

**DDVP (2,2- Diklorovin Dimetil Fosfat)'nin GÖKKUŞAĞI
ALABALIĞINDA (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum,
1972)) GH-I, IGF-I ve IGF-II GEN EKSPRESYONLARI
ÜZERİNE ETKİSİ**

**Veysel PARLAK
Yüksek Lisans Tezi
Su Ürünleri Anabilim Dalı
Doç. Dr. Orhan ERDOĞAN
2010
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DDVP (2,2-Diklorovin Dimetil Fosfat)'nin GÖKKUŞAĞI
ALABALIĞINDA (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum,1972)) GH-I,
IGF-I ve IGF-II GEN EKSPRESYONLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

Veysel PARLAK

SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

ERZURUM

2010

Her Hakkı Saklıdır

Doç. Dr. Orhan ERDOĞAN danışmanlığında, Veysel PARLAK tarafından hazırlanan bu çalışma 24.05.2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Orhan ERDOĞAN

İmza:

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ercüment AKSAKAL

İmza:

Üye : Yrd. Doç. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ömer AKBULUT

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DDVP (2,2-Diklorovin Dimetil Fosfat)'nin GÖKKUŞAĞI ALABALIĞINDA (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1972)) GH-I, IGF-I ve IGF-II GEN EKSPRESYONLARI ÜZERİNE ETKİSİ

Veysel PARLAK

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Orhan ERDOĞAN

Bu çalışmada DDVP'nin Gökkuşığı Alabalıklarında büyüme ile ilgili olan; GH-I, IGF-I ve IGF-II gen ekspresyonları üzerine olan etkisi incelenmiştir. Çalışmada 21 gün boyunca 1,6 mg/l DDVP uygulaması yapılmıştır. Kas dokusundan alınan örnekler üzerinde incelemeler yapılmıştır. Gen bölgelerine özgü primer ve Tagman probu kullanılarak Real-Time PCR yöntemi ile gen amplikasyonu gerçekleştirilmiş, gen ekspresyon seviyeleri belirlenerek istatistiksel analizler yapılmıştır. Sonuç olarak, kas dokusunda yapılan incelemelerde; muamele grubunda IGF-I ve IGF-II aktivitesinde $p < 0,01$ istatiki önem derecesinde azalmalar belirlenmiştir. Ayrıca kontrol grubunda GH-I ve IGF-I seviyerleri pozitif iken IGF-II seviyesi negatif değerde çıkmış kimyasal uygulanan grupta ise GH seviyesinde artış IGF-I ve IGF-II seviyelerinde azalmalar belirlenmiştir. DDVP'nin alabalıklarda kas dokularında büyüme hormonu salınımını azalttığı söylenebilir.

2010, 44 sayfa

Anahtar Kelimeler: Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), DDVP (2,2-Diklorovin Dimetil Fosfat)'nin, GH-I, IGF-I, IGF-II, gen ekspresyonu.

ABSTRACT

Master Thesis

THE EFFECTS OF DDVP ON THE GH-I, IGF-I AND IGF-II GENES EXPRESSION IN RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1972))

Veysel PARLAK

Atatürk University
Graduate School of Agriculture Faculty
Department of Fishery Sciences

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

In this study, the effects of DDVP on the GH-I, IGF-I and IGF-II expression gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were investigated. The application of 1,6 mg of DDVP was conducted for 21 days. The study was conducted on the samples taken from muscle tissue. Gene amplification was actualized with Real Time method by using primer and Probe of Tagman which are specific to gene parts and statistical analyses were conducted through setting the level of gene expression. As a result, in the studies on the tissue of muscle, decreases in the statistical significance of $p < 0,01$ were identified in the activities of IGF-I and IGF-II which were in the treatment group. Moreover, the level of GH-I and IGF-I was positive in the control group while the level of IGF-II was negative and an increase was observed in the level of GH and a decrease was observed in the levels of IGF-I and IGF-II in the group of which chemicals were applied. It is likely to say that DDVP decreases the secretion of growth hormone on the tissues of muscle in trout.

2010, 44 pages

Key words: Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), DDVP (2,2-Dichlorovinyl Dimethyl Phosphate), GH-I, IGF-I, IGF-II, gene expression.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu alışmanın araştırma konusunun belirlenmesi ve tez haline getirilmesinde, bana yol gösteren danışmanım Sayın Doç. Dr. Orhan ERDOĞAN'a, çalışmalarım esnasında gerekli yardım ve desteklerini esirgemeyen Bölüm Hocalarıma, laboratuvar çalışmaları ve tez yazımı aşamalarında desteğini gördüğüm Sayın Yrd. Doç. Ercüment AKSAKAL'a ve Yrd. Doç. Saltuk Buğrahan CEYHUN'a teşekkür ederim.

Eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen değerli aileme minnettarım.

Veysel PARLAK

Mayıs 2010

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1.GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	8
3. MATERYAL ve YÖNTEM	19
3.1. Materyal.....	19
3.1.1. Araştırma yeri.....	19
3.1.2. Su materyali.....	19
3.1.3. Araştırma tankları	19
3.1.4. Balık materyali	20
3.1.5. Uygulanan kimyasal	22
3.1.6. Çalışmada kullanılan kimyasallar.....	22
3.2. Yöntem	23
3.2.1. Deneme planı ve kimyasalın uygulanması	23
3.2.2. Balıkların öldürülmesi ve doku örneğinin alınması	23
3.2.3. Balık dokusundan total RNA izolasyonu yöntemi	23
3.2.4. Total RNA'nın kantitatif tayini	24
3.2.5. Total RNA'nın Kalitatif Tayini.....	25
3.2.6. Super Script™ III Reverse Transcriptase ile cDNA oluşturulması	26
3.2.7. Primer dizaynı yapılması.....	27
3.2.8. Multipleks Real-Time PCR.....	28
3.2.9.Real-Time PCR uygulamalarına ilişkin bulguların değerlendirilmesi	30
3.2.10. İstatistiksel analiz.....	30
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	31
4.1. RNA izolasyonuna ilişkin bulgular	31

4.2. Real-Time PCR sonucunda elde edilen veriler.....	32
4.2.1. Amplifikasyon etkinlik oranı	32
4.2.2. GH-I değerleri.....	32
4.2.3. IGF-I değerleri.....	33
4.2.4. IGF-II değerleri.....	33
4.3. İstatistiksel analiz sonuçları	34
5. SONUÇ ve TARTIŞMA	37
KAYNAKLAR.....	41
ÖZGEÇMİŞ.....	

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AcHE	Asetilkolinestraz
AZA	Azamethiphos
Ca	Kalsiyum
Cd	Kadmiyum
Cu	Bakır
CuSO ₄	Bakır sülfat
ddH ₂ O	Distile steril Su
DDVP	<i>2,2-Diklorovin Dimetil Fosfat</i>
DF	Seyreltme faktörü
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiniükleotidtrifosfat
DPEC	Dietil pirokarbonat
dTTP	Deoksitimidintrifosfat
EtBr	Etidyum bromür
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
GH-I	Büyüme hormonu
GHRH	Büyüme hormonu salgılatıcı hormon
GST	S-transferaz aktivitesi
Hg	Civa
HSP-70	Isı şok proteini
IGF-I	İnsulin benzeri büyüme faktörü
MDA	Malondialdehit
MOPS	Morpholinopropanesulphonic Asit
mRNA	Haberci reoksinibonükleik asit
MT	Metallotiyonin
NaCl	Sodyum klorür
NO ₃ ⁻	Nitrik asit
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
pH	Bir çözeltinin asitlik veya alkalılık derecesini tarif eden ölçü birimi.

Ppb	Milyonda bir kısım. mg/litre
Ppm	Milyonda bir hata veya olay'dır ve 10^{-6} mg/litredir.
rRNA	Ribozomal reoksinibonükleikasit
RT-PCR	Revers Transkriptaz-PCR
SO ₄ ⁻²	Sülfat
SDS	Sodyumdodesilsülfat
TBE	Tris- Borik asit- EDTA
TiO ₂	Titanyum dioksit
tRNA	Transfer reoksinibonükleikasit
UV	Ultraviyole ışık
Zn	Çinko
WHO	Dünya sağlık örgütü
µs/cm	Microsiemens/cm

ŞEKİLLER

Şekil 3.1. Denemede kullanılan gökkuşuğu.....	21
Şekil 4.1. RNA'nın agaroz jel elektroforezinde kontrolü.....	31
Şekil 4.2. Amplifikasyon oranının hesaplanması.....	33

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan suyun kimyasal özellikleri.....	19
Çizelge 3.2. Gökkuşaağı alabalığının özellikleri.....	20
Çizelge 3.3. DDVP (diklorvos).....	21
Çizelge 3.4. Primer dizaynı.....	28
Çizelge 3.5. Real-Time PCR karışımı.....	29
Çizelge 3.6. Real-Time PCR programı.....	30
Çizelge 4.1. Real-Time PCR’da kullanılan primerlere ait etkinlik oranları.....	32
Çizelge 4.2. Genlere ait kontrol ve muamele grupları arasındaki ΔC_t değerleri.....	34

1. GİRİŞ

Su, canlı ve cansız tüm organizmaların yaşamını sürdürebilmesi için vazgeçilmez bir yaşam kaynağıdır. Günümüzde suyun ve su kaynaklarının maruz kaldığı en ön önemli sorun, bunların bilinçsiz kullanılması ve kirletilmesidir. Yirminci yüzyılda dünya nüfusu 19. yüzyıla oranla üç kat artmasına rağmen, su kaynaklarının kullanımının altı kat arttığı belirlenmiştir (Anonim 2010a). Günümüzde sanayi kaynaklı kirliliğin ve evsel atıkların artması sonucu kaynak sularımız daha fazla kirletilmektedir. Bunun sonucunda da tamamen birbiriyle bağlantılı olarak besin zinciri en alt basamaktan en üst basamağa kadar bütünüyle etkilenmektedir. Ekolojik dengenin olumsuz yönde değişmesi beraberinde canlı yaşamında olumsuz olarak etkilemektedir. Bu kirlilik etmenleri besin zinciri yoluyla toprak, bitki, hayvan ve insanlara taşınarak onların yaşamlarını tehdit etmektedir.

Hızlı nüfus artışı, sanayileşme, evsel ve sanayi atıklarının arıtılmadan su kaynaklarına bilinçsizce bırakılması, her geçen gün dikkatleri sucul ortamdaki kirlilik ve kirlilik etmenleri üzerine yoğunlaştırmıştır. Sucul ortamdaki kirliliği tetikleyen başlıca öge ise insanoğlunun kullanım alışkanlıklarıdır. Sürekli artan dünya nüfusunun besin ihtiyaçlarının karşılanması, bitkisel ve hayvansal orijinli besin maddelerinden sağlanmaktadır. Ekolojik dengenin gereği olarak, bu ürünleri istenilen anda bulmak mümkün değildir. Bundan dolayı bu ürünler mevcut imkânlar dâhilinde, stoklanarak ihtiyaç anında kullanılmaktadır. 1996'da yapılan Dünya Gıda Zirvesi'nde alınan ortak kararlardan birisi de yeryüzündeki tüm insanların fiziksel ve ekonomik şartlarda her zaman yeterli ve güvenli olan gıdaya ulaşmasını sağlamaktır (TKB 2000). Dikkat edilmesi gereken nokta ise bu ürünlerin muhafazası ve korunması esnasında kullanılan koruyucu maddelerin bilinçsizce kullanılması sonucunda ortaya çıkan kirliliktir. Diğer yandan bitkisel ve hayvansal besin maddeleri zararlı birçok mikroorganizma tarafından tehdit altındadır. Bu zararlıların etkisiz hale getirilmesinde yine kimyasal ilaçlamalarla mümkündür. Zararlılara karşı uygulanan kimyasallar doğada kalma sürelerine ve yoğunluklarına bağlı olarak havaya, toprağa ve sucul ortama karışmaktadır. Böyle bir

mücadele neticesinde olumlu etkiler yanında olumsuz etkiler de ortaya çıkmaktadır. Nitekim çeşitli ilaçların veya kimyasalların ekosistemi ne derece olumsuz etkilediği açıktır. Ayrıca karasal taşınımın sucul ekosistemi ve oradaki organizmaların besin zincirini ne kadar olumsuz yönde etkilediği de bilinen bir gerçektir. Tedavi yâda yok etme amacıyla kullanılan bu kimyasallar kolay kullanılabilirliği ve ucuz olması sebebiyle yoğun olarak kullanılmakta ve sucul ortamdaki tehlikenin başlıca sebebinin oluşturmaktadır. Su kaynaklarına yakın bölgelerde kullanılan bitki ve böcek mücadele ilaçları dolaylı olarak suya ulaşmaktadır. Bunun yanı sıra kullanılan ilaçlar, bitkilerden ve toprak yüzeyinden yağmur suları ile yıkanarak, ayrıca uygulama aletleri ve ilaçlama için kullanılan ekipmaların yıkanması yoluyla da su kaynaklarına ulaşabilmektedir.

Kimyasal kirleticilerin yer altı sularına karışması çok kolay olup, bu durum insan sağlığı açısından tehlike arz etmektedir. Sulardaki insektisit kalıntıları genellikle çözünmez, süspansiyon şeklinde organik maddelerde, sedimentlerde, çamurda, çürüme artıklarında ve planktonlarda tutunur. Bu yolla besin zincirine girerek suda yaşayan omurgasızlarda ve balıklarda kolaylıkla birikebilirler. Balıkların vücudunda biriken insektisit yoğunluğu sudakinin 1.000-10.000 katını bulabilir. Sularda bulunan, bakteriler ve planktonlarda tutunan insektisit, balıklara kadar olan besin zincirinde, balıklarda en yüksek yoğunluğu bulur. Balıklarla beslenen canlılarda ise daha yüksek düzeye ulaşır. Yavru balıklar bazı ilaçlara karşı çok hassastır. Yaşam devresinin bu noktasında canlı kalma gücü çok az olduğundan, tarım ilaçlarının etkisi bu türlerin daha çok azalmasına neden olabilir (Öden 2010).

Kimyasal mücadelede kullanılan maddelerin başında genelde toksik (zehirleyici) ve biyosidal (halk sağlığı amaçlı kullanılan) maddeler olan pestisitler gelmektedir. Pestisitler; zararlı hayvanların, böceklerin, mikroorganizmaların, otların ve sorun teşkil eden diğer canlıların yok edilmesini sağlayan veya üremelerini durduran kimyasal maddelerdir. Pestisitlerin sınırsız ve kontrolsüz şekilde bilinçsiz olarak kullanılması toprağın, havanın ve suyun kirlenmesine neden olarak, yararlı türler ile insanlar üzerinde olumsuz etkilere yol açmaktadır. Doğada kimyasal kirliliğe yol açan, toprakta, suda, meyvelerde, sebzelerde ve diğer besin maddelerinde uzun süre bozulmadan kalan

ve besin zinciri yoluyla insanlara kadar ulaşabilen pestisitlerin alerjik, karsinojenik, mutajenik ve teratojenik etkilerinin olduğu çeşitli canlılarda yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Durmuş 2009).

Kimyasal mücadelede kullanılan pestisitler şunlardır;

- İnsektisit : Böcek, haşerelere karşı kullanılan ilaçlardır.
- Fungisit : Funguslara (Mantar) karşı kullanılan ilaçlardır.
- Herbisit : Yabancı otlara karşı kullanılan ilaçlardır.
- Mollusit : Yumuşakçalara karşı kullanılan ilaçlardır.
- Rodentisit : Kemirgenlere karşı kullanılan ilaçlardır.
- Nematisit : Yuvarlak solucanlara karşı kullanılan ilaçlardır.
- Akarisit : Akarlara karşı kullanılan ilaçlardır. Kimyasal maddeler olarak gruplandırılmaktadır (Öncüler 2004).

Zararlı böceklerle mücadelede 4 temel insektisit grubu yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bunlar;

- Organoklorinler (Organik Klorlular)
- Pyretroidler
- Karbamatlar
- Organofosfatlar (Organik Fosforlular) olarak gruplandırılabilir (Anonim 2010b).

Bu insektisit grupları arasında organofosfat grubu önemli yer tutmaktadır. Organik fosforlu (OP) bileşikler içlerinde bulunan bir veya daha fazla fosfor atomları nedeniyle organik fosforlu bileşikler grubu olarak adlandırılırlar. Bu grubun bileşenleri ilk zamanlarda geniş ölçüde zirai amaçlarla kullanılmış olmasına rağmen organoklorinlere karşı gelişen vektör direncinden dolayı aynı zamanda günümüzde halk sağlığı uygulamalarında da kullanılmaktadır. Organofosfatların (Organik Fosforlular) canlıya geçişi; temas, sindirim ve solunum yoluyla olmaktadır. Organik fosforlu bileşikler, düşük fototoksitesitesi ve çabuk bozulma oranına sahip olması, memeli ve kuşlarda düşük toksik etkiye sahip olması nedeniyle 1960'dan bu yana geniş ölçüde kullanılmaktadır. Aynı zamanda organofosfatların, organik klorlu (OC) insektisitlere oranla kalıcılıkları

daha azdır. Çoğu OP'li insektisitler organik olarak fosforik ya da fosforik asit bağlı ester veya amidlerden meydana gelmiştir. Malathion, parathion, diklorvos, diazinon organofosfatlı insektisitlerdendir (Yavuz ve Şanlı 1999; Çakır ve Yamanel 2005).

Organofosfatlar, kısa sürede zararlılara karşı etkili olması ve kolay kullanılabilirliği sebebiyle zirai ilaçlamalarda kullanılmakta olup bu şekilde bitki örtüsüne, toprağa ve suya karışmaktadır. Bununla beraber organofosfatların, yoğun ve bilinçsiz kullanımıyla gıdalarda, toprak, su ve havada pestisit kalıntılarına rastlanmaktadır. Sonuç olarak hedef olmayan diğer organizmalar ve insanlar üzerinde olumsuz etkileri görülmektedir. Pestisit kalıntılarının önemi ilk kez 1948 ve 1951 yıllarında insan vücudunda organik klorlu pestisitlerin kalıntılarının bulunmasıyla anlaşılmıştır. Pestisitlerin bazıları toksikolojik açıdan bir zarar oluşturmazken, bazılarının kanserojen, sinir sistemini etkileyici ve hatta mutasyon oluşturucu etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Pestisit kalıntılarının en önemli kaynağını ise gıdalar oluşturmaktadır. Bu nedenle 1960 yılında FAO ve WHO “Pestisit Kalıntıları Kodeks Komitesi”ni kurmuşlar ve bu komitenin çalışmaları sonucu konu ile ilgili tanımlamalar yapılmış, bilimsel araştırma verilerine dayanılarak gıdalarda bulunmasına izin verilen maksimum kalıntı değerleri saptanmıştır. Ülkemizde de tarımsal ürünlerde kullanılan pestisitlerin gıdalarda bulunması müsaade edilebilir maksimum miktarları ürün ve ilaç bazında belirlenmiştir (Yücel 2010).

Ağır metaller içerisinde yer alan Organofosfatlı insektisitler (DDVP) zararlı böceklerin kontrolü için en sık kullanılan insektisitlerin başında gelmekle beraber bazı türler için uzun vadede daha az etkili olmakta ve yararlı türlerinde azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca insektisitler spesifik olmadıkları için sadece hedef organizmaları öldürmez, omurgalı ve omurgasız diğer organizmaları da etkilerler. Zararlı etkilerin şiddeti, insektisit ve formülasyonun tipine, uygulama şekline ve tarımsal arazinin tipine bağlı olarak değişmektedir (Yücel 2007).

Kimyasal uygulaması sonucunda sucul ortamda meydana gelen kirlilikten elbette en çok suda yaşayan canlılar zarar görmektedir. Bu canlıların başında da balıklar gelmektedir.

Sucul ortama karışan bu kirleticiler balıklar için gerekli olan besin zincirini bozmakta ve canlıların metabolizmasına karışarak, hayatsal faaliyetlerinde düzensizliklere sebep olabilmektedir. Su kirliliğinin, balıkların gelişmelerine ve çoğalmalarına olumsuz etkileri bulunmaktadır. Bu etkiler kirleticilerin konsantrasyonlarına bağlı olarak balıklarda ölümler, yumurta koymanın veya testisovaryum gelişiminin engellenmesi şeklinde ortaya çıkmaktadır (Oğuzhan ve Atamanalp 2008).

Balıklarda büyüme; besin tüketimi, sindirim ve buna bağlı olarak vücutta meydana gelen boy ve ağırlık artışı olarak ifade edilir. Büyüme, cinsi olgunlukta daha hızlı olmak üzere ömrün sonuna kadar devam eder. Ayrıca büyüme türler arası ve türler içinde farklılık göstermektedir. Kalıtım, cinsi olgunluk ve ömür uzunluğu gibi iç faktörler yanında, su sıcaklığı, ortamdaki besin miktarı, besin göçü, mevsimsel değişimler, hastalıklar ve sucul ortamdaki kirlilik gibi dış faktörlerde balıklarda büyümeyi doğrudan veya dolaylı olarak etkilemektedir (Çetinkaya vd. 2005; Aksakal ve Atamanalp 2008).

Besin değeri ve ekonomik önemi açısından alabalıklar, besin zincirinde önemli bir yere sahiptir. Özellikle iç sularımızda büyük bir yaşama payına sahip olan alabalıklar hem lezzeti hem de kolaylıkla kültüre alınıp yetiştirilebilmesi açısından önemlidir. Fakat sularımızda meydana gelen kirlilik, aşırı avlanma ve yoğun talep, balık üretiminin kültüre alınmasında önemli etkenleri oluşturmaktadır. Gerek devlet destekli tesisler ve gerekse özel sektörün teşebbüsleriyle kurulan işletmeler, bugün modern kuluçkahane ve büyütme teknolojilerinin uygulandığı "Aquakültür" birimleri oluşturmaktadır. Bu birimlerde yetiştiriciliği yapılan balık türlerinin, en iyi şekilde üretilmesi ve en kısa zamanda sofralık boya gelmesinde önemli etkenler yer almaktadır ve bunların belirlenmesinde türlerin kalıtsal ve genetiksel özelliklerin belirlenmesi önem arz etmektedir. Mümkün olan en kısa sürede, daha büyük ve sağlıklı ürünler elde etmek içinde biyoteknoloji alanındaki uygulamalardan yararlanılmaktadır (Şahin 2003). Biyoteknoloji; hücre, doku ve organ kültürü, moleküler biyoloji, fizyoloji, biyokimya, mikrobiyoloji, moleküler genetik gibi doğa bilimleri ile temel mühendislik ve bilgisayar bilimlerinden yararlanmaktadır. Ayrıca genetik ve moleküler DNA teknikleriyle bitki ve canlıların genetik haritalarını çıkartmak, çoğaltmak, ıslah etmek, değiştirmek,

geliştirmek, yeni ve az bulunan ürünleri yine canlılara (organizma, hücre ve dokulara) üretirmek veya bu ürünleri daha fazla elde etmek için kullanılan teknolojilerin tümüdür (Babaoğlu 2010).

Su ürünleri yetiştiriciliği alanında ise Biyoteknoloji; daha fazla ürün elde etmeye katkı sağlamakta, cinsel olgunlaşma yaşını düşürerek üremeyi hızlandırmakta, organizmaların büyüme hızını, yumurta verimini ve larval safhadaki yaşama oranını artırmaktadır. Genetik mühendisliği; kültürü yapılan canlının hastalıklara direncini, yemin ete dönüşüm etkinliğini ve etin kalitesini yükseltmektedir (Şahin 2003).

Balıkların büyüme aktivitesiyle doğrudan ilişkili olan GH (Büyüme hormonu) beyinde bulunan hipofiz bezinden salgılanır. Büyüme hormonunun salgılanması hipotalamustan salgılanan GHRH isimli hormonun sayesinde artarken hipotalamustan salgılanan somatostatin isimli hormonun salgılanmasıyla azalır. Büyüme hormonu kana karışarak karaciğere gelir ve oradan IGF-I isimli hormonu salgılatır. IGF-I hormonu fazla salgılanırsa büyüme hormonu salgısını önler. IGF-I karaciğerden başka böbrek, bağırsaklar ve kıkırdak dokusunda da yapılır. IGF-I hormonu sayesinde kas, kıkırdak ve kemik büyümesi sağlanır (Özata 2010).

IGF-I (insülin benzeri büyüme faktörü) peptid yapılı bir moleküldür. Bu hormonun dokular üzerindeki etkisi insülin benzeri büyüme faktörleri aracılığı ile gerçekleşir. İnsülin benzeri büyüme faktörleri aminoasit dizisi olarak insüline benzeyen polipeptid yapılarıdır. Hücre kültürlerinde insülin ile aynı biyolojik sonuçları oluşturabilirler. Kıkırdak üzerinde büyümeyi teşvik edici etkisine ek olarak IGF-I diğer dokularda da insülin benzeri aktiviteler gösterir. IGF-I yağ yıkılışını baskılar, yağ dokusunda glikoz yıkımını artırır. Bu genin kollajen ve proteoglikan sentezini arttırdığı aynı zamanda kalsiyum, magnezyum ve potasyum dengesine de olumlu etkileri olduğu belirtilmiştir. İnsülin benzeri aktiviteler kısmen insülin ve IGF-I arasındaki yapısal benzerliğe bağlanmaktadır. IGF-I'ler kanda bağlayıcı-plazma proteinleri ile kompleks oluşturarak dolaşırlar. İnsan plazmasında dört ana IGF bağlayıcı plazma proteini tanımlanmıştır. Glikolizlenmiş bağlayıcı protein olan IGFBP-3, dolaşımdaki IGF-I'in %75'inden fazlası

ile kompleks oluşturur. Bu bağlayıcı proteinin konsantrasyonu GH-I'e bağlıdır. Bağlayıcı proteinlerden ayrılma, kapiller membrandan geçiş ve kıkırdak gibi daha yoğun dokulara girişin öncesinde gerçekleşir. Hipotiroidizm, kronik hastalık, beslenme eksiklikleri ve karaciğer hastalıkları gibi büyüme geriliğinin olduğu birçok durumda IGF-I düzeyi azalır. IGF-I düzeyi, glikoz ile baskılanmış büyüme hormonu düzeyine kıyasla akromegalinin klinik şiddeti ile daha iyi korelasyon gösterir (Anonim 2010c). Tüm bu bilgiler göz önünde tutulduğunda GH-I, IGF-I ve IGF-II genlerinin büyümeyle direkt etkisi olduğu söylenebilir. Kimyasal uygulaması sonucunda bu genlerin ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişiklikleri belirlemek için moleküller düzeyde incelemeler yapılmış, moleküler teknikler ve cihazlar kullanılmıştır.

DNA ve RNA örneklerinin kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilmesi, çok sayıda örneğin son derece az kontaminasyon riskiyle güvenle çalışılabilmesi amacıyla Real-Time PCR tekniği kullanılmıştır. Son yıllarda PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngüleri sağlamak için kullanılan cihazların (thermocycler) hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi, real-time PCR olarak adlandırılan yeni bir yöntemin gelişmesine neden olmuştur. Real-time PCR, geleneksel PCR'in uygulama alanlarını arttırırken PCR'la ilişkili pek çok laboratuvar sorununa da çözüm getirmiştir. (Kubista *et al.* 2006).

Ayrıca Real-time PCR'da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Bu nedenle, agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Real-time PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziyeye özgün olmayan floresan boyalardan ya da diziyeye özgün problemlerden yararlanılmaktadır. Böylece sonuçlar anında alınmakta, kontaminasyon riski azalarak tüm işlemler sıcaklık döngüleri başlayınca otomatik olarak devam etmektedir (Anonim 2010d). Real time PCR uygulaması ile uygulanan kimyasalın gen ekspresyonuna olan etkisi daha hassas sonuçlarla ifade edilip, mRNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme olanağı ortaya çıkmaktadır (Günel 2007).

Sonuç olarak DDVP'nin gökkuşaağı alabalđının kas dokusundaki 3 önemli gene (GH-I, IGF-I ve IGF-II) olan etkisi ile ilgili geniş kapsamlı ve kombine bir çalışmaya literatürlerde rastlanmamıştır. Toksikoloji ve moleküler biyoloji konularını içeren bu çalışmada sucul ortamın en önemli kirleticilerinden biri olan DDVP'nin gökkuşaağı alabalđında büyüme genleri üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla kas dokusunda büyümeyle ilgili IGF-I, IGF-II ve GH-I genlerinin ekspresyonlarında meydana gelen değişimler araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

DDVP, zararlıları öldürmek için kullanılan sentetik bir kimyasaldır. Bu madde yüksek derecedeki ısıya karşı kararlıdır ve doğada bulunmaz. 1961 yılından itibaren endüstriyel olarak üretilmektedir. DDVP; solunum, deri ve ağız yoluyla alındığında sinir sisteminde asetilkolinesteraz enziminin etkinliğini engelleyerek hayvanlarda akut ve kronik zehirlenmelere sebep olmaktadır. Ayrıca DDVP'nin canlılarda lipid ve protein metabolizmasını etkilediği bilinmektedir (Lucic *et al.* 1998). DDVP, deriye temas ve oral yol ile alındığı zaman solunum yoluna göre daha az toksiktir (WHO 1989).

DDVP'nin en önemli farmakolojik etkisi asetilkolin hidrolizini katalize eden asetilkolinesteraz enzimini inhibe etme yeteneğidir. Bileşiğin toksisitesi dolaysız antikolinesteraz etkinliği ile ilgilidir. DDVP'nin yüksek insektisidal gücü, memeli hayvanlarda metabolizmanın hızlı oluşu ve molekülünün metabolik sapma göstermeyişi, insan ve evcil hayvanların doğrudan doğruya bu insektisidin etkisinde kalması karşısında, zehirlenme olasılığının pek az olduğu gerçeğini ortaya çıkmaktadır (Anonim 2010e).

DDVP, alyuvarlarda ve sinir dokusunda bulunan bir enzim olan kolinesteraz üzerinde kısa veya uzun süreli etkiye sahip olup, sinir sistemi üzerinde zararlı etkisi olan zehirli maddeler arasındadır (Howard *et al.* 2010). Yapılan çalışmalarda belirtilmiştir ki DDVP'nin organizmalar üzerinde birçok olumsuz etkisi vardır (McHenery *et al.* 1991,1997; Chuiko 2000).

Balkaya ve Onar (2004), yaptıkları çalışmada DDVP'nin UV ışığı kullanılarak, TiO₂ (*Titanyum Dioksit*) varlığında sulu ortamda fotokatalitik olarak bozunmasını araştırmıştır. Sonuçta DDVP'nin fotokatalitik yolla oldukça etkin bir şekilde giderilebileceği ve uygulama sonunda 40 mg/l diklorvos içeren numunenin 60 dakika süresince UV ışığına tutulması sonucunda elde edilen giderim veriminin %96,3 olduğu belirlenmiştir.

Rishi and Sunita (1995), yaptıkları çalışmada DDVP uygulamasının yeşilbaşlı yılan balığında (*Channa punctatus*), kromozomlar üzerinde meydana getirdiği ışık sapmalarını incelemiştirler. Akvaryum ortamındaki balıklara (0.01 ppm) DDVP uygulanıp 24, 48, 72 ve 96 saat'lik süreler sonunda balıklardan böbrek dokusu alınıp incelemeler yapılmıştır. Yapılan incelemede kromotidler arasındaki ışık sapmasının beklenenden önce gerçekleştiği görülmüştür. Bu da kromotidler arasında ayrılmanın olduğunu göstermektedir.

Murison *et al.* (1997), alabalık çiftliklerinde oluşan kabuklu deniz biti çoğalmasını engellemek için DDVP uygulaması yapmıştır. Uygulanan DDVP konsantrasyon oranları arttıkça asetilkolinesteraz aktivitesinin inhibe olma oranının arttığı ve balıkların dirençlerinde azalma olduğu gözlemlenmiştir.

Başka bir çalışmada McHenery *et al.* (1996), yaygın olarak bulunan ıstakozlar (*Homarus gammarus*) üzerinde DDVP'nin hassasiyetini belirlemişlerdir. Larvalar 23 gün boyunca $0,63 \mu\text{g l}^{-1}$ DDVP'ye maruz bırakılmış ve larvaların yaşamını devam ettirmeleri için gerekli subletal doz kontrol edilmiştir. Larvalarda asetilkolinesteraz aktivitesi kontrol edilmiş ve 6 saat'lik süreyle $50 \mu\text{g l}^{-1}$ DDVP uygulanmış ve önemli derecede inhibe olduğu gözlemlenmiştir. Daha sonrasında 6 saatlik süreyle $25 \mu\text{g l}^{-1}$ DDVP uygulanmış ve önemsiz derecede ölümler olduğu belirlenmiştir. Son olarak 1 saat süreyle $50 \mu\text{g l}^{-1}$ DDVP uygulandığı halde hiç ölüm olmamıştır. Bu çalışma sonunda DDVP ile ilgili olarak kullanım oranının modellenmesi tartışılmaktadır.

Varò *et al.* (2003) Avrupa denizlerinde yaşayan levrekler üzerinde yaptıkları çalışmada balıklara DDVP uygulayarak kas ve beyin dokusunda meydana gelen değişiklikleri incelemiştirler. Uygulamanın ilk aşamasında asetilkolinesteraz aktivitesi normal olan balıklarda, düşük seviyedeki konsantrasyonunda hem kas hem de beyin dokusunda önemli derecede aktivitenin engellendiği görülmüştür. Uygulama sonunda *in vivo* ve *in vitro* şartlarda öldürücü doz konsantrasyonunun 0,125 ve 1 mg/L arasında olduğu belirlenmiştir.

Killi akvaryum balığının (*Aphanius iberus*) dişi ve erkek bireyleri üzerinde DDVP uygulaması sonucunda asetilkolinesteraz aktivitesi incelenmiştir. Letal dozun %95 güven sınırları: 1,34-3,97 ve 3,17 mg olarak belirlenmiştir. Dişi ve erkek bireylerde asetilkolinesteraz aktivitesindeki azalış aynı oranda olmuştur. *Aphanius iberus*'da asetilkolinesteraz aktivitesinin DDVP'ye maruz kalmanın iyi bir belirleyici olduğu bildirilmiştir (Varó *et al.* 2008).

Varo *et al.* (2007), çipura üzerinde 24 saatlik sürede DDVP uygulanmasının (lipid peroxidation) RNA/DNA oranı, glutatyon S-transferaz aktivitesi (GST) ve ısı şoku proteini (HSP-70) üzerindeki etkisini incelemiştir. RNA/DNA oranında azalma olmuş GST ve HSP-70'de ise önemli sayılabilecek herhangi bir değişiklik olmamıştır. Çipura'da tedavi amaçlı kullanılan DDVP'nin öldürücü dozlarını belirlemede RNA/DNA ve asetilkolinesteraz aktivitesinin etkilerinin rol alacağı görülmüştür.

Cusack and Johnson (2003), yapmış oldukları çalışmada, DDVP'nin 1,0 ppm'lik dozuna 1 saat süreyle maruz bıraktıkları genç ve yetişkin ıstakozlar, zooplankton türleri, fitoplankton türleri ve midyeler üzerinde incelemeler yapıp mortalite sonuçlarını gözlemlemiştirler. Sonuç olarak uygulamada DDVP'nin midye için toksik etkisi olmayıp, larval ıstakoz, yetişkin ıstakoz, zooplankton ve fitoplankton için toksik etki gösterdiği belirlenmiştir.

Rath and Misra (1981), tilapi üzerinde DDVP'nin solunum yoluyla alınması sonucu öldürücü etkilerini incelemiştirler. Üç farklı yaş grubu üzerinde yapılan çalışmada tüm yaş gruplarında oksijen tüketimi ile havalandırma oranı arasında pozitif bir korelasyon ($p<0,001$) sağlanmıştır. Uygulama sonrasında solunum oranları ve vücut ağırlıkları arasında ters orantı gözlenmiştir. Tüm yaş gruplarında oksijen tüketimi ve insektisit konsantrasyonu açısından negatif bir korelasyon ($p<0,001$) gözlenmiştir. Sonuç olarak toksisitenin balık yaşına bağlı olarak ters, metabolizma aktivitesiyle doğrudan ilişkili olduğu bulunmuş ve çalışma sonunda balıkların solunum sistemlerinde dönüşümsüz hasarlar meydana gelmiştir.

Rath and Misra (1979), tilapi üzerinde yaptıkları çalışmada DDVP'nin sub-lethal dozunu uygulayarak, asetilkolinesteraz aktivitesiyle DDVP'nin ilişkisini belirlemeye çalışmışlardır. Beyin ve karaciğer enzim aktivitelerinde önemli derecede inhibasyon meydana gelmiştir. Uygulama süresince DDVP'ye maruz kalan balıklarda enzim inhibasyon derecesi, insektisit konsantrasyonu kalma süresi ile pozitif korelasyon göstermiştir. Karaciğere kıyasla tüm yaş gruplarının beyin dokusunda daha fazla inhibasyon meydana gelmiştir. Küçük balıklar insektisite daha duyarlı iken temiz suya transfer edildiklerinde enzim aktivitelerinde daha çabuk bir iyileşme söz konusu olmuş ve iyileşme derecesi maruz kalma süresi ile ters bir ilişki göstermiştir.

Demael *et al.* (1990) Sazanlar üzerinde 8 gün boyunca 30 mg l⁻¹ DDVP'nin 30 dakikalık uygulamasını yapmış beyin, karaciğer ve böbrek enzimleri ile çeşitli plazma parametrelerini incelemişlerdir. Karaciğerde kolinesteraz, alkalin fosfataz ve glutatyon S transferaz aktiviteleri değişmeyip, glucuronyl transferaz aktivitesi azalmıştır. Böbrekte alkalin fosfataz, glutatyon S transferaz ve glucuronyl transferaz aktivitelerinde azalma görülmüş ancak laktat dehidrogenaz (LDH) ve glukoz-6-fosfataz aktivitelerinde hiçbir değişiklik gözlenmemiştir. Kan plazmasında ise K⁺, Ca²⁺ ve alanin aminotransferaz aktivitesinde artış gözlenmiştir. Sonuç olarak böbreklerde diklorvosun elemine edildiği gözlenmiştir. Eliminasyon sürecinde ksenobiyotiklerin bozulma olasılıklarında azalma gözlenmiştir.

McHenery *et al.* (1991) Istakoz, *Homarus gammarus* ve ringa balığı üzerinde 5,7 ve 122 µg l⁻¹'lik DDVP uygulaması yapmışlardır. Istakoz larvaları düşük dozlarda bile hassasiyet göstermiş olup daha sonrasında sub-letal doza maruz kalan larvaları iyileştirmek mümkün olmuş ve asetilkolinesteraz aktivitesinde inhibasyon gerçekleşmiştir. Sonuç olarak mevcut verilerin çevresel etkileri tartışılmıştır.

Hoy *et al.* (1991), yaptıkları çalışmada salmon bitlerine karşı tedavi için uygulanan DDVP'nin sudaki oksijen miktarına bağlı olarak gökkuşağı alabalığında asetilkolinesteraz enzimi üzerinde oluşturduğu etkileri incelemişlerdir. Su sıcaklığının 9°C olduğu ortamda, balıkların ortalama 135 gr olduğu 2 grup oluşturulmuştur.

Uygulama boyunca sudaki oksijen miktarı 15 mg/l (TH) ve 3 mg/l (TL) civarında olmuştur. Daha sonra 2 gruptaki oksijen seviyesi 6 mg/l O₂ de tutulmuştur. 2, 4, 7, 14 ve 21. günlerde 5'er balık örnekleme yapılmıştır. Beyin, plazma ve karaciğer örnekleri incelenmiştir. Uygulamadan hemen sonra yapılan ölçümler göstermiştir ki; beyin dokusunda, TH grubundaki AchE aktivitesi, TL grubundakine göre daha yüksek çıkmıştır. Ortalama AchE aktivitesi %45 (TH) ve %58 (TL) dir. Dokularda ki AchE aktivitesinin düşük olmasından dolayı gruplar arasında plazma ve karaciğer değerlerinde farklılık oluşmamıştır. Sonuç olarak DDVP'ye maruz kalan balıklarda yeterince oksijenlendirme yapıldığı takdirde ölümler engellenebilir. Ayrıca AchE aktivitesi 14 günde daha fazla inhibe olmaktadır. Aynı zaman içerisinde tekrardan salmon bitlerine diklorvos uygulamasının yapılması ölüm riskini artırabilir.

Erdoğan *et al.* (2007), 21 gün boyunca 1,6 mg/litre DDVP'ye maruz bırakılan gökkuşuğu alabalığında HSP-70 gen ekspresyonunu araştırmışlardır. Kontrol grubu ve kimyasal uygulanan grup arasında HSP-70 gen ekspresyon farkı istatistiksel olarak $p < 0,01$ önem seviyesinde farklı bulunmuştur.

Atamanalp *et al.* (2007), yaptıkları çalışmada 28 gün boyunca 1,6 mg/litre DDVP'ye maruz bırakılan gökkuşuğu alabalığında kan parametrelerinde meydana gelen değişiklikleri incelemiştir. DDVP kırmızı ve beyaz kan hücrelerinin miktarında, hemoglobin sayısında ve eritrositlerin çökelme oranında artışa sebep olmuştur. DDVP uygulanan ve uygulanmayan gruplar arasında beyaz kan hücresinde istatistiksel olarak önemli derecede fark belirlenmiştir.

Bris *et al.* (1995), ekonomik öneme sahip olan 2 tür yumuşakça (*Ruditapes philippinarum* ve *Crassostrea gigas*) üzerinde DDVP uygulamasının etkilerini incelemişlerdir. 48 saatlik sürede suya 0,1 mg l⁻¹ diklorvos uygulaması yapılmıştır. Kabuklu deniz hayvanlarında ölümler gözlemlenmiş ve asetilkolinesteraz aktivitesinde azalma olduğu belirlenmiştir. Ancak canlıların kabuklarında açılmalar meydana gelmiştir bu da DDVP'nin kas dokusunda meydana getirdiği olumsuz etkinin göstergesidir. Bu nedenle balık çiftliklerinde DDVP kullanımı sınırlandırılmalıdır.

Intorre *et al.* (2003), çalışmalarında yılan balığı, levrek ve alabalık üzerinde zararlı böceklere karşı organikfosfor grubuna da yer alan azamethiphos (AZA) tedavisi uygulayıp etkilerini incelenmişlerdir. Balıklar üzerinde 60, 120 ve 240 dakika süresince 0,1 ppm' lik miktarda uygulama yapılmıştır. 21 gün boyunca rastgele örneklemler yapılarak balıklar temiz suya transfer edilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla yılan balığı, levrek ve alabalığın beyin dokusundaki AchE (asetilkolinesteraz) aktivitesi %44, %56 ve %62'ye kadar inhibe olmuştur. Alabalıkta 7 gün, yılan balığı ve levrekte ise inhibasyon 4 gün içerisinde olmuştur. Sonuç olarak AchE aktivitesinde meydana gelen durma balıklarda hiperaktivite ve zıplamalara sebep olmuştur. Alabalıklarda ölüm, sadece 240 dakika süresince AZA'ya maruz kalan balıklarda olmuştur. AchE aktivitesinin beyin dokusunda azalması, türler arasında değişken bir korelasyon sergilemiştir.

Yapılan bir çalışmada balık dışı parazitlerin tedavisinde kullanılan DDVP'nin sazanlar üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Doza bağımlı baskılayıcı etkinin sonucunda lenfosit proliferasyonu ve miyeloid hücrelerinde solunum patlaması gözlenmiştir. *Yersinia ruckeri*'ye karşı uygulanan DDVP *in vivo* şartlarda hiçbir etki göstermemiştir. AchE analizlerine göre böbrek ve dalakta herhangi bir değişiklik gözlenmemiş, bazı kan parametrelerinde çok az spesifik olmayan değişiklik belirlenmiştir (Dunier *et al.* 1991).

Kirleticilerin balıklar üzerinde meydana getirdiği değişikliklerin moleküler olarak açıklanması, bazı belirleyici genlerin ekspresyonunun kantitatif olarak belirlenmesi ile mümkün olabilir. Bu spesifik genlerin kantitatif olarak tespiti sonucunda kimyasala maruz kalan balığın, bu durumdan ne derece etkilendiği hakkında çok sağlıklı bilgiler elde edebiliriz. Kimyasalların özellikle büyümeye olan etkisinin tespiti önemlidir. Balıklarda büyüme ile direkt ilgisi olan IGF (insülin benzeri büyüme faktörü) geni ve GH-I geninin büyük önem arz ettiği belirtilmiştir (Fox *et al.* 2009; Onuma *et al.* 2010; Richmond *et al.* 2010; Link 2010). Bütün bu bilgilerin ışığı altında akuatik ekosistemlerde organik kirleticilerin su kalitesinin kötüleşmesine yol açtığı gibi aynı zamanda toksikolojik etkilerinin insan ve balık sağlığında olumsuz etki yaptıkları açıkça ortadadır.

Hedef dokularda GH-I (büyüme hormonu)'in direkt etkisi olmasına rağmen birçok fizyolojik etkisinde IGF'ye bağımlıdır. Dolaşımdaki IGF'nin başlıca kaynağı da karaciğerdir. Periferik dokulardaki ise IGF hem GH-I'a bağımlı, hem de GH-I'a bağımsız yollardan lokal parakrin etkiler gösterir. Dışarıdan GH-I verilirse, kandaki IGF seviyesi artacağı gibi periferik dokulardaki IGF ekspresyonunda artacaktır (Peterson and Waldbieser 2009). IGFBP-3 seviyeleri GH-I'e bağımlı olup dolaşımdaki IGF-I'in başlıca taşıyıcı proteini olarak iş görür, IGFBP-1 ve IGFBP-2 ise lokal dokudaki IGF fonksiyonunu düzenler (Chesik *et al.* 2004).

IGF geni balığın gelişmesi ve büyümesinde önemli bir rol oynar. Günümüzde IGF, büyüme oranı indikatörü ve büyümeyi teşvik eden ajan olarak gösterilir (Shimizu *et al.* 2003; Larsen *et al.* 2001). IGF, insülin benzeri etkileri ve hücre çoğalması ile ilgili etkileri olan, hem karaciğerde üretilip dolaşıma verilen hem de lokal olarak üretilip etki gösteren 70 aminoasitten oluşan bir peptittir (Degger *et al.* 2000). Balık yetiştiricilik endüstrisinde ve yeni yem diyetlerinin balığın büyüme hızına katkı sağlamasında IGF-I'in potansiyel uygulamaları, araştırmalar için aktif bir alan oluşturmuştur (Dyer *et al.* 2004; Petersson and Small 2004). Bazı balıklarla ilgili yapılan son çalışmalar IGF-I'in yumurta olgunlaşmasının indüksiyonunda yer aldığını göstermiştir (Weber *et al.* 2001; Weber *et al.* 2007).

IGF-I, balığın büyümesinde önemli etkiye sahip olan mitojenik bir polipeptittir. Bu çalışmada tilapia (*Oreochromis niloticus*) üzerinde IGF-I incelenmiştir. Hepatik IGF-I cDNA'sı kısmen klonlanarak izole edilmiş ve Real-time PCR ile gerekli değerlendirmeler yapılmıştır. Sonuç olarak yüksek yem tüketimi ve sıcaklık artışı, balığın büyüme hızında ve IGF-I mRNA ekspresyonunda artışa sebep olmuş ve bu bilgiler ışığında hepatik IGF-I'in balıklar üzerinde büyümenin kontrolü için önemli bir anahtar olduğu ayrıca, IGF-I mRNA miktarının bu türün büyüme hızı oranının değerlendirilmesinde yararlı olacağı belirtilmiştir (Peterson and Small 2004; Cruz *et al.* 2005). IGF-I, yapısal homolojiyi oluşturan proinsülinin içerisinde ve yaklaşık 70 aminoasit molekülün doğal üretimde işlevsel görev alıp farklılaşma ve büyümenin düzenlenmesinde etkili olmaktadır (Degger *et al.* 2000). IGF-I sirkülasyonunun ana

kaynağı, hepatik IGF-I'in üretiminde hipofizin GH-I'i uyarmasıdır (Kajimura *et al.* 2001;Pierce *et al.* 2004).

IGF-I, ligandların yüksek afiniteli proteinlerin ve yüksek afiniteli hücre yüzeyi reseptörlerinin bağlanmasında ve omurgalıların büyümesinin düzenlenmesinde öncelikli öneme sahiptir (Wood *et al.* 2005). İnsülin benzeri büyüme hormonu mRNA'sı balıkların bütün yaşam evrelerinde bulunur. Ayrıca IGF-I gen ekspresyonu zamansal ve mekaniksel olarak tüm memelilerde benzer özellik göstermiştir. IGF, IGF reseptörleri ve IGF protein bağlayıcıları omurgalıların embriyonik gelişmesinde önemli bir düzenleyicidir (Duan 1998).

IGF-II memelilerde fetal büyümeyle ilişkilidir ancak bu balıklarda açıkça belirlenmemiştir. Yapılan çalışmada yaygın olarak bulunan sazan balıklarında PCR yöntemi uygulanarak, IGF-II cDNA amplifikasyonu sonunda tam uzunlukta IGF-II dizilimi elde edilmiştir. Tahmin edilen aminoasit dizilimi için IGF-II'nin kodlaması karşılaştırıldığında sırasıyla, salmondada %70,6, barramundide %68,7, tilapiada %63,4 ve insanda %35 oranında IGF-II belirlenmiştir. IGF-II ve IGF-II'nin cDNA diziliminde, nükleotidler arası kimlik belirleme yüzdesi sadece %32,6'dır. Aynı zamanda doku örneklerinde IGF-II mRNA'ların dağılım seviyeleri incelenmiştir. IGF-II seviyeleri genç balıkların pankreas dokusunda önemli düzeyde yüksek bulunmuştur. Ayrıca larva sazanlarda IGF-II seviyesi IGF-I'den daha yüksek bulunmuştur (Margaret *et al.* 2001).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, karaciğer ve hipofiz bezi tarafından üretilen IGF ve GH-I'in rollerine odaklanmıştır. Ancak IGF ve GH-I'in kaynağı sadece bunlar değildir. Lokal dokularda meydana gelen IGF ve GH-I gen ekspresyonları karaciğer ve hipofiz bezindekinden fazladır. Balığın erken yaşlarda gelişmesi açısından kısmi olarak önemli görülen ama muhtemelen henüz tam olarak bilinmeyen otokrin veya paratokrin gibi düzenleyiciler söz konusu olabilir (Greene and Chen 1999; Gabillard *et al.* 2003; Li *et al.* 2006, 2007; Raine *et al.* 2007).

Birkaç balık çeşidi üzerinde insülinin rolü incelenmiştir (Mommsen 2001; Navarro *et al.* 2006). İnsülin salgılanması, karbonhidrat ve aminoasitlerin etkisiyle önemli derecede beslenme rejiminden etkilenir. Kastaki protein sentezi ve aminoasit emilimi insülini tetikler. Ayrıca omurgalılarda, iskelet kasının oluşmasında ve onarılmasında IGF sistemin hayati derecede önemli rolü vardır (Navarro *et al.* 1998; Le Roith *et al.* 2001).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırma yeri

Araştırma, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümüne ait Alabalık Üretim Tesisleri, Akvaryum Balıkları ve Araştırma Merkezi ile Su Ürünleri Laboratuvarında yapılmıştır.

3.1.2. Su materyali

Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümünde, Alabalık Üretim Tesislerine ait klorsuz kaynak suyu kullanılmıştır. Yapılan ölçümlerden elde edilen su parametreleri Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan suyun kimyasal özellikleri

Parametre	Değer
O ₂	8,8 ppm
pH	7,9
SO ₄ ⁻²	0.33 mg/L
NO ₃ ⁻	3.45 mg/L
İletkenlik	240 µs/cm
Sıcaklık	9,6±1,0°C

3.1.3. Araştırma tankları

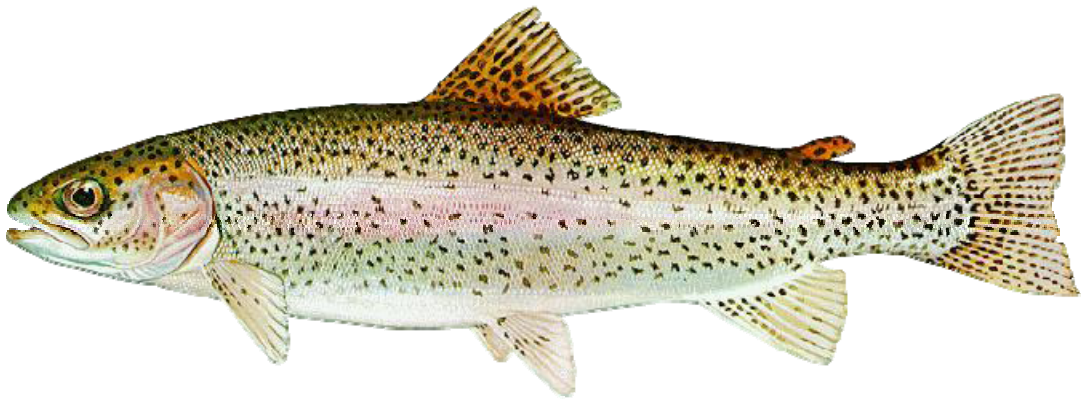
Araştırmada 1 m³’lük 2 adet fiberglas tank kullanılmıştır, tanklara 650 litre su doldurulmuştur.

3.1.4. Balık materyali

Çalışmada 20 adet 1 yaşlı Gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) kullanılmıştır. Balık ağırlıkları ortalama 150 ± 20 gr ve boyları ortalama 20 ± 3 cm'dir. Balıklar Su Ürünleri Bölümüne ait Alabalık Üretim ve Araştırma Merkezinden temin edilmiştir. Çizelge 3.2 ve Şekil 3.1'de alabalıkla ilgili bilgiler ve fotoğraf verilmiştir.

Çizelge 3.2. Gökkuşuğu alabalığının özellikleri (Anonim 2010f).

Balık Türü	Gökkuşuğu Alabalığı
Familiya	Salmonidae
Latincesi	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
İngilizcesi	Rainbow trout
Morfolojik Yapısı	Vücut diğer türlere göre daha tıknaz ve çok sayıda siyah nokta ile kaplı olup, ortası gökkuşuğu renginde bantlıdır. Kuyruk ve yağ yüzgeçleri benekli. Yumurtlama mevsiminde erkekler parlak grimsi siyah, dişiler ise daha soluk renklidir.
Maksimum Boy	80 cm.
Ortalama Boy	25-45 cm
Maksimum Ağırlık	10000 gr
Ortalama Ağırlık	250 gr
Cinsel Olgunluk	2-3 yaş

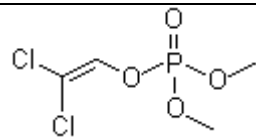


Şekil 3.1. Denemede kullanılan gökkuşuğu alabalığı

3.1.5. Uygulanan kimyasal

Balıklar üzerinde yüksek toksik etkiye sahip olan ve bitkilerde zararlı organizmalara karşı kullanılıp sucul ortama karışma ihtimali çok yüksek olan DDVP kullanılmıştır. Çizelge 3.3'te DDVP hakkında genel bilgiler verilmiştir.

Çizelge 3.3. DDVP (Anonim 2010g)

Ad	Diklorvos
Eş Anımlı	<i>2,2-Dichlorovinyl Dimethyl Phosphate, Dichlorman, DDVP, Verdisol</i>
Moleküler yapısı	
Molekül Formülü	C ₄ H ₇ Cl ₂ O ₄ P
Moleküler Ağırlığı	220,98
Yoğunluk	1,415
Ergime noktası	-60 °C
Kaynama noktası	140 °C
Suda çözünürlüğü	Az çözünür. 1 g/100 mL

3.1.6. Çalışmada kullanılan kimyasallar

1. RNA izolasyonu için gerekli kimyasallar

1. Trizol
2. Kloroform
3. İzopropilalkol
4. Etanol (% 70'lik)
5. DEPC (Diethylpyrocarbonate) su
6. MOPS (3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid) solusyonu

20x MOPS (500 ml) hazırlanışı;

41.9 gr MOPS

6.8 g sodium acetate (mw 136,08)

2.6 g EDTA (mw 372,24)

400 ml DEPC H₂O erlen içerisine konulmuş ve daha sonra pH NaOH ile 7,0'ye ayarlanmıştır. DEPC'li su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır.

7. Agaroz

8. Formamid

9. Etidium bromur

10. ddH₂O

2. Super Script™ III Reverse Transcriptase ile cDNA oluşturulması için gerekli kimyasallar

1. Oligo dT₂₀

2. dNTP Mix (pH=7,0 olan dATP, dGTP, dCTP ve dTTP her birinden 10 mM)

3. ddH₂O

4. 5xFirst-Strand Solüsyon

5. DTT

6. RNaseOUT™

7. SuperScript™ III RT

3.2. Yöntem**3.2.1. Deneme planı ve kimyasalın uygulanması**

Deneme tam şansa bağlı basit deneme planına göre, biri kontrol grubu diğeri muamele grubu olarak kurulmuştur. Denemede 2 haftalık adaptasyon sürecinden sonra, balıklara günlük 1,6 mg/l DDVP uygulaması 21 gün süresince devam etmiştir. Su, açık devre su sistemi kullanılarak kg balığa 0,5 L/dk'dan daha az olmamak şartıyla tanklara

dağıtılmıştır. Kimyasal uygulaması sırasında tanklara gelen su kesilip ve suyun 500 litrelik kısmı boşaltılıp ilaç uygulaması yapılmış 20 dakika sonra su akışı tekrar verilmiştir.

3.2.2. Balıkların öldürülmesi ve doku örneğinin alınması

21 günlük kimyasal uygulamasından sonra balıklar tanklardan alınıp kafalarına sert bir cisimle vurularak öldürülmüştür. Sonrasında steril malzemelerle balıkların sırt yüzgeçi ile linea lateral (yanal çizgi) arasında kalan kısımdan kas dokusu örnekleri alınıp plastik tüplere konulmuş ve sıvı azot içerisine bırakılmıştır.

3.2.3. Balık dokusundan total RNA izolasyonu yöntemi

Kas dokusu örnekleri alınıp TRIzol® Reagent solüsyonu içerisinde soğuk şartlarda ultraturaks yardımıyla parçalanmıştır. Total RNA'nın izolasyonu, ilgili solüsyon protokolünde belirtilen yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Total RNA konsantrasyonları ve varlığı, spektrofotometrik ölçümler ve elektroforez uygulamasıyla belirlenmiştir.

- 1- Her 4 ml Trizol başına 400-750 mg doku örneği kullanılmış ve örnek Trizol içinde homojenize edilmiştir.
- 2- Homojenizasyonun ardından 4°C'de 10 dk 11000 devirde santrifüj edilmiş ve supernatant alınmıştır.
- 3- 800 µl kloroform eklenmiş, tüplerin ağızlarını güvenli bir şekilde kapatılarak 15 sn süreyle elle çok güçlü bir şekilde çalkalanmış ve oda sıcaklığında 2-3 dk inkübe edilmiştir.
- 4- İnkübasyondan sonra örnekler 4°C'de 15 dk 11000 rpm'de santrifüjlenip supernatant alınmıştır.
- 5- Örneklerle 2 ml izopropilalkol katılıp ve oda sıcaklığında 5-10 dk inkübasyona bırakılmıştır.

- 6- Örnekler 11000 rpm'de 4°C de 15 dk santrifüj edilip üst faz tamamen uzaklaştırılmıştır.
- 7- Altta kalan kısma 4 ml %70 etanol ilave edilerek hafifçe vortekslenip 8000 rpm'de 4°C'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- 8- Etenol uzaklaştırılıp tüpler kurutma kâğıdında ters çevrilerek kurutulmuştur. Örneğe 40 µl DEPC su ilave edilerek -80°C'de stoklanmıştır (Erdoğan *et al.* 2008).

3.2.4. Total RNA'nın Kalitatif tayini

RNA varlığının kontrolü için Agaroz jel elektroforezi uygulanmıştır. Elektroforez, elektriksel bir alanın etkisi altında, suda çözünmeyen bir destek materyali içerisinde, belirli bir pH'da yüklü, çözünen ya da çözünmeyen parçacıkların göç etmesiyle ayrılmasını sağlayan bir tekniktir. RNA ürünlerinin varlığının kontrolünde kullanılan en basit yöntem Agaroz jel elektroforezidir. Elektroforde kullanılan jeli hazırlarken 0,4 gram Agaroz tartılıp üzerine 40 ml 1xTBE (Tris-Borat EDTA) tamponu ilave edilerek yaklaşık %1'lik Agaroz çözeltisi elde edilmiştir. Daha sonra 2-3 dakika mikrodalga fırın içerisinde ısıtmaya bırakılmıştır. Çözündükten sonra bir iki dakika kadar oda sıcaklığında soğutulup elektroforez tankına kabarcık oluşturmayacak şekilde boşaltılmıştır ve tarak dikkatlice yerleştirilmiştir. Çeker ocakta katılaşıncaya kadar bırakılıp, tarak çıkarılmış ve numunenin izlenmesini kolaylaştırması için boya ile karıştırılarak kuyulara yüklenmiştir. 120 voltta 1 saat yürütülüp, sonuç UV transimülatörde kontrol edilerek fotoğrafı çekilmiştir.

- **Jelde yürütülecek RNA örneğinin hazırlanışı**

RNA örneği üzerine ddH₂O eklenerek hacim 4,5 µl/L (1µl RNA +3,5 µl ddH₂O) ye getirilmiştir. Üzerine 0,5 µl 20xMOPS solüsyonu ve sonrasında 5 µl formamid eklenerek 65°C'de 15 dk inkübasyona bırakılmıştır.

- **Jelin hazırlanışı**

Cam erlen içerisine 1.88 ml 20xMOPS solüsyonu ve 0,3 gr agaroz karıştırılarak üzerine 28,5 ml ddH₂O eklenmiş ve solüsyon mikrodalga fırında kaynatılmıştır. Kaynadıktan sonra 37°C ye kadar soğumaya bırakılmış ve soğuduktan sonra üzerine 6.68 µl formamid ve sonrasında üzerine 2-3 µl/L etidyum bromür ilave edilip jelin donması için jel küvetine boşaltılmıştır.

- **Küvet solüsyonu**

1xMOPS solüsyonu kullanılmıştır. Jel donduktan sonra RNA örnekleri jele yüklenmeden önce elektroforez cihazı içerisine doldurulup örneklerin hareketi için uygun ortam sağlanmıştır.

3.2.5. Total RNA'nın Kantitatif tayini

İzole edilen RNA'ların yoğunlukları spektrofotometre ile 2 tekerrürlü olarak ölçülmüştür. Bu elde edilen değerlerin ortalaması alınarak seyrelme faktörü ile çarpılmış ve RNA yoğunluğu hesaplanmıştır. RNA dilüsyonu 1/50 olacak şekilde hazırlanarak örnekler 260 ve 280 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülüp, absorbans değerleri saptandıktan sonra yoğunluk değeri hesaplanmıştır. Total RNA'nın konsatrasyonu ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) = 260nm'deki absorbans değeri x seyreltme faktörü (1000) x40 (Ekstriksiyon katsayısı) (<http://www.pubquizhelp.34sp.com/other/dnacalculator.html>) RNA'nın yapısında yer alarak hücrelerdeki genetik bilginin kodlanmasında önemli bir rol oynayan pürin ve pürimidin bazıları 260-280 dalga boyunda absorbans verdiği için bu dalga boylarında ölçüm yapılmıştır.

3.2.6. Super Script™ III Reverse Transcriptase ile cDNA oluşturulması

Total RNA izole edildikten sonra tek zincirli şekilden çift zincirli yapıya dönüştürülmektedir ki bu yapı komplementer DNA (cDNA) olarak adlandırılırlar. Elde

edilen bu yapıların bir organizmada hemen hemen bütün gen yapısını ihtiva edebilecek bir kütüphaneye dönüştürülmesi işlemine ise cDNA kütüphanesinin oluşturulması denilmektedir. Total RNA'lardan reverse transkriptaz enzimi ile cDNA kütüphanesi oluşturulmuş ve örnekler çalışılincaya kadar -20°C 'de saklanmıştır. Yöntem şu şekildedir;

1. Steril bir mikrosantrifüj tüpüne; 1 μL 50 μM Oligo dT₂₀
 1. 10 pg-5 μg total RNA veya 10 pg-500 ng mRNA
 2. 1 μl 10 mM dNTP Mix (pH=7.0 olan dATP, dGTP, dCTP ve dTTP'nin her birinden 10 mM)
 3. 13 μl 'ye ddH₂O ile tamamlanmıştır.
2. Karışım 65°C 'de 5 dakika ısıtılıp buz üzerinde en az 1 dakika inkübe edilmiştir.
3. Karışım kısa süreli santrifüjlenip üzerine şu kimyasallar eklenmiştir;
 - 4 μl 5xFirst-Strand Buffer, 1 μl 0.1 M DTT, 1 μl RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor (Cat. no. 10777-019, 40 units/ μl).
4. Karışım hafif bir pipetleme ile karıştırılmıştır.
5. Karışım 50°C 'de 45 dakika inkübe edilmiş ve gene spesifik primer için reaksiyon sıcaklığı 55°C kadar arttırılmıştır.
6. Karışım 70°C 'de 15 dakika ısıtılarak reaksiyon durdurulmuştur (Erdoğan *et al.* 2008).

3.2.7. Primer Dizaynı Yapılması

İnternet ortamındaki gen bankasından (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) gökkuşağı alabalığında GH-I, IGF-I ve IGF-II genlerine ait mRNA baz dizilimleri kullanılarak internet ortamındaki başka bir primer dizayn programında (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi/) genlerin maksimum 250 bp'lik kısmına spesifik primerler ve problar oluşturulmuştur. TaqMan probları primerlerden daha uzun oligonükleotidlerdir (20-30 baz uzunluğunda ve Tm dereceleri 10°C daha fazladır). Bunlar genellikle 5'ucunda flouresan işaret molekülü (Reporter) ve 3' ucunda da quencher (bastırıcı; çoğunlukla TAMRA) kullanırlar. Uyarılan flouresan molekülün enerji transferi, yakınındaki quencher molekülünden daha fazla olduğunda ışınım meydana gelir (FRET = Fluorescence Resonance Energy Transfer). Böylece reporter ve

quencer moleküllerin yakınlığı ışınımı bastırır. TaqMan problemleri, PCR ürününün iç bölgesine bağlanacak şekilde dizayn edilirler. Polimeraz DNA üzerinde replikasyon yaparken TaqMan probun 5' ucuna geldiğinde ekzonükleaz aktivitesiyle probu kırar. Serbest kalan reporter molekül ışınım yapar (quencer molekülden uzaklaştığı için). Bu ışınım, her döngüde kırılan prob sayısı ile orantılı olarak artmaktadır. İyi dizayn edilmiş TaqMan problemleri çok az optimizasyon gerektirir. Molecular beacon problemleri floresan (FAM, TAMRA, TET, ROX) ve diğer uçta da quencer (çoğunlukla DABCYL) içerirler. Son olarak oluşturulan primerlerin ilgili bölgeye spesifiklikleri <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> kullanılarak kontrol edilmiştir. Uygun bulunmayan primerlerin seçimleri elle yapılmış ve <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> sitesinden tekrar kontrol edilmiştir (Erdoğan *et al.* 2008).

Çizelge 3.4. Primer Dizaynı

Genler	Primer dizilimi (5' → 3')	Çoğaltılacak bölgenin uzunluğu	Gen bankası erişim numarası
GH-I Forward	AATGGTCAGAAATGCCAACC	201 bp	NM_001124689,1
GH-I Reverse	AAGCAAGCCAACAACCTCGTAG		
GH-I Prob	^{FAM} -CATCAACCTGCTCATCACGGGG- ^{TAMRA}		
IGF-I Forward	ATGTGCTGTGTCTCCTGTACCC	149 bp	M95183.1
IGF-I Reverse	TAAAAGCCTCTCTCTCCACACA		
IGF-I Prob	^{FAM} -TAACCCTGACTTCGGCGGCA- ^{TAMRA}		
IGF-II Forward	GAAGGTCAAGATGATGTCTTCG	108 bp	M95184.1
IGF-II Reverse	AGTTCTCCTCCACATAGCGTTT		
IGF-II Prob	^{FAM} -TCGAGTGCTGGTCATTGCGC- ^{TAMRA}		
GAPDH Forward	ATCAAAGGGGCTGTCAAGAA	106 bp	NM_001124246
GAPDH Reverse	AGGAGTGGGTGTCTCCAATG		
GAPDH TaqMan Prob	^{Cy5} -CGCCGAAGGACCCATGAAGG- ^{BQ2}		

3.2.8. Multipleks Real-Time PCR

Multiplex PCR ile daha az zamanda daha çok hedef bölge amplifikasyonu gerçekleştirildiğinden kullanışlı bir inceleme yöntemidir. Fakat önemli derecede optimizasyon gerektirir. Değişik hedeflerin aynı reaksiyon şartlarında amplifikasyonunu sağlamak için kullanılacak primerlerin dikkatli seçilmesi, bağlanma sıcaklıklarının birbirine uygun olması, birbirleriyle dimerizasyona girmemeleri gibi bazı önemli şartları gerçekleştirilmesi gereklidir. Farklı primer çiftlerinin en iyi konsantrasyonlarının seçimi ve spesifik olmayan amplifikasyonların önlenmesi birçok deneme gerektirir. Doku hücrelerinden elde edilmiş RNA'nın revers transkripsiyon sonrasında elde edilen cDNA'lar üzerindeki istenilen bölgeler Real-Time PCR'da çoğaltılır (Anonim 2010h). Real-Time PCR kullanılan kimyasallar ve miktarları Çizelge 3.5'te, programı ise Çizelge3,6'da verilmiştir.

Çizelge 3.5. Real-Time PCR karışımında kullanılan kimyasallar ve miktarları

Bileşenler	Final Konsantrasyonu	Miktar (µL)
FastStart TaqMan® Probe Master	-	25
Hydrolysis Probe	5 µM	1
cDNA	-	10
Forward Primer	10 pmol	2
Reverse Primer	10 pmol	2
ddH ₂ O (Steril)	-	10
Toplam Hacim	-	50

Not; FastStart TaqMan® Probe Master; AmpliTaq Gold DNA Polimeraz, AmpErase urasil N-glikoliz (UNG), dNTP (*Deoxynucleoside triphosphates*), dUTP (*Deoxyuridine triphosphate*) ve optimize edilmiş tampon bileşeninden oluşur.

Çizelge 3.6. Real-time PCR programı

Döngü	Döngü süresi	Sıcaklık
1	2 dk	50°C
1	10 dk	95°C
45	15 sn	95°C
1	1 dk	60°C

3.2.9. Real-Time PCR uygulamalarına ilişkin bulguların değerlendirilmesi

Oncorhynchus mykiss'e ait GH-I, IGF-I ve IGF-II genlerinin yaklaşık 250 bp'lik kısmı amplifiye edilmiştir. Uygulamada kontrol geni olarak GAPDH kullanılmış ve GAPDH'ya ait ΔCt değerleri kontrol grubu ve muamele grubu arasında kıyaslanmıştır. Gen ekspresyon dereceleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak hesaplanmıştır (Livak 2001). $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak gen ekspresyonlarındaki farklılık ilişkisinin hesaplanması şu şekildedir;

$$\text{Katların değişim ilişkisi} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct \text{ değeri} = \Delta Ct_{\text{kimyasal}} - \Delta Ct_{\text{kontrol}}$$

$$\Delta Ct = (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{referans gen}})$$

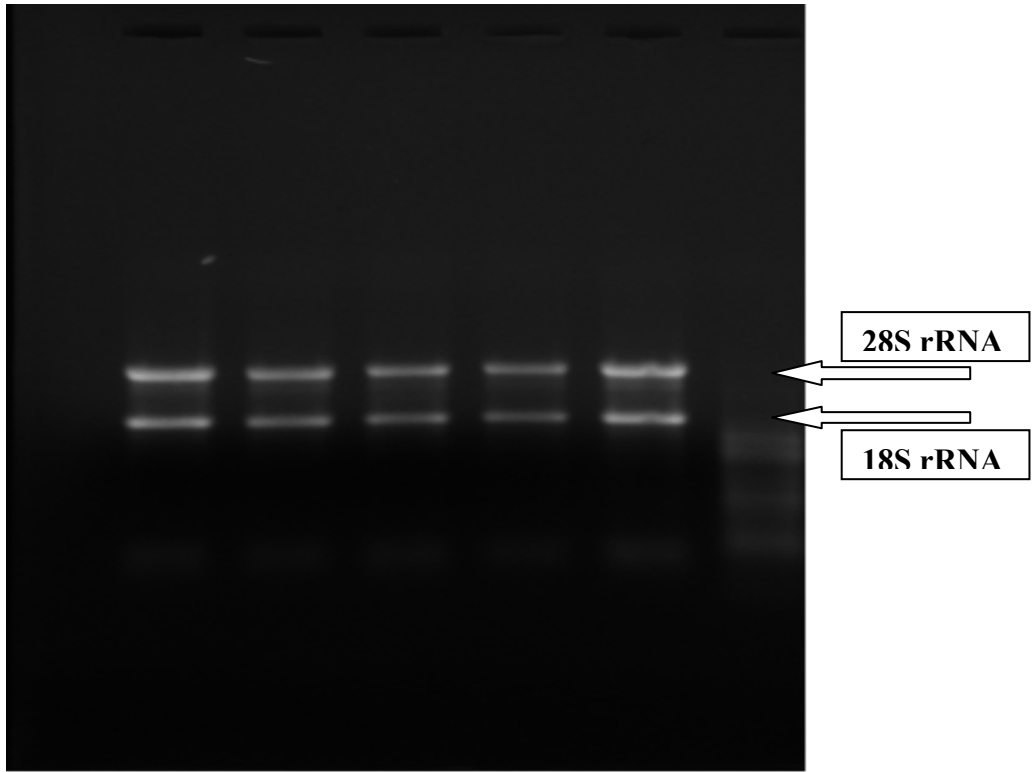
3.2.10. İstatistikî analiz

Elde edilen sonuçların istatistikî analizi için Statistica 6.0 (StatSoft® Inc., USA) programı kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. RNA izolasyonuna ilişkin bulgular

Kas dokusundan TRIzol® Reagent yöntemi ile izole edilen total RNA'ların varlığının kontrolü için %1'lik agaroz jel elektroforezi yapılarak Şekil 4.1'deki bant görüntüsü elde edilmiştir.



Şekil 4.1. RNA'nın Agaroz Jel Elektroforezinde Kontrolü. Soldan sağa doğru 1. kuyu kontrol, 2, 3, 4 ve 5. kuyular kimyasal uygulanan balıklara aittir.

Total RNA izolasyonunun gerçekleştiğinin ispatı için elektroforez sonrasında jelde 2 bant görülmesi beklenir. RNA'nın büyük bir kısmını rRNA oluşturmaktadır. Bu bantların çıkması total RNA'nın izole olduğunu gösterir. Bu bantlar izole edilen RNA

içerisindeki rRNA'ya ait alt birimler olan 28S rRNA ve 16S rRNA ünitelerinin görüntüsüdür.

4.2. Real-Time PCR sonucunda elde edilen veriler

Kas dokusundaki GH-I, IGF-I ve IGF-II seviyelerindeki değişiklik, kimyasal ve kontrol grubuna göre $p < 0,01$ istatistikî önem derecesine göre kıyaslanarak belirlenmiştir.

4.2.1 Amplifikasyon Etkinlik Oranı

Amplifikasyon etkinlik oranı, $e=10^{(-1/slope)}$ formülü ve slope değeri (stratagen MxPro3000 Software programı ile) kullanılarak hesaplanmıştır. Çizelge 4.1'de primerlere ait etkinlik oranları verilmiştir. Amplifikasyon etkinlik oranı 2 olursa dizayn edilen primerin gene spesifikliğı %100 demektir. Bu değer azaldıkça spesifiklikte azalır (Ceyhun *et al.* 2010).

Çizelge 4.1. Real-time PCR'da kullanılan primerlere ait etkinlik oranları

Genler	Slope değeri	Primer Etkinlik Oranı
GH-I	-3,54	1.93
IGF-I	-3,58	1.91
IGF-II	-3,42	1.96
GAPDH	-3,61	1.90

4.2.2. GH-I

$Kontrol_{\Delta Ct} = Kontrol\ GH-I\ \Delta Ct - Kontrol\ GAPDH\ \Delta Ct$

$DDVP_{\Delta Ct} = DDVP\ uygulanmiş\ balık\ GH-I\ \Delta Ct - DDVP\ uygulanmış\ balık\ GAPDH\ \Delta Ct$

$\Delta\Delta Ct = DDVP_{\Delta Ct} - Kontrol_{\Delta Ct}$ $E^{-\Delta\Delta Ct} = 1,93^{-\Delta\Delta Ct}$

4.2.3. IGF-I

$Kontrol_{\Delta Ct} = Kontrol\ IGF-I\ \Delta Ct - Kontrol\ GAPDH\ \Delta Ct$

$DDVP_{\Delta Ct} = DDVP\ uygulanmiş\ balık\ IGF\ -I\ \Delta Ct - DDVP\ uygulanmış\ balık\ GAPDH\ \Delta Ct$

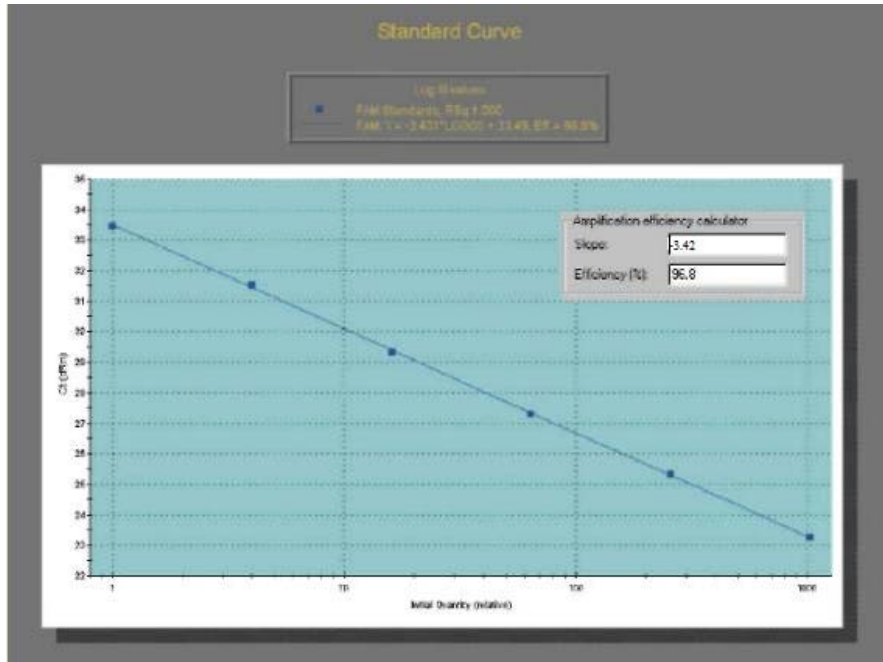
$\Delta\Delta Ct = DDVP_{\Delta Ct} - Kontrol_{\Delta Ct} \quad E^{-\Delta\Delta Ct} = 1,91^{-\Delta\Delta Ct}$

4.2.4. IGF-II

$Kontrol_{\Delta Ct} = Kontrol\ IGF-II\ \Delta Ct - Kontrol\ GAPDH\ \Delta Ct$

$DDVP_{\Delta Ct} = DDVP\ uygulanmış\ balık\ IGF\ -II\ \Delta Ct - DDVP\ uygulanmış\ balık\ GAPDH\ \Delta Ct$

$\Delta\Delta Ct = DDVP_{\Delta Ct} - Kontrol_{\Delta Ct} \quad E^{-\Delta\Delta Ct} = 1,96^{-\Delta\Delta Ct}$



Şekil 4.2. Amplifikasyon oranının hesaplanması. IGF-II değerine ait standart eğri, X ve Y ekseninde sırasıyla cDNA seyreltme faktörünün ve Ct değerlerinin logaritmik bölgesi gösterilmiştir.

4.3. İstatistiki analiz sonuçları

Real-Time PCR uygulaması sonucunda elde edilen verilerin Statistica 6.0 programıyla değerlendirilmesi sonunda aşağıdaki verilere ulaşılmıştır.

Çizelge 4.2. Genlere ait kontrol ve muamele grupları arasındaki ΔCt değerleri

Genler	Muamele	Ortalama ΔCt^x	$\Delta\Delta Ct^y$	Fold Azalışı ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
GH-I	Kontrol	$1,80 \pm 0,07^b$	3,27	0,14
	DDVP 1,6 mg/L	$5,07 \pm 0,27^a$		
IGF-I	Kontrol	$0,78 \pm 0,17^b$	-4,85	21,92
	DDVP 1,6 mg/L	$-4,07 \pm 0,05^a$		
IGF-II	Kontrol	$-3,07 \pm 0,07^b$	-0,57	1,48
	DDVP 1,6 mg/L	$-3,64 \pm 0,08^a$		

a, b= Bu değerler her bir genin kendi içerisindeki muamele ve kontrol değerleri dikkate alınarak $p < 0.01$ seviyesindeki istatistiki önem derecesidir.

x= Kullanılan her balık için ilk önce ΔCt değeri: aynı balığın GAPDH geninin -Ct seviyesi ve DDVP -Ct seviyeleri bulunarak hesaplandı. Daha sonra ortalama ΔCt değeri uygulamaya tabi tutulan her bir balık için Ct değeri bulunarak hesaplandı.

y= $\Delta\Delta Ct$ değeri, kimyasal uygulanan grubun değerinin ortalaması ile kontrol grubunun ortalama ΔCt değerinin karşılaştırılmasıyla hesaplandı.

5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Daha önce yapılan çalışmalarda DDVP'nin enzimler, kan parametreleri, sub-letal doz belirleme, mortalite ve lokal dokularda meydana getirdiği değişiklikler incelenmiştir (Giordano *et al.* 1989; Levesque *et al.* 2002). Bu açıdan yapılan çalışma moleküler düzeyde DDVP'nin büyüme genlerinde meydana getirdiği değişikliklerin belirlenmesi açısından ilk ve önemlidir. Yapılan birçok çalışmada varılan ortak sonuç kirleticilerin gen ekspresyon seviyelerinde değişiklikler meydana getirdiğidir (Handy 2003; Xiaodong *et al.* 2007; Vergani *et al.* 2009).

Diğer çalışmalarda ise GH-I, IGF-I ve IGF-II'nin büyüme üzerine olan etkileri incelenmiş yâda yapılan kimyasal uygulamalarının lipit ve protein metabolizması, asetilkolinesteraz aktivitesi, çeşitli plazma parametreleri, HSP-70 gen ekspresyonu değişimi, sebep olduğu mutasyon etkileri ve protein sentezi ile aminoasit emilimi gibi parametrelerde meydana getirdiği değişiklikler incelenmiştir (Kajimura *et al.* 2001; Pierce *et al.* 2004). Sonuç olarak yapılan çalışmalarda DDVP ve benzeri pestisit uygulamalarının büyüme ve biyolojik aktivite üzerinde olumsuz etkiler meydana getirdiğini söyleyebiliriz. Ayrıca zirai uygulamalarda zararlı böceklere karşı uygulanan pestisitlerin diğer canlılarda yaratacağı öldürücü dozların belirlenmesi için bu ve benzeri çalışmalar önem teşkil etmektedir.

Ceyhun *et al.* (2010) Yaptıkları çalışmada gökkuşağı alabalığı üzerinde farklı dozlarda (0.25, 1, 2.5 µg/L) ve farklı saat dilimlerinde (6, 12, 24, 48 ve 72) deltametrin uygulaması yaparak HSP-70 gen ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikleri incelemişlerdir. Sonuç olarak pestisit uygulamasının balıklardaki HSP-70 gen ekspresyon düzeyinde önemli derecede artışa sebep olduğu kanısına varmışlardır.

Balıkta temel görevi besin alımı, protein sentezi ve sonuçta hücre bölünmesini uyarmak olan insülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I)'nin salınımı yem alımı ile artar. Birçok

kemikli balıkta, beslenme oranı ve sıklığıyla IGF-I ve GH arasında pozitif bir ilişki olduğu açıktır (Davie 2005).

İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF) somatik büyümede etkili olan, karaciğer ve birçok doku tarafından sentezlenebilen faktörlerdir. IGF-I ve IGF-II olarak iki önemli forma sahiptir. IGF-I daha çok doğumdan sonra, IGF-II ise doğumdan önceki büyüme üzerinde etkilidir. IGF'nin kas dokusunda etkisi mekanik stresle (hareketle) birlikte artar. IGF-I'in serum seviyelerindeki değişimin en önemli belirleyicisi besin alımıdır. IGF-I'in serum seviyelerinde kısa süreli ani değişim yoktur ve seviyeler oldukça stabildir. Besin alımı değişimlerine IGF-I, IGF-II'ye göre daha duyarlıdır. IGF-I'in büyüme sürecinde, bütün dokular üzerinde etkili olduğu bilinmekle beraber, son yıllarda GH'dan bağımsız şekilde mekanik yüke duyarlı olan satellit hücre aktivasyonunu artırdığı, böylece kas hipertrofisine neden olduğu görüşü kabul görmektedir (Harbili 2008).

Sunulan bu çalışmada DDVP'ye maruz bırakılan gökkuşağı alabalıklarının büyüme genlerinde (GH-I, IGF-I, IGF-II) meydana gelen değişiklikler incelenmiştir. DDVP uygulaması sonrasında balıkların yem alımında azalmalar, yüzme hareketlerinde düzensizlikler ve durgunluk görülmüştür. 21 gün sonunda balıklardan alınan kas dokuları üzerinde yapılan incelemelerde büyüme gen ekspresyon seviyelerinde, kontrol grubu ve kimyasal uygulanan grup kıyaslandığında değişimler meydana geldiği gözlemlenmiştir.

Real-Time PCR uygulaması sonrasında genlere ait kontrol ve muamele grupları arasındaki ΔC_t değerleri karşılaştırıldığında; GH-I gen ekspresyon seviyesi büyümeye ve yaşa bağlı olarak artmakta iken kimyasal uygulamasına tepki olarak kontrol grubuna oranla daha fazla artış göstermiştir. Bu değer kontrol grubunda $1,80 \pm 0,07^b$ iken kimyasal uygulanan grupta $5,07 \pm 0,27^a$ olarak belirlenmiştir. IGF-I ve IGF-II gen ekspresyon seviyesi gen sırasıyla kontrol grubunda $0,78 \pm 0,17^b$ ve $-3,07 \pm 0,07^b$ kimyasal uygulaması yapılan grupta $-4,07 \pm 0,05^a$ ve $-3,64 \pm 0,08^a$ olarak belirlenmiştir. Kimyasal uygulamasının kas dokusunda ki IGF-I ve IGF-II gen ekspresyon seviyelerinde

azalmaya sebep olduğunu söyleyebiliriz. Bunun sonucunda DDVP'nin balıkların büyüme aktivitelerinde yavaşlamaya ve olumsuz biyolojik etkilere sebep olduğunu söyleyebiliriz.

Çalışmada GH seviyesinde hem kontrol hemde muamele grubunda pozitif artış, IGF-I ve IGF-II seviyelerinde ise azalmalar belirlendiğini söyleyebiliriz. GH seviyesindeki artışın sebebini uygulanan kimyasala karşı karaciğer ve hipofiz tarafından bir direnç göstergesi olarak ifade edebiliriz. Ayrıca kimyasal uygulamasıyla balıklarda yem alım seviyesi düştüğü gözlemlenmiştir. Buna istinaden açlıktan dolayı GH salınımı arttığını ifade edebiliriz. GH, IGF-I ve IGF-II arasında meydana gelen farklılıkların sebebi olarak bu faktörlerin birbirleriyle ilişki içerisinde olmasının yanı sıra farklı işlev ve zamanlarda görev almasından kaynaklı olduğunu da söyleyebiliriz.

Sonuç olarak DDVP'nin alabalıkların büyüme genleri (IGF-I ve IGF-II) üzerinde olumsuz etkileri olduğunu ifade edebiliriz. Sucul ortamın bu ve benzeri kirleticilerden arındırılması kesinlikle bu ortamda yaşayan canlılar, özellikle balıklar için önem arz etmektedir. DDVP benzeri pestisitlerin kullanımının kontrol altında tutulması ve daha dikkatli bir şekilde kullanılarak sucul ortama karışımının engellenmesiyle bu ortamda yaşayan balıkların bundan zarar görmesi önlenmelidir. Daha temiz su şartları sağlanarak balıkların büyüme ve gelişme evrelerinde mutlak gelişmeler gözlenebilecektir.

KAYNAKLAR

- Aksakal, E. ve Atamanalp, M., 2005. Su kirliliğinin balıklarda büyüme üzerine etkileri. *Hasad hayvancılık*, 24(279), 62-65.
- Anonim 2010a. www.suyla.com/dunyada-su-kaynaklari.html (18.04.2010).
- Anonim 2010b. [Pestisit. tr.wikipedia.org/wiki/Pestisit](http://tr.wikipedia.org/wiki/Pestisit). (25.04.2010).
- Anonim 2010c. IGF. www.bilim.gen.tr. (27.04.2010).
- Anonim 2010d. PCR. www.iontek.com.tr. (28.04.2010).
- Anonim 2010e. DDVP. www.apvma.gov.au/products/review/current/dichlorvos.php (28.04.2010).
- Anonim 2010f. [Gökkuşluğu Alabalığı. tr.wikipedia.org/wiki/Ana_Sayfa](http://tr.wikipedia.org/wiki/Ana_Sayfa). (23.04.2010).
- Anonim 2010g. DDVP. tr.wikipedia.org/wiki/diclorvos. (28.04.2010).
- Anonim 2010h. Multiplex PCR. <http://www.iontek.com.tr>. (28.04.2010).
- Atamanalp, M., Angis, S., Oguzhan, P. ve Aksakal, E., 2007. Alterations in Hematological Parameters of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Exposed to DDVP. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*, 60(1), 2008, 9-12.
- Babaoğlu, M., 2010. Biyoteknolojinin Tanımı. KTO-Karatay Üniversitesi Rektörlüğü, Konya. <http://www.biyoteknoloji.gen.tr/biyoteknoloji.html>. (13.03.2010).
- Balkaya, N. ve Onar, A., 2004. Organofosfatlı Pestisitlerin Fotokatalitik Olarak Bozunması (Photocatalytic Degradation of Organophosphate Pesticides). *Çevre Bilimleri Dergisi*, 6, 43-49.
- Bris, H., Maffart, P., Bocquené, G., Buchet, V., Galgani, F. and Blanc, G., 1995. Laboratory study on the effect of dichlorvos on two commercial bivalves. *Aquaculture*, 138(4), 139-144.
- Ceyhun, S., Şentürk, M., Erdoğan O. ve Küfrevioğlu, İ., 2010. *In vitro* and *in vivo* effects of some pesticides on carbonic anhydrase enzyme from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gills. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 105(2), 31-34.
- Chesik, D., Wilczak, N., Keyser J.D., 2004. Insulin-like growth factor binding protein-4 interacts with centrosomes and microtubules in primary astrocytes. *Neuroscience*, 125(2), 381-390.
- Chuiko, G.M., 2000. Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and in vitro inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 127(3), 233-242.
- Cruz, E., Brown, C., Luckenbach, J.A., Picha, M.E., Bolivar, R.B. and Borski, R.J., 2005. Insulin-like growth factor-I cDNA cloning, gene expression and potential use as a growth rate indicator in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 251(2-4), 585-595.
- Cusack, R. and G, Johnson., 1990. A study of dichlorvos (*Nuvan*; 2,2 dichloroethenyl dimethyl phosphate), a therapeutic agent for the treatment of salmonids infected with sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*). *Aquaculture*, 90(2), 101-112.

- Çakır, Ş. ve Yamanel Ş., 2005. Böceklerde İnsektisidlere Direnç. G.Ü. Kırşehir Eğitim Fakültesi Dergisi, Cilt 6, Sayı 1, 21-29. Kırıkkale Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kırıkkale/TÜRKİYE.
- Çetinkaya, O., Sen, F., Elp, M., 2005. Balıklarda büyüme ve büyüme analizleri. Balık biyolojisi araştırma yöntemleri. Nobel yayınları, 498, 93-121.
- Davie, A., 2005. Effect of photoperiod manipulation on growth and reproduction in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). PhD Thesis. Inst. of Aquaculture, Univ. of Stirling, Scotland.
- Degger, B., Upton, Z., Soole, K., Collet, C. and Richardson, N., 2000. Comparison of recombinant barramundi and human insulin-like growth factor (IGF)-I in juvenile barramundi (*Lates calcarifer*): *in vivo* metabolic effects, association with circulating IGF-binding proteins, and tissue localization. General and Comparative Endocrinology, 117(3), 395-403.
- Demaël, A., Dunier, M. and Siwicki A.R., 1990. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, 95(2), 237-240.
- Duan, C., 1998. Nutritional and Developmental Roles of Insulin-like Growth Factors between Species. Department of Biology, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109-1048.
- Dunier, M., Siwicki, A.K. and Demaël, A., 1991. Effects of organophosphorus insecticides: Effects of trichlorfon and dichlorvos on the immune response of carp (*Cyprinus carpio*) : III. *In Vitro* effects on lymphocyte proliferation and phagocytosis and *in Vivo* effects on humoral response. Ecotoxicology and Environmental Safety, 22(1), 79-87.
- Durmuş, D., 2009. DDVP'nin (*Dichlorvos*) Subletal Dozlarının *Galleria mellonella* L.'nin Protein, Lipit ve Karbonhidrat Düzeyine Etkileri. Y. Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, Türkiye.
- Dyer, A.R., Upton, Z., Stone, D., Thomas, P.M., Soole, K.L., Higgs, N., Quinn, K. and Carraler, J.F., 2004. Development and validation of a radioimmunoassay for fish insulin-like growth factor I (IGF-I) and the effect of aquaculture related stressors on circulating IGF-I levels. General and Comparative Endocrinology, 135(3), 268-275.
- Erdogan, O., Atamanalp, M., Sisman, T., Aksakal, E ve Alak, G., 2007. Effects of 2,2-Dichlorovinyl Dimethyl Phosphate (DDVP) on Hsp70 Gene Expression in Rainbow Trout. The Israeli Journal of Aquaculture- Bamidgeh 59(4), 230-234.
- Erdoğan, O., Küfrevioğlu, Ö.İ. ve Çankaya, M., 2008. Balık Dokusundan RNA Saflaştırılması. Su ürünlerinde uygulamalı moleküler biyoloji teknikleri. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Yayınları. Erzurum, Türkiye. No:237, 90-93.
- Erdoğan, O., Özdemir, H. ve Aksakal, E., 2008. RACE ve Revers Transcriptaz ile cDNA Üretimi. Su ürünlerinde uygulamalı moleküler biyoloji teknikleri. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Yayınları Erzurum, Türkiye. No:237, 94-98.
- Fox, B.K., Breves, J.P., Davis, L.K., Pierce, A.L., Hirano, T. and Grau, E.G., 2009. Tissue-specific regulation of the growth hormone/insulin-like growth factor axis during fasting and re-feeding: Importance of muscle expression of IGF-I and IGF-II mRNA in the tilapia. General and Comparative Endocrinology, 166(3), 573-580.

- Gabillard, J.C., Rescan, P.Y., Fauconneau, B., Weil, C. and Le Bail, P.Y., 2003. Effect of temperature on gene expression of the GH-I/IGF system during embryonic development in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology*, 133(2), 233-242.
- Giordano, R., Arata, P., Rinaldi, S., Ciaralli, L., Giani, M., Rubbiani, M. and Costantini, S., 1989. Mercury, cadmium and lead levels in marine organisms (*Mytilus galloprovincialis*) collected along the Italian coasts. *Ann. Ist. Super. Sanita*, 25(3), 511-516.
- Greene, M.W. and Chen, T.T., 1999. Characterization of teleost insulin receptor family members II: developmental expression of insulin-like growth factor type 1 receptor messenger RNAs in rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* 115, 270–281.
- Günel, T., 2007. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PCR”. *Moleküler Biyoloji ve Genetik, İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BiYOGEM), İSTANBUL Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 27, 763-767.
- Handy, R.D., 2003. Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 135, 25–38.
- Harbili, S., 2008. İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF): Egzersiz metabolizması ve kas dokusu üzerine etkileri. *Genel Tıp Dergisi*, 18(4): 177-184.
- Howard, W.C., Edward, M.C. and Chambers, J.E. 2010. *Chemistry of Organophosphorus Insecticides*. Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition), 1395-1398.
- Hoy, T., Horsberg, T.E. and Wichstrøma, R., 1991. Inhibition of acetylcholinesterase in rainbow trout following dichlorvos treatment at different water oxygen levels. *Aquaculture*, 95(1-2), 33-40.
- Intorre, L., G. Soldani, A. M. Cognetti-Varriale, G. Monni, V. Meucci and C. Pretti., 2003. Safety of azamethiphos in eel, seabass and trout. *Pharmacological Research*, 49(2), 171-176.
- Kajimura, S., Uchida, K., Yada, T., Riley, L.G., Byatt, J.C., Collier, R.J., Aida, K., Hirano, T. and Grau, E.G., 2001. Effects of insulin-like growth factors (IGF-I and -II) on growth hormone and prolactin release and gene expression in euryhaline tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *General and Comparative Endocrinology*, 127(3), 223-231.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J. And Lind, K., 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3), 95-125.
- Larsen, D.A., Beckman, B.R. and Dickhoff, W.W., 2001. The Effect of Low Temperature and Fasting during the Winter on Metabolic Stores and Endocrine Physiology (Insulin, Insulin-like Growth Factor-I, and Thyroxine) of Coho Salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *General and Comparative Endocrinology*, 123(3), 308-323.
- Le Roith, D., Scavo, L. and Butler, A., 2001. What is the role of circulating IGF-I? *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 12(2), 48-52.
- Levesque, H.M., Moon, T.W., Campbell, P.C.G. and Hontela, A., 2002. Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca*

- flavescens*) chronically exposed to metals in the field. *Aquatic Toxicology*, 60(3-4), 257-267.
- Li, M., Greenaway, J., Raine, J.C., Petrik, J., Hahnel, A. and Leatherland, J.F., 2006. Growth hormone and insulin-like growth factor gene expression prior to the development of the pituitary gland in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos reared at two temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 143(4), 514-522.
- Li, M., Raine, J.C. and Leatherland, J.F., 2007. Expression profiles of growth-related genes during the very early development of rainbow trout embryos reared at two incubation temperatures. *General and Comparative Endocrinology*, 153(1-3), 302-310.
- Link, K., Berishvili, G., Shved, N., D’Cotta, H., Baroiller, J., Eppler, E. and Reinecke, M., 2010. Seawater and freshwater challenges affect the insulin-like growth factors IGF-I and IGF-II in liver and osmoregulatory organs of the tilapia. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 127(3), 65-68.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Lucic, M.R., Forbes, B.E., Grosvenor, S.E., Carr, J.M., Wallace, J.C. and Forsberg, G., 1998. Secretion in *Escherichia coli* and phage-display of recombinant insulin-like growth factor binding protein-2. *Journal of Biotechnology*, 61(2), 95-108.
- Margaret, C.L. Tse., Vong, Q.P., Cheng, C.H.K. and Chan, C.K.M., 2001. PCR-cloning and gene expression studies in common carp (*Cyprinus carpio*) insulin-like growth factor-II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1575(1-3), 63-74.
- McHenery J.G., Saward D. and Seaton, D.D., 1991. Lethal and sub-lethal effects of the salmon delousing agent dichlorvos on the larvae of the lobster (*Homarus gammarus* L.) and herring (*Clupea harengus* L.). *Aquaculture*, 98(4), 331-347.
- McHenery, J. G., Francis, C. and Davies, I. M., 1996. Threshold toxicity and repeated exposure studies of dichlorvos to the larvae of the common lobster (*Homarus gammarus* L.). *Aquatic Toxicology*, 34(3), 237-251.
- McHenery, J.G., Linley-Adams, G.E., Moore, D.C., Rodger, G.K. and Davies, I.M., 1997. Experimental and field studies of effects of dichlorvos exposure on acetylcholinesterase activity in the gills of the mussel, *Mytilus edulis* L. *Aquatic Toxicology*, 38(1-3), 125-143.
- Murison D.J., Moore, D.C., McHenery, J.G., Robertson, N.A. and Davies, I.M., 1997. Epiphytic invertebrate assemblages and dichlorvos usage at salmon farms. *Aquaculture*, 159(1-2), 53-66.
- Mommsen, T.P., 2001. Paradigms of growth in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 129(2-3), 207-219.
- Navarro, P., Valverde, A.M., Benito, M. and Lorenzo, M., 1998. Insulin/IGF-I Rescues Immortalized Brown Adipocytes from Apoptosis Down-Regulating Bcl-xS Expression, in a PI 3-Kinase and Map Kinase-Dependent Manner. *Experimental Cell Research*, 243(2), 213-221.
- Navarro, G., Lopez-Aceves, T., Rojas-Ochoa, A. and Mejia, C.F., 2006. Effect of dichlorvos on hepatic and pancreatic glucokinase activity and gene expression, and on insulin mRNA levels. *Life Sciences*, 78(9), 25, 1015-1020.

- Onuma, T.A., Ban, M., Makino, K., Katsumata, H., Hu, WW., Ando, H., Fukuwaka, M., Azumaya, T. and Urano, A., 2010. Changes in the plasma levels of insulin-like growth factor-I from the onset of spawning migration through upstream migration in chum salmon. *General and Comparative Endocrinology*, 165(2), 237-243.
- Oğuzhan, P. ve Atamanalp, M., 2008. Su Kirliliğinin Balıklarda Üreme Üzerine Etkileri. Erzincan Üniversitesi AquaClub Su Ürünleri Araştırma ve Geliştirme Bilim Kulübü, Kemaliye 5.Geleneksel Su Ürünleri Bilimsel ve Kültürel Platformu.
- Öden, S., 2010. Pestisitler ve pestisitlerin çevreye etkileri. Tütün Ekspertliği Yüksek Okulu, Celal Bayar Üniversitesi, www.tutuneksper.org.tr/yayin/bulten/bulten77/pestisitler.htm. (28.04.2010).
- Öncüer, C., 2004. Pestisitler. Tarımsal Zararlılarla Savaş Yöntemleri ve İlaçları V. Baskı. Adnan Menderes Üniversitesi Yayınları No:19, Aydın, 424-425.
- Özata, M., 2010. Büyüme hormonu nedir. www.tavsiyeediyorum.com/makale_2899.htm (04.20.2010).
- Peterson, B.C. and Small, B.C., 2004. Effects of fasting on circulating IGF-binding proteins, glucose, and cortisol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Domestic Animal Endocrinology*, 26(3), 231- 240.
- Peterson, B.C. and Waldbieser, G.C., 2009. Effects of fasting on IGF-I, IGF-II, and IGF-binding protein mRNA concentrations in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Domestic Animal Endocrinology*, 37(2), 74-83.
- Pierce, A.L., Dickey, J.T., Larsen, D.A., Fukada, H., Swanson, P. and Dickhoff, W.W., 2004. A quantitative real-time RT-PCR assay for salmon IGF-I mRNA, and its application in the study of GH-I regulation of IGF-I gene expression in primary culture of salmon hepatocytes. *General and Comparative Endocrinology*, 135(3), 401-411.
- Raine, J.C., Shin, M.L. and Rus, H., 2007. Complement C5 regulates the expression of insulin-like growth factor binding proteins in chronic experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology*, 203(1), 94-103.
- Rath, S. and Misra, B.N., 1979., Sub-lethal effects of dichlorvos (DDVP) on respiratory metabolism of *Tilapia mossambica*, peters of 3 age groups. *Experimental Gerontology*, 14(1), 37-41.
- Rath, S. and Misra, B.N., 1981., Toxicological effects of dichlorvos (DDVP) on brain and liver acetylcholinesterase (AChE) activity of *Tilapia mossambica*, peters. *Toxicology*, 19, 3, 239-245.
- Richmond, J.P., Norris, T. and Zinn, S.A., 2010. Re-alimentation in harbor seal pups: Effects on the somatotrophic axis and growth rate. *General and Comparative Endocrinology*, 165, 2, 286-292.
- Rishi, K., and Sunita., 1995. Chromosome aberration test for the insecticide, dichlorvos, on fish chromosomes. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 344(1-2), 1-4.
- Shimizu, M., Swanson, P., Hara, A. and Dickhoff, W.W., 2003. Purification of a 41-kDa insulin-like growth factor binding protein from serum of chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *General and Comparative Endocrinology*, 132(1), 103-111.

- Şahin, T. 2003. Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Biyoteknoloji. Sümae Yunus Araştırma Bülteni, 3; 12-14
- TKB, 2000. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Faaliyet Raporu. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Ankara (12.05.2010).
- Varò, I., Navarro, J.C., Amat, F. and Guilhermino, L., 2003. Effect of dichlorvos on cholinesterase activity of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Pesticide Biochemistry and Physiology, 75(3), 61-72.
- Varó, I., Navarro, J.C., Nunes, B., and Guilhermino, L., 2007. Effects of dichlorvos aquaculture treatments on selected biomarkers of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fingerlings. Aquaculture, 266, 87–96.
- Varó, I., Amat, F. and Navarro, J.C., 2008. Acute toxicity of dichlorvos to *Aphanius iberus* (Cuvier & Valenciennes, 1846) and its anti-cholinesterase effects on this species. Aquatic Toxicology, 88(1), 53-61.
- Vergani, L., Lanza, C., Scarabelli, L., Canesi, L. and Gallo, G., 2009. Heavy metal and growth hormone pathways in metallothionein regulation in fish RTH-149 cell line. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 149, 572–580.
- Weber, M., Milligan, L., Delalbre, A., Antoine, E., Brunel, C., Cathala, G. and Forné, T., 2001. Extensive tissue-specific variation of allelic methylation in the *Igf2* gene during mouse fetal development: relation to expression and imprinting. Mechanisms of Development, 101(1-2),133-141.
- Weber, G.M., Moore, A.B. and Sullivan, C.V., 2007. *In vitro* actions of insulin-like growth factor-I on ovarian follicle maturation in white perch (*Morone americana*). General and Comparative Endocrinology, 151(2), 180-187.
- WHO., 1989. Dichlorvos. International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria, Pages 79. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc79.htm> (24.05.2010).
- Wood, A.W., Duan, C. and Bern, A.H., 2005. Insulin-Like Growth Factor Signaling in Fish. International Review of Cytology, 243, 215-285.
- Xiao-dong, J., Gui-zhong, W., Shao-jing, L. and Jian-feng, H., 2007. Heavy metal exposure reduces hatching success of *Acartia pacifica* resting eggs in the sediment. Journal of Environmental Sciences 19, 733–737.
- Yavuz, O. ve Şanlı, Y., 1999. Halk Sağlığı ve Vektör Kontrolünde Kullanılan Pestisidler, Pestisid Formülasyonları ve Uygulama Seçenekleri, I. Seminer. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Anabilim Dalı. Ankara.
- Yücel, Ü., 2007. Petisitlerin İnsan ve Çevre üzerine etkileri. Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi, Nükleer Kimya Bölümü, Ankara, www.dogainsanisbirligidernegi.org.tr/makaleler/pestisitler.doc, (15.05.2010).
- Yücel, Ü., 2010. Petisitlerin İnsan ve Çevre üzerine etkileri. Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi, Nükleer Kimya Bölümü, Ankara, www.dogainsanisbirligidernegi.org.tr/makaleler/pestisitler.doc, (16.05.2010).

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Elazığ'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Mezre İlköğretim Okulu'nda, Lise öğrenimini Mehmet Akif Ersoy Lisesi'nde tamamladı. 2002 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü'nden 2006 yılında mezun oldu. 2009 yılında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı ve halen devam etmektedir.