T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KADMİYUM VE ARSENİĞİN ERGİN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*, Hamilton 1822) ISI ŞOK PROTEİN GENLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

KEZBAN ÖZDEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: DOÇ. DR. FULYA DİLEK GÖKALP

EDİRNE-2016

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Mustafa ÖZCAN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

Prof. Dr. Yılmaz ÇAMLITEPE

Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Fulya Dilek GÖKALP

Tez Danışmanı

Bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoloji Anabilim Dalında bir Yüksek lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	İmza
Doç. Dr. Fulya Dilek GÖKALP	
Doç. Dr. Utku GÜNER	
Yrd. Doç. Dr. Pınar GÖÇ RASGELE	

Tarih: 30/06/2016

Tarih: 16/06/2016

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI LİSANSÜSTÜ PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

16/06/2016

Kezban ÖZDEMİR

Yüksek Lisans Tezi

Kadmiyum ve Arseniğin Ergin Zebra Balığı (*Danio rerio*, Hamilton 1822) Isı Şok Protein Genleri Üzerindeki Etkisi

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Günümüzde kentleşme, endüstriyel gelişim ve modern tarımın giderek artması, doğal ortamda bulunan ağır metal miktarının ciddi derecede artmasına sebep olmaktadır. Artan ağır metal konsantrasyonlarının canlılarda oluşturduğu toksik etkiler son yıllarda toksikoloji çalışmalarının temel konularını oluşturmaktadır.

Bu çalışmada arsenik (As) ve kadmiyum (Cd) elementlerinin içme sularında ve sulama sularında bulunma limitlerine göre As için 10 ve 100 µg/L ; Cd için 5 ve 50 µg/L konsantrasyonda 48 saat süreyle Zebra balığına ayrı ayrı ve karışımları (As+Cd, 5+10 µg/L ve 50+100 µg/L) halinde uygulanarak, kas dokusunda ICP-MS ile ağır metal birikimi, RAPD-PCR ile DNA hasarının belirlenmesi ve qRT-PCR ile ısı şok protein genleri ifadesindeki değişimlerin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Çalışma sonucunda kas dokusunda meydana gelen metal birikimleri değerlendirildiğinde yüksek doz As muamelesi ve düşük doz karışım uygulanması sonucunda kas dokusunda metal birikimlerinde kontrole göre anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir. DNA hasarı değerlendirildiğinde ise uygulanan metallere ve doza bağlı olarak yüzde genomik kalıp stabilitesinde (% GTS) azalma görülmüştür. Karışım halinde uygulanan muamele gruplarının, hücre stres proteinleri olan HSP 26, HSP 60 ve HSP 70 gen ifadelerini kontrole göre anlamlı arttırarak hücre korunma mekanizmasını aktive ettiği belirlenmiştir.

Sonuçlar su ortamı ve sucul organizmalarda kirliliğe yönelik izleme programları, ekolojik risk değerlendirme araştırmalarının yapılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Yıl : 2016
Sayfa Sayısı : 59
Anahtar Kelimeler : Arsenik, DNA hasarı, Isı Şok Proteini, Kadmiyum, Metal Birikimi, Zebra balığı

Master's Thesis

Effects of Cadmium and Arsenic on Heat Shock Protein Genes of Adult Zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton 1822)

Trakya University Institute of Natural Sciences

Department of Biology

ABSTRACT

The amount of heavy metal in environment critically increase due to urbanization, industrial development, and increasing modern agriculture. Toxic effects of heavy metals on organisms is one of the main topics of toxicological studies.

In this study, it is aimed to investigate the accumulation and genetic damage of arsenic and cadmium after exposed singly or in combination on zebra fish muscle tissue. Metal accumulation was analyzed with ICP-MS, DNA damage with RAPD-PCR method, and gene expressions of the heat shock proteins were evaluated by qRT-PCR method. Two different concentration series were used to test the genetic effect response after acute exposure for 48 hours; drinking water limits of arsenic 10 µg/L, and cadmium 5 µg/L; and allowed irrigation waters limits of arsenic 100 µg/L, and cadmium 50 µg/L and the combination of these metals with low doses (As+Cd; 10+5 µg/L) and high doses (As+Cd; 100+50 µg/L).

As a result of the study, when metal accumulation in muscle tissue were evaluated, high dose of arsenic and low dose of mixture exposure significantly increased the accumulation compare to control. When DNA damage was assessed, % genomic template stability was decreased depending on metals and concentrations. Exposure groups that As and Cd used in combination increased HSP 26, HSP 60, and HSP 70 gene expressions that of cell stress proteins, and activated cell protection mechanism. The results assert the necessity of making monitoring programs for pollution, and ecological risk assessment research on aquatic environment and organism.

Year : 2016
Number of Pages : 59
Keywords : Arsenic, Cadmium, DNA damage, Heat Shock Protein, Metal accumulation, Zebrafish

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve lisans eğitimim boyunca bana büyük emek ve katkısı bulunan, her konuda yardımlarını esirgemeyen, bilimsel katkı ve önerileri ile hep yanımda olan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Fulya Dilek GÖKALP' e teşekkürlerimi sunarım.

2015/194 no' lu proje ile araştırmamızı destekleyen TÜBAP' a ve çalışmaların bir kısmının yürütüldüğü TUTAGEM' e teşekkür ederim.

Manevi desteğini her zaman hissettiğim, her şeyin en iyisini hak eden, bu tezin başından en sonuna kadar benden yardımını eksik etmeyen, dostluğun ne demek olduğunu onunla anladığım değerli dostum Martin KANEV' e çok teşekkür ederim.

Her zaman çevrelerine ve bana pozitifliği aşılayan, içten gelen sevgi, merhamet, iyi dileklerini benden esirgemeyen hayatımda hep olmasını temenni ettiğim değerli hocalarım Sayın Arş. Gör. Dr. Mitat AYDOĞDU ve Yrd. Doç. Dr. Halide AYDOĞDU' ya sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve deneyimiyle her zaman yardımcı olmaya çalışan hocam Doç. Dr. Utku GÜNER' e; manevi desteği ve güler yüzünü eksik etmeyen sevgili hocalarım Yrd. Doç. Dr. Elvan BAKAR' a ve Arş. Gör. Gamze ALTINTAŞ KAZAR' a teşekkürlerimi sunarım.

Üniversite dönemimde tanıma fırsatı bulduğum ve paylaşımlarda bulunduğum, manevi destek veren arkadaşlarım Onur DİNÇ' e, Ayten DOĞAN' a ve Metin YILDIRIM' a teşekkür ederim.

Benim bugünlere gelmemi sağlayan, destek ve güveniyle her zaman yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER **Sayfa**

ÖZET……... I

ABSTRACT……. III

TEŞEKKÜR…… V

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ……..... VIII

ŞEKİLLER DİZİNİ……..... X

TABLOLAR DİZİNİ…….. XI

GİRİŞ VE AMAÇ……... 1

GENEL BİLGİLER…… 3

2.1. Metaller…….. 3

2.2. Canlılarda Metal Birikimi…….. 5

2.3. Sucul Canlılarda Metal Toksisitesi…… 6

2.4. Toksikolojik Çalışmalarda Balıkların Kullanılması…….. 7

2.5. Arsenik ……... 8

2.5.1. Arsenik Genotoksisitesi ..…… 10

2.6. Kadmiyum ...……... 11

2.6.1. Kullanım Alanları …… 12

2.6.2. Kadmiyum Toksisitesi …… 12

2.7. Zebra Balığının Genel Özellikleri…….. 13

2.7.1. Zebra Balığı ile Çalışmanın Avantajları……. 14

2.8. Isı Şok Protteinleri (HeatShock Protein-HSP)…….. 15

2.8.1. HSP 100 …….. 16

2.8.2. HSP 90 …… 16

2.8.3. HSP 70 …… 17

2.8.4. HSP 60 …… 17

2.8.5. Küçük Isı Şok Proteinleri (HSPs) ……... 17

2.9. Metallerin HSP'ye Etkisi ……... 18

2.10. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) …….. 19

2.10.1. RAPD Yönteminin Avantaj ve Sınırlılıkları ……. 21

2.11. Kantitatif Real-Time PCR …… 21

2.11.1. SYBR Green I ……... 25

2.12. ICP-MS Test Yöntemi ……. 25

MATERYAL VE METOD……..... 27
3.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Adaptasyonu …….. 27
3.2. Deneysel Çalışma ……... 27
3.3. Metal Birikiminin Belirlenmesi ……. 28
3.4. DNA Ekstraksiyonu ve RAPD Analizi …….. 28
3.5. RNA Analizi …….. 29
3.6. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) Çalışmaları ……... 30
3.7. İstatistiksel Analiz …….. 31
SONUÇLAR…… 32
4.1. Kas Dokularında Metal Birikimleri ……... 32
4.2. RAPD Sonuçları ……. 35
4.3. Gen Ekspresyon Sonuçları ……. 39
TARTIŞMA……..... 42
KAYNAKLAR …… 48
ÖZGEÇMİŞ…… 59

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Al	**:**	Alüminyum
As	**:**	Arsenik
ATP	**:**	Adenozintri fosfat
℃	**:**	Santigrad derece
Cd	**:**	Kadmiyum
cDNA	**:**	Tamamlayıcı deoksiribo nükleik asit
Cl	**:**	Klor
cm	**:**	Santimetre
Cr	**:**	Krom
DNA	**:**	Deoksiribo nükleik asit
dNTP	**:**	Deoksinükleotid
e^-	**:**	Elektron
EDTA	**:**	Etilendiamintetraasetik asit
GTS	**:**	Genomik kalıp stabilitesi
Hg	**:**	Civa
HSC	**:**	Isı Şok Esas Proteini
HSP	**:**	Isı Şok Proteini
IARC	**:**	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
ICP-MS	**:**	İndüktif olarak eşleştirilmiş plazma - kütle spektrometresi
KCl	**:**	Potasyum klorür
L	**:**	Litre
m^3	**:**	Metre küp
mg	**:**	Miligram
mm	**:**	Milimetre
mRNA	**:**	Mesajcı ribonükleik asit
µM	**:**	Mikromolar
µg	**:**	Mikrogram
µL	**:**	Mikrolitre
Ni	**:**	Nikel
ng	**:**	Nanogram
ort	**:**	Ortalama

p	**:**	Anlamlılık
ppb	**:**	Milyarda bir
ppm	**:**	Milyonda bir
PCR	**:**	Polimeraz zincir reaksiyonu
qRT-PCR	**:**	Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RAPD	**:**	Rastgele çoğaltılmış polimorfik deoksiribonükleik asit
RNA	**:**	Ribonükleik asit
SH	**:**	Standart hata
SPSS	**:**	Sosyal bilimler için istatistik paket programı
TAE	**:**	Tris, asetat ve etilendiamintetraasetik asit
UV	**:**	Ultra viyole

ŞEKİLLER DİZİNİ **Sayfa**

Şekil 2.1. Doğada elementlerin taşınma yolları……. 4
Şekil 2.2. Arseniğin doğadaki döngüsü……. 9
Şekil 2.3. Zebra balıklarının genel morfolojisi…….. 14
Şekil 2.4. RAPD Reaksiyonunun şematik gösterimi……. 20
Şekil 2.5. PCR basamakları……..... 22
Şekil 2.6. TaqMan® çalışması…….. 24
Şekil 4.1. Balık kas dokusunda arsenik birikim düzeyleri……..... 33
Şekil 4.2. Balık kas dokusunda kadmiyum birikim düzeyleri……... 34
Şekil 4.3. Metal muameleleri sonucu primerlere ait RAPD profilleri ……. 36
Şekil 4.4. Balık kas dokusunda meydana gelen % GTS değişimleri……. 38
Şekil 4.5. HSP 26 gen ifadesinde meydana gelen değişimler……... 39
Şekil 4.6. HSP 70 gen ifadesinde meydana gelen değişimler……... 40
Şekil 4.7. HSP 83 gen ifadesinde meydana gelen değişimler……... 40
Şekil 4.8. HSP 60 gen ifadesinde meydana gelen değişimler……... 41

TABLOLAR DİZİNİ **Sayfa**

Tablo 2.1. Sucul organizmalarda biyobirikimi etkileyen faktörler……... 6

Tablo 3.1. RAPD Analizinde kullanılan primerler ve sekansları……...…... 29

Tablo 3.2. qRT-PCR'da kullanılan genler ve primer sekansları……... 30

Tablo 4.1. Zebra balığı kas dokusunda arsenik birikimleri……... 32

Tablo 4.2. Zebra balığı kas dokusunda kadmiyum birikimleri.…… 34

Tablo 4.3. Arsenik ve kadmiyum uygulamasına bağlı balık kas dokusunda metaller arası korelasyon……... 35

Tablo 4.4. RAPD profillerinde oluşan ve yok olan bantların moleküler büyüklükleri…… 37

Tablo 4.5. Ağır metal uygulaması sonucu oluşan ve yok olan bantların sayısı 37

Tablo 4.6. Balık kas dokusunda ağır metal uygulamasına bağlı % GTS' de meydana gelen değişimler…….. 38

BÖLÜM 1

GİRİŞ VE AMAÇ

Yeryüzünde bulunan tüm doğal sular çeşitli oranlarda ağır metal içermektedir. Ancak günümüzde kentleşme, endüstriyel gelişme ve modern tarımın giderek artması doğal ortamda bulunan ağır metal miktarının ciddi derecede artmasına sebep olmaktadır [1]. Akarsu, deniz, göl gibi çeşitli su kaynaklarının atık sular için alıcı ortam halinde kullanılması ile derişimleri devamlı yükselen ağır metaller sucul organizmalar tarafından direkt olarak bünyelerine alınmaktadır. Besin zinciri yoluyla da doğada yaşayan tüm canlılara kadar ulaşmaktadır. Besin ağı boyunca ağır metaller metabolik açıdan aktif doku ve organlarda birikmektedirler. Birikim moleküler ve hücresel düzeyde işlevsel sorunlara neden olmaktadır [2].

Endüstrileşme ve şehirleşmedeki artış antropojenik kirleticilerin miktar ve çeşitliliğinde artışa neden olmaktadır. Ortamda birden fazla kirletici (metalin) bulunmasına rağmen, hedef organizmalarda toksik cevap ile nasıl etkileşime geçtiği konusunda nispeten az veri bulunmaktadır. Otoritelerin akuatik ekosistemlerde ayrı ayrı ve toksik karışımları belli bir çerçevede değerlendirme çalışmaları yapmaya başlaması ile son yıllarda karışım toksisitesine ilgi giderek artmaktadır [3].

As ve Cd elementlerinin ayrı ayrı canlılar üzerindeki genotoksik etkilerinin değerlendirildiği çalışmalar olmasına rağmen beraber kullanımının genotoksik etkisinin

değerlendirildiği çalışma bulunmamaktadır. Bu elementlerin ayrı ayrı ve beraber etkileşimlerinin değerlendirilmesi insan sağlığı, su kalite standartlarının oluşturulması açısından önem taşımaktadır [4, 5]. Bu çalışmada, kadmiyum ve arsenik elementlerinin içme sularında ve sulama sularında bulunma limitlerine göre iki farklı konsantrasyonda, Zebra balığına ayrı ayrı ve karışım halinde uygulanarak, kas dokusunda ağır metal birikimi, DNA hasarının belirlenmesi, ısı şok protein genleri ifadesindeki değişimlerin tespit edilmesi ve ağır metal birikimi ile gen ifadesinin değişimi arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

Yirminci yüzyıl ile birlikte artan Dünya nüfusu sebebiyle hızlı sanayileşme ile modern tarıma geçilmesi çevre kirliliği sorunlarını ortaya çıkarmaya başlamıştır. Endüstriyel faaliyetler ile aktiviteler sonucunda oluşan atık sular yoğun ve yüksek konsantrasyonda ağır metal içerebilmektedir. Bu atık suların; akarsu, göl ve denizlere ulaşmasıyla metaller ekolojik dengeyi tehdit edici düzeye gelmiştir [6].

2.1. Metaller

Uygarlığın ve endüstrinin temelini oluşturan metaller bütün organizmalar için önemli bir yer tutar. Metaller toksik özellik içeren maddelerdir. Metalleri başka toksik etkiye sahip maddelerden ayıran yanları doğal halde bulunmalarıdır [7]. Metallerin canlı organizmasına giriş yolları; çevresel taşınım, besinler, içme suları ve insanlar tarafından veya antropojenik olarak su, hava, toprak, besinler yoluyla gerçekleşebilir. Kadmiyum (Cd), kurşun (Pb), alüminyum (Al), civa (Hg) ve mangan (Mn) gibi ağır metaller biyolojik sistemlerle etkileşerek toksik etki gösterebilmektedir [8].

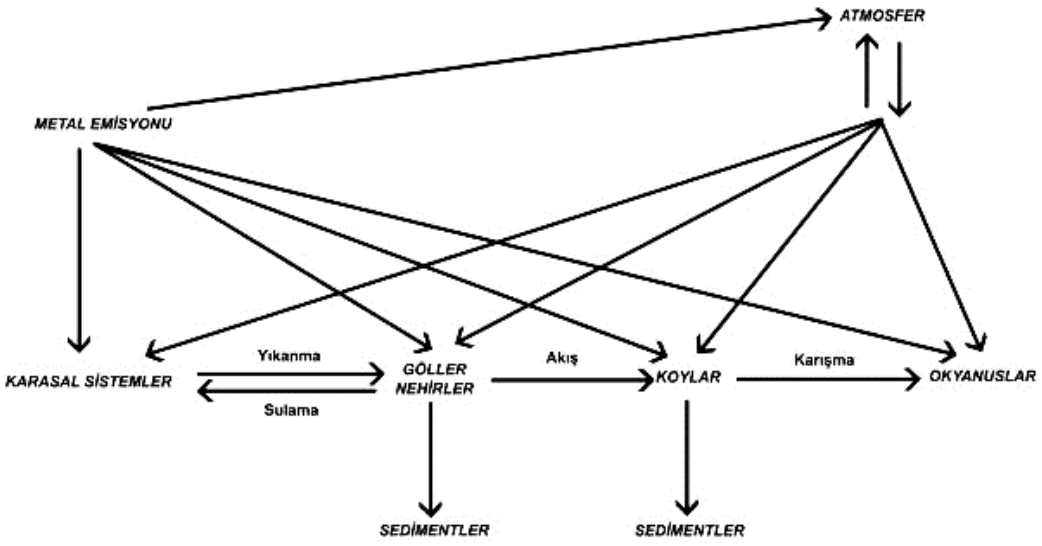
Metaller biyolojik olarak 3 grup altında incelenebilir:

1. Esas elementler (Hafif metaller): Sodyum (Na), kalsiyum (Ca), potasyum (K) gibi sıvı ortamlarında hareket halindeki katyonlar halinde taşınırlar.

2. Yan elementler (Geçiş elementleri): Demir (Fe), kobalt (Co), bakır (Cu), mangan (Mn) gibi düşük konsantrasyonlarda esansiyel olan, yüksek konsantrasyonlarda ise toksik etkiye sebep olan metalleri içerir.

3. İz elementler (Metalloitler): Civa (Hg), kurşun (Pb), kadmiyum (Cd), kalay (Sn), arsenik (As) gibi metabolik aktiviteler için oldukça çok kullanılan ya da hiç kullanılmayan ancak çok düşük konsantrasyonlarda hücrede toksik etki yaratan metallerdir. İz elementler ve yan elementler kaynaklarda ağır metal olarak adlandırılır. Maden ocakları, gübreler, çeşitli metal ve kağıt endüstrilerinin atık suları, pestisitler, fosil yakıtlar, ağır metallerin doğal ortama kolayca karışmasına neden olan kaynaklardır [9].

Yaşadığımız ekosistemin oldukça fazla bir bölümünü oluşturan su ortamı birçok atığı da içeren bir bölgedir. Ekosistemde kirliliğe sebep olan en büyük neden ağır metallerdir. Yeryüzündeki, doğal sular toksik etki yaratmayacak oranda ağır metal içermektedir. Ağır metal kaynakları; sanayi, tarım ve doğal ortamdır [10] (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Doğada elementlerin taşınma yolları

2.2. Canlılarda Metal Birikimi

Akarsu, göl ve deniz gibi su kaynakları atıkların fazla olması nedeniyle derişimleri devamlı artan ağır metaller, sucul organizmalar tarafından bünyelerine alınmaktadır. Bunun sonucu olarak ağır metaller besin zinciri sayesinde diğer tüm canlılara ulaşmakta ve aktif organ ve dokularda birikime sebep olmaktadır. Metallerin bazıları oldukça yüksek seviyede derişimlere ulaştıklarında organizmada depolanmaya ve yerleşmeye başlarlar [11]. Balıkların metabolik açıdan aktif olan organlarında öldürücü olmayan derişimlerde daha fazla miktarda ağır metal birikmesinin en düşük oranda kas dokusunda, en yüksek oranda karaciğerde depolandığını göstermektedir [12].

Doğal su ortamlarında metaller; serbest iyonlar, organik ya da inorganik olan bileşiklerle veya partikül halinde olan maddelerle etkileşim halinde bulanabilmektedirler. Doğal suların sedimentinde yapışmış halde veya çökmüş olarak bulunan metaller kimyasal ve fiziksel yollar ile iyonik olan formlara çevrilerek toksik etki yaratabilirler. Metaller farklı formlarda sucul canlıların bünyelerinde birikebilmektedirler [13]. Bu birikim aşağıda belirtilen yollarla gerçekleşir:

a)Suda bulunan organik ya da çözünmüş moleküllere bağlı iyonların suyla birlikte alınmalarıyla,

b)İçlerinde metal birikmiş besin maddelerinin bünye içine alınmasıyla,

c)Organizmalar ile toksik metal iyonlarının ürettiği bazı maddeler arasında oluşan çekim nedeni ile açığa çıkan absorbsiyon yoluyla,

d)Yüzeylerinde bazı ağır matelleri absorbe etmiş halde bulunan sestonlar yoluyla [14].

Canlı organizmalarda sürekli çevresel olarak yüksek dozda metallere maruziyet sonrası, vücutlarına aldıkları metalleri etkisiz hale getirmek veya vücut dışına atılımlarını kolaylaştırmak amacıyla çeşitli korunma mekanizmaları gelişmektedir. Metaller, metallotionin gibi metal bağlayan proteinlere bağlanarak hücresel vezikül ve granüllerde birikebilirler. Bunun gibi birikim mekanizmaları canlının ihtiyacı olduğunda metalin salımı için de kullanılmaktadır. Sucul organizmalar çeşitli fizyolojik olaylar ile kendi içlerindeki metal düzeylerini düzenleyebilirler. Bunu alımı azaltma atılımı arttırma şeklinde gerçekleştirirler. Örneğin midyeler istiridyeler ile benzer beslenme

şekillerine sahip olmalarına karşın midyelerin iç metal seviyelerini düzenleme yetenekleri farklıdır [15].

Biyolojik sistemlerde metal konsantrayonlarının değerlendirilmesi sıcaklık, redoks koşulları, iyonik kuvvet, organik kompleks, metal ve onu bağlayan moleküllerin karşılıklı konsantrasyonları, pH, genel fizyolojik durum, hayat döngüsü ve geçmişi gibi bazı faktörler ışığında değerlendirilmelidir [16] (Tablo 2.1).

Metallerin veya metal adüktlerinin nükleik asitlere bağlanarak hücresel DNA ile reaksiyona girmesi sonucu çeşitli mutasyonlara, DNA ipliklerinde kesilmelere, baz modifikasyonları gibi çeşitli zararlı sonuçlara neden olduğu görülmüştür. Ayrıca metalik katyonların yüksek konsantrasyonlarda bulunmaları durumunda DNA replikasyonunu etkiledikleri bulunmuştur [17].

Tablo 2.1. Sucul organizmalarda biyobirikimi etkileyen faktörler

Biyotik Faktörler	Abiyotik Faktörler
Tür	Diyet içeriği (yağ, karbonhidrat)
Zarar görmüş olup olmaması	Mevsimler
Genetik köken	Su sıcaklığı
Gelişme düzeyi	Toplam biyokütle
Yumurtlama	Su miktarı oranı
Sağlık durumu	Besin eksikliği
Cinsiyet	Yanlış beslenme ve açlık

2.3. Sucul Canlılarda Metal Toksisitesi

Sucul canlılardaki ağır metal birikim miktarı; metalin özelliklerine, canlı ile maruziyet süresine, derişimine, canlının hangi gelişme evresinde olduğuna, canlının türüne ve ortamın kimyasal/fiziksel özelliklerine bağlı olarak farklılık göstermektedir [18].

Herbivor balıkların, karnivor olan balıklara oranla vücutlarında bulunan ağır metal oranı daha azdır. Canlıların yer aldığı besin ağında üst basamaklarda yer alan balıklar besinler yoluyla diğer canlılarda yer alan metalleri de bünyelerine aldıklarından dolayı aşırı

miktarda metal biriktirirler ve bu durum kronik ya da akut yollu zehirlenmelere neden olur [19].

Balıkların solungaç dokularında ağır metaller epitelyum hücreleri üzerine hiperplazi (organ küçülmesi), hipertrofi (organ büyümesi) ve proliferasyon (hücre sayısının artışı) ile etki göstermektedir [20].

Sucul organizmalardaki ağır metal kirliliği ile ilgili toksikolojik çalışmalarda metallerin alımı, birikimi ve toksisitesi aynı zamanda metallerin birbirleri ile olan etkileşimlerine de bağlıdır. Selenyum ve civa arasında olduğu gibi bazı metaller antagonistik etkileşim gösterirler. Omurgalılarda selenyum tarafından civanın toksisitesi azaltılmaktadır [21].

Metallotioninler özellikle yüksek metal bağlama kapasitelerinden dolayı sucul organizmalar için önemli bir protein ailesini teşkil ederler. Bu nedenle sucul organizmaların dokularındaki metallotioninlerin değerlendirilmesi ortamdaki metal kirliliği ve organizmadaki biyobirikimi açısından bir fikir vermektedir [22].

Metal iyonları hücresel metabolizmayı bozarak nükleusa ulaşabilmektedir. Metal katyonları iyonik ve koordine bağlarla tersinir bir şekilde DNA'ya bağlanabilir fakat doğrudan hücrelerin kromatin materyallerinde lezyonlar oluşturmayabilirler. Bu nedenle nükleer kromatin materyali üzerinde metallerin sadece doğrudan etkileri değil aynı zamanda DNA hasarındaki dolaylı etkileri de göz ardı edilmemelidir [23].

2.4. Toksikolojik Çalışmalarda Balıkların Kullanılması

Zehir bilimi olan toksikoloji, biyolojik sistemler ile kimyasallar arasındaki etkileşimleri, zararlı sonuçları bakımından inceleyen veya kimyasalların zararsızlık limitlerini belirleyen bilim dalıdır. Belirli doz ile uygun yolla alınmayan her madde zehir etkisi ile sonuçlanabilir. Bu sonuçların etkisi, hücre ölümü biçiminde olabileceği gibi geri dönüşümlü de olabilir [16].

Akuatik toksikolojik çalışmalarda test çeşitlerinin seçimi genelde araştırmanın amacına bağlı olup, omurgalılar arasında balıklar tercih edilmektedir. Toksikolojik testlerde daha çok tercih edilen balık türleri; kaynak alabalığı, gökkuşağı alabalığı, japon balığı, sazan

balığı, golyan balığı, kanal yayın balığı, güneş balığı, turna balığı, dikence balığı, zebra balığı ve lepistes balığıdır [24, 25].

Balıklarla birlikte algler, yüksek yapılı bitkiler, protozoa, rotifer, sölenterata, krustasea, annelidler, su böcekleri ve yumuşakçalar da diğer tercih edilen gruplardır. Özellikle tatlı su balıkları ticari ve ekolojik önemlerinden dolayı ekotoksikoloji çalışmalarında tercih edilmektedirler. Balıklar sucul ekosistemlerde besin piramidinin en üst basamağını oluştururlar [26]. Balıklar sucul ekosistemlerde koruyucu elemanlar olarak görev yapmaktadırlar. Bu yüzden toksikolojik çalışmalarda kullanılacak balıkların biyolojik yapıları iyi bilinmelidir. Çalışmalarda kullanılacak balıklar ya uygun sahalardan toplanmalı ya da uygulamanın yapılacağı laboratuvarda veya yetiştirme çiftliklerinde yetiştirilmelidir. Balıklar uygun saklama ve yaşam sürdürme ortamlarında bulunmalıdır [27].

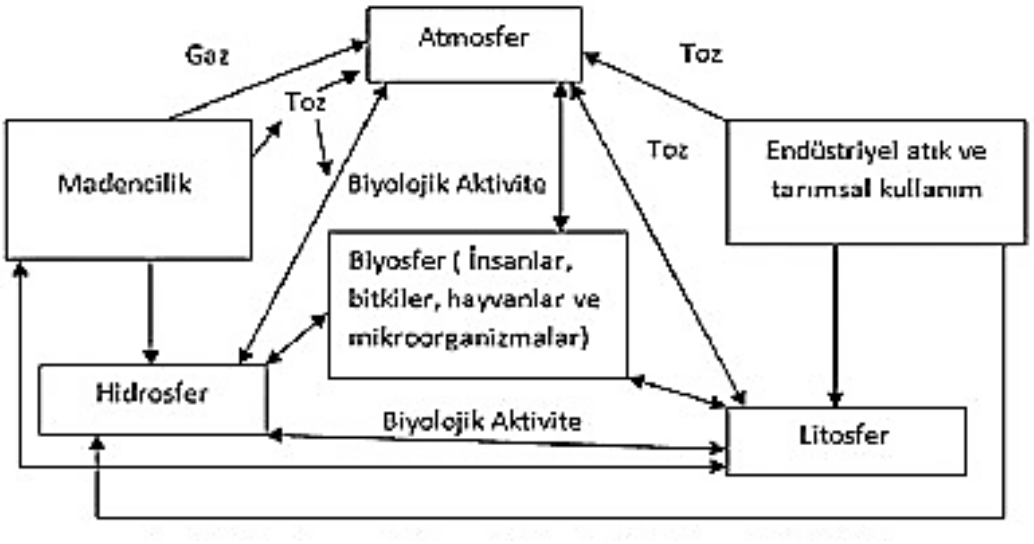
Genotoksik çalışmaların ana amaçlarından biri de canlı organizmalar üzerinde antropojenik kirlenmelerden biri olan metal kirliliğinin canlılar üzerindeki etkilerini araştırmaktır [28].

2.5. Arsenik

Azot ailesinden olan arsenik metalloid özelliğe sahip bir elementtir. Kimyada arsenik, As sembolü ile gösterilip ametal ve metal arasında bir özellik taşır. Sarı ve gri kristaller şeklinde iki ayrı biçimde bulunur [29]. As bileşikleri İ.Ö. 4.y.y.'da, element olarak ise 17.y.y.' da tanımlanabilmiştir. İlk kez As' i 1649 yılında Alman Eczacı Johann Schroeder oksidini taş kömürü ile ısıtarak elde etmiştir [30]. Kurşundan sonra toksikolojisi en çok çalışılan metaldir. Jeolojik faaliyetler, maden döküm işlemleri, fosil yakıt kullanımı, pestisit ve herbisitlerin yaygın kullanımı sonucu doğaya salınmaktadır. As daha çok kurşun benzeri metallerin eritilmesiyle de yan ürün olarak oluşabilmektedir [31].

As doğal ortamda oldukça yaygın halde bulunmaktadır. As^{+5} değerlikli bileşikleri özellikle diğer arsenik türlerine oranla toprakta daha sık bulunur [32]. As' e toprakta 0,1 ile 40 ppm miktarı arasında rastlanılması mümkündür. Doğal su kaynaklarında ve denizlerde miktarı değişen oranlarda As bulunabilmektedir. Özellikle yüksek ısıda As

miktarı da artış göstermektedir. As ayrıca topraktaki organik maddelere bağlı olarak bulunabilmekle ve organik maddelerin okside olmasıyla suya ve bitkilere geçebilmektedir (Şekil 2.2). As oranı deniz ürünlerinde tolerans sınırının üstünde olabilmektedir (2,6 ppm). Özellikle planktonlarda ve yengeçlerde bu oranın yüksek olduğu görülmüştür [33]. As' in akut toksisitesi kimyasal formuna bağlı olarak değişebilmektedir. As doğada en çok As^{+3} değerlikli meta-arsenat (As^{+3}) veya ($^{+5}$) değerlikli arsenat (As^{+5}) inorganik formlarında bulunur. Yüzey sularında arsenat (As^{+5}) formu daha fazla iken kuyu gibi oksijence fakir derin dip sularında meta-arsenat (As^{+3}) formu daha çok bulunmaktadır. Meta-arsenatın, arsenata oranla daha toksik olduğu bilinmektedir. As daha çok ppm'den ppd'ye değişen konsantrasyonlarda suda, canlı organizmalarda ve toprakta yer almaktadır [34, 35].



Şekil 2.2. Arseniğin doğadaki döngüsü

As bileşikleri sık olarak göze, cilde ve solunum yollarına tahriş edici etki gösterdiği için savaş gazı olarak kullanılmış olup bunun yanı sıra penisilin keşfedilene kadar frengi gibi hastalıklara sebep olan etkenlerle de savaşmak amacıyla ilaçlarla birlikte kullanılmıştır. İnsanlar gıdalar ve hava yoluyla As' e maruz kalabilmektedir. Çin, Hindistan ve Güney Amerika ülkelerinde kirli içme suyu ile de inorganik As' e maruz kalmaktadırlar [36]. As yetişkinler tarafından mide-barsak sistemi yolu ile alınmaktadır.

As' e maruziyetin büyük bir kısmı su ürünleri ile gerçekleşmekte olup, alınmasının ardından dalak, karaciğer, akciğer ve gastrointestinal sisteme yerleşmektedir. As bu kısımlardan kısa bir zaman zarfında yok olmasına karşın keratine afinitesi olması sebebiyle keratince zengin dokularda özellikle tırnak, deri ve saçta birikmektedir. As' in birkaç formu ise fosfatlara benzerliğinden dolayı ATP gibi yüksek enerjili fosfat bağları içeren bileşiklerin yakılmasında rol oynar [37].

As oranı düzeylerinin izin verilen sınır limitlerinin altında bulunması koşuluyla herhangi bir sağlık riski oluşturmasının oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) As' i içme suyunda 10 µg/L olarak sınırlamıştır. Buna rağmen Hindistan'ı da içeren gelişmekte olan ülkelerde içme suyundaki kabul edilebilir limiti 50 µg/L olarak belirlenmiştir. WHO, akuatik yaşam kriteri olarak total As' i akut maruziyet için 340, kronik maruziyet için 150 µg/L olarak belirlemiştir [38].

2.5.1. Arsenik genotoksisitesi

As muamelesi balıklarda gen ifadelerinin değişmesine yol açmıştır. Bunlar oksidasyon redüksiyon, translasyon, homeostatik proseslerdir. Zebra balığı karaciğer hücrelerinde oksidatif strese neden olmuş ve oksidatif stres hücresel homeostazisi içeren gen ifadesini değiştirmiştir. 45 ppm As 120/SvJ fare karaciğer hücrelerinde DNA metilasyonunu değiştirdiği, steroidle ilişkili genlerde gen ifadesini değiştirdiği, sitokinez, hücre siklusu regülasyonunu içeren genleri ve apoptozis genlerini değiştirdiği bildirilmiştir. Ayrıca reaktifi oksijen türevlerinin (ROS) oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmalar farklı konsantrasyonlarda As muamelesinin çeşitli moleküler yolaklar üzerinde etkili olduğu saptanmıştır. Deneysel ve klinik araştırmalar inorganik As çeşitli kanser tiplerine, diyabete ve diğer hastalıklara neden olabilmektedir [39].

Arseniğin genotoksik etkileri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır [40-43]. İnsan fibroblastları, lökositler, lenfositler ve hamster embriyo hücreleri ile yapılan *in vitro* çalışmalarda arseniğin kromozom aberasyonları ve kardeş kromatid değişimine neden olduğu bulunmuştur [44, 41]. İnsan, fare ve hamster hücreleri kullanılarak yapılan benzer çalışmalarda DNA hasarının arttığı veya DNA sentezinin inhibe edildiği

belirlenmiştir [45]. Ayrıca organik As' in genotoksik etkileri de doğrudan incelenmiş ve DNA'da tek zincir kırıklara, apürinik veya apirimidinik bölge oluşmasına, DNA temelli oksidasyon sonucu oksidatif stres oluşumuna, DNA-protein bağlantılarında hatalara ve kromozomal aberasyonlara neden olduğu bildirilmiştir [46-48].

2.6. Kadmiyum

Kadmiyum (Cd) esas element olmayıp insan, hayvan ve bitkiler üzerinde toksik etkiye sahiptir. Cd doğal ortamda kadmiyum sülfit ve sülfat, kadmiyum klorür, kadmiyum oksit şeklinde ve sık olarak Zn, Cu ve Pb madenleriyle beraber ince partiküller yapı halinde bulunabilir [49]. Zn' un elde edilmesinde kullanılan önemli bir metaldir ve bu süreçte havaya, yiyeceklere, suya önemli miktarlarda karışmamıştır . Fakat günümüzde Cd da çevreyi kirleten ağır metaller arasındadır [50].

Cd metali fosforlu gübre uygulamaları ile endüstriyel bazlı faaliyetler gibi insan aktiviteleri sonucunda veya ana materyal şeklinde toprakta kendine yer bulmaktadır [51]. İnsan aktiviteleri sonucu toprakta bulunan Cd yaklaşık % 2-5'i çiftlik gübresi ve atık çamur uygulamalarından,% 39-41'i atmosferik depolamadan,%54-58'i en büyük etken olan insanların kullandığı fosforlu gübrelerden kaynaklandığı görülmüştür. Üzerinde yaşadığımız yer kabuğu yaklaşık olarak 0.1 mg/kg, toprak yapısında 0.53 mg/kg Cd yer almaktadır. Toprağın yapısında 3 mg/kg'dan daha çok Cd insan hayatını tehlikeye sokabilecek toksik etkilere sebebiyet vermektedir [52]. Cd metalinin senelik doğal ortamlarda yayınım miktarı genelde 25,000 ile 30,000 ton arasında olup bu miktarın 4,000 –13,000 tonu insan faaliyeti sonucu ortaya çıkmaktadır[53].

Suda çözünme özelliği oldukça yüksek olan elementlerdendir. Suda çözünebildiğinden Cd^{+2} şeklinde deniz canlıları ve bitkiler tarafından biyolojik alınarak birikebilmektedir [54].

2.6.1. Kullanım alanları

Metal ve otomotiv endüstrisinde oldukça fazla kullanımı vardır. Cd ; demir, çelik, pirinç ve alüminyum kaplamasında deniz ve alkali ortam korozyonuna karşı mukavemet gösterdiğinden sıkça kullanılır [55].

En önemli kullanım alanı Hg-Cd, Ag-Cd, Ni-Cd pilleridir. Büyük Cd-Ni pilleri sık olarak gemi ve uçaklarda, normal kapasiteli olanları ise günlük yaşamda kullandığımız elektronik cihazlarda geniş bir tüketim alanına sahiptir [56].

Cd' un çok yoğun bir biçimde kullanıldığı diğer bir alan ise boya endüstrisidir. Bunların yanı sıra televizyon tüpleri, floresan lamba yapımında, plastik ve sentetik elyaf sanayinde, nükleer reaktör kontrol sisteminde ve çeşitli alaşımlarda kullanıma sahiptir. Özellikle pencere profilleride Cd kullanılarak sağlamlaştırılmaktadır [57].

Cd' la bir toza maruz kalma maden cevheri rafinerisinde, batarya imalatı yapan çalışanlarda, kaynak ve pigment üretiminde, aeresol üretilen yerlerde çalışanlarda Cd' un neden olduğu akciğer hastalıkları görülmektedir [56].

2.6.2. Kadmiyumun toksisitesi

İnsanda Cd' un karsinojen etki yaptığı ilk olarak 1976 yılında ortaya konulmuş bunu takiben 1993 yılında IARC (International Agency for Cancer Research) tarafından karsinojen tiplerinden Tip 1 sınıfına girdiği belirlenmiştir. Kadmiyum bileşikleri endüstriyel aktivite ve fosil yakıtlar ile çevreye yüksek miktarda salınmakta, akuatik organizmalarda birikebilmekte besin zinciri ile insanlar üzerinde zararlı etkilere yol açabilmektedir. Kısa süreli Cd' a maruz bırakılma sonucunda özellikle sucul canlılarda kalsiyum dengesinde bozulmalar, böbrek, bağırsak ve solungaç gibi dokularda histopatolojik değişiklikler gözlenebilmektedir. Kadmiyumla mesleklerinden dolayı sıklıkla karşılaşan insanlarda deri, akciğer, prostat, özafagus ve burun kanserlerine yol açar. Cd bileşiklerinin hemen hemen hepsi karsinojen olup hedef bölgelerin karsinojeniteye hassas olması sık olarak yaş, ırk, tür ve cinsiyetle ilişkili olmaktadır [58].

Cd' un kanser oluşturmasına neden olan birçok mekanizma ileri sürülmüştür. Reaktif oksijen türevleri meydana getirerek hücresel antioksidan sistemin bozulmasına neden olup DNA onarımı inhibisyonu ve DNA metilasyonun değişmesi, hücre adezyonunun bozulması, hücre sinyal iletiminin bozulması ve apoptozisle sonuçlanması ile hücre proliferasyonu oluşmasına neden olmaktadır [59].

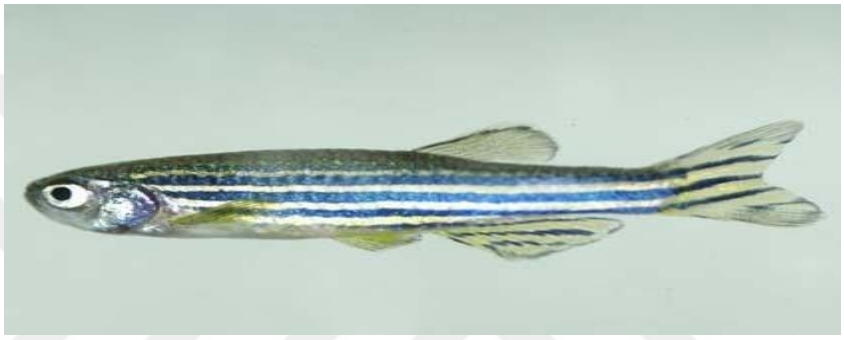
Cd özellikle balıkların bazı enzim yapı ve sistemlerini etkileyerek bağışıklık sistemi, transepitelyal taşınma, nöroiletimoksidazlar gibi temel biyokimyasal ve fizyolojik mekanizmalarında bozulmalara sebep olabilir. Kadmiyum özellikle bazı hücrelerdeki enzim havuzlarından Cu ile Zn' la yer değiştirip çinko ve bakır dengesini önemli derecede zarara uğratır. Cd seviyelerinin giderek artış göstermesi hücrelerde sitotoksik ve genotoksik etkilere sebep olmaktadır [60-62].

2.7. Zebra Balığının Genel Özellikleri

- Regnum: Animalia (Hayvanlar)
- Filum: Chordata (Kordalılar)
- Subfilum: Vertebrata (Omurgalılar)
- Superklasis: Pisces (Balıklar)
- Klasis: Osteichthyes (Kemikli Balıklar)
- Subklasis: Actinopterygii (Işınsal Yüzgeçliler)
- Superordo: Teleostei (Gerçek Kemikli Balıklar)
- Ordo: Cypriniformes (Sazanlar)
- Familya: Cyprinidae (Sazangiller)
- Cins: *Danio*
- Tür: *Danio rerio* (Hamilton, 1882)

Tropikal bir tatlı su balığı olan Zebra balığı dünyada doğal olarak Güney Asya, Kuzey Hindistan, Nepal, Bhutan, Pakistan gibi ülkelerin akarsularında yayılım gösterir. Zebra balığı Kemikli balıklardan (Teleostei) olup Actinopterygii sınıfında ve Cyprinidae familyasındandır [63].

Zebra balığının dış görünüşüne bakıldığında ise gövde kısımlarında 7 ile 9 arasında değişen mavi ve gümüş renginde çizgiler bulunmaktadır (Şekil 2.3). Bu balıklar su sıcaklığı açısından oldukça geniş bir aralık olan 18-30 °C arasında yaşamlarını sorun olmadan sürdürebilmektedir. Üreme dönemlerinde ise ideal olan sıcaklık değerleri 26-28 °C'dir. Zebra balığının bilimsel çalışmalarda oldukça fazla oranda tercih edilen omurgalı bir model olmasının nedenleri ise; şeffaf embriyolara sahip olması, kolay üreme kapasitesi bulunmasıdır [64].



Şekil 2.3. Zebra balıklarının genel morfoloji

Zebra balığı ovipar üreme yeteneğine sahiptir. Yaklaşık 24 saat içerisinde embriyogenez gerçekleşip ve 5 günde de organ oluşum süreci büyük oranda tamamlanmış olur. Zebra balığı başka model organizmalara göre yüksek oranda döl verimine sahip olup, dişileri haftada 200 adet yumurta, laboratuvar şartlarında ise bütün bir yıl yumurta üretebilir. Sahip olduğu yüksek oranda döl verme özelliği ile gelişim hızının yanı sıra geçirmiş olduğu mutasyonları içeren spermler korunup *in vitro* döllenmede kullanılabilir [65].

2.7.1. Zebra Balığı ile Çalışmanın Avantajları

Çevreden yayılan stres faktörlerine maruz kalan sucul omurgalılarla ilgili yapılan çalışmalar çok sayıdadır. Son yıllarda çalışmalarda sıkça *Danio rerio* (Zebra balığı) yumurta ve embriyoları kullanılmaktadır. Omurgalıların gelişimi gösteren iyi bir organizma olup, diğer modellerin en iyi özelliklerini barındırır. Zebra balığının embriyosu kurbağalarda olduğu gibi dış ortamda gelişmesinin yanında tüm safhaları

değiştirilebilir ve izlenebilir. Embriyonun gelişimi organizasyonu basit, şeffaf ve oldukça hızlıdır. Genetik analizler için uygundur [66, 67].

Son yıllarda Zebra balığına gen transfer çalışmalarının sayısı artmaktadır. Bu çalışmalarla Zebra balığının genetik haritası çıkarılmıştır. Zebra balığının genomunda birçok insan gelişim ve hastalık genlerinin benzeri bulunur. 1.7 milyar baz çiftine sahip olmakla beraber mutant olarak üretilen zebra balıkları, insan hastalıkları için model organizmadır [68, 69]. İnsan ve diğer omurgalıların hastalıklarının araştırılmasında son derece önem teşkil eden bir model organizma haline gelen Zebra balığında insanların sahip olduğu tümör baskılayıcı genin (sitokrom P450 grubu) bulunması, metobolizma, genom ve embriyonik gelişim yapılarının benzer olması bu balığın model organizma olarak kullanılmasının başlıca nedenleri arasındadır. Bunun yanı sıra ksenebiyotik metobolizma sisteminde yer alan faz I ve faz II enzim sistemi bu balıkta da bulunmaktadır [70]. Zebra balıklarının laboratuvar farelerine kıyasla hayat döngülerini kısa bir zamanda tamamlaması, farelerle yapılan çalışmaların bu balıkla da yapılabilme imkanı olması başka bir tercih sebebi olmuştur. Bir diğer tercih nedeni yapılan testin kısa ve sonuçlarının olmasıdır [71, 72].

2.8. Isı Şok Proteinleri (Heat Shock Protein-HSP)

Sucul organizmalar sürekli değişen çevre koşullarına karşı çeşitli adaptasyon mekanizmaları ve yaşam stratejileri geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri bu mekanizmaların sürdürülebilmesinde sahip oldukları proteinlerin önemli rolleri bulunmaktadır. Bu proteinler ısı şoku proteinleri (HSP) olarak bilinir ve hücreleri çeşitli stres etkenlerine karşı korumaya yardımcı olurlar [73, 74].

Termotolerans, bir canlının çevre sıcaklığında meydana gelen değişimlere uyum gösterebilme kabiliyetidir. Canlı organizmaların, normal fizyolojik faaliyetlerini yerine getirebildiği çevre sıcaklığı aralığı olarak bilinen termotelarans üst sınırının aşılması durumunda o canlıda sıcaklık stresi oluşmaya başlar. Canlılardaki fizyolojik koşulları etkileyen önemli bir çevresel faktör sıcaklıktır. Öyle ki sucul canlıların bulunduğu ortamın sıcaklığında görülen minimal düzeyde olan değişimler bile fizyolojik olayların işleyişini ve biyokimyasal olarak işleyen reaksiyonları etkiler. Hatta bu değişim bazı

zayıf yapıya sahip olan makromoleküler bağları parçalayabilme durumu gösterir [75, 76].

Canlı organizmaların biyokimyasal ve fizyolojik dengesinin etkilenmesine neden olan iç ile dış etkenlere "stres faktörleri" denir. Bu stres faktörelerine karşı hücre tarafından verilen tepki ise "hücre stres yanıtı" olarak bilinmektedir. Hücreler bundan dolayı herhangi bir stres oluşturucu durumla karşılaştığında hücre tarafından bazı stres proteinleri sentezlenmeye başlar. Stres yaratıcı durumlardan bazıları; ultraviyole, tuzluluk, yüksek ısı, oksijen azlığı/yokluğu, pestisitler, ağır metaller, ışık azlığı/yokluğu gibi etkenlerdir. Isı şok proteinlerine "stres proteinleri" de denmektedir. Organizmalar için stres proteinlerinin önemli biyobelirteçler olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur [77, 78].

2.8.1. HSP 100

Yüksek molekül ağırlığı olan ısı şok proteinleridir (100-110 kDa). Özellikle termotoleransın geliştirilmesinde aktif olarak yer aldığı bilinmektedir. Çoğunlukla fizyolojik şartlar içerinde HSP 100 proteinleri proteinlerin yeniden düzenlenmesinde görev alırlar [79, 80].

2.8.2. HSP 90

Hücredeki en çok fonksiyonlu stres proteini ve moleküler şaperon olan HSP 90'ın, sinyal yolaklarında, tümör yayılmasının önüne geçilmesinde ve proteinlerin katlanmasında rol oynadığı varsayılmaktadır. Ergin ve genç alabalıklar ile yapılan bir çalışmada, balıklara akut ısı uygulanmış ve HSP 70, HSC 70 ve HSP 90'ın intrasellüler lokalizasyonları incelenmiştir. HSP 70, HSC 70 ve HSP 90 öncelikli olarak kalp ve karaciğer hücrelerinde belirlenmiştir [81, 82]. HSP 90 hem ergin hem de genç balıkların karaciğer dokusunda önemli derecede artış göstermiştir. Ergin balıklarda sitoplazma ve nükleusta, genç balıklarda ise organel ve membranlarda daha fazla miktarda bulunmuştur [83]. Akut ısı stresi uygulanan balıklarda ısı şoku korumasında nükleus hedef organel olarak kabul edilmektedir. HSP 90'ların sonuç olarak tüm subsellüler

fonksiyonlarda önemli derecede multifonksiyonel görevlere sahip olduğu belirlenmiştir [84, 85].

2.8.3. HSP 70

İlk olarak HSP 70, 1962 yılında *Drosophila melanogaster* (Sirke sineği) tükrük bezi hücrelerinde tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalarda HSP 70'in kognat (HSC 70) ile hücrede ısı şoku uyarımlı (HSP 70) iki çeşit protein ailesi üyesi olduğu bilinmektedir [86].

Stresin yol açtığı zararlı etkenlerden hücreyi korur ve proteinlerin düzgün bir şekilde katlanmasında görev alır. Üzerinde en çok çalışma yapılmış, birçok balık çeşidinde tanımlanmış olup evrim süresi boyunca korunmuş olan stres uyarımlı önemli bir proteindir [87, 88].

2.8.4. HSP 60

HSP 60 özellikle aminoasit zincirlerinin işlevsel yapılarına oldukça düzgün bir biçimde katlanması ve belli bazı proteinlerin sitoplazmadan mitokondrial matrikse kadar taşınmasında rol oynar. Diğer başka önemli bir görevi ise hücrede apoptozisi (programlı hücre ölümü) engellemektir. Sıcaklık şoku sırasında hücrede HSP 60 proteinini kodlayan genlerin moleküler bir şaperon olarak görev yapmasının yanında aynı zamanda stres tepkisinde de rol oynamaktadır. Özellikle ökaryot hücrelerin kloroplast ve mitokondri organellerinde yer almaktadır [89, 90].

2.8.5. Küçük Isı Şoku Proteinleri (HSPs)

Bu proteinlerin moleküler ağırlıkları 15 ile 45 kDa arasında olup organizmalardaki dağılımları oldukça değişkenlik göstermektedir. Bu protein grupları, HSP 60 ve HSP 70' de olduğu gibi proteinlerin katlanmasında rol oynamazlar. Onların görevleri ise hücresel stres cevabı sırasında kısmi olarak katlanmış olan proteinler ile

etkileşime geçip bu proteinleri stabilize ederek onların yapışıp çökelmelerini engellemektir [91].

Küçük moleküler ağırlığa sahip stres proteinleri çeşitli türlere göre spesifik ve tanısal amaçlı kullanılır. Örneğin HSP 40'ın midye, salyangoz ve balık benzeri sucul organizma gruplarında bulunduğu tespit edilmiştir [92].

2.9. Metallerin HSP' ye Etkisi

Sudaki kimyasal ve fiziksel değişimlerin farklılık göstermesi (amonyak, çözünmüş oksijen, pH, kısmi basınç, sıcaklık vb.), tarımsal kimyasallar (fungisit, insektisit), ağır metaller (As, Cd, Co, Ni, Pb vb.) ile poliklorobifenil (PCB) ve klor ile fenol gibi kirletici ajanlar akuatik organizmlarda strese neden olmaktadır. Bu olumsuz koşullara tepki olarak sucul organizmalar çeşitli stres proteinleri üretir. Stres proteinleri ise kirleticilerin hücresel seviyede neden olduğu etkilerinin belirlenmesinde biyobelirteç olarak kullanılmaktadır [93].

Son zamanlarda stres proteinleri özellikle çevre kirliliği üzerine yapılan araştırmalarda sıklıkla kullanılmaya başlamıştır. Sucul organizmalarda (tek hücreliler, alg, rotifer, eklembacaklılar, balık vb.) yapılmış olan çalışmalarda stres proteinlerinin çok önemli biyobelirteçler olduğu ortaya konulmuş olup birçok araştırıcı bu konu üzerinde yoğun olarak çalışmaya başlamıştır [94].

Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)' nın karaciğer dokusu üzerine yapılan bir çalışmada HSP 70 (heat shock constitutive protein 70) ekspresyonunun balığa uygulanan metalin doz miktarına bağlı artış gösterildiği görülmüştür. Bir başka çalışmada ise kadmiyum, arsenit ve bakıra maruz bırakılan aynı balık türünün karaciğer dokusunda HSC 70 ekspresyonunda bir değişiklik göstermezken, HSP 70' i 3 ile 6 kat arasında arttırdığı bulunmuştur [93].

Metal kontaminasyonuna maruz bırakılan gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nın solungaçlarında HSP 70 birikimi olduğu bulunmuş ve ağır metal, BNF (β-naphthoflavone) , SDS (sodyum dodesil sülfat) ve ağaç endüstri atıkları gibi kirletici ajanların balık dokularında HSP 70 seviyesini ciddi derecede yükselttiği görülmüştür. Diğer bir benzer çalışmada ise SDS ile ağaç endüstri atıklarının subletal

konsantrasyonlarına 96 saat boyunca maruz kalan balıkların karaciğerinde total HSP 70 miktarının yükseldiği ortaya çıkmıştır [95].

Bazı ağır metallerin özellikle subletal dozlarının *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda denenmiş olduğu birçok organizmada HSPs' yi indüklediği görülmüştür. Bir başka çalışmada zebra balıklarının embriyolarında HSP 70 gen ekspresyonunun yükselmesinin yanı sıra balık üzerinde morfolojik anomalilere yol açtığı gözlenmiştir [96].

Farklı bakır konsantrasyonları ile (0, 25, 50, 100 ve 200 µM) muamele edilen gökkuşağı alabalığının karaciğer dokusunda, HSP 70 ekpresyonunun uygulanan doza bağlı olarak arttığı bulunmuştur [97]. Gökkuşağı alabalığı embriyolarında çinko ve kadmiyumun karaciğerde HSP 70 ve HSP 60 ifadesini artırdığı bildirilmiştir [98]. Aynı metallerin aynı balık türünde epitel hücrelerindeki HSP 70 ifadesini arttırmasına rağmen diğer stres proteinlerini etkilemediğini belirlenmiştir [99]. Ağır metallerin subletal dozlarının *in vivo*ve *in vitro* olarak çalışıldığı birçok organizmada HSPs oluşumunun arttığı saptanmıştır [94, 93]. Zebra balığı embriyolarının kullanıldığı bir çalışmada kadmiyumun HSP 70 gen ekspresyonunu arttırdığı ve bunun yanında balıklarda bazı morfolojik anormalliklere de neden olduğu bulunmuştur [100].

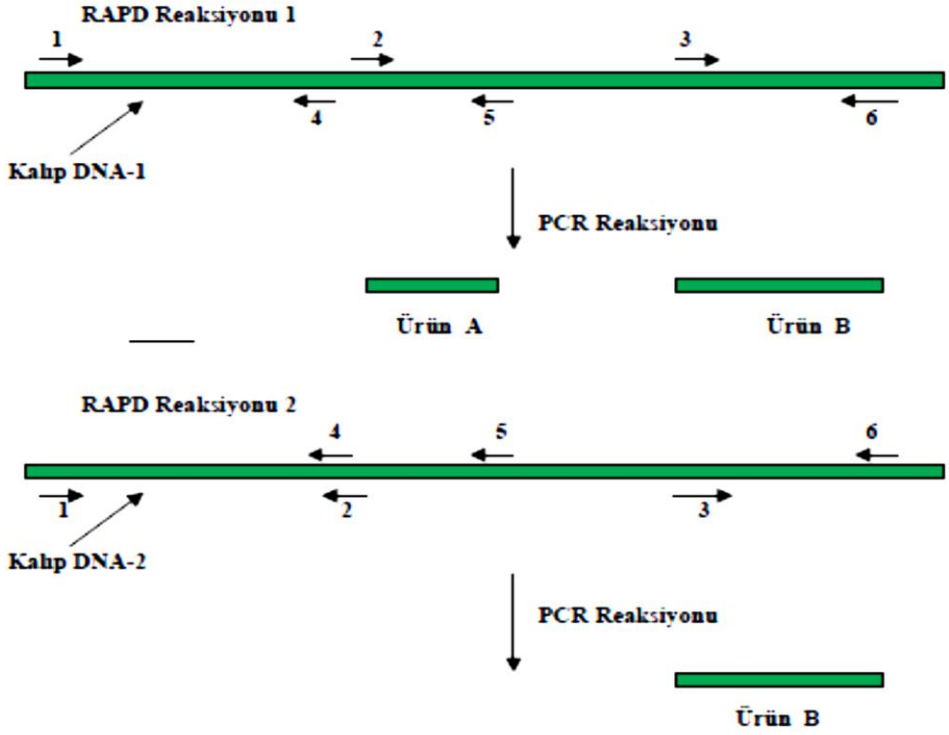
2.10. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)

Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA olarak tanımlanan ve genetik polimorfizmi belirleyen bir metodtur. RAPD nükleotidlerin dizilenmesi rastgele bir biçimde sıralanmış olan primerler ile yapılan bir PCR çeşididir [101] (Şekil 2.4).

RAPD genetik haritalama çalışmaları ile polimorfizmlerin belirlenmesinde genetik işaretçilerin elde edilmesinde kullanılır. Polimorfizmin belirlenmesini, nükleotid dizi bilgisine sahip olmadan yapar. RAPD tekniğinde nükleotid dizilimi rastgele seçilmiş ve on nükleotid uzunluğunda tek çeşit primer hazırlanarak yapılmaktadır. Primer hazırlanırken genelde GC/AT oranının %50 düzeyde tutulmasına dikkat edilir. Ayrıca sayıca çoğaltılacak olan DNA'da primerlerin kendilerine has bölgelere bağlanabilmeleri amacıyla sıcaklığın düşürülmesi gerekmektedir. Bu işlemin devamında ise elde edilmiş olan çoğaltma ürünü radyoaktif özellik taşımayan standart bir jel elektroforezi üzerinde yürütülürken çoğaltma ürünleri ise bantlar halinde gözlenir ve incelenir. Oluşan

bantların yokluğu veya varlığına göre sonuçlar değerlendirilmeye alınır [102]. RAPD ile yapılan çalışmalarda her bir farklı tür için oluşturulacak olan reaksiyon şartlarının optimize edilmesi oldukça önemlidir [103].

Bakterilerden, insana kadar çoğu organizmaların genomları 10 nükleotid içeren kısa rastgele primerler için yeterli oranda ters konumlu birbirine bağlanma yerleri içerirler. Bu özellik sayesinde primerlerin birbirlerine çok uzaklıktaki (birkaç bin baz çifti uzaklıkta) farklı olan yerlere, birbirlerine ters konumlu bağlanmaları ile bu iki bağlanma noktaları arasındaki kalan kısım çoğaltılır [104]. Her birey kendine özgü nükleotid dizisine sahip olduğundan bireylerden herhangi birinde primer bağlanma yerlerinin değişmesi veya kaybı çoğalan PCR ürünleri arasında da özgün bant/bantların kaybolmasına neden olur. PCR sonucu elde edilen ürünlerin elektroferez üzerinde analiz edilmesi sonucu jeldeki bantlarda görülen benzerlik veya farklılık oranları belirlenip polimorfizmler hakkında bilgi sahibi olunur [105, 106].



Şekil 2.4. RAPD reaksiyonunun şematik gösterimi

2.10.1. RAPD Yönteminin Avantaj ve Sınırlılıkları

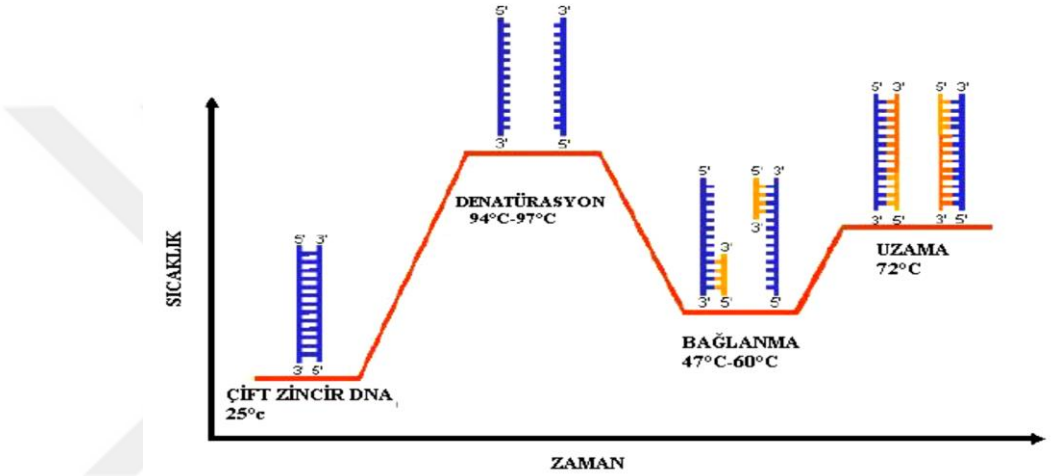
RAPD metodunun sağladığı en büyük avantaj araştırılan taksonun genleriyle alakalı herhangi bir ön bilgiye sahip olunmasının gerekmemesidir. Tüm organizmalarda, çoğaltmada aynı oligonükleotid primer seti kullanılabilmekte olup bu oligonükleotidler belli özgün bölgelere bağlanıp çoğaltma yapabilmektedir. Tek primerle, değişik türde bitkilerin genomik DNA'ları farklılık göstereceğinden bundan dolayı oluşacak olan RAPD belirteçleri farklı olacaktır. Oluşan bu farklılık organizmaların birbirleriyle karşılaştırılmasına olanak sağlamaktadır [107].

Ayrı olarak radyoktiviteye, DNA hibridizasyonuna veya Southern transferlere herhangi bir ihtiyaç duyulmamaktadır. Teorik olarak RAPD karakterlerinin sayısı sınırsızdır. Kullanılmış olan primer sayısının arttırılması durumunda elde edilen bant sayısında da artış olacaktır. Bundan dolayı birbirine oldukça yakın türleri ayırmakta izozimden daha hassastır. Bu sağlamış olduğu avantajların yanında RAPD metodunun sınırlı tarafları da bulunmaktadır. RAPD metodu kullanım bakımından oldukça kolay olmasına rağmen belirteçleri ise dominanttır ve heterozigotları teşhis etmek oldukça zordur. Bu çalışmaların sonucunda elde edilen verilerin tekrarlanabilmesi bu reaksiyona giren bütün değişkenlere bağlı olmasından dolayı düşük olabilmekte ve bu yüzden bir başka karşılaştırmalı analizlere geçilmeden önce RAPD yönteminin optimizasyonu oldukça önem taşımaktadır [108, 109].

2.11. Kantitatif Real-Time PCR

Yaygın bir biçimde kullanılan ve nicel kesin sonuçlar verebilen eş zamanlı PCR çeşitlerindendir. DNA'nın çoğaltılmasını ve ürünlerin sadece bir tüpte belirlenmesine olanak sağlayan bir yöntemdir. Oldukça gelişmiş bu teknoloji sayesinde gen kopya ürünlerinin düzeylerini sayısal verilere dönüştürmek oldukça kolay ve hızlı hale gelmiştir. Bununla beraber sürmekte olan PCR işlemini, bir yandan ekrandan izleyebilme imkanı tanıması, işlem yapabilme imkanı vermesi, döngü sıcaklığı ve sayısının değiştirilebilmesi daha fazla tercih edilmesine imkan sağlamaktadır [110, 111].

Geliştirilen Real-time metodlar tayin ile amplifikasyon işlemlerinin aynı reaksiyon türü içerisinde yer aldığı ve sık olarak aynı zamanda yapılan homojen yöntemlerdir. Bununla beraber amplifikasyon sırasında el ile yapılmasını gerektiren işlemlerin hepsi tamamen azaltılmış olup kontaminasyon riski oldukça aza indirgenmiştir. Diziye özgül problar veya DNA boyalarından elde edilen floresans değişimi PCR' ın tüm döngüsünde izlenebilmektedir [112] (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. PCR basamakları

Genellikle Real-time PCR' de kullanılmakta olan ilk olarak tercih edilen boya etidyum bromür olup, günümüzde SYBR Green I boyası da sıkça tercih edilmektedir. Hem SYBR Green I hem de etidyum bromür çift zincirli DNA' ya özgü boyalar olmakla beraber floresans bakımından aynı emisyon ile eksitasyon spektrumuna sahiptirler. SYBR GreenI küçük oluğa bağlanırken, etidyum bromür ise çift sarmalın arasına girer. PCR işlemi boyunca SYBR Green I, etidyum bromür boyasına göre tek zincirden daha iyi bir şekilde ayırt edilebilmektedir [113].

PCR işlemi sonrası elde edilen ürünlerin gerçek PCR ürünü olup olmadığını anlamak için erime eğrisi yöntemi kullanılır. Bu şekilde ürünün kontrolü sağlanmış olur. Bir amplifikasyon ürünü olan genin %50' sinin denatüre olduğu sıcaklığa Erime ısısı (Tm) denir. Gen dizisinde yer alan G-C baz çiftlerinin yüzde olarak oranına bağlı olarak denetürasyon sıcaklığı farklılık gösterebilir. PCR sonunda elde edilmiş olan

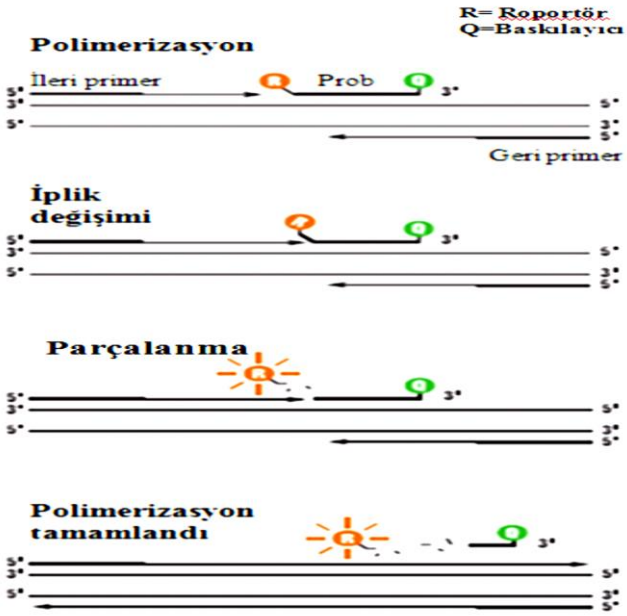
amplifikasyon eğrilerinin gen ürünü primer, dimer veya ortam kirliliğine bağlı olup olmadığı erime eğrisi yönteminin bu özelliğinden yararlanılarak yapılır. Sadece tek bir baza kadar dizilim değişimleri saptanabilmektedir [114, 115].

Real Time PCR kullanım alanları; metilasyon tespiti, DNA hasarı (mikrosatellitin stabilitesi) tespiti, KİT (Kemik İliği Transplantasyonu) sonrasında kimerizmin izlenmesi, KİT sonrasında MRD (Minimal Rezidüel Hastalık) izlenmesi, gen ekspresyonunun kantitasyonu, Melting-curve-genotipleme analizidir [116].

Kantitatif PCR sisteminin avantajları oldukça çoktur. Reaksiyon sırasında floresans ışıma ile eş zamanlı olarak veri toplanarak aynı anda analiz yapılabilmektedir. Diziyi tanıyan ya da diziye özgü mutasyonu tanıyan problar kullanıldığından spesifik olmayan çoğaltımlardan etkilenmez. Sonuç almak için ikinci bir tekniğe gerek yoktur. Bu sayede yüksek verimlilik sağlamaktadır. Kapalı bir sistem olduğu için kontaminasyon riski çok azdır. Reaksiyon bittikten sonra başka işlemlere ihtiyaç duyulmadığından qPCR işlemi yaklaşık 45 dakika sürmektedir. Özel eğri analizleri ile spesifik çoğaltımlar tanımlanmaktadır [117]

Reaksiyon sırasında kullanılan malzemelerin çok pahalı olması, teknik donanım, alt yapı, beceri, tecrübe ve yüksek ekipmana ihtiyaç olması, sadece bilinen mutasyonların taranabilmesi, laboratuvarlar arasında sonuçların farklı çıkması ve standardizasyon problemlerinin varlığı bilinen dezavantajlardandır [118].

TaqMan® prob yöntemi çift-boyalı oligonükleotid (Double-Dye Oligonucleotide), çift işaretli prob (dual labeled probe) veya 5' nükleaz probu (5’ nükleaz probe) olarak adlandırılmaktadır. Bu prob yönteminde çoğaltılmak istenilen DNA’ya tamamlayıcı olan ve floresans işaretlenmiş tek zincirli bir prob bulunmaktadır [119] (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. TaqMan® çalışması

Floresan işaretli probun 5' ucunda yüksek enerjili florofor (FAM) ve 3' ucunda düşük enerjili baskılayıcı (TAMRA) boya yer almaktadır. Probun 3' ucundaki baskılayıcı TAMRA boyası probun 5' ucundaki FAM boyasının sinyal oluşturmasını engellemektedir. Prob hedef DNA'ya bağlandığında ölçülen floresans sinyali düşüktür. PZR da çoğaltılma sırasında hedef nükleik asit dizisi üzerinde primerlerin bağlanma bölgeleri arasında TaqMan problar bağlanarak primer bağlanmasının ardından yeni zincir oluşturmaya başlarlar. Taq DNA polimeraz enzimi probun bağlandığı bölgeye gelindiği zaman 5'→3' nükleaz aktivitesi ile 5' ucundan florofor FAM' ı probdan ayrılmakta ve serbest hale geçen FAM sinyal oluşturmaktadır. Her döngüde ürün miktarı arttıkça floresans ona bağlı olarak artmaya devam eder. Bu yöntem ile mutasyon tespiti sayısal verilere ulaşabilmektedir. TaqMan prob yöntemi standart protokolü ve kolay dizaynı ile çok az bir optimizasyonla gerçekleştiği için hem allellerin belirlenmesi hem de gen anlatım profilinin çıkartılmasında sıklıkla kullanılmaktadır [120, 121].

2.11.1. SYBR Green 1

DNA'ya bağlandıklarında floresans veren boyalar (SYBR Green 1) kullanılarak, çoğalmaya bağlı DNA artışı, ortaya çıkan floresansın miktarıyla ölçülmektedir. Primerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında, hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan SYB Green 1 miktarı artmakta ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir [122]. Bu uygulamada, floresans artışı her zaman spesifik amplifikasyonu göstermeyebilir. Çünkü çift sarmal DNA'ya entegre olan SYBR Green 1 ortamda hedef moleküller olmadığında primerlerin kendi aralarında gerçekleşecek olan bağlanmalar (primer dimer) sonucunda da yapıya katılarak floresans oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu olumsuz faktörü gidermek için amplifikasyon ürünlerinin melting curve (erime eğrisi) analizi yapılmaktadır. Her çift sarmal DNA, kendine özgü melting temperature (Tm, çift sarmal DNA'nın %50'sinin tek sarmal hale gelmesi için gerekli sıcaklık) değerine sahiptir [123]. PCR çoğalmasının ardından sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek, belirli aralıklarla tüpteki floresans miktarı kaydedilir. Çift sarmal DNA zincirleri birbirinden ayrılmaya başlayınca SYBR Green 1 boya serbest kalmakta ve floresans miktarı azalmaktadır. Denatürasyon olduğunda floresans sinyal aniden düşmektedir. Erime eğrisinden yararlanılarak amplikonun Tm derecesi saptanabilmektedir. İncelenen örneğe ait Tm derecesi, aynı koşullarda işleme alınan pozitif kontrolün Tm derecesiyle karşılaştırılarak, PCR sonucunun doğru veya hatalı olduğuna karar verilmektedir [124].

2.12. ICP-MS Test Yöntemi

ICP-MS (Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometer) çoğunlukla sıvı ve katı örneklerde birden fazla sayıda elementin ucuz, hassas, doğru ve hızlı bir biçimde niceliksel veya yarı niceliksel ve niteliksel ölçülmesine dayanan oldukça ileri bir teknoloji ürününün sağlamış olduğu analiz metodudur [125]. Öncelikli olarak örnek bir solüsyon olarak giriş sistemi ile nebulizöre ve sprey odacığına alınır ve bu sistemde yüksek hızlı argon akımı vasıtasıyla solüsyonda sisleşme meydana gelir. Sadece çok küçük damlacıklar argon plazmasına taşınabilirken diğerleri ise doğrudan atığa giderler. 6000 Kelvin civarında sıcaklıklardaki plazma örneğini buharlaştırarak iyonize eder. İyonlar, atmosferik basınçtan örnekleyici ve süzücü konlarla yüksek vakumlu ortama

geçip, daha sonra iyon akımı, iyon lensleri ile quadrupola odaklanarak kütle filtresine yönlendirilir ve burada kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrılarak ölçülürler [126].

ICP-MS' te yer alan plazma optik optik emisyon spektrometresinde yer alan kullanılan Argon plazması ile benzerdir. Periyodik tabloda yer alan çoğu elementin birinci iyonlaşma enerjileri Argonun sahip olduğu iyonlaşma enerjisinden daha düşük olduğundan elementler plazmada pozitif iyonlarına dönüşürler. ICP-MS doğrudan çözeltide bulunan iz elementin derişimlerinin belirlenmesinde uygun bir metottur [127]. Çoğu element için gözlenebilme sınırı ng/L' nin (ppb ve daha düşük derişimler)altında olduğu bilinmektedir. Birçok sayıda elementin eş zamanlı olarak analiz edebilme kabiliyeti sayesinde, izotop oranlarının belirlenmesinde ve nitel analizlerde olduğu gibi ilk başta metalik olan elementler olmak üzere periyodik tabloda yer alan elementlerin çoğunun yarı nitel ve nicel olarak yapılan tayinlerin de belirlenmesinde yararlanılır. ICP-MS analiz tekniğinin diğer yöntemlere oranla çalışma aralığı geniştir. İstenen elementler için pg-mg/L arasında kalibrasyon grafikleri çizilebilme imkanı tanımaktadır [128].

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD

3.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Adaptasyonu

Çalışmada kullanılan Zebra balıkları ticari firmalardan temin edilmiş ve Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü Sucul Hayvan Deneyleri Araştırma Laboratuvarına plastik torbalar ile getirilmiştir. Getirilen balıklar 50x50x100 cm, 100 L'lik cam akvaryumlar içinde 26 °C'de sürekli havalandırma yapılarak, pH 7-8'de, 12:12 gece-gündüz periyodunda 2 hafta boyunca ortama adapte edilmiştir. Adaptasyon süresi boyunca balıklar her gün kuru balık yemi ile beslenmiştir.

3.2. Deneysel Çalışma

Çalışmada test edilecek metal konsantrasyonları ülkemizde su kirliliği kontrol yönetmeliğine göre belirlenmiştir. Buna göre 2 konsantrasyon belirlenmiş olup, en düşük konsantrasyon, İnsani tüketim amaçlı sular hakkında yönetmeliğine göre [129] As ve Cd için sırasıyla 10 µg/L, 5 µg/L ve en yüksek konsantrasyon Su kirliliği kontrolü yönetmeliği kıta içi su kaynakları 4. Sınıf su kalite değerleri [129] As ve Cd için sırasıyla 100 µg/L, 50 µg/L olarak belirlenmiştir. As muamelesi için 10 µg/L ve 100 µg/L konsantrasyonlarda, Cd muamelesi için 5 µg/L ve 50 µg/L konsantrasyonlarda, karışım halinde muamelesi için Karışım I (As + Cd; 10 µg/L+5

µg/L) ve Karışım II (As+ Cd; 100 µg/L + 50 µg/L) konsantrasyonlarda 48 saat boyunca optimum şartlarda muamele edilmiştir.

Zebra balıkları her grupta 5 balık olacak şekilde gruplara ayrılmıştır. Akvaryumlardaki su sıcaklığı 24-26 °C ve aydınlık: karanlık (12:12) olacak şekilde sabitlenmiştir. Deney süresince akvaryumlar sürekli havalandırılmıştır. Beslenme günde bir kez kuru yem verilerek yapılmıştır. Kontrol grubuna metal muamelesi yapılmamıştır. Deney 3 kez tekrar edilmiştir.

Belirlenen deney süreleri sonunda kontrol ve en düşük konsantrasyonlardan başlayarak deney akvaryumlarından çıkarılan zebra balıkları pellet buz-su karışımında anestezi yapılarak sakrifiye edilmiş ve solungaç diseksiyonu gerçekleştirilmiştir. Alınan solungaç dokuları tartılmıştır, Ağırlık ölçümlerinde ± 0.01 g hassasiyetli elektronik terazi kullanılmıştır. Çalışma sonunda balıklar solungaçlar alınarak sıvı azot (-80 °C) içinde dondurulmuş ve genetik analizlerde kullanılmak üzere -86 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

3.3. Metal Birikiminin Belirlenmesi

Kas dokusu örnekleri tartılarak % 35 HNO_3 (Merck-CAS no: 7697-37-2) ile 4 mL'ye tamamlanmıştır. Örnekler CEM Mars 6 mikrodalga yakma sisteminde yakılmıştır. Yakılan örnekler % 2'lik HNO_3 çözeltisiyle falkon tüp içeresinde 10 ml'ye tamamlanmış ve ICP-MS (Agilent 7700 xx, USA) oto örnekleme sisteminde okutulmuştur. 0-200 ppb (0, 6.50, 25, 50, 100, 200) arasında 6 noktada ICP cihazı kalibre edilerek ağır metaller ölçülmüştür.

3.4. DNA Ekstraksiyonu ve RAPD Analizi

Dokulardan Genomik DNA'lar DNeasy® Tissue-Blood (Qiagen, USA) kit ile kit protokolü kullanılarak izole edilmiştir. Total DNA, PCR reaksiyonu öncesi nukleazfree su kullanılarak 25 ng/µL konsantrasyona ayarlanmıştır. Standart 50 µL PCR reaksiyonu; 2 µL (50±10 ng) kalıp DNA, 5µl 10× Taq tamponu + KCl (Fermentas, EP0071), 1.25 U TaqDNA polymerase (Fermentas, EP0401), 6 µL 2.5mM MgCl2 (Fermentas, R0971), 1 µL 10× dNTPs (Fermentas,R0181), 1µL her bir primer ve

nukleazfree su (10977-015, Invitrogen™) maddelerinin Applied Biosystems® ProFlex™ PCR sisteminde kullanılması ile yapılmıştır Kullanılan primerler Tablo 3.1' de verilmiştir. DNA amplifikasyonu ABI PCR [40 döngü 95 °C denatürasyon (30 saniye), 37 °C eşleşme (30 saniye) ve 72 °C uzama (90 saniye)] ile başlangıç 94 °C denatürasyon (3 dakika) ve son uzama 72 °C (30 dakika) olarak gerçekleştirilmiştir. DNA ile çoğaltılan örneklerden, 15 µL alınarak 3 µL yükleme boyası (R0611, Fermentas) eklenmiş ve %2 agaroz jel+etidyumbromit, 2× TAE (1.6 M Tris, 0.8 M asetik asit, 40 mM EDTA, Ambion® 10X TAE) tampon içerisinde yürütülmüştür. Moleküler ağırlık standardı olarak üretici talimatlarına göre 100 baz çiftlik DNA (Geneaid, DL007) kullanılmıştır. Elde edilen bantlar UV transilluminatorde (ViberLourmat, Quantum ST4) izlenmiş ve BIO-PROFIL, BIO-1D++ programları kullanılarak analiz edilmiştir. Genomik Kalıp Stabilitesi (GTS), rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA verileri kullanılarak hesaplanmıştır. Buna göre;

$$GTS\ (\%) = (1 - [(a + b) / n]) \times 100$$

a = yeni görünen bantlar,

b = kaybolan bantlar,

n = kontroldeki toplam bantların sayısını ifade etmektedir [130].

Tablo 3.1. RAPD analizinde kullanılan primerler ve sekansları

RAPD PRİMERLERİ	SEKANSLARI
D 1	5' AGGGAACGAG 3'
OPH 03	5' AGACGTCCAC 3'
14 OPC 09	5' CTCACCGTCC 3'
RAPD 6	5' CCCGTCAGCA 3'

3.5. RNA Analizi

Dokulardan total RNA izolasyonu için Total RNA PureLink® RNA Mini Kit (Life Sciences) kullanılmış ve RNA kit protokolüne göre izole edilmiştir. Protokole göre hücre homojenatlarına %70 etanol ilave edilmiştir. Homojen bir görüntü elde

edilene kadar vorteksleme yapılmıştır. 700 µL örnek 12.000 x g' de 15 dakika santrifüj edilmiş ve santrifüj sonrası presipitant atılarak hücreleri üzerine 700 µL yıkama tamponu ilave edilmiştir. 12.000 x g' de 15 dakika tekrar santrifüjden sonra toplama tüpüne alınan hücrelere yıkama tamponu ilave edilmiştir. 12.000 x g' de 15 dakika santrifüj işlemi 2 kez daha tekrar edildikten sonra hücreler özel filtreli tüplere alınmış ve üerine 100 µL RNase-free su ilave edilmiştir. 1 dakika oda sıcaklığında inkübasyon sonrası 12.000 x g'de 2 dakika santrifüj yapılmıştır. Son kez filtreden geçirilen hücre homojenatından izole edilen RNA miktarları OPTIZEN NanoQ mikrohacim fotometresi ile belirlenmiştir. Total RNA konsantrasyonu, High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) kullanarak tamamlayıcı DNA (cDNA)'nın birinci zincirinin sentezi için 50 ng/µL olarak ayarlanmıştır. AppliedBiosystems® ProFlex™ PCR sistemi (adım 1: 25 °C, 10 dakika; adım 2: 37 °C, 120 dakika; adım 3: 85 °C, 5 dakika) ile cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA'lar daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

3.6. Kantitatif Real Time PCR Çalışmaları

Bu cDNA'lar SYBR® Select Master Mix (Life Technologies, USA) ile ABI Step One Plus Real-Time PCR' da protokole uygun olarak Tablo 3.2 'de verilen primer problar kullanılmıştır.

Tablo 3.2. qRT-PCR'da kullanılan genler ve sekansları

Genler/Sekanslar	Primer Sekansları
HSP 26	F 5' GCCCCGCAGCCCCATCTACGAG 3' R 5' GAGCACGCCATCCGACGACAGC3'
HSP 60	F 5' GTCGCGCCCCGTTAGCAC 3' R 5' CATCGCGTCCCACCTTCTTCAT3'
HSP 70	F 5' CGAGETCGACGCATTGTTTG 3' R 5' GAGTGGATCCGCCGACGAGTA 3'
HSP 83	F 5' CCGGAGGCTCTTTCACAGTC 3' R 5' CTTCTCGCGCTCCTTCTCTAC 3'

Gen ekspresyonlarında göreceli kat değişimleri kontrol ile karşılaştırılmış ve standart olarak 18S mRNA ekspresyonları kullanılmıştır. Karşılaştırmalı döngü eşiği (ΔCt) metodu ile mRNA'ların ekspresyon düzeyleri analiz edilmiştir.

3.7. İstatistiksel Analiz

Metal birikimlerinin belirlenmesi, RAPD analizi sonucu % GTS değerleri ve gen ifade düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde; kontrol grubu ve deneme gruplarının karşılaştırılmasında ve ortalamaların girdiği grupların belirlenmesinde Tukey Testi kullanılmıştır. Analizlerde anlamlılık düzeyi ($p \leq 0.05$) olacak şekilde SPSS 17.0 yazılımı kullanılmıştır

BÖLÜM 4

SONUÇLAR

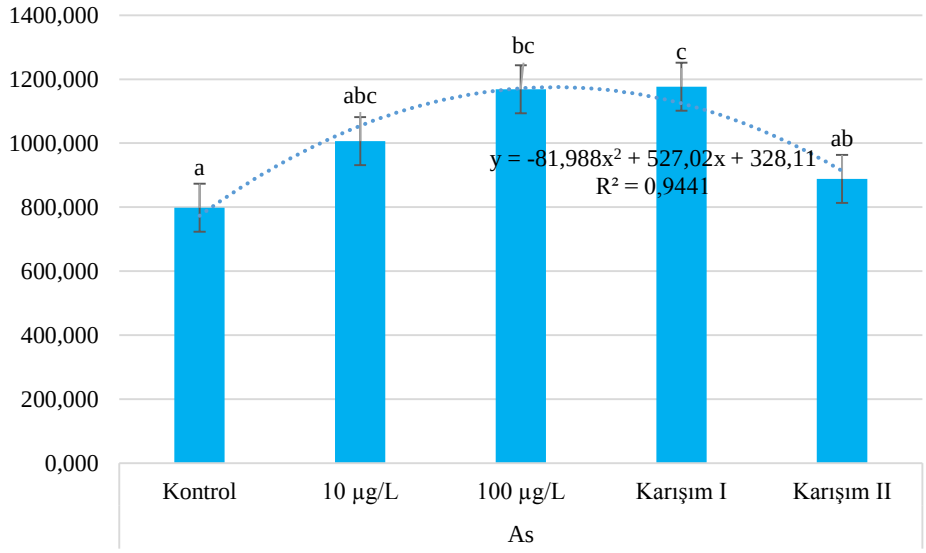
4.1. Kas Dokularında Metal Birikimleri

Çalışma sonucunda, As ve Cd' un farklı konsantrasyonları ile ayrı ayrı ve karışım halinde 48 saat akut muameleye maruz kalan Zebra balığı kas dokusunda metal birikimleri Tablo 4.1 ve Tablo 4.2 'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Zebra balığı kas dokusunda arsenik birikimleri. Gruplar arası farklılık p≤0,05 * ; p≤0,01 ** ; p≤0,001 *** olacak şekilde değerlendirilmiştir. Karışım I (As + Cd; 10 + 5 µg/L); Karışım II (As + Cd; 100 + 50 µg/L); SS, standart sapma.

As Birikimi	
Gruplar	**Ortalama (ppb) ± SS**
Kontrol	797,75 ± 103,74
As-10 µg/L	1005,91 ± 219,59
As-100 µg/L	1168,50 ± 232,36 **
Karışım I	1176,38 ± 237,70 **
Karışım II	887,98 ± 59,38

Zebra balığı kas dokusunda 48 saat muamele sonucu As birikiminde, 100 µg/L As (p=0,006) uygulanan grupta ve Karışım I (p=0,005) uygulanan grupta kontrole oranla anlamlı artış tespit edilmiştir (Şekil 4.1). Karışım I ve Karışım II uygulamaları sonucu kas dokusunda ölçülen As miktarları arasında istatistiksel olarak fark tespit edilmiştir (p=0,043).



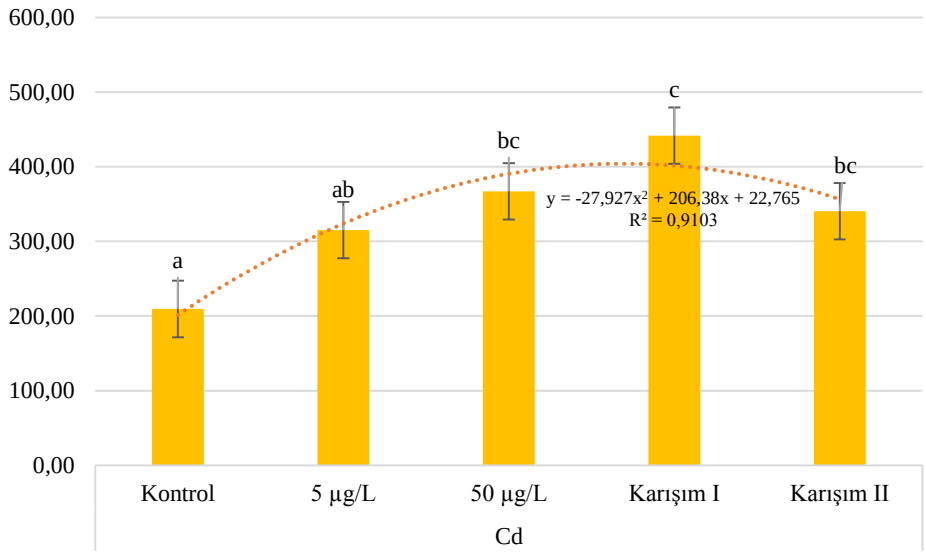
Şekil 4.1. Balık kas dokusunda As birikim düzeyleri. Grafiklerde veriler üzerinde görülen farklı harfler Tukey testi sonucu elde edilen istatistiki olarak birbirinden farklı grupları göstermektedir. Karışım I (As + Cd; 10 + 5 µg/L); Karışım II (As + Cd; 100 + 50 µg/L)

Cd' un dokularda birikimi değerlendirildiğinde (Tablo 4.2), Cd' un yüksek dozu (50 µg/L) (p=0,002), Karışım I (p=0,0001) ve Karışım II (p=0,013) uygulaması sonucunda balık kas dokusunda kontrole göre anlamlı miktarda birikim artışı belirlenmiştir.

Tablo 4.2. Zebra balığı kas dokusunda Cd birikimleri. Gruplar arası farklılık p≤0,05 * ; p≤0,01 ** ; p≤0,001 *** olacak şekilde değerlendirilmiştir. Karışım I (As + Cd; 10 + 5 µg/L); Karışım II (As + Cd; 100 + 50 µg/L); SS, standart sapma

Cd Birikimi	
Gruplar	**Ortalama (ppb) ± SS**
Kontrol	209,43 ± 44,07
Cd-5 µg/L	315,22 ± 64,67
Cd-50 µg/L	366,94 ± 120,74 **
Karışım I	441,47 ± 45,96 ***
Karışım II	340,36 ± 53,93 *

Cd uygulaması sonrasında düşük doz Cd uygulaması ile Karışım I arasında istatistiki olarak fark mevcutken (p=0,018); yüksek doz uygulaması ile Karışım II arasında anlamlı farklılık bulunmamaktadır (p=0,951). As uygulaması sonucunda ise hem düşük doz As uygulaması ile Karışım I hem de yüksek doz As uygulaması ile Karışım II arasında istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır (p=0,410; p=0,052) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Balık kas dokusunda Cd birikim düzeyleri. Grafiklerde veriler üzerinde görülen farklı harfler Tukey testi sonucu elde edilen istatistiki olarak birbirinden farklı grupları göstermektedir. Karışım I (As + Cd; 10 + 5 µg/L); Karışım II (As + Cd; 100 + 50 µg/L)

Tablo 4.3. As ve Cd uygulamasına bağlı balık kas dokusunda metaller arası korelasyon. Tablodaki anlamlılık derecesi p≤0,01 ** şeklinde verilmiştir.

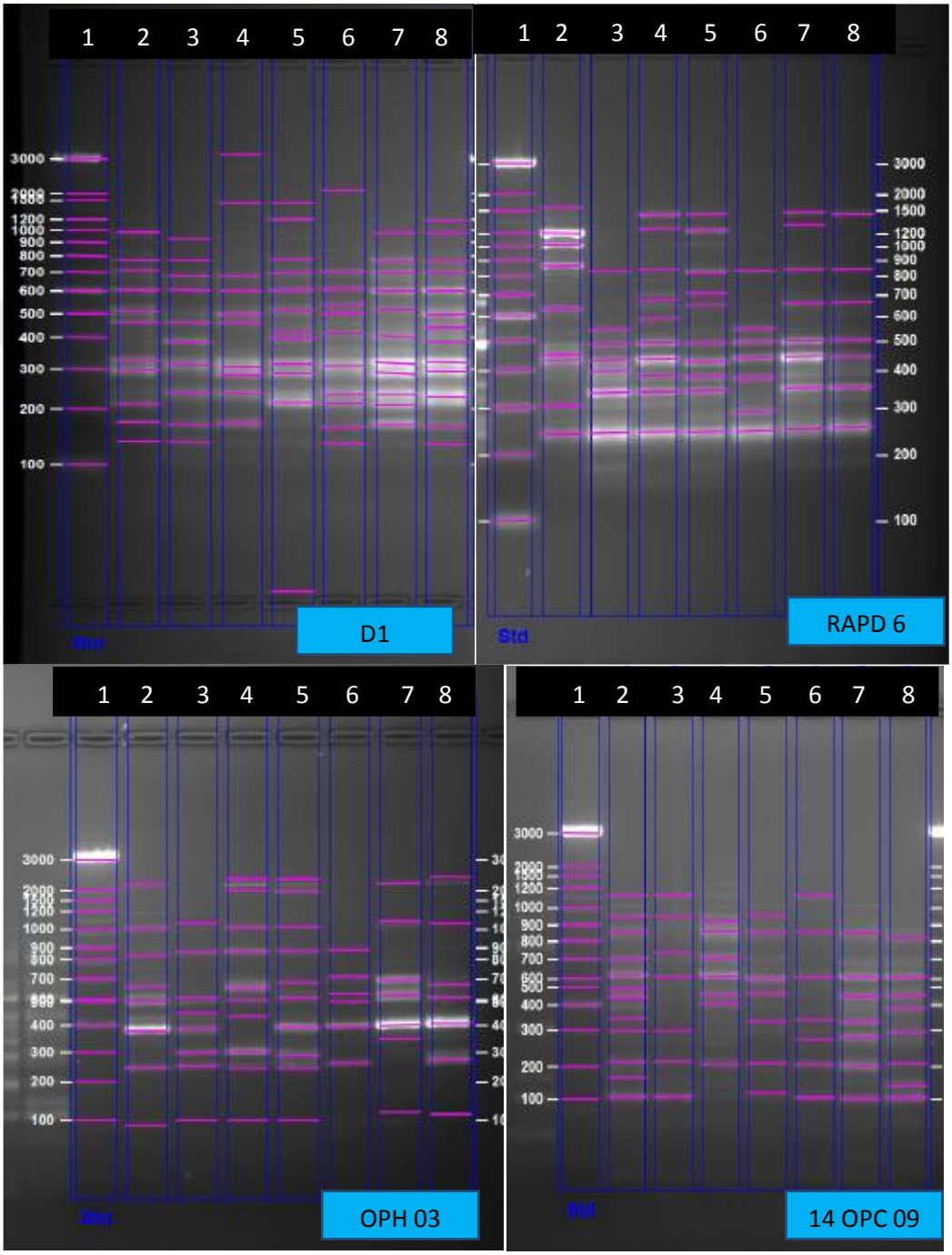
	Cd birikimi ile karışımlardaki As konsantrasyonu arasındaki ilişki	As birikimi ile karışımlardaki Cd konsantrasyonu arasındaki ilişki	Karışımlarda Gruplarında As ve Cd birikimi arasındaki ilişki
Pearson Korelasyon	-0,771**	-0,714**	0,852**
Anlamlılık	0,003	0,009	0,0001

As ve Cd karışım halinde uygulanması ile elde edilen Cd birikim miktarı ile karışımda bulunan As konsantrasyonu arasında negatif korelasyon tespit edilmiştir (Pearson korelasyon; p=0,003). Aynı şekilde As ve Cd' un karışım halinde uygulanması ile elde edilen As birikim miktarı ile karışımda bulunan Cd konsantrasyonu arasında negatif korelasyon tespit edilmiştir (Pearson korelasyon; p=0,009). Karışım I ve Karışım II muamelesi ile elde edilen As ve Cd birikim miktarları arasında pozitif korelasyon gözlenmiştir (Pearson korelasyon; p=0,0001). Metal karışımları aynı oranda artsa bile, ortamda belli metallerin belli bir seviyenin üzerinde beraber bulunması metal birikimini düşürdüğü tespit edilmiştir (Tablo 4.3).

4.2. RAPD Sonuçları

Çalışma sonunda 4 primer ile DNA'da meydana gelen toplam hasar belirlenmiş (Şekil 4.3) ve Tablo 4.4 ile Tablo 4.5'te verilen sonuçlar elde edilmiştir.

% GTS değişimleri değerlendirildiğinde, Cd' un 50 µg/L muamelesi dışında tüm uygulama gruplarında kontrole göre anlamlı % GTS azalması belirlenmiştir (Tablo 4.6). En fazla bant oluşumu 10 µg/L As uygulamasında meydana gelmişken; en fazla bant kaybolması ise 100 µg/L As uygulamasında meydana gelmiştir.



Şekil 4.3. Metal muameleleri sonucu farklı primerlere ait RAPD profilleri. Resimlerdeki numaralar: 1-Standart; 2-Kontrol; 3- Cd 5 µg/L; 4- Cd 50 µg/L; 5-As 10 µg/L; 6- As 100 µg/L; 7- Karışım I; 8-Karışım II uygulamalarını ifade etmektedir. Karışım I (As + Cd; 10 + 5 µg/L); Karışım II (As + Cd; 100 + 50 µg/L).

Tablo 4.4. RAPD profillerinde oluşan ve yok olan bantların moleküler büyüklükleri (baz çifti). Karışım I (As + Cd; 10 + 5 µg/L); Karışım II (As + Cd; 100 + 50 µg/L). a:oluşan bantlar ; b:yok olan bantlar.

Primer	Kontrol	Cd 5 µg/L	Cd 50 µg/L	As 10 µg/L	As 100 µg/L	Karışım I	Karışım II
14 OPC 09	2000,1500, 1200,1000, 800,700, 600,500,400, 300,200,100	a: -	a: -	a: -	a: -	a: -	a: -
		b: 2000, 1500,1200, 1000,900, 800,500	b: 1200, 800,500	b: 2000, 1200	b: 2000, 1500, 1200, 1000, 800	b: 2000, 1500, 1200, 700	b:2000, 1500, 1200, 1000, 100
RAPD 6	1200,1000, 700,600,500, 400,300,200	a: -	a: 700	a: 1500, 700	a: -	a: 1500	a: 1500
		b: 1200, 1000	b: 800	b: 1000	b: 1200, 1000	b: 1000	b: 1200, 1000
OPH 03	1000,900, 800,700,600, 500,400,300, 200,100	a: -	a: -	a: -	a: -	a:-	a: -
		b: 800, 500,400	b: 1000, 300,100	b: 1000, 700,600	b: 900, 700,500	b: 1000,900, 700	b: 1000, 900, 700
D 1	2000,1000, 800,600, 500,300, 200,100	a: 400	a: 1500, 400	a: 1500, 700, 400	a: 700, 400	a: 700, 400	a: 700, 400
		b: 2000	b: -	b: 500	b: 2000, 1000,300 , 100	b: 800, 500, 100	b: 800, 500,400

Tablo 4.5. Ağır metal uygulaması sonucu oluşan ve yok olan bantların sayısı. Karışım I (As + Cd; 10 + 5 µg/L); Karışım II (As + Cd; 100 + 50 µg/L). a:oluşan bant sayısı ; b:yok olan bant sayısı.

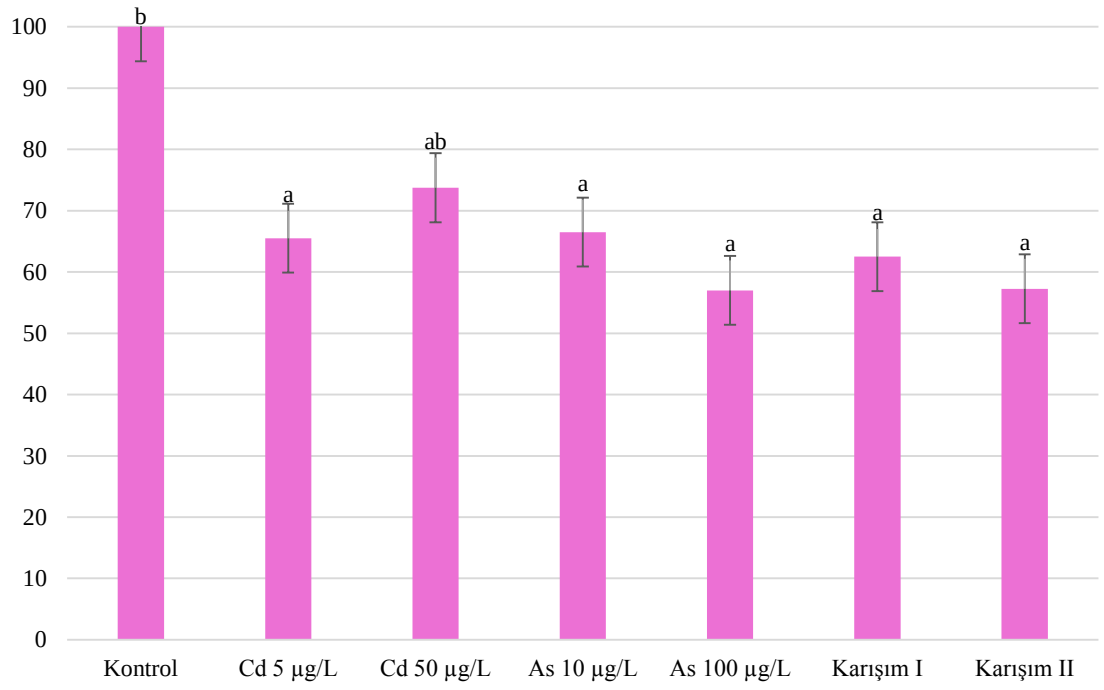
Primerler	Kontrol	Cd 5 µg/L		Cd 50 µg/L		As 10 µg/L		As 100 µg/L		Karışım I		Karışım II	
		a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
14OPC09	12	0	7	0	3	0	2	0	5	0	4	0	5
RAPD6	8	0	2	1	1	2	1	0	2	1	1	1	2
OPH03	10	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3
D1	8	1	1	2	0	3	1	2	4	2	3	2	3
Toplam bant	38	1	13	3	7	5	7	2	14	3	11	3	13
a+b		14		10		12		16		14		16	

Bant oluşumları değerlendirildiğinde kontrolde toplam 38 bant gözlenmişken; Cd 5 µg/L' te 14; Cd 50 µg/L'de 10; As 10 µg/L' da 12; As 100 µg/L'de 16; Karışım I' de 14 ve Karışım II' de 16 bant gözlenmiştir.

Tablo 4.6. Balık kas dokusunda ağır metal uygulamasına bağlı % GTS' de meydana gelen değişimler. Karışım I (As + Cd; 10 + 5 µg/L); Karışım II (As + Cd; 100 + 50 µg/L). Ort: Ortalama; SS: Standart sapma. Anlamlılık sonuçları p≤0,05 * ; p≤0,01 ** olacak şekilde değerlendirilmiştir.

Primer	Kontrol	Cd 5 µg/L	Cd 50 µg/L	As 10 µg/L	As 100 µg/L	Karışım I	Karışım II
14OPC09	100	42	75	83	58	67	58
RAPD6	100	75	75	63	75	75	63
OPH03	100	70	70	70	70	70	70
D1	100	75	75	50	25	38	38
Ort ± SS	100	65,5±15,8*	73,75±2,5	66,5±13,7*	57±22,4**	62,5±16,6**	57,25±13,7**

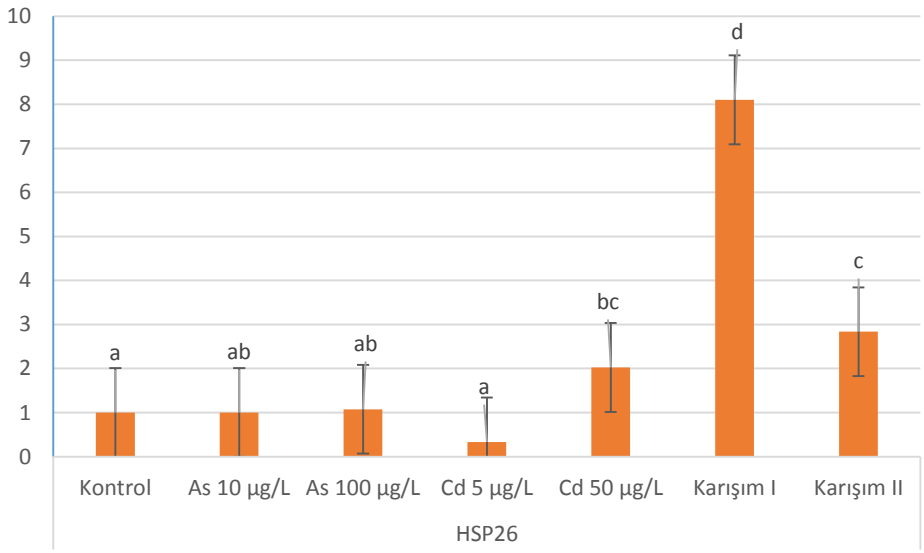
% GTS değişimlerine bakıldığında, 100 µg/L As uygulaması % GTS de en fazla azalmaya neden olan grup olarak bulunmuştur.



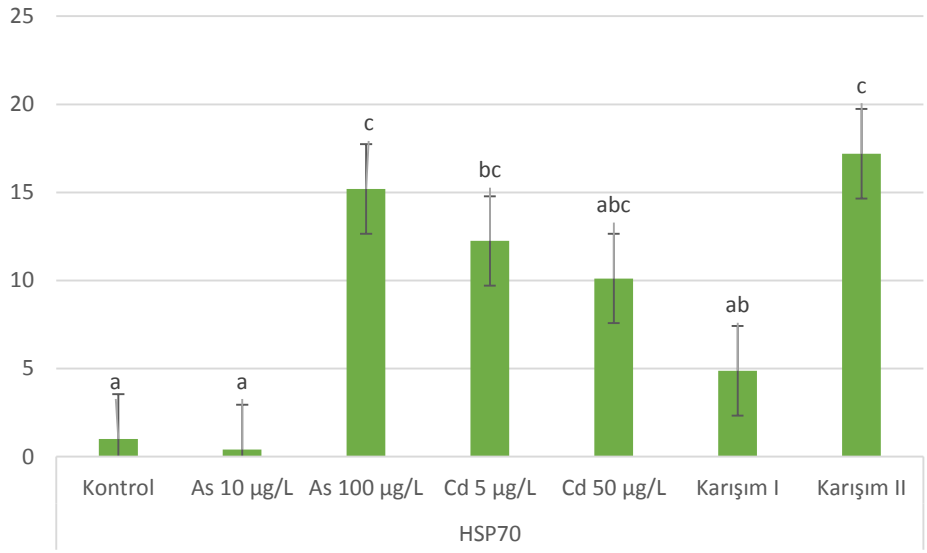
Şekil 4.4. Balık kas dokusunda meydana gelen % GTS değişimleri. Grafiklerde veriler üzerinde görülen farklı harfler Tukey testi sonucu elde edilen istatistiki olarak birbirinden farklı grupları göstermektedir. Karışım I (As + Cd; 10 + 5 µg/L); Karışım II (As + Cd; 100 + 50 µg/L)

4.3. Gen Ekspresyon Sonuçları

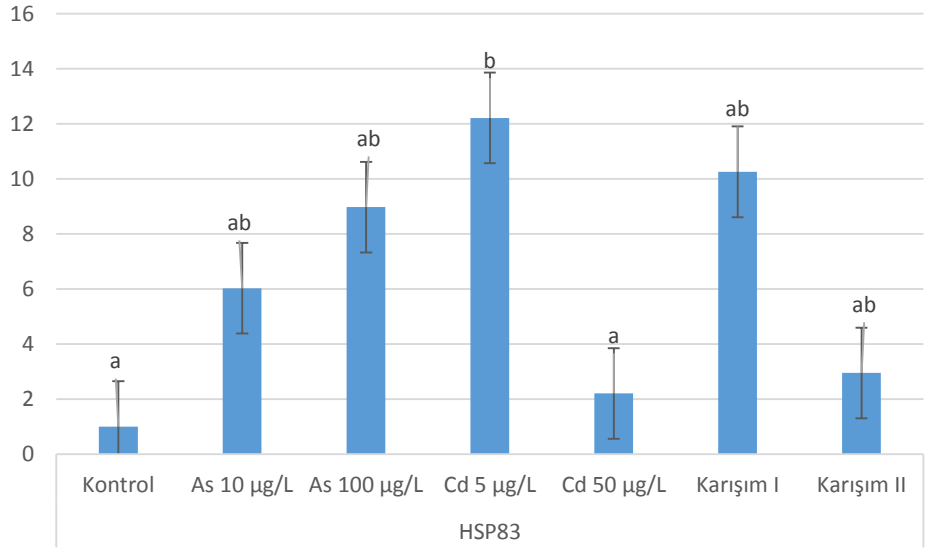
Isı şok proteinlerine ait gen ifadeleri değerlendirildiğinde; HSP 26 gen ifadesi Karışım I ve Karışım II' de kontrole göre anlamlı olarak artmıştır (p=0,0001; p=0,023) (Şekil 4.5). HSP 70 gen ifadesi As 100µg/L (p=0,005), Cd 5 µg/L (p=0,029) ve Karışım II (p=0,002) uygulamalarında kontrole göre anlamlı artış göstermiştir (Şekil 4.6). HSP 83 gen ifadesi sadece Cd 5 µg/L muamelesi sonucu artarken (p=0,022) (Şekil 4.7); HSP 60 gen ifadesinde Karışım II muamelesi dışında tüm uygulamalar sonucunda kontrole göre anlamlı bir değişim belirlenmemiştir (p>0,05) (Şekil 4.8).



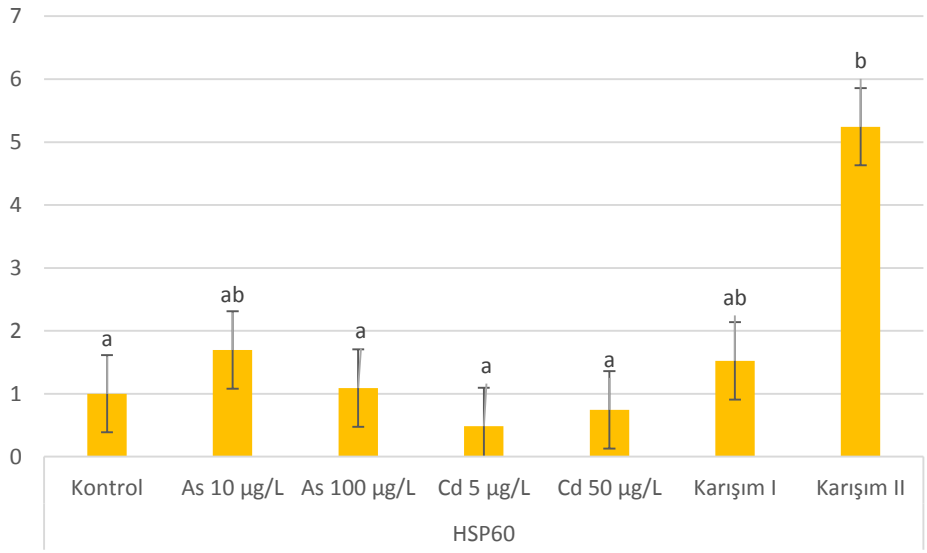
Şekil 4.5. HSP 26 gen ifadesinde meydana gelen değişimler. Grafiklerde veriler üzerinde görülen farklı harfler Tukey testi sonucu elde edilen istatistiki olarak birbirinden farklı grupları göstermektedir. Karışım I (As + Cd; 10 + 5 µg/L); Karışım II (As + Cd; 100 + 50 µg/L).



Şekil 4.6. HSP 70 gen ifadesinde meydana gelen değişimler. Grafiklerde veriler üzerinde görülen farklı harfler Tukey testi sonucu elde edilen istatistiki olarak birbirinden farklı grupları göstermektedir. Karışım I (As + Cd; 10 + 5 µg/L); Karışım II (As + Cd; 100 + 50 µg/L).



Şekil 4.7. HSP 83 gen ifadesinde meydana gelen değişimler. Grafiklerde veriler üzerinde görülen farklı harfler Tukey testi sonucu elde edilen istatistiki olarak birbirinden farklı grupları göstermektedir. Karışım I (As + Cd; 10 + 5 µg/L); Karışım II (As + Cd; 100 + 50 µg/L).



Şekil 4.8. HSP 60 gen ifadesinde meydana gelen değişimler. Grafiklerde veriler üzerinde görülen farklı harfler Tukey testi sonucu elde edilen istatistiki olarak birbirinden farklı grupları göstermektedir. Karışım I (As + Cd; 10 + 5 µg/L); Karışım II (As + Cd; 100 + 50 µg/L).

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Akuatik organizmalarda As' e bağlı olarak sitotoksitenin artması, oksidatif stres oluşumu ve değişen ısı şok proteini düzeyleri gibi birçok toksik etki gözlenmektedir. As' in balıklarda diğer dokulara kıyasla en az kas dokusunda birikim gösterdiği bildirilmiştir [131-133]. Akuatik organizmalarda As' e bağlı olarak balık hücre hatlarında sitotoksitenin artması, oksidatif stres oluşumu, azalan antioksidan enzim aktivitesi ve artan antioksidan gen ifadesi düzeyleri gibi birçok toksik etki gözlenmektedir [134]. As'in üç farklı konsantrasyonu ile 48 saat boyunca muamele edilen Zebra balıklarının solungaç dokularında artan As birikimi gözlenmiştir [135]. Bir başka çalışmada 1 ve 10 mg/L sodyum arsenatın 90 gün boyunca uygulanması neticesinde balık dokularında zamana ve doza bağlı olarak metal birikimi belirlenmiştir. Nehir sularında bulunan As miktarı ile Zebra balığında, diğer çalışmalarda olduğu gibi zamana ve doza bağlı olarak artan birikim ölçülmüştür [136]. Yeşil güneş balığı *Lepomis cyanellus* ile yapılan başka bir çalışmada As' in birikimi değerlendirilmiş ve 1 ppm As uygulaması sonucunda balık dokusunda metal birikimde anlamlı bir artış gözlenmiştir [137]. Bu çalışma sonucunda Zebra balığı kas dokusunda kontrole göre daha önceki çalışmalar ile paralel olarak As' in sadece yüksek doz uygulanması sonucu artan ağır metal birikimi gösterdiği belirlenmiştir.

Cd, endüstriyel kullanımın artması sonucu son yıllarda çevresel kirleticiler arasında yüksek toksisitesi ile dikkat çekmektedir. Yapılan birçok çalışma doğrudan veya dolaylı olarak Cd maruziyeti sonucu sucul canlılarda birikime bağlı toksik etkiler gözlenmektedir [138]. Cd birikimi bazı protoonkogenlerin oluşumunu tetiklemekte,

DNA onarım sistemini inhibe etmekte ve ısı şok proteinlerinde çeşitli değişimelere neden olmaktadır. Bunun yanında mitokondriyel solunum zincirini inhibe etmekte ve DNA hasarı ile apoptozise yol açmaktadır [139]. Zebra balığının 2 µg/L ve 10 µg/L Cd ile 21 günlük muamelesi sonucu beyin, solungaç, karaciğer ve kas dokularında yapılan incelemelerde kontrole göre artmış Cd birikimi belirlenmiştir. Yüksek doz kadmiyum uygulaması sonucunda solungaçta kontrole göre yaklaşık 12 kat fazla birikim tespit edilmiştir [140]. Daha önce yapılan birçok çalışmada elde edilen sonuçlarda artan Cd konsantrasyonu sonucu bu çalışmada olduğu gibi dokuda metal birikiminde de artış olmaktadır [141, 52, 138]. Zebra balığı embriyoları ile yapılan bir başka çalışmada 5, 10, 25, 50, 75 ve 100 mg/L Cd 'un 48 saatlik uygulaması sonucunda doza bağlı olarak kadmiyum birikiminde artış olduğu tespit edilmiştir [142]. Cd özellikle metabolik olarak aktif olan solungaç, karaciğer, böbrek ve sindirim sistemi organları gibi yapılarda birikim gösterme eğiliminde olan bir elementtir. Birikim bölgeleri balık türleri ve uygulama periyotlarına bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. Ayrıca su ile taşınan Cd, zebra balıklarında diyet yoluyla uygulanan Cd' dan daha fazla birikim göstermektedir [143-145]. Cd 'un 0,003 ve 0,025 µM dozlarda uygulanmasıyla Zebra balığı solungaç dokularında doza bağlı birikimde artış olduğu gözlenmiştir [146]. Zebra balığının 1 mg/L Cd ile 2, 7 ve 16 günlük muamelesi sonucu uygulama yapılan günlerde kontrole göre anlamlı derecede Cd birikimi gözlenmiştir. 16.gün sonunda balık beyninde ölçülen Cd birikimi kontrolün yaklaşık 100 katıdır [147]. Cd' un balıklarda genotoksik etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, iskelet kaslarında biriken metal miktarı beyin, solungaç ve karaciğere oranla daha az bulunmuştur [148]. Bu çalışmanın sonuçları diğer çalışmalara benzer olarak Cd' un uygulanan yüksek dozu (50 µg/L) Zebra balığı kas dokusunda kontrole göre anlamlı metal birikimine neden olmuştur.

Kirlenmiş çevresel ortamlarda birçok ağır metal yüksek konsantrasyonlarda ve birlikte bulunmaktadır. Bu metallerin bir arada bulunmaları bazen tek tek bulunmalarından farklı etkiler doğurabilmektedir. Bu yüzden bu elementlerin birlikte bulunmaları; sucul organizmalar tarafından alımları, birikimleri ve toksisitesi için önemli bir etken oluşturmaktadır [149]. Karışım halindeki metallerin alımı, rekabetçi veya rekabetçi olmayan inhibisyon gösterebilir ya da alımı hızlandırabilir. Bu etkileşimler çevresel ortamdaki metallerin konsantrasyonuna, kullanılabilirliğine, maruziyet şekli ve süresine, çalışılan deney hayvanı ve incelenen organa bağlı olarak

farklılık göstermektedir. Düşük konsantrasyonlardaki metal-metal etkileşimleri, çeşitli ortamlarda özellikle balıkların içinde yer aldığı sucul ekosistemlerde birçok çalışma ile gösterilmiştir [150]. *Dreissena polymorpha*' da bakır, kadmiyum ve çinkonun karışım halinde ve tek tek toksisiteleri değerlendirildiğinde, metallerin karışım halinde daha toksik oldukları rapor edilmiştir [151]. As ve Cd balık solungaç dokusunda ayrı ayrı ve beraber kullanımının değerlendirildiği bir çalışmada, As ayrı ayrı uygulanması, Cd ile beraber uygulanmasına göre solungaç dokusunda daha fazla As birikimine neden olduğu belirlenmiştir [152]. Çoklu metal ilişkilerinin Zebra balığında incelenmesi sonucunda Cd ve Pb alımı ortamda bulunan bakır, nikel ve çinko tarafından etkilendiği gösterilmiştir. Ayrıca özellikle kadmiyum alımı Cu, Pb ve Zn tarafından inhibe edilirken, Ni varlığında hızlanmaktadır [153]. Çeşitli metallerin akut toksisitesi incelendiğinde ise Cu varlığının Ni ve Cd' un LC_{50} değerini arttırdığını göstermektedir [154]. Cd, Ni ve Zn tekli ve beraber bulunmaları durumunda *Cyprinus carpio*'da meydana gelen birikimleri değerlendirilmiş ve metallerin kombine kullanımı sonucu balıkta birikim miktarında artış olduğu bildirilmiştir [155]. *Tilapia nilotica*'nın karaciğer, solungaç ve kas dokusunda Cd ve Zn' nun birlikte kullanımlarının tekli kullanıma oranla daha fazla birikime neden olduğu ortaya çıkmıştır [156]. Bu çalışmada As ve Cd metalleri ayrı ayrı muamele edildiğinde Zebra balığı kas dokusunda uygulama konsantrasyonu arttıkça birikim miktarının da arttığı gözlenmiştir. Ancak As ve Cd karışım halinde muamele edildiğinde Zebra balığı kas dokusunda uygulama konsantrasyonu arttıkça birikim miktarının da azaldığı tespit edilmiştir. Metal karışımları aynı oranda artsa bile, ortamda belli metallerin belli bir seviyenin üzerinde bulunması metal birikimini düşürebileceği tespit edilmiştir. Bu da test edilen konsantrasyonlarda As ve Cd' un *Danio rerio* kas dokusunda akut muamelede antagonistik etkili olabileceğini göstermektedir. Elde edilen bu sonuç solungaç dokusunda da benzerlik göstermiş olup, metallerin beraber uygulanması (As+Cd) metallerin ayrı uygulandığı şartlara göre solungaç dokusunda metal birikimini azaltmıştır [152].

RAPD bant polimorfizmi, genom yeniden düzenlenmesinden kaynaklanan oligonükleotidlerin bağlanma bölgelerindeki değişiklikler sonucunda da oluşabilmektedir [157, 158]. Yeni oluşan bantlar ortamdaki stres faktörleri sonucu oluşan DNA hasarı kaynaklı olabilmektedir. Ayrıca yeni bant oluşumu genomik kalıp

kararsızlığından da kaynaklanabilmektedir [159]. Genetik stabilite, hücredeki DNA tamir ve replikasyon mekanizmasının etkinliğine bağlı oluşan DNA hasarı ile ilişkilidir [160]. Kimyasal maddeye maruziyet sonucu canlıların çeşitli dokularına ait RAPD profillerinde değişiklikler gözlenmiştir. *Carassius auratus* ile yapılan başka bir çalışmada Ni, Cd, Zn ve Cu maruziyeti sonrasında organizmanın beyin dokusundaki DNA hasarı araştırılmış ve RAPD profillerinde kontrole göre gözlenen bant sayısında değişimler bulunmuştur. Altın balığı *Carassius auratus* sile yapılan, nehir suyunun ekotoksikolojik etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada Brezilya'daki bir nehre ait su örneklerinde metal düzeyleri ve bu metallerin organizmada neden olduğu toplam DNA hasarı RAPD yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışma sonucunda nehir suyunda bulunan metallere bağlı olarak kontrol grubunda görülen DNA bantlarının sayısı muamele gruplarında azalma göstermiştir [161]. Bu çalışmada da diğer çalışmalarda olduğu gibi muamele gruplarında kontrole göre % GTS değişimleri gözlenmiş, Cd 50 µg/L uygulanan grup hariç tüm muamele gruplarında bu değişimlerin anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç, metal uygulaması sonucu hücrenin fonksiyonel birimlerinde meydana gelen DNA hasarı oluştuğunu göstermektedir.

Zebra balığı embriyolarında DNA yanlış eşleşme tamir (MMR) gen ifadeleri Cd muamelesi sonrasında değerlendirilmiş ve subletal dozların embriyolarda gen ifadelerini değiştirdiği bulunmuştur [162]. Zebra balığında ısı şok protein genleri üzerine Cd' un etkileri değerlendirildiğinde 4 saatlik 10 ile 100 µM arasında değişen konsantrasyonlarda Cd uygulandığında HSP 70 ifadesinde bu çalışmada olduğu gibi bir artış rapor edilmiştir [163]. Bazı ağır metallerin özellikle subletal dozlarının *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda denenmiş olduğu birçok organizmada HSPs' yi indüklediği görülmüştür. Metal kontaminasyonuna maruz bırakılan gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nın solungaçlarında HSP 70 birikimi olduğu bulunmuş ve ağır metal, BNF (β-naphthoflavone) , SDS (sodyum dodesil sülfat) ve ağaç endüstri atıkları gibi kirletici ajanların balık dokularında HSP 70 seviyesini ciddi derecede yükselttiği görülmüştür. Diğer bir benzer çalışmada ise SDS ile ağaç endüstri atıklarının subletal konsantrasyonlarına 96 saat boyunca maruz kalan balıkların karaciğerinde total HSP 70 miktarının yükseldiği ortaya çıkmıştır [95]. Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)' nın karaciğer dokusu üzerine yapılan bir çalışmada HSP 70 ekspresyonunun balığa uygulanan metalin doz miktarına bağlı artış gösterildiği görülmüştür. Bir başka

çalışmada ise Cd, As ve Cu' a maruz bırakılan aynı balık türünün karaciğer dokusunda HSC 70 ekspresyonunda bir değişiklik göstermezken, HSP 70' i 3 ile 6 kat arasında arttırdığı bulunmuştur [93]. Çeşitli Cu konsantrasyonları ile (0, 25, 50, 100 ve 200 µM) muamele edilen gökkuşağı alabalığının karaciğer dokusunda, HSP 70ekpresyonunun uygulanan doza bağlı olarak arttığı rapor edilmiştir [97]. Gökkuşağı alabalığı embriyolarında Zn ve Cd' un karaciğerde HSP 70 ve HSP 60 ifadesini artırdığı bildirilmiştir [98]. Ağır metallerin subletal dozlarının *in vivo* ve *in vitro* olarak çalışıldığı birçok organizmada HSPs oluşumunun arttığı saptanmıştır [94, 93]. HSP 70 gen ifadesinin artması, muameleden sonra proteinlerin yanlış katlanması sonucu meydana gelen hücre bozulmasını önlemek üzere hücre koruma mekanizması olarak artış gösterir [164]. Bu çalışmada diğer çalışmalara benzer şekilde 100 µg/L arsenik, 5 µg/L kadmiyum ve Karışım II (As 100 µg/L + Cd 50 µg/L) muamele gruplarının HSP 70' in gen ifadesini kontrole göre arttırdığı tespit edilmiştir. HSP 60 mitokondriyal stres ve hasarın göstergesi olup [164], bu çalışmada en anlamlı artış Karışım II muamele grubunda tespit edilmiştir. Isı şok koşulları için intrinsik sıcaklık göstergesi olarak kullanılan ve mRNA bağlanması ile protein katlanmasında rol oynayan [165] HSP 26, Karışım I ve Karışım II gruplarında kontrole göre anlamlı artışa neden olduğu belirlenmiştir. ATP bağlama, katlanmamış proteinlerin bağlanması, aktin filament organizasyonu ve spermatogenez gibi süreçlerde rol oynayan [166]. HSP 83 gen ifadesi kadmiyum 5 µg/L grubunda kontrole göre anlamlı artış göstermiştir. Bu çalışmada farklı dozlarda metal ve karışımları stres proteinleri üzerinde farklı etki gösterdiği belirlenmiştir. Benzer sonuçlar diğer çalışmalarda da elde edilmiş olup metallerin HSP 70 gen ifadesini arttırmasına rağmen, diğer stres proteinlerini etkilemediği bildirilmiştir [99]. Bu çalışmada da en fazla etkilenen proteinin HSP 70 olduğu, diğer ısı şok proteinlerindeki artışın değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Bu çalışmada sonuç olarak As ve Cd' un çalışmada ayrı ayrı test edildiği yüksek konsantrasyonlarda ve karışım halinde düşük konsantrasyonlarda kontrole göre Zebra balığı kas dokusunda anlamlı birikime neden olduğu ancak daha yüksek karışım oranlarında, As ve Cd metal karışımları aynı oranda artsa bile ortamda belli bir seviyenin üzerinde bulunması antagonistik etki gösterebileceği ve metal birikimini düşürdüğü tespit edilmiştir. Toplam DNA hasarı sonuçları, 100 µg/L As ile Cd' un karışım halinde bulunması % GTS' yi düşürerek DNA hasarına neden olduğu

saptanmıştır. Karışım halinde uygulanan muamele grupları, hücre stres proteinleri olan HSP 26, HSP 60 ve HSP 70 gen ifadelerini kontrole göre anlamlı arttırarak hücre korunma mekanizmasını aktive ettiği belirlenmiştir. Ortamda oluşan stres nedeniyle HSP 70 gen ifadesinin arttığı, karışım dozlarında gözlenen HSP 26 artışının kısmi katlanmış proteinlerle etkileşime girerek hücresel stres cevabın oluştuğu tespit edilmiştir. İçme suyu ve sulama suyu limitlerine göre belirlenen konsantrasyonlarda yapılan bu çalışmada sulama suyu limitlerinin ve metallerin karışım halinde uygulanmasının gen ifadesinde değişikliğe neden olduğu tespit edilmiştir.

Sucul organizmalar ile yapılan metallerin tek tek ve karışım halinde birikimi, etkileri, metallere karşı duyarlılığın belirlenmesi ve organizmanın genetik parametrelerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar; su kaynaklarına yakın bölgelerdeki endüstriyel faaliyetlerin ve kuruluşların sıklıkla denetlenmesi; su ortamı ve sucul organizmalarda kirliliğe yönelik izleme programları ile ekotoksikolojik risk değerlendirme araştırmaları gibi faaliyetler aquatik ekosistemlerin korunmasına ve bu ekosistemlerde canlılığın devamı için önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

[1] AA Al-Janabi, ***Toxic effect of heavy metals on dermatophytes,*** Mycoses, 54, 4, 345-349, (2011).

[2] A Castano, N Bols, T Braunbeck, P Dierickx, M Halder, B Isomaa, K Kawahara, LE Lee, C Mothersill, P Part, G Repetto, JR Sintes, H Rufli, R Smith, C Wood, H Segner , E Workshop, ***The use of fish cells in ecotoxicology. The report and recommendations of ECVAM Workshop 47,*** Altern Lab Anim, 31, 3, 317-351, (2003).

[3] MI Chubirko, GM Basova, NN Stepanova, TA Popova, LN Iakushkina , VP Kuralesina, ***[Biomonitoring of salivary heavy metals],*** Gigiena i sanitariia, 2, 66-67, (2005).

[4] DH Evans, ***Freshwater fish gill ion transport: August Krogh to morpholinos and microprobes,*** Acta physiologica, 202, 3, 349-359, (2011).

[5] HH Fang, LC Xu , KY Chan, ***Effects of toxic metals and chemicals on biofilm and biocorrosion,*** Water research, 36, 19, 4709-4716, (2002).

[6] A Galanis, A Karapetsas , R Sandaltzopoulos, ***Metal-induced carcinogenesis, oxidative stress and hypoxia signalling,*** Mutation research, 674, 1-2, 31-35, (2009).

[7] ZL He, XE Yang , PJ Stoffella, ***Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment,*** Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements, 19, 2-3, 125-140, (2005).

[8] K Jomova, D Vondrakova, M Lawson , M Valko, ***Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders,*** Molecular and cellular biochemistry, 345, 1-2, 91-104, (2010).

[9] A Kahru , HC Dubourguier, ***From ecotoxicology to nanoecotoxicology,*** Toxicology, 269, 2-3, 105-119, (2010).

[10] OI Kubrak, VV Husak, BM Rovenko, JM Storey, KB Storey , VI Lushchak, ***Cobalt-induced oxidative stress in brain, liver and kidney of goldfish Carassius auratus,*** Chemosphere, 85, 6, 983-989, (2011).

[11] P Morcillo, MA Esteban , A Cuesta, ***Heavy metals produce toxicity, oxidative stress and apoptosis in the marine teleost fish SAF-1 cell line,*** Chemosphere, 144, 225-233, (2016).

[12] KV Sastry , S Tyagi, ***Toxic effects of chromium in a freshwater teleost fish, Channa punctatus,*** Toxicology letters, 11, 1-2, 17-21, (1982).

[13] L Tamas, J Huttova, I Mistrik, M Simonovicova , B Siroka, ***Aluminium-induced drought and oxidative stress in barley roots,*** Journal of plant physiology, 163, 7, 781-784, (2006).

[14] M Valko, H Morris , MT Cronin, ***Metals, toxicity and oxidative stress,*** Current medicinal chemistry, 12, 10, 1161-1208, (2005).

[15] N Vural, ***Toksikoloji,*** Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 73, (1996).

[16] S Zrncic, D Oraic, M Caleta, Z Mihaljevic, D Zanella , N Bilandzic, ***Biomonitoring of heavy metals in fish from the Danube River,*** Environ Monit Assess, 185, 2, 1189-1198, (2013).

[17] AC Bosch, B O'Neill, GO Sigge, SE Kerwath , LC Hoffman, ***Heavy metals in marine fish meat and consumer health: a review,*** J Sci Food Agric, 96, 1, 32-48, (2016).

[18] F Guo, J Yao , WX Wang, ***Bioavailability of purified subcellular metals to a marine fish,*** Environmental toxicology and chemistry / SETAC, 32, 9, 2109-2116, (2013).

[19] BD Laird , HM Chan, ***Bioaccessibility of metals in fish, shellfish, wild game, and seaweed harvested in British Columbia, Canada,*** Food and chemical toxicology : an

international journal published for the British Industrial Biological Research Association, 58, 381-387, (2013).

[20] S Rajeshkumar, J Mini , N Munuswamy, ***Effects of heavy metals on antioxidants and expression of HSP70 in different tissues of Milk fish (Chanos chanos) of Kaattuppalli Island, Chennai, India,*** Ecotoxicology and environmental safety, 98, 8-18, (2013).

[21] M Shuhaimi-Othman, N Yakub, NA Ramle , A Abas, ***Comparative toxicity of eight metals on freshwater fish,*** Toxicol Ind Health, 31, 9, 773-782, (2015).

[22] AY Sonmez, AM Yaganoglu, G Arslan , O Hisar, ***Metals in two species of fish in Karasu River,*** Bulletin of environmental contamination and toxicology, 89, 6, 1190-1195, (2012).

[23] D Thiyagarajan, KV Dhaneesh, TT Ajith Kumar, S Kumaresan , T Balasubramanian, ***Metals in fish along the southeast coast of India,*** Bulletin of environmental contamination and toxicology, 88, 4, 582-588, (2012).

[24] M Rajkowska , M Protasowicki, ***Distribution of metals (Fe, Mn, Zn, Cu) in fish tissues in two lakes of different trophy in Northwestern Poland,*** Environ Monit Assess, 185, 4, 3493-3502, (2013).

[25] MM Obaidat, AM Massadeh, AM Al-Athamneh , QM Jaradat, ***Heavy metals in fish from the Red Sea, Arabian Sea, and Indian Ocean: effect of origin, fish species and size and correlation among the metals,*** Environ Monit Assess, 187, 4, 218, (2015).

[26] P Pereira, H de Pablo, M Pacheco , C Vale, ***The relevance of temporal and organ specific factors on metals accumulation and biochemical effects in feral fish (Liza aurata) under a moderate contamination scenario,*** Ecotoxicology and environmental safety, 73, 5, 805-816, (2010).

[27] A Turkmen, M Turkmen, Y Tepe , M Cekic, ***Metals in tissues of fish from Yelkoma Lagoon, northeastern Mediterranean,*** Environ Monit Assess, 168, 1-4, 223-230, (2010).

[28] AK Basaran, M Aksu , O Egemen, ***Impacts of the fish farms on the water column nutrient concentrations and accumulation of heavy metals in the sediments in the eastern Aegean Sea (Turkey),*** Environ Monit Assess, 162, 1-4, 439-451, (2010).

[29] K Jeyasingham , N Ling, ***Acute toxicity of arsenic to three species of New Zealand Chironomids: Chironomus zealandicus, Chironomus sp. a and Polypedilum pavidus (Diptera, Chironomidae),*** Bulletin of environmental contamination and toxicology, 64, 5, 708-715, (2000).

[30] U Biswas, S Sarkar, MK Bhowmik, AK Samanta , S Biswas, ***Chronic toxicity of arsenic in goats: clinicobiochemical changes, pathomorphology and tissue residues,*** Small ruminant research : the journal of the International Goat Association, 38, 3, 229-235, (2000).

[31] T Tisler , J Zagorc-Koncan, ***Acute and chronic toxicity of arsenic to some aquatic organisms,*** Bulletin of environmental contamination and toxicology, 69, 3, 421-429, (2002).

[32] YS Vardhanan , T Radhakrishnan, ***Acute toxicity evaluation of copper, arsenic and HCH to paddy field crab, Paratelphusa hydrodromus (Herb.),*** J Environ Biol, 23, 4, 387-392, (2002).

[33] PB Tchounwou, JA Centeno , AK Patlolla, ***Arsenic toxicity, mutagenesis, and carcinogenesis--a health risk assessment and management approach,*** Molecular and cellular biochemistry, 255, 1-2, 47-55, (2004).

[34] RC Lantz , AM Hays, ***Role of oxidative stress in arsenic-induced toxicity,*** Drug metabolism reviews, 38, 4, 791-804, (2006).

[35] A Wang, SD Holladay, DC Wolf, SA Ahmed , JL Robertson, ***Reproductive and developmental toxicity of arsenic in rodents: a review,*** Int J Toxicol, 25, 5, 319-331, (2006).

[36] DN Guha Mazumder, ***Chronic arsenic toxicity & human health,*** The Indian journal of medical research, 128, 4, 436-447, (2008).

[37] L Patrick, ***Toxic metals and antioxidants: Part II. The role of antioxidants in arsenic and cadmium toxicity,*** Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic, 8, 2, 106-128, (2003).

[38] WH Organization, ***Guidelines for drinking-water quality - 4th ed.,*** (2011).

[39] MM Storelli , GO Marcotrigiano, ***Organic and inorganic arsenic and lead in fish from the South Adriatic Sea, Italy,*** Food Addit Contam, 17, 9, 763-768, (2000).

[40] D Sayed Ael, HA Elbaghdady , E Zahran, ***Arsenic-induced genotoxicity in Nile tilapia (Orechromis niloticus); the role of Spirulina platensis extract,*** Environ Monit Assess, 187, 12, 751, (2015).

[41] R Colognato, F Coppede, J Ponti, E Sabbioni , L Migliore, ***Genotoxicity induced by arsenic compounds in peripheral human lymphocytes analysed by cytokinesis-block micronucleus assay,*** Mutagenesis, 22, 4, 255-261, (2007).

[42] TK Hei , M Filipic, ***Role of oxidative damage in the genotoxicity of arsenic,*** Free radical biology & medicine, 37, 5, 574-581, (2004).

[43] H Yi, L Wu , L Jiang, ***Genotoxicity of arsenic evaluated by Allium-root micronucleus assay,*** The Science of the total environment, 383, 1-3, 232-236, (2007).

[44] M Kumar, M Lalit , R Thakur, ***Natural Antioxidants Against Arsenic-Induced Genotoxicity,*** Biological trace element research, 170, 1, 84-93, (2016).

[45] Y Lai, W Zhao, C Chen, M Wu , Z Zhang, ***Role of DNA polymerase beta in the genotoxicity of arsenic,*** Environmental and molecular mutagenesis, 52, 6, 460-468, (2011).

[46] F Faita, L Cori, F Bianchi , MG Andreassi, ***Arsenic-induced genotoxicity and genetic susceptibility to arsenic-related pathologies,*** Int J Environ Res Public Health, 10, 4, 1527-1546, (2013).

[47] G Avani , MV Rao, ***In vitro genotoxicity assays to evaluate the role of vitamin A on arsenic in human lymphocytes,*** Ecotoxicology and environmental safety, 72, 2, 635-638, (2009).

[48] P Ramos-Morales , R Rodriguez-Arnaiz, ***Genotoxicity of two arsenic compounds in germ cells and somatic cells of Drosophila melanogaster,*** Environmental and molecular mutagenesis, 25, 4, 288-299, (1995).

[49] S Barhoumi, I Messaoudi, T Deli, K Said , A Kerkeni, ***Cadmium bioaccumulation in three benthic fish species, Salaria basilisca, Zosterisessor ophiocephalus and Solea vulgaris collected from the Gulf of Gabes in Tunisia,*** J Environ Sci (China), 21, 7, 980-984, (2009).

[50] I Messaoudi, S Barhoumi, K Said , A Kerken, ***Study on the sensitivity to cadmium of marine fish Salaria basilisca (Pisces: Blennidae),*** J Environ Sci (China), 21, 11, 1620-1624, (2009).

[51] J Kalman, I Riba, T Angel DelValls , J Blasco, ***Comparative toxicity of cadmium in the commercial fish species Sparus aurata and Solea senegalensis,*** Ecotoxicology and environmental safety, 73, 3, 306-311, (2010).

[52] RJ Maunder, J Buckley, AL Val , KA Sloman, ***Accumulation of dietary and aqueous cadmium into the epidermal mucus of the discus fish Symphysodon sp,*** Aquatic toxicology, 103, 3-4, 205-212, (2011).

[53] DM Ongeri, JO Lalah, SO Wandiga, KW Schramm , B Michalke, ***Seasonal variability in cadmium, lead, copper, zinc and iron concentrations in the three major fish species, Oreochromis niloticus, Lates niloticus and Rastrineobola argentea in Winam Gulf, Lake Victoria: impact of wash-off into the lake,*** Bulletin of environmental contamination and toxicology, 88, 2, 166-171, (2012).

[54] P Kumar, Y Prasad, AK Patra , D Swarup, ***Levels of cadmium and lead in tissues of freshwater fish (Clarias batrachus L.) and chicken in Western UP (India),*** Bulletin of environmental contamination and toxicology, 79, 4, 396-400, (2007).

[55] S Nandini, J Chaparro-Herrera Dde, SL Cardenas-Arriola , SS Sarma, ***Population growth of Brachionus macracanthus (Rotifera) in relation to cadmium toxicity: influence of algal (Chlorella vulgaris) density,*** J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng, 42, 10, 1467-1472, (2007).

[56] Y Zhang, D Huang, D Zhao, J Long, G Song , A Li, ***Long-term toxicity effects of cadmium and lead on Bufo raddei tadpoles,*** Bulletin of environmental contamination and toxicology, 79, 2, 178-183, (2007).

[57] JR Lee, SJ Park, HS Lee, SY Jee, J Seo, YK Kwon, TK Kwon , SC Kim, ***Hepatoprotective Activity of Licorice Water Extract against Cadmium-induced Toxicity in Rats,*** Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM, 6, 2, 195-201, (2009).

[58] S Morin, TT Duong, O Herlory, A Feurtet-Mazel , M Coste, ***Cadmium toxicity and bioaccumulation in freshwater biofilms,*** Archives of environmental contamination and toxicology, 54, 2, 173-186, (2008).

[59] V Nunia , PK Goyal, ***Protective effect of diltiazem (a calcium channel blocker) against cadmium-induced toxicity in mice,*** Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer, 26, 3, 185-193, (2007).

[60] AJ Wigginton , WJ Birge, ***Toxicity of cadmium to six species in two genera of crayfish and the effect of cadmium on molting success,*** Environmental toxicology and chemistry / SETAC, 26, 3, 548-554, (2007).

[61] M Viau, V Collin-Faure, P Richaud, JL Ravanat , SM Candeias, ***Cadmium and T cell differentiation: limited impact in vivo but significant toxicity in fetal thymus organ culture,*** Toxicology and applied pharmacology, 223, 3, 257-266, (2007).

[62] E Prato, C Scardicchio , F Biandolino, ***Effects of temperature on the acute toxicity of cadmium to Corophium insidiosum,*** Environ Monit Assess, 136, 1-3, 161-166, (2008).

[63] OA Ramirez , FP Garcia, ***Genotoxic damage in zebra fish (Danio rerio) by arsenic in waters from Zimapan, Hidalgo, Mexico,*** Mutagenesis, 20, 4, 291-295, (2005).

[64] U Gundel, D Benndorf, M von Bergen, R Altenburger , E Kuster, ***Vitellogenin cleavage products as indicators for toxic stress in zebra fish embryos: a proteomic approach,*** Proteomics, 7, 24, 4541-4554, (2007).

[65] R Gerlai, ***Zebra fish: an uncharted behavior genetic model,*** Behav Genet, 33, 5, 461-468, (2003).

[66] A Endo , TH Ingalls, ***Chromosomes of the zebra fish. A model for cytogenetic, embryologic, and ecologic study,*** J Hered, 59, 6, 382-384, (1968).

[67] R Gerlai, M Lahav, S Guo , A Rosenthal, ***Drinks like a fish: zebra fish (Danio rerio) as a behavior genetic model to study alcohol effects,*** Pharmacology, biochemistry, and behavior, 67, 4, 773-782, (2000).

[68] SS Vutukuru, J Ganugapati, V Ganesh, P Atheeksha , RB Potti, ***Endocrine disruption by Bisphenol A, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ether, in zebra fish (Danio rerio) model: an in silico approach,*** Fish Physiol Biochem, (2016).

[69] M Hou , J Xie, ***[Insight into tuberculosis pathogenic mechanism from the zebra fish-Mycobacterium marinum model--a review],*** Wei Sheng Wu Xue Bao, 50, 1, 15-22, (2010).

[70] G Streisinger, C Walker, N Dower, D Knauber , F Singer, ***Production of clones of homozygous diploid zebra fish (Brachydanio rerio),*** Nature, 291, 5813, 293-296, (1981).

[71] F Ladu, S Butail, S Macri , M Porfiri, ***Sociality modulates the effects of ethanol in zebra fish,*** Alcoholism, clinical and experimental research, 38, 7, 2096-2104, (2014).

[72] G Vidal, B Scheffler, A Michel , SJ D'Surney, ***Genomic and phylogenic comparisons of the alpha-globin and beta-globin intergenic sequences between zebra fish (Danio rerio) and six closely related Cyprinindae species,*** DNA and cell biology, 23, 5, 325-334, (2004).

[73] TO Bender, M Bohm, K Kratochwill, H Lederhuber, M Endemann, B Bidmon , C Aufricht, ***HSP-mediated cytoprotection of mesothelial cells in experimental acute peritoneal dialysis,*** Peritoneal dialysis international : journal of the International Society for Peritoneal Dialysis, 30, 3, 294-299, (2010).

[74] TO Bender, K Kratochwill, R Herzog, A Ulbrich, M Bohm, A Jorres , C Aufricht, ***Injury-induced inflammation and inadequate HSP expression in mesothelial cells upon repeat exposure to dual-chamber bag peritoneal dialysis fluids,*** The International journal of artificial organs, 38, 10, 530-536, (2015).

[75] S Banerjee, T Mitra, GK Purohit, S Mohanty , BP Mohanty, ***Immunomodulatory effect of arsenic on cytokine and HSP gene expression in Labeo rohita fingerlings,*** Fish & shellfish immunology, 44, 1, 43-49, (2015).

[76] JJ Brunt, S Khan , JJ Heikkila, ***Sodium arsenite and cadmium chloride induction of proteasomal inhibition and HSP accumulation in Xenopus laevis A6 kidney epithelial cells,*** Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP, 155, 2, 307-317, (2012).

[77] SS Dangi, M Gupta, D Maurya, VP Yadav, RP Panda, G Singh, NH Mohan, SK Bhure, BC Das, S Bag, R Mahapatra, G Taru Sharma , M Sarkar, ***Expression profile of HSP genes during different seasons in goats (Capra hircus),*** Trop Anim Health Prod, 44, 8, 1905-1912, (2012).

[78] J Dudley, G Smith, A Llewelyn-Edwards, K Bayliss, K Pike , J Tizard, ***Randomised, double-blind, placebo-controlled trial to determine whether steroids reduce the incidence and severity of nephropathy in Henoch-Schonlein Purpura (HSP),*** Archives of disease in childhood, 98, 10, 756-763, (2013).

[79] M Wiesgigl , J Clos, ***Uniform distribution of transcription complexes over the entire Leishmania donovani clpB (hsp 100) gene locus,*** Protist, 150, 4, 369-373, (1999).

[80] M Miot, M Reidy, SM Doyle, JR Hoskins, DM Johnston, O Genest, MC Vitery, DC Masison , S Wickner, ***Species-specific collaboration of heat shock proteins (Hsp) 70 and 100 in thermotolerance and protein disaggregation,*** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108, 17, 6915-6920, (2011).

[81] J Garcia Lorenzo, X Leon Vintro , M Camacho Perez de Madrid, ***HSP-90 expression as a predictor of response to radiotherapy in head and neck cancer patients,*** Acta otorrinolaringologica espanola, 67, 3, 130-134, (2016).

[82] MG Catelli, N Binart, JR Feramisco , DM Helfman, ***Cloning of the chick hsp 90 cDNA in expression vector,*** Nucleic Acids Res, 13, 17, 6035-6047, (1985).

[83] B Vastag, ***HSP-90 inhibitors promise to complement cancer therapies,*** Nature biotechnology, 24, 11, 1307, (2006).

[84] NA Him, V Gillan, RD Emes, K Maitland , E Devaney, ***Hsp-90 and the biology of nematodes,*** BMC Evol Biol, 9, 254, (2009).

[85] RC Matthews, ***HSP 90, yeasts and Corynebacterium jeikeium,*** Epidemiology and infection, 107, 2, 273-283, (1991).

[86] J Lee, JH Kim, AB Biter, B Sielaff, S Lee , FT Tsai, ***Heat shock protein (Hsp) 70 is an activator of the Hsp104 motor,*** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110, 21, 8513-8518, (2013).

[87] K Kim, ***Interaction between HSP 70 and iNOS in skeletal muscle injury and repair,*** Journal of exercise rehabilitation, 11, 5, 240-243, (2015).

[88] CP Silveira, AC Piffer, L Kmetzsch, FL Fonseca, DA Soares, CC Staats, ML Rodrigues, A Schrank , MH Vainstein, ***The heat shock protein (Hsp) 70 of Cryptococcus neoformans is associated with the fungal cell surface and influences the interaction between yeast and host cells,*** Fungal genetics and biology : FG & B, 60, 53-63, (2013).

[89] T Ergun, U Ince, E Eksioglu-Demiralp, H Direskeneli, O Gurbuz, L Gurses, F Aker , T Akoglu, ***HSP 60 expression in mucocutaneous lesions of Behcet's disease,*** Journal of the American Academy of Dermatology, 45, 6, 904-909, (2001).

[90] MR Rossi, S Somji, SH Garrett, MA Sens, J Nath , DA Sens, ***Expression of hsp 27, hsp 60, hsc 70, and hsp 70 stress response genes in cultured human urothelial cells (UROtsa) exposed to lethal and sublethal concentrations of sodium arsenite,*** Environmental health perspectives, 110, 12, 1225-1232, (2002).

[91] EJ Lee, JY Lim, SY Lee, SH Lee, KH In, SH Yoo, D Sul , S Park, ***The expression of HSPs, anti-oxidants, and cytokines in plasma and bronchoalveolar lavage fluid of patients with acute respiratory distress syndrome,*** Clinical biochemistry, 45, 6, 493-498, (2012).

[92] P Piper, ***Differential role of Hsps and trehalose in stress tolerance,*** Trends in microbiology, 6, 2, 43-44, (1998).

[93] S Rajeshkumar , N Munuswamy, ***Impact of metals on histopathology and expression of HSP 70 in different tissues of Milk fish (Chanos chanos) of Kaattuppalli Island, South East Coast, India,*** Chemosphere, 83, 4, 415-421, (2011).

[94] BM Kim, JS Rhee, CB Jeong, JS Seo, GS Park, YM Lee , JS Lee, ***Heavy metals induce oxidative stress and trigger oxidative stress-mediated heat shock protein (hsp) modulation in the intertidal copepod Tigriopus japonicus,*** Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP, 166, 65-74, (2014).

[95] LK Duffy, E Scofield, T Rodgers, M Patton , RT Bowyer, ***Comparative baseline levels of mercury, Hsp 70 and Hsp 60 in subsistence fish from the Yukon-Kuskokwim delta region of Alaska,*** Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol, 124, 2, 181-186, (1999).

[96] RA Badin, MF Lythgoe, L van der Weerd, DL Thomas, DG Gadian , DS Latchman, ***Neuroprotective effects of virally delivered HSPs in experimental stroke,*** Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 26, 3, 371-381, (2006).

[97] Q Feng, AN Boone , MM Vijayan, ***Copper impact on heat shock protein 70 expression and apoptosis in rainbow trout hepatocytes,*** Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP, 135C, 3, 345-355, (2003).

[98] S Ait-Aissa, O Ausseil, O Palluel, E Vindimian, J Garnier-Laplace , JM Porcher, ***Biomarker responses in juvenile rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) after single and combined exposure to low doses of cadmium, zinc, PCB77 and 17beta-oestradiol,*** Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals, 8, 6, 491-508, (2003).

[99] M Lyons-Alcantara, R Mooney, F Lyng, D Cottell , C Mothersill, ***The effects of cadmium exposure on the cytology and function of primary cultures from rainbow trout,*** Cell biochemistry and function, 16, 1, 1-13, (1998).

[100] RJ Roberts, C Agius, C Saliba, P Bossier , YY Sung, ***Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: a review,*** Journal of fish diseases, 33, 10, 789-801, (2010).

[101] Y Bakri, MI Arabi , M Jawhar, ***RAPD technique is a useful tool to distinguish Penicillium species,*** Polish journal of microbiology / Polskie Towarzystwo Mikrobiologow = The Polish Society of Microbiologists, 56, 4, 273-276, (2007).

[102] ER Duarte , JS Hamdan, ***RAPD differentiation of Malassezia spp. from cattle, dogs and humans,*** Mycoses, 53, 1, 48-56, (2010).

[103] EH Sari, MG Tavares , LA Campos, ***RAPD variation within and among species of Melittobia westwood (Hymenoptera: Eulophidae),*** Neotrop Entomol, 35, 2, 201-205, (2006).

[104] E Walczak, A Czaplinska, W Barszczewski, M Wilgosz, M Wojtatowicz , M Robak, ***RAPD with microsatellite as a tool for differentiation of Candida genus yeasts isolated in brewing,*** Food microbiology, 24, 3, 305-312, (2007).

[105] ML Zhu, MH Mo, ZY Xia, YH Li, SJ Yang, TF Li , KQ Zhang, ***Detection of two fungal biocontrol agents against root-knot nematodes by RAPD markers,*** Mycopathologia, 161, 5, 307-316, (2006).

[106] L Iacumin, G Comi, C Cantoni , L Cocolin, ***Molecular and technological characterization of Staphylococcus xylosus isolated from naturally fermented Italian sausages by RAPD, Rep-PCR and Sau-PCR analysis,*** Meat science, 74, 2, 281-288, (2006).

[107] PR Butovskaia, GV Pavlova, IA Martirosian, GT Sukhikh , AP Ryskov, ***[Somatic mosaicism in mice detected using the RAPD-PCR method],*** Molekuliarnaia genetika, mikrobiologiia i virusologiia, 1, 3-7, (2009).

[108] PS Mishra, A Chaudhari, G Krishna, D Kumar , WS Lakra, ***Genetic diversity in Metapenaeus dobsoni using RAPD analysis,*** Biochem Genet, 47, 5-6, 421-426, (2009).

[109] M Szczepaniak, W Bieniek, P Boron, M Szklarczyk , M Mizianty, ***A contribution to characterisation of genetic variation in some natural Polish populations of Elymus repens (L.) Gould and Elymus hispidus (Opiz) Melderis (Poaceae) as revealed by RAPD markers,*** Plant biology, 11, 5, 766-773, (2009).

[110] B Currie, ***Real-time PCR testing for CDI improves outcomes and reduces costs,*** MLO: medical laboratory observer, 41, 10, 18-20, (2009).

[111] Z Kesmen, A Gulluce, F Sahin , H Yetim, ***Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay,*** Meat science, 82, 4, 444-449, (2009).

[112] Y Kohayagawa, Y Izumi, M Ushita, N Niinou, M Koshizaki, Y Yamamori, S Kaneko , H Fukushima, ***[Real-time PCR in rapid diagnosis of Aeromonas hydrophila necrotizing soft tissue infections],*** Kansenshogaku zasshi. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases, 83, 6, 673-678, (2009).

[113] D Lee, PJ Chen , GB Lee, ***The evolution of real-time PCR machines to real-time PCR chips,*** Biosens Bioelectron, 25, 7, 1820-1824, (2010).

[114] C Martinhago, L Vagnini, C Petersen, A Mauri, R Baruffi, R de Oliveira , J Franco, Jr., ***Development of a real-time PCR method for rapid sexing of human preimplantation embryos,*** Reproductive biomedicine online, 20, 1, 75-82, (2010).

[115] S Lin, B Gilpin, P Scholes, E Podivinsky, J Klena , M Savill, ***Preliminary development and validation of a real-time reverse transcription PCR assay for the semi-quantification of viable Campylobacter jejuni in water samples,*** Water Sci Technol, 60, 12, 3151-3158, (2009).

[116] L Tapia, ***[Rapid diagnosis of respiratory viruses with Luminex versus real time PCR],*** Revista chilena de infectologia : organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectologia, 27, 6, 575, (2010).

[117] BK Babu, S Mesapogu, A Sharma, SR Somasani , DK Arora, ***Quantitative real-time PCR assay for rapid detection of plant and human pathogenic Macrophomina phaseolina from field and environmental samples,*** Mycologia, 103, 3, 466-473, (2011).

[118] M Palle-Reisch, M Cichna-Markl , R Hochegger, ***Development and validation of a duplex real-time PCR assay for the simultaneous detection of three mustard species (Sinapis alba, Brassica nigra and Brassica juncea) in food,*** Food chemistry, 153, 66-73, (2014).

[119] MT Pyne , DR Hillyard, ***Evaluation of the Roche COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV Test,*** Diagnostic microbiology and infectious disease, 77, 1, 25-30, (2013).

[120] P Blanchard, S Guillot, K Antunez, H Koglberger, P Kryger, JR de Miranda, S Franco, MP Chauzat, R Thiery , M Ribiere, ***Development and validation of a real-time two-step RT-qPCR TaqMan((R)) assay for quantitation of Sacbrood virus (SBV) and its application to a field survey of symptomatic honey bee colonies,*** J Virol Methods, 197, 7-13, (2014).

[121] MR Lee, KP Chung, HC Wang, CB Lin, CJ Yu, JJ Lee , PR Hsueh, ***Evaluation of the Cobas TaqMan MTB real-time PCR assay for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens,*** Journal of medical microbiology, 62, Pt 8, 1160-1164, (2013).

[122] AI Dragan, R Pavlovic, JB McGivney, JR Casas-Finet, ES Bishop, RJ Strouse, MA Schenerman , CD Geddes, ***SYBR Green I: fluorescence properties and interaction with DNA,*** Journal of fluorescence, 22, 4, 1189-1199, (2012).

[123] M Chetta, V Bafunno, R Grillo, A Mele, P Lo Perfido, M Notarnicola, F Cellini , RA Cifarelli, ***SYBR green real time-polymerase chain reaction as a rapid and alternative assay for the efficient identification of all existing Escherichia coli biotypes approved directly in wastewater samples,*** Biotechnology progress, 28, 4, 1106-1113, (2012).

[124] P Thanakiatkrai , L Welch, ***Using the Taguchi method for rapid quantitative PCR optimization with SYBR Green I,*** International journal of legal medicine, 126, 1, 161-165, (2012).

[125] N Stobener, S Amayri, A Gehl, U Kaplan, K Malecha , T Reich, ***Sensitive redox speciation of neptunium by CE-ICP-MS,*** Anal Bioanal Chem, 404, 8, 2143-2150, (2012).

[126] MH Yang, CH Lin, LW Chang , P Lin, ***Application of ICP-MS for the study of disposition and toxicity of metal-based nanomaterials,*** Methods in molecular biology, 926, 345-359, (2012).

[127] XW Zhang, YH Li, LS Yang, HR Li , WY Wang, ***[Determination of five trace elements (Pb, Cd, Se, As and Hg) in human whole blood by temperature-controllable wet digestion and ICP-MS technique],*** Guang pu xue yu guang pu fen xi = Guang pu, 30, 7, 1972-1974, (2010).

[128] YA Sun, SQ Song, GQ Wang, LF Wei , ZX Li, ***[Determination of trace elements in tobaccos by microwave digestion/ICP-MS method],*** Guang pu xue yu guang pu fen xi = Guang pu, 30, 7, 1968-1971, (2010).

[129] S Bakanlığı, ***YÖNETMELİK İTASH,*** Resmi Gazete, 25730, (17 Şubat 2005).

[130] W Liu, YS Yang, Q Zhou, L Xie, P Li , T Sun, ***Impact assessment of cadmium contamination on rice (Oryza sativa L.) seedlings at molecular and population levels using multiple biomarkers,*** Chemosphere, 67, 6, 1155-1163, (2007).

[131] JL Culioli, S Calendini, C Mori , A Orsini, ***Arsenic accumulation in a freshwater fish living in a contaminated river of Corsica, France,*** Ecotoxicology and environmental safety, 72, 5, 1440-1445, (2009).

[132] RL Spehar, JT Fiandt, RL Anderson , DL DeFoe, ***Comparative toxicity of arsenic compounds and their accumulation in invertebrates and fish,*** Archives of environmental contamination and toxicology, 9, 1, 53-63, (1980).

[133] A Takatsu, T Kuroiwa , A Uchiumi, ***Arsenic accumulation in organs of the fresh water fish Tribolodon hakonensis,*** Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements, 13, 3, 176-179, (1999).

[134] CP Liang, CW Liu, CS Jang, SW Wang , JJ Lee, ***Assessing and managing the health risk due to ingestion of inorganic arsenic from fish and shellfish farmed in blackfoot disease areas for general Taiwanese,*** Journal of hazardous materials, 186, 1, 622-628, (2011).

[135] J Ventura-Lima, MR de Castro, D Acosta, D Fattorini, F Regoli, LM de Carvalho, D Bohrer, LA Geracitano, DM Barros, LF Marins, RS da Silva, CD Bonan, MR Bogo , JM Monserrat, ***Effects of arsenic (As) exposure on the antioxidant status of gills of the zebrafish Danio rerio (Cyprinidae),*** Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP, 149, 4, 538-543, (2009).

[136] FJ Liu, GP Cobb, TA Anderson, QQ Cheng , CW Theodorakis, ***Uptake, accumulation and depuration of sodium perchlorate and sodium arsenate in zebrafish (Danio rerio),*** Chemosphere, 65, 10, 1679-1689, (2006).

[137] EM Sorensen, ***Toxicity and accumulation of arsenic in green sunfish, Lepomis cyanellus, exposed to arsenate in water,*** Bulletin of environmental contamination and toxicology, 15, 6, 756-761, (1976).

[138] SM Wu, KJ Jong , YJ Lee, ***Relationships among metallothionein, cadmium accumulation, and cadmium tolerance in three species of fish,*** Bulletin of environmental contamination and toxicology, 76, 4, 595-600, (2006).

[139] F Dang , WX Wang, ***Assessment of tissue-specific accumulation and effects of cadmium in a marine fish fed contaminated commercially produced diet,*** Aquatic toxicology, 95, 3, 248-255, (2009).

[140] S Cambier, P Gonzalez, G Durrieu , JP Bourdineaud, ***Cadmium-induced genotoxicity in zebrafish at environmentally relevant doses,*** Ecotoxicology and environmental safety, 73, 3, 312-319, (2010).

[141] R Qu, X Wang, Z Wang, Z Wei , L Wang, ***Metal accumulation and antioxidant defenses in the freshwater fish Carassius auratus in response to single and combined exposure to cadmium and hydroxylated multi-walled carbon nanotubes,*** Journal of hazardous materials, 275, 89-98, (2014).

[142] AV Hallare, M Schirling, T Luckenbach, HR Kohler , R Triebskorn, ***Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (Danio rerio) embryos,*** J Therm Biol, 30, 1, 7-17, (2005).

[143] CA Mebane, FS Dillon , DP Hennessy, ***Acute toxicity of cadmium, lead, zinc, and their mixtures to stream-resident fish and invertebrates,*** Environmental toxicology and chemistry / SETAC, 31, 6, 1334-1348, (2012).

[144] CJ Schmitt, JJ Whyte, WG Brumbaugh , DE Tillitt, ***Biochemical effects of lead, zinc, and cadmium from mining on fish in the Tri-States District of northeastern Oklahoma, USA,*** Environmental toxicology and chemistry / SETAC, 24, 6, 1483-1495, (2005).

[145] Y Keskin, R Baskaya, O Ozyaral, T Yurdun, NE Luleci , O Hayran, ***Cadmium, lead, mercury and copper in fish from the Marmara Sea, Turkey,*** Bulletin of environmental contamination and toxicology, 78, 3-4, 258-261, (2007).

[146] I Komjarova , NR Bury, ***Evidence of common cadmium and copper uptake routes in zebrafish Danio rerio,*** Environmental science & technology, 48, 21, 12946-12951, (2014).

[147] I Ferrandino, R Favorito, M Annunziata , MC Grimaldi, ***Cadmium induces apoptosis in the pituitary gland of Podarcis sicula,*** Annals of the New York Academy of Sciences, 1163, 386-388, (2009).

[148] JS Lee, MH Zhang, EK Yun, D Geum, K Kim, TH Kim, YS Lim , JS Seo, ***Heat shock protein 27 interacts with vimentin and prevents insolubilization of vimentin subunits induced by cadmium,*** Experimental & molecular medicine, 37, 5, 427-435, (2005).

[149] S Naz , M Javed, ***Growth Responses of Fish During Chronic Exposure of Metal Mixture under Laboratory Conditions,*** Pak Vet J, 33, 3, 354-357, (2013).

[150] C Kamunde , R MacPhail, ***Metal-metal interactions of dietary cadmium, copper and zinc in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss,*** Ecotoxicology and environmental safety, 74, 4, 658-667, (2011).

[151] MHS Kraak, D Lavy, H Schoon, M Toussaint, WHM Peeters , NM Vanstraalen, ***Ecotoxicity of Mixtures of Metals to the Zebra Mussel Dreissena-Polymorpha,*** Environ Toxicol Chem, 13, 1, 109-114, (1994).

[152] O Doganlar, ZB Doganlar, FDG Muranli , U Guner, ***Genotoxic Effect and Carcinogenic Potential of a Mixture of As and Cd in Zebrafish at Permissible Maximum Contamination Levels for Drinking Water,*** Water Air Soil Poll, 227, 3, (2016).

[153] I Komjarova , R Blust, ***Multimetal interactions between Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn uptake from water in the zebrafish Danio rerio,*** Environmental science & technology, 43, 19, 7225-7229, (2009).

[154] D Alsop , CM Wood, ***Metal and pharmaceutical mixtures: is ion loss the mechanism underlying acute toxicity and widespread additive toxicity in zebrafish?,*** Aquatic toxicology, 140-141, 257-267, (2013).

[155] PMD Prasath , TH Khan, ***Impact of Tsunami on the Heavy Metal Accumulation in Water, Sediments and Fish at Poompuhar Coast, Southeast Coast of India,*** E-J Chem, 5, 1, 16-22, (2008).

[156] F Kargin , HY Cogun, ***Metal interactions during accumulation and elimination of zinc and cadmium in tissues of the freshwater fish Tilapia nilotica,*** Bulletin of environmental contamination and toxicology, 63, 4, 511-519, (1999).

[157] FA Atienzar, M Conradi, AJ Evenden, AN Jha , MH Depledge, ***Qualitative assessment of genotoxicity using random amplified polymorphic DNA: comparison of genomic template stability with key fitness parameters in Daphnia magna exposed to benzo[a]pyrene,*** Environ Toxicol Chem, 18, 2275–2282, (1999).

[158] C Conte, I Mutti, P Puglisi, A Ferrarini, G Regina, E Maestri , N Marmiroli, ***DNA fingerprinting analysis by a PCR based method for monitoring the genotoxic effects of heavy metals pollution,*** Chemosphere, 37, 14-15, 2739-2749, (1998).

[159] W Liu, PJ Li, XM Qi, QX Zhou, L Zheng, TH Sun , YS Yang, ***DNA changes in barley (Hordeum vulgare) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis,*** Chemosphere, 61, 2, 158-167, (2005).

[160] I Silins , J Hogberg, ***Combined toxic exposures and human health: biomarkers of exposure and effect,*** Int J Environ Res Public Health, 8, 3, 629-647, (2011).

[161] YM Zhang, DJ Huang, YQ Wang, JH Liu, RL Yu , J Long, ***Heavy metal accumulation and tissue damage in goldfish Carassius auratus,*** Bulletin of environmental contamination and toxicology, 75, 6, 1191-1199, (2005).

[162] CM Kapron-Bras , BF Hales, ***Heat-shock induced tolerance to the embryotoxic effects of hyperthermia and cadmium in mouse embryos in vitro,*** Teratology, 43, 1, 83-94, (1991).

[163] KS Ali, L Dorgai, A Gazdag, M Abraham , E Hermesz, ***Identification and induction of hsp70 gene by heat shock and cadmium exposure in carp,*** Acta Biol Hung, 54, 3-4, 323-334, (2003).

[164] RD Martinus, GP Garth, TL Webster, P Cartwright, DJ Naylor, PB Hoj , NJ Hoogenraad, ***Selective induction of mitochondrial chaperones in response to loss of the mitochondrial genome,*** Eur J Biochem, 240, 1, 98-103, (1996).

[165] NP Tucker, T Ghosh, M Bush, X Zhang , R Dixon, ***Essential roles of three enhancer sites in sigma54-dependent transcription by the nitric oxide sensing regulatory protein NorR,*** Nucleic Acids Res, 38, 4, 1182-1194, (2010).

[166] RW Hackett , JT Lis, ***Localization of the hsp83 transcript within a 3292 nucleotide sequence from the 63B heat shock locus of D. melanogaster,*** Nucleic Acids Res, 11, 20, 7011-7030, (1983).

ÖZGEÇMİŞ

9 Mayıs 1989 yılında Ankara'da doğdu.2005'te İnönü İlköğretim Okulundan, 2009'da Emel-Özgür Subaşıay Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesinden mezun oldu. 2010 yılında Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümüne ve 2012 yılında Trakya Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi İşletme Bölümünde yan dal eğitimine başladı. 2014 yılında hem lisans hem de yan dal eğitiminden mezun oldu. 2014 yılında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı lisansüstü eğitime başladı. İstanbul Üniversitesi Genetik Kulübü (İÜGEN) tarafından düzenlenen Uluslararası Katılımlı Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okullarında 2013, 2014 ve 2015 yıllarında en iyi poster yarışmalarında 1.lik kazandı. Lisans ve lisansüstü eğitimi sırasında hakemli ulusal ve uluslararası kongrelerde 1 sözlü, 10 poster bildirisi; lisansüstü eğitimi süresince diğer ulusal ve uluslararası hakemli dergilerde 1 adet makale; SCI indekslerine giren dergilerde 2 makalesi yayınlandı.