



Ekolojik Risk Değerlendirmede Ekotoksikogenomik Kavramı ve Verdiği Katkılar

Mehmet Kürşat ŞAHİN^{1*}

¹ Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Kamil Özdağ Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Karaman, Türkiye
ORCID No: 0000-0003-0834-5081

*Sorumlu yazar: yasambilimci.kursat@gmail.com

(Alınış: 01.04.2020, Kabul: 04.06.2020, Online Yayınlanma: 18.06.2020)

Anahtar Kelimeler
Ekotoksikogenomik,
Toksikant,
Biyobelirteç,
Ekolojik risk
değerlendirilmesi

Öz: Ekotoksikolojide, ekotoksikogenomik yaklaşımlar önemli bir alan olmaya başlamıştır. Toksikogenomikler önceleri kimyasalların insanlara risklerini belirlemek amacıyla kullanılmaya başlandıysa da, bu konudaki son gelişmeler bu yaklaşımın diğer organizmalara da uygulanabilirliğini göstermiştir. Ekotoksikogenomik, ekosistemi temsil eden ve bireyler üzerinde olduğu kadar ekosistem üzerinde de kimyasalların zararlı etkilerinin çalışıldığı, organizmalara yönelik toksikogenomik bir uygulamadır. Ekotoksikogenomik belli bir toksikanta biyolojik sistemlerin bir yanıtı olarak, öncül gen ekspresyon çalışmalarından gelişmiştir. Zaman içinde olgunlaşan çalışmalar çeşitli –omik alanlarının toksikoloji ve patolojide kullanılmasına olanak sağlamıştır. Bu bağlamda ekolojik risk değerlendirme çalışmalarında çeşitli enzimler ve proteinlerin (örneğin Glutasyon S-transferaz, metallothiyonin, kolinesterazlar, ısı – şok proteinleri) biyobelirteç olarak kullanılması canlılar üzerindeki potansiyel etkilerin gözlemlenmesine olanak sağlamıştır. Ayrıca birçok omurgalı ve omurgasız canlıda toksik etkiye maruz kalmanın belirlenmesinde mikroçip veya gen çiplerinden yararlanılarak hangi genlerin hücrede, dokuda, organda “up/down regüle” olarak ifade edilmesinin belirlenmesi de bu yaklaşımın bir diğer alanıdır. Etki ve genin sonuç özgü örüntüsü, protein ve metabolit profilleri, toksisitenin biyobelirteçleri olarak moleküler değişimleri tanımlamada kullanılmakta ve bu profiller, toksisite mekanizmalarını açıklamayı da sağlamaktadır. Bu yaklaşım ile çok sayıda farklı etkenin etki mekanizmalarını belirlenerek, belli tür ve populasyon alt gruplarında bu mekanizmaları yorumlayabilen genetik özellikleri gösterebilmektedir. Son yıllarda çevresel maruz kalma ile oluşan etkilerden korunma ya da etkinin azaltılmasında ekotoksikogenomik çalışmalar, multidisipliner kimliği ile hem erken uyarı değerlendirilmesini hem de maruz kalmanın ekosistemde oluşturduğu risklerin moleküler düzeyde etki mekanizmalarının açıklanmasını sağlayan bir bilim dalı olarak gelişmesini sürdürmektedir.

Ecotoxicogenomics Concept and Its Contributions to Ecological Risk Assessment

Keywords
Ecotoxicogenomic,
Toxicant,
Biomarker,
Ecological risk
assessment

Abstract: Ecotoxicogenomic approach has become an important area in ecotoxicology. While toxicogenomics were previously used to determine the risks of chemicals to humans, recent developments in this area have demonstrated that this approach is also applicable for other organisms. Ecotoxicogenomic is a toxicogenomic practice that represents the ecosystem and where harmful effects of chemicals are studied on the ecosystem as well as on individuals. Ecotoxicogenomics evolved from precursor gene expression studies as a response to a particular toxicant biological systems. Studies that have matured over time have allowed various -omic fields to be used in toxicology and pathology. In this context, the use of various enzymes and proteins (eg Glutathione S-transferase, metallothionine, cholinesterases, heat-shock proteins) as biomarkers in ecological risk assessment studies has enabled the observation of potential effects on living things. In addition, determining which genes are expressed as “up / down regulated” in the cell, tissue and organ by using microarrays or gene chips in determining the exposure to toxic effects in many vertebrates and invertebrates. The result-specific pattern of effect and gene, protein and metabolite profiles are used to define molecular changes as biomarkers of toxicity, and these profiles also explain the mechanisms of

toxicity. With this approach, by determining the mechanisms of action of many different factors, it can show genetic features that can interpret these mechanisms in certain species and population subgroups. In recent years, ecotoxicogenomic studies continue to be developed as a branch of science that provides both early warning assessment and explanation of the mechanisms of action at the molecular level of the risks posed by the exposure in the ecosystem, with its multidisciplinary identity.

1. TANIM

Doğal ekosistemlerde çeşitli kimyasalların oluşturduğu etkileri inceleyerek, toksik maddelerin canlılar ve ekosistem üzerindeki etkilerini araştırıp, gösteren çalışmalar, bilindiği üzere “ekotoksikoloji”nin özünü oluşturur. Ancak son zamanlarda modern genomik teknolojilerinin de klasik ekotoksikolojiye eklenmesi ile yeni bir çalışma alanı olarak “ekotoksikogenomik” alanı kendinden söz ettirmeye başlamıştır. Konuyu bu bağlamda ele alırken, göz ardı edilmemesi gereken temel hususlardan biri de sadece genomik verinin değil, proteomik, transkriptomik ve metabolomik verinin de bu konu içerisinde ele alındığı gerçeğidir [1]. Bununla birlikte ekotoksikogenomik alanında çalışmaların temelini ortaya çıkaran bu –omik yaklaşımının kökeninde “kimyasalların insanlara yönelik tehditlerini” ortaya çıkarmak olsa da, genetik alanındaki son gelişmeler bu alandaki bilgi donanımını diğer organizmalara da uygulanabilir kılmıştır. Böylelikle, ekotoksikogenomik kavramı “ekosistemi, verdiği yanıtlar bakımından temsil eden ve bu nedenle bireyler üzerinde olduğu kadar ekosistem üzerinde kimyasalların zararlı etkilerinin çalışıldığı toksikogenomik bir uygulama” olarak ifade edilebilir. Bu kapsamda araştırmacılar, çevresel stres etkenlerine veya toksikantlara genomun nasıl yanıt verdiği üzerinde çalışmalar yürütmüşlerdir [2–16].

2. TARİHÇE

Ekotoksikogenomik, belli bir toksikanta ya da referans ajanlarla kaplı etkenlere biyolojik sistemlerin bir yanıtı uygulama alanı olarak gören ve model organizmalardaki öncül gen ekspresyon çalışmalarından köken alarak zaman içinde gelişen bir bilim dalıdır (Tablo 1.). Maruz kalma ve genin sonuç özgü örüntülerini anlamada, protein ve metabolit profilleri ile toksisitenin biyobelirteçleri olarak moleküler değişimleri tanımlamada kullanılmıştır [17,18]. Ayrıca bu profiller, toksisite mekanizmalarını [19,20] ve etki nedenlerini [21] kavramayı da sağlamıştır. Nuwaysir ve ark., [1999] “toksikogenomik” terimini, toksikolojik olarak ilgili genlerin yanıtlarını ölçerek ve seçici ve duyarlı biyobelirteçleri belirleyerek mikroçiplerin kullanımı ile tanımlamışlardır [2]. Bu anlamda mikroçip analizlerinden yararlanılarak çok sayıda kimyasal bileşik ile omik profillerinin ilişkisine yönelik bir çok çalışma bulunmaktadır [22]. Maruz kalmadan sonra izole edilen RNA örneklerinin sitokin, kemokin ve matriks metalloproteinaz transkript profillerinde beklenen yükselmeler gösterilmiştir. Benzer ekspresyon profilleri, yangısal hastalık sırasında meydana gelen biyolojik değişimleri taklit eden sistemlerde örneğin eklem

hastalığı olan hastadaki sinoviyosit ve kondrositlerinde de görülmüştür.

Sonraki çalışmalar, diğer dokuların gözlemini ve toksikantların geniş yayılımını genişleterek, spesifik toksisite-moleküler profillerin çağrışımına imkan sağlamıştır. Bu kapsamda genom teknolojisi ile yapılan ilk çalışmalardan biri Kurşun bileşiklerinin bir sınıfı, Alzheimer hastalığında da sakıncalı etki olarak bulunan Notch1 tarafından üretilen *Hes1* gen ürününün kırılma inhibisyonunun γ -sekretaz temelli bir keşif programı ile tanımlanmasıdır. Buradaki süreçte önemli olan nokta intestinal [barsak] epitel hücrelerindeki farklılıktır. Gen ekspresyon profillemesi ve protein analiz sonuçlarının kullanımı ile, adipsin’i bu toksisite için bir biyobelirteç olarak tanımlamışlardır [23]. Açıkçası genomik temelli yaklaşımlar son teknolojiyi gereksindiğinden ötürü maliyetlidirler. İşte bu sebeple, ekotoksikogenomik çalışmalara önemli bir katkı da özellikle ABD, Avrupa ülkeleri ve Uzakdoğu Asya’dan Japonya ve Güney Kore’deki büyük enstitüler ve konsorsiyumlar arası işbirliği ile gelmiştir [24,25]. Bu sayede düzenleyici kuruluşlardan öne çıkan bilim insanları endüstriyel laboratuvarlarda, akademilerde ve idari organizasyonlarda, bir araya gelerek, bu çalışma alanındaki önemli noktaları tanımlayıp, buna dönük hedefleri işaret etmektedirler.

2.1. Konsorsiyumlar

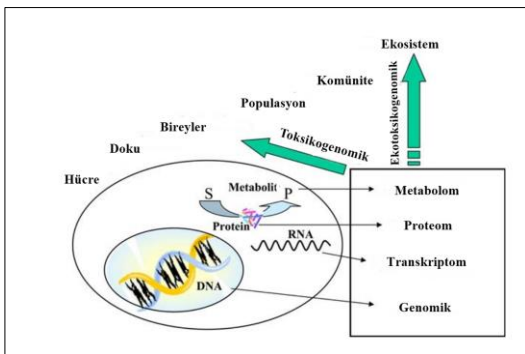
Ekotoksikogenomik ile karşılaşılan problemler bilim insanlarının tek başlarına çözümleyebileceğinden daha geniş olup, veri toplanması ve karşılaştırılması doğrultusunda yaygın çabalara gereksinen, süratli gelişen durumlardır. 3 ana işbirlikçi araştırma konsorsiyumu, prensip olarak ölçümleri standardize edip, toksikogenomik deneylerin yorumuna rehber olmaları amacıyla oluşturulmuştur. Bu gruplardaki bilim insanlarının yönlendirmesiyle, endüstri bazlı idari ve akademik laboratuvarlar, birer düzenleyici kurumlar olarak, ilgili spesifik konuyu işaret eden araştırma enstitüleri ile organize halde çalışmalarını sürdürmektedir. Bu konsorsiyumlara örnek olarak **ILSI (International Life Science Institute)**, **EMBL (European Bioinformatics Institute)**, **NIEHS (National Institute of Environmental Health Services)**, **Toxicogenomic Research Consortium –National Center for Toxicogenomics (NCT)**, **Consortium for Metabonomics Technology (COMET)**, **CREST Core Research for Evolutional Science and Technology** gibi merkezler verilebilir.

Tablo 1. Ekotoksikogenomik'in bilim tarihindeki yeri

Tarih	Kirillik kaynağı veya Bir bilim insanının atılımı	Etki veya yapılan çalışma
1850ler	Kömür yanma reaksiyon ürünleri	Güvelerde endüstriyel melanizm
1863	Endüstriyel atık sular	İlk toksikoloji testleri
1866	Mendel	Bezelyelerde kalıtım çalışmaları
1869	Miescher	DNA yı saflaştırın ilk kişi
1874	Kurşun atışları	Su kuşu ve sülün ölümleri
1887	Maden yataklarından Argon emisyonu	Geyiklerde ve tilkilerde ölümler
1920	Hans Winkler	Genom terimini ilk ortaya atan kişi
1927	Petrol sahalarında hidrojen sülfür	Memeli ve kuşlarda tükenmeler
1950ler	DDT ve organik klorlu pestisitler	Bahk yiyen kuşların yumurta zarında incelemeler
1953	Watson ve Crick	DNA'nın sarmal yapısının açıklanması
1960lar	Antikolin esteraz pestisidleri	Omurgalılarda tükenmeler
1970ler	Toksik atıkların karışımı	İnsan, sucul ve yaban hayatı sağlığına etkiler
1977	Fred Sagner ve arkadaşları	Genomik çalışmalarını başlatmaları
1980ler	Tarımsal tahribatlar ve radyoaktif maddeler	Şekil bozuklukları ve üremede harabiyet
1990lar	Kompleks kimyasal karışımları [PCBler]	Endokrin bozucular
1991	Pat Brown	DNA mikroarrayleri
2001-2003	Celera Genomics	İnsan Genomu Projesi
2000ler	Çevresel strese neden olan ajanlar	Ekotoksikogenomik'in toksikolojinin bir kolu olarak yer almaya başlaması
2010 sonrası	Toksik atıklar, kimyasallar	Ekotoksikogenomik ile uluslararası geçerli referans genlerin önerilmesi

3. -OMİK'LER

Bu başlık altında ifade edilen -omik kavramları toksisitenin hücreden ekosisteme giden hiyerarşik bir çerçeve içerisindeki fonksiyonları üzerinden değerlendirilmiştir (Şekil 1.).



Şekil 1. hücreden ekosisteme -omik kavramlarının hiyerarşik katılımı [26]

3.1. Türlerin Seçimi

Ekotoksikolojik etkilerin çalışılmasında proteomik ve genomik uygulamalar için uygun tür seçimi çok önemlidir. Bundandır ki yapılacak analizin niteliğini temsil edebilecek türler önem kazanır. Örneğin

denizkestanesi ve deniz üzümü gibi kimi durumlarda ayrıntılıca çalışılan bazı türler uygun adaylar olabilir. Çevresel toksikanta yanıtta karakteristik özellikleri sergileyen *Daphnia* sp. (Su piresigiller) cinsinin türleri gibi gruplar önemli bilgiler sağlamaktadır. Dolayısıyla konu ele alınırken şayet bu çalışma ekotoksikogenomik bir çalışma olacak ise, aşağıdaki kriterleri sağlayan türler ekotoksikogenomik analizler için iyi modeller olarak düşünülebilir: bu türler kolay örneklenebilir olması ve laboratuvarında yetiştirilebilir olması. Böyle bir yaklaşım kimyasala maruz kalma çalışmalarında yarar sağlayan bir kontrol noktası olarak düşünülebilir. Zira bu aşamadan sonra laboratuvara adaptif bir tür seçimi, ekotoksikogenomik temelli bir çalışma için kritik bir diğer noktayı işaret eder. Çünkü, şayet maruz kalma şartları kontrol edilemez ise gen ekspresyon değişiminin nedenini aydınlatmak zordur. Organizmalar kontamine olmuş ve olmamış alanlardan örneklenmiş olsa bile, bazen kirleticilerin etkilerinin genetik nedenli mi yoksa diğerlerinden mi olduğunun farkında olmak zordur. Genom büyüklüğü de türlerin seçiminde bir diğer kritik faktördür. Bununla birlikte, zaman ve genomik sekanslamamanın maliyeti direk olarak genom büyüklüğüne bağlı olup; türler arasında değişkenlik gösterebilmektedir.

Aşağıdaki tabloda çeşitli türlerde kirleticilere ilişkin genomik yaklaşım çalışmaları sunulmuştur (Tablo 2).

Tablo 2. Farklı türlerde kirleticilerle ilişkin genomik yaklaşım çalışmaları [26]

Kirletici	Organizma	Genomik yaklaşım	Referans
Pestisitler			
Klorpirifos, Diazinon	<i>Rattus norvegicus</i>	252 Gen bölgesi	Slotkin ve Seidler, 2007
Diazinon	<i>Homo sapiens</i>	600 Gen bölgesi	Mankame ve ark., 2006a,b
Diazinon	<i>Oryzias latipes</i>	Diferansiyel görünüm	Yoo ve ark., 2007
Fenarimol	<i>Daphnia magna</i>	SSH PZR, cDNA bölgesi	Soetaert ve ark., 2007
Mianserin	<i>Danio rerio</i>	Beyin spesifik	van der Ven ve ark., 2006b
Yeni ortaya çıkan kirleticiler			
2,4- 2,4-Dinitrotoluen	<i>Pimephelas promelas</i>	cDNA bölgesi	Wintz ve ark., 2006
Bis [Tri-N-bütülin] oksit [TBTO]	<i>Rattus norvegicus</i>	Oligo bölgesi	Baken ve ark., 2007
Bromobenzen	<i>Rattus norvegicus</i>	Afimetrik bölgeler	Tanaka ve ark., 2007a
Bromobenzen	<i>Rattus norvegicus</i>	Metabolomik/gen ekspresyonu	Hejine ve ark., 2005
Nanopartiküller [C50]	<i>Danio rerio</i>	Afimetrik bölgeler	Henry ve ark., 2007
Perklorat	<i>Xenopus laevis</i>	cDNA bölgesi, Q-PZR	Helbing ve ark., 2007
Perflorooktanoik asit [PFOA]	<i>Rattus norvegicus</i>	Afimetrik bölgeler	Guruge ve ark., 2006
PFOA	<i>Gobiocypris rarus</i>	cDNA bölgesi, Q-PZR	Wei ve ark., 2008
PFOA	<i>Mus musculus</i>	Afimetrik bölgeler	Rosen ve ark. 2007
PFOA, perflorooktan sulfonat asit [PFOS]	<i>Gallus gallus</i>	Genom bölgeleri	Yeung ve ark., 2007
RDX (siklotrimetilen-trinitramin)	<i>Populus nigra DN34</i>	RT-PZR	Tanaka ve ark., 2007b
RDX	<i>Rattus norvegicus</i>	Oligo bölgesi	Perkins ve ark., 2006
RDX	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SAGE	Ekman ve ark., 2005
Tribütülin	<i>Salmo salar</i>	RT-PZR	Mortensen ve Arukwe, 2007
Tribütülin	<i>Tetrahymena thermophila</i>	SSH, Q-PZR	Feng ve ark., 2007
Trimetilbenzen	<i>Rattus norvegicus</i>	Mikroçip	McDougal ve Garrett, 2007
Vanadium	<i>Rattus norvegicus</i>	Afimetrik bölgeler	Willsky ve ark., 2006
Farmasötikler			
Klorpromazin	<i>Danio rerio</i>	Beyin spesifik bölgeler	van der Ven ve ark., 2005
13 farmasötiğin karışımı	<i>Danio rerio</i>	Oligo bölgesi	Pomati ve ark., 2007
Propikonazol	<i>Daphnia magna</i>	cDNA bölgesi	Soetaert ve ark., 2006

Kirletici	Organizma	Genomik yaklaşım	Referans
Kompleks karışımlar			
Atık sular	<i>Cyprinus carpio</i>	cDNA mikroçipi	Moens ve ark. 2007a
Herbisit karışımı	<i>Platichthys flesus</i>	SSH	Marchand ve ark. 2006
Çoklu kirleticiler	<i>Phalacrocorax carbo</i>	cDNA mikroçipi	Nakayama ve ark., 2006
Kağıt fabrikası atık suyu	<i>Micropterus salmoides</i>	Diferansiyel görünüm	Denslow ve ark., 2004
Endokrin bozucular			
17 α -etininöstradiol [EE2]	<i>Danio rerio</i>	Oligo bölgesi	Santos ve ark., 2007
EE2	<i>Danio rerio</i>	Oligo bölgesi, RT-PZR	Martyniuk ve ark., 2007
EE2	<i>Carassius auratus</i>	cDNA mikroçipi	Martyniuk ve ark., 2006
EE2	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	cDNA mikroçipi	Hook ve ark., 2006
17 β östradiol, 4-nonilfenol[4NP], 1,1-dikoro-2,2-bis [P-klorofenil] etilen [P,P'-DDE]	<i>Micropterus salmoides</i>	Makroçip	Larkin ve ark., 2003
17 β östradiol	<i>Pimephelas promelas</i>	Oligo bölgesi	Larkin ve ark., 2007
4NP (4-nonilfenol)	<i>Oryzias latipes</i>	Oligo bölgesi	Kim ve ark. 2006
4NP, bisfenol A, EE2	<i>Cyprinus carpio</i>	cDNA mikroçipi	Moens ve ark., 2007b
Fadrozol	<i>Pimephelas promelas</i>	Oligo bölgesi	Villeneuve ve ark., 2007
Flutamid, EE2	<i>Pimephelas promelas</i>	Q-PZR	Filby ve ark., 2007
Progesteron, Östrojen, Testosteron	<i>Caenorhabditis elegans</i>	cDNA mikroçipi	Custodia ve ark., 2001

3.1. Omurgalılarda ve Omurgasızlarda Endokrin Bozucuların Ekotoksikogenomik Uygulamaları

Poliklorlu bifeniller, dioksin ve çevresel endokrin – bozucu kimyasallar ve plastikleştirici, farmasötikler gibi pestisidler ve doğal hormonlar steroid ve retinoid reseptörlerle etkileşmektedir [27–30]. Bu kimyasallar genellikle östrojenik aktivite gösterir ve yapısal olarak fenol halkasına benzer oldukları söylenebilir [31]. Reseptör bazlı işlevsel deneyler, çeşitli çevresel kimyasalların kabul edilen biyolojik aktivitelerini tespit etmede kullanılmıştır [32]. Bu östrojenik kimyasallara nonilfenol [NP], bisfenol A [BPA], östron ve 17 β östradiol [E2] verilebilir [33]. Bu bağlamda ülkemizde de yaygın olarak kullanılan model organizma olan farelerde endokrin bozucuların etkileri üzerine yapılan çalışmalar şöyle sunulabilir:

Fare

cDNA mikroçip metodu, hormonlar tarafından düzenlenen gen ekspresyon analizlerinin genom çapında başarılı uygulamaları yıldan yıla gelişmekte olan bir

yaklaşımdır [34–37]. Östrojen yanıt genlerinin ekspresyonundaki örüntülerin bilgisi, farelerin üreme organları üzerinde östrojenik kimyasalların etki mekanizmasını anlamak için gereklidir. Seçilen çok sayıda gen için; ekspresyon, doz bağımlı tarzda indüklenir. Karakteristik gen ekspresyon örüntüleri her çevresel östrojenik kimyasal için gözlenmiş ve bu örüntülerin E2'den farklı oldukları, böylece endojenik östrojenle indüklenmeden farklı olan spesifik etki mekanizmaları olabileceği önerilmiştir [38].

Fizyolojik östrojenler E2, fizyolojik olmayan östrojenler [DES] ve dioksinlerin uterus gen ekspresyonu üzerinde farklı etkiler gösterdiği söylenmiştir [39]. Karaciğerde, bununla birlikte östrojenik yanıt genlerinden farklı olarak NP ve dioksinin farklı gen setlerini aktive ettiği bulunmuştur [38–40]. Böylece ancak küçük bir miktar genin direk olarak östrojen uygulanması ile uterofolik etkilerinin olduğu, uterustaki gen ekspresyonunda da E2'nin NP'ye benzer etkileri olduğu ancak hepatik doku için durumun böyle olmadığı rapor edilmiştir. Genel olarak bakıldığında, bu tip bir konuyu ekotoksikoproteomik prensiplere uygun yönlendirmek

gerekirse de tür seçimi için benimsenecek genomik yaklaşıma göre farklılık sağlayabilecek başlıca kriterler ise şunlardır: hedef tür yine kolay örneklenebilir olmalı fakat bu türün toksikanta yanıtı akut ölüm yada ölümcül dozda toksikanta maruz kalma değil, uzun dönemli protein ekspresyonunda meydana gelebilen bozukluklar

ele alınmalıdır. Bunun yanı sıra yaşamsal faaliyetlerde rol alması nedeniyle evrensel olarak düşünülen sitokrom P450, kolinesteraz, katalaz, glutatyon S-transferaz, vitellogen, ısı şok proteinleri gibi başlıca biyobelirteçleri kullanmak ekosistem analizleri için de fayda sağlayacaktır [41-43] (Tablo 3).

Tablo 3. Moleküller profiller kullanılarak, farklı canlılarda yapılan çalışmaların değerlendirilmesi [44]

Sınanan koşullar	Organizma	Tanımlanmış hücresel etkisi gözlenmiş işlem	Sınanan dokular	Organizasyon düzeyi	Referanslar
Östrojen / Ksenoöstrojen	Salmonidler	Östrojen sinyalizasyonu, transkripsiyon kontrolü, detoksifikasyon, stres	Beyin, karaciğer	Transkript	Gallagher ve ark.[2008], Meucci ve Arukwe[2006], Mortensen ve Arukwe[2007a,b], ve Veldhoen ve ark. [2010]
	Diğer teleostlar	Hücre proliferasyonu, protein sentezi, taşınım ve immüno yanıtlar	Karaciğer	Transkript	Williams ve ark.[2007]
	Yumuşakçalar	Detoksifikasyon, oksiradikalmetabolizma, hormon regülasyonu, enerji metabolizması,immüne işlevler	Sindirim bezi, hemolenf plazma	Protein	Amelina ve ark..[2007], Apraiz ve ark, [2006], Bjornstad ve ark,2006], Knigge ve ark, [2004], Mi ve ark, [2007], ve Zhou ve ark.,[2010]
	Deniz kestanesi	Hormon düzenlenmesi	Yumurta	Transkript	Roepke ve ark.,2006]
Üreme olgunluğu, göç—smoltifikasyon ya da yumurtlama	Salmonidler	Östrojen düzenlenmesi, transkripsiyon kontrolü, detoksifikasyon ve stres	Beyin ve karaciğer	Transkript	Gallagher ve ark.,[2008], Meucci ve Arukwe[2006], Mortensen ve Arukwe[2007a,b], ve Veldhoen ve ark.,[2010]
Farklı larval evreler ve erginlik	Diğer teleostlar	Çeşitli	Çeşitli	Transkript	Douglas ve ark.,[2007]
Eşey belirlenmesi	Yumuşakçalar	Aminoasit / protein metabolizması	Manto	Metabolit	Hines ve ark., [2007]
Poliaromatik kirleticiler	Salmonidler	Detoksifikasyon ve stres	Karaciğer	Transkript	Mortensen ve Arukwe[2007a], Rees ve Li [2004], Rees ve ark.,[2005], ve Rees ve ark.,[2003]
	Salmonidler	Enerji metabolizması	Karaciğer ve Kas	Metabolit	Lin ve ark. [2009], Tjeerdema [2008], van Scoy ve ark. [2010] ve Viant ve ark. [2006]
	Yüzgeçayaklılar	Hormon düzenlenmesi, enerji metabolizması, detoksifikasyon	Karaciğer, Kan, deri/yağ	Transkript, Protein ve Metabolit	Brouwer ve ark.[1998], Cole ve ark. [2009], Hammond ve ark. [2005], Hirakawa ve ark.2007], Kim ve ark. [2005], Mos ve ark. [2007], Tabuchi ve ark. [2006], Rolland [2000], ve Sormo ve ark. [2005]
	Yumuşakçalar	Detoksifikasyon, oksiradikal metabolizma, hormone regülasyonu, enerji metabolizması, immün işlevler	Sindirim bezi, hemolenf plazma	Protein	Amelina ve ark.[2007], Apraiz ve ark.[2006], Bjornstad ve ark.[2006], Knigge ve ark. [2004], Mi ve ark.[2007], ve Zhou ve ark [2010]
Ağır metaller, bakteriyel enfeksiyonlar, kişisel bakım ürünleri, pestisidler, poliaromatik kirleticier	Yumuşakçalar	Detoksifikasyon, immün işlevler, stress, transkripsiyon kontrolü	Çeşitli	Transkript	Cellura ve ark.,2007], Dondero ve ark., [2006b], Feldstein ve ark., [2006],Franzellitti ve Fabbri [2005], Franzellitti ve Fabbri[2006], La Porte [2005], Luckenbach ve Epel[2005], Song ve ark.,[2006], Tanguy ve ark.[2005], ve Venier ve ark., [2006]

Sınanan koşullar	Organizma	Tanımlanmış hücresel etkisi gözlenmiş işlem	Sınanan dokular	Organizasyon düzeyi	Referanslar
Yakalama / Kirletici baskısı	Salmonidler, Yüzgeç ayaklılar	İmmün yanıt, Stres, İmmün işlevleri, Enerji metabolizması	Karaciğer, Deri, Periferal lökositleri	Protein, Transkript	Ellis ve ark.[2009], Mancia ve ark.[2007] ve Mancia ve ark. [2008]
Viral ya da bakteriyel enfeksiyon	Salmonidler	İmmün yanıt	Makrofaj, hematopoietik böbrek	Transkript	Rise ve ark. [2004a]
	Salmonidler	İmmün yanıt	Karaciğer	Protein	Booy ve ark. [2005] ve Provan ve ark. [2006]
	Diğer teleostlar	İmmün yanıt	Dalak	Transkript	Rise ve ark. [2008]
	Deniz kestanesi	RNAsplicing, protein işleme ve hedefleme, sekresyon, endozomal aktiviteler, hücre düzenlenmesi, hücre iskelet yapısı	Sölomositler	Transkript	Nair ve ark [2005]
	Deniz kestanesi	İmmün yanıt	Sölomositler	Protein	Dhelly ve ark [2011]
	Karides	Antimikrobiyal faaliyetler, oksidatif stres	Hepatopankreas	Transkript	Robalino ve ark. [2007]
	Karides	İmmün yanıt, oksidatif stres, Deri değiştirme proteinleri, stres	Hepatopankreas	Protein	Chai ve ark [2010]
Bakteriyel enfeksiyon, besin sınırlama ve sıcaklık stresi	Yumuşakçalar	Osmoregülasyon, aminoasit/protein/nükleotit metabolizması, karbonhidrat ve enerji metabolizması	Yaklaşıcı kas, sindirim bezi	Metabolit	Rosenblum ve ark [2005]
Populasyon adaptasyonu	Diğer teleostlar	Hücre yönlendirme ve enerji metabolizması	Beyin	Protein	Gonzales ve ark. [2010]
	Diğer teleostlar	Protein metabolizması	Karaciğer	Protein	Gonzales ve ark. [2010]
	Diğer teleostlar	Demir/Hem biyosentezi, osmoregülasyon	Karaciğer	Transkript	Larsen ve ark. [2007]
Hipoksi, soğuk ve sıcak stresi	Diğer teleostlar	İmmün yanıt, enerji metabolizması, hücre büyümesi, hücre iskelet yapısı, protein metabolizması	Karaciğer	Transkript	Kassahn ve ark. [2007]
Hipoksi	Karides	Oksidatif stres, stress, mitokondrial işlevler, yağ taşınımı, protein sentezi, enerji metabolizması	Hepatopankreas ve hemosit	Transkript	Brown-Peterson ve ark[2008] ve de laVega ve ark. [2007a,b]
Osmotik stres	Karides	Protein metabolizması, Hücre iskelet yapısı, enerji metabolizması, immun işlevler	Hemositler	Transkript	de la Vega ve ark. [2007a,b]
Isı stresi	Karides	Protein metabolizması, Hücre iskelet yapısı, enerji metabolizması, immüne işlevler	Hemositler	Transkript	de la Vega ve ark. [2007a,b]
Metaller/ Ağır metaller	Diğer teleostlar	Detoksifikasyon, enerji metabolizması, protein demeti, mitokondriyal solunum,	Karaciğer	Transkript	Shedder ve ark. [2006]
	Diğer teleostlar	Enerji metabolizması, sinyal geçişi, stres	Beyin	Protein	Keyvanshokoh ve ark. [2009]
	Deniz kestanesi	Detoksifikasyon	Embriyo	Transkript	Cserjesi ve ark.[1997] ve Scudiero ve ark.[1997]

Sınanan koşullar	Organizma	Tanımlanmış hücresel etkisi gözlenmiş işlem	Sınanan dokular	Organizasyon düzeyi	Referanslar
Pestisitler	Diğer teleostlar	Oksidatif stres	Karaciğer	Protein	Chen ve Huang[2011]
	Deniz kestanesi	Proteoliz, transkripsiyon	Embriyo	Transkript	Marc ve ark [2005]
	Yumuşakçalar	Aminoasit / protein metabolizması, azot metabolizması	Manto, yaklaşırtıcı kas	Metabolit	Hines ve ark. [2010]
Kirlilik düzeyleri	Diğer teleostlar	Hormon düzenlenmesi, detoksifikasyon	Karaciğer	Transkript	Baker ve ark [2009]
	Yumuşakçalar	Stres, kolaylaştırılmış membran transportu	Yaklaşırtıcı kas, gonad ve hepatopankreas	Transkript	Veldhoen ve ark [2011] ve Veldhoen ve ark [2009]
	Yumuşakçalar	Detoksifikasyon, protein metabolizması, enerji metabolizması, stres	Sindirim bezi	Protein	Amelina ve ark [2007], Knigge ve ark [2004] ve Mi ve ark [2005]

* smoltifikasyon: juvenil salmonidlerin tuzlu su ile başa çıkabilmesi için geçirdiği fizyolojik değişimlerin süreci

Bu –omik profilleri üzerine çevresel etkenlerin yansması, çoklu değişken veri analizleri ile beraber hücresel düzeyde gözlenen bir etkinin domino etkisi biçiminde tüm ekosistemi de tehdit edebileceği söylenilmektedir. Örneğin Birleşmiş Milletlerin yayınladığı bir çevre raporunda Nijerya'daki Nijer deltası başta hidrokarbonların degradasyonu olmak üzere metan gazı ve karbon IV oksit gibi yağ türevlerinin oluşturduğu kirlilik ile karşı karşıyadır [44]. Söz konusu alanda brnzen ve polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) değerleri de Dünya Sağlık Örgütü'nün öngördüğü üst sınırlardan sırasıyla 1800 ve 500 kat daha yüksektir [44]. Burada sitagenomik bazı yürütülen bir çalışmada Udofia ve ark, (2018) özellikle petrol bazı hidrokarbon biyodegradasyon enzim yetkinlikleri olan mikroorganizmalar kullanılarak (örneğin *Pseudomonas stutzeri* ve *Acidovorax sp.*), kirlilik seviyesinin azaltılmasında başarı sağlanmıştır [44].

4. AMAÇ ve ARAÇLAR

Ekotoksikogenomiğin, 3 temel hedefi vardır:

- Çevresel maruz kalma ve organizmadaki etken duyarlılığı arasındaki ilişkileri anlama,
- Etkenin ve toksik maddelere maruz kalmanın faydalı biyobelirteçlerini tanımlama ve
- Toksitenin moleküler mekanizmalarını aydınlatma.

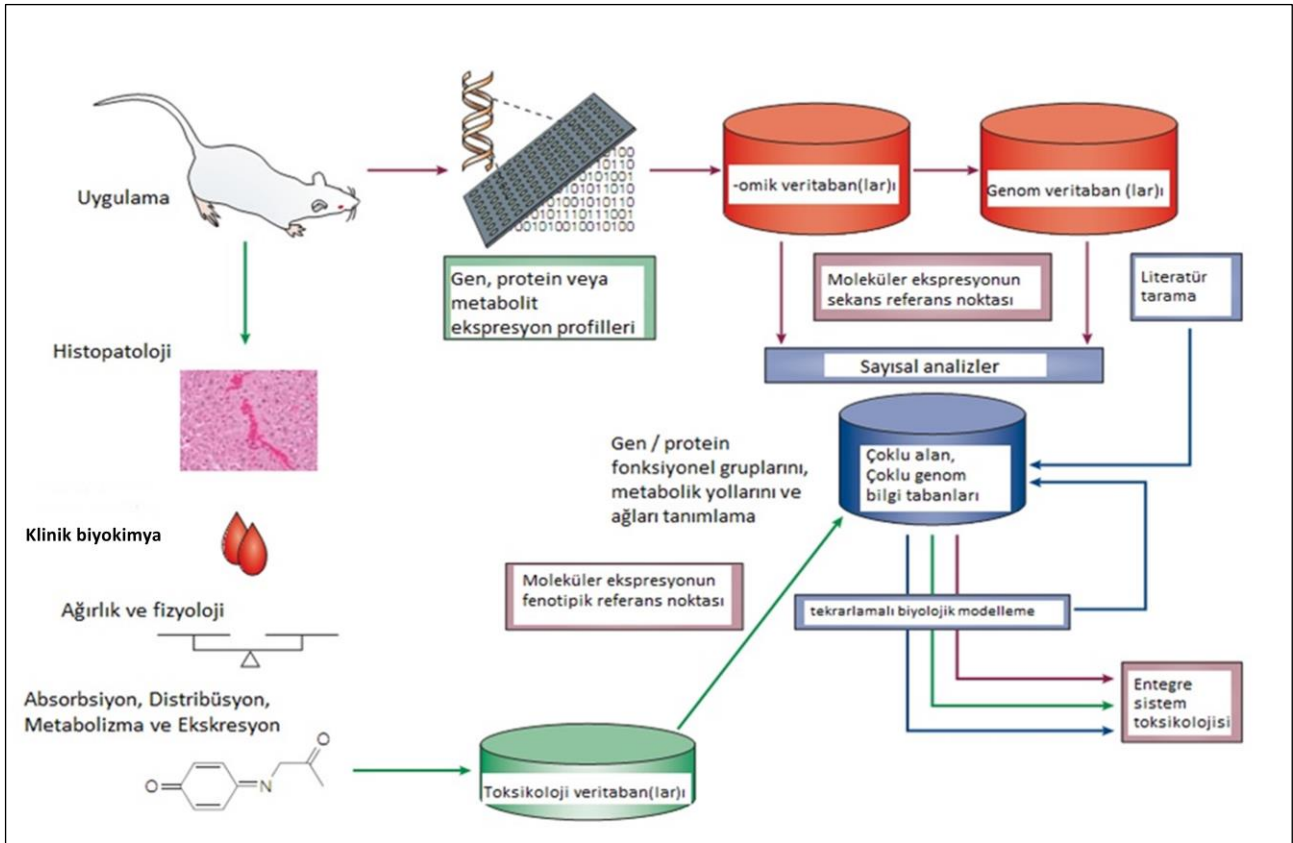
4.1. Örnek Bir Modelleme

Tipik bir toksikogenomik deneyinde, her biyolojik örnek için kayda değer farklılıkta ifade edilen genlerin listeleri oluşturulur. Alternatif olarak ise, genleri ve ilginin gen profilini tanımlamak için profil – analiz metotları doz ilişkili ya da süreç çalışmaları olarak uygulanabilir. Sonra, literatür taramaları, karşılaştırma analizleri ve moleküler ekspresyon veri setlerinin tekrarlamalı biyolojik modelleri üzerinden sistematik olarak çıkarılan ve toplanılan ilgili bilginin yardımıyla; bu değişimlerden (ya da biyobelirteçler) gelen benzer kliniksel ya da

görülen yan etkileriyle, ilgili biyolojik sistemlerin adaptif yanıtlarını ayırtmak mümkün olur. Geçen on yılda, ekotoksikogenomik yaklaşımı; gen ekspresyon profillerinin konseptini, toksikant sınıflarının, etken alt tiplerinin veya diğer biyolojik son noktalarının [end-point] bir “imzası” olarak onaylamıştır [45]. Bu imzalar, toksikant etkilerinin tahmin edici biyobelirteçlerinin analitik araştırmalarında etkili olarak yönlendirdiği gibi, aynı zamanda toksik ve adaptif yanıtlar arasındaki bağlantılı moleküler mekanizmalarda dinamik ayrışmanın anlaşılmasına da katkı sağlamıştır.

Toksikogenomik çalışmayı ve gen ekspresyon verilerinin üretildiği toplamı içeren bir deneysel çalışma çok büyüktür. Hatta inceleme yapmak, her bir doz – zaman grubunda, her bir hayvan başına bir doku için 18 – 45 mikroçip (eğer replikantlar kullanılacak ise daha fazla) ve çip başına 20000 ya da daha fazla transkriptin ilgili ölçümlerine gereksinir. Ayrıca, hayvan başına tipik uygulama ilgili veriler (vücut ağırlığı, organ –ağırlık ölçümleri, klinik kimyasal ölçümler, çeşitli dokular için mikroskopik histopatolojik bulgular gibi) de hesaba katılmalıdır. Bu verilerin dikkatli toplanması, yönetimi ve entegrasyonu, deney protokolünün içeriğinde olup, toksikolojik sonuçlar için yorumlanması için zorunludur.

Böylece, dozla, zamanla ve önemli toksikolojik ve/veya histopatolojik fenotip(ler) yönünden olan bütün veriler kaydedilmelidir. Bu tip deneysel verilerin derlenmesi, sayısal modelleme ve toksikoinformatikle beraber, toksikant ilgili etkenleri yeniden anlamının sağlanmasıyla önem arz edecektir. Aşağıdaki çerçevede toksikogenomiğin, geleneksel toksikolojik ve histopatolojik bulgularının son noktalarından hesaplanıp, -omiklerce derlenen bir entegrasyon şeması görülmektedir (Şekil 2). Bu entegrasyon, toksikolojik sonuçlar ve moleküler genetik arasındaki ilişkiyi sinerjistik biçimde anlamamızı sağlayan bir potansiyel sahiptir.



Şekil 2. Sistem toksikoloji çalışma çerçevesi [46]

4.2. Verilerin Entegrasyonu

Ekotoksikogenomikte anahtar hedef, farklı çalışmalardan ve analitik platformlardan gelen verileri daha zengin ve biyolojik olarak bir hücrenin, organın veya organizmanın toksikolojik yanıtını daha belirginleşmiş kavrama zemininde birleştirmektir. Örneğin, bir amaç protein fonksiyonları ile gen ekspresyonu arasında veya belli metabolit edici enzimler ile serumda veya küçük metabolit gruplarının organizmanın idrarındaki ekskresyon arasındaki etkileşimi tanımlayabilir.

Farklı alanlardan gelen proteomik, transkriptomik veya metabonomik gibi verilerin entegrasyonu rapor edilmiştir. Bu deneylerde, doku örnekleri aynı birey hayvanlardan ya da farklı teknolojiler kullanarak paralelde benzer olarak uygulanan hayvanların analizinden elde edilmiştir. Bununla birlikte, farklı çalışmalardan gelen veriler sadece farklı açılardan yanıtlayıcı transkriptlerin son listesinden ya da elde edilen protein profillerinden elde edilirler [47]. Global proteomik veya metabonomik çalışmalarından elde edilen iki boyutlu jelden spot yoğunluğu veya nükleer manyetik rezonans ile (NMR) metabonomiklerin iz verileri gibi tecrübeler; bize küme yada temel bileşenler analizlerinin, transkripsiyon analizlerine çok benzer şekilde moleküler ekspresyonun evrensel işaretlerden elde edilebileceğini anlatır [48]. Eğer biyolojik örnekler, benzer ekspresyon karakteristiği gösteren, kendilerine has kümelerine ayrılırlarsa, sonraki çabalar bu örneklerde eksprese olan yeni protein ya da metabolitlerin farkına varabilir [11]. Sonraki aşamalar potansiyel biyobelirteçler ya da toksikolojik yanıtın

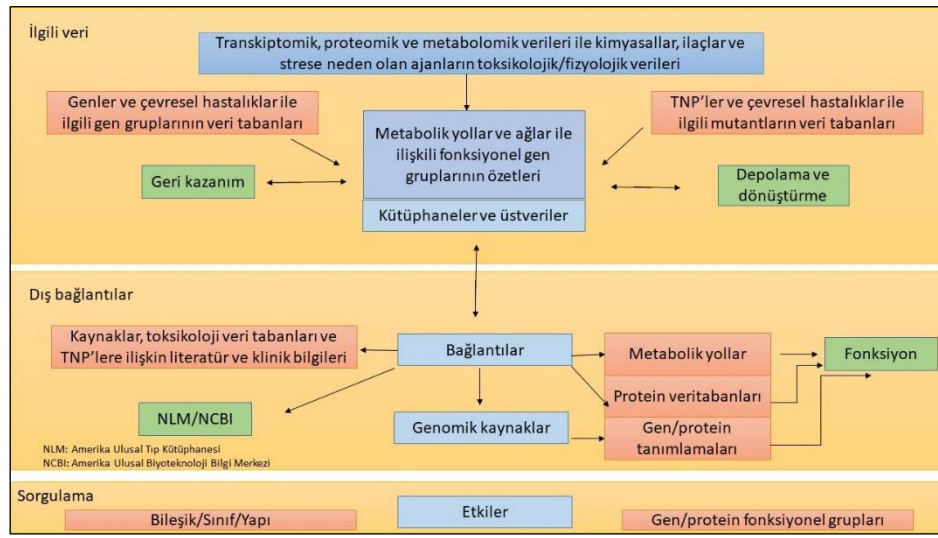
temelini oluşturmada araç olarak bu protein ya da metabolitleri değerlendirmeye yönelir. Gen karşılaştırmaları, kamu veri tabanındaki protein ve metabolik veriler biyolojik sistemlerin fonksiyonlarının ve çevresel etkenlere yanıtların nasıl olduğu hususunda teşvik edici evrensel anlayış için değerli olacaktır [49–53].

Bu yazılım havuzları geliştiğinde; deneyler, farklı deney dizaynları kullanarak ancak benzer toksisite son noktası veya toksikantın benzer sınıfından bir parametreyi hedefleyerek tamamen başka kaynaklardan birikecektir. Bu durumlarda, veri tarama meydana gelmeden önce, ilgili çalışmalardan gelen veri tabanlarının entegrasyonu önemlidir. Biriken veri setlerinin değerini maksimize etmek için, yazılım havuzları farklı teknolojik alanlardan gelen verilerin entegrasyonu sağlanmalıdır [41]. Zira her bir gruptaki (domain) veri tiplerinin standart bir temsili, etkili ve tutarlı depolama, erişim, analiz, karşılaştırma ve veri değişimi için ön koşuldur. Gelişim sürecinde uluslararası standartları düzenleyen gruplar MGED (Microarray Gene Expression Data Society) veya RSBI'dir (Reporting Structure for Biological Investigations). Bundan sonra ise, düzenleme kuruluşlarının üyeleri, sanayiden, akademik ve idari laboravuarlardan gelen biliminsanlarıyla beraber çalışarak, ILSI (International Life Science Institute) Genomik Komitesi ve Clinical Data Interchange Standards Consortium'da değişim, analiz ve transkriptomik verinin yorumlanması gibi durumlar için standart geliştirilmeye çalışır.

Bu durumu temellendirerek, toksikogenomik kavramının genişletilmesine yönelik, bunu PBPK (Fizyoloji Bazlı

Farmakokinetik) ve PD (Farmakodinamik) modellemeleri gibi rekabet edici yaklaşımlarla birleştiren bir öneri söz konusudur [54]. PBBDK modellemeleri, test ajanı dozunun kantitatif tahminlerini ya da hedef dokuda mevcut olan metabolitleri sağlamada kullanılabilir. Dolayısıyla, uygulama sonrası herhangi bir zamanda moleküler ekspresyon profillerini göz önüne almak başlangıç dozu, maruz kalma zamanına bağlı ya da toksikant indüklenmiş fenotipi referans almada düşünülebilir. Gen, protein ve metabolit ekspresyonu arasındaki ilişkiler, hem ajanın uygulanan dozunun fonksiyonu olarak hem de birbiri ardına gelen çeşitli doku kompartımanlarında meydana gelen kinetik ve dinamik doz – cevap doz – yanıt davranışları olarak

tanımlanabilir. Bu modeller, transkriptom, proteom ve metabolomun bizzat kendileri dinamik sistemler olduklarından, değerlendirmede hesaba katılmalıdır. Bu nedenle bu –omik profilleri, gün içinde bir zaman ya da besin gibi önemli çevresel etkenlere tabi olurlar. Ayrıca, NIEHS Environmental Genome Project, genlerdeki çevresel maruz kalma, detoksifikasyon ve onarımda önemli TNPLeri (Tek Nükleotid Polimorfizmi) tanımlama amacındadır. Toksikogenomik bilgiyi bu şekilde TNPLer gibi dikkate değer noktalarla getirilebilecek analizler, organizmaların verdikleri yanıtlarda bize resmi daha büyük bir çerçevede bakmamıza olanak sağlayabilir (Şekil 3).



Şekil 3. Biyolojik Sistemler bilgi tabanında Kimyasal Etkilerin [CEBS] gelişimi için Konsept Çerçeve [46]

4.2.1. Ekotoksikogenomik Yaklaşım

Ekspresyon profillemesi gibi genomik analizler bir organizmanın çevresel etkenler ile olan reaksiyonunu inceler. İlk olarak, organizma, vücuduna giren ve vücut içerisinde dağılan kimyasala maruz kalır. Spesifik hücre hasarları sonuçlanan, bir şekilde kendine has kimyasal özelliklerinde kirlenmiş hücreler ve hücre komponentleri ile etkileşime girer. Yanıt olarak; organizma kirlenmeye, genin ekspresyon değişimini, protein seviyelerini veya metabolik konsantrasyonları içeren çoklu seviyelerde reaksiyon gösterir [55]. Bu değişimler, örneğin organizmayı önemli stres kaynaklarından korumada yardımcı ya da bunun yan etkilerini azaltmak gibi biçimlerde olabilir. Genler, kirlenmenin etki mekanizmasına bağlı ve spesifik olarak değiştirilen belirli setlerden (ya da protein veya metabolitlerin) oluşur [55]. Yanıtın önemsenmiş örüntüsü, spesifik bir etki mekanizmasını ve kirlenmeyi bir parmak izi gibi temsil edebilir.

Ekotoksikologlar için DNA mikroçipleri, uygun genomik araçlardan biridir. Gen ekspresyon mikroçipleri, her substrat üzerinde genellikle DNA parçalarının en yakın haliyle düzenlenmiş analizlerinden oluşur (örneğin 100 mikron). Her parça genellikle spesifik bir gen için bir araştırma temsil eden farklı bir DNA molekülünden oluşur. Mikroçipler, araştırmacının tek bir RNA örneği üzerinde tüm genin

ekspresyonunu temsil ederek sorgulamasını sağlar. cDNA mikroçipleri, bireysel klonlanmış cDNAların PZR amplifikasyonundan gelen DNA'ları içerir. Sonuç olarak, probun uzunluğu oldukça çeşitli olabilir. Fragmentler üzerindeki yüksek yoğunlukta DNA noktalarını yazmada robot yazıcılar kullanılır. DNA mikroçiplerinin yakın zamandaki bir tipi, spesifik transkriptler için 50 – 70 birimlik oligonükleotid problemlerinden oluşur. cDNA çiplerine zıt olarak da her transkript için sekans bilgisi gereklidir. Bu oligonükleotitler cam parça üzerinde direkt olarak sentezlenebildiği gibi önceden imal edilerek, farklı polimerler üzerinde de işaretlenebilir [56]. Afimetrik çipler ise birkaç kısa oligolarda belli bir gen için prob olarak kullanılan başka bir yaklaşımı temsil eder.

4.3. Verilerin Entegrasyonu

Ekotoksikogenomik, kirlenmeye ilişkin bilinmeyen toksisiteyi, sürekliliği, çevresel akıbeti, taşınımı ve kompleks karışımlardaki varlığı gibi zorluklarda yardımcı olabilir. Ekotoksikogenomik etki mekanizmaları [MOA=Mode of Action] bilgilendirmede ve çevrede kimyasala maruz kalmayı tahmin etme çalışmaları için iki potansiyel uygulama üzerinden gitmek yararlı olacaktır. Bunlardan birisi NOTEL [Transkripsiyonel Etki Gözetlenmeyen Seviye] ve diğeri genomik bazlı TIE dir [Toksiste Tanımlama Değerlendirmesi]. Bu ve benzeri çalışmaların

yürütülmesi ileride bu tip çalışmaları daha önemli su kalitesi, çevre sağlığı gibi hususlarda gözlem parametreleri olarak düşünülmesini kuvvetle sağlayacaktır.

4.3.1. Transkripsiyonal etki gözlenmeyen seviye [NOTEL]

NOTEL kavramı, bir kimyasalın gen ekspresyonunda kayda değer değişim ile sonuçlanmayan dozu olarak tanımlanabilir [57]. Lobenhofer ve ark., önce bu konsepti bir MCF – 7 hücresi [bir östrojen yanıt kanser hücresi hattı] çalışmasında önermiş, burada iki düşük doz, bir fizyolojik doz ve bir de sitotoksik doz içeren dört farklı konsantrasyona maruz kalmayı çalışmışlardır. Bu çalışmada, 2000 aday genin hiçbirinde kayda değer değişim ile eksprese olmayan iki düşük dozu vurgulamışlar ve bunların etkene transkripsiyonal yanıt için bir dönüm noktası konsantrasyonu olarak NOTEL terimini önermişlerdir. Buradaki önemli husus, herhangi bir hücresel taşıma bozukluğu gen ekspresyonunda kayda değer bazı değişimlere neden olmalıdır; böylece NOTEL değeri olarak gerçek transkripsiyonal etki gözlenmeyen seviye hesaplanabilir. Bazı araştırmacılar, NOTEL'in kontaminasyon izleme ve hatta düzenleme standartlarını kurmada kullanılabileceğini önermişlerdir [58].

Gen ekspresyon değişimleri her zaman toksisiteyi belirtmeyebilir, bazen de dengeleyici (telafi edici) yanıtları temsil edebilir. Çevresel izlemede NOTEL'in potansiyel rolü kimi çalışmalarda gösterilmiştir. Poynton ve ark., düşük seviyede metal konsantrasyonlarında, *D.magna*'da çok az da olsa genlerin farklı eksprese olabildiklerini göstermiştir [59]. Daha sonra terk edilmiş iki bakır madeninden örneklerinin gen ekspresyon paternleri karşılaştırılmış ve bakır yatakların kaynağa yakın yerlerinden gelen gen ekspresyon örüntüleri, çok düşük konsantrasyonları ile de çok az da olsa farklı biçimde eksprese olan genler ile sonuçlandığı gösterilmiştir: Atlantik yıllıkbalığının (*Fundulus heteroclitus*) hedef tür olduğu New Bedford limanındaki (ABD) iyileştirmenin etkinliğinin izlenmesinde mikroçiplerden yararlanılan çalışmada Crawford ve ark. (2019), lipid homeostasisindeki Poliklorinli Bifenil (PCB) ve gen ekspresyonunun ilişkili olduğunu göstermişlerdir[60]. Yine yavru Atlantik yıllıkbalıklarında hepatik yanıtların izlendiği çalışmada kirliliğe adapte olmada eksprese olan gen yanıtları da bu konu ile ilgili bir diğer örnektir. [61].

4.3.2. Karışımlara genomik toksisite tanımlama değerlendirme yaklaşımı

Doğal ortamlarında, organizmalar sadece bir bileşiğe değil, çevre ve bireysel organizmalar ile etkileşimde olabilen bir kirletici karışımı ile maruz kalabilirler. Önceden vurgulandığı gibi, çevrede kirletici karışımlarını içeren kompleksler atık sularda bazılar saptanmıştır. Toksikite Tanımlama Değerlendirmesi (TTD) süreci sıklıkla kompleks karışımlardaki tekil kimyasallar ile filtrelenen ilişkili toksisite testlerinden yararlanıp, nedensel ajanları belirler. Toksikite

tanımlamada güncel metotlar; bir ya da daha fazla toksikant sınıftan kaldırılan, her manipülasyonu takip eden atık su toksisite testleri ile eşleşmiş biyofizyolojik ayrışımı ve uygulamalarından yararlanır. Zaman ve maliyet olarak ilgili yürütülen bir TTD, bu bağlamda çok önemlidir [62] ve genelde bu yaklaşımlar, bazı atık sularda toksikantların genel sınıflarının ayrıştırılmasında başarılıdır; ancak tek bir kirletici değerlendirilmesi için böyle bir başarıdan bahsedilemez. Ek olarak, ayrışım yaklaşımları da karışımlarda sinerjistik yada antagonistik etkinin oluşturulabilmesi olarak değerlendirilmez. Çünkü bu metot, yıllarca toksikant tanımlamada dayanak noktası olmuştur ve bir TTD yaklaşımı daha duyarlı, spesifik, süreli ve uygun maliyetli özellikleri ile daha net bir ifadedir.

Genomik, TTD için alternatif ve tamamlayıcı bir araç olarak önerilebilir. Gen ekspresyon profilleri bir kompleks atık suda nedensel ajanı belirleyebilir. Ayrıca karışımlardaki kimyasalların, üreme ve hayatta kalmada beklenmeyen sonuçlar ile etkileşebildikleri bilinmektedir [63]. Kimyasal kombinasyonlarının farklı etkilere sahip olmaları, o organizma üzerindeki gen ekspresyon profillerini etkileyen tekli kimyasallara kıyasla daha uygundur. Akut yada kronik biyo-sınamalarda ek yanıtı neden olan kimyasallar, ayrıca bir başlarına da additif ekspresyon profiline de sahip olabilir. Standart biyo-sınamalarda sinerjistik veya antagonistik etki gösteren kimyasalların kendine özgü ekspresyon profilleri olabilir ama tekli kimyasalların ekspresyon profillerini temsil etmezler. Örneğin, krom ve benzopiren içeren karışımın karaciğer tümör hücre hattına [hepatoma hücreleri] etkileri üzerine olan bir çalışmada, Liu ve ark. (2010), karışımın gen ekspresyon profiline, tekil kirleticilerin, profillerinden farklı olduklarını bulmuşlardır [64]. Bununla beraber, bilinen bu iki transkripsiyonal yolları benzeyen karsinojen hedef, zıt yönlendirmeler ile bir antagonistik yanıtı neden olur. Böylece, karışımda bazı indüklenmiş gen – benzopirenlerin baskılanması tahmin edilmiştir.

Krasnov ve ark. (2005), Cd, CCl₄ ve piren olarak 3 model toksikantı araştırmıştır [65]. Düşük maruz kalma seviyelerinde ekspresyon profillerinin additif olduklarını ve Cd ile piren ekspresyon profillerinin ayrılacaklarını göstermişlerdir. Nanopartikül araştırmalarını içeren bir diğer çalışma ise nanopartikül ve yardımcı çözücüsünden dolayı etkiler arasında ayırım yapabileme imkanını göstermiştir. Fullerenlerin (C₆₀) ayrışması için partiküler hidrofobik özelliğe sahip, bir yardımcı çözücü ajan olan tetrahidrofurandan (THF) yararlanır. Araştırmacılar, bu iki formulasyona maruz kalmanın ekspresyon profilleri benzer örüntüye sahip olsa da fullerenlerin ayrışmasında THF'nin toksik etkisi görece düşük kaldığını göstermişlerdir [66]. THF - C₆₀ ve yalnız THF'ye maruz kalmanın ekspresyon profillerinin benzer olması görülen toksik etkileri ve sudaki THF degradasyon ürünlerinin bir sonucu olarak C₆₀ a katkıyı ifade eder. Ancak bu öncül sonuçlara rağmen, DNA mikroçipleri TTD yaklaşımına bütünüyle entegre olmadan önce; gen ekspresyonları üzerinde karışımların etkilerinin anlaşılmasını sağlayan çok sayıda çalışmaya ihtiyaç olduğu açıktır.

4.4. Etki Mekanizmasını Anlamada Genomik Yaklaşım

Ekspresyon profilleri ve diğer genom ifadelerinin geniş yaklaşımları, toksikantların etki mekanizmasının [MOA] hipotezinin test edilebilirliğine yardımcı olmuş ve etki mekanizması bazlı olarak kimyasalların sınıflandırılmasına imkan sağlamıştır. Yeni gelişmekte olan kimyasallar için, MOA verileri kirlenmeyle ilgili en çok ilgili analizlerin ne olacağını belirlemede önemlidirler. Ek olarak, mekanistik veriler yeni gelişmekte olan kimyasalların muhtemel risk değerlendirmelerle ilgili bilgilendirmeye ilişkin gerekliliği de söz konusudur. Ayrıca mikroçipler de bu tip bilgi sağlamada önemli rol oynayabilecek bir potansiyele sahiptirler [67]. Mikroçip çalışmalarından MOA bilgisi sonucu çıkarmak için çok sayıda metod vardır. Zebra balığı beyininde nörofarmasötiklerin etkilerinin araştırıldığı son çalışmalara göre, bu balık türünde görülen etkiler memelilerdekine benzer bir örüntü göstermektedir [68,69]. Bundandır ki türler arası ekstrapolasyonlarla, balıklardan yararlanıp, bu ilaçların uzun dönemli etkileri hakkında tahminler yapabilmek mümkün olmuştur. Mikroçip çalışmalarından MOA araştırmaları için gelen diğer teknikler, Anbumani ve Kakkar tarafından derlenmiştir [70]. Ayrıca gen ürünlerinin bilinen biyolojik metabolik yollara entegrasyonu, maruz kalmayla ilişkili metabolik, işaret verme (sinyalizasyon) yada farklı yanıtları ortaya çıkarabilir. Son olarak, gen ekspresyonunun fizyolojik / fenotipik etkileri ile bağlantılı fenotipik tespitleme (referans noktası) nedensel sonuç çıkarma için destek sağlamada hayati derecede önemlidir. Buradaki bir amaç, bir sonuç tahmin etmede ve biyobelirteç olarak kullanılabilmesi, genlerin kümelenmelerinin tanımlanması olarak düşünülebilir.

GO, moleküler fonksiyonları, biyolojik süreçleri ve her genin hücresel bileşenlerini tanımlamada sistematik bir metottur [71]. GO Konsorsiyumu'ndan [<http://www.geneontology.org>] yararlanarak, araştırmacı "Hangi hücresel bileşenler yada biyolojik sistemler stres kaynağından etkileniyor?" sorusuna bir yanıt belirleyebilmek için bu sınıflandırma sistemini kullanabilir [72]. GO terimlerinin görevi farklı eksprese olmuş genlerin listesini ile daha büyük etkilere ve biyolojik süreçlere ilişkin bir fikir verip, bunların etki mekanizmasını açıklamada yer alması olarak ifade edilebilir. Östrojenik bileşiklerle ilgili çalışmalarda zebra balığında [*Danio rerio*] farklı organlarda östrojenlerden ve farmasötiklerden kaynaklanan etkileri tahmin etmede GO yaklaşımından yararlanılmıştır [73-76]. Bir diğer 17-β östradiol ile ilgili mikroçip çalışmasında; koca galyan balığındaki [*Pimephales promela*] östradiol, toksisitenin muhtemel hedeflerini belirlemede GO koşulları kullanılmıştır. Bunlar kan pıhtılaşması, metabolizma, protein biosentezi, elektron transportu ve hücre büyümesinin düzenlenmesini içermektedir [77].

Bir kimyasala maruz kalmanın biyolojik sonuçlarının araştırıldığı bir diğer metod ise Kyoto Gen ve Genomların Ansiklopedisi [78] ve Gen Harita Belirlenimi [Annotasyonu] ve Metabolik Yol Profilleycisi [79] gibi veri tabanlarından yararlanılan

Metabolik Yol Haritalamadır. Bu araçlar, araştırmacıya metabolik yollarda maruz kalma çalışmalarında farklı eksprese olmuş genlerin tanımlanarak haritalanması hususunda olanak sağlar. Bir genel bakış, potansiyel hedefleri ortaya çıkarabilir ve metabolik yolun fonksiyonu üzerinde etkilerin tahmin edilmesine imkan sağlar. Villeneuve ve ark. (2007), metabolik yol analizlerini östrojenik bileşiklerin etkilerini anlamak için kullanmışlardır [80]. Villeneuve ve ark., koca galyan balığı üzerinde androjen fadrozolun etkilerinin ekotoksikogenomik çalışması bazlı bir hipotez öne sürerek, teleost beyin –hipofiz –gonadal aksinin bir grafiksel modelini kurmuşlardır. Onların modeli, beyin, hipofiz, karaciğer ve gonadlar üzerinde muhtemel risk değerlendirmeye yön vermede, moleküler yanıtla yan etki bağlantısı için gerekli bir araç sağlar. Son olarak, bazı araştırmacılar tarafından önerildiği üzere, moleküler olayların referans noktasının zıt fizyolojik sonuçları, mikroçip çalışmalarından gelen güvenilir MOA tahminleri için gereklidir [26-28,58,81-83]. Fenotipik referans noktası, moleküler olayları göstermeyle birlikte toksikolojik sonuçlar yada etken durumu ile bağlantı sağlar. Fenotipik bağlantıyı göstermek için, araştırmacılar geleneksel toksikolojik son noktaları mikroçip çalışmalarını da dahil etmişlerdir. Zebra balıklarında çevresel ilişkili konsantrasyon seviyelerinde etinilestradiolün (EE2) etkilerine ilişkin bir çalışma, EE2 nin hem erkeklerde hem de dişilerde gamet üretimini yan etki olarak etkilediğini ortaya çıkarmıştır. Çeşitli gen ailelerinin disregülasyonu (düzenleme bozukluğu) her iki cinsiyette gamet üretim bozukluğu için potansiyel bir mekanizma açıklamıştır [84]. Buna benzer şekilde çok sayıda türde endokrin bozucuların etkisi genomik düzeyde gösterilmiştir [85,86]. Bu sayede araştırmacılar, endokrin bozucu süreçlerde yer alan reseptörlerin detaylı moleküler karakterizasyonları ile olan gen ekspresyon çalışmalarından faydalanarak, bu gelişmenin bir fenotipik yanıt üretmede moleküler olayların rolünün anlaşılmasını sağlamışlardır.

4.5. Genler ile Populasyonlar Arasında Kurulan Köprü Olarak "Ekotoksikogenomik"

Çevresel risk değerlendirmede kullanılan standart ekotoksikite testlerinin cevaplayamadığı sorulara ekotoksikogenomik bir çözüm olabilir. Gen ekspresyonundaki değişimler, duyarlı son noktalar olup, çevresel etkenler için birer erken uyarı belirteçleri olabilir. Ekotoksikogenomik, düşük seviyede biyolojik organizasyonlara odaklanmayı yeğler. Buradaki amaç, hem mekanistik hem korelatif olarak gen ekspresyon yanıtları ve populasyon seviye yanıtları arasında bağlantıları keşfetmektir. Ancak LOEC [en düşük etki gözlenen konsantrasyon] ve NOEC [hiç etki gözlenmeyen konsantrasyon] değerlerinin indikatör olarak saptanmasında veri eksikliği sürmektedir [87-89]. Tutarlı bir çerçeve oluşturmak için sürecin her seviyesinde en az bir son nokta olmalıdır.

Ekotoksikite testlerinde sıklıkla kullanılan hedefler hayatta kalabilip, üreme yeteneğinde olan bireylerdir. Bu yetenekteki organizmaların sağladıkları erken uyarı sistemi ile kimyasal etkilerin düşük konsantrasyonlarda

ve üreme ile alakalı veya morfolojik etkileri görünür olmadan tespit edilebilir.

5. POTANSİYEL YARARLAR

Tartışmasız olarak, kimyasallara ilişkin insan yada ekolojik risk değerlendirmesi üzerinde genomik verinin en kayda değer etkisi, toksisite metabolik yollarını veya etki mekanizmalarını (MOA) iyi bir tanımlama olarak ifade edilebilir. Örneğin, dünya genelindeki düzenleyici kuruluşlar, hipotalamik – hipofiz- gonadal [HPG] bölgeler veya hipotalamik – hipofiz – tiroid (HPT) bölgeler arası metabolik yolu ayırtırmayı sağlayan endokrin bozucu kimyasalların potansiyel risklerine odaklanır [90-93]. Olanaksız değilse de, uzun – dönem deneyler ile potansiyel yan etkilerini de değerlendirerek endokrin bozucu kimyasalları (EBK) sınamak pek kolay değildir. Bu nedenle, bazı durumlarda görece iyi açıklanmış olan EBK’lerin potansiyeli bakımından kimyasalların öncelik verilen listesini oluşturma ile ilgili bir yayıma ihtiyaç vardır. Eğer *in vitro* veya *in vivo* sistemlerle kısa dönemli testler, bilinen etki mekanizmalarına (MOA) bağlı EBKlere genomik yanıtların profillerinin geliştirilmesi için kullanılabilirse, bu testlerin sonuçları öncelik verilen ama bilinmeyen etki mekanizmalı (MOA) kimyasallar için de daha fazla özen gösterilerek uzun soluklu çalışmalarda kullanılabilir.

Ayrıca, genomikler bir bileşimin beklenmeyen etki mekanizmalarına sahip olup olmamasına ilişkin olarak iç yüzünü kavramayı sağlayabilir. Örneğin; pestisit tescili gibi düzenleme şartlarında, *a priori* (olası) bilgi muhtemel toksik etki mekanizmalarıyla ilgilidir. Bununla birlikte, kimyasallar genellikle çok sayıda metabolik yol vasıtasıyla toksisiteye neden olur. Günümüzde, pestisit düzenlemeleri çok sayıda tür ve “kaçırılmaması gereken” beklenmedik toksisite metabolik yollarından emin olunan son noktalar ile olan çok sayıda farklı tipte teste gereksinir. Bunlar, zaman alan ancak sonunda değerli katkıları olan çok büyük çapta veri birikimi sağlayacaktır. Bununla beraber, genomik yanıt odaklı kısa dönemli sınamalar, belirlenmiş etki mekanizmaları ile “referans” toksikantlardan elde edilen bilgiler ile deney kimyasallarından gelen verilerin karşılaştırılması kullanılarak beklenmeyen toksisite metabolik yollarını tanımlamaya yardımcı olabilir [94,95]. Bu tip analizler ile elde edilen kazanımlar, deney tasarımlarını ve verilen kimyasal en uygun şekilde sınamasındaki son noktalarını özelleştirmede kullanılabilir. Böylece, daha iyi hedef etki mekanizmalarıyla genomik kullanımı, risk değerlendirmeyi etkileyen deneylere ilişkin kaynakların yatırımında odaklamaya yardımcı olabilir.

MOA’nın daha iyi tanımlanması ayrıca risk değerlendirmedeki belirsizlikleri indirmek için bilgiler de sağlayabilir. Örneğin, risk değerlendirme ile ilgili önemli kaynaklar, kimyasal karışımların toksisitesini tahminlemeyi içerir. Genomik profiller, benzer olan etkilere karşı benzer olmayan etki mekanizmaları ile ve dolaylı aditif etkiler için seçici “atık” kimyasalları ile bileşikler tanımlamada kullanılabilir. Kimyasalların etkilerinin türler boyunca

ekstrapolasyonu, genomik vasıtasıyla etki mekanizmalarını iyi anlamada bir diğer alan olarak faydalı kavramlar sağlayabilir [96]. Toksikogenomik teknikler, türler boyunca benzerlikleri ve ayrışmaları tanımlamada öncülük edebilir; dolayısıyla kimyasal tehlikelerin ekstrapolasyonunun onaylanmasına yardımcı olma, bir türden diğerine teknik olarak geçerlidir. Son olarak; MOA bilgisi, tanısal değerlendirmenin önemli kavrayışlarını sağlayabilir. Çoğu çevresel düzenlemede, organizmalar hem kimyasal hem de kimyasal olmayan çeşitli stres etkenine maruz kalır. Bu yüzden, istenilmeyen etki durumlarında meydana gelen etkilere neden olan stres etkenlerini tanımlamada zorlayıcı olabilir.

Bu durumun karşılaştırmalı basit örneği, bir düzenleyici perspektif olan atık su toksisitesini içerir. Bununla beraber, bir atık su toksik varsayıldığında, sebep olabilecek ajanların tanımlanması kimyasal karışımlarının kompleksliğinin varlığından dolayı son derece zor olabilir [karışık matriksteki kirlenici biyoetkinliğiyle ilgili belirsizlikler olduğu gibi]. Bu durum, biyolojik bazlı basit fraksiyon prosedürlerinin gelişimine öncülük ederek, basit toksisitelerden sorumlu spesifik kimyasalları belirlemeye yardımcı olur [97]. Bu yaklaşımlar, çeşitli türlere, son noktalara ve test matrislerine başarıyla adapte olur. Toksikogenomik veriler kullanarak, kirlenicilerin kompleks maruz kalan organizmalarda biyolojik olarak toksisite metabolik yollarını tanımlama, TTD sürecine iyi bir destek olabilir. Örneğin, günümüzde, toksisite verileri bulunabilir veya bir küçük karşılaştırmalı altkümü ile kaynak gereksizliğinden dolayı yeni kimyasallar üretilebilir [98]. REACH programı (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) önümüzdeki yıllarda, binlerce kimyasalın güvenilir değerlendirmelerine gereksinerek bu belirsizliklere hitap etme arayışında fayda sağlayacaktır [99,100]. Toksikogenomik teknikler; çok sınırlı örneklemelerden gelen çoklu potansiyel toksisiteyi yansıtan ilgili taranan verilerle bir arada değerlendirildiğinde güzel sonuçlar verebilir. Bu yaklaşım kaynakları en uygun şekilde kullanarak, hayvan kullanımını da sınırlar. Dolayısıyla kimyasallar için risk değerlendirmeleri, genomikteki geniş uygulamaları ile kısa dönemde akla uygun olarak beklenilebilen bir gelişime geçirmese de bu yaklaşım kavramsal olarak sağlamdır.

5.1. Ekotoksikogenomik Geleceği

Yeni ekotoksikogenomik metodlarının gücü ve toksikolojide devrim yapma potansiyelleri vardır. Protein antikoları ile toksikolojik olarak ilişkili ve çok sayıda küçük molekülün profil tayinlerinin gelişiminde gaz kromatografisi, sıvı kromatografi veya kütle spektrometre kullanılır [101]. Toksikoproteomik araştırma, tanımlamada, ölçmede ve protein ile diğer biyobelirteçlerin değerlendirmesinde şu an mevcut olanlardan daha tutarlı, duyarlı ve spesifik bir düzeye tartışmayı taşımayı öngörür. Metabonomik araştırmalar “metabolit parmak izleri” gibi spesifik kimyasallara, çevresel maruz kalmaya yada hastalığa neden olan stres etkenleri ile ilgili durumlarda önemli metabolik olayların

sekansında küçük endojen moleküllerinin seviyelerindeki değişimlerin tanımlanmasında yardımcı olacaktır. Bu aşamadan sonra göz önüne alınacak durumlar bireysel genotipler, yaşam biçimleri, yaş, maruz kalma geçmişi gibi çevresel maruz kalmaya toksikogenomik yanıtları değerlendirmeler biçiminde olacaktır [102,103]. Ekotoksikogenomik, çevresel gerçekçi doza genomik yanıtların global gözlemi vasıtasıyla toksikoloji ile ilgili çalışmalarında artan bir değer olarak yerini alacaktır. Çok sayıda ve çok sınıftaki ajanların etki mekanizmaları betimleyecek ve belli tür ve populasyon alt gruplarının etki mekanizmalarını yorumlayabilen eşsiz genetik özellikleri gösterebilecektir. Bir tür içindeki soylarla ilgili çalışmalar, o kimyasala duyarlı yada dirençli olmaları ile spesifik hastalıklarda bu kimyasalların neden olma durumlarını değerli kılan yolları göstereceklerdir [82]. Bu düşüncüyü hem ana korunmuş biyolojik süreçlere hem de farklı türlerdeki görünen toksikolojik yanıtlar ile genişletmek; genetik hassaslığın karşılaştırmalı kavranmasını ve muhtemel hastalık sonuçlarının kapsamlı ele alınmasını sağlayacaktır.

Sonuç olarak -omik teknolojilerinden yararlanılan bu tip uygulamalar, toksisite mekanizmasını kapsamlı olarak anlamamızı sağlayarak *in vivo* ve/veya *in vitro* deney sistemleri ile entegre olmuş toksikogenomik veri tabanları olarak hastalık etiolojisinin geniş biçimde tamamlanmasını geliştirecektir. Doz, zaman, hedef doku ve türler arasında fenotipik yalınlık gibi içeriklerden toplanan geni protein, metabolit değişim verileri gen – çevre etkileşimlerinde genetik ve moleküler bazıları değerlendirme gerektiren karşılaştırmalı bilgileri sağlayacaktır. Böylece toksikoloji, biyolojik türler, kimyasal sınıflar ve hastalık sonuçları arasında bilimsel keşfi kolaylaştıran bir bilgi bilimi olarak ortaya çıkacaktır. Biyoinformatik metotlarının ve veri toplama araçlarının gelişimi 21. yüzyılda çevresel etkilere maruz kalma ile ilgili hastalıkların yan etkilerinden korunma yada azaltılmasında ekotoksikogenomik, multidisipliner kimliği ile hem erken uyarı değerlendirilmesini hem de kirlenmeye maruz kalmanın ekosistemde oluşturduğu risklerin moleküler düzeyde etki mekanizmalarının açıklanmasını sağlayan bir bilim dalı olarak yerini alacaktır.

Teşekkür

Bu çalışmanın değerlendirilmesinde yerinde tespitleri ve yönlendirici soruları ile katkı sağlayan değerli hakemlere teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

[1] Snape JR, Maund SJ, Pickford DB, Hutchinson TH. Ecotoxicogenomics: the challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquatic toxicology*. 2004;67(2):143-54.

[2] Nuwaysir EF, Bittner M, Trent J, Barrett JC, Afshari CA. Microarrays and toxicology: the advent of toxicogenomics. *Molecular Carcinogenesis*: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center. 1999;24(3):153-9.

[3] Fielden MR, Zacharewski TR. Challenges and limitations of gene expression profiling in mechanistic and predictive toxicology. *Toxicological sciences*. 2001;60(1):6-10.

[4] Thomas RS, Rank DR, Penn SG, Zastrow GM, Hayes KR, Pande K, vd. Identification of toxicologically predictive gene sets using cDNA microarrays. *Molecular Pharmacology*. 2001;60(6):1189-94.

[5] Hamadeh HK, Bushel PR, Jayadev S, Martin K, DiSorbo O, Sieber S, vd. Gene expression analysis reveals chemical-specific profiles. *Toxicological Sciences*. 2002;67(2):219-31.

[6] Tennant RW. The National Center for Toxicogenomics: using new technologies to inform mechanistic toxicology. *Environmental health perspectives*. 2002;110(1):A8-10.

[7] Ulrich R, Friend SH. Toxicogenomics and drug discovery: will new technologies help us produce better drugs? *Nature Reviews Drug Discovery*. 2002;1(1):84-8.

[8] Olden K. Genomics in environmental health research—opportunities and challenges. *Toxicology*. 2004;198(1-3):19-24.

[9] Lettieri T. Recent applications of DNA microarray technology to toxicology and ecotoxicology. *Environmental health perspectives*. 2006;114(1):4-9.

[10] Sanchez BC, Ralston-Hooper K, Sepúlveda MS. Review of recent proteomic applications in aquatic toxicology. *Environmental toxicology and chemistry*. 2011;30(2):274-82.

[11] Dorts J, Kestemont P, Marchand P-A, D'Hollander W, Thézenas M-L, Raes M, vd. Ecotoxicoproteomics in gills of the sentinel fish species, *Cottus gobio*, exposed to perfluorooctane sulfonate (PFOS). *Aquatic Toxicology*. 2011;103(1-2):1-8.

[12] Gomes T, Pereira CG, Cardoso C, Pinheiro JP, Cancio I, Bebianno MJ. Accumulation and toxicity of copper oxide nanoparticles in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*. 2012;118:72-9.

[13] Vidal-Dorsch DE, Bay SM, Moore S, Layton B, Mehinto AC, Vulpe CD, vd. Ecotoxicogenomics: Microarray interlaboratory comparability. *Chemosphere*. 2016;144:193-200.

[14] Abbas A, Valek L, Schneider I, Bollmann A, Knopp G, Seitz W, vd. Ecotoxicological impacts of surface water and wastewater from conventional and advanced treatment technologies on brood size, larval length, and cytochrome P450 (3A3) expression in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018;25(14):13868-80.

[15] Campos B, Fletcher D, Piña B, Tauler R, Barata C. Differential gene transcription across the life cycle in *Daphnia magna* using a new all genome custom-made microarray. *BMC genomics*. 2018;19(1):370.

[16] Campana O, Wlodkowic D. Ecotoxicology goes on a chip: embracing miniaturized bioanalysis in aquatic risk assessment. *Environmental science & technology*. 2018;52(3):932-46.

- [17] Prat O, Degli-Esposti D. New Challenges: Omics Technologies in Ecotoxicology. *Içinde: Ecotoxicology*. Elsevier; 2019. s. 181-208.
- [18] Lee B-Y, Choi B-S, Kim M-S, Park JC, Jeong C-B, Han J, vd. The genome of the freshwater water flea *Daphnia magna*: A potential use for freshwater molecular ecotoxicology. *Aquatic Toxicology*. 2019;210:69-84.
- [19] Fröhlich E. Role of omics techniques in the toxicity testing of nanoparticles. *Journal of nanobiotechnology*. 2017;15(1):84.
- [20] Simões T, Novais SC, Natal-da-Luz T, Devreese B, de Boer T, Roelofs D, vd. An integrative omics approach to unravel toxicity mechanisms of environmental chemicals: effects of a formulated herbicide. *Scientific reports*. 2018;8(1):1-12.
- [21] Martínez R, Navarro-Martín L, Luccarelli C, Ortiz-Villanueva E, Codina AE, Raldúa D, vd. Applying omic techniques to unravel distinct pathways of PFOS toxicity in zebrafish eleutheroembryos. 2019;
- [22] Krizkova S, Kepinska M, Emri G, Rodrigo MAM, Tmejova K, Nerudova D, vd. Microarray analysis of metallothioneins in human diseases—A review. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2016;117:464-73.
- [23] Searfoss GH, Jordan WH, Calligaro DO, Galbreath EJ, Schirtzinger LM, Berridge BR, vd. Adipsin, a biomarker of gastrointestinal toxicity mediated by a functional γ -secretase inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(46):46107-16.
- [24] Ampe F. The use of nanopore sequencing in ecotoxicology. Ghent university; 2019.
- [25] Bláha L, Hofman J. *Ecotoxicology of Environmental Pollutants*. *Içinde: Advanced Nano-Bio Technologies for Water and Soil Treatment*. Springer; 2020. s. 549-72.
- [26] Poynton HC. Insights from ‘Omics on the Exposure and Effects of Engineered Nanomaterials on Aquatic Organisms. *Içinde: Ecotoxicology of Nanoparticles in Aquatic Systems*. CRC Press; 2019. s. 189-207.
- [27] Caballero-Gallardo K, Olivero-Verbel J, L Freeman J. Toxicogenomics to evaluate endocrine disrupting effects of environmental chemicals using the zebrafish model. *Current genomics*. 2016;17(6): s515-27.
- [28] Messerlian C, Martinez RM, Hauser R, Baccarelli AA. “Omics” and endocrine-disrupting chemicals—new paths forward. *Nature Reviews Endocrinology*. 2017;13(12):740.
- [29] Oliveira E, Barata C, Piña B. Endocrine disruption in the omics era: new views, new hazards, new approaches. *The Open Biotechnology Journal*. 2016;10(1): s20-35.
- [30] Kim B-M, Kim J, Choi I-Y, Raisuddin S, Au DW, Leung KM, vd. Omics of the marine medaka (*Oryzias melastigma*) and its relevance to marine environmental research. *Marine environmental research*. 2016;113:141-52.
- [31] Lv X, Xiao S, Zhang G, Jiang P, Tang F. Occurrence and removal of phenolic endocrine disrupting chemicals in the water treatment processes. *Scientific reports*. 2016;6(1):1-10.
- [32] Mennigen JA, Thompson LM, Bell M, Santos MT, Gore AC. Transgenerational effects of polychlorinated biphenyls: 1. Development and physiology across 3 generations of rats. *Environmental Health*. 2018;17(1):18.
- [33] Chen H, Zhao L, Yu QJ. Determination and reduced life expectancy model and molecular docking analyses of estrogenic potentials of 17 β -estradiol, bisphenol A and nonylphenol on expression of vitellogenin gene (*vtg1*) in zebrafish. *Chemosphere*. 2019;221:727-34.
- [34] Rao MS, Van Vleet TR, Ciurlionis R, Buck WR, Mittelstadt SW, Blomme EA, vd. Comparison of RNA-seq and microarray gene expression platforms for the toxicogenomic evaluation of liver from short-term rat toxicity studies. *Frontiers in genetics*. 2019;9:636.
- [35] Gismondi E. Identification of molt-inhibiting hormone and ecdysteroid receptor cDNA sequences in *Gammarus pulex*, and variations after endocrine disruptor exposures. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2018;158:9-17.
- [36] Salama RM, Abd Elwahab AH, Abd-Elgalil MM, Elmongy NF, Schaalán MF. LCZ696 (sacubitril/valsartan) protects against cyclophosphamide-induced testicular toxicity in rats: Role of neprilysin inhibition and lncRNA TUG1 in ameliorating apoptosis. *Toxicology*. 2020;152439.
- [37] Jiang W, Zhao H, Zhang L, Wu B, Zha Z. Maintenance of mitochondrial function by astaxanthin protects against bisphenol A-induced kidney toxicity in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020;121:109629.
- [38] Osorio D, Pinzón A, Martín-Jiménez C, Barreto GE, González J. Multiple pathways involved in palmitic acid-induced toxicity: A system biology approach. *Frontiers in neuroscience*. 2020;13:1410.
- [39] Sharma N, Saifi MA, Singh SB, Godugu C. In vivo studies: toxicity and biodistribution of nanocarriers in organisms. *Içinde: Nanotoxicity*. Elsevier; 2020. s. 41-70.
- [40] Yauk CL, Harrill AH, Ellinger-Ziegelbauer H, van der Laan JW, Moggs J, Froetschl R, vd. A cross-sector call to improve carcinogenicity risk assessment through use of genomic methodologies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2020;110:104526.
- [41] Lemos MF, Soares AM, Correia AC, Esteves AC. Proteins in ecotoxicology—how, why and why not? *Proteomics*. 2010;10(4):873-87.
- [42] Veldhoen N, Ikonomou MG, Helbing CC. Molecular profiling of marine fauna: integration of omics with environmental assessment of the world’s oceans. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2012;76:23-38.
- [43] Zhang Q, Li J, Middleton A, Bhattacharya S, Conolly RB. Bridging the data gap from in vitro toxicity testing to chemical safety assessment through computational modeling. *Frontiers in public health*. 2018;6:261.

- [44] Udofia UU, Edet UO, Antai SP. Potential Benefits of Applying “Omics” Technology in Cleaning up Incessant Crude Oil Spillages in the Niger Delta Region of Nigeria. *Advances in Research*. 2018;1-8.
- [45] Campos A, Tedesco S, Vasconcelos V, Cristobal S. Proteomic research in bivalves: towards the identification of molecular markers of aquatic pollution. *Journal of Proteomics*. 2012;75(14):4346-59.
- [46] Waters MD, Fostel JM. Toxicogenomics and systems toxicology: aims and prospects. *Nature Reviews Genetics*. 2004;5(12):936-48.
- [47] Hines A, Staff FJ, Widdows J, Compton RM, Falciani F, Viant MR. Discovery of metabolic signatures for predicting whole organism toxicology. *Toxicological Sciences*. 2010;115(2):369-78.
- [48] Nair PMG, Choi J. Identification, characterization and expression profiles of *Chironomus riparius* glutathione S-transferase (GST) genes in response to cadmium and silver nanoparticles exposure. *Aquatic toxicology*. 2011;101(3-4):550-60.
- [49] Dondero F, Banni M, Negri A, Boatti L, Dagnino A, Viarengo A. Interactions of a pesticide/heavy metal mixture in marine bivalves: a transcriptomic assessment. *BMC genomics*. 2011;12(1):195.
- [50] Choi JS, Kim R-O, Yoon S, Kim W-K. Developmental toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish (*Danio rerio*): a transcriptomic analysis. *PLoS One*. 2016;11(8).
- [51] Morgens DW, Wainberg M, Boyle EA, Ursu O, Araya CL, Tsui CK, vd. Genome-scale measurement of off-target activity using Cas9 toxicity in high-throughput screens. *Nature communications*. 2017;8(1):1-8.
- [52] Hook SE, Mondon J, Revill AT, Greenfield PA, Smith RA, Turner RD, vd. Transcriptomic, lipid, and histological profiles suggest changes in health in fish from a pesticide hot spot. *Marine environmental research*. 2018;140:299-321.
- [53] Davis AP, Grondin CJ, Johnson RJ, Sciaky D, McMorran R, Wieggers J, vd. The comparative toxicogenomics database: update 2019. *Nucleic acids research*. 2019;47(D1):D948-54.
- [54] Aguayo-Orozco A, Taboureau O, Brunak S. The use of systems biology in chemical risk assessment. *Current Opinion in Toxicology*. 2019;
- [55] Jager T, Vandenbrouck T, Baas J, De Coen WM, Kooijman SA. A biology-based approach for mixture toxicity of multiple endpoints over the life cycle. *Ecotoxicology*. 2010;19(2):351-61.
- [56] Kumar R, Weigel S, Meyer R, Niemeyer CM, Fuchs H, Hirtz M. Multi-color polymer pen lithography for oligonucleotide arrays. *Chemical Communications*. 2016;52(83):12310-3.
- [57] Lobenhofer EK, Cui X, Bennett L, Cable PL, Merrick BA, Churchill GA, vd. Exploration of low-dose estrogen effects: identification of No Observed Transcriptional Effect Level (NOTEL). *Toxicologic pathology*. 2004;32(4):482-92.
- [58] Fukushima T, Hara-Yamamura H, Nakashima K, Tan LC, Okabe S. Multiple-endpoints gene alteration-based (MEGA) assay: A toxicogenomics approach for water quality assessment of wastewater effluents. *Chemosphere*. 2017;188:312-9.
- [59] Poynton HC, Loguinov AV, Varshavsky JR, Chan S, Perkins EJ, Vulpe CD. Gene expression profiling in *Daphnia magna* part I: concentration-dependent profiles provide support for the no observed transcriptional effect level. *Environmental science & technology*. 2008;42(16):6250-6.
- [60] Crawford KA, Clark BW, Heiger-Bernays WJ, Karchner SI, Henn BGC, Griffith KN, vd. Altered lipid homeostasis in a PCB-resistant Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) population from New Bedford Harbor, MA, USA. *Aquatic toxicology*. 2019;210:30-43.
- [61] Riley AK, Chernick M, Brown DR, Hinton DE, Di Giulio RT. Hepatic responses of juvenile *Fundulus heteroclitus* from pollution-adapted and nonadapted populations exposed to Elizabeth River sediment extract. *Toxicologic pathology*. 2016;44(5):738-48.
- [62] Li H, Zhang J, You J. Diagnosis of complex mixture toxicity in sediments: Application of toxicity identification evaluation (TIE) and effect-directed analysis (EDA). *Environmental Pollution*. 2018;237:944-54.
- [63] Arzuaga X, Walker T, Yost E, Radke E, Hotchkiss A. Use of the Adverse Outcome Pathway (AOP) framework to evaluate species concordance and human relevance of Dibutyl Phthalate (DBP)-induced male reproductive toxicity. *Reproductive Toxicology*. 2019;
- [64] Liu W, Wu Y, Wang C, Li HC, Wang T, Liao CY, vd. Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size. *Nanotoxicology*. 2010;4(3):319-30.
- [65] Krasnov A, Koskinen H, Rexroad C, Afanasyev S, Mölsä H, Oikari A. Transcriptome responses to carbon tetrachloride and pyrene in the kidney and liver of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*. 2005;74(1):70-81.
- [66] Henry TB, Menn F-M, Fleming JT, Wilgus J, Compton RN, Sayler GS. Attributing effects of aqueous C60 nano-aggregates to tetrahydrofuran decomposition products in larval zebrafish by assessment of gene expression. *Environmental Health Perspectives*. 2007;115(7):1059-65.
- [67] Wagner M, Kienle C, Vermeirssen EL, Oehlmann J. Endocrine disruption and in vitro ecotoxicology: Recent advances and approaches. İçinde: *In vitro Environmental Toxicology-Concepts, Application and Assessment*. Springer; 2017. s. 1-58.
- [68] Roper C, Tanguay RL. Zebrafish as a model for developmental biology and toxicology. İçinde: *Handbook of Developmental Neurotoxicology*. Elsevier; 2018. s. 143-51.
- [69] Bertotto LB, Catron TR, Tal T. Exploring interactions between xenobiotics, microbiota, and neurotoxicity in zebrafish. *NeuroToxicology*. 2020;76:235-44.
- [70] Anbumani S, Kakkar P. Ecotoxicological effects of microplastics on biota: a review. *Environmental*

- Science and Pollution Research. 2018;25(15):14373-96.
- [71] Bada M, Stevens R, Goble C, Gil Y, Ashburner M, Blake JA, vd. A short study on the success of the Gene Ontology. *Journal of web semantics*. 2004;1(2):235-40.
- [72] Gene Ontology Resource [Internet]. Gene Ontology Resource. [a.yer 13 Şubat 2020]. Erişim adresi: <http://geneontology.org/>
- [73] Ebrahimie E, Fruzangohar M, Moussavi Nik SH, Newman M. Gene ontology-based analysis of zebrafish omics data using the web tool comparative gene ontology. *Zebrafish*. 2017;14(5):492-4.
- [74] Ruzicka L, Howe DG, Ramachandran S, Toro S, Van Slyke CE, Bradford YM, vd. The Zebrafish Information Network: new support for non-coding genes, richer Gene Ontology annotations and the Alliance of Genome Resources. *Nucleic acids research*. 2019;47(D1):D867-73.
- [75] Newman M, Hin N, Pederson S, Lardelli M. Brain transcriptome analysis of a familial Alzheimer's disease-like mutation in the zebrafish presenilin 1 gene implies effects on energy production. *Molecular brain*. 2019;12(1):43.
- [76] Howe DG, Bradford YM, Eagle A, Fashena D, Frazer K, Kalita P, vd. The Zebrafish Model Organism Database: new support for human disease models, mutation details, gene expression phenotypes and searching. *Nucleic acids research*. 2017;45(D1):D758-68.
- [77] Larkin P, Villeneuve DL, Knoebl I, Miracle AL, Carter BJ, Liu L, vd. Development and validation of a 2,000-gene microarray for the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*. 2007;26(7):1497-506.
- [78] KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [Internet]. [a.yer 13 Şubat 2020]. Erişim adresi: <https://www.genome.jp/kegg/>
- [79] GenMAPP - Download Area [Internet]. [a.yer 17 Şubat 2020]. Erişim adresi: <http://www.genmapp.org/>
- [80] Villeneuve DL, Larkin P, Knoebl I, Miracle AL, Kahl MD, Jensen KM, vd. A graphical systems model to facilitate hypothesis-driven ecotoxicogenomics research on the teleost brain-pituitary-gonadal axis. *Environmental science & technology*. 2007;41(1):321-30.
- [81] Xu Z, Liu J, Wu X, Huang B, Pan X. Nonmonotonic responses to low doses of xenoestrogens: a review. *Environmental research*. 2017;155:199-207.
- [82] Liu Z, Huang R, Roberts R, Tong W. Toxicogenomics: A 2020 Vision. *Trends in pharmacological sciences*. 2019;40(2):92-103.
- [83] Vahle JL, Anderson U, Blomme EA, Hoflack J-C, Stiehl DP. Use of toxicogenomics in drug safety evaluation: Current status and an industry perspective. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2018;96:18-29.
- [84] Santos EM, Paull GC, Van Look KJ, Workman VL, Holt WV, Van Aerle R, vd. Gonadal transcriptome responses and physiological consequences of exposure to oestrogen in breeding zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic toxicology*. 2007;83(2):134-42.
- [85] Wilkinson J. *Environmental Epigenetics: The Enviro-genomic Interface*. 2018;
- [86] Patisaul HB, Fenton SE, Aylor D. Animal models of endocrine disruption. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2018;32(3):283-97.
- [87] Fedorenkova A, Vonk JA, Lenders HR, Ouborg NJ, Breure AM, Hendriks AJ. Ecotoxicogenomics: Bridging the gap between genes and populations. *Environmental science & technology*. 2010;44(11):4328-33.
- [88] Amiard-Triquet C. How to improve toxicity assessment? From single-species tests to mesocosms and field studies. İçinde: *Aquatic Ecotoxicology*. Elsevier; 2015. s. 127-51.
- [89] Wang Y, Na G, Zong H, Ma X, Yang X, Mu J, vd. Applying adverse outcome pathways and species sensitivity-weighted distribution to predicted-no-effect concentration derivation and quantitative ecological risk assessment for bisphenol A and 4-nonylphenol in aquatic environments: A case study on Tianjin City, China. *Environmental toxicology and chemistry*. 2018;37(2):551-62.
- [90] Scognamiglio V, Antonacci A, Patrolecco L, Lambrea MD, Litescu SC, Ghuge SA, vd. Analytical tools monitoring endocrine disrupting chemicals. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016;80:555-67.
- [91] McMullen PD, Pendse S, Adeleye Y, Carmichael PL, Andersen ME, Clewell RA. Using Transcriptomics to Evaluate Thresholds in Genotoxicity Dose-Response. İçinde: *Toxicogenomics in Predictive Carcinogenicity*. Royal Society of Chemistry; 2016. s. 185-208.
- [92] Haggard D. *Classifying Chemical Bioactivity by Coupling High-throughput Phenotypic Anchoring and Transcriptome Profiling in Zebrafish*. 2016;
- [93] Mahaye N, Thwala M, Cowan DA, Musee N. Genotoxicity of metal based engineered nanoparticles in aquatic organisms: A review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2017;773:134-60.
- [94] Kuhn RM, Karolchik D, Zweig AS, Wang T, Smith KE, Rosenbloom KR, vd. The UCSC genome browser database: update 2009. *Nucleic acids research*. 2009;37(suppl_1):D755-61.
- [95] Grondin CJ, Davis AP, Wieggers TC, Wieggers JA, Mattingly CJ. Accessing an expanded exposure science module at the Comparative Toxicogenomics Database. *Environmental health perspectives*. 2018;126(1):014501.
- [96] Saito F. *Mechanism-Based Evaluation System for Hepato-and Nephrotoxicity or Carcinogenicity Using Omics Technology*. İçinde: *Alternatives to Animal Testing*. Springer; 2019. s. 91-104.
- [97] Baker TK, Engle SK, Halstead BW, Paisley BM, Searfoss GH, Willy JA. *Discover Toxicology: An Early Safety Assessment Approach*. İçinde:

- Translating Molecules into Medicines. Springer; 2017. s. 119-62.
- [98] Wu J-Q, Zhang S-S, Gao H, Qi Z, Zhou C-J, Ji W-W, vd. Experimental and theoretical studies on rhodium-catalyzed coupling of benzamides with 2, 2-difluorovinyl tosylate: diverse synthesis of fluorinated heterocycles. *Journal of the American Chemical Society*. 2017;139(9):3537-45.
- [99] Taboureau O, Audouze K, Brunak S. 3 REACH and Environmental. *Computational Methods for Reproductive and Developmental Toxicology*. 2015;23.
- [100] Broeckaert F, Rossi LH. Regulatory needs for the assessment of respiratory sensitisation under REACH and CLP. *Toxicology Letters*. 2017; 280:S60.
- [101] Maggi L, Zalacain A, Mazzoleni V, Alonso GL, Salinas MR. Comparison of stir bar sorptive extraction and solid-phase microextraction to determine halophenols and haloanisoles by gas chromatography–ion trap tandem mass spectrometry. *Talanta*. 2008;75(3):753-9.
- [102] Shamim N, Gupta A, Paul V, Vida E. Nutritional genomics: A review. *The Pharma Innovation*. 2017;6(4, Part A):17: 167-191.
- [103] Gao Y, Chen J. Informatics for Nutritional Genetics and Genomics. İçinde: *Translational Informatics in Smart Healthcare*. Springer; 2017. 143-66.