



**OKADAİK ASİTİN ZEBRA BALIĞI  
EMBRIYOLARINDA MEYDANA GETİRDİĞİ  
İMMUNFLORASANS DEĞİŞİKLİKLER**

**Hatice OĞUŞ**

**Yüksek Lisans Tezi  
Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı  
Doç. Dr. Ahmet TOPAL  
2023**

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

**OKADAİK ASİTİN ZEBRA BALIĞI EMBRİYOLARINDA MEYDANA GETİRDİĞİ  
İMMUNFLORESAN DEĞİŞİKLİKLER**

(Immunoflorance Changes Occurred By Okadaic Acid in Zebra Fish Embryo)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hatice OĞUŞ

Danışman: Doç. Dr. Ahmet TOPAL

Erzurum  
Ağustos, 2023

## KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Hatice OĞUŞ tarafından hazırlanan “Okadaik Asitin Zebra Balığı Embriyolarında Meydana Getirdiği İmmunfloresan Değişiklikler” başlıklı çalışması 03 / 08 / 2023 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Su Ürünleri Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Su Ürünleri Mühendisliği Bilim Dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

|               |                                                                   |                      |
|---------------|-------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Jüri Başkanı: | Doç. Dr Veysel PARLAK<br><i>Atatürk Üniversitesi</i>              | Aslı Islak İmzalıdır |
| Danışman:     | Doç Dr Ahmet TOPAL<br><i>Atatürk Üniversitesi</i>                 | Aslı Islak İmzalıdır |
| Jüri Üyesi:   | Doç. Dr. Tayfun KARATAŞ<br><i>Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi</i> | Aslı Islak İmzalıdır |
| Jüri Üyesi:   | Doç Dr. Arzu UÇAR<br><i>Atatürk Üniversitesi</i>                  | Aslı Islak İmzalıdır |

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

**Prof. Dr Saltuk Buğrahan Ceyhun**  
**Enstitü Müdürü**

Aslı Islak İmzalıdır

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Doç. Dr. Ahmet TOPAL danışmanlığında sunulan “OKADAİK ASİTİN ZEBRA BALIĞI EMBRİYOLARINDA MEYDANA GETİRDİĞİ İMMUNFLORESAN DEĞİŞİKLİKLER” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

| Tez Bölümleri                   | Tezin Benzerlik Oranı (%) | Maksimum Oran (%) |
|---------------------------------|---------------------------|-------------------|
| Giriş                           | 20                        | 30                |
| Kuramsal Temeller               | 7                         | 30                |
| Materyal ve Yöntem              | 20                        | 35                |
| Araştırma Bulguları ve Tartışma | 7                         | 20                |
| Sonuçlar                        | 0                         | 20                |
| Tezin Geneli                    | 9                         | 25                |

**Not:** Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

| Tez Yazarı (Öğrenci)       | Tez Danışmanı              |
|----------------------------|----------------------------|
| Hatice OĞUŞ                | Doç Dr. Ahmet TOPAL        |
| 3.8.2023                   | 3.8.2023                   |
| İmza: Aslı ıslak imzalıdır | İmza: Aslı ıslak imzalıdır |

\* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun ....../.../.... tarih ve ..... sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun ....../.../.... tarih ve ..... sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim sürecimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, tez konumun belirlenmesinde, araştırma ve yazım sürecimde sabırla destekleyen, bilgi ve birikimleriyle yoluma ışık tutan kıymetli danışmanım Sayın Doç. Dr. Ahmet TOPAL'a, laboratuvar incelemelerinde her daim yardımcı olan, bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, Sayın Doç. Dr. Selim ÇOMAKLI'ya, araştırmaların yürütülmesinde her türlü imkandan faydalanmamı sağlayan Fen Bilimleri Enstitü Müdürü Sayın Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN'a, tezimin laboratuvar analizleri ve tamamlanmasında yardımcı olan Sayın Dr. Ekrem SULUKAN'a, Su Ürünleri Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Telat YANIK'a ve hayatımın her aşamasında sevgi ve hoşgörüsü bana her daim destek olan kıymetli annem Fadime OĞUŞ ve kıymetli babam Haydar OĞUŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hatice OĞUŞ

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### OKADAİK ASİTİN ZEBRA BALIĞI EMBRİYOLARINDA MEYDANA GETİRDİĞİ İMMUNFLORESAN DEĞİŞİKLİKLER

Hatice OĞUŞ

Danışman: Doç. Dr. Ahmet TOPAL

**Amaç:** Bu çalışma okadaik asitin zebra balığı embriyolarında meydana getireceği malformasyon ve immunfloresan değişiklikleri incelemek için yapılmıştır.

**Yöntem:** Yapılan çalışmada; her bir grupta 80 tane olacak şekilde zebra balığı yumurtası embriyosu 4 gruba ayrılmıştır. Bu gruplardan ilk grup kontrol grubu olup, ikinci gruba 0,5 µg/ml okadaik asit, üçüncü gruba 1 µg/ml okadaik asit, dördüncü gruba 2,5 µg/ml okadaik asit ilavesi yapılmıştır. Bu işlem 5 gün boyunca tekrarlanmıştır. Embriyolarda meydana gelen hayatta kalma oranı ve değişimler gözlemlenmiştir ve 6. günde anomali bozukluk görülen embriyolar, metil selüloz damlatılmış olan lamın üzerine alınıp mikroadjektasyon mikroskopunda beyaz ışık çekimi yapılmıştır. Çekim yapıldıktan sonra embriyolarda meydana gelen malformasyon değerlendirilerek çıkan sonuçlara göre oluşan anomali bozukluklar tespit edilmiştir. Deney sonunda gruplardan rastgele 10 embriyo seçilerek %4 paraformaldehit fiksatifine bırakılarak embriyolarda meydana gelen immunfloresan değişiklikler kaspaz 3, 8-OHdG, ERK½, NF-Kb, TLR4 ve c-Fos primer antikorları uygulanarak belirlenmiştir.

**Bulgular:** Okadaik asit, doza bağımlı olarak NF-Kb, TLR-4, kaspaz 3, ERK½, c-Fos ve 8-OHdG nin immunpozitifliğine sebep olmuştur. Okadaik asitin, zebra balığı embriyo beyin dokularında DNA hasarı, inflamasyon ve apoptotik aktiviteleri etkileyerek nöronal hasara neden olduğu tespit edilmiştir.

**Sonuç:** Elde ettiğimiz sonuçlar, okadaik asit toksisitesinin patofizyolojisi altında yatan moleküler mekanizmayı daha iyi anlamak için imkan sağlamaktadır. Ayrıca bu çalışma ile okadaik asit biyotoksininin; kabuklu deniz ürünlerinin tüketimi ile insan vücudunda olumsuz etkiler oluşturabileceği gözlemlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** zebra balığı; embriyo; okadaik asit; malformasyon; immunfloresan; caspase3; 8- OHdG; ERK1/2; NF-Kb; TLR4, c-Fos

Ağustos 2023, 65 sayfa

## ABSTRACT

### MASTER THESIS

#### IMMUNOFLOUORANCE CHANGES OCCURRED BY OKADAIC ACID IN ZEBRA FISH EMBRYO

Hatice OĞUŞ

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ahmet TOPAL

**Purpose:** This study was carried out to examine the malformation and immunofluorescence changes that okadaic acid will cause in zebrafish embryos.

**Method:** In the study; zebrafish egg embryos are divided into 4 groups, with 80 in each group. The first group of these groups was the control group, 0.5 µg/ml okadaic acid was added to the second group, 1 µg/ml okadaic acid was added to the third group, and 2.5 µg/ml okadaic acid was added to the fourth group. This procedure was repeated for 5 days. The survival rate and changes occurring in embryos have been observed, and on the 6th day, the embryos with anomalous disorders were taken on the slide where methyl cellulose was dripped and white light was taken under microinjection microscope. After the extraction, the malformation of the embryos was evaluated and the anomalous disorders were determined according to the results. At the end of the experiment, 10 embryos were randomly selected from the groups and left in 4% paraformaldehyde fixative, and immunofluorescent changes in the embryos were determined by applying primary antibodies to caspase 3, 8-OHdG, ERK½, NF-Kb, TLR4 and c-Fos.

**Findings:** Okadaic acid induced dose-dependent immunopositivity of NF-Kb, TLR-4, caspase 3, ERK1/2, c-Fos and 8-OHdG. It has been determined that okadaic acid causes neuronal damage by affecting DNA damage, inflammation and apoptotic activities in zebrafish embryo brain tissues.

**Results:** Our results provide an opportunity to better understand the basic load mechanism underlying the pathophysiology of okadaic acid action. In addition, with this study, okadaic acid biotoxin; It has been observed that consumption of shellfish can cause negative effects on the human body.

**Keywords:** zebrafish; embryo; okadaic acid; malformation; immunofluorescence; caspase3; 8- OHdG; ERK1/2; NF-Kb; TLR4, C-Fos

August 2023, 65 Pages

## İÇİNDEKİLER

|                                                                         |      |
|-------------------------------------------------------------------------|------|
| KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....                                             | i    |
| ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU .....                              | ii   |
| TEŞEKKÜR .....                                                          | iii  |
| ÖZET .....                                                              | iv   |
| ABSTRACT .....                                                          | v    |
| İÇİNDEKİLER.....                                                        | vi   |
| TABLolar DİZİNİ.....                                                    | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                   | ix   |
| GİRİŞ.....                                                              | 1    |
| Biyotoksinler .....                                                     | 2    |
| Biyotoksinlerin neden olduğu hastalıklar .....                          | 3    |
| Lipofilik biyotoksinler. ....                                           | 6    |
| Okadaik Asit .....                                                      | 7    |
| Okadaik asitin toksikolojik etkileri .....                              | 9    |
| Okadaik asitin sitotoksik etkisi .....                                  | 9    |
| Okadaik asitin nörotoksik etkisi.....                                   | 10   |
| Okadaik asitin embriyotoksik etkisi.....                                | 11   |
| Okadaik asitin genotoksik etkileri ve DNA onarımı üzerine etkileri..... | 11   |
| Okadaik asitin neden olduğu hastalıklar .....                           | 11   |
| Zebra Balığı.....                                                       | 12   |
| Kaspaz 3.....                                                           | 14   |
| 8-OHdG.....                                                             | 15   |
| ERK1/2.....                                                             | 16   |
| NF-Kb .....                                                             | 18   |
| TLR4 .....                                                              | 18   |
| c-Fos.....                                                              | 19   |
| KURAMSAL TEMELLER.....                                                  | 21   |
| MATERYAL VE YÖNTEM .....                                                | 24   |
| Materyal .....                                                          | 24   |
| Araştırma yeri.....                                                     | 24   |
| Balık materyali .....                                                   | 24   |
| Kullanılan kimyasal .....                                               | 25   |
| Yöntem.....                                                             | 25   |

|                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------|----|
| Deneme planı .....                                            | 25 |
| Embriyo morfolojilerinin izlenmesi ve değeriendirilmesi ..... | 25 |
| İmmunfloresan boyama yöntemi .....                            | 26 |
| İstatistiksel analiz .....                                    | 26 |
| ARAŞTIRMA BULGULARI .....                                     | 27 |
| Morfolojik Bulgular .....                                     | 27 |
| Gözlenen vücut bozuklukları .....                             | 27 |
| İmmunfresan Boyama Bulguları .....                            | 29 |
| TARTIŞMA VE SONUÇ .....                                       | 36 |
| KAYNAKLAR .....                                               | 42 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                | 52 |



## TABLÖLAR DİZİNİ

|                                                                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1.</b> Altı Ana Deniz Biyotoksin Sendromunun Özeti .....                                                                                         | 4  |
| <b>Tablo 2.</b> EFSA'nın Tavsiye Ettiği Yönergelerle Karşılaştırmalı Olarak Deniz Biyotoksinleri<br>İçin Avrupa Komisyonu (AK) Düzenleyici Limitleri..... | 5  |
| <b>Tablo 3.</b> 8-OHdG, Kazpaz 3, c-FOS, NF-kB, TLR4 ve ERK ½ Ekspresyonlarının Gruplar<br>Arası Karşılaştırılması.....                                   | 35 |



## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1. Uydudan çekilmiş, Erie Gölü'nde meydana gelen alg patlaması .....                                                                                                                                                                                          | 3  |
| Şekil 2. Deniz Ürünlerinde Biriken Biyotoksinlerin İnsanlara Bulaşma Aşamalarını Gösteren Şematik Diyagram.....                                                                                                                                                     | 6  |
| Şekil 3. Okadaik asit ve türevlerinin genel yapısı .....                                                                                                                                                                                                            | 7  |
| Şekil 4. Tipik bir deniz besin zincirinde okadaik asitin omurgasızlar boyunca bulaşmasını gösteren şematik diyagram.....                                                                                                                                            | 8  |
| Şekil 5. Kaspaz-3 heterotetramer + 2 pryazinon inhibitörü .....                                                                                                                                                                                                     | 14 |
| Şekil 6. 8-hidroksiguanozinin kimyasal yapısı .....                                                                                                                                                                                                                 | 16 |
| Şekil 7. Klasik Ras-Raf-MEK-ERK 1/2 sinyal yolunun özeti .....                                                                                                                                                                                                      | 17 |
| Şekil 8. Araştırma Birimi .....                                                                                                                                                                                                                                     | 24 |
| Şekil 9. Denemede kullanılan zebra balığı yumurtaları .....                                                                                                                                                                                                         | 25 |
| Şekil 10. Kontrol grubuna ait görüntü.....                                                                                                                                                                                                                          | 27 |
| Şekil 11. 0,5 µg/ml okadaik asit grubuna ait bulgular. Besin kesesi ödemi (YSE), Perikardiyal ödem (PE) ve vücut malformasyonları, kafa malformasyonu, kuyruk malformasyonu ve kısa kuyruk dahil (BM) .....                                                         | 27 |
| Şekil 12. 1 µg/ml okadaik asit grubuna ait bulgular Besin kesesi ödemi (YSE), Perikardiyal ödem (PE) ve vücut malformasyonları, kafa malformasyonu, kuyruk malformasyonu ve kısa kuyruk dahil (BM) .....                                                            | 28 |
| Şekil 13. 2,5 µg/ml okadaik asit grubuna ait bulgular. Besin kesesi ödemi (YSE), Perikardiyal ödem (PE) ve vücut malformasyonları, kafa malformasyonu, kuyruk malformasyonu, kısa kuyruk (BM) ve kavisli vücut eksenini dahil (CBA) .....                           | 28 |
| Şekil 14. Yumurtadan çıkış oranları.....                                                                                                                                                                                                                            | 28 |
| Şekil 15. Okadaik asit dozlarının zebra balığı embriyolarında meydana getirdiği malformasyon oranları .....                                                                                                                                                         | 29 |
| Şekil 16. Kontrol grubu ve 0,5 µg/ml, 1 µg/ml ve 2,5 µg/ml okadaik asite maruz kalan zebra balığı embriyolarının beyin dokusundaki kaspaz 3 immunfloresan sonuçları. Ok başları kaspaz 3 pozitif sinir hücrelerini temsil etmektedir. Ölçek çubukları: 100 µm. .... | 30 |
| Şekil 17. Kontrol grubu ve 0,5 µg/ml, 1 µg/ml ve 2,5 µg/ml okadaik asite maruz kalan zebra balığı embriyolarının beyin dokusundaki 8-OHdG immunfloresan sonuçları. Ok başları 8-OHdG pozitif sinir hücrelerini temsil etmektedir. Ölçek çubukları: 100 µm. ....     | 31 |

- Şekil 18.** Kontrol grubu ve 0,5 µg/ml, 1 µg/ml ve 2,5 µg/ml okadaik asite maruz kalan zebra balığı embriyolarının beyin dokusundaki c-fos immunfloresan sonuçları. Ok başları c-fos pozitif sinir hücrelerini temsil etmektedir. Ölçek çubukları: 100 µm.....32
- Şekil 19.** Kontrol grubu ve 0,5 µg/ml, 1 µg/ml ve 2,5 µg/ml okadaik asite maruz kalan zebra balığı embriyolarının beyin dokusundaki NF-kB immunfloresan sonuçları. Ok başları NF-kB pozitif sinir hücrelerini temsil etmektedir. Ölçek çubukları: 100 µm. ....33
- Şekil 20.** Kontrol grubu ve 0,5 µg/ml, 1 µg/ml ve 2,5 µg/ml okadaik asite maruz kalan zebra balığı embriyolarının beyin dokusundaki TLR 4 immunfloresan sonuçları. Ok başları TLR 4 pozitif sinir hücrelerini temsil etmektedir. Ölçek çubukları: 100 µm. ....34
- Şekil 21.** Kontrol grubu ve 0,5 µg/ml, 1 µg/ml ve 2,5 µg/ml okadaik asite maruz kalan zebra balığı embriyolarının beyin dokusundaki ERK1/2 immunfloresan sonuçları. Ok başları ERK1/2 pozitif sinir hücrelerini temsil etmektedir. Ölçek çubukları: 100 µm. ....35

## KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

### Simgeler

|    |                  |
|----|------------------|
| %  | Yüzde değeri     |
| µg | Mikrogram        |
| µm | Mikrometre       |
| g  | Gram             |
| kg | Kilogram         |
| L  | Litre            |
| ml | Mililitre        |
| nm | Nanometre        |
| nM | Nanomolar        |
| °C | Santigrat Derece |

### Kısaltmalar

|                    |                                                                  |
|--------------------|------------------------------------------------------------------|
| 8-OHdG             | 8-Hidroksi-2-deoksiguanozin                                      |
| AK                 | Avrupa Komisyonu                                                 |
| AZA                | Azaspasit                                                        |
| BTX                | Brevetoksin                                                      |
| C-fos              | C-terminalinde bir işlem alanı olan 380 amino asitli bir protein |
| CTX                | Ciguatoksin                                                      |
| DA                 | Domoik asit                                                      |
| DSP                | Diyareik Kabuklu Zehirlenmesi                                    |
| DTX                | Dinofizistoksinler                                               |
| EFSA               | Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi                                  |
| ERK <sub>1/2</sub> | Ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinazlar                       |
| FDA                | Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi                 |
| HAB                | Zararlı Alg Patlaması                                            |
| NF-Kb              | Nükleer transkripsiyon faktörü                                   |
| OA                 | Okadaik Asit                                                     |
| PTX                | Pektenotoksin                                                    |
| STX                | Saksitoksin                                                      |
| TLR4               | Toll benzeri reseptör 4                                          |
| YTX                | Yessotoksin                                                      |

## GİRİŞ

Su ürünleri yetiştiriciliği, suda yaşayan organizmaların yetiştirilmesi ile ilişkili olup, dünya çapında son 40 yılda en yüksek büyümeyi gösteren, tarımsal endüstriyel faaliyettir. Su ürünleri üretimi yıllık 60 milyon tonun üzerindedir ve yaklaşık olarak değeri 85 milyar dolar olarak tespit edilmektedir (Martinez-Porchas and Martinez-Cordova 2012).

Su ürünleri yetiştiriciliği, çok hızla ve düşük maliyetlerle üretilen protein kaynaklarını bize sunan endüstriyel faaliyetlerden biridir. Su ürünleri yetiştiriciliğinin yatay ve dikey genişlemede artan verimlilik ile çevredeki kirleticilerde aşırı artışları meydana getirmektedir (Jamal *et al.* 2020). Su ürünleri yetiştiriciliğinin karlılığı ve üretim verimliliği, genetik kaynakların kullanım şekline bağlı olarak değişmektedir. Su ürünleri genomu, genetiği ve ıslah araştırmalarının nihai hedefleri, ticari sektörü desteklemek ve tüketicilerin yararına olmak üzere su ürünleri üretiminin verimliliğini, sürdürülebilirliğini, ürün kalitesini ve karlılığını artırmaktır. Su ürünleri türlerinin organizasyonu ve genomik yapısını ve bunların varyasyonları arasındaki ilişkilerin anlaşılması, su ürünleri yetiştiriciliğindeki istenilen verim ve karlılığa ulaşabilmek için önem teşkil etmektedir (Abdelrahman *et al.* 2017).

Dünya üzerindeki mikroorganizmaların; çevrede yayılmalarının yolu ve en önemli yaşam alanlarından biri sudur. Su kaynaklı mikroorganizmaların sayısı oldukça fazladır Bu nedenle, balıkların mikrobiyolojik olarak çeşitli yaşam alanları, ölüm oranını artırarak çeşitli etkilere neden olabilmektedir (Cholewińska *et al.* 2022). Yüksek biyokütle patlamaları, fiziksel müdahale, oksijensizleştirme veya toksisite yoluyla yabani balıkçılığı veya deniz mahsullerini bozabilmektedir (Davidson *et al.* 2016).

Alg toksinleri tarafından kontamine olan deniz ürünleri, dünyanın çeşitli bölgelerinde yaşayan hayvanlara etki etmekte ve karakterize edilen toksik fitotoksinlerin sayısında artmaya neden olmaktadır. Algal toksinleri meydana getiren yapılar, deniz ürünlerinin bireysel toksin sınıfları tarafından kontaminasyon riskini artırmaktadır. Son 20 yılda geliştirilen çeşitli deneyler ile fitotoksinler tespit edilmektedir. Bu fitotoksinlerin nörotoksik ve nörotoksik olmayan, farklı kimyasal sınıflara ait olduğu görülmektedir. Nörotoksinler, insanlarda ve hayvanlarda çoklu akut nörolojik ve gastroenterik semptomlar meydana getirmekte; kimyasal yapıları açısından farklılık gösteren biyoaktif ajanları içermektedir (Rossini 2005).

Mikroalgler, hücre yoğunluğuna göre değişebilen farklı tipte dinoflagellatlardan (*Dinophyceae* spp.), diatomlardan (*Bacillariophyceae* spp.) ve siyanobakterilerden (*Cyanophyceae* spp.) meydana gelmektedir. Etkileşimi içeren belirli çevresel koşullar altında biyolojik, fiziksel ve kimyasal faktörlerin etkisiyle, farklı mikroalg türleri çoğalarak balıklarda aşırı sayıda ölüme, kabuklu deniz hayvanlarının kirlenmesine ve nihayetinde gıda zincirini ve insan sağlığını etkileyen ekosistemlerdeki değişikliklere neden olabilmektedir (Figueroa 2020).

## **Biyotoksinler**

Balık, midye, istiridye, deniztarağı vb. çift yumuşakçalarda biriken deniz toksinlerine biyotoksinler denilmektedir. Bu toksinlerin geneli, doğal olarak meydana gelen fitoplankton yani deniz yosunları tarafından üretilmektedir. Yapılan araştırmalar sonucu 5000 deniz yosunu türü olmasına rağmen, yalnızca 70-80 türün toksin ürettiği bilinmektedir. Deniz biyotoksinleri, besin zinciri yoluyla su veya deniz ürünlerinde yüksek düzeyde biriken, aktif metabolitlerin geniş ve çeşitli bir grubudur (Ryder et al. 2014). Birçok fitoplankton veya alg türü zararlı olmamakla birlikte, birçok deniz balığı ve hayvan türü için besin zincirinin alt kısmında, besin kaynağı olarak hizmet etmektedir. Bunun yanı sıra toksik olan bazı alg türleri de bulunmaktadır ve bu toksinler besin zinciri boyunca aktarılabilmektedirler (McNamee et al. 2012).

Su ekosisteminde yer alan, fitoplankton gibi fotosentez yapan organizmalar, deniz besin ağlarının temelini oluşturmaktadır. Deniz ekosisteminde mevsimsel döngünün bir parçası olarak; bu organizmaların aşırı büyümesi sonucu alg çiçekleri meydana gelmektedir (Goya et al. 2022).

Kabuklu deniz hayvanlarını etkileyen faktörlerin çoğu, özellikle kültür teknikleri ve koşulları ile ilgili olanlar aktif olarak yönetilebilirken, alg oluşumunu etkileyen birçok faktörün kontrol edilmesi ve tahmin edilmesi oldukça zordur. Algler, sıcaklık ve ışık koşullarından doğrudan etkilenmektedir. Bu sebeple birçok tahmin modelinin belirlenmesi bu parametrelere dayanmaktadır (Lawrence 2011).

Çiçek açması; besin açısından zengin suların kombinasyonu, güneş ışığı ve yüksek sıcaklıkların hızlı plankton üremesi ile meydana gelmektedir. Meydana gelen bu çiçeklenmeler, çeşitli hastalıklara sebep olduklarından dolayı, genellikle zararlı alg patlamaları veya “HAB’ler” olarak isimlendirilmektedir. Bu alg patlamaları neticesinde, insan, hayvan ve çevre sağlığına zararlı olabilecek biyotoksinler üretilmektedir. Bu biyotoksinler, fizikokimyasal özellikler, kimyasal yapı, toksikolojik etki ve toksisite mekanizmaları açısından geniş bir yelpazeye sahiptir (Wells et al. 2020).



**Şekil 1.** Uydudan çekilmiş, Erie Gölü’nde meydana gelen alg patlaması (Anonim 2011).

Bazı alglerin toksik bileşikler üretme yetenekleri, iklim değişikliği gibi faktörlerin etkisi altında değişebilmekte ve aynı anda birden fazla alg toksini üretebilmektedir. Bu durum sonucunda da ekosistem olumsuz olarak etkilenmektedir. Zararlı alg patlamalarından (HAB'ler) kaynaklanan toksinler, kabuklu deniz hayvanları ve diğer deniz organizmalarını zehirleyip, hatta ölüm meydana getirmektedir. Doğrudan temas veya besin zinciri aracılığı ile insanlara bulaşabilmekte, insanlarda da zehirlenme ve ölüm vakalarının görülmesine sebebiyet vermektedir (Liu *et al.* 2022).

### **Biyotoksinlerin neden olduğu hastalıklar**

Deniz biyotoksinlerinin daha önce hiç rapor edilmediği coğrafi bölgelerde ortaya çıkması, deniz ürünleri kontaminasyonu ve dolayısıyla halk sağlığı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Çeşitli deniz biyotoksin grupları, özellikle tetradotoksinler, ciguatoksinler ve palitoksinler, son zamanlarda çeşitli kıyı bölgelerinde ortaya çıkan ilgili deniz biyotoksinleri arasında yer almaktadır. İklim değişikliği ve besin maddelerinin artan mevcudiyeti, tüm bu toksinlerin yeni alanlara yayılmasında kilit faktörler olarak kabul edilmektedir (Gerssen and Martínez 2019). İnsanlar tarafından sıklıkla çift kabuklu yumuşakçaların tüm yumuşak doku kısımlarının tüketilmesi besin zincirinde doğal risk teşkil etmektedir. Bu nedenle tüketiciler; çift kabuklu yumuşakçaların, fizyolojik detoksifikasyon, sekestrasyon ve kimyasal kontaminantların atılımında yer alan organları ve dokuları tükettiklerinde çeşitli olumsuzluklar meydana gelebilmektedir (O’Mahony 2018).

Yumuşakça kabuklu deniz ürünleri filtre besleyicilerdir bu sebeple çevredeki suda bulunan hem iyi hem de kötü her türlü parçacığı tüketmektedirler. Toksinler; kabuklu deniz

hayvanları tarafından aktif olarak biriktirilir ve bu toksinler bazı bölgelerde, kabuklu deniz ürünleri türleri tarafından genellikle düzenli olarak biriktirilse dahi çeşitli faktörlerden etkilenmekte ve bu oran değişmektedir (Goya *et al.* 2022). Toksin üreten alglerin, kabuklu deniz hayvanları tarafından tüketilmesi ile toksinler bu canlıların sistemlerinde kalmaktadır. Bu sebeple büyük miktarlarda alg dokularında daha fazla toksin konsantre etmektedir. Biyotoksinler kabuklu deniz hayvanlarına direkt olarak zarar vermemektedir ancak insanlar ve diğer memeliler tarafından kabuklu deniz ürünlerinin tüketilmesi sonucunda, hastalık oluşturabilecek veya ölüme neden olabilecek düzeylerde birikebilmektedirler (<https://doh.wa.gov/community-and-environment/shellfish/recreational-shellfish/illnesses/biotoxins>).

Deniz biyotoksinlerinin bulaşmış olduğu deniz ürünlerinin görünüşü, kokusu ve tadı normaldir. Bu sebeple insanlar veya hayvanlar deniz ürünlerini tüketirken herhangi bir olumsuz durum olduğunu anlayamamaktadırlar ve deniz ürünlerini tükettikten sonra çeşitli hastalıklara yakalanabilmektedirler (Visciano *et al.* 2016). Deniz mikroalgleri tarafından üretilen çeşitli biyotoksinler geleneksel olarak insanlar üzerindeki etkileri temelinde organize edilebilmektedir (Van Dolah 2000). Kabuklu deniz hayvanı zehirleri sınıflandırılması; sasi toksinlerin neden olduğu, parolitik kabuklu deniz hayvanı zehirlenmesi, brevetoksinlerin neden olduğu nörotoksik kabuklu deniz hayvanı zehirlenmesi, okadaik asidin neden olduğu, ishali kabuklu deniz hayvanı zehirlenmesi ve domoik asidin neden olduğu amnezik kabuklu deniz hayvanı zehirlenmesi olarak kategorize edilmektedir (Rossini and Hess 2010).

**Tablo 1.** Altı Ana Deniz Biyotoksin Sendromunun Özeti

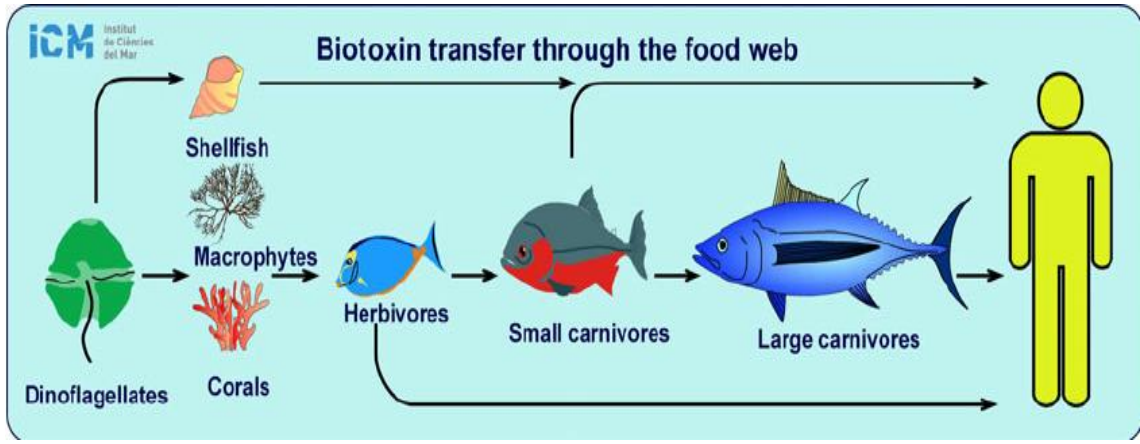
| Sendrom                                            | Toksin Grubu      | Alg/ Bakteri Üreticisi                                                                     | Hücresel Hedef        | Belirtiler                                                                     |
|----------------------------------------------------|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Amnezeik Kabuklu Deniz Ürünleri Zehirlenmesi (ASP) | Domoik Asit (DA)  | <i>Pseudo-nitzschia</i> türleri, <i>Nitzschia navis-varingica</i> , <i>Chondria armata</i> | Glutamat reseptörleri | Kısa süreli hafıza kaybı, konfüzyon, oryantasyon bozukluğu, kusma, ishal, ölüm |
| İshali Kabuklu deniz hayvanı zehirlenmesi (DSP)    | Okadaik Asit (OA) | <i>Dinophysis</i> spp., <i>Prorocentrum</i> spp.                                           | Protein fosfatazlar   | Mide bulantısı, kusma, ishal, mide krampları                                   |
| Azaspirasit kabuklu deniz hayvanı                  | Azaspirasit (AZA) | <i>Azadinium</i> spp., <i>Amphidoma languida</i>                                           |                       | Mide bulantısı, kusma, ishal, mide krampları                                   |

|                                                     |                   |                                                                               |                  |                                                                                                                                           |
|-----------------------------------------------------|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Paralitık kabuklu deniz hayvanı zehirlenmesi (PSP)  | Saksitoksin (STX) | <i>İskenderiye spp. ,<br/>Gymnodinium catenatum,<br/>Pyrodinium bahamense</i> | Sodyum kanalları | Gastrointestinal semptomlar, ağızda ve ekstremitelerde uyuşma/karınalanma, baş dönmesi, baş ağrısı, ateş, ataksi, solunum sıkıntısı, ölüm |
| Nörotoksik kabuklu deniz hayvanı zehirlenmesi (NSP) | Brevetoksin (BTX) | <i>Karenia spp.</i>                                                           | Sodyum kanalları | Gastrointestinal semptomlar, uyuşma, karınalanma hissi, hipotansiyon, felç, nöbetler, koma                                                |
| Ciguatera balık zehirlenmesi (CFP)                  | Ciguatoksin (CTX) | <i>Gambierdiscus spp.</i>                                                     | Sodyum kanalları | Gastrointestinal semptomlar, ağızda ve ekstremitelerde uyuşma/karınalanma, geçici körlük, bradikardi, ataksi, felç                        |

**Tablo 2.** EFSA'nın Tavsiye Ettiği Yönergelerle Karşılaştırmalı Olarak Deniz Biyotoksinleri İçin Avrupa Komisyonu (AK) Düzenleyici Limitleri

| Toksin ve eşdeğerleri | AT düzenleme limiti (µg toksin eşdeğeri/kg kabuklu deniz hayvanı/balık) | EFSA tarafından önerilen limit (µg toksin eşdeğeri/kg kabuklu deniz hayvanı/balık) |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Domoik asit (DA)      | 20 000                                                                  | 4500                                                                               |
| Okadaik asit (OA)     | 160                                                                     | 45                                                                                 |
| Azaspasit (AZA)       | 160                                                                     | 30                                                                                 |
| Saksitoksin (STX)     | 800                                                                     | 75                                                                                 |
| Brevetoksin (BTX)     | 800                                                                     | yok                                                                                |
| Ciguatoksin (CTX)     | AB sınırı yok. CTX içeren ürünler piyasaya arz edilmemelidir.           | 0.01                                                                               |

\*BTX için AB sınırı yoktur. Değer, ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) eylem sınırına eşittir (McPartlin 2016).



**Şekil 2.** Deniz Ürünlerinde Biriken Biyotoksinlerin İnsanlara Bulaşma Aşamalarını Gösteren Şematik Diyagram (Muzlovic and Knezevic 2014).

Deniz biyotoksinleri çok hızlı etki ettiğinden dolayı bu durumun önüne geçilmesi gerekmektedir. Spesifik ve hassas tarama ile bu sorunlar önlenebilmektedir. Deniz biyotoksinlerinin birçoğu yüksek toksisiteye sahip olduğundan ve düşük ağırlıklı moleküller olduğundan; antikor üretiminde çeşitli sorunlar görülebilmekte ve yüksek maliyetler gerekebilmektedir (Zhao *et al.* 2018 ). Deniz biyotoksinleri; lipofilik (yağda çözünen kirletici maddeler) özelliklere, hidrofilik (suda çözünen kirletici maddeler) özelliklerine göre veya yeni oluşan su biyotoksinlerine göre kategorize edilmektedir (<http://www.biosciences-labs.bham.ac.uk/exhibit/whatare.html> ).

### **Lipofilik biyotoksinler.**

Lipofilik biyotoksinler, doğal olarak oluşabilen bileşiklerdir ve biyotoksin karışımları veya tek tek olarak gruplandırılabilir. Lipofilik biyotoksinler biyoyararlanıma ve kimyasal yapılarına göre dört gruba ayrılmaktadır. Bunlar:

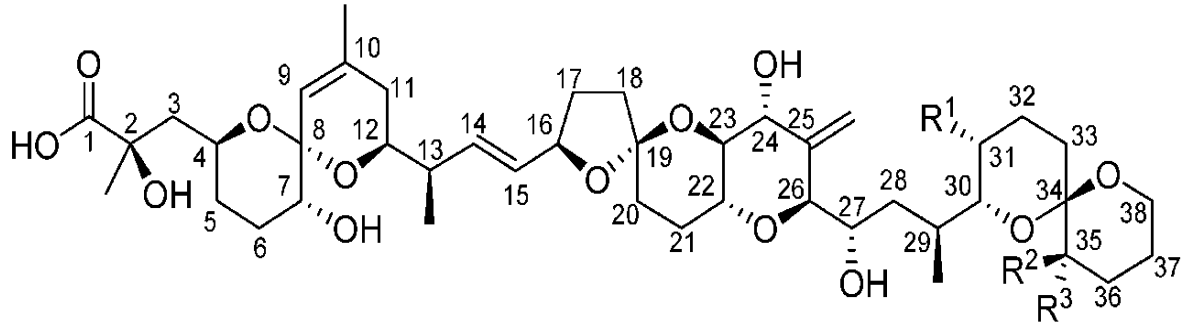
- i. Okadaik asit (OA) ve türevi dinofizistoksinler (DTX'ler),
- ii. Yessotoksinler (YTX'ler),
- iii. Azaspirasitler (AZA'lar) ve
- iv. Pektenotoksinler ( PTX'ler)'dir.

Lipofilik toksinlerin tüketimi neticesinde çoğunluklu olarak gastrointestinal semptomlar (kusma, mide bulantısı ve ishal) meydana gelmektedir. Okadaik asit (OA), dinofizistoksinler ve pektenotoksinler, ishali kabuklu deniz hayvanı zehirlenmesi (DSP) biyotoksinleri olarak sınıflandırılmaktadır ve ilk olarak 1960'larda Hollanda'da kontamine midye tüketimi sonucunda bir dizi gastrointestinal olay meydana gelmesi sonucunda tespit edilmiştir (Fire and Van Dolah 2012). Bu toksinler, farklı trofik seviyelerde bulunan okadaik asit ve spirolid toksin gruplarının ester metabolitlerini üreterek, filtreyle beslenen organizmalarda biyotransformasyona

uğramaktadır. Deniz organizmalarındaki çoklu toksin karışımı seviyelerinin değerlendirilmesi, insan sağlığındaki risklerin yanı sıra trofik zincir yoluyla biyo-aktarımlarını değerlendirmek için oldukça önemlidir (Farabegoli *et al.* 2018). Başlangıçta ilişkili olduğu organizmalarda tanımlanan toksinlerde bulunmaktadır, örneğin okadaik asit başlangıçta sünger *Halichondria okadaei*'de tanımlanmaktadır (Lawrence *et al.* 2011).

### Okadaik Asit

Okadaik asit ( $C_{44}H_{68}O_{13}$ ) çeşitli dinoflagellat türleri tarafından üretilen bir toksin olup, hem kabuklu deniz hayvanlarında hemde deniz süngerlerinde birikmektedir (Lee 2016). Bu toksin ve esterleşmiş formları su yosunları (*Dinophysis*) tarafından dinophysis toksin-1 (DTX1) ve -2 (DTX2) ile birlikte üretilmektedir. Okadaik asit, güçlü bir poliyeter deniz toksinidir. Bu toksin, deniz yumuşakçalarının sindirim bezlerinde birikebilmektedir. İnsanlar tarafından kontamine olmuş deniz hayvanlarının tüketilmesi sonrasında, ciddi tehdit teşkil eden sorunlar meydana gelebilmektedir. Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar neticesinde; insan embriyonik amniyotik hücreleri, nöroblastom hücreleri, hepatositler de dâhil olmak üzere çeşitli hücrelerin okadaik asite maruz kalması ile hücrelerde ölüm görülmektedir. Ek olarak bu çalışmalar; okadaik asitin hücrelerde, fonksiyonel ve morfolojik modifikasyonları indüklediğini göstermektedir (Fujiki *et al.* 2018).



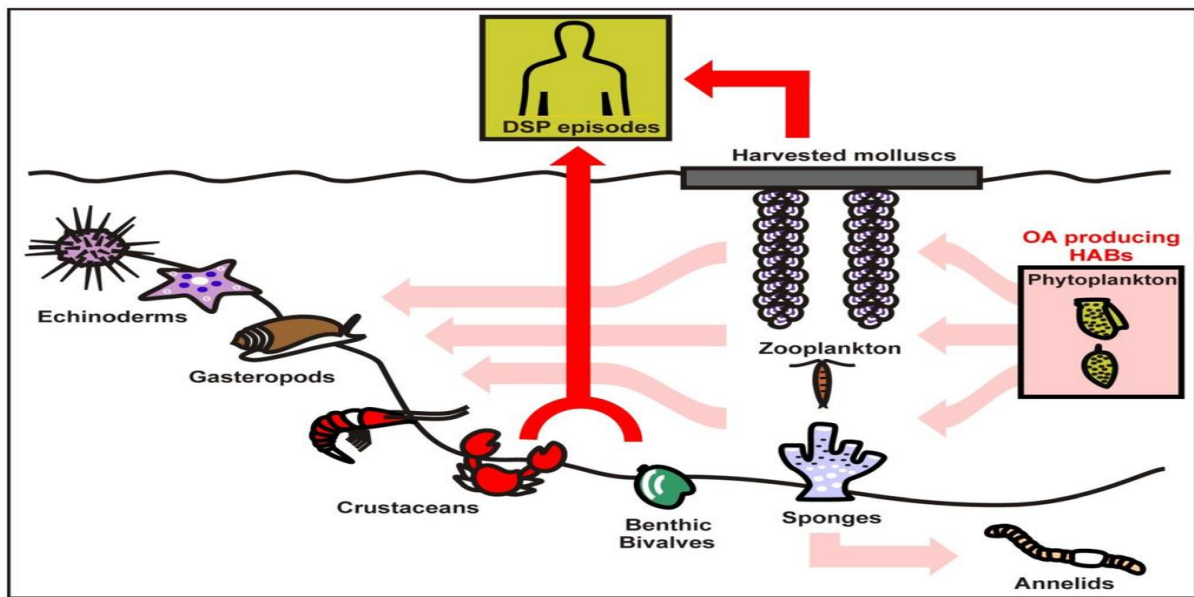
**Şekil 3.** Okadaik asit ve türevlerinin genel yapısı (Munday 2013).

Okadaik asit, ilk keşfedilen diyareik kabuklu zehirlenme türüdür. İlk olarak 1981 yılında *Halichondria melanodocia* ve *Halichondria okadaei*'den tanımlanmıştır ve esas olarak *Prorocentrum lima*, *Prorocentrum concavum*, *Dynophysis acuta* ve *Dynophysis fortii* gibi fitoplanktonlar tarafından üretilmektedir. Okadaik asit, bağırsak üzerinde saptanamayan etkileri olan bir hepatotoksin gibi davranır ancak aynı zamanda öldürücü olmayan dozlarda hücre iskeleti elemanları üzerinde de bir etkiye sahiptir. Ayrıca, toksinin kültürlenmiş nöronlar için güçlü bir nörotoksin, çeşitli hücre dizilerinde apoptotik olayları indüklemek ve çeşitli organlarda tümör destekleyici aktivite sergilemek olduğu bilinmektedir (Franchini *et al.* 2010).

Kabuklulardaki polieter DSP toksinleri, okadaik asit grup (Okadaik asit, Dinophysis toksinleri DTX1, DTX2, DTX4 ve akil türevleri DTX3), pektenotoksin (PTX) ve yessotoksin (YTX) içermektedir. Diğer gruplar dışında yalnızca okadaik asit grupları direkt etkilere sahiptir. Diğer DSP toksinlerinin insan zehirlenmelerine sebep olmadığı bilinmektedir. Okadaik asit ve DTX1 tümör oluşturunca aktiviteyede sahiptir.

Okadaik asit, birçok hücrel süreçlerde önemli rol oynayan proteinlerin fosforilasyonunda artışlar meydana getirebilmektedir (Aydın ve Uzar 2009). Kabuklu deniz ürünleri zehirlenmesinden (DSP'den) sorumlu olan ana toksin okadaik asittir. Bir tümör promotörü C38 polieter yağ asidi olan okadaik asit, hidrofobik ve asidik kısımlar içermektedir. Bu asit, protein fosfataz 1 ve 2A gibi önemli protein serin/treonin fosfataz sınıflarının güçlü bir inhibitörüdür (Alexander 2009). Okadaik asit grubu toksinler, serin ve treonin fosfatazları PP1 ve PP2A'yı engellemektedir (Botelho *et al.* 2018). Bu engelleme sonucunda proteinlerde hiperfosforilasyon meydana gelmektedir. Hiperfosforilasyon oluşumu hücre sıvılarında kayıp oluşumuna neden olmaktadır (Wertz *et al.* 2011).

Lipofilik toksinlerin başlangıç seviyesi, farklı işleme prosedürleri olan; kaynatma, buharlama veya otoklavlama gibi işlemler ile değiştirilebilmektedir. İşleme sırasında oluşan su kayıplarının, kabuklu deniz hayvanı etinin gramı başına toksin konsantrasyonundaki artışın nedeni olduğu bilinmektedir. Okadaik asit ve DTX2'de, yüksek sıcaklıklarda (>100 °C) bozunma meydana gelebilmektedir. Ek olarak, kabuklu deniz ürünlerinin işlenmesi sırasında, okadaik asit grubu toksinlerin, sindirim bezinden geri kalan dokulara yeniden dağılımı görülebilmektedir (Reguera *et al.* 2014).



Şekil 4. Tipik bir deniz besin zincirinde okadaik asitin omurgasızlar boyunca bulaşmasını gösteren şematik diyagram (Prego Faraldo *et al.* 2013).

Okadaik asit, bağırsak dokularında sitotoksik konsantrasyonlara ulaşmaktadır. Son çalışmalar, okadaik asidin toksik etkilerinin, muhtemelen taşıyıcı sistemi değiştirerek ince bağırsakta besinlerin, iyonik ve su absorpsiyonunun modifikasyonu ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (Botelho *et al.* 2018). Okadaik asit, bağırsak hücreleri tarafından Na<sup>+</sup> sekresyonunu uyarak ishale neden olmaktadır. Bu durumda intraluminal gastrointestinal sıvı birikimine ve abdominal krampa neden olmaktadır (Terzi 2008).

### **Okadaik asitin toksikolojik etkileri**

Okadaik asit; insanlarda ve hayvanlarda nörotoksisite, hepatotoksisite ve sitotoksisite dâhil olmak üzere ciddi zararlara neden olabilmektedir (Terzi 2008). Okadaik asitin ilk olarak ishali kabuklu deniz hayvanı zehirlenmesinden (DSP) sorumlu olduğu ve insanlarda ishal, mide bulantısı, karın ağrısı veya kusma gibi çeşitli semptomlara sebebiyet verdiği görülmektedir. Yönetmeliğe göre, okadaik asit, DTX'ler ve PTX-2, bir kg kabuklu deniz hayvanı başına belirlenen 160 µg okadaik asit eşdeğeri limiti belirlenmektedir (Alarcan 2018).

### **Okadaik asitin sitotoksik etkisi**

Okadaik asitin hücrel hedefleri; büyüme, bölünme ve hücre iskeleti yapısı gibi temel hücrel süreçlerin düzenlenmesine yöneliktir. Okadaik asit ile indüklenen fosfataz inhibisyonu, birçok hücrel proteinin fosforilasyon durumlarında ciddi değişikliklere neden olmaktadır. Bu durum sonunda düzenleyici süreçler çökmekte ve çeşitli hücrel bozulmalar meydana gelebilmektedir. Bu sebeple, düşük konsantrasyonlarda bile okadaik asite maruz kalma sonucunda hücrel olaylarda çeşitli değişikliklerin meydana geldiği görülmektedir (Valdiglesias 2013). Okadaik asitin sitotoksik etkisi; esas olarak hücre morfolojisinde değişiklik, hücre iskeletinin yıkımı, hücre döngüsünde değişiklik ve apoptozun indüklenmesi şeklinde kendini göstermektedir.

Hasarlı hücreler tipik olarak gevşek zar bütünlüğü, bastırılmış metabolizma, hızlı şişme, ve çevreye hücrel salınım sergilemektedir. Serin treonin protein fosfatazlar (Ser/Thr PP), hücre büyümesi, bölünmesi, hücre iskeleti yapısının korunması ve ölümü dahil olmak üzere temel hücrel süreçlerin düzenlenmesinde yer almaktadır. Morfoloji ve hücre iskeletinde meydana gelen değişiklikler, diğer birçok hücrel olay için ön adımları oluşturmaktadır (Zhao *et al.* 2018). Serin/treonin protein fosfatazın, kalsinörinin inhibisyonu ve fosforilasyonunu artırmaktadır. Düşük moleküler ağırlıklı protein fosfataz inhibitörleri, reseptör fonksiyonunun çalışmasında önemli bir rol teşkil etmekte ve canlı hücrelere nüfuz edebilmektedirler (Alcantara Hernandez *et al.* 2000).

Okadaik asit, protein fosforilasyonunu hızla uyabilir ve çeşitli hücre tiplerinde çeşitli metabolik süreçleri indükleyebilmektedir. Adipositleri okadaik asitle tedavi etmek, birçok proteinin fosforilasyonunu önemli ölçüde artırıp ve bazal lipolizi uyarmaktadır. Okadaik asit, lipolizi hızlandırmak için sitozolden lipid damlacıklarına fosforile edilmekte ve lipolizi uyarmaktadır (Chang *et al.* 2013).

Okadaik asitin kullanımı, fosforilasyon ve defosforilasyon durumunun, biyolojik son nokta olan apoptoz da dâhil olmak üzere hücrel düzenleme ile ilgilidir. Okadaik asit, insan osteoblastik hücrelerinde apoptozu indüklemektedir. Protein kinazların ve fosfatazların, NF-Kb yolunun aktivasyonu yoluyla transkripsiyonel stimülasyonuna dâhildir. Okadaik asit kaynaklı apoptoz sırasında NF-Kb translokasyonu meydana gelmektedir (Haneji *et al.* 2013). Okadaik asitin hücre içi etkilerinin belirgin olmaması, midye kan hücrelerinde multiksenobiyotik direncine (MXR) bağlı olarak meydana gelebilmektedir. Okadaik asitin subtoksik konsantrasyonlarına maruz kalan bazı memeli hücre dizilerinin, bu toksinin sitotoksik etkilerine karşı direnç geliştirdiği görülmektedir (Svensson 2003).

### **Okadaik asitin nörotoksik etkisi**

Okadaik asit, en yaygın olarak gelişen deniz toksinlerinden biridir. (Cui *et al.* 2023). Okadaik asit nörotoksik etkileri, DSP toksinlerinin kabul edilen ana etki mekanizması ile ilişkilidir (Louzao *et al.* 2015). Serin/treonin protein fosfatazlar, hücrel fonksiyonların yanı sıra nörodejeneratif süreçlerde de bir rol oynamaktadır. Nöronlar, çeşitli protein kinaz inhibitörleri ve/veya dört estrojenlerden birinin varlığında veya yokluğunda okadaik asite maruz bırakıldığında; okadaik asit artan reaktif oksijen türleri, protein karbonilasyonu, lipid peroksidasyonu, Kaspaz 3 aktivitesi ve mitokondriyal disfonksiyon yoluyla hücre ölümünü indüklediği gözlemlenmektedir. Ayrıca, protein kinaz C ve mitojenle aktive olan protein kinaz yolunun inhibisyonu, okadaik asit toksisitesine karşı nöroprotektif olmadığı görülmektedir. Okadaik asitin, ERK1/2 ve/veya protein kinaz C'nin kalıcı aktivasyonuna sebep olmakta ve meydana gelen oksidatif strese aracılık etmektedir. Bu durum sonucunda okadaik asitin; protein fosfataz aktivitesinde, östrojen aracılı nörokoruma için önemli ve gerekli bir yönü olduğunu görülmektedir (Yi *et al.* 2009).

Okadaik asit, protein fosfatazlar 1 ve 2A üzerindeki inhibitör etkisinden dolayı, hücrel süreçlerde protein fosforilasyon sürecinin incelemesinde bir araç olarak kullanılmaktadır. Serin treonin protein fosfatazları, tau proteinini in vitro olarak fosforile edebilmektedir (Kamat *et al.* 2015).

Glikojen sentez kinaz-3 (GSK-3) gibi tau kinazların aşırı aktivasyonu ile tau fosforilasyonunun aşağı doğru regülasyonu arasındaki dengenin sonucunda tau hiperfosforilasyonunun seviyesi meydana gelmektedir. Ayrıca, PP-2A aktivitesinin aşağı doğru regülasyonu Alzheimer (AD) beynindeki anormal tau fosforilasyonundan da sorumludur. Tau fosforilasyonunun inhibisyonu, AD'nin önlenmesi için uygulanabilir bir terapötik yöntem olabilmektedir (Li *et al.* 2011).

Gelişmekte olan beyin dokusunun dilimlerinden yapılan organotipik kültürler, karmaşık çok hücreli koşulları önemli ölçüde korumaktadır. Bu sebeple okadaik asitin neden olduğu nörodejenerasyon modellerini oluşturmak için de kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalar göstermektedir ki, okadaik asit nöronal hasara, Alzheimer hastalığında olduğu gibi nöropatolojik değişikliklere neden olmaktadır. Ayrıca astroglioz, oksidatif strese artmalar ve nöronal ölüm meydana gelmektedir (Medina *et al.* 2013). Okadaik asitin, alzheimer patolojisinin özelliği olan tau hiperfosforilasyonunu, nörodejenerasyon, nörotoksisite ve nöroinflamasyon ile birlikte oksidatif stresi, indüklediği görülmektedir (Kamat and Nath 2015).

### **Okadaik asitin embriyotoksik etkisi**

Okadaik asit, güçlü bir serin/treonin protein fosfataz inhibitörü olduğu için, embriyonik gelişim sırasında fosforilasyon ve defosforilasyon durumunun sıkı bir şekilde düzenlenmiş dengesini bozma potansiyeline sahiptir (Ehlers *et al.* 2010). Yapılan araştırmalar sonucunda, kuluçkalanmış medaka balığı (*Oryzias latipes*) embriyolarında, okadaik asitin dozuna bağlı olarak sağkalım oranında ve embriyonel gelişmelerde azalmalar meydana geldiği gözlemlenmektedir. Düşük okadaik asit konsantrasyonlarının, embriyonik gelişim aşamalarında, dönüşü olmayan hasarlara neden olabileceği görülmektedir (Ye *et al.* 2022).

### **Okadaik asitin genotoksik etkileri ve DNA onarımı üzerine etkileri**

Araştırmalar göstermektedir ki, insan ve hayvan hücrelerinde, okadaik asit genetik materyal üzerinde hasar oluşturmaktadır. Bu sebeple okadaik asit genotoksik bir ajan olarak kabul edilmektedir. Oluşan bu hasarlar neticesinde; mikronüklei oluşumu, oksidatif DNA hasarı, kardeş kromatid değişimleri, 8-hidroksi-deoksiguanin eklentileri, mini uydu mutasyonları ve DNA zincir kırıkları gibi çeşitli DNA lezyonlarına sebebiyet vermektedir (Wuerger *et al.* 2023).

### **Okadaik asitin neden olduğu hastalıklar**

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) diyareik kabuklu zehirlenmesini; ishal, bulantı, kusma ve karın ağrısı gibi semptomlarla karakterize etmektedir. İshalli kabuklu deniz

ürünleri zehirlenmesinin semptomları arasında yoğun ishal ve şiddetli karın ağrıları ve nadiren mide bulantısı ve kusma bulunur ve bunlar zehirli kabuklu deniz ürünleri tüketildikten 30 dakika ile en fazla 12 saat sonra herhangi bir zamanda ortaya çıkma eğilimindedir. Yetişkin insanlarda ishal etkileri oluşturmak için kabaca 40 µg okadaik asit gerektiği tahmin edilmektedir (Creppy 2002).

Fosfatazların inhibisyonu, hücrede sodyum salgılanması ve çözünen geçirgenliği üzerindeki kontrolün kaybıyla sonuçlanabilmektedir. Diğer güçlü fosfataz inhibitörleri ishal etkisi göstermemektedir. İshalin protein fosfataz inhibisyonu ile ilişkisi olmadığı görülmüştür. Bu sebeple, okadaik asit ve DTX'lerin toksisitesinde, örneğin bağırsak motilitesini ve su ve elektrolit sekresyonunu inhibe ederek diyareye karşı koruma sağlayan nöropeptit Y'nin inhibisyonu gibi etkileri olması söz konusu olabilmektedir (Vilarino *et al.* 2018).

Bu inhibisyon, hücrenin geçirgenliğini düzenleyen sitoskeletal bağlantılarda yer alan proteinlerin hiperfosforilasyonuna sebebiyet vererek hücre sıvılarında kayıplara neden olmaktadır. Okadaik asit tipi toksinlerle kontaminasyona maruz kalan kabuklu deniz hayvanlarının tüketimi neticesinde, mide bulantısı, kusma, karın krampları, ishal ve gastrointestinal bozukluk gibi olumsuz etkiler teşkil edebilmektedir (Gerssen *et al.* 2010).

Avrupa Birliği'nin verilerine göre, deniz biyotoksinlerinin akut risk değerlendirmesindeki porsiyon boyutu 400 g kabuklu deniz hayvanı eti olarak kabul edilmektedir. Mevcut AB limiti olan 160 µg okadaik asit eşdeğeri/kg kabuklu deniz hayvanı eti seviyesinde okadaik asit grubu toksinler içeren 400 gr'lık kabuklu deniz hayvanı eti porsiyonunun, 64 µg toksinlik bir diyet maruziyetiyle sonuçlanacağı kaydedilmektedir. 60 kg'lık bir yetişkin için bu değer yaklaşık olarak 1 µg/kg vücut ağırlığına eşdeğerdir (Alexander *et al.* 2009). Yapılan araştırmalar neticesinde, okadaik asit kaynaklı hafıza bozukluğu ile nöroinflamasyon arasında ilişki olduğu tespit edilmiştir (Nazem *et al.* 2015).

## **Zebra Balığı**

Zebra balığı insan genomu ile birçok homolog gene sahip olduğundan, insanlar üzerinde araştırılması mümkün olmayan birçok deneyde kullanılan omurgalı bir model organizmadır. Zebra balığı, kolay genetik manipülasyon, küçük boyut, düşük maliyet, yüksek üreme potansiyeli, embriyo gelişiminin dışı vücudunun dışında ve hızlı olması gibi avantajlarının olması model organizma olmasında önemli bir etkindir. Ayrıca zebra balığı, birçok insan hastalığı ile gelişim genleri benzer özellik göstermektedir. Bu sebeple zebra balığı birçok genetik ve deneysel araştırmada model organizma olarak kullanılmaktadır. Zebra balığı akvaryum balığı olarak kullanılmaktan ziyade tıbbi araştırmalarda, insanlarda kullanılması

istenen tedavi ve yöntemlerin etkilerinin belirlenememesinden dolayı genetik kontrolün sağlanabilmesi ve etkilerin gözlemlenebilmesi amacıyla kullanılmaktadır (Kayhan 2018).

Zebra balığı ile insan homologları arasındaki nükleotid veya amino asit sekanslarının deklığı yaklaşık %71'dir. Zebra balığı, omurgalı bir sinirsel yapısal organizasyona sahiptir ve tüm temel yapılar, memeli beynine benzemektedir (Ali *et al.* 2011). Gelişimin erken aşamalarında aktif dolaşım olmadan hayatta kalma yeteneğine sahiptir. Hücre ve hücre doku hareketlerini izlemek için geleneksel bir araç olan hızlandırılmış parlak alan mikroskopisi kullanılmaktadır. Yapılan yeni çalışmalarda ise hücresel doku hareketlerinin izlenmesi için, hızlı ışık levhası floresan mikroskoplar kullanılmaktadır ( Yalcin *et al.* 2017). Zebra balığı embriyoları, serbest yüzen larvalar haline geldiklerinde, döllenmeden 48 ve 72 saat sonra (hpf) kuluçkada 28.5°C'de tutulmaktadır. Yumurtadan çıkmadan önce embriyo, bazı bileşiklerin girişine engel olan koryon, yarı saydam ve nispeten geçirgen olmayan zar içindedir (Ahmad *et al.* 2012).

Zebra balığı, hücre kültürü deneylerini bütün bir omurgalı modeline genişletmek için benzersiz, in vivo, orta verimli bir sistem sağlamaktadır. Zebra balığı embriyolarının popülasyon boyutunun fazla olması, zebra balığı üzerindeki çalışmalar, bileşik toksisitenin hızlı bir şekilde değerlendirilmesini sağlamaktadır. Zebra balığı, başka bir omurgalı canlı popülasyonunda toksik maddeye maruz kalma durumunda meydana gelebilecek gelişimsel ve sağlık sonuçlarının mekanizmalarını inceleme fırsatı verdiğinden oldukça önem teşkil etmektedir. Ek olarak, çok sayıda yavru, düşük bir maliyetle, çevresel maruziyetlerin gelişimsel etkilerinin popülasyon ölçeğinde yapılabilen uzunlamasına araştırmalara olanak tanımaktadır (Bambino and Chu 2017).

Kas iskelet sisteminin klinik bozukluklarını tespit etmek ve yeni tedavilerin keşfini hızlandırmak için hızlı, verimli biyolojiye uygun küçük hayvan modelleri avantaj sağlamaktadır. Zebra balığı, daha fazla emek ve maliyet gerektiren yoğun çalışmalara öncelik vermek için bir ön tarama aracı olarak kullanılabilir (Busse *et al.* 2020).

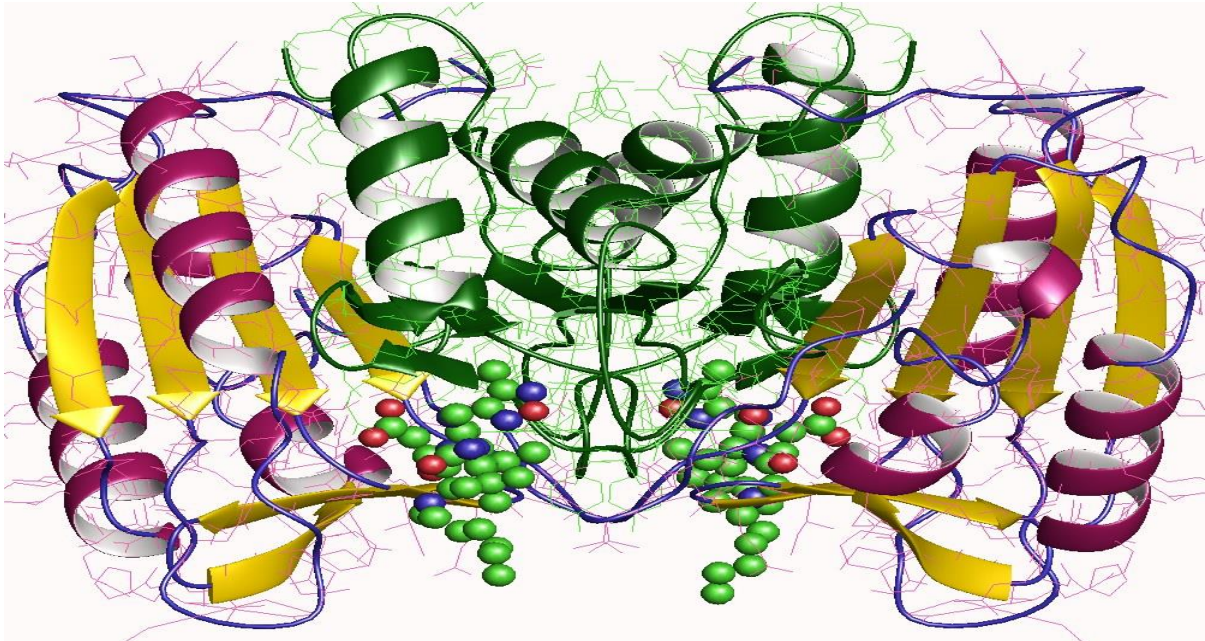
Omurgalılar, rejeneratif kapasitelerinde oldukça büyük farklılıklar göstermektedir. Memelilerin rejeneratif kapasiteleri genellikle daha sınırlıdır ve diğer omurgalılar daha yüksek derecede rejeneratif kapasiteye sahiptir. Rejenerasyon çalışmaları için zebra balığı (*Danio rerio*) en yaygın olarak kullanılan omurgalı hayvan modellerinden biridir. Gelişimi incelemek için genetik ve deneysel olarak erişilebilir bir model sistem olarak kurulmasının, erken rejenerasyon çalışmaları, diğer birçok balık gibi zebra balığının birçok dokuyu tamamen yenileyebildiğini göstermektedir (Marques *et al.* 2019).

Zebra balığı, kimyasal toksisite taramasında, ilaç geliştirmede ve gelişimsel nörotoksisitede önemli bir model haline gelmektedir (Horzmann an00000000000000000000000000000000d Freeman 2018). Zebra balığı, sadece nörotoksik maddelerin yapısal ve kimyasal etkilerini anlamak için değil, aynı zamanda bu tür maruziyetle ilişkili davranışsal bozukluğu değerlendirmek için de yararlı bir araç olacak şekilde geliştirilmektedir. Nörotoksikanın temel eylemleri, nöral farklılaşma, proliferasyon, göç, aşırı büyüme, sinaps oluşumu ve devre gelişimindeki bozulmaların takip edilmesi açısından zebra balığı önem teşkil etmektedir. Ayrıca kimyasal maruziyetin işlevsel etkisini belirlemek amacıyla zebra balığının davranışı ölçülebilmektedir (Bailey *et al.* 2013).

### Kaspaz 3

Kaspaz 3, spesifik hedef proteinlerin bölünmesine aracılık eden sistein proteazlar ailesinin bir üyesidir. Kaspazların tümü başlangıçta aktif olmayan zimojenler (prokaspazlar) olarak üretilir ve daha sonra çok çeşitli spesifik dahili ve/veya harici sinyaller tarafından aktive edilmektedir.

Kaspaz 3, bazı Sp1 benzeri sekans içermekte ve bunun mRNA ekspresyonu, Sp1 ve p73 dahil olmak üzere birkaç transkripsiyon faktörü tarafından düzenlenebilmektedir (Eskandari and Eaves 2022). Kaspaz 3 proteini, kaspaz-8 ve kaspaz-9 ile etkileşime girmektedir. Kaspaz 3, CASP3 geni tarafından kodlanmakta ve CASP3 ortologları, tam genom verilerinin mevcut olduğu birçok memeli canlıda tanımlanmaktadır (Khalil *et al.* 2012).



Şekil 5. Kaspaz-3 heterotetramer + 2 pryazinon inhibitörü (Becker *et al.* 2004 ).

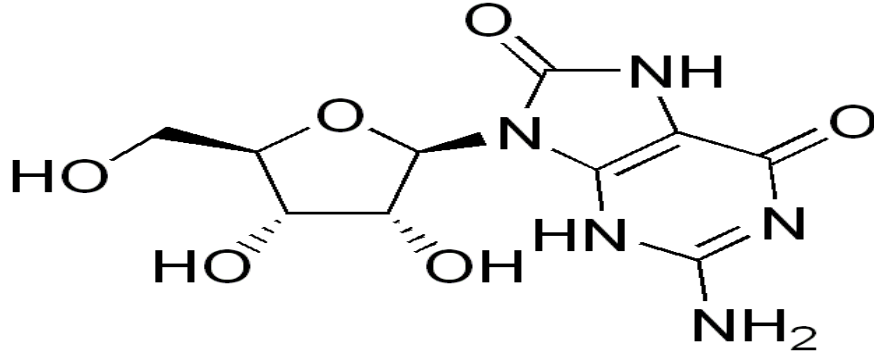
Kaspaz 3, apoptozun spesifik bir belirteci olarak kabul edilmektedir (Beroske *et al.* 2021). Prokaspaz-3, hücre dışı apoptotik yolla aktive edilebilmektedir. Hücre dışı yolda, proapoptotik sinyaller hücre dışı reseptörlere bağlanarak ölüme bağlı sinyal kompleksinin (DISC) oluşumuna neden olmaktadır (Araya *et al.* 2021). Kaspaz 3 apoptoz sırasında başlıca yürütücü kaspaz olarak kabul edilmektedir. Kaspaz 3'ün aktivasyonu, hücre ölümünün habercisi olmaktadır. Birçok hastalık durumunda apoptoz için patojenik bir rol önerilmektedir. Kaspaz 3'ün inhibisyonu, apoptozu azaltır ve birçok hasara karşı koruma sağlayabilmektedir (Suresh *et al.* 2019).

Kaspaz inhibisyonu için yaygın bir allosterik düzenleme, dimer arayüzündeki amino asitler ile aktif bölge kalıntıları arasında kısa mesafeli etkileşimler yer almaktadır. Mutajenez veya küçük moleküllerin bağlanması yoluyla etkileşimlerin bozulması aktif yapıyı kararsız bir hale getirir ve proteini aktif olmayan ya da kapalı duruma kaydırmaktadır (Walters *et al.* 2012).

Aktive edilmiş kaspaz 3'ü saptamak için tam montajlı immüno Floresan, zebra balığı embriyolarında içsel veya dışsal apoptoz geçiren hücreleri belirlemek için yararlıdır. Tüm montaj analizi, apoptoz geçiren hücrelerin doku özgüllüğüne ilişkin bilgi sağlar ancak sonuçta apoptoz geçiren hücre tiplerini kesin olarak belirlemek için kesit alma gerekmektedir (Sorrells *et al.* 2013).

## **8-OHdG**

DNA'nın oksidatif hasarında en yaygın metabolomik olan 8-Hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG), oksidatif stresin düşük seviyeli DNA hasarını gösterebilen hassas bir biyobelirteçtir. Hidroksil radikalının DNA üzerindeki C8 pozisyonundaki guanidin nükleosidini zedelemesi veya hidroksil radikalının alıcı elektron ile deoksiguanine bağlanması ile meydana gelmektedir (Gunes *et al.* 2021). Hidroksil radikali, membran lipitleri, hücresel proteinler ve DNA gibi temel biyomoleküllere hasar veren en kritik oksijensiz radikallerden biridir. Başlangıçta hidroksil reaksiyonu, serbest radikal kaynaklı DNA eklentilerinin üretimi meydana gelmekte ve daha sonra bir reaksiyonlar zinciri ve elektron soyutlaması ile 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) üretilmektedir. Oksidatif DNA hasarı seviyelerinin mutasyon frekansları ve kanser insidansı ile korelasyonu, hafif DNA hasarı seviyelerinin analizi için hassas yöntemlerin varlığına bağlı olarak gerçekleştirilmektedir (Sajous *et al.* 2008).



**Şekil 6.** 8-hidroksiguanozinin kimyasal yapısı ( Anonim 2008).

Hücre dışı olarak uygulanan 8-OHdG, genomik DNA'ya tekrar dâhil olamadığı için, 8-OHdG'yi 8-hidroksi-dGTP'ye dönüştüren deoksinnükleotit kinazın aktivitesi oldukça azdır ancak deoksiguanozin aktif olarak bir substrat olarak kullanılabilen deoksiguanozin trifosfata dönüştürülebilmektedir. 8-OHdG, oksitlenmiş guanin içeren diğer türlerin aksine hücre zarını geçebilmektedir. Bu nedenle 8-OHdG, genellikle oksidatif stres ile bağlantılı hastalıkları olan hastaların idrarında ya da serumunda saptanmaktadır (Ock *et al.* 2021).

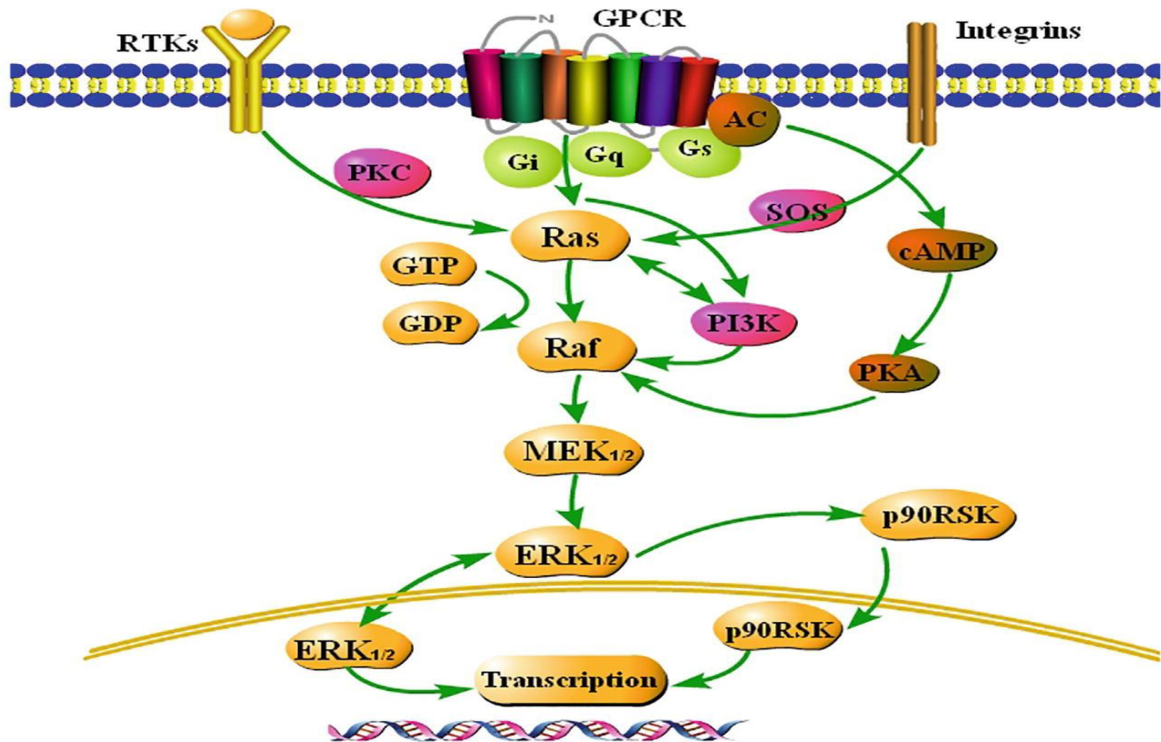
Hücre ve dokulardaki varlığına ek olarak, modifiye edilmiş pürin bazı idrarda da bulunmasına bağlı olarak, 8-OHdG vücutta gerçekleşen DNA onarım süreçlerini göstermektedir. Farklı patojenik süreçlerde idrardaki 8-OHdG miktarı ile dokulardaki miktar arasındaki korelasyonlar üzerinde gerçekleştirilen çalışmaların devam ettiği bilinmektedir (Dabrowska and Wiczowski 2017). 8-OHdG veya 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin (8-oksoG), nükleer ve mitokondriyal DNA'da, serbest radikallerin sebebiyet verdiği baskın formlardan biridir. Hücre zarlarının lipidlerinde, proteinlerde ve DNA'da oksidatif hasarın kalıcı olarak meydana geldiği deneysel olarak çoğu kez kanıtlanmıştır. Oksidatif lezyonlar, karsinogenez ve oksidatif stres için bir biyobelirteç olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar, idrarda 8-OHdG'nin dejeneratif hastalıkların ve çeşitli kanserlerin risk değerlendirmesi için iyi bir biyobelirteç olduğunu göstermektedir (Valavanidis 2009).

## ERK1/2

ERK1/2; ERK1 ve ERK2, Ras-Raf-MEK-ERK sinyal iletim zincirine katılan ilgili protein-serin/treonin kinazlardır. Bu basamak, hücre yapışması, hücre döngüsü ilerlemesi, hücre göçü, hücre hayatta kalması, farklılaşma, metabolizma, çoğalma ve transkripsiyon dâhil olmak üzere çok çeşitli süreçlerin düzenlenmesine katılmaktadır (Roskoski 2012).

ERK ½, farklılaşma ve çoğalma gibi uyarılmış hücresel süreçleri düzenleyen merkezi sinyal bileşenleridir. Bu kinazlar, düzensiz olduklarında, başta kanser olmak üzere çeşitli patolojilerin aktifleşmesine ve sürdürülmesine dahil olmaktadır. ERK, dinlenen hücrelerin

sitoplazmasında bulunmaktadır. Substratlarının çoğu nükleerdir ve gerçekten de hücre dışı uyarılma, ERK'nin sağlam ve hızlı bir nükleer translokasyonunu başlatmaktadır. Uyarılma üzerine çekirdeğe giden diğer sinyal bileşenlerine benzer şekilde ERK, nükleer translokasyonun kanonik importin $\alpha/\beta$  mekanizmasından faydalanamamaktadır. Bunun yerine, nükleer gözenekler aracılığıyla uyarılmış mekik hareketine izin vermek için importin7 ile reaksiyona giren kendi benzersiz nükleer translokasyon sinyali (NTS) bulunmaktadır. Nükleer translokasyonun önlenmesi, B-Raf- ve N/K-Ras-dönüştürülmüş kanserlerin artmasını engellemektedir (Maik Rachline *et al.* 2019).



**Şekil 7.** Klasik Ras-Raf-MEK-ERK 1/2 sinyal yolunun özeti (Kong *et al.* 2019).

ERK1/2, bağışıklık hücrelerinde önemli bir rol oynayarak hücre hasarına karşı koruma sağlamaktadır. ERK1/2, inflamatuvar sitokin üretimi için ilk olarak c-Fos'u fosforile etmektedir. ERK1/2 diğer inflamatuvar mediyatörlere cevap olarak NF-K $\beta$  düzenlemesinde nasıl bir etki oluşturması gerektiğini göstermektedir. ERK1/2, hem doğal hem de adaptif bağışıklık sistemlerinin hücrelerinde çoklu sinyal yollarına öncülük etmekte ve bağışıklık hücresi fonksiyonunun merkezi bir düzenleyicisi olarak meydana çıkmaktadır. ERK1/2 aktivasyonu, hücresel cevapların türünü ve ne düzeyde olduğunu belirlemede oldukça önem teşkil etmektedir (Lucas *et al.* 2022).

## NF-Kb

Nükleer transkripsiyon faktör-Kb (NF-Kb), doğuştan gelen ve adaptif immün fonksiyonların birçok yönüne etki ederek inflamatuvar cevapların düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır. NF-Kb, kemokinleri ve sitokinleri kodlayanlar dahil olmak üzere çeşitli proinflamatuvar genlerin ekspresyonunu başlatmaktadır (Liu 2017).

Nükleer faktör-Kb (NF-Kb), çeşitli hücrel süreçlerde yer alan beş transkripsiyon faktörü ailesinden meydana gelmektedir. Bu aile NF-Kb1 (p105/p50), NF-Kb2 (p100/p52), RelA (p65), RelB ve c-Rel'den meydana gelmektedir. NF-Kb aktivasyonu, çoğu proinflamatuvar olan hedef genlerin transkripsiyonunda yer almaktadır. NF-Kb sinyali, kanonik ve kanonik olmayan yollar olmak üzere iki farklı yolla etkinleştirilmektedir. NF-Kb, Alzheimer (AD)'da meydana gelen nörodejenerasyon döngüsünün merkezinde yer almaktadır. Ek olarak, hücre tipine ya da NF-Kb alt birimlerinin birleşimine bağlı olarak, NF-Kb'nin aktivasyonu, nörodejenerasyon veya nöroproteksiyonda da rol oynayabilmektedir (Sun *et al.* 2022).

Okadaik asitin güçlü bir NF-Kb aktivatörü olduğu bildirilmektedir. Okadaik asit, NF-Kb aktivasyonunun protein fosforilasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Yapılan bir çalışmada, okadaik asitin ROI'lerden bağımsız olarak NF-Kb'yi aktive ettiğine dair kanıt sağlarken, başka bir çalışma okadaik asit etkisinin antioksidanlara karşı duyarlı olduğunu ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve L-butyonin-sülfoksimin, bir glutatyon inhibitörü, okadaik asit üzerinde birlikte uyarıcı bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Tümör hücrelerinin, ancak birincil hücre dizilerinin değil, NF-Kb'nin aktivasyonu ile okadaik asite güçlü bir şekilde tepki oluşturduğu gözlemlenmektedir (Schmidt 1995).

## TLR4

Toll benzeri reseptör 4 (TLR4), hücre dışı bir alan ve bir hücre içi alan içeren Toll benzeri reseptör (TLR) ailesine ait bir model tanıma reseptörüdür. Endozomal olarak işlev gören TLR'ler esas olarak nükleik asitlerle aktive edilmektedirler. Ek olarak çeşitli moleküller, hücre yüzeyinde eksprese edilen TLR'leri aktive etmektedir (Litak *et al.* 2020). Toll benzeri reseptör 4 (TLR4); LPS tanıma ile LPS aracılı inflamatuvar cevaplar için TLR protein ailesinin en önemli üyesidir. TLR 4 ya da Toll benzeri reseptör 4, bağışıklık sisteminde rol oynayan Toll benzeri reseptörler ailesinden TLR4 olarak bilinen gen ve bunun ürünü olan proteindir (Watson 2014).

TLR4'ün proinflamatuvar aktivitesi, otoimmün bozukluklarda ve ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklarla bağlantılı olduğunu göstermektedir (Plociennikowska *et al.* 2015).

TLR4, lipopolisakkaritin (LPS) tanınmasından sorumlu gendir. Moleküler düzeyde lipopolisakkaritin (LPS), LPS bağlayıcı protein tarafından bağlanmasını sağlamaktadır. Bu durum, proinflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin, antimikrobiyal peptitlerin, reaktif oksijen türlerinin, ve akut faz proteinlerinin salgılanmasına sebebiyet vermektedir. TLR-4'ün aşırı ekspresyonu ve bu inflamatuvar sitokinlerin kronik üretimi, kaudal tip homeobox 2'nin (CDX-2) anormal transkripsiyonu meydana getirmektedir. CDX-2 seviyelerinde meydana gelen artış, pro-onkojenik hücre içi yolları aktive ederek kanser oluşumuna neden olabilmektedir (Mai *et al.* 2013). LPS TLR4'e uygun bir şekilde bağlandıktan sonra reseptör fosforile edilmekte ve NF-Kb dimerlerinden oluşan bir sinyalleşme ağını aktive etmektedir (Thon *et al.* 2022).

### **c-Fos**

c-Fos proteini, farklılaşma, proliferasyon, hayatta kalma ve ayrıca hipoksi ve anjiyogenezden etkilenen doku homeostazı dahil olmak üzere kritik hücre fonksiyonlarında yer almaktadır. c-Fos'un yanı sıra c-Jun, sinyal iletim yolları içindeki diğer genlerin ekspresyon oranlarını değiştiren çok kritik bir gendir (Tsiambas *et al.* 2020). c-Fos, hücre dışı uyaranlardan sonra hücre farklılaşması ile proliferasyonunda etki eden ani erken tepki genidir. FOS ailesinin proteinlerinin (Fra-1, Fra-2, FosB) diğer üyeleri, c-Fos, transkripsiyonunu meydana getirmek için JUN ailesinin üyeleriyle (c-Jun, JunB, JunD) heterodimerize olabilmektedir. Bir AP-1 heterodimeri olarak c-Fos, kısa vadeli uyaranları uzun vadeli tepkilere dönüştürebilmektedir (Velazquez *et al.* 2015).

FOS/AP-1 transkripsiyon faktörünün proliferasyon, farklılaşma, hayatta kalma, metabolizma, hipoksi, anjiyogenez, steroidogenez ve prostaglandin üretimi gibi çeşitli hücresel olaylarda yer almaktadır. Hücresel olaylar aynı zamanda yumurtlama, foliküler gelişim ve luteinizasyon dahil olmak üzere normal yumurtalık fonksiyonlarının oluşabilmesi için gerekli olan proseslerdir (Choi *et al.* 2021). c-Fos transkripsiyon faktörü AP-1, proliferasyonu artırmakta, tümör ve apoptoz metastazı gibi çeşitli hücresel proseslerin ilerleyişinde etkin bir rol oynamaktadır. Özellikle, AP-1 ailesinin çeşitli üyeleri arasında c-Fos, bir tümör promotörü olarak etki edebilmektedir (Liang *et al.* 2011).

Literatürde okadaik asidin zebra balığı üzerindeki toksik etkilerine ilişkin birçok çalışma bulunmaktadır (Zhang *et al.* 2014; Nada and Shah, 2016; Thawkar *et al.* 2021; Figueroa *et al.* 2020). Okadaik asite maruz bırakılan *in vitro* ve *in vivo* yapılan çalışmalardaki kanıtlar, ishal sendromuna ek olarak dokularda çeşitli dejenerasyonların meydana geldiğini göstermektedir. Yapılan çalışmalar, okadaik asit ilave edilmemiş kontrol grubuna kıyasla doza bağlı bir şekilde hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığını hatta hücre ölümünü arttırdığı görülmektedir. Okadaik asitin zebra balığı beyni üzerindeki etkilerinin toksik mekanizması

tam olarak bilinmemektedir ve NfKB, TLR-4, ERK 1/2, 8-OHdG, kaspaz 3 ve c-FOS sinyalinin rolü üzerine sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır. Bu nedenle bu çalışmada, okadaik asitin zebra balığı beyinlerindeki potansiyel toksik mekanizması NfKB, TLR-4, ERK 1/2, 8-OHdG, kaspaz 3 ve c-Fos immünofloresan aktivasyonu değerlendirilerek ve hayatta kalma oranı, kuluçka oranı ve vücut malformasyonları ölçülerek araştırılmıştır. Dolayısıyla, zebra balığı beynindeki okadaik asitin etki mekanizmasına aracılık eden sinyal iletim yollarını anlayarak, okadaik asit toksisitesinin patofizyolojisi altında yatan moleküler mekanizmaları araştırmak mümkün olabilir.



## KURAMSAL TEMELLER

Figueroa *et al.* (2020) okadaik asit veya DTX-1'in zebra balığı (*Danio rerio*) larvalarında toksik etkilerini araştırmışlardır. Bu toksine maruz bırakıldığı süreç boyunca, siklopi, perikadiyel ödem, gelişimsel gecikme ve ön-arka ekseninde kısalma gibi çeşitli değişiklikler, zebra balıklarında saptanmıştır. Biyokimyasal biyobelirteçler olan süperoksit dismutaz (SOD) ve katalazın (CAT) aktivite seviyeleri konsantrasyona bağlı bir düşüş gösterirken glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GR) belirgin şekilde yüksek olduğu gözlemlenmiş ve toksin maruziyetinin ardından artan seviyelerde oksidatif hasar (malondialdehit ve karbonil içeriği) oluştuğunu tespit etmişlerdir.

Nada *et al.* (2016) yaptıkları çalışmada zebra balığını kullanarak farmakolojik olarak indüklenen bir Alzheimer hastalığı geliştirmişlerdir. Kullanılan farmakolojik ajan olan okadaik asiti kullanmışlardır.

Çalışmalarında, zebra balığı beyinde fosforile glikojen sentaz-3 $\alpha/\beta$ , p-tau, Ap, tau proteini ve senil plak oluşumunun immünohistokimyasında, okadaik asit maruziyeti sebebiyle önemli ölçüde artış meydana geldiği gözlemlenmiştir. Gözlenen değişiklikler, Alzheimer hastalığı (AD) patofizyolojisinde de önem teşkil eden bileşenlerde, eksiklikler olduğunu göstermektedir. Zebra balıklarında Alzheimer hastalığını meydana getirmeye yönelik mevcut farmakolojik yöntemler yeterince geliştirilmemiş ve hastalığın tüm özelliklerini yansıtmadığını belirtmektedirler. Zebra balığı, okadaik asit kaynaklı Alzheimer hastalığının ilaç keşfini incelemek için uygun maliyetli bir model olarak yer alabilmektedir. Alzheimer hastalığına sebebiyet veren karmaşık patofizyolojinin altında yatan moleküler mekanizmaları anlaşılması için de, zebra balığının oldukça uygun bir model organizma olduğu tespit edilmiştir.

Zhang (2014) çalışmalarında, zebra balığı embriyolarını gelişim aşamaları sırasında, etanol konsantrasyonuna (%0,5-5,0) maruz bırakılmıştır. Embriyoların sonik dikenli proteine bağımlı nöral hücre tipleri için tanımlanmış hücre markırlarının ekspresyonunda görülen değişiklikler için in situ hibridizasyon ile analizini yapmışlardır. Erken nörolasyon ve erken gastrulasyon gibi tanımlanmış gelişim aşamaları sırasında geçici tıkanıklık benzeri etanol maruziyetlerinin, Shh'ye bağlı genlerin ekspresyonunda çeşitli değişiklikler gözlemlenmiştir.

Williams (2018), yaptığı çalışmada LKE, murin modellerinde nöroprotektif ve nörotrofik özellikler ile birlikte etki mekanizmasını açıklığa kavuşturmak için yakın zamanda kurulmuş bir zebra balığı okadaik asit kaynaklı Alzheimer hastalığı modelini kullanmışlardır.

Her grupta 8 balık yer alacak şekilde 3 grup oluşturulmuştur. İlk Grup negatif kontrol, 2. Grup 100 nM okadaik asit, 3. Grup 100 nM okadaik asit + 500 uM LKE olacak şekilde ayarlanmıştır. Okadaik asitin, zebra balığında ciddi bilişsel bozukluklara neden olduğu, ancak LKE ile birlikte tedavi, bilişsel bozukluklara karşı koruma sağladığı görülmüştür. Ayrıca LKE'nin, apoptotik beyin hücrelerinin sayısını önemli ölçüde azalttığı, beyinden türetilen nörotrofik faktörü (BDNF), pAkt (Ser 473) ve pCREB'nin (Ser133) fosfoaktivasyonunu artırdığını belirtmişlerdir.

Chen (2011) yaptığı çalışmada, hücrelerin apoptotik morfolojik değişikliklerini ve DNA fragmentasyonunu karakterize ederek okadaik asitin MG63 hücrelerinin apoptozisi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. MG63 hücrelerinde okadaik asit aracılı apoptozun meydana gelmesi ile çift sarmallı RNA'ya bağımlı protein kinaz (PKR), kaspaz ve nükleer faktör- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)'nin etki şekilleride incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar neticesinde, okadaik asitin MG63 hücrelerinde 75 IC50'de sitotoksikite ve apoptozu indüklediği tespit edilmiştir. NF-Kb'nin amonyum pirolidinditiokarbamat (PDTC) tarafından bloke edildikten sonra apoptozun aşağı regülasyonu meydana gelmiştir. Sonuç olarak, okadaik asitin, PKR, NF-Kb ve kaspaz yolu yoluyla MG63 hücre apoptozunu indüklediği tespit edilmiştir.

Mensi *et al.* (2008) yaptıkları çalışmada, hücre proliferasyonu, hücre zarı bütünlüğü, caspase-3 aktivasyonu gibi çeşitli son noktaları kullanarak DOK, Caco-2, HepG 2 ve C6 gibi farklı hücre dizilerinin sitotoksik ve genotoksik tepkilerini okadaik asite karşı değerlendirmiş ve karşılaştırmışlardır.

Lin *et al.* (2023), yaptıkları çalışmada, insan embriyo kültürünü tedavi etme amacıyla neler yapılabileceğini öngörmek üzere zebra balığı embriyolarını önce düşük konsantrasyonlu bir GM SULF (17.8 uM)'a maruz bırakmışlardır. RNA-seq ve MeRIP-seq ile birleştirerek, EYA1, EYA2, PDZD7, Dach2, Rere, sox9-b, h2ax ve H3-I gibi kontrol grubu ve 1000  $\mu$ M GM SULF ile tedavi edilen grupta farklı şekilde ifade edilen bazı genler bulunmaktadır. Embriyolar GM SULF ile tedavi edildikten sonra bu genlerin ekspresyonu önemli ölçüde değiştiği gözlemlenmiştir. GM'nin bu genlerin ekspresyonunu etkileyerek ototoksikite ve nefrotoksikiteye neden olabileceğini düşündürmektedir. pH3 ve PCNA'nın, immüno Floresan sonuçları aracılığıyla GM SULF ile tedavi edildikten sonra zebra balığı embriyo gelişiminde mitotik tutuklama gözlemlenmiş, bu da GM'nin toksisitesinin hücre büyümeme ve ölümü üzerindeki etkileri olduğunu göstermektedir.

Berry *et al.* (2006), yaptıkları çalışmada zebra balığı embriyo modelini kullanılarak, son zamanlarda izolat Fischerella 52-1'den gelişimsel toksinlerini saflaştırmışlardır. Bu çalışma aracılığıyla, bu toksinlerin kültürlerin hücre dışı bileşenlerinde bol miktarda bulunduğu ve doğal olarak oluşan alg popülasyonları tarafından salınabileceği bulunmuştur.

Botelho *et al.* (2022) bu makalede deniz dinoflagellatları tarafından doğal olarak üretilen toksinlerin Alzheimer hastalığının (AD) başlıca itici güçleri olan tau proteini hiperfosforilasyonu ile birlikte  $\beta$ -amiloid plaklarındaki artışlar üzerinde nasıl etkiler oluşturduğunu incelemişlerdir. Bu çalışmada,  $\beta$ -amiloid plaklarını ve tau hiperfosforilasyonunu azaltan yessotoksinler (YTX'ler), gymnodimin (GYM), spirolidler (SPX'ler) ve gambierol üzerine çalışılmıştır. Tanımlanan başka bir toksin grubu olan okadaik asit ve türevlerinin, fosforile tau proteinlerinin varlığını kolaylaştıran protein fosfataz aktivitesini inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Zebra balığında Alzheimer hastalığını tetiklemek için okadaik asit kullanılmış ve Alzheimer hastalığını tedavi etmede veya hafifletmede yeni ilaçların etkinliğini *in vivo* olarak test etme fırsatı sunmuştur.

Tchivelekete *et al.* (2022) yaptıkları çalışmada okadaik asitin insan retina pigment epitel hücrelerinde (ARPE-19) ve zebra balığı retinalarında meydana getirdikleri toksisiteyi araştırmışlardır. Hücre bazlı deneyler, okadaik asitin doza bağlı bir şekilde hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığını ve oksidatif stresi arttırdığını göstermiştir. *In vivo* çalışmada, döllenmeden (hpf) 24 saat sonra zebra balığı embriyoları, dört gün boyunca okadaik asit ile tedavi edilip, ölüm, malformasyonlar, gecikmiş yumurtadan çıkma, değişen kalp atışı ve azalan hareket dahil son nokta ölçümleri yapılmıştır. Okadaik asit maruziyeti mortaliteyi artırdığı, yumurtadan çıkmayı, kalp atış hızını düşürdüğü ve morfolojik anormalliklere neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, antioksidan genlerin etkisini önemli ölçüde azalttığı, iltihaplanmayı önemli ölçüde artırdığı ve ayrıca zebra balığı embriyolarında fotoreseptör kaybına neden olduğu rapor edilmiştir.

Hong *et al.* (2002) yaptıkları çalışmada, sıçan nöronlarında okadaik asitin neden olduğu nöronal ölümü önlemek için CHX kullanmış ancak başarısız olduğu tespit edilmiştir. Her iki ölen hücre tipinin karşılaştırılması üzerine, olgunlaşmamış nöronlar, apoptozun nükleer parçalanma, fosfatidilserin dışsallaştırma ve belirgin caspase-3 aktivasyonu gibi karakteristik özelliklerini gösterirken, olgun nöronlar apoptozun birkaç karakteristik özelliğini gösterdiği tespit edilmiştir.

Le *et al.* (2008) yaptıkları bu çalışmada zebra balıklarında *c-fos* geninin aşırı ekspresyonu, seçici olarak ERK fosforilasyonunu uyardığı ve transkripsiyon faktörü c-Fos seviyesini arttırdığını tespit etmişlerdir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

#### Araştırma yeri

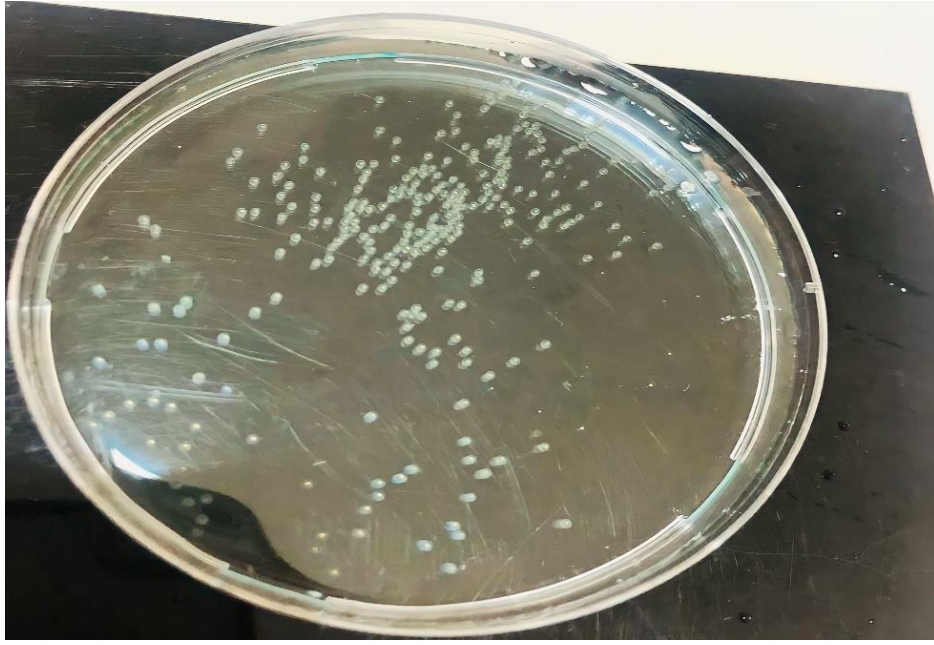
Araştırma, Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Deneysel Araştırma Birimi'nde yapılmıştır.



Şekil 8. Araştırma Birimi

#### Balık materyali

Yapılan araştırmada, düşük maliyetlerle çok sayıda üreme sağlanması, bakımının kolaylığı, boyut olarak küçüklüğü, doğurganlığının fazla olması, embriyonik gelişiminin hızlı olması; 24 saat içinde tek hücreli zigot, klasik omurgalı vücut planına sahip hareketli, şeffaf bir embriyoya sahip olması nedeniyle zebra balığı (*Danio rerio*) kullanılmıştır. Toksikoloji çalışmalarında sıklıkla tercih edilen zebra balığı *Cyprinidae* familyasını ait bir türdür (Astell and Sieger 2020). Zebra balığı embriyoları, çalışmada kullanılması amacıyla Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Deneysel Araştırma Birimi'nden temin edilmiştir.



**Şekil 9.** Denemede kullanılan zebra balığı yumurtaları

#### **Kullanılan kimyasal**

Yapılan araştırmada kullanılan kimyasal, okadaik asit ( $C_{44}H_{68}O_{13}$ ) olup ticari firmadan (Calbiochem) satın alınmıştır.

#### **Yöntem**

##### **Deneme planı**

Zebra balığı larvalarında LC 50 değeri 10  $\mu\text{g/ml}$  olarak belirlenmiştir (Figueroa et al. 2020). Çalışmamızda kullanılan dozlar ilgili literatüre göre belirlenmiştir (Figueroa et al. 2020). Her bir grupta 80 tane olacak şekilde zebra balığı embriyoları, 4 gruba ayrılmıştır. Bu gruplardan ilk grup kontrol grubu olup, ikinci gruba 0,5  $\mu\text{g/ml}$  okadaik asit, üçüncü gruba 1  $\mu\text{g/ml}$  okadaik asit, dördüncü gruba 2,5  $\mu\text{g/ml}$  okadaik asit ilavesi 5 gün boyunca yapılmıştır. İlk günden sonra yumurtadan çıkan balıklar sayılıp kabuklar pipetle alınmıştır. Hergün 25 ml saf su ile tüm grupların ortamı 5 gün boyunca yenilenmiş ve hepsine 25 ml saf su eklenmiştir. Embriyolarda meydana gelen değişimler gözlemlenmiştir.

##### **Embriyo morfolojilerinin izlenmesi ve değerlendirilmesi**

6. Günde anomali bozukluk görülen embriyolar, metil selüloz damlatılmış olan lamın üzerine alınıp beyaz ışık çekimi yapılmıştır. Çekim yapıldıktan sonra embriyolarda meydana gelen malformasyonlar değerlendirilmiştir. Çıkan sonuçlara göre embriyolarda oluşan anomali bozukluklar tespit edilmiştir. Vücut morfolojilerindeki anormalliklerin belirlenmesinde, besin kesesi ödemi (YSE), perikardiyal ödem (PE), kafa malformasyonu, kavisli vücut eksen (CBA), vücut malformasyonları (BM) kuyruk malformasyonu, kısa kuyruk

gibi tipik malformasyonlar okadaik asit ve kontrol gruplarında araştırılmıştır. Yumurtadan çıkış oranı ve malformasyon oranı hesaplanmıştır.

### **İmmunfloresan boyama yöntemi**

Deney sonunda gruplardan rastgele 10 embriyo seçilerek %4 paraformaldehit fiksatifine bırakılmıştır. Fikse olan embriyolar akan çeşme suyunda yıkandıktan sonra, dereceli alkollerde (%70, 80, 90, 95, 100 ) 15'er dk, ksilen ile 1 saat, sıcak parafinde 1 saat bekletilmiştir. Daha sonra embriyolar parafine gömülmüştür. Parafin bloklardan 3 µm'lik kesitler rotarymikrotom (Leica RM 2255, Wetzlar, Almanya) kullanılarak polilizinli lamlara alınmıştır. Polilizinli lamlara alınan doku örnekleri deparafinizasyon için 57°C 1 saat bekletilmiş ve daha sonra, ksilol ve alkol solüsyonlarında deparafinizasyon aşaması tamamlanan kesitler distile suya alınarak rehidre edilmiştir. Kesitler bir antijen retrieval çözeltisine (Citratabuffer, pH6.0) alınmış ve antijenlerin açığa çıkması için mikrodalgada 10 dk kaynatılmıştır. Spesifik olmayan bağlanmayı önlemek için dokuların üzerine protein blok damlatılmıştır. Kesitlere 8-OHdG, caspase3, NF-Kb, ERK1/2, TLR4 ve c-Fos primer antikorları uygulanarak ve 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra sekonder olarak anti-mouseIgG H&L damlatılarak karanlık ortamda 1 saat bekletilmiştir. Kesitler DAPI'li FluoroshieldMountingMedium ile kapatılarak floresan mikroskopta (ZeissScope A1) incelenmiştir. Her grupta yer alan embriyolarda görülen immünopozitiflikler yarı kantitatif olarak skorlanmıştır (0=yok, 1=hafif, 2=orta ve 3=yoğun).

### **İstatistiksel analiz**

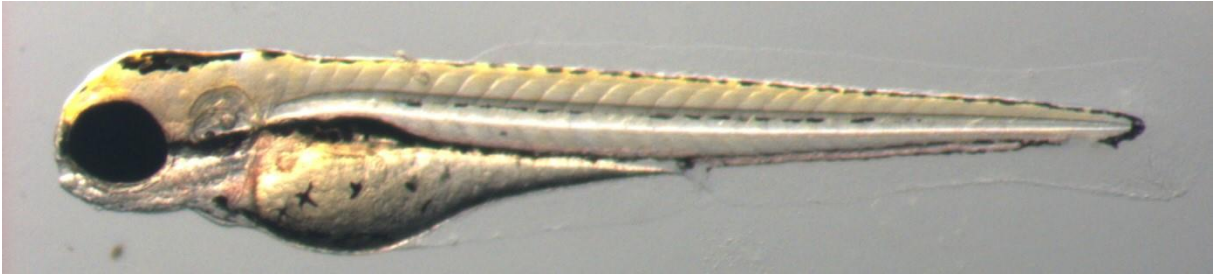
İmmunofloresans boyama yöntemi sonucu elde edilen immunpozitifliklere ait verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde IBM SPSS 20 programı kullanılmıştır. Tüm gruplar arasındaki farklılıklar parametrik olmayan Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırılmıştır. Gruplar arasındaki ikili çapraz kontroller, Mann-Whitney U testi ile analiz edilmiştir. İstatistiksel olarak  $p < 0,05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir. Veriler ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Yumurtadan çıkış ve toplam malformasyon analizleri; her bir hayvan ve numune için üç kopya halinde yapılmıştır. Sonuçların istatistiksel karşılaştırması, Prism yazılımı (GraphPad Software, San Diego, CA) kullanılarak tek yönlü ANOVA ve Tukey'nin post-hoc testi ile yapılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar şu şekilde sunulmuştur: ns  $p > 0,05$  (anlamlı değil); \* $p < 0,05$  (anlamlı); \*\* $p < 0,01$  (çok anlamlı); \*\*\* veya \*\*\*\* $p < 0,001$  (son derece önemli).

## ARAŞTIRMA BULGULARI

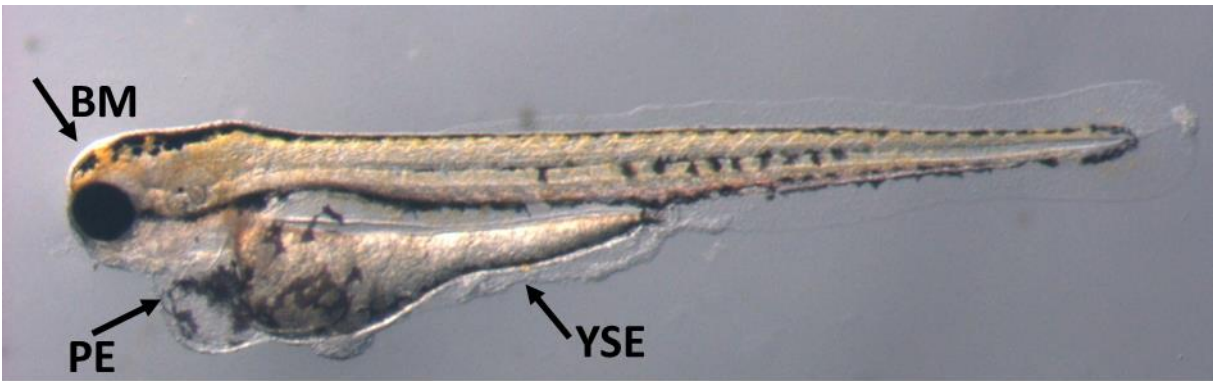
### Morfolojik Bulgular

#### Gözlenen vücut bozuklukları

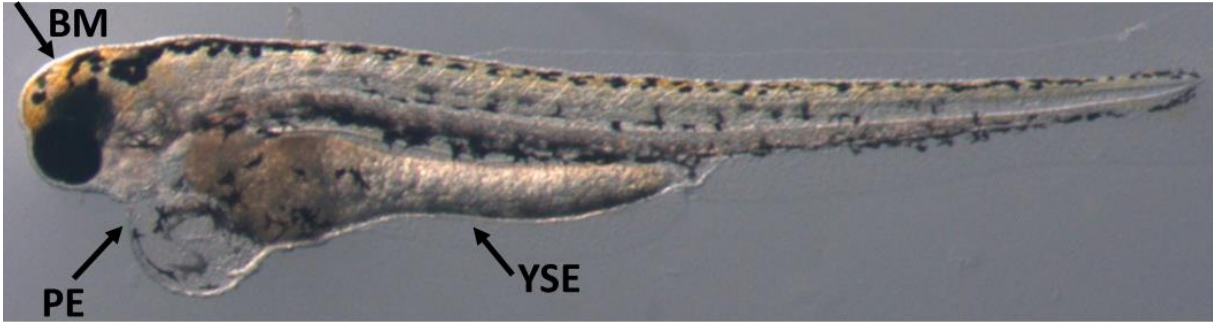
Embriyolar 0,5 µg/ml, 1 µg/ml ve 2,5 µg/ml okadaik asit dozlarına 5 gün maruz bırakılmıştır. Uygulama sonrası embriyolar 6. gün sonunda mikroskop altında incelenmiş ve gözlenen morfolojik bozukluklar tespit edilmiştir. Besin kesesi ödemi (YSE), perikardiyal ödem (PE), vücut malformasyonları (BM) kuyruk malformasyonu, kısa kuyruk, kafa malformasyonu ve kavisli vücut eksenini (CBA) gibi tipik malformasyonlar okadaik asit ve kontrol gruplarında 28,5°C'de araştırılmıştır. Yapılan inceleme sonucunda kontrol grubuna ait görüntü Şekil 10' de verilmiştir. 0,5 ve 1 µg/ml okadaik asit uygulanan grupta perikardiyal ödem (PE), besin kesesi ödemi (YSE) ve vücut malformasyonları kuyruk malformasyonu, kısa kuyruk ve kafa malformasyonu (BM) tespit edilmiştir (Şekil 11, Şekil 12). 2,5 µg/ml okadaik asit uygulanan grupta ise perikardiyal ödem (PE), besin kesesi ödemi (YSE), vücut malformasyonları kuyruk malformasyonu, kısa kuyruk ve kafa malformasyonu dahil (BM) ve kavisli vücut eksenini (CBA) görülmüştür (Şekil 13).



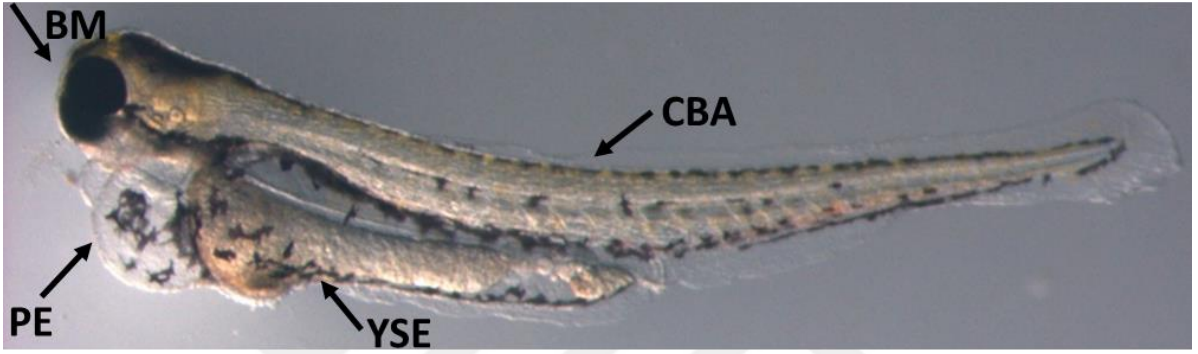
Şekil 10. Kontrol grubuna ait görüntü



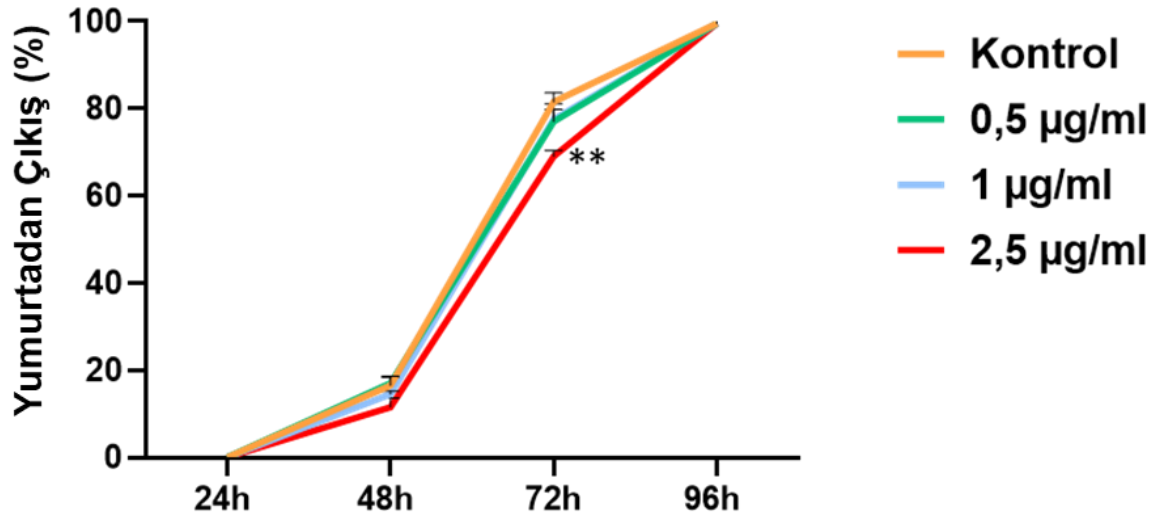
Şekil 11. 0,5 µg/ml okadaik asit grubuna ait bulgular. Besin kesesi ödemi (YSE), Perikardiyal ödem (PE) ve vücut malformasyonları, kafa malformasyonu, kuyruk malformasyonu ve kısa kuyruk dahil (BM)



**Şekil 12.** 1 µg/ml okadaik asit grubuna ait bulgular Besin kesesi ödemi (YSE), Perikardiyal ödem (PE) ve vücut malformasyonları, kafa malformasyonu, kuyruk malformasyonu ve kısa kuyruk dahil (BM)

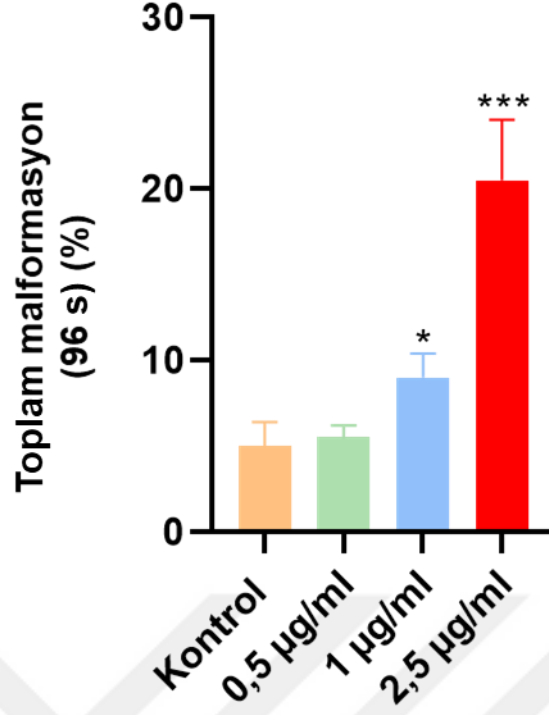


**Şekil 13.** 2,5 µg/ml okadaik asit grubuna ait bulgular. Besin kesesi ödemi (YSE), Perikardiyal ödem (PE) ve vücut malformasyonları, kafa malformasyonu, kuyruk malformasyonu, kısa kuyruk (BM) ve kavisli vücut eksenini dahil (CBA)



**Şekil 14.** Yumurtadan çıkış oranları

Kontrol grubu, 0,5 µg/ml ve 1 µg/ml okadaik asit uygulanan grupların yumurtadan çıkış oranlarında önemli bir fark görülmemiş ancak 2,5 µg/ml okadaik asit dozu uygulanan grubun yumurtalardan çıkış oranında önemli bir fark görülmüştür ( $p < 0,01$ ) (Şekil 14.).

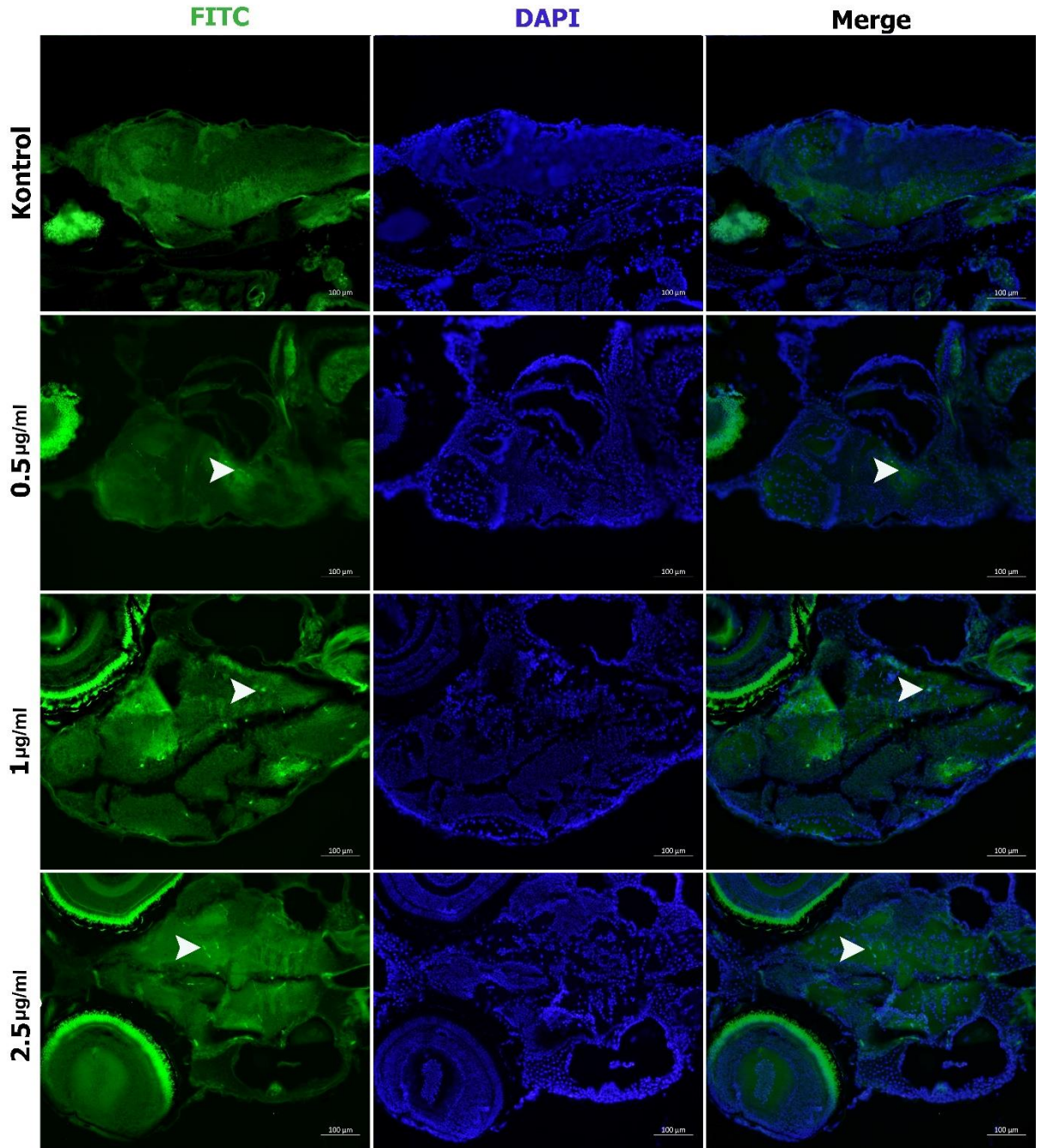


**Şekil 15.** Okadaik asit dozlarının zebra balığı embriyolarında meydana getirdiği malformasyon oranları

Kontrol grubu, 0,5 µg/ml, okadaik asit uygulanan grupların malformasyon oranlarında önemli bir fark görülmemiştir. 1 µg/ml ve 2,5 µg/ml okadaik asit uygulanan grupların malformasyon oranlarında önemli bir fark görülmüştür ( $p < 0,001$ ) (Şekil 15).

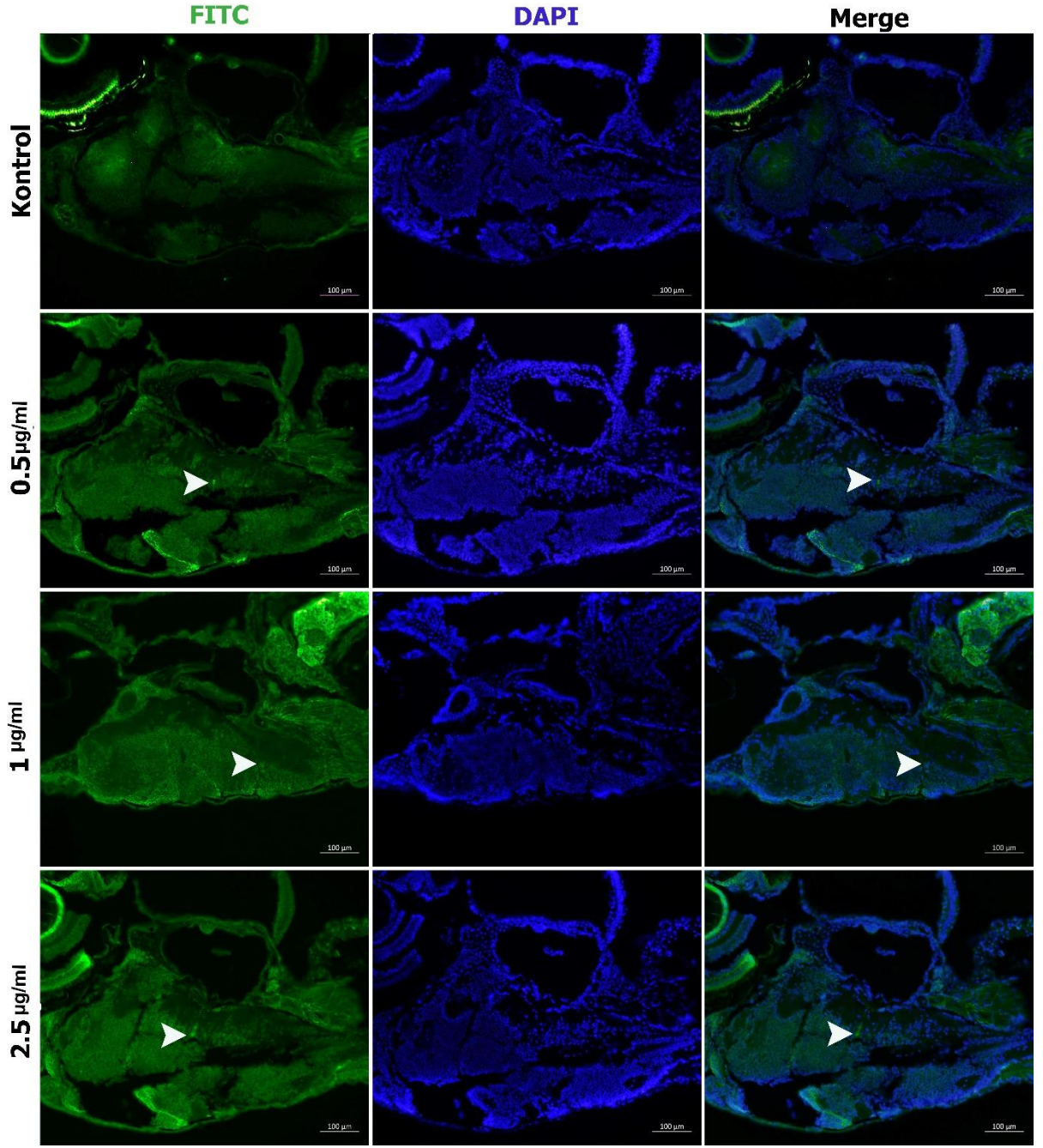
### İmmunfloresan Boyama Bulguları

İmmunfloresan boyama sonuçlarına göre, kontrol grubuna kıyasla 0,5 µg/ml okadaik asit uygulanan zebra balığı embriyolarının beyin kesitlerinde daha yüksek kaspaz 3 ekspresyonu gözlenmiştir (Şekil 16,  $p < 0,05$ ). 1 µg/ml okadaik asit ve 2,5 µg/ml okadaik asit uygulanan zebra balığı embriyolarının beyin kesitlerinde kaspaz 3 ekspresyonunun 1 µg/ml okadaik asit uygulanan gruba göre daha önemli ölçüde arttığı (Şekil 16,  $p < 0,05$ ), ancak 1 µg/ml ile 2,5 µg/ml okadaik asit uygulanan gruplar arasında önemli bir fark olmadığı belirlenmiştir (Şekil 16,  $p > 0,05$ ).



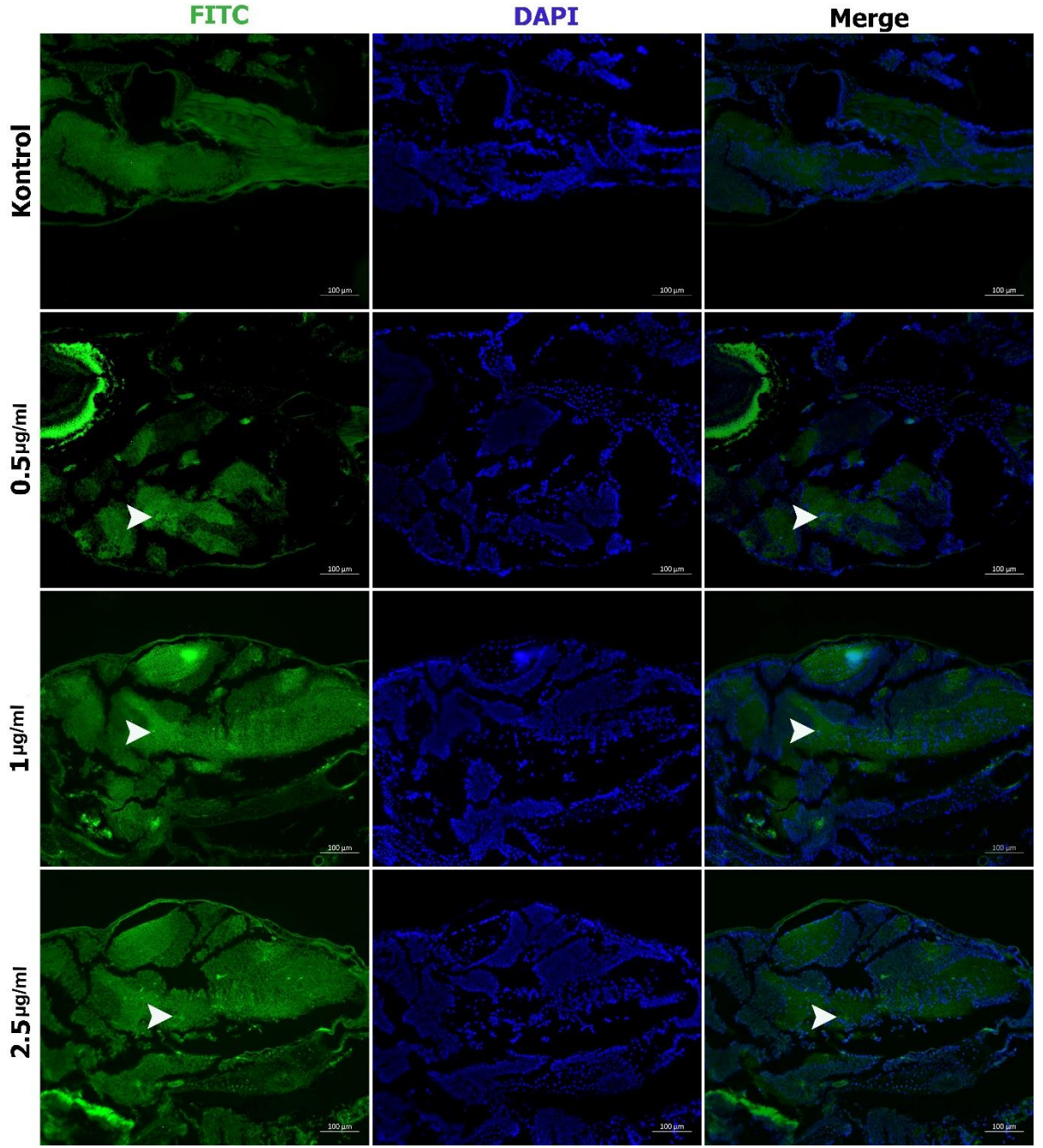
**Şekil 16.** Kontrol grubu ve 0,5 µg/ml, 1 µg/ml ve 2,5 µg/ml okadaik asite maruz kalan zebra balığı embriyolarının beyin dokusundaki kaspaz 3 immunfloresan sonuçları. Ok başları kaspaz 3 pozitif sinir hücrelerini temsil etmektedir. Ölçek çubukları: 100 µm.

Şekil 17’de gözlemlendiği üzere, kontrol grubu zebra balığı embriyolarının beyin kesitlerinde hafif düzeyde 8-OHdG ekspresyonu gözlemlendi. 0,5 µg/ml okadaik asit uygulaması zebra balığı embriyolarının beyin kesitlerinde 8-OHdG ekspresyonunu kontrol grubuna göre artırmıştır ( $p < 0,05$ ). 1 µg/ml ve 2,5 µg/ml okadaik asit uygulanan zebra balığı embriyolarının beyin kesitlerinde ise 0,5 µg/ml okadaik asit uygulanan gruba göre daha yoğun bir 8-OHdG ekspresyon artışı belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ). Buna karşılık, 1 µg/ml ile 2,5 µg/ml okadaik asit uygulanan gruplar arasında önemli bir fark olmadığı belirlenmiştir ( $p > 0,05$ ).



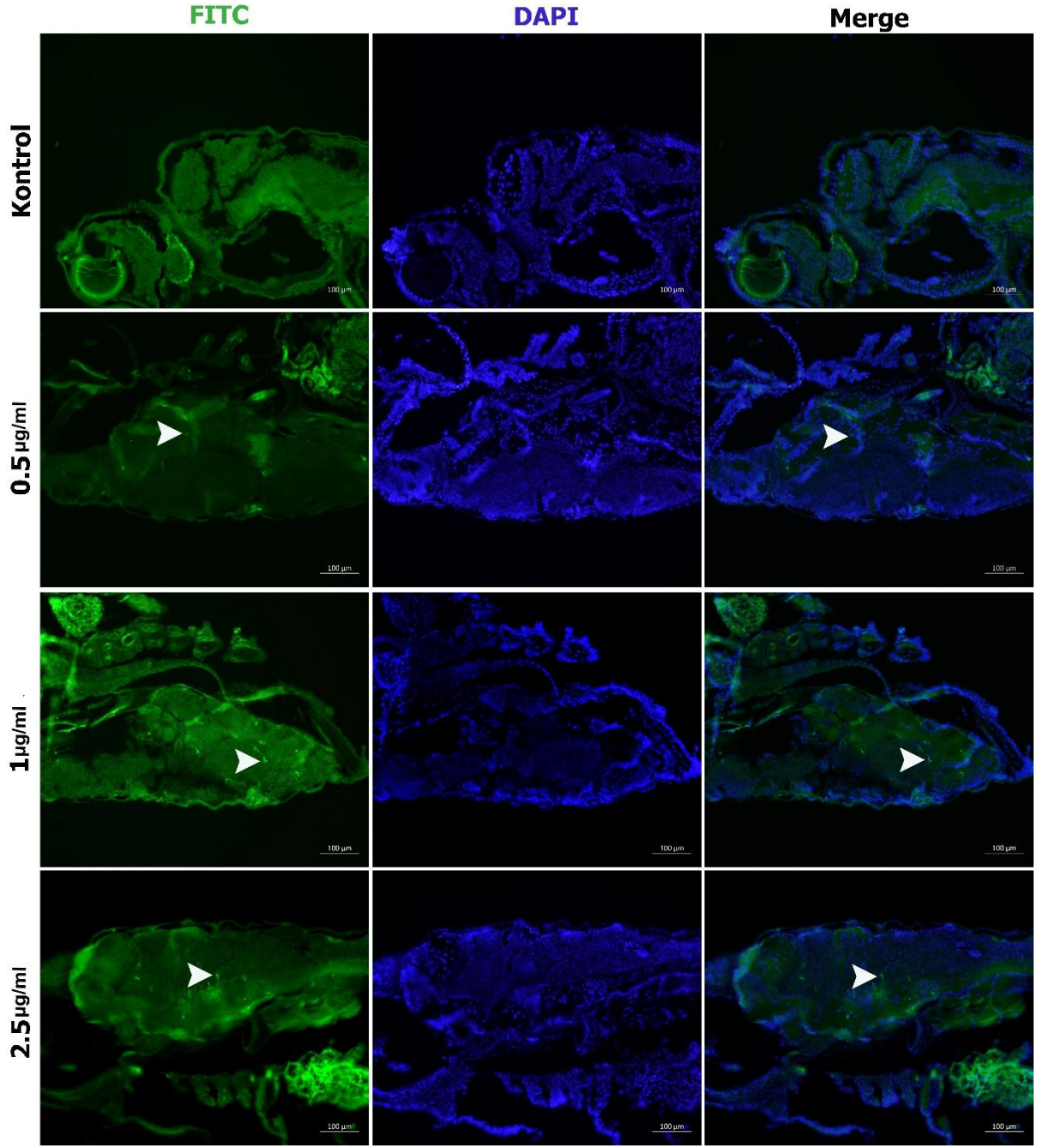
**Şekil 17.** Kontrol grubu ve 0,5 µg/ml, 1 µg/ml ve 2,5 µg/ml okadaik asite maruz kalan zebra balığı embriyolarının beyin dokusundaki 8-OHdG immunfloresan sonuçları. Ok başları 8-OHdG pozitif sinir hücrelerini temsil etmektedir. Ölçek çubukları: 100 µm.

0.5 µg/ml okadaik asit uygulanan zebra balığı embriyolarının beyin kesitlerinde c-Fos ekspresyonu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ekspresyonun hafif bir düzeyde arttığı belirlenmiştir (Şekil 18,  $p < 0,05$ ) Benzer şekilde, 1 µg/ml ve 2,5 µg/ml okadaik asit uygulanan zebra balığı embriyolarının beyin kesitlerinde de kontrol ve 0,5 µg/ml okadaik asit uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında c-fos ekspresyonunun belirgin şekilde arttığı gözlenmiştir (Şekil 18,  $p < 0,05$ ).



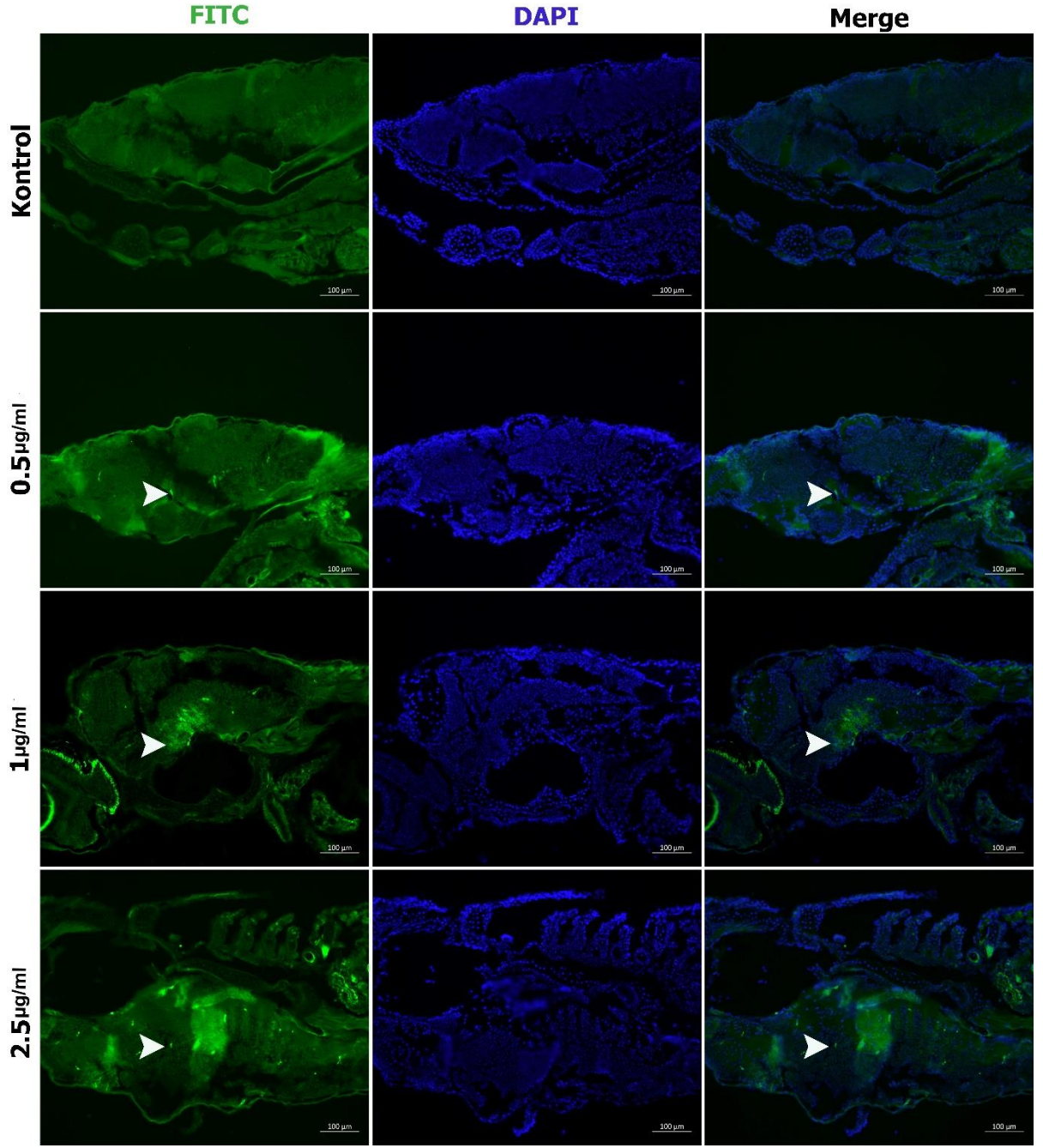
**Şekil 18.** Kontrol grubu ve 0,5 µg/ml, 1 µg/ml ve 2,5 µg/ml okadaik asite maruz kalan zebra balığı embriyolarının beyin dokusundaki c-fos immunfloresan sonuçları. Ok başları c-fos pozitif sinir hücrelerini temsil etmektedir. Ölçek çubukları: 100 µm.

Okadaik asit uygulamasının zebra balığı embriyolarının beyin kesitlerinde NF-kB ekspresyonu üzerine etkisi değerlendirildiğinde, 0,5 µg/ml okadaik asit uygulamasının Şekil 19'da gösterildiği gibi, kontrol grubuna kıyasla NF-kB ekspresyonunu hafif düzeyde artırdığı gözlenmiştir ( $p < 0,05$ ). 1 µg/ml ve 2,5 µg/ml okadaik asite maruz kalan zebra balığı embriyolarının beyin kesitlerinde NF-kB ekspresyonunun kontrol ve 0,5 µg/ml okadaik asit uygulanan gruplara göre yoğun olarak arttığı tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ).



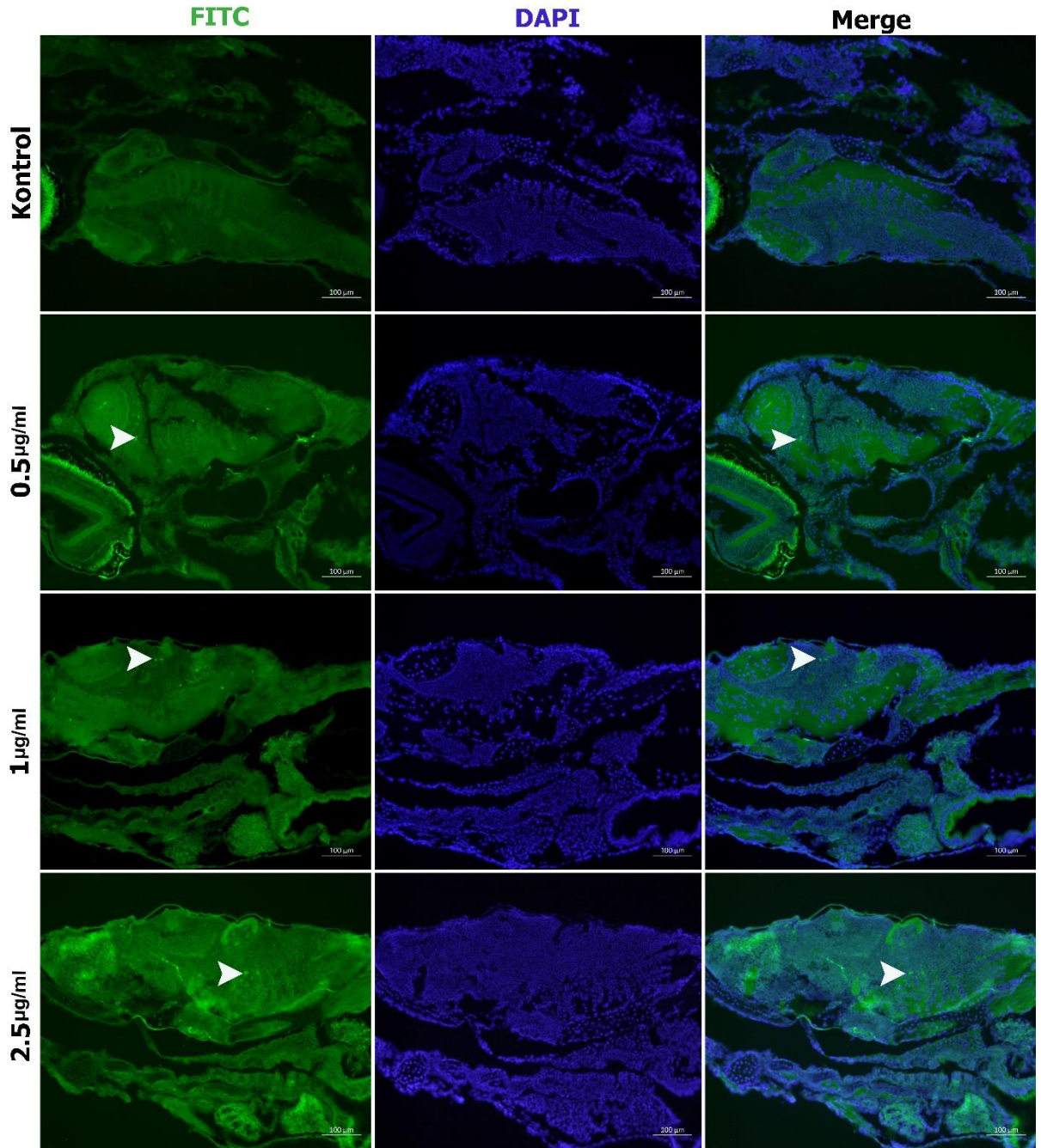
**Şekil 19.** Kontrol grubu ve 0,5 µg/ml, 1 µg/ml ve 2,5 µg/ml okadaik asite maruz kalan zebra balığı embriyolarının beyin dokusundaki NF-kB immunfloresan sonuçları. Ok başları NF-kB pozitif sinir hücrelerini temsil etmektedir. Ölçek çubukları: 100 µm.

Şekil 20’de görüldüğü gibi, kontrol grubu zebra balığı embriyolarının beyin kesitlerinde hafif şiddette TLR 4 ekspresyonu saptandı. Beyin doku örneklerine uygulanan 0,5 µg/ml okadaik asit’ in TLR 4 ekspresyonunu kontrol grubuna göre artırdığı ( $p<0,05$ ), yine 1 µg/ml ve 2,5 µg/ml okadaik asit uygulanan gruplarda 0,5 µg/ml okadaik asit uygulanan gruba göre TLR 4 ekspresyonun daha şiddetli olduğu belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). 1 µg/ml ve 2,5 µg/ml okadaik asit uygulanan beyin örneklerinde TLR 4 ekspresyonlarının doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ).



**Şekil 20.** Kontrol grubu ve 0,5 µg/ml, 1 µg/ml ve 2,5 µg/ml okadaik asite maruz kalan zebra balığı embriyolarının beyin dokusundaki TLR 4 immunfloresan sonuçları. Ok başları TLR 4 pozitif sinir hücrelerini temsil etmektedir. Ölçek çubukları: 100 µm.

Zebra balığı embriyolarının kontrol grubu beyin dokusunda hafif düzeyde ERK 1/2 ekspresyonları gözlenmiştir. 0,5 µg/ml okadaik asit uygulanan gruplarda ise kontrol grubuna kıyasla beyin dokularında ERK 1/2 ekspresyonunun anlamlı düzeyde arttığı saptanmıştır ( $p<0,05$ ). Yine 1 µg/ml ve 2,5 µg/ml okadaik asit uygulamalarının 0,5 µg/ml okadaik asit uygulamasına göre beyin dokularında daha şiddetli düzeyde ERK 1/2 ekspresyonu oluşturduğu gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). Ayrıca, 1 µg/ml ve 2,5 µg/ml okadaik asit uygulamalarında doza bağlı olarak ERK 1/2 ekspresyonunu anlamlı düzeyde arttığı tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ).



**Şekil 21.** Kontrol grubu ve 0,5 µg/ml, 1 µg/ml ve 2,5 µg/ml okadaik asite maruz kalan zebra balığı embriyolarının beyin dokusundaki ERK1/2 immunfloresan sonuçları. Ok başları ERK1/2 pozitif sinir hücrelerini temsil etmektedir. Ölçek çubukları: 100 µm.

**Tablo 3.** 8-OHdG, Kazpaz 3, c-FOS, NF-kB, TLR4 ve ERK ½ Ekspresyonlarının Gruplar Arası Karşılaştırılması

| Gruplar/<br>Antikorlar | 8-OHdG                 | Kazpaz 3               | c-FOS                  | NF-kB                  | TLR4                   | ERK 1/2                |
|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Kontrol                | 1.00±0.14 <sup>a</sup> | 0.30±0.15 <sup>a</sup> | 0.10±0.10 <sup>a</sup> | 0.20±0.13 <sup>a</sup> | 0.00±0.00 <sup>a</sup> | 0.10±0.10 <sup>a</sup> |
| 0.5 µg/ml              | 1.80±0.24 <sup>b</sup> | 1.10±0.10 <sup>b</sup> | 1.10±0.10 <sup>b</sup> | 0.90±0.17 <sup>b</sup> | 0.80±0.20 <sup>b</sup> | 1.10±0.10 <sup>b</sup> |
| 1 µg/ml                | 2.70±0.21 <sup>c</sup> | 2.70±0.21 <sup>c</sup> | 2.00±0.14 <sup>c</sup> | 2.70±0.21 <sup>c</sup> | 2.00±0.29 <sup>c</sup> | 2.00±0.14 <sup>c</sup> |
| 2.5 µg/ml              | 2.80±0.13 <sup>c</sup> | 2.80±0.13 <sup>c</sup> | 2.70±0.21 <sup>d</sup> | 2.70±0.15 <sup>c</sup> | 2.90±0.10 <sup>d</sup> | 2.70±0.21 <sup>d</sup> |

Farklı harfler (a, b, c, d) gruplar arası farklılıkları gösterir.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Bazı fitoplankton türleri tarafından oluşturulan alg patlamaları, su ürünleri yetiştiriciliği ve balıkçılık endüstrileri üzerinde halk sağlığı için risk oluşturabilecek etkilerle, suda yaşayan organizmaları ve su kalitesini etkileyebilecek toksinler üretebilmekte veya çevresel koşulları değiştirebilmektedir (Zerrifi *et al.* 2018). Pek çok zararlı alg patlaması (HAB) türü dahil olmak üzere birçok fitoplankton türü, bentik dinlenme aşamalarının oluşumu yoluyla çiçeklenmeler arasında uzun süreler boyunca hayatta kalmaktadır (Brosnahan *et al.* 2020).

Çiçeklenme dönemsel ve değişkendir, çok çeşitli türlerde belgelenen deniz yaşamının ilişkili ölümleri ve deniz balıkçılığı üzerindeki olumsuz etkileri bulunmaktadır. Okadaik asitler bu çiçeklenmeler sonucunda potansiyel olarak ortaya çıkan tehditlerdir ( Danil *et al.* 2021). Deniz poliyeter okadaik asit, başta *Dynophysis* ve *Prorocentrum* cinsi olmak üzere çeşitli dinoflagellat türleri tarafından üretilen ve insan sağlığı, ekonomi ve bilim üzerinde çarpıcı bir etkiye sahip olan bir fitotoksindir. Bunun başlıca nedeni, okadaik asitin yumuşakçalar ve çeşitli balıklar tarafından tüketilmesi ve bu canlıların insanlar tarafından tüketilerek diareyik kabuklu zehirlenmesine neden olmasıdır (Costas *et al.* 2022).

Araştırmalara göre, ksenobiyotiklere maruz kalan su hayvanlarının, prooksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik olarak tanımlanan ve enzimatik antioksidanlarda çok çeşitli değişikliklere, biyolojik bozukluklara ve farklı dokularda lezyonlara neden olduğu gözlemlenmektedir (Souid *et al.* 2018). Doğal yollarla oluşan zehirli madde ve kimyasallar balıklar ve diğer sucul organizmalar üzerinde toksik etki yaratarak olumsuz etkilere sebep olurlar. Kimyasallar, suyun çözme ve taşıma özelliğinden dolayı hızlı bir şekilde besin zincirine girerek besin zincirinin en üst kısmında yer alan ve kimyasallara maruz kalan organizmaları tüketen insanların sağlığını olumsuz etkilemektedirler (Ayas vd 2009). Toksik maddelerin olumsuz etkilerinin hedef alınmayan canlılarda belirlenmesi, bu ürünlerin kullanım koşulları ve dozları hakkında önemli bilgiler vermektedir. Ayrıca bu tür çalışmaların model organizmalar üzerinde yapılmasıyla, söz konusu maruziyetin insanlarda olması durumunda gözlenebilecek etkilerin tahmin edilebilmesi noktasında daha tatmin edici veriler elde edilebilmektedir.

Canlıların vücuda aldığı kimyasallar çeşitli toksikolojik etkiler meydana getirebilmektedirler. Kimyasalın özelliği ve dozu toksisitenin belirlenmesinde önem teşkil etmektedir. Dozdaki artan miktara bağlı olarak toksisitede de artışlar gözlemlenebilmektedir. Düşük dozlu kimyasala belirli bir süre boyunca maruz kalan canlılardaki etkisi olumsuz olarak

seyredilmektedir. Toksik maddelerin sebep olduğu etkilerin, model organizmalar ile incelenmesi, meydana gelen olumsuz neticelerin insanlar üzerindeki etkisinin tahmin edilmesi hususunda avantajlar sağlamaktadır. Okadaik asit, toksikolojik olarak hızlı ve sürekli bir şekilde ilerleme sağlamaktadır. Bu sebeple, okadaik asitin uygulamasından sonra zebra balığı beyindeki apoptotik hücrelerin sayısında artış meydana gelmektedir. Okadaik asitin sebebiyet verdiği beyin hasarının gözlemlenmesi için, zebra balığı oldukça uygun bir model organizmadır (Koehler and Williams 2018). Okadaik asitin en iyi karakterize edilen toksik etkilerden biri, hücre yapısının bozulmasıdır (Tchivelekete *et al.*, 2022). Yapılan literatür taramasında okadaik asitin zebra balıkları üzerindeki toksik etkilerini gösteren pek çok çalışma vardır (Zhang *et al.*, 2014; Nada and Shah, 2016; Thawkar *et al.*, 2021; Figueroa *et al.*, 2020). Okadaik asit nöronal hücreler, lösemik hücreler ve bağırsak hücreleri gibi birçok hücre tipinde apoptozu veya büyüme inhibisyonunu indüklemektedir. Bu toksinin neden olduğu hücresel tepkilerde yer alan moleküler mekanizmalar ve bileşenler hakkında çok az şey bilinmektedir (Valdiglesias *et al.* 2010). Çok sayıda çalışma, okadaik asitin zebra balıklarında, farklı hücre dizileri için sitotoksik, karsinojenik, embriyotoksik, nörotoksik, mutajenik ve genotoksik etkileri olduğunu göstermektedir. (Zhang *et al.* 2014). Okadaik asitin, zebra balığı beyini üzerinde etkisini gösteren sınırlı sayıda çalışma olmakla birlikte, etkisi tam olarak bilinmemektedir. Zebra balığında okadaik asit kaynaklı nörotoksistide NF-Kb, TLR4, ERK1/2, 8OHdG, Kaspaz 3 ve c-Fos sinyal yollarının üzerinde yapılan çalışmalar sınırlıdır.

Bu çalışmada, okadaik asitin fosfataz inhibisyonu dışındaki potansiyel mekanizmaları hakkında ipuçları sağlamak için okadaik asitin neden olduğu malformasyon ve immunfloresan değişiklikler zebra balığında değerlendirildi. Ek olarak, okadaik asit toksinin deniz ortamı üzerindeki etkilerini gösteren çok az sayıda çalışma bulunması ve deniz organizmaları üzerindeki moleküler etkilerinin tam olarak anlaşılamadığı göz önüne alındığında; yapılan araştırmanın ehemmiyeti artmaktadır.

Yürütmüş olduğumuz bu çalışmada kuyruk şekil bozukluğu, omur şekil bozukluğu, vücudun herhangi bölgesinde meydana gelen ödem bulguları aranarak kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre artan okadaik asit konsantrasyonuna paralel olarak gözlenen morfolojik bulguların sayısı da artmıştır. Yapılan inceleme sonucunda 0.25 ve 1 µg/ml okadaik asit uygulanan grupta besin kesesi ödemi (YSE), perikardiyal ödem (PE) ve vücut malformasyonları kuyruk malformasyonu, kafa malformasyonu (BM) ve kısa kuyruk tespit edilmiştir. 2,5 µg/ml okadaik asit uygulanan grupta ise besin kesesi ödemi (YSE), perikardiyal ödem (PE), vücut malformasyonları kuyruk malformasyonu, kısa kuyruk ve kafa malformasyonu dahil (BM) ve kavisli vücut ekseni (CBA) tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular

literatürlerde yapılan benzer çalışmalarla örtüşmektedir. Okadaik asit maruziyeti mortaliteyi artırmakta, yumurtadan çıkış oranını, kalp atış hızını düşürmekte ve morfolojik anormalliklere neden olduğu gözlemlenmektedir. Okadaik asite maruz kalmanın ayrıca, antioksidan genlerin ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı ve iltihaplanmayı önemli ölçüde artırdığı ve ayrıca zebra balığı embriyolarında fotoreseptör kaybına neden olduğu tespit edilmiştir (Tchivelekete *et al.* 2022).

Okadaik asitin nörotoksisiteye, nörodejenerasyona ve oksidatif strese neden olduğu bilinmektedir (Kamat *et al.*, 2013). Okadaik asitin inflamasyonu artırdığı rapor edilmiştir (Tchivelekete *et al.*, 2022). NF-Kb, birçok hücrenin hayatta kalması ve ölümü arasındaki dengeyi belirleyen bir dizi genetik yanıtı transkripsiyonel olarak düzenlemektedir (Bilici ve Uğuz 2022). Okadaik asit farklı hücre tiplerinde nükleer faktör kappa B'yi (NF-Kb) aktive edebilmektedir. Bu aktivasyon sonrasında, proinflamatuvar sitokinler yüksek seviyelere ulaşmaktadır ve bu sebeple NF-Kb inflamasyonda önemli bir rol oynamaktadır (Wuerger *et al.* 2023). Kronik inflamasyonda önemli rolleri olan NF-Kb nöronal gelişim, beyin yaralanması ve nörodejeneratif hastalıklarda aktive olan bir transkripsiyon faktörüdür (You *et al.*, 2013; Espín-Palazón and Traver, 2016; Gupta *et al.*, 2010; Shih *et al.*, 2015). NF-Kb aktivasyonu oksidatif stres ve toksisite gibi durumlara karşı nöronları korumaktadır (Mattson, 2005; Sarnico *et al.*, 2009). Literatür taramalarını incelediğimizde okadaik asitin zebra balığı beyinde NF-Kb aktivasyonunu gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda okadaik asitin dozlara bağlı olarak zebra balığı embriyolarının beyin dokularında NF-Kb immunfloresan pozitifliğine sebep olduğu tespit edilmiştir. Benzer bulgular Tchivelekete (2013) arkadaşları tarafından okadaik asitin zebra balığı ve insan retina hücreleri üzerine etkisini gösteren çalışmada rapor edilmiştir. Dolayısıyla bulgularımız okadaik asitin NF-Kb aktivasyonunda artışa sebep olarak beyin dokularında inflamasyona sebep olabileceğini desteklemektedir. Bu durum okadaik asitin neden olduğu nörotoksitede NF-Kb yolağının önemli bir yer tuttuğunu göstermektedir. İnsan hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada okadaik asit NF-Kb yi aktive ederek apoptosize sebep olduğu bildirilmiştir (Ozaki *et al.*, 2006). Pek çok hücrede apoptosis potansiyeline sahip olan okadaik asit farklı yollar üzerinden apoptosize sebep olur (Ferron *et al.* 2014). Literatürde yer alan verilere göre, okadaik asitin, NF-Kb dışında kaspaz 3 yolunu içerdiği görülmektedir (Chen 2011).

Literatürde yer alan bu çalışmada, kaspaz 3 gibi apoptozu incelemek için özel metodolojilerin kullanılmasıyla, okadaik asitin apoptozu indüklediği doğrulanmaktadır. Apoptoz oranındaki artışlar, kaspaz 3'teki artışların eşlik ettiği S9 fraksiyonu yokluğunda tedavi edilen tüm hücrelerde elde edilmektedir. Bu artışların, okadaik asit

tarafından indüklenen apoptozun kaspaz 3'e bağı bir süreç olduğunu düşündürmektedir (Valdiglesias *et al.* 2011). Yapılan bir başka çalışmada sıçan beyinde, okadaik asitin kaspaz 3 ekspresyonunda artışa sebep olarak apoptotik hücre ölümüne sebep olduğu bulunmuştur (Kamat *et al.*, 2011). Yaptığımız çalışmada, okadaik asitin dozlara bağı olarak zebra balığı embriyolarının beyin dokularında kaspaz 3 immunfloresan pozitifliğine sebep olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlarımız, okadaik asitin NF-kB ve kaspaz 3 aktivasyonlarında artışa sebep olması literatürde yapılan çalışmaları desteklemektedir (Ozaki *et al.*, 2006). Dolayısıyla, sonuçlarımız okadaik asitin NF-kB yolağı üzerinden kaspaz 3 aktivasyonunu artırarak apoptosize sebep olabileceğini ve bu durumun okadaik asitin neden olduğu nörotoksisitede apoptotik yolun dahil olduğunu göstermektedir.

TLR4, NF-kB yi aktive ederek inflamasyon cevaplarını başlatan önemli bir moleküldür (Huang *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2021). Yaptığımız literatür taramaları neticesinde okadaik asitin zebra balığı beyinde TLR4 aktivasyonunu gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda, okadaik asitin zebra balığı embriyo beyinlerinde doza bağı olarak TLR4 ün immunfloresan pozitifliğinde artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Okadaik asitin inflamasyonu artırdığı bilinmektedir (Tchivelekete *et al.* 2022). Dolayısıyla, sonuçlarımız okadaik asitin TLR4 ve NF-kB yolları üzerinden inflamasyona sebep olabileceğini göstermektedir. Diğer taraftan,TLR4 ün ökaryotik hücrelerde apoptosizi aktive edebileceği rapor edilmiştir (Aliprantis *et al.*, 2000). TLR4 sinyal yolu, inflamasyon faktörlerin transkripsiyonunu aktive ederek apoptosizi başlatmak için apoptozla ilişkili proteinlerin ekspresyonunu düzenlemektedir (Wang *et al.*, 2016). TLR4'ün nöronal apoptoza dahil olması ile ilgili iki açıklama rapor edilmiştir. Birincisi, TLR4, Akt/FoxO3a/Bim sinyal yolu aracılığıyla nöronal apoptozda yer alabilir (Xu *et al.*, 2014). İkincisi, TLR4, kaspaz-3'ün nöronal apoptoza ve sinir hasarına dahil olmasına aracılık edebilir (Ryan *et al.*, 2004). Başka bir çalışmada TLR4 ün hem ekstrinsik hem de intrinsik apoptotik sinyal yollarını başlattığı bildirilmiştir (Liu *et al.*, 2017). Hanafy (2013) TLR4 ün TRIF'e bağı sinyal yolu üzerinden nöronal apoptosize sebep olduğunu rapor etmiştir. Dolayısıyla, okadaik asitin NF-Kb ve kaspaz 3 aktivasyonu üzerinden apoptosize neden olduğu düşünüldüğünde TLR4 ünde apoptosize yol açan sinyal yollarına katıldığı görülmektedir.

Nöronal beyin aktivitesini tespit etmek için bir marker olarak kullanılan c-Fos pek çok stres faktörüne bağı olarak artan bir transkripsiyon faktörüdür (Topal *et al.*, 2021). Nörotoksin ve kirletici gibi pek çok kimyasalın c-Fos aktivasyonunda artışına sebep olduğu tespit edilmiştir (Salierno *et al.* 2006; Varani *et al.* 2014). c-Fos ayrıca inflamasyon cevaplarını düzenler ve apoptosiz, gen transkripsiyonu gibi süreçlerle ilgili mekanik stres altında ekprese olabilir (Zhou *et al.* 2022). Çalışmamızda, okadaik asitin zebra balığı embriyo beyinlerinde doza bağı olarak

c-Fos un immunfloresan pozitifliğinde artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla, okadaik asit c-Fos yolağı üzerinden inflamasyon ve apoptosize sebep olabilir.

Beyinde hücre farklılaşması ve hücre büyümesi gibi önemli rolleri olan diğer bir molekül ERK  $\frac{1}{2}$  dir. (Lu *et al.* 2013). ERK  $\frac{1}{2}$  yolağı inflamasyondaki değişikliklerin düzenlenmesinde gerekli bir yoldur (Sun and Nan, 2017). Çalışmamızda, okadaik asitin zebra balığı embriyo beyinlerinde doza bağlı olarak ERK  $\frac{1}{2}$  nin immunfloresan pozitifliğinde artışa neden olduğu tespit edilmiştir. ERK1/2 mikrogliya aktivasyonunu teşvik ederek inflamasyona ve apoptoza yol açar ve in vivo inflamatuvar yanıtları artırır (Lv *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2019). Ayrıca, ERK  $\frac{1}{2}$  inflamasyon cevaplarında NF-kB nin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir (Vuong *et al.*, 2015). Okadaik asit, ERK1/2 sinyal yolu, oksidatif stres ve enflamasyon üzerinde de önemli etkiler göstermektedir (Hong *et al.* 2019). Ayrıca farklı hücrelerarası uyaranların, yüzey reseptörleri sayesinde ERK1/2 yolunun aktivasyonunun, c-Fos fosforilasyonu ve transkripsiyonel aktivasyonunda artışlara neden olduğu görülmüştür (Gilley *et al.* 2009). ERK  $\frac{1}{2}$  c-Fos sinyal yollarının patolojik ve fizyolojik süreçler boyunca gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli rolleri bulunduğu görülmektedir (Lu *et al.* 2013). Sonuçlarımız, okadaik asitin c-Fos ve ERK  $\frac{1}{2}$  aktivasyonlarında artışa sebep olması literatürde yapılan çalışmaları desteklemekle birlikte, okadaik asitin c-Fos ve ERK  $\frac{1}{2}$  yolağı üzerinden nörotoksisiteye sebep olabileceğini göstermektedir.

Okadaik asitin suda yaşayan hayvanlarda DNA hasarına neden olduğu ve oksidatif strese yol açtığı bildirilmiştir (Chi *et al.*, 2016; Souid *et al.*, 2018). Okadaik asitin neden olduğu oksidatif stres DNA hasarına yol açmaktadır (Traore *et al.* 2000). Çalışmamızda, okadaik asitin zebra balığı embriyo beyinlerinde doza bağlı olarak 8-OHdG'nin immunfloresan pozitifliğinde artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Okadaik asitin neden olduğu 8 OHdG artışının oksidatif hasara bir yanıt olduğu açıktır. Okadaik asit memeli hücrelerinde 8-OHdG artışına neden olduğu bildirilmiştir (Fessard *et al.* 1996). 8-OHdG hücrelerde apoptoza neden olabilmekte ve kimyasallara maruz kalan hücrelerde apoptoz ile DNA hasarı dokulardan uzaklaştırılmaktadır. Bu nedenle OA, 8-OHdG'de artışa neden olarak DNA hasarına ve apoptozise neden olur (Topal *et al.* 2017).

Sonuç olarak bu çalışma ile zebra balığı beyindeki okadaik asitin etki mekanizmasına aracılık eden sinyal iletim yollarını anlayarak, okadaik asit toksisitesinin patofizyolojisinin altında yatan moleküler mekanizmaları araştırılmıştır. Yapılan çalışma neticesinde; okadaik asit doza bağımlı olarak NfKB, TLR-4, kaspaz 3, ERK  $\frac{1}{2}$ , c-Fos ve 8-OHdG nin immunpozitifliğine sebep olduğu tespit edilmiştir. Okadaik asit, TLR4, NF-Kb, kaspaz 3, ERK  $\frac{1}{2}$  ve c-Fos sinyal yolaklarını aktive ederek inflamasyon ve apoptoza neden olarak nöronal hasara yol açar ve

ayrıca 8-OHdG artışına yol açarak DNA hasarına neden olur. Bu sinyal yollarındaki artış, okadaik asitin beyin sinir hücrelerinin yapısında ve işlevinde hasara neden olabileceğini göstermektedir. Sonuçlarımız, okadaik asitin nöral hasarının kapsamlı değerlendirmesi için yeni bir temel sağlar ve okadaik asit toksisitesinin patofizyolojisinin altında yatan moleküler mekanizmaları daha iyi anlamamızı sağlar. Yaptığımız çalışma ile okadaik asit biyotoksininin bulaştığı kabuklu deniz ürünlerinin tüketimi sonucunda, insan vücudunda çeşitli değişikliklerin meydana gelebileceği öngörülmüştür.



## KAYNAKLAR

- Abdelrahman, H., ElHady, M., Alcivar-Warren, A., Allen, S., Al-Tobasei, R., Bao, L., ... & Zhou, T. (2017). Aquaculture genomics, genetics and breeding in the United States: current status, challenges, and priorities for future research. *BMC genomics*, 18(1), 1-23.
- Ahmad, F., Noldus, L. P., Tegelenbosch, R. A., & Richardson, M. K. (2012). Zebrafish embryos and larvae in behavioural assays. *Behaviour*, 149(10), 1241.
- Alarcan, J., Biré, R., Le Hégarat, L., & Fessard, V. (2018). Mixtures of lipophilic phycotoxins: exposure data and toxicological assessment. *Marine drugs*, 16(2), 46.
- Alcántara-Hernández, R., Vázquez-Prado, J., & García-Sáinz, J. A. (2000). Protein phosphatase-protein kinase interplay modulates  $\alpha 1$ B-adrenoceptor phosphorylation: effects of okadaic acid. *British journal of pharmacology*, 129(4), 724.
- Alexander, J., Benford, D., Boobis, A., Ceccatelli, S., Cravedi, J. P., Di, A., ... & Verger, P. (2009). Marine biotoxins in shellfish—Summary on regulated marine biotoxins Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA J*, 1306, 1-23.
- Ali, S., Champagne, D. L., Spaink, H. P., & Richardson, M. K. (2011). Zebrafish embryos and larvae: a new generation of disease models and drug screens. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 93(2), 115-133.
- Aliprantis, A. O., R. B. Yang, D. S. Weiss, P. Godowski, and A. Zychlinsky. 2000. The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *EMBO J*. 19:3325-3336.
- Araya, L. E., Soni, I. V., Hardy, J. A., & Julien, O. (2021). Deorphanizing caspase-3 and caspase-9 substrates in and out of apoptosis with deep substrate profiling. *ACS Chemical Biology*, 16(11), 2280-2296.
- Astell, K. R., & Sieger, D. (2020). Zebrafish in vivo models of cancer and metastasis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 10(8), a037077.
- Ayas, D., Kalay, M., Sangün, MK., 2009. Mersin Körfezi'nden Örneklenen Yüzey Suyu ve Patella Türlerindeki (Patella caerulea, Patella rustica) Cr, Cd ve Pb Düzeylerinin Belirlenmesi. *Ekoloji*, 18, 70: 32-37.
- Aydın, H. and Uzar, S., 2009. Denizel Mikroalg Biyotoksinleri ve Etkileri. *C.B.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 5.1 (2009) 87 – 100.
- Bailey, J., Oliveri, A., & Levin, E. D. (2013). Zebrafish model systems for developmental neurobehavioral toxicology. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 99(1), 14-23.
- Bambino, K., & Chu, J. (2017). Zebrafish in toxicology and environmental health. *Current topics in developmental biology*, 124, 331-367.
- Becker, J. W., Rotonda, J., Soisson, S. M., Aspiotis, R., Bayly, C., Francoeur, S., ... & Zamboni, R. (2004). Reducing the peptidyl features of caspase-3 inhibitors: a structural analysis. *Journal of medicinal chemistry*, 47(10), 2466-2474.
- Berry, J. P., Roy, U., Jaja-Chimedza, A., Sanchez, K., Matysik, J., & Alia, A. (2016). High-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance of intact zebrafish embryos detects metabolic changes following exposure to teratogenic polymethoxyalkenes from algae. *Zebrafish*, 13(5), 456-465.

- Bi, W., Zhu, L., Jing, X., Zeng, Z., Liang, Y., Xu, A., ... & Tao, E. (2014). Rifampicin improves neuronal apoptosis in LPS-stimulated co-cultured BV2 cells through inhibition of the TLR-4 pathway. *Molecular medicine reports*, 10(4), 1793-1799.
- Bilici, E., & Uğuz, C., Nf-Kappa B Sinyal Yolu ve Kanserde Potansiyel Terapotik Yaklaşımlar. *Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(4), 527-531.
- Botelho, M. J., Milinovic, J., Bandarra, N. M., & Vale, C. (2022). Alzheimer's Disease and Toxins Produced by Marine Dinoflagellates: An Issue to Explore. *Marine Drugs*, 20(4), 253.
- Botelho, M. J., Vale, C., Joaquim, S., Costa, S. T., Soares, F., Roque, C., & Matias, D. (2018). Combined effect of temperature and nutritional regime on the elimination of the lipophilic toxin okadaic acid in the naturally contaminated wedge shell *Donax trunculus*. *Chemosphere*, 190, 166-173.
- Brosnahan, M. L., Fischer, A. D., Lopez, C. B., Moore, S. K., & Anderson, D. M. (2020). Cyst-forming dinoflagellates in a warming climate. *Harmful Algae*, 91, 101728.
- Busse, B., Galloway, J. L., Gray, R. S., Harris, M. P., & Kwon, R. Y. (2020). Zebrafish: an emerging model for orthopedic research. *Journal of Orthopaedic Research®*, 38(5).
- Chang, N. C., Lin, A. C. M., Hsu, C. C., Liu, J. S., Tsui, L., Chen, C. Y., ... & Fong, T. H. (2013). Okadaic acid, a bioactive fatty acid from *Halichondria okadai*, stimulates lipolysis in rat adipocytes: The pivotal role of perilipin translocation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Chen, L. (2011). Okadaic acid induces apoptosis through the PKR, NF-κB and caspase pathway in human osteoblastic osteosarcoma MG63 cells. *Toxicology in Vitro*, 25(8), 1796-1802.
- Chi, C., Giri, S.S., Jun, J.W., Kim, H.J., Yun, S., Kim, S.G., Park, S.C., 2016. Marine Toxin Okadaic Acid Affects the Immune Function of Bay Scallop (*Argopecten irradians*). *Molecules* 24, 21(9), 1108. <https://doi.org/10.3390/molecules21091108>.
- Choi, Y., Jeon, H., Akin, J. W., Curry Jr, T. E., & Jo, M. (2021). The FOS/AP-1 regulates metabolic changes and cholesterol synthesis in human periovulatory granulosa cells. *Endocrinology*, 162(9), bqab127.
- Cholewińska, P., Moniuszko, H., Wojnarowski, K., Pokorny, P., Szeligowska, N., Dobicki, W., ... & Górniak, W. (2022). The occurrence of microplastics and the formation of biofilms by pathogenic and opportunistic bacteria as threats in aquaculture. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(13), 8137.
- Costas Sánchez, C., Louzao Ojeda, M. C., Raposo García, S., Vale González, M. D. C., Rodríguez Vieytes, M. M., & Botana López, L. M. (2022). Intestinal secretory
- Creppy, E. and Traore, A. and Baudrimont, I. and Cascante, M. and Carratu', M. Recent advances in the study of epigenetic effects induced by the phycotoxin okadaic acid. *Toxicology*, 181/182 (2002) 433/439.
- Cui, J., Meng, YH, Wang, ZW, Wang, J., Shi, DF ve Liu, D. (2023). Ganoderik Asitler A ve B, Tau Hiperfosforilasyonunu Engelleyerek PC12 Hücrelerinde Okadaik Asite Bağlı Nörotoksisiteyi Azaltır. *Biyomedikal ve çevre bilimleri: BES* , 36 (1), 103-108.
- Dabrowska, N., & Wiczowski, A. (2017). Analytics of oxidative stress markers in the *Medicine*, 26(1), 155-166.

- Danil, K., Berman, M., Frame, E., Preti, A., Fire, S. E., Leighfield, T., ... & Lefebvre, K. (2021). Marine algal toxins and their vectors in southern California cetaceans. *Harmful Algae*, 103, 102000.
- Davidson, K., Anderson, D. M., Mateus, M., Reguera, B., Silke, J., Sourisseau, M., & Maguire, J. (2016). Forecasting the risk of harmful algal blooms. *Harmful Algae*, 53, 1-7.
- Ehlers, A., Stempin, S., Al-Hamwi, R., & Lampen, A. (2010). Embryotoxic effects of 863.
- Eskandari, E., & Eaves, C. J. (2022). Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis. *Journal of Cell Biology*, 221(6), e202201159.
- Espín-Palazón R, Traver D. The NF- $\kappa$ B family: Key players during embryonic development and HSC emergence. *Exp Hematol*. 2016 Jul;44(7):519-27. doi: 10.1016/j.exphem.2016.03.010.
- Farabegoli, F., Blanco, L., Rodríguez, L. P., Vieites, J. M., & Cabado, A. G. (2018). Phycotoxins in marine shellfish: Origin, occurrence and effects on humans. *Marine drugs*, 16(6), 188.
- Ferron, P. J., Hogeveen, K., Fessard, V., & Le Hégarat, L. (2014). Comparative analysis of the cytotoxic effects of okadaic acid-group toxins on human intestinal cell lines. *Marine drugs*, 12(8), 4616-4634.
- Fessard, V., Grosse, Y., Pfohl-Leszkowicz, A., Puiseux-Dao, S., 1996. Okadaic acid treatment induces DNA adduct formation in BHK21 C13 fibroblasts and HESV keratinocytes, *Mutat. Res.* 361, 133-141. [https://doi.org/10.1016/s0165-1161\(96\)90248-4](https://doi.org/10.1016/s0165-1161(96)90248-4).
- Figueroa, D., Signore, A., Araneda, O., Contreras, H. R., Concha, M., & García, C. (2020). Toxicity and differential oxidative stress effects on zebrafish larvae following exposure to toxins from the okadaic acid group. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 83(15-16), 573-588.
- Fire, S. E., & Van Dolah, F. M. (2012). Marine biotoxins: emergence of harmful algal blooms as health threats to marine wildlife In: Aguirre AA, Ostfeld R, Daszak P (eds) *New directions in conservation medicine: applied cases of ecological health*.
- Franchini, A., Malagoli, D., & Ottaviani, E. (2010). Targets and effects of yessotoxin, okadaic acid and palytoxin: A differential review. *Marine drugs*, 8(3), 658-677.
- Fujiki, H., Sueoka, E., Watanabe, T., & Suganuma, M. (2018). The concept of the okadaic acid class of tumor promoters is revived in endogenous protein inhibitors of protein phosphatase 2A, SET and CIP2A, in human cancers. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 144, 2339-2349.
- Gerssen, A., & Gago-Martínez, A. (2019). Emerging marine biotoxins. *Toxins*, 11(6), 314.
- Gerssen, A., Pol-Hofstad, I. E., Poelman, M., Mulder, P. P., Van den Top, H. J., & De Boer, J. (2010). Marine toxins: Chemistry, toxicity, occurrence and detection, with special reference to the Dutch situation. *Toxins*, 2(4), 878-904.
- Gilley, R., March, H. N., & Cook, S. J. (2009). ERK1/2, but not ERK5, is necessary and sufficient for phosphorylation and activation of c-Fos. *Cellular signalling*, 21(6), 969-977.
- Goya, A. B., Baqer, D., Alexander, R. P., Stubbs, P., Dean, K., Lewis, A. M., ... & Turner, A. D. (2022). Marine Biotoxins in Whole and Processed Scallops from the Argentine Sea. *Marine Drugs*, 20(10), 634.

- Gunes, A. E., Yılmaz, O., Erbas, C., Dagli, S. N., & Celik, H. (2021). High serum 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels predict DNA damage and aging in professional divers. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 67, 1701-1705.
- Gupta S. C., Sundaram C., Reuter S., Aggarwal B. B. (2010). Inhibiting NF-kappaB activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochim. Biophys. Acta* 1799 775–787. 10.1016/j.bbagr.2010.05.004
- Hanafy KA. The role of microglia and the TLR4 pathway in neuronal apoptosis and vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Neuroinflammation*. 2013 Jul 13;10:83. doi: 10.1186/1742-2094-10-83.
- Haneji, T., Hirashima, K., Teramachi, J., & Morimoto, H. (2013). Okadaic acid activates the PKR pathway and induces apoptosis through PKR stimulation in MG63 osteoblast-like cells. *International journal of oncology*, 42(6), 1904-1910.
- Hong, H. N., Yoon, S. Y., Suh, J., Lee, J. H., & Kim, D. (2002). Differential activation of caspase-3 at two maturational stages during okadaic acid-induced rat neuronal death. *Neuroscience letters*, 334(1), 63-67.
- Hong, Y., Nan, B., Wu, X., Yan, H., & Yuan, Y. (2019). Allicin alleviates acrylamide-induced oxidative stress in BRL-3A cells. *Life sciences*, 231, 116550.
- Horzmann, K. A., & Freeman, J. L. (2018). Making waves: New developments in toxicology with the zebrafish. *Toxicological Sciences*, 163(1), 5-12.  
<http://www.biosciences-labs.bham.ac.uk/exhibit/whatare.html>  
<http://www.farmwithscience.org/en/program-2014-2017/aquaculture/monitoring-of-the-shellfish-biotoxins>  
<https://doh.wa.gov/community-and-environment/shellfish/recreational-shellfish/illnesses/biotoxins>
- Huang L, Chen C, Zhang X, Li X, Chen Z, Yang C, et al. Neuroprotective effect of curcumin against cerebral ischemia-reperfusion via mediating autophagy and inflammation. *J Mol Neurosci*. 2018;64:129–39. doi: 10.1007/s12031-017-1006-x.
- Jamal, M. T., Broom, M., Al-Mur, B. A., Al Harbi, M., Ghandourah, M., Al Otaibi, A., & Haque, M. F. (2020). Biofloc technology: Emerging microbial biotechnology for the improvement of aquaculture productivity. *Polish journal of microbiology*, 69(4), 401-409.
- Kamat PK, Tota S, Shukla R, Ali S, Najmi AK, Nath C. Mitochondrial dysfunction: a crucial event in okadaic acid (ICV) induced memory impairment and apoptotic cell death in rat brain. *Pharmacol Biochem Behav*. 2011 Dec;100(2):311-9. doi: 10.1016/j.pbb.2011.08.019.
- Kamat, P. K., & Nath, C. (2015). Okadaic acid: a tool to study regulatory mechanisms for neurodegeneration and regeneration in Alzheimer's disease. *Neural regeneration research*, 10(3), 365.
- Kamat, P. K., Rai, S., & Nath, C. (2013). Okadaic acid induced neurotoxicity: an emerging tool to study Alzheimer's disease pathology. *Neurotoxicology*, 37, 163-172.
- Kayhan, F., Kaymak, G., Duruel, H. E. E., & Kızılkaya, Ş. T. (2018). Biyolojik araştırmalarda zebra balığının (*Danio rerio* Hamilton, 1822) kullanılması ve önemi. *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*, 7(2), 38-45.

- Khalil, H., Peltzer, N., Walicki, J., Yang, J. Y., Dubuis, G., Gardiol, N., ... & Widmann, C. (2012). Caspase-3 protects stressed organs against cell death. *Molecular and cellular biology*, 32(22), 4523-4533.
- Kim, J., Ji, S., Lee, J. Y., Lorquin, J., Orlikova-Boyer, B., Cerella, C., ... & Diederich, M. (2023). Marine Polyether Phycotoxin Palytoxin Induces Apoptotic Cell Death via Mcl-1 and Bcl-2 Downregulation. *Marine Drugs*, 21(4), 233.
- Koehler, D., & Williams, F. E. (2018). Utilizing zebrafish and okadaic acid to study Alzheimer's disease. *Neural regeneration research*, 13(9), 1538.
- Kong, T., Liu, M., Ji, B., Bai, B., Cheng, B., & Wang, C. (2019). Role of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathway in ischemia-reperfusion injury. *Frontiers in physiology*, 10, 1038.
- Lawrence, J., Loreal, H., Toyofuku, H., Hess, P., & Iddya, K. (2011). Assessment and management of biotoxin risks in bivalve molluscs.
- Le, H. Y., Zhang, Y., Liu, H., Ma, L. H., Jin, Y., Huang, Q. H., ... & Liu, T. X. (2008). eena Promotes myeloid proliferation through stimulating ERK1/2 phosphorylation in zebrafish. *Journal of Biological Chemistry*, 283(25), 17652-17661.
- Lee, TCH, Fong, FLY, Ho, KC ve Lee, FWF (2016). Prorocentrum spp.'de ishali kabuklu deniz hayvanlarını zehirleyen toksin üretiminin mekanizması: fizyolojik ve moleküler bakış açıları. *Toksinler*, 8 (10), 272.
- Li, L., Liu, J., Yan, X., Qin, K., Shi, M., Lin, T., ... & Zhao, G. (2011). Protective effects of ginsenoside Rd against okadaic acid-induced neurotoxicity in vivo and in vitro. *Journal of ethnopharmacology*, 138(1), 135-141.
- Liang, F., Kina, S., Takemoto, H., Matayoshi, A., Phonaphonh, T., Sunagawa, N., ... & Sunakawa, H. (2011). HPV16E6-dependent c-fos expression contributes to AP-1 complex formation in SiHa cells. *Mediators of inflammation*, 2011.
- Lin, Y., Yu, J., Wang, M., & Wu, L. (2023). Toxicity of single and combined 4-epianhydrotetracycline and cadmium at environmentally relevant concentrations on the zebrafish embryos (*Danio rerio*). *Environmental Pollution*, 316, 120543.
- Litak, J., Grochowski, C., Litak, J., Osuchowska, I., Gosik, K., Radzikowska, E., ... & Rolinski, J. (2020). TLR-4 signaling vs. Immune checkpoints, mirnas molecules, cancer stem cells, and wntless-signaling interplay in glioblastoma multiforme—Future perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3114.
- Liu B, Sun R, Luo H, Liu X, Jiang M, Yuan C, Yang L, Hu J. Both intrinsic and extrinsic apoptotic pathways are involved in Toll-like receptor 4 (TLR4)-induced cell death in monocytic THP-1 cells. *Immunobiology*. 2017 Feb;222(2):198-205. doi: 10.1016/j.imbio.2016.10.002.
- Liu, F., Zhu, S., Qin, L., Feng, P., Xu, J., Zhou, W., & Wang, Z. (2022). Isolation, identification of algicidal bacteria and contrastive study on algicidal properties against *Microcystis aeruginosa*. *Biochemical Engineering Journal*, 185, 108525.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. (2017). NF-κB signaling in inflammation. *Signal transduction and targeted therapy*, 2(1), 1-9.
- Louzao, M. C., Fernández, D. A., Abal, P., Fraga, M., Vilariño, N., Vieytes, M. R., & Botana, L. M. (2015). Diarrhetic effect of okadaic acid could be related with its neuronal action: Changes in neuropeptide Y. *Toxicology Letters*, 237(2), 151-160.

- Lu, N., & Malemud, C. J. (2019). Extracellular signal-regulated kinase: a regulator of cell growth, inflammation, chondrocyte and bone cell receptor-mediated gene expression. *International journal of molecular sciences*, 20(15), 3792.
- Lucas, R. M., Luo, L., & Stow, J. L. (2022). ERK1/2 in immune signalling. *Biochemical Society Transactions*, 50(5), 1341-1352.
- Ly, Y., Zhang, Z., Hou, L., Zhang, L., Zhang, J., Wang, Y. et al. (2015) Phytic acid attenuates inflammatory responses and the levels of NF- $\kappa$ B and p-ERK in MPTP-induced Parkinson's disease model of mice. *Neurosci. Lett.* 597, 132–136 <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.04.040>
- Mai, C. W., Kang, Y. B., & Pichika, M. R. (2013). Should a Toll-like receptor 4 (TLR-4) agonist or antagonist be designed to treat cancer? TLR-4: its expression and effects in the ten most common cancers. *OncoTargets and therapy*, 1573-1587.
- Maik-Rachline, G., Hacohen-Lev-Ran, A., & Seger, R. (2019). Nuclear ERK: mechanism of translocation, substrates, and role in cancer. *International journal of molecular sciences*, 20(5), 1194.
- Marques, I. J., Lupi, E., & Mercader, N. (2019). Model systems for regeneration: zebrafish. *Development*, 146(18), dev167692.
- Martinez-Porchas, M., & Martinez-Cordova, L. R. (2012). World aquaculture: environmental impacts and troubleshooting alternatives. *The Scientific World Journal*, 2012.
- Mattson, M. P. (2005). NF- $\kappa$ B in the survival and plasticity of neurons. *Neurochem. Res.* 30, 883–893. doi:10.1007/s11064-005-6961-x
- McNamee, S. E., Elliott, C. T., Delahaut, P., & Campbell, K. (2013). Multiplex biotoxin surface plasmon resonance method for marine biotoxins in algal and seawater samples. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 6794-6807.
- McPartlin, D. A., Lochhead, M. J., Connell, L. B., Doucette, G. J., & O'Kennedy, R. J. (2016). Use of biosensors for the detection of marine toxins. *Essays in Biochemistry*, 60(1), 49-58.
- Medina, M., Avila, J., & Villanueva, N. (2013). Use of okadaic acid to identify relevant phosphoepitopes in pathology: A focus on neurodegeneration. *Marine Drugs*, 11(5), 1656-1668.
- Munday, R. (2013). Is protein phosphatase inhibition responsible for the toxic effects of okadaic acid in animals?. *Toxins*, 5(2), 267-285.
- Nada SE, Williams FE, Shah ZA. Development of a Novel and Robust Pharmacological Model of Okadaic Acid-induced Alzheimer's Disease in Zebrafish. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2016;15(1):86-94. doi: 10.2174/1871527314666150821105602.
- Nazem, A., Sankowski, R., Bacher, M., & Al-Abed, Y. (2015). Rodent models of neuroinflammation for Alzheimer's disease. *Journal of neuroinflammation*, 12, 1-15.
- O'Mahony, M. (2018). EU regulatory risk management of marine biotoxins in the marine bivalve mollusc food-chain. *Toxins*, 10(3), 118.
- Ock, C. Y., Kim, E. H., Choi, D. J., Lee, H. J., Hahm, K. B., & Chung, M. H. (2012). 8-Hydroxydeoxyguanosine: not mere biomarker for oxidative stress, but remedy for oxidative stress-implicated gastrointestinal diseases. *World journal of gastroenterology: WJG*, 18(4), 302.
- Ozaki A, Morimoto H, Tanaka H, Okamura H, Yoshida K, Amorim BR, Haneji T. Okadaic acid induces phosphorylation of p65NF- $\kappa$ B on serine 536 and activates NF- $\kappa$ B

- transcriptional activity in human osteoblastic MG63 cells. *J Cell Biochem.* 2006 Dec 1;99(5):1275-84. doi: 10.1002/jcb.20873.
- Plóciennikowska, A., Hromada-Judycka, A., Borzęcka, K., & Kwiatkowska, K. (2015). Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cellular and molecular life sciences*, 72, 557-581.
- Prego-Faraldo, M. V., Valdiglesias, V., Méndez, J., & Eirín-López, J. M. (2013). Okadaic acid meet and greet: An insight into detection methods, response strategies and genotoxic effects in marine invertebrates. *Marine Drugs*, 11(8), 2829-2845.
- Reguera, B., Riobó, P., Rodríguez, F., Díaz, P. A., Pizarro, G., Paz, B., ... & Blanco, J. (2014). Dinophysis toxins: causative organisms, distribution and fate in shellfish. *Marine drugs*, 12(1), 394-461.
- Roskoski Jr, R. (2012). ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacological research*, 66(2), 105-143.
- Rossini, G. P., & Hess, P. (2010). Phycotoxins: chemistry, mechanisms of action and shellfish poisoning. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology: Volume 2: Clinical Toxicology*, 65-122.
- Ryan, L. A., Peng, H., Erichsen, D. A., Huang, Y., Persidsky, Y., Zhou, Y., ... & Zheng, J. (2004). TNF-related apoptosis-inducing ligand mediates human neuronal apoptosis: links to HIV-1-associated dementia. *Journal of neuroimmunology*, 148(1-2), 127-139.
- Ryder, J., Iddya, K., & Ababouch, L. (2014). Assessment and management of seafood safety and quality: current practices and emerging issues. *FAO fisheries and aquaculture technical paper*, (574), I.
- Sajous, L., Botta, A., & Sari-Minodier, I. (2008, January). Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of environmental oxidative stress?. In *Annales de biologie clinique* (Vol. 66, No. 1, pp. 19-29).
- Salierno JD, Snyder NS, Murphy AZ, Poli M, Hall S, Baden D, Kane AS (2006) Harmful algal bloom toxins alter c-Fos protein expression in the brain of killifish. *Fundulus heteroclitus Aquat Toxicol* 78(4):350–357
- Sarnico, I., Lanzillotta, A., Boroni, F., Benarese, M., Alghisi, M., Schwaninger, M., et al. (2009). NF-kappaB p50/RelA and c-Rel-containing dimers: opposite regulators of neuron vulnerability to ischaemia. *J. Neurochem.* 108, 475–485. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05783.x
- Schmidt, K. N., Traenckner, E. B. M., Meier, B., & Baeuerle, P. A. (1995). Induction of oxidative stress by okadaic acid is required for activation of transcription factor NF-κB. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45), 27136-27142.
- Sorrells, S., Toruno, C., Stewart, R. A., & Jette, C. (2013). Analysis of apoptosis in zebrafish embryos by whole-mount immunofluorescence to detect activated Caspase 3. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (82), e51060.
- Soud, G., Souayed, N., Haouas, Z., Maaroufi, K., 2018. Does the phycotoxin Okadaic acid cause oxidative stress damages and histological alterations to seabream (*Sparus aurata*)?. *Toxicon* 144, 55-60. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.02.001>
- Soud-Mensi, G., Moukha, S., Mobio, T. A., Maaroufi, K., & Creppy, E. E. (2008). The cytotoxicity and genotoxicity of okadaic acid are cell-line dependent. *Toxicon*, 51(8), 1338-1344.

- Sun, E., Motolani, A., Campos, L., & Lu, T. (2022). The pivotal role of NF-KB in the pathogenesis and therapeutics of Alzheimer's disease. *International journal of molecular sciences*, 23(16), 8972.
- Sun, J., Nan, G. "The extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in neurological diseases: A potential therapeutic target (Review)". *International Journal of Molecular Medicine* 39.6 (2017): 1338-1346. Lu X, Bijli KM, Ramirez A, et al. Hypoxia downregulates
- Suresh, K., Carino, K., Johnston, L., Servinsky, L., Machamer, C. E., Kolb, T. M., ... & Damarla, M. (2019). A nonapoptotic endothelial barrier-protective role for caspase-3. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 316(6), L1118-L1126.
- Svensson, S. (2003). Depuration of Okadaic acid (Diarrhetic Shellfish Toxin) in mussels, *Mytilus edulis* (Linnaeus), feeding on different quantities of nontoxic algae. *Aquaculture*, 218(1-4), 277-291.
- Tchivelekete, G. M., Almarhoun, M., Cao, Y., Zhou, X., Martin, P. E., & Shu, X. (2022). Evaluation of okadaic acid toxicity in human retinal cells and zebrafish retinas. *Toxicology*, 473, 153209.
- Terzi, G. 2008. Seafood Poisonings and their Effects. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 65 (1): 51-60.
- Thawkar BS, Kaur G. Zebrafish as a Promising Tool for Modeling Neurotoxin-Induced Alzheimer's Disease. *Neurotox Res.* 2021 Jun;39(3):949-965.
- Thon, P., Rump, K., Knorr, A., Dyck, B., Ziehe, D., Unterberg, M., ... & Koos, B. (2022). The Distinctive Activation of Toll-Like Receptor 4 in Human Samples with Sepsis. *Cells*, 11(19), 3020.
- Topal A, Alak G, Ozkaraca M, Yeltekin AC, Comaklı S, Acıl G, Kokturk M, Atamanalp M. Neurotoxic responses in brain tissues of rainbow trout exposed to imidacloprid pesticide: Assessment of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine activity, oxidative stress and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere.* 2017 May;175:186-191. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.02.047.
- Topal A, Özdemir S, Arslan H, Çomaklı S. How does elevated water temperature affect fish brain? (A neurophysiological and experimental study: Assessment of brain derived neurotrophic factor, cFOS, apoptotic genes, heat shock genes, ER-stress genes and oxidative stress genes). *Fish Shellfish Immunol.* 2021 Aug;115:198-204. doi: 10.1016/j.fsi.2021.05.002.
- Traoré, A., Ruiz, S., Baudrimont, I., Sanni, A., Dano, S. D., Guarigues, P. H., ... & Creppy, E. E. (2000). Combined effects of okadaic acid and cadmium on lipid peroxidation and DNA bases modifications (m5dC and 8-(OH)-dG) in Caco-2 cells. *Archives of toxicology*, 74, 79-84.
- Tsiambas, E., Mastronikolis, N., Fotiades, P. P., Kyrodimos, E., Chrysovergis, A., Papanikolaou, V., ... & Ragos, V. (2020). c-Jun/c-Fos complex in laryngeal squamous cell carcinoma. *Journal of BUON*, 25(2), 618-620.
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., & Fiotakis, C. (2009). 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of environmental science and health Part C*, 27(2), 120-139.
- Valdiglesias, V., Laffon, B., Pásaro, E., & Méndez, J. (2011). Okadaic acid induces morphological changes, apoptosis and cell cycle alterations in different human cell types. *Journal of environmental monitoring*, 13(6), 1831-1840.

- Valdiglesias, V., Méndez, J., Pásaro, E., Cemeli, E., Anderson, D., & Laffon, B. (2010). Assessment of okadaic acid effects on cytotoxicity, DNA damage and DNA repair in human cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 689(1-2), 74-79.
- Valdiglesias, V., Prego-Faraldo, M. V., Pásaro, E., Méndez, J., & Laffon, B. (2013). Okadaic acid: more than a diarrheic toxin. *Marine Drugs*, 11(11), 4328-4349.
- Van Dolah, F. M. (2000). Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence. *Environmental health perspectives*, 108(suppl 1), 133-141.
- Varani AP, Moutinho Machado L, Balerio GN (2014) Baclofen prevented the changes in c-Fos and brain-derived neutrophilic factor expressions during mecamlamine-precipitated nicotine withdrawal in mice. *Synapse* 68(11):508–517
- Velazquez, F. N., Caputto, B. L., & Boussin, F. D. (2015). c-Fos importance for brain development. *Aging (Albany NY)*, 7(12), 1028.
- Vilariño, N., Louzao, M. C., Abal, P., Cagide, E., Carrera, C., Vieytes, M. R., & Botana, L. M. (2018). Human poisoning from marine toxins: Unknowns for optimal consumer protection. *Toxins*, 10(8), 324.
- Visciano, P., Schirone, M., Berti, M., Milandri, A., Tofalo, R., & Suzzi, G. (2016). Marine biotoxins: occurrence, toxicity, regulatory limits and reference methods. *Frontiers in microbiology*, 7, 1051.
- Vuong, B., Hogan-Cann, A.D.J., Alano, C.C., Stevenson, M., Chan, W.Y., Anderson, C.M. et al. (2015) NF- $\kappa$ B transcriptional activation by TNF $\alpha$  requires phospholipase C, extracellular signal-regulated kinase 2 and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *J. Neuroinflammation* 12, 229 <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0448-8>
- Walters, J., Schipper, J. L., Swartz, P., Mattos, C., & Clark, A. C. (2012). Allosteric modulation of caspase 3 through mutagenesis. *Bioscience Reports*, 32(4), 401-411.
- Wang, B., Chen, J., Sheng, Z., Lian, W., Wu, Y., & Liu, M. (2022). Embryonic exposure to fentanyl induces behavioral changes and neurotoxicity in zebrafish larvae. *PeerJ*, 10, e14524.
- Wang, X., Sun, Y., Yang, H., Lu, Y. & Li, L. Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis in cultured neonatal rat cardiomyocytes by modulating the tlr4/nf-kappab pathway. *Sci Rep* 6, 27866 (2016).
- Watson, R. R. (Ed.). (2014). *Nutrition in the prevention and treatment of abdominal obesity*. Elsevier.
- Wells, M. L., Karlson, B., Wulff, A., Kudela, R., Trick, C., Asnaghi, V., ... & Trainer, V. L. (2020). Future HAB science: Directions and challenges in a changing climate. *Harmful algae*, 91, 101632.
- Wertz, I. E., Kusam, S., Lam, C., Okamoto, T., Sandoval, W., Anderson, D. J., ... & Dixit, V. M. (2011). Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7. *Nature*, 471(7336), 110-114.
- Wuerger, L. T., Kudiabor, F., Alarcan, J., Templin, M., Poetz, O., Sieg, H., & Braeuning, A. (2023). Okadaic Acid Activates JAK/STAT Signaling to Affect Xenobiotic Metabolism in HepaRG Cells. *Cells*, 12(5), 770.
- Xu, L., Zhou, A. L., & Zhao, M. (2014). Involvement of Toll-like receptor 4 in apoptosis of hippocampal neurons through Akt/FoxO3a/Bim signaling pathways. *Sheng li xue bao:[Acta Physiologica Sinica]*, 66(3), 315-322.

- Yalcin, H. C., Amindari, A., Butcher, J. T., Althani, A., & Yacoub, M. (2017). Heart function and hemodynamic analysis for zebrafish embryos. *Developmental Dynamics*, 246(11), 868-880.
- Ye, M. H., Li, D. W., Cai, Q. D., Jiao, Y. H., Liu, Y., Li, H. Y., & Yang, W. D. (2022). Toxic Responses of Different Shellfish Species after Exposure to *Prorocentrum lima*, a DSP Toxins Producing Dinoflagellate. *Toxins*, 14(7), 461.
- Yi, K. D., Covey, D. F., & Simpkins, J. W. (2009). Mechanism of okadaic acid-induced neuronal death and the effect of estrogens. *Journal of neurochemistry*, 108(3), 732-740.
- You WC, Wang CX, Pan YX, Zhang X, Zhou XM, Zhang XS, Shi JX, Zhou ML. Activation of nuclear factor- $\kappa$ B in the brain after experimental subarachnoid hemorrhage and its potential role in delayed brain injury. *PLoS One*. 2013;8(3):e60290. doi: 10.1371/journal.pone.0060290.
- Zerrifi, S. E. A., El Khalloufi, F., Oudra, B., & Vasconcelos, V. (2018). Seaweed bioactive compounds against pathogens and microalgae: Potential uses on pharmacology and harmful algae bloom control. *Marine Drugs*, 16(2), 55.
- Zhang, N. S., Li, H. Y., Liu, J. S., & Yang, W. D. (2014). Gene expression profiles in zebrafish (*Danio rerio*) liver after acute exposure to okadaic acid. *Environmental Toxicology and pharmacology*, 37(2), 791-802.
- Zhao, L., Huang, Y., Dong, Y., Han, X., Wang, S., & Liang, X. (2018). Aptamers and aptasensors for highly specific recognition and sensitive detection of marine biotoxins: recent advances and perspectives. *Toxins*, 10(11), 427.
- Zhu, L., Huang, Y., Hu, Y., Tang, Q., & Zhong, Y. (2021). Toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B pathway is involved in radicular pain by encouraging spinal microglia activation and inflammatory response in a rat model of lumbar disc herniation. *The Korean journal of pain*, 34(1), 47-57.

## ÖZGEÇMİŞ

| Kişisel Bilgiler          |                                               |
|---------------------------|-----------------------------------------------|
| Adı Soyadı :              | Hatice OĞUŞ                                   |
| Doğum tarihi :            |                                               |
| Doğum Yeri :              |                                               |
| Uyruğu :                  |                                               |
| Adres :                   |                                               |
| Tel :                     |                                               |
| E-mail :                  |                                               |
| Eğitim                    |                                               |
| Lisans :                  | Atatürk Üniversitesi Gıda Mühendisliği        |
| Yüksek lisans :           | Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Mühendisliği |
| Yabancı Dil Bilgisi       |                                               |
| İngilizce :               | B2                                            |
| Tezden Üretilmiş Yayınlar |                                               |
|                           |                                               |