



Meriç Delta Balıklarında Çevre Kirliliğinin Genotoksik Etkileri: Antioksidan Savunma, Isı Şok Protein Sinyali ve DNA Hasar-Onarım Mekanizmaları

Cem TOKATLI^{1*} , Oğuzhan DOĞANLAR² , Zeynep Banu DOĞANLAR¹

¹Trakya Üniversitesi, İpsala Meslek Yüksekokulu, Laboratuvar Teknolojisi Programı

²Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZ

Çalışmamızda, Gala ve Sığircı Gölleri için ekonomik açıdan önemli olan balık türleri (*Carassius gibelio* (Bloch, 1782), *Carassius carassius* (Linnaeus, 1758), *Scardinius erythrophthalmus* (Linnaeus, 1758), *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758, *Sander lucioperca* (Linnaeus, 1758), *Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758) üzerinde kirliliğin etkileri araştırılmıştır. Kirliliğin genotoksik etkileri, kas, solungaç ve karaciğer dokularında antioksidan savunma sinyali (GS, Cu-Zn SOD, CAT), ısı şok proteinleri (HSP26, HSP60, HSP70 ve HSP83) ve QRT-PCR testi ile DNA onarımı (SMUG1) metotları kullanılarak incelenmiştir. Ayrıca, RAPD analizi kullanılarak balık dokularındaki DNA hasarları belirlenmiştir. Bant değişimleri, özellikle tüm balıkların solungaç dokularında açıkça tespit edilmiştir. Ayrıca, *C. gibelio*, *S. erythrophthalmus* ve *S. lucioperca*'nın kas dokusunda CuZn-SOD'un nispi ekspresyonunda önemli bir artış gösterdiği tespit edilmiştir. CAT ekspresyonu tüm balık dokularında önemli ölçüde değişiklik sergilemiştir. Bununla birlikte, CAT 128,9, 102,1 ve 138,4 fg/µg total RNA'nın ekspresyon seviyesindeki en yüksek artış, *S. lucioperca*'nın kas, karaciğer ve solungaç dokularında belirlenmiştir. HSP60 ve HSP70 çevre kirliliğinden en az etkilenirken, *S. lucioperca*'nın karaciğer dokusunda en büyük DNA onarım aktivitesi açık şekilde gözlenmiştir. Çalışmamızın sonucunda, Gala ve Sığircı Göllerindeki çevre kirliliğinin DNA stabilitesi ve savunma sinyallerinin gen ifadeleri üzerinde genotoksik etkileri olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca, *S. lucioperca* türünün, su kirliliğinin biyolojik olarak izlenmesinde biyoidikatör bir tür olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Meriç Deltası, balık dokuları, RAPD analizi, antioksidan enzimler, gen ekspresyonu

MAKALE BİLGİSİ

ARAŞTIRMA MAKALESİ

Geliş : 22.01.2019
Düzeltilme : 05.08.2019
Kabul : 08.08.2019
Yayın : 25.04.2020



DOI:10.17216/LimnoFish.516094

* SORUMLU YAZAR

tokatlicem@gmail.com
Tel : +90 284 616 1348

Genotoxic Effects of Environmental Pollution in Meriç Delta Fish: Expressions of Antioxidant Defence Signals, Heat Shock Proteins and DNA Damage-Repair Mechanisms

Abstract: In this study, the effects of pollution on economically important fish species for Gala and Sığircı Lakes [*Carassius gibelio* (Bloch, 1782), *Carassius carassius* (Linnaeus, 1758), *Scardinius erythrophthalmus* (Linnaeus, 1758), *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758, *Sander lucioperca* (Linnaeus, 1758), *Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758] were investigated. The genotoxic effects of environmental pollution were investigated with reference to gene expressions of antioxidant defense signal (GS, Cu-Zn SOD, CAT), heat shock proteins (HSP26, HSP60, HSP70 and HSP83) and DNA repair (SMUG1) by qRT-PCR assay in muscle, liver and gill tissue of fish species. Additionally, DNA damage determined using RAPD assay. Band changes were clearly detected, especially in the gill tissues of all fishes. In addition, a significant increase in the relative expression of CuZn-SOD in muscle tissue of *C. gibelio*, *S. erythrophthalmus* and *S. lucioperca*. The expression of CAT changed significantly at all tissue of fishes. However, the highest increase in expression level of CAT 128.9, 102.1 and 138.4 fg/µg total RNA was determined in muscle, liver and gill tissues of *S. lucioperca*. While the HSP60 and HSP70 was the least affected by environmental pollutions, greatest DNA repair activity was clearly observed in liver tissue of *S. lucioperca*. We conclude that environmental pollution in Gala and Sığircı Lake exert genotoxic effects on DNA stability, and gene expressions of defense signaling. Additionally, *S. lucioperca* may be a bio-indicator species for biomonitoring to water pollution.

Keywords: Meriç Delta, fish tissues, RAPD analysis, antioxidant enzymes, gene expression

Alıntılama

Tokatlı C, Doğanlar O, Doğanlar ZB. 2020. Meriç Delta Balıklarında Çevre Kirliliğinin Genotoksik Etkileri: Antioksidan Savunma, Isı Şok Protein Sinyali ve DNA Hasar-Onarım Mekanizmaları. LimnoFish. 6(1): 14-24. doi: 10.17216/LimnoFish.516094

Giriş

Artan nüfus ve buna bağlı tarım ve sanayi faaliyetlerindeki hızlı gelişmeler ve çevre bilincinin yeterince yerleşmemiş olması, su kaynaklarımızı ve sucul canlıları tehdit etmektedir. Balıklar, sağlıklı ve dengeli beslenme için büyük önem taşımaktadır. Özellikle vücutta sentezlenemeyen ve dışarıdan alınması zorunlu olan amino asitleri ve yağ asitlerini bol miktarda içermeleri insan sağlığı için önemlerini açıkça göstermektedir. Bu nedenle sucul ortamlarda artan kirliliğin balıklarda ne gibi etkiler gösterdiğinin araştırılması hem balık biyolojisi hem de insan sağlığı açısından önemli bir konudur.

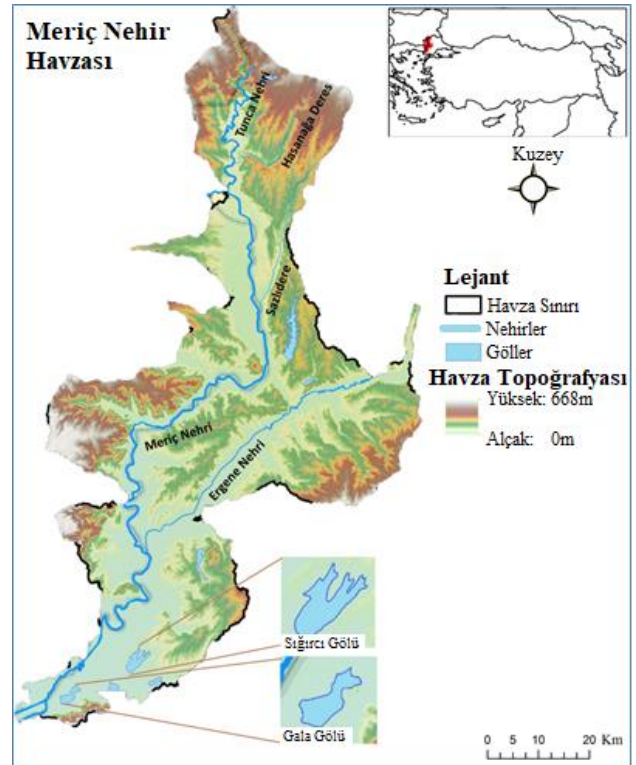
Ülkemize batıdan giren kuş yolu üzerindeki ilk sulak alan olan Meriç Delta'sı, kuş varlığı yönünden ülkemizin ve dünyanın sayılı zenginlikleri arasında yer almaktadır ve uluslararası kriterlere göre A sınıfı sulak alan kapsamındadır (Yarar ve Magnin 1997). Ülkemizin biyoçeşitlilik açısından sayılı tatlısu ekosistemlerinden olan Gala Sığircı Gölleri, Meriç Delta'sında yer almaktadır ve özellikle havzada yürütülen yoğun tarımsal ve endüstriyel faaliyetlerden önemli şekilde etkilendikleri bilinmektedir (Anonim 2005; Elipek vd. 2010; Güher vd. 2011; Tokatlı vd. 2014). Gala Gölünde yapılan çalışmalarda göl sularının özellikle kadmiyum ve kurşun açısından III. ve IV. sınıf su karakterine sahip olduğu kaydedilmiştir (Yılmaz 2004). Gala Gölü ve gölü besleyen su kaynaklarında su ve sediment numunelerinin çoğunda kadmiyum, kurşun, mangan, kobalt ve bakır konsantrasyonlarının sınır değerlerin üzerinde olduğu bildirilmiştir (Dökmeci 2005). Bunun yanında yapılan çalışmalar Gala Gölünde kirlilik etkisinin Tarımsal ve Endüstriyel kaynaklı olduğunu ortaya koymuştur (Tokatlı vd. 2014; Tokatlı 2017). Sığircı Gölündeki kirlilik düzeyleri üzerindeki tek çalışma göldeki bazı balıkların dokularında ağır metal miktarlarının belirlendiği bir çalışmadır. Bu çalışmada balıkların solungaç dokularında Cr: 12,4-31,6 ppb, Ni: 22,06-76,7 ppb, As: 10,1-15,2 ppb ve Pb: 49,8-65,3 ppb olarak belirlenmiş ve sınır değerlerde olduğu, bölgenin düzenli olarak izlenmesinin gerekli olduğu önerilmiştir (Tokatlı 2018).

Delta balıkları, sadece sistemin en önemli biyotik öğelerinden olmakla kalmayıp, bölge halkının diyetlerinde önemli bir yere sahiptir ve halk sağlığı açısından büyük önem arz etmektedir. Çalışmamızda, farklı habitat özelliklerine sahip, toplam 6 tür balığın, kas, solungaç ve karaciğer dokularında, kirliliğe bağlı DNA hasarı belirlenmiş, ayrıca antioksidan, ısı şok proteinleri ve DNA tamir genlerine ait gen ekspresyonları ile bölgede mevcut kirliliğin genotoksik etkileri araştırılmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışma Alanı ve Örneklerin Toplanması

Özellikle çeltik tarımı için kullanılan sulama ve kurutma kanalı vasıtasıyla Meriç Nehri ile direkt ve Ergene Nehri ile dolaylı olarak bağlantısı bulunan Meriç Delta'sı önemli derecede kirliliğe maruz kalmaktadır. Meriç Delta'sının en önemli lentik suları olan ve organik ve inorganik kirlilik yükü günden güne artan Gala ve Sığircı Gölleri ötrofik karakter sergilemeye başlamıştır. Özellikle bölgede kullanılan kimyasal gübre ve pestisitler ve bunların içerdiği ağır metaller, önemli kirlilik baskılarına maruziyetleri bilinen bu göller üzerinde ağır tahribatlara neden olmaktadır. Bu durum hem ekosistem, hem balık hem de insan sağlığını ciddi şekilde tehdit etmektedir (Elipek vd. 2010; Güher vd. 2011; Tokatlı vd. 2016; Tokatlı ve Başatlı 2016; Tokatlı 2017, 2018).



Şekil 1. Meriç Delta'sı.

Figure 1. Meriç Delta.

Trakya Bölgesi'nin en önemli sucul sistemi olan Meriç Delta'sında yer alan, uluslararası öneme sahip Gala Gölü ve önemli balıkçılık faaliyetlerinin yürütüldüğü Sığircı Gölü'nün en önemli biyotik öğelerinden olan balıkların kas, solungaç ve karaciğer dokularındaki kirliliğe bağlı genotoksik etkileri tespit etmek amacıyla, 2016 yılının yaz mevsiminde yapılan arazi çalışmalarında, balıkçıların serpmeye ağ kullanarak yakaladıkları balıklardan satın alınarak gerekli balık örnekleri temin edilmiştir. Çalışma alanı haritası Şekil 1'de verilmiştir. Analizlerde kullanılan tüm balıkların

Türkçe ve Latince isimleri ile birlikte ağırlık, standart boy, çatal boy ve total boy gibi metrik verileri ve cinsiyetleri kaydedilmiştir. Gala Gölü ve Sığircı Gölü'nden temin edilen balık türleri ve balıklara ait metrik karakterler Tablo 1'de verilmiştir.

Bölgede yaşayan ve özellikle insani tüketim amacı ile kullanılan tüm balık türlerinden temin

edilmeye özen gösterilmiş. Balık örnekleri naylon poşetler içerisinde ve buz kalıpları arasında muhafaza edilerek laboratuvara getirilmiştir. Gala Gölü ve Sığircı Gölü'nden temin edilen balıkların kas, solungaç ve karaciğer dokuları disekte edilmiş ve genetik çalışmalar yapılncaya kadar -80°C derin dondurucuda saklanmıştır.

Tablo 1. Meriç Deltası göllerinden yakalanan balıkların bazı metrik karakterleri.

Table 1. Some metric characters of fish caught from lakes in Meriç Delta.

Mevki	No	Tür İsmi		Cinsiyet	Ağırlık (gr)	Boy (mm)		
		Latince	Türkçe			Standart	Çatal	Total
Gala Gölü	1			Dişi	560	257	280	300
	2	<i>Carassius gibelio</i>	Gümüşi	Dişi	545	233	260	275
	3	(Bloch, 1782)	havuz balığı	Dişi	543	230	255	264
	4			Dişi	562	255	286	300
	5			Dişi	1250	320	350	394
	6	<i>Carassius carassius</i>	Havuz	Dişi	1100	315	338	380
	7	(Linnaeus, 1758)	balığı	Dişi	1130	305	333	387
	8			Dişi	1300	340	365	398
	9			Erkek	1050	295	325	370
Sığircı Gölü	10			Dişi	270	255	277	300
	11	<i>Scardinius</i>		Dişi	263	245	272	295
	12	<i>erythrophthalmus</i>	Kızıllkanat	Dişi	260	245	270	290
	13	(Linnaeus, 1758)		Dişi	257	222	245	265
	14			Dişi	258	240	260	285
	15	<i>Cyprinus carpio</i>	Pullu	Erkek	1080	313	340	364
	16	Linnaeus, 1758	sazan	Erkek	1150	375	300	324
	17	<i>Sander lucioperca</i>	Sudak	Dişi	430	333	362	375
	18	(Linnaeus, 1758)		Dişi	205	220	232	250
	19	<i>Perca fluviatilis</i>	Tatlısu	Erkek	185	200	218	225
	20	Linnaeus, 1758	levreği	Erkek	178	175	200	210

Gen Amplifikasyon ve Gen Ekspresyon Çalışmaları

DNA ve RNA izolasyonu

Balık dokularından DNA izolasyonu DNeasy® Tissue-Blood (Qiagen, USA) kit ile kit protokolü kullanılarak balık örnekleri için her lokalite 3 er tekerrür olmak üzere 0,5 gram balık örneği kullanılarak yapılmıştır. *Cyprinus carpio* türü için 3 tekerrür, iki balıktan alınan dokular paçal yapılarak elde edilmiş, tek örnek olan *Sander lucioperca*'da ise dokuların 3 farklı yerinden örnek alınmıştır.

Balık dokularından total RNA izolasyonu için, Total RNA PureLink® RNA Mini Kit (Life Sciences) kullanılmış ve RNA kit protokolüne göre izole edilmiştir. Dokulardan izole edilen RNA miktarları, Qubit® Fluorometer (Invitrogen) ile belirlenmiş ve High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) kullanılarak PCR şartları adım 1: 25 °C, 10 dk; adım 2: 37 °C, 120 dk; adım 3: 85 °C, 5 dk olacak şekilde programlanmış ve cDNA sentezi yapılmıştır. Elde

edilen cDNA'lar daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

Rasgele çoğaltılmış polimorfik farklılık; RAPD yöntemi

Total DNA PCR reaksiyonu öncesi nukleaz free su kullanılarak 25 ng/μl konsantrasyona ayarlanmıştır. Standart 50 μl PCR reaksiyonu 2 μl (50±10 ng) template DNA, 5μl 10× Taqbuffer + KCl (Fermentas, EP0071), 1,25 U TaqDNA polymerase (Fermentas, EP0401), 6 μl 2,5 mM MgCl₂, (Fermentas, R0971) 1 μl 10× dNTPs (Fermentas, R0181), 1μl her bir primer ve nuklease free su (R0581, Fermentas) ile yapılmıştır. Çalışmada 9-11 bazlık 20 farklı RAPD primeri kullanılmıştır. DNA amplifikasyonu PCR ile yapılmıştır (40 döngü 95°C denaturasyon (30 saniye), 37°C annealing (30 saniye), and 72°C elongasyon (90 saniye) ile başlangıç 94°C denaturasyon (3 dakika) ve son uzatma 72°C (30 dakika). DNA ile çoğaltılan örneklerden, 15 μl alınarak 3 μl loading dye (R0611, Fermentas) eklenmiş ve %2 agaroz jel+ethidium

bromit, 2× TAE (Tris 1,6 M, asetik asit 0,8 M, EDTA 40 mM) tampon içerisinde yürütülmüştür. Moleküler ağırlık standardı olarak 100 bp lik, Gene Ruler 100 bp plus DNA (Fermentas, SM0321) kullanılmıştır. Elde edilen bantlar UV transilluminatorde (ViberLourmat, Quantum ST4), izlenmiş ve BIO-PROFIL, BIO-1D++ programları kullanılarak analiz edilmiştir.

RT-PCR (RT-PCR)

Balıkların kas, karaciğer ve solungaç dokularında Süperoksit Dismutas (SOD), katalaz (CAT), Glutasyon sentaz (GS) antioksidan enzimlerinin, HSP60 ve HSP70 ısışok proteinlerinin sentezinden sorumlu gen ekspresyonları ve zincir hasar tamiri ve urasil yanlış eşlenik tamirinden sorumlu SMUG1 tam kantitatif qRT-PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Elde edilen toplam RNA'dan High Capacity RT Kit kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır. Elde edilen cDNA RT-PCR'da SYBR Green qPCR Mastermix protokolüne uygun olarak;

SOD; F (5'-GTTCGGTGACAACACCAATG-3') ve
R(5'-GGAGTCGGTGATGTTGACCT-3'),

CAT: F(5'-TACGAGCAGGCCAAGAAGTT-3') ve
R(5'-ACCTTGACGGGCAGTTCAC-3'),

GS: F (5'-TGGGACCAGCAAGTAAAACC-3') ve
R(5'-TCGCGAATG TAGAACTCGTG-3'),

HSP70 F (5' CGAGETCGACGCATTGTTTG 3')
R (5' GAGTGGATCCGCCGACGAGTA 3')

HSP60 F(5'GTCGCGCCCCGTTAGCAC 3')
R(5'CATCGCGTCCCACCTTCTTCAT 3')

SMUG1 F (5'CTCTGTGGCTGAGGGTTGAT-3')
R (5'TTGTAGATGATGCCACAGG-3')

primerleri kullanılarak çoğaltılmıştır. Eldeki Power syber green mix, cDNA ve primerler Step-one plus qRT-PCR'da PCR program: 1 döngü 2 dakika 50°C ve 10 dakika 95°C, bunu takiben, 40 döngü denaturasyon (95°C 15 saniye) ve annelling ve uzatma (60°C 'de 1 dakika) ile çoğaltılmıştır.

Tam kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) çalışmalarında gen ekspresyonun belirlenmesinde standart olarak kullanılacak genler, hücre kültürü koşullarında kültüre alınan C8 Astrosit hücrelerine H₂O₂ uygulaması yapılarak elde edilmiştir. Hidrojen peroksit uygulaması yapılan hücrelerden yukarıda anlatıldığı şekilde RNA izole edilmiş izole edilen RNA'lar agaroz jelde yürütülerek primer ve diğer kırılmış genetik materyalden ayrılması sağlanmıştır. Bu RNAlar Qiagen Gel Ekstraksiyon kit ile saflaştırılmış ve RNA miktarları Optizen Nanodrop Spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir. Balık dokularındaki gen ekspresyonları baz alınarak her bir

gen için başlangıç konsantrasyonu belirlenmiş ve bu konsantrasyondan başlanarak seri sulandırım ile 8 farklı konsantrasyon hazırlanmıştır. Hazırlanan kalibrasyon noktaları yukarıda belirtildiği şekilde balık dokuları ile aynı PCR koşullarında çoğaltılarak her bir gen için 8 noktalı kalibrasyon eğrisi hazırlanmış ve balık dokularından okunan örneklerdeki gen ekspresyon miktarları bu kalibrasyon eğrileri kullanılarak 1µg Total RNA içinde belirlenen gen için fg olarak belirlenmiştir (Park vd. 2003).

Bulgular ve Tartışma

Genotoksik Veriler

RAPD yöntemi toksik maddelerinin genotoksite çalışmalarında canlı organizmalarda yaygın olarak kullanılan bir tekniktir (Cenkci vd. 2010; Doğanlar 2012). RAPD bantlarındaki değişimlerin oligonükleotidlerin yeniden düzenlenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Toksikite çalışmalarında RAPD profilinde yeni bantların ortaya çıkması toksik madde tarafından DNA hasarının indüklenmesini ya da DNA tamir mekanizmalarının yeterli olmamasının bir sonucu olarak genetik stabilitenin bozulması olarak değerlendirilmektedir. (Conte vd. 1998; Atienzar vd. 1999; Liu vd. 2005). Bantların kaybolmasının ise özellikle yüksek ağırlıklı DNA ürünlerinin bozulmasının bir sonucu olduğu rapor edilmiştir (Liu vd. 2005).

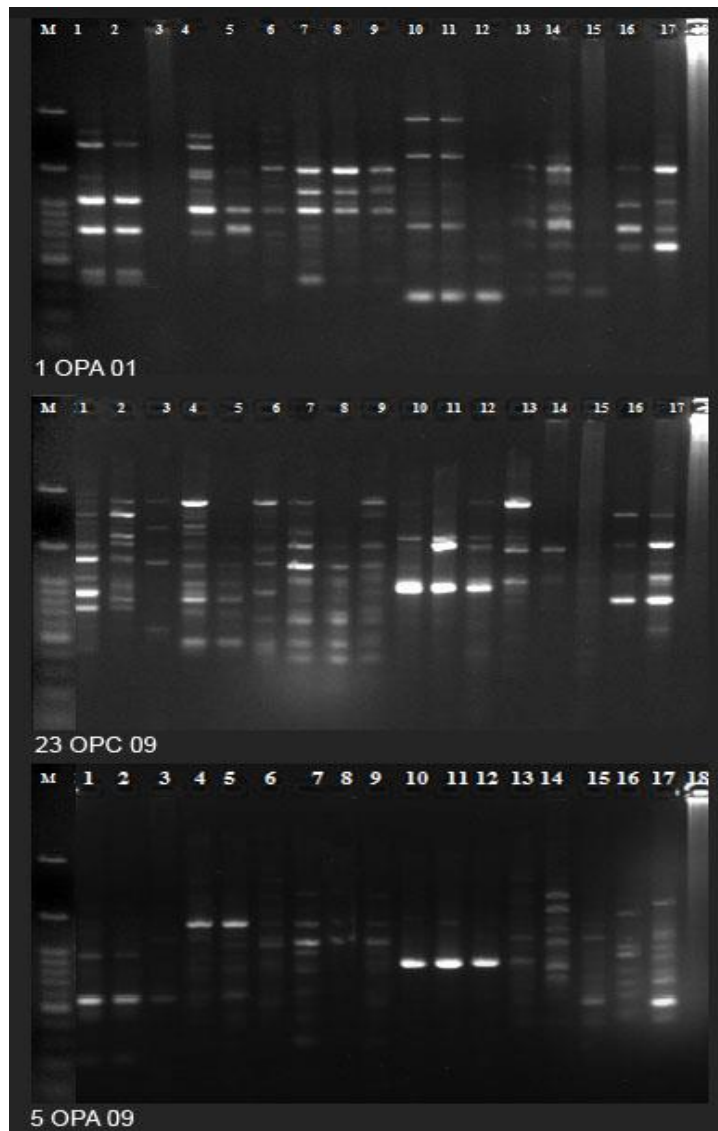
Toplamda 6 farklı türe ait balıkların kas, karaciğer ve solungaç dokularından elde edilen Total DNA örneklerinde, RAPD analizi yapılmıştır. Bu kapsamda total DNA polymorfiziminin saptanması amacıyla kullanılan 20 farklı RAPD primerinden ön denemeler sonucu seçilen 13 farklı oligonükleotid primerin; 1 adedi tüm örneklerde band vermemiş, 9 adedi yapılan tekrarlar da aynı sonucu vermemiş, 5 adedi tekrarlar da aynı sonucu vermiştir. Tekrarlar da aynı sonucu veren bu 5 adet primer dikkatle incelenerek, 3 adet informative ve stress spesifik primer sonucu RAPD analiz için tercih edilmiştir.

Yapılan RAPD analizinde üç farklı olügonükleotid primer uygulama grubunda, 100 (5OPA09) ile 2072 bp (1OPA01) arasında değişen uzunluklarda gen fragmentleri çoğaltılmıştır. RAPD profilinde ait bp değerleri Şekil 2'de verilmiştir. RAPD profilinde görülen bant yoğunluğundaki artış ve azalışlar özellikle sonulungaç dokularında örnekleme yapılan tüm balıklar ve örnekleme noktalarında gözlemlenmiştir. RAPD bant sayılarındaki değişim ve kirlilik konsantrasyonları arasında pozitif bir korelasyon olduğu gözlemlenmiştir. En yüksek bant değişimi genel olarak solungaç dokularında sonrasında kas dokularında belirlenmiş, bu değişim balık türlerine

ve toplandıkları bölgede kirlilik miktarları ile ilişkili olarak balık dokularında bant yoğunluklarının değişimi, normal bantların kaybolması ve yeni bantların oluşumu şeklinde kendini göstermiştir. Burada oluşan RAPD bant polimorfizminin oligonükleotitlerin priming bölgelerindeki değişim sebebi ile oluştuğu ve genomun yeniden düzenlenmesi sonucu oluştuğu düşünülmektedir. Yeni oluşan bantların toksik stresörler sonucu meydana gelen DNA hasarından kaynaklandığı rapor edilmiştir (Doğanlar vd. 2014; Güçlü vd. 2018). Bununla birlikte yeni bantlar genomik kalıp kararlılığının bozulması sonucu da oluşabilmektedir. Genetik kararlılık DNA hasar seviyesi ve DNA tamir

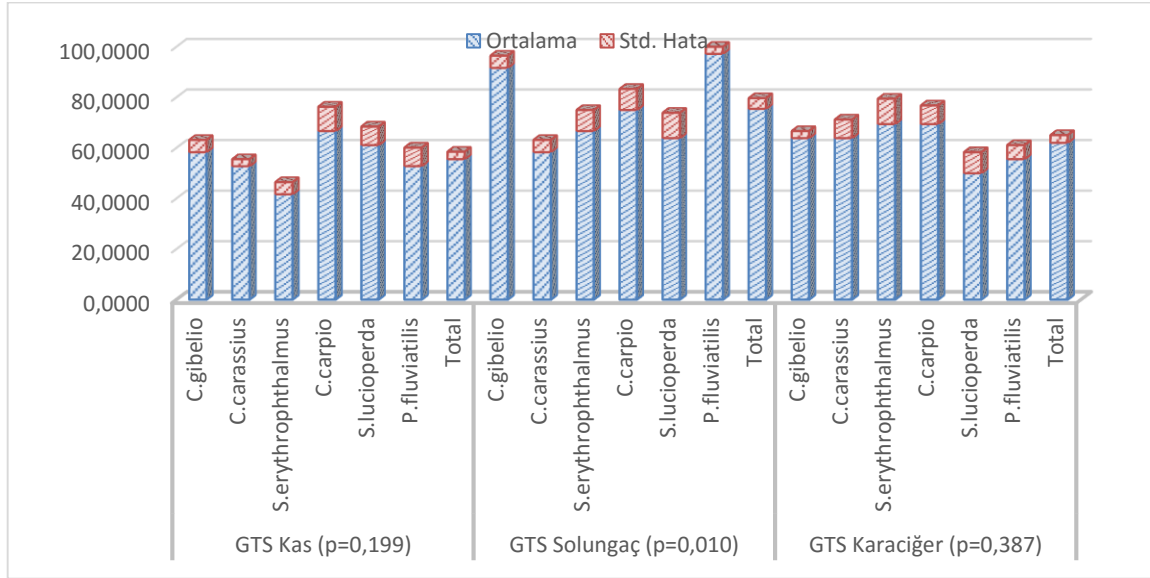
ve replikasyon mekanizmalarının etkinliği ile ilişkilidir (Atienzar vd. 1999). Liu vd. (2005) PCR ürünlerinin kaybolmasının yüksek moleküler ağırlıktaki bantların etkilenmesinden kaynaklandığını rapor etmişlerdir. Çalışmamızda elde edilen bulgular yukarıdaki sonuçları destekler niteliktedir.

Yapılan RAPD analizinde genomik kalıp kararlılığının tüm balıklarda önemli ölçüde değiştiği belirlenmiştir. Oluşan bant polimorfizmi kullanılan markardaki bp bantlarına göre skorlanmış ve kontrol % 100 olarak kabul edilerek %GTS analizi yapılmış sonuçlar Şekil 3'te verilmiştir.



Şekil 2. *C. gibelio* 1)Kas, 2)Karaciğer, 3)Solungaç; *C. carassius* 4)Kas, 5)Karaciğer, 6)Solungaç; *S. erythrophthalmus* 7)Kas, 8)Karaciğer, 9)Solungaç; *C. carpio* 10)Kas, 11)Karaciğer, 12)Solungaç; *S. lucioperca* 13)Kas, 14)Karaciğer, 15)Solungaç; *P. fluviatilis* 16)Kas, 17)Karaciğer, 18)Solungaç dokularında RAPD analiz bant polimorfizmi. Primerler: 1 OPA 01, 23 OPC 09, 5 OPA 09. Marker (M) Geneaid 100 bp DNA ladder 100–3,000 bp.

Figure 2. *C. gibelio* 1)Muscle, 2)Liver, 3)Gill; *C. carassius* 4)Muscle, 5)Liver, 6)Gill; *S. erythrophthalmus* 7)Muscle, 8)Liver, 9)Gill; *C. carpio* 10)Muscle, 11)Liver, 12)Gill; *S. lucioperca* 13)Muscle, 14)Liver, 15)Gill; *P. fluviatilis* 16)Muscle 17)Liver, 18)RAPD analysis band polymorphism in gill tissues. Primers: 1 OPA 01, 23 OPC 09, 5 OPA 09. Marker (M) Geneaid 100 bp DNA ladder 100–3,000 bp.



Şekil 3. Farklı örnekleme noktalarından toplanılan *C.gibelio*, *C.carassius*, *S. erythrophthalmus*, *C.carpio*, *S.lucioperca*, *P. fluviatilis* türlerinde kas, solungaç ve karaciğer dokularında belirlenen Genetik kalıp kararlılığı (% GTS).

Figure 3. Genetic mold stability (% GTS) determined in muscle, gill and liver tissues in *C.gibelio*, *C.carassius*, *S. erythrophthalmus*, *C.carpio*, *S.lucioperca*, *P. fluviatilis* species collected from different sampling points.

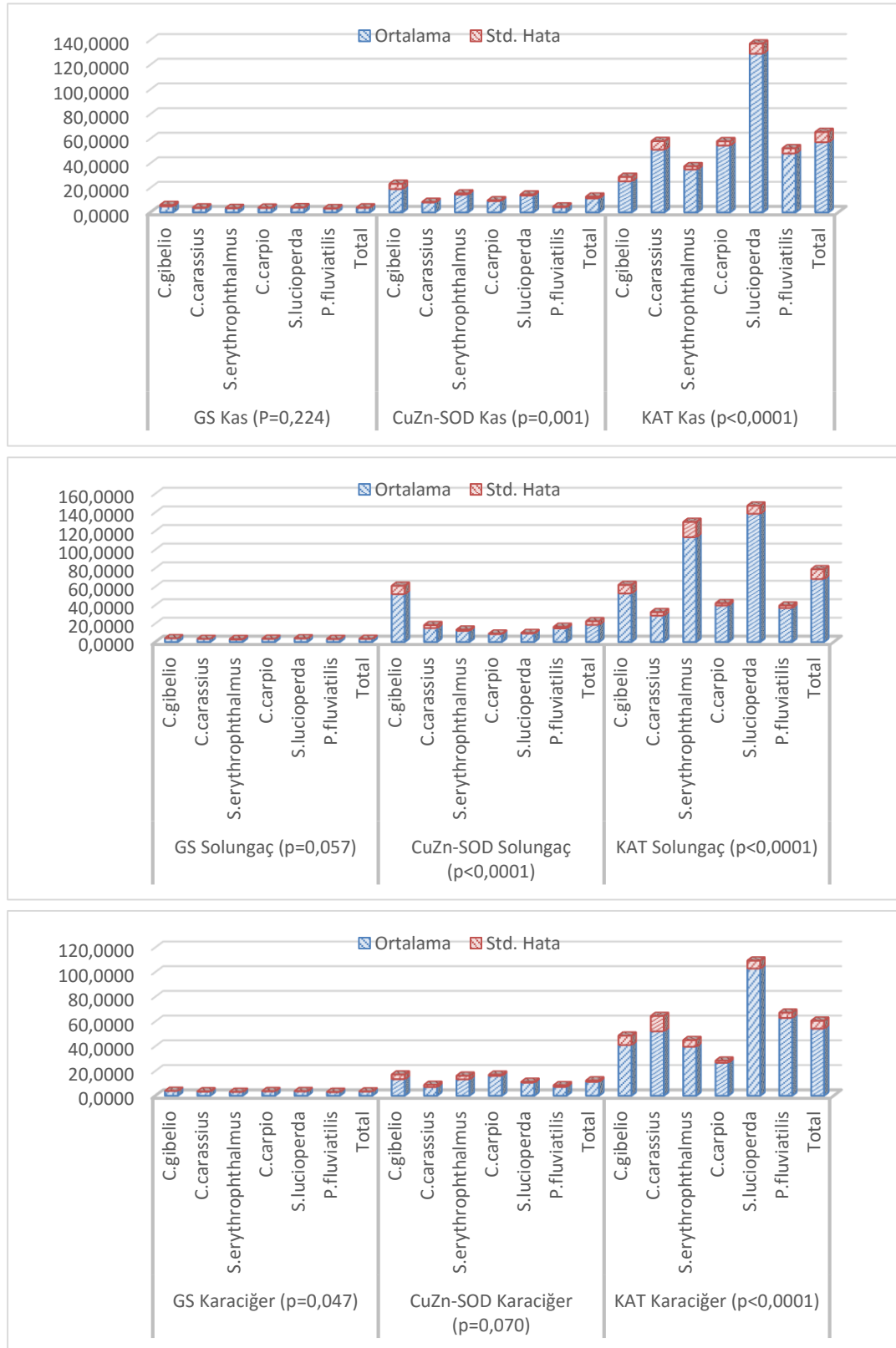
RAPD band polimorfizm değerleri kullanılarak yapılan hesaplamada en düşük genomik kalıp kararlılığının daha çok *C. carassius*, *S. erythrophthalmus* türlerinin kas dokularında olduğu görülmüş, bu türlerde kas dokuları için % GTS sırasıyla $52,7 \pm 4,8$, $41,6 \pm 8,3$ olarak saptanmıştır. Karaciğer dokularında en düşük genomik kalıp kararlılığı değişimi *S.lucioperca*, *P.fluviatilis*'de $50,0 \pm 8,2$ ve $55,5 \pm 5,6$ olarak belirlenirken, solungaç dokularında genomik kalıp kararlılığı en yüksek tür *C. gibelio* ve *P. fluviatilis* olmuş, en zayıf tür ise *C. carassius* ve *S. lucioperca* olarak belirlenmiştir (Şekil 3). Yapılan istatistik analizde kas ve karaciğer dokularında % GTS değerleri arasında fark oluşmazken, solungaç dokularında türler arasında belirlenen fark istatistik olarak anlamlı bulunmuştur ($P=0,010$) (Şekil 3).

Gen Ekspresyon Analizleri

Canlı hücreler normal yaşam koşullarında herhangi bir stres faktörüne maruz kaldıklarında metabolizmanın verdiği ilk cevap reaktif oksijen türlerinin oluşumudur. Reaktif oksijen türleri dış orbitalde çift oluşturmamış elektroları bulunan enerjisi yüksek oksijenli bileşiklerdir. Bu oksijen türleri hücrede ilk etapta membran hasarı oluşturmakta, protein ve lipid dengesini bozarak enzim ve hormon mekanizmasını etkilemekte ayrıca, DNA nükleotid ve koenzimler gibi birçok biyolojik

materyale zarar vermektedir. Bu zarar sonucu, sinirsel iletim zarar görmekte, nörotoksik etki oluşmakta, çeşitli kalp-damar hastalıkları, bağışıklık sistemi bozuklukları ve çeşitli kanser türlerinin oluşumu görülmektedir (Economos vd. 1982; Massie 1988; Ruddle vd. 1988; Bourg 2001). Vücut bu hasarı engellemek için çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmiştir. Antioksidan enzimler olarak adlandırılan bir grup enzim ROS'lar için birincil savunma mekanizmalarını içerirler. Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutasyon ve Glutasyon Peroksidaz (GSHPx) en bilinen enzimatiok antioksidanlardır. Birincil savunma mekanizması içerisinde SOD, süperoksit anyonunun ($\bullet O_2^-$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene dönüşümünü katalize ederek bu radikallerin etkisini azaltmakta, CAT ise, SOD enzimi faaliyeti sonucunda meydana gelen toksik H_2O_2 'nin su ve oksijene dönüşümünü katalizlemektedir (Duthie vd. 1989; Bourg 2001).

Bu bilgiler ışığında çalışmamız kapsamında *C. gibelio*, *C. carassius*, *S. erythrophthalmus*, *C. carpio*, *S. lucioperca*, *P. fluviatilis* türlerinde kas, karaciğer ve solungaç dokularında çevresel kirlenmelerin ROS üretimi ve antioksidan gen ekspresyon seviyelerine etkileri SOD, CAT ve GS gen ekspresyonları ile araştırılmıştır. Antioksidan enzim gen ekspresyonları Şekil 4'te verilmiştir.



Şekil 4. Farklı örnekleme noktalarından toplanılan *C. gibelio*, *C. carassius*, *S. erythrophthalmus*, *C. carpio*, *S. lucioperca*, *P. fluviatilis* türlerinde kas, solungaç ve karaciğer dokularında GS, SOD ve CAT gen ekspresyonları (fg/μg Total RNA). Veriler ortalama ± SH, n=3. Farklı harfle gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır, tek yönlü ANOVA, Duncan testi, $P \leq 0,05$.

Figure 4. GS, SOD and CAT gene expressions (fg / μg Total RNA) in muscle, gill and liver tissues in *C. gibelio*, *C. carassius*, *S. erythrophthalmus*, *C. carpio*, *S. lucioperca*, *P. fluviatilis* species collected from different sampling points.). Data are mean ± SH, n = 3. The averages shown in different letters are statistically different, one-way ANOVA, Duncan test, $P \leq 0.05$.

Yapılan çalışmada, çalışılan tüm balık türlerinde glutatyon sentaz (GS) gen ekspresyonu, karaciğer ve solungaç dokularından daha düşük olarak belirlenmiştir. Balıklar arasında karaciğer dokularında belirlenen GS gen ekspresyonu istatistik bir fark oluşturmuş, diğer dokularda bu fark istatistik olarak anlamlı seviyede olmamıştır (Şekil 4).

Hücrelerde ağır metal kaynaklı ROS oluşumuna ilk cevap olarak oluşan Süperoksit Dismütaz (SOD) ve Katalaz (CAT) gen ekspresyonları incelendiğinde en yüksek SOD ekspresyonunun *C. gibelio* türünde kas, karaciğer ve solungaç dokularında sırasıyla $19,01 \pm 4,18$, $13,36 \pm 13,74$ ve $51,80 \pm 9,09$ fg/ μ g total RNA olarak belirlendiği, bunu kas ve karaciğer dokularında *S. erythrophthalmus* türüne ait dokularda belirlenen gen ekspresyonunun takip ettiği belirlenmiştir. Tüm balıklar içinde en yüksek CAT ekspresyonu solungaç dokularında *S. erythrophthalmus* ve *S. lucioperca* türlerinde sırasıyla $113,36 \pm 16,34$, $138,41 \pm 8,74$ fg/ μ g total RNA pg/ml olarak belirlenirken kas dokularında *S. lucioperca* türünde $128,92 \pm 8,14$, karaciğer dokusunda ise yine aynı türde $102,84 \pm 6,49$ fg/ μ g total RNA olarak saptanmıştır. Balık dokularında çevresel kirliliğe en net ekspresyon yanıtının CAT enziminin sorumlu mRNA ekspresyonunda olduğu belirlenmiştir.

Farklı stres koşullarında insan, bitki ve böceklerde bu enzimlerdeki değişimler ve bu enzimlerden sorumlu gen ekspresyonları (Stavaley vd. 1990; Reveillaud vd. 1991; Sun ve Tower 1999; Posgai vd. 2011) daha önceki çalışmalar ile belirlenmiştir. Proje kapsamında antioksidan gen ekspresyonları genel olarak değerlendirildiğinde non enzimatik glutatyon mekanizmasının daha çok karaciğer ve solungaç dokularında etkin olduğu gözlemlenmiş, bu sebeple balık dokularında mevcut ağır metal birikimlerinin bu dokularda lipid peroksidasyonuna neden olduğu düşünülmüştür. Bununla birlikte aynı bölgelerden alınan balık dokularında SOD ve CAT gen ekspresyonlarının farklı düzeylerde olduğu görülmüş, özellikle non enzimatik antioksidan olan GS gen düzeyinin balık türleri arasında önemli bir değişim göstermediği görülmüştür. SOD ve CAT gen ekspresyonu ise türler arasında istatistik olarak önemli seviyede değiştiği özellikle CAT geninde *S. erythrophthalmus* ve *S. lucioperca* türlerinde overekspresyona sebep olduğu belirlenmiştir. Bu durumun özellikle balık türlerinde biriken ağır metal, pestisit ve diğer toksik bileşiklerin oluşturduğu yüksek hidrojen peroksit reaktif türü ve peroksidasyon kaynaklı olduğu düşünülmüştür.

Çalışmamız kapsamında antioksidan sisteme ek olarak protein katlanmasında ve DNA hasarı sebebiyle oluşan protein hasarlarının tamirinde önemli rol

oynayan stres spesifik ısışok ailesi protein grubundan HSP70 ve HSP60 genleri ve hem tek hemde çift zincir kırıklarının tamirinde görevli SMUG1 gen ekspresyonu çalışılmıştır (Şekil 5).

Yapılan çalışmada hücrelerde oluşan bir gen hasarı sonucu ortaya çıkabilecek proteinlerin yanlış katlanmasını düzelter, düzeltilmeyen proteinlerin degrades edilmesinde görev alan mitokondrial ısı şok proteini HSP60 ve stres spesifik hücrel ısışok proteini HSP70 ekspresyon seviyeleri incelendiğinde *C. carpio*, *S. lucioperca*, *P. fluviatilis* kas ve karaciğer dokularında HSP ailesi genlerin seviyelerinin diğer türlere kıyasla nispeten daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Ancak kas dokusunda *C. gibelio* türünde mitokondrial HSP60'ın yüksek olduğu belirlenmiştir. Ancak yapılan istatistik analizde aralarında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Isı şok genleri genel olarak stres genleri olarak bilinirler ve strese ilk tepki veren genlerdir. HSP70, HSP26 ve HSP83 kaperonin fonksiyonundan yani sitoplazmik proteinin doğrulanmasından sorumludur, HSP60 ise şaperon fonksiyonuna yani mitokondrial proteinlerin ve pro apoptotik moleküllerden sorumludur (Macario ve Macario 2005; Chang vd. 2007; Tang vd. 2007; Singh vd. 2010). Özellikle HSP70 kimyasal bileşiklerin hücre toksitesinde, anormal değişim gösteren hücrel proteinlerin düzenlenmesinde, erken dönem tepki veren bir sinyal gen olarak bilinmektedir (Kohler vd. 2005; Haap vd. 2008; Doğanlar vd. 2018). Ayrıca, *D. melanogaster*'de uçucu organik bileşik uygulamasında, artan reaktif oksijen türlerinin düzenlenmesinde rol aldıkları belirtilmiştir (Singh vd. 2010; Doğanlar ve Doğanlar 2015). Çalışmamızda bu genlerde önemli bir fark olmamasının sebebini balıkların uzun süre yaşadıkları metal yüksek ortamlara adaptasyonu olduğu düşünülmektedir.

Yapılan çalışmada özellikle çift zincir ve tek zincir DNA tamir mekanizmalarından sorumlu, bunun yanında spesifik olarak urasil yanlış eşlenik tamirinde görev alan SMUG1 geninin özellikle kas dokusunda *C. gibelio*, *C. carassius*, *S. erythrophthalmus* türlerinde yüksek olduğu belirlenmiştir.

Yapılan çalışmada özellikle karaciğer dokusunda *S. lucioperca* türünde, solungaç dokusunda ise *S. lucioperca*, *P. fluviatilis* türlerinde SMUG1 geninin overekspresye olduğu belirlenmiştir. Özellikle *S. lucioperca*, türünde görülen çok yüksek ekspresyonun, RAPD analizinde ve ayrıca %GTS analizinde görülen genetik kalıp kararlılığındaki bozulma ve buna bağlı olarak genetik hasarın tamiri ile ilgili olduğu düşünülmektedir.



Şekil 5. Farklı örnekleme noktalarından toplanılan *C. gibelio*, *C. carassius*, *S. erythroptalmus*, *C. carpio*, *S. lucioperca*, *P. fluviatilis* türlerinde kas, karaciğer ve solungaç dokularında HSP60, HSP70 ve SMUG1 gen ekspresyonları (fg/μg Total RNA). Veriler ortalama ± SH, n=3. Farklı harfle gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır, tek yönlü ANOVA, Duncan testi, $P \leq 0.05$.

Figure 5. HSP60, HSP70, and SMUG1 gene expressions (fg / μg Total RNA in muscle, liver and gill tissues in *C. gibelio*, *C. carassius*, *S. erythroptalmus*, *C. carpio*, *S. lucioperca*, *P. fluviatilis* species collected from different sampling points. Data are mean ± SH, n = 3. The averages shown in different letters are statistically different, one-way ANOVA, Duncan test, $P \leq 0.05$.

Bölgede yapılan çalışmalar gerek örneklem yapılan göllerin gerekse bu bölgeyi besleyen su kaynaklarının kirlendiğini göstermektedir. Meriç Nehrinin, Ege Denizine döküldüğü bölgede çinko, bakır ve cıva seviyelerinin yüksek olduğu belirlenmiş (Ergin ve Yemenicioğlu 1997) ve yine Meriç Nehrinin döküldüğü bölgede kurşun konsantrasyonları oldukça yüksek olduğu ortaya konulmuştur (Batki vd. 1999). Benzer çalışmalar Meriç Deltasında yürütülmüş ve deltada su, sediment ve bazı balıklarda organoklorlu pestisit kalıntılarının risk oluşturacak seviyede olduğu belirlenmiştir (Erkmen ve Kolankaya 2006; Ayas 2007). Benzer sonuçlar Gala Gölü ve Sığırcı Gölünden elde edilen balıkların dokularında da elde edilmiş ve balıklarda önemli düzeyde bir toksik metal birikiminin olduğu görülmüştür (Tokatlı 2018).

Sonuç olarak Meriç Deltasında iki farklı gölden alınan balık örneklerinde, bu göllerde mevcut çevresel kirliliğin, özellikle aynı balık türünde tümüyle aynı DNA'ya sahip kas, karaciğer ve solungaç dokularında görülen genomik kalıp kararlılığındaki değişimler göz önüne alındığında genotoksik bir etki oluşturduğu düşünülmektedir. Bu savımızı özellikle DNA tamir geni, bunun yanında çevresel abiyotik stres etmenlerine güçlü bir savunma cevabı oluşturan antioksidan savunma sinyali genleri SOD ve CAT ekspresyonlarındaki önemli düzeydeki artışların desteklediği düşünülmektedir. Şu an için bölgedeki her iki gölde balıklar için en azından moleküler seviyede tehdit oluşturabilecek bir kirliliğin olduğu, bu sebeple yoğun tarımsal faaliyetlerin yapıldığı bu göllerin insan ve çevre sağlığı açısından düzenli olarak takip edilmesi gerektiği önerilmektedir.

Teşekkür

Bu araştırma, Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (TÜBAP 2016/86) tarafından finansal olarak desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Anonim 2005. Edirne İl Çevre Durum Raporu. Edirne Valiliği İl Çevre Ve Orman Müdürlüğü.
- Atienzar FA, Conradi M, Evenden AJ, Jha AN, Depledge MH. 1999. 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. Society Environmental Toxicology and Chemistry. 18(10):2275–2282.
doi: 10.1002/etc.5620181023
- Ayas Z. 2007. Review on DDT and its residues in Turkey's wetlands. J Environ Biol. 28(4):707-715.
- Batki H, Kucuksezgin F, Uslu O. 1999. Trace metal distribution in different chemical fractions of marine sediments along the eastern Aegean shelf. Toxicol Environ Chem. 70(1-2):243-258.

- doi: 10.1080/02772249909358752
- Bourg EL. 2001. Oxidative stress, aging and longevity in *Drosophila melanogaster*. FEBS Letters 498(2-3):183-186.
doi: 10.1016/S0014-5793(01)02457-7
- Cenkci S, Yildiz M, Cigerci IH, Bozdog A, Terzi ESA. 2010. Evaluation of 2,4-D and Dicamba genotoxicity in bean seedlings using comet and RAPD assays. Ecotox Environ Safe. 73(7):1558-1564.
doi: 10.1016/j.ecoenv.2010.07.033
- Chang HC, Tang YC, Hayer-Hartl M, Hartl UC. 2007. SnapShot: molecular chaperones, Part I. Cell 128(1):212.e1-212.e2.
doi: 10.1016/j.cell.2007.01.001
- Conte C, Mutti I, Puglisi P, Ferrarini A, Regina G, Maestri E. 1998. DNA fingerprinting analysis by a PCR based method for monitoring the genotoxic effects of heavy metals pollution. Chemosphere. 37(14-15):2739-2749.
doi: 10.1016/S0045-6535(98)00317-8
- Doğanlar ZB. 2012. Physiological and genetic responses to pesticide mixture treatment of *Veronica beccabunga*. Water Air Soil Poll. 223(9):6201-6212.
doi: 10.1007/s11270-012-1350-y
- Doğanlar ZB, Doğanlar O, Tabakçioğlu K. 2014. Genotoxic effects of heavy metal mixture in *Drosophila melanogaster*: expressions of heat shock proteins, RAPD profiles and mitochondrial DNA sequence. Water Air Soil Poll. 225:2104.
doi: 10.1007/s11270-014-2104-9
- Doğanlar O, Doğanlar ZB. 2015. Effects of a mixture of volatile organic compounds on total DNA and gene expression of heat shock proteins in *Drosophila melanogaster*. Arch Environ Con Tox. 68(2):395-404.
doi: 10.1007/s00244-014-0089-4
- Doğanlar ZB, Doğanlar O, Tozkir H, Gökalep FD, Doğan A, Yamaç F. Aktaş ÜE. 2018. Nonoccupational exposure of agricultural area residents to Pesticides: Pesticide accumulation and evaluation of genotoxicity. Arch Environ Con Tox. 75(4):530-544.
doi: 10.1007/s00244-018-0545-7
- Dökmeçi AH. 2005. Gala Gölü ve gölü besleyen su kaynaklarında ağır metal kirliliğinin araştırılması. [Yüksek lisans tezi]. Trakya Üniversitesi. 112 s.
- Duthie GG, Wahle KWJ, James WPT. 1989. Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease. Nutr Res Rev. 2(1):51-62.
doi: 10.1079/NRR19890007
- Economos AC, Ballard RC, Miquel J, Binnard R, Philpott DE. 1982. Accelerated aging of fasted *Drosophila*. Preservation of physiological function and cellular fine structure by thiazolidine carboxylic acid (TCA). Exp Gerontol. 17(2):105-114.
doi: 10.1016/0531-5565(82)90043-2
- Elipek BÇ, Arslan N, Kirgiz T, Öterler B, Güher H, Özkan N. 2010. Analysis of Benthic Macroinvertebrates in Relation to Environmental Variables of Lake Gala, a National Park of Turkey. Turk J Fish Aquat Sc. 10:235-243.
doi: 10.4194/trjfas.2010.0212
- Ergin M, Yemenicioğlu S. 1997. Geologic assessment of environmental impact in bottom sediments of the

- eastern Aegean sea. *Int J Environ Stud.* 51(4):323-334.
doi: [10.1080/00207239708711090](https://doi.org/10.1080/00207239708711090)
- Erkmen B, Kolankaya D. 2006. Determination of organochlorine pesticide residues in water, sediment, and fish samples from the Meriç Delta, Turkey. *Int J Environ An Ch.* 86(1-2):161-169.
doi: [10.1080/03067310500247926](https://doi.org/10.1080/03067310500247926)
- Güçlü H, Doganlar ZB, Gürlü VP, Özal A, Dogan A, Turhan MA, Doganlar O. 2018. Effects of cisplatin-5-fluorouracil combination therapy on oxidative stress, DNA damage, mitochondrial apoptosis, and death receptor signalling in retinal pigment epithelium cells. *Cutan Ocul Toxicol.* 37(3):291-304.
doi: [10.1080/15569527.2018.1456548](https://doi.org/10.1080/15569527.2018.1456548)
- Güher H, Erdoğan S, Kırgız T, Elipek BÇ. 2011. The Dynamics of Zooplankton in National Park of Lake Gala (Edirne-Turkey). *Acta Zool Bulgar.* 63(2):157-168.
- Haap T, Triebkorn R, Kohler HR. 2008. Acute effects of diclofenac and DMSO to *Daphnia magna*: immobilization and Hsp70 induction. *Chemosphere.* 73(3):353-359.
doi: [10.1016/j.chemosphere.2008.05.062](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.05.062)
- Kohler HR, Alberti G, Seniezak A. 2005. Lead induced hsp70 and hsp60 pattern transformation and leg malformation during postembryonic development in orbadit mite *Archegozetes longisetosus* Aoki. *Comp Biochem Phys C.* 141(4):398-405.
doi: [10.1016/j.cbpc.2005.09.003](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.09.003)
- Liu W, Li PJ, Qi XM, Zhou QX, Zheng L, Sun TH, Yang YS. 2005. DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis. *Chemosphere.* 61(2):158-167.
doi: [10.1016/j.chemosphere.2005.02.078](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.02.078)
- Macario AJL, Macario CE. 2005. Sick chaperones, cellular stress, and disease. *New Engl J Med.* 353:1489-1501.
doi: [10.1056/NEJMra050111](https://doi.org/10.1056/NEJMra050111)
- Massie HR. 1988. Chemicals. In: Lints FA, Soliman MH, editors. *Drosophila as a Model Organism for Ageing Studies.* Glasgow: Blackie. p. 59-70.
- Park WJ, Kriebelbaumer V, Müller A, Piotrowski M, Meeley RB, Gierl A, Glawischnig E. 2003. The nitrilase ZmNIT2 converts indole-3-acetonitrile to indole-3-acetic acid. *Plant Physiol.* 133(2):794-802.
doi: [10.1104/pp.103.026609](https://doi.org/10.1104/pp.103.026609)
- Posgai R, Caitlin B, McCulloch C, Murphy KR, Hussain SM, Rowe JJ, Nielsen MG. 2011. Differential toxicity of silver and titanium dioxide nanoparticles on *Drosophila melanogaster* development, reproductive effort, and viability: Size, coatings and antioxidants matter. *Chemosphere.* 85(1):34-42.
doi: [10.1016/j.chemosphere.2011.06.040](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.06.040)
- Reveillaud I, Niedzwiecki A, Bensch KG, Fleming JE. 1991. Expression of bovine superoxide dismutase in *Drosophila melanogaster* augments resistance to oxidative stress. *Mol Cell Biol.* 11(2):632-640.
doi: [10.1128/MCB.11.2.632](https://doi.org/10.1128/MCB.11.2.632)
- Ruddle DL, Yengoyan LS, Miquel J, Marcuson R, Fleing JE. 1988. Propyl gallate delays senescence in *Drosophila melanogaster*. *Age;* 11(2):54-58.
doi: [10.1007/BF02431773](https://doi.org/10.1007/BF02431773)
- Singh MP, Ravi R, Mishraa M, Shrivastavac M, Saxenaa DK. 2010. Kar Chowdhuri D. Effects of co-exposure of benzene, toluene and xylene to *Drosophila melanogaster*: Alteration in hsp70, hsp60, hsp83, hsp26, ROS generation and oxidative stress markers. *Chemosphere.* 79(5):577-587.
doi: [10.1016/j.chemosphere.2010.01.054](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.01.054)
- Staveley BE, Phillips JP, Hilliker AJ. 1990. Phenotypic consequences of copper-zinc superoxide dismutase overexpression in *Drosophila melanogaster*. *Genome.* 33(6):867-872.
doi: [10.1139/g90-130](https://doi.org/10.1139/g90-130)
- Sun J, Tower J. 1999. Flp recombinase-mediated induction of Cu/Zn-superoxide dismutase transgene expression can extend the life span of adult *Drosophila melanogaster* flies. *Mol Cell Biol.* 19(1):216-228.
doi: [10.1128/MCB.19.1.216](https://doi.org/10.1128/MCB.19.1.216)
- Tang YC, Chang HC, Hayer-Hartl M, Hartl FU. 2007. SnapShot: molecular chaperones, part II. *Cell.* 128(2):412.
doi: [10.1016/j.cell.2007.01.013](https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.013)
- Tokatlı C. 2017. Bioecological and statistical risk assessment of toxic metals in sediments of a worldwide important wetland: Gala Lake National Park (Turkey). *Arch Environ Prot.* 43(1): 34-47.
doi: [10.1515/aep-2017-0007](https://doi.org/10.1515/aep-2017-0007)
- Tokatlı C. 2018. Essential and toxic element bioaccumulations in fishes of Gala and Siğirci Lakes (Meriç River Delta, Turkey). *Acta Alimentaria.* 47(4):470-478.
doi: [10.1556/066.2018.47.4.10](https://doi.org/10.1556/066.2018.47.4.10)
- Tokatlı C, Başatlı Y. 2016. Trace and Toxic Element Levels in River Sediments. *Pol J Environ Stud.* 25(4):1715-1720.
doi: [10.15244/pjoes/62678](https://doi.org/10.15244/pjoes/62678)
- Tokatlı C, Köse E, Uğurluoğlu A, Çiçek A, Emiroğlu Ö. 2014. Gala Gölü (Edirne) Su Kalitesinin Coğrafi Bilgi Sistemi (CBS) Kullanılarak Değerlendirilmesi. *Sigma Journal of Engineering and Natural Sciences.* 32(4):490-501.
- Tokatlı C, Emiroğlu Ö, Çiçek A, Köse E, Başkurt S, Aksu S, Uğurluoğlu A, Şahin M, Başatlı Y. 2016. Investigation of Toxic Metal Bioaccumulations in Fishes of Meriç River Delta (Edirne). *Anadolu University Journal of Science and Technology C - Life Sciences and Biotechnology.* 5(1):1-11.
doi: [10.18036/btdc.32213](https://doi.org/10.18036/btdc.32213)
- Yarar M, Magnin G. 1997. Türkiye'nin önemli kuş alanları. İstanbul: Doğal Hayatı Koruma Derneği 313 s.
- Yılmaz GB. 2004. Gala gölü ve çevresinde ağır metal derişiminin dinamiği. [Yüksek lisans tezi], Trakya Üniversitesi. 59 s.