------------------------|----------------------------|
| 1.Bölge | Su/Sediman water/sediment | 40,076017 40°4'33,66"N | 32,954967 32°57'17,88"E | 7.bölge | Su water | 39,974548 39°58'28,37"N | 32,579478 32°34'46,12"E |
| 2.Bölge | Su/Sediman water/sediment | 39,880591 39°52'50,13"N | 32,094051 32°5'38,58"E | 8.bölge | Su water | 39,948963 39°56'56,27"N | 32,792255 32°47'32,12"E |
| 3.Bölge | Su/Sediman water/sediment | 39,967106 39°58'1,58"N | 32,865308 32°51'55,11"E | 9.bölge | Su water | 39,967011 39°58'1,24"N | 32,865171 32°51'54,61"E |
| 4.bölge | Su/Sediman water/sediment | 39,845220 39°50'42,79"N | 32,298216 32°17'53,58"E | 10.bölge | Su water | 39,983962 39°59'2,26"N | 32,895106 32°53'42,38"E |
| 5.bölge | Su/Sediman water/sediment | 39,791209 39°47'28,35"N | 32,373883 32°22'25,98"E | 11.bölge | Su water | 40,076046 40°4'33,77"N | 32,955033 32°57'18,12"E |
| 6.bölge | Su/Sediman water/sediment | 39,888984 39°53'20,34"N | 32,464936 32°27'53,77"E | 12.bölge | Su water | 40,224112 40°13'26,8"N | 32,025506 33°1'31,82"E |



Şekil 1. Numunelerin toplandığı istasyonlar
Figure 1. Sampling stations

Hücre Kültürü Koşulları

Gökkuşuğu alabalığı *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) gonadlarından elde edilen RTG-2 hücre hattı (ATCC; LGC Promochem, Teddington UK) 75 cm²lik flasklarda (Sarstedt, Nümbrecht, Germany), 22 °C, %10 FCS (Gibco) ve antibiyotik (penisilin-streptomisin, Gibco) içeren 10 ml Leibovitz-15 Medium

(L15) içerisinde kültür ortamında bulunduruldu. *Poeciliopsis lucida* hepatoselüler karsinom hücresi olan PLHC-1 hücre hattı ise aynı vasat koşullarında 30 °C, karbondioksitli inkübatörde geliştirildi. Deneyden bir gün önce hücreler 6 kuyucuklu (CYP1A analizi için) ya da 96 kuyucuklu plate'lere RTG2 için 30X10⁴, PLHC-1 için 45X10⁴ hücre ml⁻¹ olacak şekilde aktarıldı.

Sediman ve Su Örneklerinin Hazırlanması

Hücre kültürlerinde EROD etkinliği için toplanan sediment örnekleri oda sıcaklığında kurutulup (2 g) ve organik kirleticilerin ekstraksiyonunda yaygın kullanılan diklorometan-methanol (v:v-1/2) çözeltisi (15 ml) ilave edilerek, ultrasonik banyoda 25 °C'de 30 dk sonike edildi. Whatmann filtresi-cam pamuğu ile süzülen ekstre rotavaporda uçuruldu ve kuruyan rezidü 1 ml dimetilsülfoksitte (DMSO) çözündürüldü ve 0.22 µm enjektör filtresinden süzülerek hücre kültürlerine uygulandı (Traven ve ark., 2008; Srut ve ark., 2011).

Hücre Canlılığı Testleri

MTT, Nötral Kırmızısı ve LDH (Laktat Dehidrojenaz) testleri

96 kuyucuklu platelerde bulunan hücrelere 25 µl ilaç/numune uygulandı ve 24 saat inkübasyonun ardından Mosmann (1983) yöntemine göre MTT testi yapıldı. Nötral kırmızısı deneyi ise, 96 kuyucuklu platelerde bulunan hücrelere 10 µl ilaç numune-1 uygulanarak 24 saatlik inkübasyondan sonra Repetto ve ark. (2008)'nin kullandığı yöntemine göre yapıldı. Nötral kırmızısı deneyinde 24 saatlik inkübasyonu takiben alınan medyumlar -20 °C'de LDH testi yapılmak üzere saklandı. LDH testi ise, ChronoLab Quantitative Detection of Lactate Dehydrogenase kiti (Barselona, İspanya) kullanılarak yapıldı.

Sitotoksosite Değerlendirilmesi

Numune uygulanan hücrelerdeki sitotoksosite % olarak ifade edildi ve uygulanmayan, %100 canlı kabul edilen pozitif kontrol grubu (Maksimal Viabilite, Max V) ile %0 canlı kabul edilen, Triton-X uygulanan negatif kontrol grubuna (Minimal Viabilite, Min V) göre aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplandı (Ulukaya ve ark., 2008). IC₅₀ değerlendirilmesi, klasik sigmoid-doş modellemesine göre GraphPad Prism4 ve NCSS yazılımları kullanılarak gerçekleştirildi.

Sitotoksosite (%) = $[1 - (test - MinV) / (MaxV - MinV)] \times 100$.

EROD Etkinliği

PLHC-1 ve RTG-2 hücrelerinde CYP1A etkinliği Traven ve ark. (2008)'in belirttiği yöntemine göre yapıldı. Benzo[a]pyrene (B[a]P) pozitif kontrol olarak kullanıldı. Protein miktarı ise Bradford (1976) yöntemine göre fotometrik yöntemle belirlendi (Bradford, 1976; Traven ve ark., 2008).

İstatistiksel Değerlendirme

Seçilen veriler arasındaki yüzde sitotoksosite değerlendirmesi ve ilgili ortalamaların standart hatası (SEM: Standart Error of Mean) MS Excel (MS Office 2007) kullanılarak hesaplandı. Doş ve yüzde sitotoksosite değerleri ile regresyon eğrisi analizi SPSS 17.00 programı ve Graph Pad® Prism 4.0 programı

kullanılarak yapıldı ve en yüksek belirtme katsayısı (r²) değerlendirmeye alınarak IC₅₀ hesaplanmasında kullanılacak olan eğrinin formülü belirlendi. Hücre ve yöntem sabit kalmak üzere yüzde sitotoksosite ve numuneleri karşılaştırmak amacıyla öncelikle verilerin normal dağılıp dağılmadığı belirlenerek ve buna uygun olarak gruplar arasındaki farklılık ilgili varyans analizi ile yapılarak ve farklılıkların olması durumunda karşılaştırıldı.

BULGULAR

Numunelerin Toplanması

Bölgelerden, 1-6. bölgeler daha çok kırsal, 7-12. bölgeler ise kentsel numuneleri temsil etmektedir. Numune toplama sırasında özellikle 1. bölgeden (Ayaş-Polatlı yolu tarafında Sarıoba Köyü'ne yakın bölge) akan Ankara Çayı'nın oldukça köpüklü olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde 4. bölgeye kadar azalacak şekilde köpüklülük durumu gözlenmiştir.

Hücre Canlılığı Testleri

MTT testi

RTG2 hücre hattında Ankara Çayı su örneklerinin sitotoksik etkinliğinin aylara ve toplanılan istasyonlara göre MTT testi ile değerlendirilmesi Çizelge 2'de gösterilmiştir. Aylara göre ortalama alındığında en yüksek sitotoksik etkinlik Şubat ayında, en düşük sitotoksik ise Nisan ayında görüldü. Bölgeler olarak değerlendirildiğinde, kırsal istasyonlardan alınan numunelerin (1-6. bölgeler), kentsele göre (7-12. bölge) daha yüksek sitotoksik etki oluşturduğu gözlemlendi. PLHC hücrelerinde RTG2 hücrelerine benzer şekilde su numuneleri için, Ekim ayında sitotoksik etkinliğin azaldığı tespit edildi (Çizelge 4). Temmuz ayı sitotoksik etkinliğin en yüksek olduğu ay olarak görülürken, bunu Aralık ayı takip etmektedir. RTG2 hücre hattında en düşük sitotoksik etkinliğin sediman numuneleri için MTT testi ile kış aylarında olduğu görüldü.

Mart, Haziran ve Ekim aylarında toksik etkinliğin artmış olduğu tespit edildi. Ekim ayı RTG2 hücrelerinde en düşük toksik etkiyi oluştururken, sediman numunelerinde en yüksek sitotoksik etkiyi oluşturduğu görüldü. RTG2 hücrelerinde sediman numunelerinin sitotoksik etkinliğinin MTT testi ile değerlendirilmesi Çizelge 3'de gösterilmiştir.

LDH testi

RTG2 hücrelerinde de bahar ayları ve Eylül-Ekim dönemi sitotoksik etkinliğin arttığı ve kış mevsimine doğru azaldığı gözlenmiştir. Kırsal bölgelerdeki hücre membranı üzerinden yapılan sitotoksite değerlendirmesi, kentsel bölgelere göre daha düşük bulundu (p<0.05). RTG2 hücrelerinde en yüksek toksisitenin görüldüğü istasyon tüm aylar ortalama bulundu (p<0.05). RTG2 hücrelerinde en yüksek toksik

Çizelge 2. RTG2’de Ankara Çayı su örneklerinin sitotoksik etkinliğinin aylara ve toplanılan istasyonlara göre MTT testi ile değerlendirilmesi (Ortalama±SS).

Table 2. Evaluation of the cytotoxic efficacy of Ankara Stream water samples by MTT test according to months and collected stations in RTG2 (Mean ± SD)

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------------|-------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|
| Ocak | 16.97±0.73 | 27.38±2.31 | 17.38±0.95 | 27.82±2.84 | 19.71±0.85 | 14.93±0.67 | 15.66±1.16 | 24.88±2.27 | 38.29±2.48 | 42.26±2.38 | 42.49±5.90 | 41.56±2.01 |
| Şubat | 56.98±3.74 | 56.11±1.28 | 59.58±0.23 | 57.28±2.88 | 59.03±2.71 | 54.01±5.95 | 46.60±2.55 | 49.05±1.65 | 46.40±0.86 | 40.74±1.01 | 20.94±0.85 | 20.21±0.04 |
| Mart | 13.01±0.62 | 27.25±2.83 | 30.15±0.14 | 41.41±2.96 | 31.26±2.35 | 31.64±3.04 | 30.48±2.05 | 25.11±7.88 | 52.17±9.04 | 45.76±0.74 | 52.99±0.00 | 48.96±1.55 |
| Nisan | 17.58±1.79 | 10.51±0.58 | 12.56±0.53 | 6.97±0.88 | 18.85±0.34 | 24.42±0.08 | 20.06±0.11 | 25.81±1.37 | 22.12±1.80 | 31.29±1.61 | 19.26±0.69 | 25.33±0.03 |
| Mayıs | 17.98±0.75 | 18.57±0.55 | 17.62±0.52 | 18.15±0.64 | 19.69±1.42 | 18.91±1.14 | 27.80±0.78 | 33.11±1.25 | 25.54±0.71 | 28.41±1.16 | 18.36±0.35 | 14.67±1.65 |
| Haziran | 14.45±0.01 | 8.84±0.38 | 19.66±0.81 | 24.95±0.36 | 21.81±1.88 | 20.05±0.51 | 25.79±1.32 | 37.90±4.65 | 25.75±0.36 | 26.62±1.20 | 27.81±0.89 | 38.50±0.19 |
| Temmuz | 42.02±1.97 | 42.29±3.55 | 47.33±3.20 | 45.77±2.31 | 53.12±5.78 | 42.74±1.98 | 39.93±1.16 | 36.63±1.88 | 31.06±1.53 | 29.55±0.95 | 21.61±1.80 | 28.21±4.55 |
| Ağustos | 56.48±3.17 | 51.62±0.45 | 51.03±1.32 | 49.37±3.09 | 44.38±1.77 | 46.51±0.15 | 45.68±1.90 | 40.35±1.35 | 32.56±0.76 | 19.54±0.59 | 27.89±0.57 | 24.47±5.69 |
| Eylül | 23.79±15.43 | 51.32±8.34 | 47.92±5.36 | 37.22±3.04 | 31.94±1.53 | 18.80±1.24 | 31.27±3.30 | 33.19±4.84 | 32.71±5.26 | 18.99±0.59 | 48.82±4.20 | 6.81±2.22 |
| Ekim | 16.01±8.45 | 15.79±6.98 | 28.20±10.20 | 12.77±0.79 | 28.09±8.33 | 40.61±5.54 | 9.08±1.22 | 6.62±3.64 | 18.58±3.80 | 48.70±2.25 | 2.26±0.29 | 48.34±12.46 |
| Kasım | 52.23±0.67 | 51.99±1.15 | 51.22±2.21 | 50.94±0.24 | 49.18±1.41 | 45.92±1.45 | 43.98±0.41 | 40.14±1.25 | 37.40±2.40 | 26.04±1.24 | 28.78±0.83 | 18.71±0.56 |
| Aralık | 48.40±1.14 | 48.26±0.59 | 54.68±2.14 | 52.54±1.48 | 48.17±3.25 | 42.69±0.59 | 42.69±1.58 | 40.33±1.18 | 36.27±2.73 | 32.40±0.41 | 36.36±0.18 | 37.52±1.65 |

Çizelge 3. RTG2’de Ankara Çayı sediment örneklerinin sitotoksik etkinliğinin aylara ve toplanılan istasyonlara göre MTT testi ile değerlendirilmesi (Ortalama±SS).

Table 3. Evaluation of the cytotoxic efficacy of Ankara Stream sediment samples by MTT test according to months and collected stations in RTG2 (Mean ± SD)

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Ocak | 20.81±1.23 | 22.80±0.76 | 21.25±1.63 | 19.54±2.49 | 29.97±2.02 | 26.96±0.32 |
| Şubat | 3.15±0.31 | 13.03±2.45 | 7.17±1.27 | 5.43±0.91 | 9.07±0.65 | 3.80±0.04 |
| Mart | 45.91±1.62 | 84.40±8.94 | 87.13±4.50 | 82.65±9.16 | 87.17±4.58 | 80.22±0.00 |
| Nisan | 46.59±2.26 | 66.79±9.22 | 74.04±1.88 | 69.22±2.09 | 56.73±6.09 | 68.41±0.23 |
| Mayıs | 40.03±3.77 | 68.16±6.32 | 69.22±2.75 | 70.97±6.80 | 70.16±10.59 | 66.58±3.90 |
| Haziran | 91.01±3.07 | 78.39±3.42 | 82.31±1.92 | 71.78±7.09 | 57.37±3.46 | 39.39±4.92 |
| Temmuz | 39.26±1.71 | 38.27±1.15 | 9.56±2.82 | 46.07±0.89 | 32.63±2.13 | 43.08±2.03 |
| Ağustos | 49.14±3.75 | 48.96±3.42 | 46.46±1.89 | 38.35±5.15 | 27.93±4.11 | 44.38±0.90 |
| Eylül | 67.95±0.37 | 77.15±0.00 | 65.17±3.88 | 56.48±1.05 | 59.72±1.59 | 25.36±5.02 |
| Ekim | 90.07±2.02 | 92.92±5.40 | 82.69±4.82 | 77.37±30.78 | 47.95±5.37 | 46.46±6.63 |
| Kasım | 26.89±19.44 | 23.85±22.40 | 20.77±19.65 | 17.77±18.06 | 20.23±19.18 | 12.56±19.72 |
| Aralık | 19.44±0.49 | 22.40±0.49 | 19.65±0.42 | 18.06±0.24 | 19.18±0.79 | 19.74±0.34 |

Çizelge 4. PLHC'de Ankara Çayı su örneklerinin sitotoksik etkinliğinin aylara ve toplanılan istasyonlara göre MTT testi ile değerlendirilmesi (Ortalama±SS).

Table 4. Evaluation of the cytotoxic efficacy of Ankara Stream water samples by MTT test according to months and collected stations in PLHC (Mean ± SD)

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|--------------|------------|-------------|-------------|
| Mart | 50.76±2.09 | 42.42±4.38 | 50.85±2.20 | 51.70±10.24 | 14.20±4.54 | 17.42±0.28 | 69.70±6.18 | 53.31±5.35 | 44.41±3.91 | 44.89±5.53 | 36.74±2.49 | 16.16±1.06 |
| Haziran | 41.94±1.07 | 49.61±2.47 | 38.81±1.47 | 44.86±0.64 | 55.82±2.48 | 53.01±4.04 | 60.51±6.38 | 56.57±1.68 | 64.45±11.84 | 60.57±7.15 | 61.27±3.45 | 64.67±7.82 |
| Temmuz | 90.90±6.12 | 95.71±5.53 | 90.63±14.21 | 87.23±2.82 | 89.45±8.73 | 89.82±3.37 | 83.56±3.69 | 93.98±6.40 | 102.24±12.05 | 88.80±2.65 | 92.69±4.67 | 89.55±6.16 |
| Eylül | 34.44±2.02 | 33.36±2.95 | 40.81±1.91 | 36.17±2.17 | 46.64±3.65 | 49.88±2.84 | 35.63±1.57 | 50.63±5.64 | 57.71±4.91 | 46.48±4.04 | 62.29±3.03 | 64.08±10.83 |
| Ekim | 62.89±7.35 | 17.22±0.28 | 7.50±0.43 | 5.51±0.39 | 16.57±3.16 | 21.54±0.90 | 58.46±14.40 | 17.06±0.29 | 24.99±0.99 | 4.16±0.06 | 19.16±1.26 | 11.17±0.49 |
| Kasım | 61.65±2.53 | 54.57±3.08 | 50.47±2.03 | 66.07±7.03 | 57.06±6.37 | 56.68±4.49 | 79.51±9.77 | 76.06±8.80 | 63.10±11.21 | 41.94±6.90 | 74.01±14.22 | 54.74±5.85 |
| Aralık | 67.10±12.40 | 89.55±1.67 | 86.26±3.78 | 84.53±7.12 | 87.18±6.38 | 91.55±6.41 | 81.57±5.61 | 82.81±10.80 | 95.33±3.06 | 84.21±3.39 | 90.53±9.47 | 91.66±6.96 |

Çizelge 5. RTG2'de Ankara Çayı su örneklerinin sitotoksik etkinliğinin aylara ve toplanılan istasyonlara göre LDH testi ile değerlendirilmesi (Ortalama±SS).

Table 5. Evaluation of the cytotoxic efficacy of Ankara Stream water samples by LDH test according to months and collected stations in RTG2 (Mean ± SD)

| | Ocak | Şubat | Mart | Nisan | Mayıs | Haziran | Temmuz | Ağustos | Eylül | Ekim | Kasım | Aralık |
|----|------------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------|------------|
| 1 | 8.44±0.35 | 2.48±0.03 | 8.30±0.16 | 14.23±0.04 | 9.30±0.08 | 24.34±1.43 | 2.37±0.05 | 10.46±0.11 | 21.19±0.16 | 23.22±2.19 | 0.22±0.00 | 7.73±0.11 |
| 2 | 8.85±0.17 | 0.59±0.02 | 6.71±0.00 | 23.72±0.09 | 9.83±0.05 | 21.32±0.10 | 4.92±0.08 | 7.39±0.24 | 17.13±0.13 | 20.51±0.23 | 0.59±0.01 | 8.95±0.59 |
| 3 | 7.22±0.24 | 0.38±0.01 | 0.37±0.00 | 15.98±0.12 | 14.42±0.08 | 16.32±0.11 | 3.16±0.02 | 6.96±0.22 | 6.49±0.00 | 8.24±0.29 | 1.22±0.01 | 6.63±0.21 |
| 4 | 8.02±0.66 | 3.52±0.06 | 12.70±0.69 | 18.04±0.06 | 4.24±14.61 | 17.17±0.05 | 3.10±0.01 | 0.57±0.01 | 24.88±0.27 | 2.03±0.05 | 4.72±0.04 | 9.13±0.82 |
| 5 | 8.30±0.32 | 3.46±0.03 | 12.39±0.21 | 14.79±0.07 | 15.54±0.34 | 23.41±0.05 | 4.07±0.10 | 4.40±0.03 | 43.57±6.95 | 12.45±0.36 | 2.99±0.06 | 6.05±0.06 |
| 6 | 11.16±0.34 | 2.72±0.02 | 11.80±0.11 | 21.10±0.05 | 11.61±0.19 | 13.64±0.29 | 1.53±0.01 | 1.98±0.02 | 16.60±0.13 | 16.89±0.99 | 2.75±0.00 | 6.88±0.12 |
| 7 | 6.99±0.27 | 4.95±0.17 | 17.54±0.02 | 24.72±0.97 | 17.79±0.01 | 16.42±0.04 | 3.82±0.04 | 17.10±0.61 | 24.56±0.16 | 14.29±0.59 | 5.02±0.09 | 8.67±0.07 |
| 8 | 7.63±0.18 | 4.83±0.15 | 32.33±2.62 | 30.15±0.63 | 17.57±0.27 | 23.78±0.09 | 5.45±0.09 | 7.05±0.08 | 28.75±0.57 | 33.80±0.51 | 3.25±0.04 | 9.80±0.15 |
| 9 | 8.03±0.28 | 2.59±0.09 | 9.49±0.02 | 20.16±0.06 | 22.53±0.15 | 18.32±0.52 | 5.72±0.06 | 5.00±0.04 | 30.71±0.61 | 31.43±0.16 | 3.69±0.04 | 7.90±0.07 |
| 10 | 9.85±0.09 | 4.54±0.15 | 15.14±0.11 | 11.67±0.26 | 8.96±0.19 | 12.95±0.12 | 9.87±0.36 | 7.58±0.14 | 26.34±0.50 | 30.81±0.40 | 8.12±0.16 | 13.51±0.28 |
| 11 | 9.91±0.37 | 3.41±0.12 | 12.55±0.21 | 2.28±0.09 | 9.99±0.06 | 21.79±0.49 | 10.56±0.25 | 8.37±0.15 | 33.08±0.84 | 19.35±0.16 | 5.09±0.02 | 13.33±0.47 |
| 12 | 8.42±0.28 | 6.48±0.26 | 22.19±1.41 | 17.45±0.60 | 13.14±0.24 | 21.19±0.30 | 3.88±0.01 | 13.50±0.22 | 42.48±0.29 | 13.45±0.17 | 4.49±0.05 | 12.38±0.30 |

sitenin görüldüğü istasyon tüm aylar ortalama olarak değerlendirildiğinde, şehir merkezinde (Aydınlıkevler) bulunan 8 numaralı istasyondan alınan su numunesi en yüksek sitotoksik etkinliği göstermiştir (Çizelge 5) PLHC hücrelerinin üremesinde yaşanan sıkıntılar nedeniyle sadece belirli aylarda uygulama yapılabilmiştir. Primer karaciğer hücresindeki

sonuçlara benzer şekilde Ekim ve Aralık numuneleri balık karaciğer hücre hattında da düşük toksik etki gösterdi; ancak Eylül ayında farklı olarak hücre hattında daha yüksek toksisite gözlemlendi. Uygulama yapılan ayların ortalamaları alınarak değerlendirildiğinde ise en yüksek toksisite 2. bölgede gözlemlendi (Çizelge 6).

Çizelge 6. RTG2'de Ankara Çayı sediment örneklerinin sitotoksik etkinliğinin aylara ve toplanılan istasyonlara göre LDH testi ile değerlendirilmesi (Ortalama±SS).

Table 6. Evaluation of the cytotoxic efficacy of Ankara Stream sediment samples by LDH test according to months and collected stations in RTG2 (Mean ± SD)

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|----------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|
| Ocak | 17.32±0.78 | 32.90±1.06 | 6.93±0.18 | 30.30±0.63 | 46.75±0.84 | 45.45±1.36 |
| Şubat | 32.90±0.52 | 27.27±0.53 | 39.83±0.13 | 20.78±0.59 | 35.50±0.47 | 38.10±0.32 |
| Mart | 15.25±0.67 | 9.22±0.01 | 10.38±0.01 | 10.47±0.27 | 9.17±0.21 | 10.74±0.15 |
| Nisan | 16.63±0.46 | 6.78±0.02 | 9.11±0.05 | 9.35±0.05 | 16.89±0.31 | 8.27±0.06 |
| Mayıs | 19.15±0.31 | 6.41±0.06 | 26.64±1.84 | 7.49±0.10 | 5.12±0.01 | 8.90±0.00 |
| Haziran | 8.34±0.28 | 10.85±0.56 | 8.08±0.20 | 5.32±0.07 | 7.52±0.26 | 11.59±0.13 |
| Temmuz | 20.35±0.66 | 18.18±0.35 | 25.54±0.25 | 45.45±0.46 | 46.75±0.76 | 18.61±0.25 |
| Ağustos | 46.32±0.47 | 42.86±0.09 | 42.86±0.26 | 51.08±0.21 | 54.98±0.11 | 52.38±0.22 |
| Eylül | 2.62±2.62 | 7.06±7.06 | 5.17±5.17 | 4.63±4.63 | 16.90±16.90 | 6.35±6.35 |
| Ekim | 4.48±4.48 | 4.10±4.10 | 5.59±5.59 | 3.83±3.83 | 2.03±2.03 | 9.89±9.89 |
| Kasım | 17.75±0.15 | 28.14±0.04 | 15.58±0.48 | 28.14±0.09 | 34.20±0.48 | 11.69±0.17 |
| Aralık | 30.74±0.36 | 29.44±0.21 | 34.63±0.22 | 22.73±2.93 | 22.08±1.18 | 37.66±0.38 |

Sediman örneklerindeki sitotoksik etkinliğin su örneklerinden farklı olarak Mart, Nisan, Mayıs, Haziran gibi bahar aylarında daha düşük olduğu, buna karşın Temmuz ve Ağustos aylarında artmış olduğu tespit edildi. Bu durum ilaç-kimyasal madde ile bulaşıklığın sedimanda birikmesi olarak değerlendirilebilir. Bölgeler arasındaki sitotoksikite farklı genel anlamda anlamsız bulunurken (5. bölge dışında, $p>0.05$), dönem olarak en düşük toksik etkinliğin sudakinin aksine Eylül ve Ekim ayları olduğu görülmektedir (Çizelge 7).

RTG2 hücresi sediman örneklerinin Nisan, Mayıs, Haziran ile Eylül, Ekim aylarında daha düşük toksisite oluşturdu. Bölgeler arası ortalamalar tüm aylara göre değerlendirildiğinde en düşük etkinliğin 2. bölgede olduğu gözlemlendi. Sitotoksik etkinliğin %100'lere varacak derecede yüksek olması, çevrede araştırmamızda belirlenen kalıcı organik kirleticilerin dışında başka kirleticilerin varlığını desteklemektedir (Çizelge 7).

Nötral kırmızı testi

PLHC1'de Ankara Çayı su örneklerinin sitotoksik etkinliğinin aylara ve toplanılan istasyonlara göre Nötral Kırmızı testi ile değerlendirilmesi Çizelge 5'de gösterilmiştir. PLHC1'de araştırılan aylar içerisinde en yüksek sitotoksik etkinlik Temmuz ayında görülmüştür, bunu Aralık ayı takip etmektedir. En düşük sitotoksik etkinlik ise; LDH ile yapılan test sonuçlarına benzerlik oluşturacak şekilde Ekim ayında gözlemlendi. Aralık ayında LDH'nın düşük, Nötral Kırmızı değerlerinin yüksek olması, membran bütünlüğünü bozmayan ancak lizozomal zarıya neden

olabilecek kirleticilerin varlığını düşündürmektedir. Bölgesel değerlendirildiğinde; kırsal olarak değerlendirilen (1-6 bölge istasyonlarını kapsayan) bölgelerde araştırılan ayların ortalaması %54.29 iken, kentsel kesimlerde (7-12. bölge istasyonları) bu değer %60.75'e çıkmaktadır. Dolayısıyla karaciğer hücre hattında lizozomal hasarın kentsel kesimlerden alınan numunelerde daha yüksek olduğu görülmektedir.

RTG2 gonadal hücre hattında su numunelerinin sitotoksik etkilerinin Nötral Kırmızı testi ile değerlendirmesinde (Çizelge 6) kentsel bölgelerde sitotoksik etkinliğin kırsala göre daha yüksek olduğu görüldü. En düşük sitotoksik etkinlik Ağustos ayında görülürken (Ağustos 12.bölgeden alınan numune %7.2) , en yüksek sitotoksik etkinlik Şubat ayı 12. bölgede görüldü (%105.67).

LDH testine benzer şekilde sediman örneklerinde RTG2 hücre hatlarında Nötral Kırmızı ile yapılan analize göre sitotoksik etkinlik oldukça düşük bulundu. Aralık ayı en düşük sitotoksikitenin gözlemlendiği ay idi. En yüksek sitotoksik etkinlik ay olarak Mayıs, Haziran aylarında, istasyon olarak 1. ve 2. bölgelerde gözlemlendi. En düşük sitotoksikite ise Eylül ayı 6. bölgeden alınan numunede gözlemlendi. RTG2 hücre hattında Ankara Çayı sediman örneklerinin sitotoksik etkinliğini Çizelge 7'de gösterildi.

EROD Etkinliği

CYP1A ile katalize olan EROD etkinliğinin değerlendirilmesinde; çalışılan tüm hücrelerde, bir saat boyunca 15 dakika aralıklarla yapılan ölçümlerde floresan yoğunluğunun artışı, deneyin düzgün

çalıştığını göstermiştir. Standart olarak kullanılan Bisfenol A ile de kontrol değerlendirmeleri ayrıca yapılmıştır (Çizelge 10). Ön denemelerde, PLHC hücrelerine (morfolojileri bozulmadan, kontamine olmadan önce), CYP1A1 etkinliği olduğu bilinen Benzo(a)pyrene ve 2,3,7,8-TCC (dioksin) standartları uygulanmış ve IC₅₀ tespitleri yapılmıştır. Buna göre dioksinin IC₅₀ değeri 197.23 nM (0.0537 ppb), Benzo(a)pyrene'inki ise 131.29 µM (35.76 ppb) bulundu. Ancak hücrelerde oluşan sıkıntılar nedeniyle araştırmalara bu hücre hattında devam edilemedi.

RTG2 hücrelerinde kentsel bölgelerden alınan su örneklerinin EROD etkinliği kırsal bölgelere göre daha yüksek bulundu. En düşük EROD etkinliği aylar ortalaması üzerinden değerlendirildiğinde 3. bölge olarak tespit edildi; en yüksek ay ise bölgeler ortalaması değerlendirildiğinde Nisan olarak tespit edildi. En düşük EROD, Temmuz ayı 3. istasyondan alınan örnekte tespit edilirken (0.32 pmol mg⁻¹), en yüksek etkinlik Ocak ayı 4. istasyondan alınan numunede (53.63 pmol mg⁻¹) tespit edildi (Çizelge 8).

RTG2 hücrelerinde sediman numunelerinin EROD etkinliğinin bölgeler ortalaması değerlendirildiğinde en düşük sitotoksik etkinlik Nisan ayında görülürken, en yüksek etkinliğin Mayıs ayında olduğu tespit edildi. Bölgeler arasında 6. bölgenin en düşük EROD etkinliği gösterdiği tespit edildi. En düşük EROD etkinliği Ağustos ayı 5. istasyondan alınan numunede gözlenirken (0.76 pmol ml⁻¹), en yüksek etkinlik %75.07 ile Eylül ayı yine 5. bölge istasyonundan alınan numunede gözlendi (Çizelge 9).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Su sistemleri kentsel ve tarımsal dönüşüm sırasında oluşan kimyasallarla, evsel ve endüstriyel atıklarla, hidrolojik ve atmosferik işlemler sonrasında oluşan ksenobiyotiklerin deşarj edildiği dev bulaşık çukurları oluşturmaktadır. Çevredeki organizmalar tarafından alınan ksenobiyotiklerin çoğu kimyasal stabilitesi ve metabolik yıkımlanmaya dirençli olması nedeniyle, farklı sucul ortamlarda birikmektedir. Bu kimyasalların içerisinde Poliaromatik hidrokarbonlar (PAH'lar), poliklorlu bifeniller (PCB'ler), pestisitler, alkiltin bileşikler ve ağır metal (Pb, Hg, Cd gibi) gibi maddeler bulunur. Bu maddelerin çoğu lipofilik özellikte olması nedeniyle diğer sucul canlılar için ise kümülatif toksik etki oluşturmaktadır (Boyuneğmez, 2004; Bols ve ark., 2005).

Ekotoksikoloji çalışmalarında hücre kültürü testleri önemlidir. Hücre kültürü testleri hücresel düzeyde etki mekanizmalarının anlaşılması, duyarlılıklarının karşılaştırılması, çoklu deneme testlerinin yapılabilmesi ve karşılaştırılması açısından uygundur (Bols ve ark., 2005). Ayrıca hücre kültürü testleri sitotoksosite, CYP1A indüksiyonu, östrojenik etkilerin incelenmesi amacıyla kullanıldığı gibi özel enzimlerin indüksiyonu ve mRNA analizleri *in vivo* toksik etki

değerlendirmesinde de kullanılabilir (Traven ve ark., 2008). Balıklarda sitokrom p450 enzimleri, kirliliklerin değerlendirilmesinde biyomarker olarak kullanılır. Bu enzimler arasında, CYP1 ailesi en duyarlı indikatörlerdir (Machala ve ark., 1997, 2001). Balıklarda bulunan CYP1A ailesi moleküler özellikleri, biyokatalitik etkinlikleri, immunolojik özellikleri ve gen regülasyonu bakımından memeli CYP1A ailesine benzer özellikler taşır (Segner ve ark., 1994). Özellikle etoksirezorufinden 7-hidroksietoksirezorufine dönüştürülmesini katalize eden EROD etkinliği ve aril hidrokarbon hidroksilaz (AHH) ile ilişkilendirilir (Siroka ve Drastichova, 2004; Bols ve ark., 2005). Bu nedenlerle balık hücre hatları ksenobiyotik metabolizmasında ve enzimlerinde çalışmak için uygundur (Segner ve ark., 1994). CYP1A düzeyi ortamda kirleticilerin yüksek konsantrasyonlarda olması ve P450 inhibe edici maddelerin (Cu, Zn, Pb, Cd, Ni gibi) bulunması durumlarında değişiklik göstermezken (Machala ve ark., 1997); poliaromatik hidrokarbonlar ve azotlu poliaromatik hidrokarbonlar, poliklorlubifeniller, dioksinler ve bazı pestisitlerin varlığında artmaktadır (Siroka ve Drastichova, 2004).

Türkiyede sediman ve su numunelerinde bu kirleticilerin aranmasına yönelik çalışmalar sürdürülmektedir (Gedik ve İmamoğlu, 2011, 2013). Sedimanda bulunan kirleticilerin sadece kimyasal karakterizasyonuna dayalı testlerle değerlendirilmesi, bu kirleticilerin birlikte etkilerinin ekotoksikolojik potansiyel riskleri açıdan incelenmesinde yetersiz kalmaktadır (Özmen ve ark., 2006). Toplanan çevresel materyallerin potansiyel etkilerinin bir bütün olarak incelenmesinde *in vitro* testler aşamasında hücre kültürleri yer almaktadır. Sedimanların balık hücre kültürleri üzerinde sitotoksikite değerlendirmesinde CHSE, EPC ve RTG-2 balık hücre kültürleri karşılaştırılması sonucunda RTG-2 hücrelerinin ozmolarite artışına daha dayanıklı olduğu ve sitotoksikite deneylerinde kullanılabileceği gösterilmiştir (Davoren, 2005).

Toksik bileşenler, genellikle hücrelerin metabolik mekanizmasını etkiler. Bazı kimyasallar özellikle hücre mitokondrilerini etkilemekte ve MTT testi ile değerlendirilmekte, bazıları da lizozomal fonksiyonları etkilemekte ve nötral kırmızı testi ile değerlendirilmektedir (Barile, 1994; Butler, 2004). Hücre ölümünü tanımlayan en önemli yöntemler arasında, membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerden hücresel içeriklerin kültür ortamına geçtiği enzimatik yöntemler bulunmaktadır. *In vitro* modellerde en yaygın kullanılan enzim salınmasına dayanan sitotoksikite testleri arasında LDH tayini bulunmaktadır (Butler, 2004; Fotakis ve Timbrell, 2006).

Ankara Çayı'nda kirlilik gösteren çeşitli araştırmalar (Kazancı ve Girgin, 1998; Karakoç ve ark., 2003; Atıcı

Çizelge 7. PLHC'de Ankara Çayı su örneklerinin sitotoksik etkinliğinin aylara ve toplanılan istasyonlara göre LDH testi ile değerlendirilmesi (Ortalama±SS).

Table 7. Evaluation of the cytotoxic efficacy of Ankara Stream water samples by LDH test according to months and collected stations in PLHC (Mean ± SD)

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|
| Nisan | 90.61±0.65 | 84.68±1.54 | 81.38±1.39 | 80.40±1.25 | 88.63±1.37 | 68.53±8.22 | 86.33±1.26 | 99.84±3.43 | 83.69±3.54 | 93.90±1.99 | 83.03±4.44 | 90.61±2.27 |
| Mayıs | 49.67±0.77 | 78.49±1.56 | 36.84±1.07 | 38.97±0.55 | 28.27±0.61 | 15.09±0.29 | 25.39±0.28 | 25.49±0.31 | 16.26±0.27 | 34.34±1.44 | 45.08±0.40 | 62.85±1.73 |
| Haziran | 22.77±0.14 | 24.64±0.46 | 35.35±0.60 | 34.78±0.58 | 28.78±0.45 | 29.50±3.73 | 27.12±0.36 | 12.42±0.43 | 17.49±0.78 | 25.16±0.54 | 27.43±1.48 | 29.50±0.71 |
| Eylül | 79.74±0.49 | 117.63±1.62 | 53.71±0.06 | 55.68±7.22 | 87.64±0.50 | 90.61±1.30 | 52.39±0.21 | 87.97±0.40 | 87.64±0.39 | 89.29±0.45 | 100.16±0.52 | 90.28±0.84 |
| Ekim | 25.39±16.85 | 47.92±0.21 | 12.42±15.75 | 52.35±4.09 | 20.65±0.76 | 44.94±1.09 | 14.89±2.64 | 36.71±0.59 | 24.36±0.37 | 34.24±0.64 | 27.03±0.40 | 31.97±0.96 |
| Aralık | 35.66±2.33 | 6.31±4.01 | 63.01±13.45 | 61.11±3.80 | 28.57±2.23 | 30.85±3.36 | 42.86±3.01 | 21.79±2.25 | 28.62±1.07 | 23.76±2.47 | 23.12±1.71 | 24.91±3.38 |

Çizelge 8. RTG2'de Ankara Çayı su örneklerinin EROD etkinliğinin aylara ve toplanılan istasyonlara göre değerlendirilmesi.

Table 8. Evaluation of the EROD activity of Ankara Stream water samples according to months and collected stations in RTG2 (Mean ± SD)

| | Ocak | Şubat | Mart | Nisan | Mayıs | Haziran | Temmuz | Ağustos | Eylül | Ekim | Kasım | Aralık |
|-----------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|
| 1 | 28.40±3.29 | 18.13±1.70 | 11.37±1.06 | 31.69±1.96 | 14.01±0.94 | 11.89±0.40 | 47.04±3.18 | 1.85±0.63 | 16.62±3.51 | 14.20±1.06 | 8.35±1.71 | 32.57±2.06 |
| 2 | 31.49±8.83 | 4.78±2.82 | 3.86±1.19 | 22.62±1.55 | 29.64±0.06 | 4.42±0.03 | 21.92±3.37 | 10.41±4.45 | 31.64±1.85 | 5.80±3.60 | 14.67±2.32 | 12.36±0.60 |
| 3 | 15.92±0.86 | 8.53±2.64 | 29.91±1.86 | 6.09±1.49 | 17.39±3.23 | 6.09±0.35 | 0.32±3.85 | 0.25±0.13 | 7.43±1.63 | 16.09±3.48 | 9.73±2.43 | 21.81±1.45 |
| 4 | 53.63±3.96 | 2.34±0.20 | 63.54±1.25 | 7.80±1.50 | 19.80±3.15 | 10.15±2.72 | 20.15±4.44 | 41.41±3.00 | 52.21±4.38 | 11.57±2.05 | 50.72±2.41 | 12.83±2.88 |
| 5 | 18.84±5.88 | 0.98±0.02 | 5.83±1.14 | 29.06±2.91 | 13.11±0.59 | 39.40±1.50 | 13.18±2.99 | 19.21±8.82 | 2.75±1.89 | 16.55±1.37 | 14.81±.32 | 26.90±2.24 |
| 6 | 11.42±0.67 | 16.36±3.71 | 13.27±2.59 | 38.39±7.38 | 41.90±0.65 | 24.62±1.04 | 30.25±3.46 | 11.55±0.99 | 38.84±1.94 | 30.39±2.41 | 22.39±7.27 | 11.12±5.89 |
| 7 | 22.70±1.14 | 0.40±0.04 | 17.84±1.59 | 49.14±6.31 | 45.57±0.13 | 4.01±2.76 | 25.83±1.41 | 12.30±7.15 | 42.90±1.45 | 18.86±1.29 | 10.98±1.97 | 2.21±0.98 |
| 8 | 8.88±1.55 | 2.71±0.80 | 38.80±0.79 | 46.42±10.18 | 47.67±3.80 | 23.08±1.03 | 4.10±0.89 | 28.63±4.41 | 2.49±2.07 | 9.58±1.45 | 39.67±0.63 | 27.13±0.46 |
| 9 | 41.94±0.56 | 15.63±0.00 | 29.28±0.20 | 92.84±13.78 | 95.87±3.35 | 15.85±0.87 | 6.30±1.69 | 4.61±1.72 | 50.67±0.55 | 26.91±4.51 | 3.58±5.90 | 24.95±1.69 |
| 10 | 36.08±2.10 | 45.27±0.19 | 16.83±2.92 | 27.14±1.82 | 24.32±1.47 | 32.86±2.86 | 20.29±4.72 | 12.40±1.16 | 5.34±0.63 | 9.85±1.99 | 1.64±0.41 | 59.66±5.18 |
| 11 | 42.73±2.47 | 17.73±4.27 | 0.22±0.15 | 36.03±2.96 | 33.58±2.92 | 3.40±0.69 | 28.80±5.62 | 24.27±1.43 | 13.17±0.88 | 18.48±7.40 | 15.99±7.41 | 11.83±0.36 |
| 12 | 1.30±4.70 | 18.47±2.53 | 33.62±1.23 | 14.66±2.45 | 10.75±2.16 | 22.54±0.19 | 28.62±4.47 | 9.54±2.59 | 12.33±3.83 | 58.90±10.34 | 11.31±3.62 | 12.64±3.50 |

Çizelge 9. RTG2'de Ankara Çayı sediment örneklerinin EROD etkinliğinin aylara ve toplanılan istasyonlara göre değerlendirilmesi.

Table 9. Evaluation of the EROD activity of Ankara Stream sediment samples according to months and collected stations in RTG2 (Mean ± SD)

| | Ocak | Şubat | Mart | Nisan | Mayıs | Haziran | Temmuz | Ağustos | Eylül | Ekim | Kasım | Aralık |
|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | 30.07±5.98 | 10.47±2.47 | 34.34±4.35 | 2.95±0.54 | 44.57±1.55 | 12.94±5.86 | 1.83±0.18 | 60.25±2.89 | 39.47±3.01 | 35.25±3.73 | 13.84±3.05 | 24.51±1.27 |
| 2 | 32.80±4.82 | 37.26±1.12 | 53.42±9.50 | 24.38±4.01 | 40.13±1.66 | 13.14±0.10 | 9.74±1.13 | 0.32±0.25 | 2.27±4.85 | 12.70±1.25 | 24.52±1.73 | 15.21±1.17 |
| 3 | 44.79±4.04 | 33.51±6.54 | 54.47±3.21 | 7.81±8.68 | 40.81±1.93 | 5.50±1.49 | 21.40±2.22 | 20.59±1.66 | 18.55±3.89 | 35.78±0.52 | 25.09±1.63 | 8.19±4.12 |
| 4 | 15.57±5.97 | 2.52±5.23 | 16.11±5.20 | 15.04±2.02 | 40.12±3.81 | 29.91±4.04 | 14.09±2.24 | 20.09±1.38 | 37.45±1.83 | 62.75±2.41 | 1.27±0.71 | 32.30±2.14 |
| 5 | 14.10±3.08 | 20.07±2.31 | 43.40±3.94 | 1.95±0.27 | 45.51±2.83 | 45.32±2.46 | 16.89±1.95 | 0.76±0.36 | 75.07±2.90 | 18.91±2.53 | 30.88±2.39 | 14.57±2.33 |
| 6 | 30.62±5.58 | 12.63±2.16 | 28.56±8.30 | 11.82±2.30 | 35.36±3.50 | 24.13±4.69 | 8.62±4.39 | 16.45±4.87 | 28.03±1.91 | 5.67±1.71 | 32.00±8.22 | 2.11±0.57 |

Çizelge 10. Standart olarak kullanılan Bisfenol A'nın EROD etkinliği/kinetik değerlendirilmesi (RTG2)
Table 10. EROD activity / kinetic evaluation of Bisphenol A used as standard (RTG2)

| µM | Ortalama Değer (Mean value) | | | | Standart Sapma (Standart Deviation (SD)) | | | |
|-------|-----------------------------|--------|--------|--------|------------------------------------------|-------|-------|-------|
| | 0 | 15 | 30 | 60 | 0 | 15 | 30 | 60 |
| 0.428 | 39.458 | 41.611 | 42.169 | 44.202 | 5.189 | 4.390 | 5.127 | 5.918 |
| 0.856 | 54.644 | 53.159 | 52.481 | 52.948 | 5.068 | 4.212 | 6.615 | 2.908 |
| 1.711 | 56.090 | 54.697 | 53.643 | 53.234 | 4.934 | 4.417 | 7.446 | 3.602 |
| 3.422 | 58.401 | 56.897 | 55.336 | 59.848 | 4.132 | 3.412 | 1.862 | 1.027 |
| 6.844 | 58.648 | 57.230 | 60.838 | 57.244 | 1.791 | 1.164 | 3.392 | 3.443 |

ve Ahıska, 2005; Gedik ve İmamoğlu, 2013; Özyürek ve ark., 2013) ile Ankara'da atık su ve Ankara Çayı'na ilişkin rehabilitasyon çalışmaları yapılmıştır (Gökalp ve ark., 2011, Timur ve Barış, 2014). 2012 yılı itibarıyla, Ankara'da hizmet veren 10 Organize Sanayi Bölgesi'nden dört tanesinin atık su tesisinin olmadığı, üç tanesinde ASKİ'yle ortak çalışma yapıldığı, diğer üç tanesinin de ASKİ'nin arıtma tesisini kullandığı bildirilmiştir (Anonim, 2012). Bunun üzerine, Sincan Organize Sanayi Bölgesi (SOSB) için atıksu arıtma tesisi yapımı için önerge Meclis'e Ekim 2012 yılında verilmiş, planlamalar 2013 yılında yapılarak Mart 2014 yılında kullanılmaya başlanmıştır. Organize sanayi bölgelerinde güç kaynakları, transistörler boya ve kimyasallar, ambalaj, inşaat, plastik malzemeler, makine ve elektrikli cihazlar gibi pek çok alanda üretim yapılmaktadır. Elektrik endüstrisinde PCB'ler, endüstriyel tranformer ve kapasitörlerde soğutucu amaçlı yanmayan materyal olarak mineral yağların yerini almıştır. Düşük yanıcı ve yüksek dielektrik sabitesi yüzünden de pek çok endüstriyel alanda (endüstriyel yağlar da dahil olmak üzere) kullanılmaktadır (UNEP, 1999). Ayrıca, düşük gaz basıncı olması nedeniyle, PCB'ler hidrosferde birikebilmekte organizmalarda biyoakümüle olabilmektedir.

Sonuç olarak Ankara Çayı'ndan alınan su ve sediman örnekleri balık hücrelerinde çeşitli düzeylerde sitotoksik etkinlik göstermiştir. Bu etkinlik numune alınan bölge ve döneme göre değişkenlik göstermektedir. Endüstri, evsel ve tarım atıklarının olduğu ve iyileştirme çalışmalarının devam ettiği Ankara Çayı'nda dönemsel görülen bu farklılıklar özellikle tarımda kullanılan pestisitlerin su ve sedimandaki konsantrasyonlarına bağlı olabilmektedir. Değerlendirme için farklı sitotoksikite testlerinin (lizozomal etkinlik için Nötral Kırmızı, mitokondriyal hasar için MTT, hücre membran hasarı için LDH) ve ksenobiyotik varlığında indüklenen CYP1A etkinliğini gösteren EROD testlerinin birlikte kullanılması daha sağlıklı sonuçlar vermektedir.

TEŞEKKÜRLER

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nce 13B3338010 numaralı

proje ile desteklenmiştir.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

KAYNAKLAR

- Anonim 2012. OSB'de Atık Su Sancısı. <http://www.hurriyet.com.tr/osb-de-atik-su-sancisi-21957791> (Erişim Tarihi: 18.04.2019.)
- Atıcı T, Ahıska S 2005. Pollution and algae of Ankara stream. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi 18(1): 51-59.
- Babin MM, Tarazona JV 2005. In vitro toxicity of selected pesticides on RTG-2 and RTL-W1 fish cell lines. Environ Polut 135(2):267-274.
- Baksi SM, Frazier JM 1990. Isolated fish hepatocytes—model systems for toxicology research. Aquat Toxicol 16(4):229-256
- Barile FA 1994. Introduction to In Vitro Cytotoxicology: Mechanisms and Methods. New York: CRC Press, p.: 33-43.
- Behrens A, Schirmer K, Bols NC, Segner H 2001. Polycyclic aromatic hydrocarbons as inducers of cytochrome P4501A enzyme activity in the rainbow trout liver cell line, RTL-W1 and in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. Environ Toxicol Chem 20(3) :632-643.
- Bols NC, Dayeh VR, Lee LEJ, Schirme K 2005. Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. Piscine cell lines in environmental toxicology. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes 6: 43-84.
- Boyuneğmez T 2004. Biochemical monitoring of toxic and carcinogenic organic pollutants along the Izmir bay after the great canal project and possible health effects. ODTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2 syf.
- Bradford MM 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

- Bruschweiler BJ, Wurgler F, Fent K 1996. An ELISA for the determination of cytochrome P4501A in fish cell cultures. *Environ Toxicol Chem* 15:592-596
- Butler M 2004. *Animal Cell Culture and Technology*, Taylor & Francis, New York p.: 32-33.
- Clemons JH, Dixon DG, Bols NC 1997. Derivation of 2,3,7,8-TCDD toxic equivalency factors (TEFs) for selected dioxins, furans and PCBs with rainbow trout and rat liver cell lines and the influence of exposure time. *Chemosphere* 34 (5-7):1105-1119.
- Cravedi JP, Paris A, Monod G, Devaux A, Flouriot G, Valotaire Y 1996. Maintenance of cytochrome P450 content and phase I and phase II enzyme activities in trout hepatocytes cultured as spheroidal aggregates. *Comp Biochem Physiol C* 113(2):241-246.
- Davoren M, Shúilleabháin SN, Hartl MGJ, Sheehan D, O'brien NM, O'halloran J, Van Pelt FN, Mothersill C 2005. Assessing the potential of fish cell lines as tools for the cytotoxicity testing of estuarine sediment aqueous elutriates. *Toxicol In Vitro* 19(3): 421-31.
- Devaux A, Pesonen M, Monod G, Andersson TB 1992. Gluco-corticoid- mediated potentiation on P450 induction in primary culture of rainbow trout hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 43(4):898-901
- Dubois M, Plaisance H, Thome JP, Kremers P 1996. Hierarchical cluster analysis of environmental pollutants through P450 induction in cultured hepatic cells. *Ecotoxicol. Environ. Saf* 34(3): 205-215.
- Eichbaum K, Brinkmann M, Buchinger S, Reifferscheid G, Hecker M, Giesy JP, Engwall M, Van Bavel B, Hollert H 2014. In vitro bioassays for detecting dioxin-like activity—Application potentials and limits of detection, a review. *Science of the Total Environment* 487: 37-48.
- Fent K 2007. Permanent Fish Cell Cultures as Important Tools in Ecotoxicology. *ALTEX* 24(8): 26-28.
- Fotakis G, Timbrell JA 2006. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters* 160 (2): 171-177.
- García-Tavera JL, Valdés-Lozano D, Poblete-Naredo I, Albores-Medina A, Zapata-Pérez O 2013. Bile benzo[a]pyrene concentration and hepatic CYP1A induction in hypoxic adult tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chemosphere* 92 (1):16-23.
- Gedik K, Imamoglu I 2011. Assessment of temporal variation and sources of PCBs in the sediments of Mediterranean Sea, Mersin Bay, Turkey. *Marine Pollution Bulletin* 62(1): 173-177.
- Gedik K, Imamoglu I. 2013. Levels, Distribution, and Sources of Polychlorinated Biphenyls in Sediments of Lake Eymir, Turkey. *Arch Environ Contam Toxicol* 65(2): 203-211.
- Gökalp Z, Tas I, Ozkay F, Akgül S 2011. Wastewater use in irrigation-Ankara case study. *African Journal of Agricultural Research* 67(7): 1807-1812.
- Hahn ME, Woodward BL, Stegeman JJ, Kennedy SW 1996. Rapid assessment of induced cytochrome P4501A protein and catalytic activity in fish hepatoma cells grown in multiwell plate: response to TCDD, TCDF and two planar PCBs. *Environ Toxicol Chem* 15 (4):582-591
- Huuskonen SE, Tuvikene A, Trapido M, Fent K, Hahn ME 2000. Cytochrome P4501A induction and porphyrin accumulation in PLHC-1 fish cells exposed to sediment and oil shale extracts. *Archives of environmental contamination and toxicology* 38(1): 59-69.
- Isomaa B, Lilius H 1995. The urgent need for in vitro tests in ecotoxicology. *Toxic In Vitro* 9(6):821-825
- Karakoç G, Erkoç FU, Katircioglu H 2003. Water quality and impacts of pollution sources for Eymir and Mogan Lakes (Turkey). *Environ Int* 29(1): 21-27.
- Kazancı N, Girgin S 1998. Distribution of Oligocheta species as bioindicators of organic pollution in Ankara Stream and their use in biomonitoring. *Turkish Journal of Zoology* 22: 83-87.
- Machala M, Nezveda K, Petrivalsky M, Jarosova A, Piacka V, Svobodova Z 1997. Monooxygenase activities in carp as biochemical markers of pollution by polycyclic and polyhalogenated aromatic hydrocarbons: choice of substrates and effects of temperature, gender and capture stress. *Aquatic Toxicology* 37: 113-123.
- Machala M, Vondracek J, Blaha L, Ciganek M, Neca J 2001. Aryl hydrocarbon receptor mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using in vitro reporter gene assay. *Mutation Research* 497: 49-62.
- Mosmann T 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
- Özmen M, Gungordu A, Kucukbay FZ, Guler RE 2006. Monitoring the effects of water pollution on *Cyprinus carpio* in Karakaya Dam Lake, Turkey. *Ecotoxicology* 15: 157-69.
- Pesonen M, Goksoyr A, Andersson T 1992. Expression of P4501A1 in a primary culture of rainbow trout hepatocytes exposed to b-naphthoflavone or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Arch Biochem Biophys* 292(1):228-233
- Repetto G, Del Peso A, Zurita JL 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, 3(7): 1125-1131.
- Scholz S, Segner H 1999. Induction of CYP1A in primary cultures of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver cells: Concentration-response relationships of four model substances.

- Ecotoxicology and environmental safety 43(3): 252-260.
- Segner H, Lenz D, Hanke W, Schuurmann G 1994. Cytotoxicity of metals toward rainbow trout R1 cell line. *Environ. Toxicol. Water Quality* 9(4): 273–279.
- Sijm DTHM, Schaap G, Opperhuizen A 1993. The effect of the biotransformation inhibitor piperonylbutoxide on the bioconcentration of 2,8-dichlorodibenzo-P-dioxin and pentachlorobenzene in goldfish. *Aquat. toxicol* 27 (3-4): 345-360.
- Siroka Z, Drasticova J 2004. Biochemical Markers of Aquatic Environment Contamination - Cytochrome P450 in Fish. A Review. *Acta Veterinaria Brno* 73 (1): 123-132.
- Suares-Rocha P, Braunbeck T, De Angelis DDF, Marin-Morales MA 2015. Assessment of cytotoxicity and AhR-mediated toxicity in tropical fresh water sediments under the influence of an oil refinery. *Environmental Science and Pollution Research* 22(16), 12566-12575.
- Timur UP, Barış ME 2014. Greenway Planning Based on River for Sustainable Cities: An Example of Ankara City. *International Journal of Natural and Engineering Sciences* 8(2): 35-41.
- Traven L, Zaja R, Loncar J, Smital T, Mićović V 2008. CYP1A induction potential and the concentration of priority pollutants in marine sediment samples--in vitro evaluation using the PLHC-1 fish hepatoma cell line. *Toxicol In Vitro* 22 (6): 1648-56.
- Ulukaya E, Ozdikicioglu F, Oral AY, Demirci M 2008. The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicology in vitro* 22(1): 232–239.
- UNEP 1999. United Nations Environmental Program. Guidelines for the Identification of PCBs and Materials Containing PCBs.: 40
- Uno T, Ishizuka M, Itakura T 2012. Cytochrome P450 (CYP) in fish. *Environ Toxicol Pharmacol* 34(1):1–13.
- White RD, Shea D, Solow AR, Stegeman JJ 1997. Induction and post-transcriptional suppression of hepatic cytochrome P450 1A1 by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl. *Biochem Pharmacol* 53(7): 1029–1040.