

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

ANTROPOJENİK GÜRÜLTÜNÜN ZEBRA BALIKLARINDA (*Danio rerio*)
NÖROTRANSMİTTER GEN EKSPRESYON SEVİYELERİNE ETKİLERİ

Macit GENÇER

SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2024

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

ANTROPOJENİK GÜRÜLTÜNÜN ZEBRA BALIKLARINDA (*Danio rerio*) NÖROTRANSMİTTER GEN EKSPRESYON SEVİYELERİNE ETKİLERİ

Macit GENÇER

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Levent DOĞANKAYA

Sanayi ve teknolojideki ilerleme ile birlikte su altı dünyasındaki canlıların eş bulma, besin arama, avcılardan kaçınma, sürü oluşturma gibi davranışlar için yararlandığı doğal seslere antropojenik gürültü olarak tabir edilen yeni ve yabancı sesler dahil olmuştur. Gemi trafiği, derin deniz sondajı, inşaat, balık çiftliklerinde kullanılan mekanizasyon sistemleri gibi yabancı ses kaynaklarının omurgasızlardan memelilere kadar tüm su canlılarını hem bir stres kaynağı olarak fizyolojik açıdan hem de üreme, yüzme, beslenme alışkanlıklarını değiştirerek davranış açısından olumsuz etkileyebileceği hipotezini araştıran çok sayıda çalışma yapılsa da bu mekanizmaların işleyişine dair bilinmeyenler halen çok fazladır. Bu tez çalışmasında, balıkların çeşitli sesler karşısındaki fizyolojik yanıtlarını ölçmede iyi bir belirteç olan nörotransmitter genlerin ekspresyon seviyelerindeki ve yüzme davranışlarındaki değişimler incelenmiştir. Bu amaçla, moleküler çalışmalar için uygun bir model organizma olan zebra balığını (*Danio rerio*) ile kurulan deneyde beyaz gürültü, tekne gürültüsü, devir daim pompası gürültüsü ve klasik müzik (Mozart - Symphony No. 40 in G minor, K. 550; 1788) olmak üzere farklı saf sinüsoidal tonlar 30 gün boyunca uygulanarak nörotransmitter metabolitlerinin (serotonin, dopamin, glutamat, GABA) sentezinden sorumlu genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişimleri izlenmiştir. Nörotransmitterlerin sentez ve taşınmasından sorumlu genlerde (*tph2*, *slc6a4a*, *dbh*, *slc6a3*, *gad67*, *got1*, *slc6a1a*) ses kaynağına bağlı olarak ekspresyon seviyelerinin önemli oranda değiştiği ve balıkların yüzme davranışları ile ağırlık kazancı bakımından da farklılık oluştuğu görülmüştür. Elde ettiğimiz bulgular, çalışmamızda seçilen genlerin balıkların sese tepkilerini ve maruz kaldıkları etkileri açıklamada kullanışlı birer indikatör olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymuştur.

Mayıs 2024, 54 sayfa

Anahtar Kelimeler: Zebra balığı, *Danio rerio*, nörotransmitter, gürültü, gen ekspresyonu

ABSTRACT

PhD Thesis

EFFECTS OF ANTHROPOGENIC NOISE ON NEUROTRANSMITTER GENE EXPRESSION LEVELS IN ZEBRA FISH (*Danio rerio*)

Macit GENÇER

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Fisheries and Aquaculture

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Levent DOĞANKAYA

With the progression in industry and technology, the aquatic species have been exposed to artificial sounds, termed anthropogenic noise, alongside natural sounds employed for behaviours like mating, feeding, evasion of predators, and hearing ability. Despite the plethora of studies probing the hypothesis that anthropogenic sounds such as shipping, boating, pile-driving, seismic exploration, motorboat traffic, energy production and mechanization systems employed in aquaculture facilities may significantly perturb aquatic organisms physiologically, serving as stressors, and behaviourally, by modifying reproductive, locomotive, and feeding patterns, numerous aspects of the underlying mechanisms remain enigmatic. In this thesis, alterations in the expression levels of neurotransmitter genes, serving as useful indicators in quantifying the physiological responses of fish to diverse auditory stimuli, alongside their locomotion behaviours, were scrutinized. To this end, an experiment was conducted with zebrafish (*Danio rerio*), wherein different sinusoidal tones comprising white noise, boat noise, pump noise, and classical music (Mozart - Symphony No. 40 in G minor, K. 550; 1788) were stimulated for 30 days to monitor changes in the expression levels of genes accountable for neurotransmitter metabolite synthesis (serotonin, dopamine, glutamate, GABA). Substantial alterations in the expression levels of genes governing neurotransmitter synthesis and transport (*tph2*, *slc6a4a*, *dbh*, *slc6a3*, *gad67*, *got1*, *slc6a1a*) contingent upon the sound source were noted, concomitant with divergences in both the swimming behaviours and weight gain of the fish. Our findings advocate that the selected genes in our study can serve as useful indicators in elucidating the auditory responses of fish and the attendant repercussions they encounter.

May 2024, 54 pages

Keywords: Zebra fish, *Danio rerio*, neurotransmitter, noise, gen expression

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Çalışmamda beni yönlendiren ve her aşamasında değerli desteğini, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen akademik danışmanım Sayın Doç. Dr. Levent DOĞANKAYA' ya ve tez çalışmamın yürütüldüğü dönemde Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Hasan Hüseyin ATAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Öncelikli Alan Doktora Projesi kapsamında "FDK-2022-2561" proje numarası ve "Antropojenik Gürültünün Zebra Balıklarında (*Danio rerio*) Nörotransmitter Gen Ekspresyon Seviyelerine Etkileri" proje konusu ile desteklenmiştir.

Ayrıca çalışmalarım boyunca maddi ve manevi birçok fedakarlıklar göstererek beni her zaman desteklemiş olan sevgili aileme en içten duygularla teşekkür ederim.

Macit GENÇER
Ankara, Mayıs 2024

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	11
3.1 Materyal.....	11
3.1.1 Deneme alanı.....	11
3.1.2 Deneme materyali.....	11
3.1.3 Deneme ünitesi.....	11
3.1.4 Denemede kullanılan suya ilişkin özellikler.....	12
3.1.5 Denemede kullanılan işitsel uyaranlara ilişkin özellikler.....	12
3.1.6 Denemede kullanılan ekipmanlar	13
3.2 Yöntem	17
3.2.1 Deneme planı	17
3.2.1.1 Etik izin	18
3.2.2 Gürültüye maruz bırakma protokolü	18
3.2.2.1 Doku örneklerinin hazırlanması.....	19
3.2.2.2 Hedef genlerin belirlenmesi.....	19
3.2.2.3 RNA izolasyonu	20
3.2.2.4 Gen Ekspresyonları için RT-qPCR analizleri	23
3.2.2.5 Davranış analizi.....	24
3.2.2.6 İstatistik değerlendirme.....	24
4. BULGULAR	25
4.1 Büyüme Performansına İlişkin Bulgular	25
4.2 İşitsel Uyarılara İlişkin Bulgular	26
4.3 Nörotransmitter Gen Gruplarına Ait Ekspresyon Bulguları	30

4.3.1 Serotonin nörotransmitterine ait bulgular	30
4.3.2 Dopamin nörotransmitterine ait bulgular	32
4.3.3 Glutamat nörotransmitterine ait bulgular	34
4.3.4 GABA nörotransmitterine ait bulgular	36
4.4 Davranış Analizine Ait Bulgular	37
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	39
KAYNAKLAR.....	48
ÖZGEÇMİŞ.....	54



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

H ₂ O	Su
ng	Nanogram
°C	Santigrat Derece
g	Gram
cm	Santimetre
km	Kilometre
L	Litre
pH	Potansiyel Hidrojen (asit/alkali)
mm	Milimetre
µPa	MikroPascal
dk	Dakika
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
mgL ⁻¹	Miligram/Litre
ng/µl	Nanogram/Mikrolitre
sn	Saniye

Kısaltmalar

5HT	Serotonin
BS	Beyaz Gürültü
ÇO ₂	Çözünmüş Oksijen
DA	Dopamin
dB	Desibel
<i>got1</i>	glutamik-oksaloasetik transaminaz 1
Hz	Hertz
kHz	Kilohertz
KS	Klasik Müzik
lux	Işık birimi
NMDAR	NMDA reseptör
PS	Pompa gürültüsü
SERT	Serotonin Taşıyıcısı
TS	Tekne Gürültüsü
SBO	Spesifik Büyüme Oranı
YDO	Yem Dönüşüm Oranı
12L	12 Saat Işık
12D	12 Saat Karanlık
GABA	Gama Aminobütirik Asit
TDS	Toplam Askıda Katı Madde

SPL	Ses Basınç Seviyesi
<i>tph2</i>	Tryptophan hydroxylase 2
<i>slc6a4a</i>	SERT; solute carrier family 6
<i>dbh</i>	Dopamine Beta-Hydroxylase
<i>slc6a3</i>	Dopamine Transporter; DAT
<i>gad67</i>	Glutamic acid decarboxylase
<i>slc6a1a</i>	Solute carrier family 6 member 1a



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 İşitsel uyaran olarak tekne gürültüsü.....	13
Şekil 3.2 Hassas terazi.....	14
Şekil 3.3 Osiloskop	15
Şekil 3.4 Ses Kartı.....	15
Şekil 3.5 Amplifikatör.....	16
Şekil 3.6 Hidrofon.....	16
Şekil 3.7 Hoparlör	17
Şekil 3.8 Deyen tankları	18
Şekil 3.9 Agaroz jel görüntüsü.....	22
Şekil 3.10 qRT – PCR Amplifikasyon grafiği	23
Şekil 3.11 Solomon Coder yazılımıyla balıkların hareketleri	24
Şekil 4.1 Deney tankında kaydedilen Beyaz gürültü.....	26
Şekil 4.2 Deney tankında kaydedilen Tekne gürültüsü	27
Şekil 4.3 Deney tankında kaydedilen Pompa gürültüsü.....	27
Şekil 4.4 Deney tankında kaydedilen Klasik Müzik SPL (dB re 1 µPa cinsinden) güç spektral yoğunluğu	28
Şekil 4.5 Deney tankında kaydedilen beyaz gürültü spektrum analizi.....	28
Şekil 4.6 Deney tankında kaydedilen klasik müzik spektrum analizi.....	29
Şekil 4.7 Deney tankında kaydedilen tekne gürültüsü spektrum analizi.....	29
Şekil 4.8 Deney tankında kaydedilen pompa gürültüsü spektrum analizi.....	30
Şekil 4.9 Deneme gruplarında tph2 genine ait ekspresyon seviyeleri.....	31
Şekil 4.10 Deneme gruplarında slc6a4a genine ait ekspresyon seviyeleri.....	32
Şekil 4.11 Deneme gruplarında dbh genine ait ekspresyon seviyeleri.....	33
Şekil 4.12 Deneme gruplarında slc6a3 genine ait ekspresyon seviyeleri.....	34
Şekil 4.13 Deneme gruplarında gad67 genine ait ekspresyon seviyeleri	35
Şekil 4.14 Deneme gruplarında got1 genine ait ekspresyon seviyeleri.....	36
Şekil 4.15 Deneme gruplarında slc6a1a genine ait ekspresyon seviyeleri.....	37

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Su parametre ölçüm aralıkları ve hassasiyet değerleri	12
Çizelge 3.2 Hedef genler ve primer setleri.....	19
Çizelge 3.3 Nanospektrofotometre sonuçları	22
Çizelge 4.1 Deney gruplarında ölçülen su kalite değerleri.....	25
Çizelge 4.2 Deney gruplarında büyüme performansı (Ortalama \pm SE) (N:90).....	25
Çizelge 4.3 Deney tankındaki balıkların sesli uyarana karşı yüzey, orta ve dip derinliklerinde bulunma tepkileri	38
Çizelge 4.4 Deney tankındaki balıkların sesli uyarana karşı kaçma tepkileri	38



1. GİRİŞ

İnsan kaynaklı faaliyetlerin sucul sisteme dahil ettiği seslerin suda yaşayan canlılarının beslenme, üreme, avlanma, korunma ve sürü oluşturma gibi davranışları ile birlikte duyma kabiliyetleri ve fizyolojik yanıtlarına ilişkin tartışmalar ve araştırmalar gün geçtikçe hem sayıca artmakta hem de kapsamaları derinleşmektedir.

Yetişkin zebra balıkları en iyi hassasiyetle 800 Hz civarında olmak üzere, 100 Hz ile en az 4000 Hz arasındaki frekansları duyabilirler (Higgs 2002). Zebra balıklarının işitme yetenekleri Japon balıklarınıninkine benzerdir (Popper 1971, Higgs 2002) ve yüzme kesesini iç kulağa bağlayan ortak Weber kemikçikleri nedeniyle *Cypriniformes*' in diğer üyeleri yanında yerini alır. Zebra balığı en az 200 - 1000 Hz arasındaki saf tonlara güçlü davranışsal tepkiler gösterir (Cervi *vd.*, 2012). Yetişkinlerde akustik uyarılara verilen yanıtta büyük olasılıkla sakküler epitelin aracılık ettiği düşünülmektedir (Zeddies ve Fay 2005), ancak lagenar ve muhtemelen utriküler tüy hücrelerinden de uyarı alabilirler. Mutlak işitsel hassasiyet, işitsel yetenekleri ölçmek için kullanılan tekniklere bağlı olarak farklılık göstermekle birlikte (Rogers *vd.*, 2016) zebra balığı, diğer türlerle kıyaslandığında belirli frekans aralıklarındaki seslere karşı oldukça hassas görünmektedir.

Bu özellikleri itibariyle ses ve gürültünün fizyolojik ve davranışsal etkilerini izlemek için en uygun model balık türü olan zebra balıkları ile gerçekleştirilen bu tez çalışması ile doğal çevre ve yetiştiricilik ortamlarındaki gürültü koşulları simule edilerek yetiştiricilik ve fizyoloji çalışmalarına katkı sunması düşünülen verilerin toplanması amaçlanmaktadır. Elde edilen bulgular deneysel çalışmalar için literatüre katkı sağlamanın yanı sıra yetiştiricilik şartlarının düzenlenmesi, iyileştirilmesi ve verim artışına yönelik noninvazif uygulamalar için de önemli bir kaynak oluşturması düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasının amacı, kavramsal ve deneysel pek çok çalışmada ele alınan bir model organizma olan zebra balıkları (*Danio rerio*) üzerinde yapılacak deneyler ile doğal çevre ve yetiştiricilik ortamlarının akustik sahnelerinde maruz kaldıkları

potansiyel gürültü kaynakları ile müzikal ses uyarılarına karşı nörotransmitter (serotonin, dopamin, noradrenalin, glutamat, GABA vb.) metabolitlerinin sentezinden sorumlu genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişimleri belirleyerek balıkların tepki seviyelerinin değerlendirilmesi ve balık davranışları üzerindeki etki potansiyelinin yorumlanmasıdır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Balıkların avlanma, korunma veya popülasyonlar arası iletişim için kullandıkları sesin bu canlılardaki etkileri araştırmacılar için cazip bir konudur (Selen 2006). İnsan veya diğer omurgalılarda bulunan dış ve orta kulak gibi yapılar deniz canlılarında (memeliler ve yumuşakçalar hariç) bulunmamaktadır. Bu yapıların yerine, yapılarındaki akustolateral sistemleri sayesinde sesleri işitebilir veya algılayabilirler. Akustolateral sistemde ses dalgalarının iki farklı yolla (hava kesesi veya yan çizgi üzerinden) yükseltgenerek iç kulağa iletilmesiyle sesin algılanması sağlanır (Hawkins 1993).

Ses, enerji transferinin eşlik ettiği bir ortamdan geçen dalga biçimidir. Dalgalar, lokalize sıkıştırma ve seyrelme bölgelerinden, yani ses basıncına neden olan alternatif basınç sapmalarından oluşur. Ortamın ayrı ayrı parçacıkları dalga ile birlikte hareket etmez, ancak ileri geri titreşir ve salınım hareketini komşularına iletir (Urlick 1983).

Belirli bir mesafeden bilgi sağlayan en yaygın sinyaller ışık, kimyasallar veya akustiktir. Bir hayvanın bunlardan birkaçını veya tümünü kullanması muhtemel olsa da her sinyalin kendine özgü iletişim özellikleri vardır. Sesler bilgiyi çok hızlı ve uzun mesafelerde sağlar.

Sucul canlıların akustik çevre hakkında bilgi edinmek için kullandıkları sesler, sadece suda yaşayan canlılar tarafından değil, aynı zamanda yaşadıkları ortamdaki dalga hareketleri, suya çarpan yağmur damlaları, resiflerin üzerinden geçen su akıntıları ve su altı depremleri gibi çevresel faktörler tarafından da üretilir.

Ses ortamındaki değişiklikler anlık bile olsa sucul canlıyı bir yırtıcının saldırısına veya bazı tehlikeli durumların varlığına karşı uyarmakla birlikte besin maddesi bulunmasında da etkili olabilir. Ses, üreme, bölgesel savunma ve bir araya gelme gibi normal davranışlardaki bireyler arasındaki iletişim için kullanılır. Örneğin, subay balığı (*Porichthyes notatus*) çiftleşme için dişileri çağırırken ya da bir orfoz türü olan *Mycteroperca jordani* yumurtlamak için bir araya gelirken sesleri kullanır (Zeddies vd.,

2010, Rowell *vd.*, 2020). Benzer şekilde, Avrupa ıstakozları (*Homarus gammarus*) agonistik davranışlar sırasında ses kullanırlar (Jézéquel *vd.*, 2020).

Balıklar, karasal omurgalılar gibi sesler arasında ayırım yapmak, bir sesin yönünü belirlemek ve gürültünün varlığında biyolojik olarak ilgili sesleri tespit etmek gibi aynı temel işitsel görevleri gerçekleştirebilir. Nitekim test edilen tüm balık türlerinin işitebildiği gösterilmiştir (Popper *vd.*, 2003). Bununla birlikte, türler arasındaki işitme yetenekleri büyük ölçüde değişmektedir. İşitme yeteneklerini sınıflandırma amacıyla, “işitme uzmanı” (hearing specialist) ve “işitme uzmanı olmayan” terimleri yaygın olarak kullanılmaktadır (Popper ve Fay 1999).

Balıklar arasındaki işitme yapılarında olağanüstü bir çeşitlilik görülmekte olup bu da türler arasında farklı işitme yetenekleriyle sonuçlanır. Birçok balık türü yaklaşık 30 Hz - 1 kHz aralığında işitirken, bazı araştırmalar, 20 Hz’ den daha düşük infrasonik aralıkta (Karlsen 1992; Knudsen *vd.*, 1997) ve 20 kHz’ nin üzerindeki ultrasonik aralıkta (Mann *vd.*, 1998, 2001; Popper *vd.*, 2003) türe özgü işitme yetenekleri olduğunu göstermiştir.

Balıklarda insan ya da diğer omurgalılar gibi bir dış ve orta kulak yapısı bulunmaz. Balıklar akustolateral sistemin elemanları sayesinde işitebilirler. Akustolateral sistem, iç kulak ve yanal çizgi olmak üzere iki bölümden oluşur. İç kulak dediğimiz yapı, insan iç kulağına benzer bir yapıya sahiptir. Vücuda gelen titreşimler yüzme kesesince yükseltgenerek, iç kulağına iletilir. Bunun yanında, yanal çizgiden algılanan titreşimler de başka bir yolla iç kulağına iletilirler. Böylece balık sesin şiddetini algılayabilir. Balıklar, duyma yapılarındaki farklılıklara göre, genel işitenler ve özel işitenler olmak üzere iki ayrı sınıfta toplanırlar. Yüzme kesesi ve iç kulak arasında bağlantı olmayanlar (fizoglist), genel işitenlerdir. Yüzme kesesi ve iç kulak arasında bağlantı bulunanlar (fizostom) ise özel işitenler adı altında sınıflandırılmaktadır (Jobling, 1995; Yan *vd.*, 2010).

Nakliye, sismik hava tabancaları, kazık çakma ve rüzgar türbinlerinin çalışma gürültüsü dahil antropojenik su altı gürültüsü 1000 Hz’ nin altında büyük enerji sergiler ve bu durum çoğu balığın duyma frekansı aralığı içindedir (Richardson *vd.*, 1995; Popper *vd.*,

2003). Balıklar, su altı titreşimlerinin tespiti için yanal çizgi sistemi ve iç kulak olmak üzere iki ana mekanik duyu organına sahiptir. Yanal çizgi sistemi, balık gövdesine göre düşük frekanslı (genellikle 150 Hz' nin altında) su akışı ile uyarılır (Sand 1984, Enger *vd.*, 1989, Coombs ve Montgomery 1999, Wahlberg ve Westerberg 2005). Ses kaynağına çok yakın olan yanal çizgi sistemi akustik alanı algılayabilir. Bununla birlikte, sınırlı algılama aralığı, balığın rüzgar türbinlerinden gelen sinyallere tepkisi bağlamında yanal çizgiyi muhtemelen önemsiz kılmaktadır (Wahlberg ve Westerberg 2005). İç kulak, üç yarım daire şeklindeki kanalı ile bununla ilişkili duyu bölgelerini ve sakkül, utrikül ve lagenayı kapsayan üç otolit uç organını içermektedir. Her bir otolit organı, mekanoreptif işitme kılı (hair cell) içeren bir duysal epitel ile yakından ilişkili katı bir kalkerli taştan (otolit) oluşur. Otolitlerin çevre dokulardan ve sudan daha yoğun olması sebebiyle bir ses dalgası içindeki hareketleri epitelinkinden farklı bir faz ve genişlikte olur ve böylece işitme kılı hücrelerinde makaslama hareketi yaratır. Otolit organları bu nedenle prensipte parçacık hareket detektörleridir (Hawkins 1993, Popper *vd.*, 2003). Hem yakın hem de uzak alanda balığın vücudunun ses kaynaklı hareketlerine tepki verme eğilimindedirler (Popper ve Fay 1999). Ses basıncı algısı, hava dolu yüzme keseleri içeren balık türleri ile sınırlıdır.

Gazın suya kıyasla daha yüksek sıkıştırılabilirliği nedeniyle, yüzme kesesi ses basıncı dalgalanmalarına yanıt verir. Yüzme kesesinin bu hareketi iç kulağın otolit organlarına iletebilir. Başka bir deyişle, yüzme kesesi, gelen ses basıncını kulağı uyaran parçacık hareketine dönüştürür. Birçok balık türünün ses basıncına ve parçacık hareketine karşı ikili duyarlılığı, hayvanlara mesafe ve konum da dahil olmak üzere ses kaynağı özellikleri hakkında değerli bilgiler sağlayabilir (Popper ve Fay 1999, Popper *vd.*, 2003).

Antropojenik faaliyetlerin çoğu 1 kHz' in altındaki frekanslarda önemli miktarda gürültü ürettiği için (Normandeau Associates 2012), bir etki potansiyeli vardır. İnsan kaynaklı gürültünün balıklar üzerindeki olumsuz etkisine dair nihai ampirik kanıt, diğer taksonlara, özellikle de kuşlara göre daha azdır. Bu durum, bugüne kadar yapılan çalışma sayısının az olmasından, doğal koşullarda yapılan gözlemsel çalışmaları yorumlamanın genellikle zor olmasından ve kapalı kaplarda yürütülen deneysel çalışmaların ekolojik realiteden yoksun olmasından kaynaklanabilmektedir. Farklı

kaynaklı seslerin farklı etkileri olabileceğini, aynı veya benzer gürültü kaynaklarının tüm türleri aynı şekilde etkilemeyebileceğini unutmamak önemli olmakla birlikte, tür içi farklılıklar da olasıdır (Pine *vd.*, 2014). Genel olarak, en önemli etkiler, akustik iletişim de dahil olmak üzere davranış üzerindedir. Birçok balık tarafından üretilen akustik sinyaller, 100 Hz ile 1 kHz arasındaki bir frekans bandına düşer ve bu da onları çeşitli kaynaklardan gelen insan kaynaklı gürültüye karşı savunmasız hale getirir. Birkaç çalışma, tekne trafiğinden kaynaklanan gürültünün, etkili iletişim sinyalleri aralığını ve dolayısıyla bireyler arasındaki sinyalleme verimliliğini azaltabileceğini ileri sürmüştür (Vasconcelos *vd.*, 2007; Codarin *vd.*, 2009). Bunun nedeni, algılama mesafelerinin maskeleye yoluyla kısaltılması (Codarin *vd.*, 2009) ve/veya alıcıların işitsel hassasiyetlerinin azalmasıdır (Vasconcelos *vd.*, 2007). Bununla birlikte, yalnızca bir çalışma, gürültünün balıkların akustik davranışını nasıl etkileyebileceğini doğrudan incelemiştir. Picciulin ve arkadaşlarının 2012 yılında, kahverengi eşkina balığının (*Sciaena umbra*) üzerinde gerçekleştirdiği çalışmada, ortalama nabız hızının, tekrarlanan tekne geçişlerini takiben daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

İnsan kaynaklı seslere olan ilginin çoğu deniz memelilerine odaklanmış olsa da, bu tür seslerin balıklar ve deniz omurgasızları üzerindeki etkisine ilişkin de artan bir endişe bulunmaktadır. Seslerin balıklar üzerindeki etkilerine olan araştırma konularında bir artış olmasına rağmen, bu konu en sınırlı ölçekte ele alınmıştır. Yüksek ses seviyelerinin iç kulak duyu hücrelerine zarar verebileceği, işitme kaybına neden olabileceği (eşik kaymaları), stres tepkileri ortaya çıkarabileceği ve balıkların davranışını değiştirebileceği bildirilmiştir. İşitme kaybı açısından bu etkiler, ses seviyesine maruz kalma şiddeti ve süresiyle ilişkilidir.

Su altındaki gürültü ve/veya ses kaynakları balıklarda en temel stres faktörlerinden biridir. Wysocki ve arkadaşları (2006), tatlı su balığı türleri olan sazan (*Cyprinus carpio*, L 1758), dere kaya balığı (*Gobio gobio*, L 1758) ve tatlı su levreğinde (*Perca fluviatilis*, L 1758) gemi gürültüsünün kortizol salgısına etkisini araştırmış, Tuna Nehri ve Avusturya'nın iki gölünde gemi gürültüsüne maruz kalan tüm türlerde başlangıçta kortizol salgısında artış olduğunu ancak uzun vadede kortizol seviyelerinin değişmediğini saptamışlardır. Sonuç olarak; gemi gürültüsünün genişlik ve frekans

dalgalanmasına göre etki değişirken, devamlılığı durumunda kortizol seviyelerinde tetikleyici olamadığını belirlemişlerdir.

Çalışmaların çoğu, hayvanlar üzerinde neden olabilecekleri doğrudan hasar nedeniyle sonar, havalı tabancalar ve kazık çakma gibi yüksek güçlü, akut gürültü kaynaklarına odaklanmıştır (Popper ve Hastings 2009); ancak yetiştiricilik ortamlarında da antropojenik gürültü söz konudur. Sucul türlerden toplanan stres verilerinin, koruma programları ve su ürünleri yetiştiriciliği için uygun habitatın belirlenmesi ile doğrudan bir ilişkisi kurulabilir.

Bir akuakültür ortamında bir balığın optimal büyümesi veya hayatta kalması için gerekli olan uygun akustik ortamlarla ilgili araştırmalar oldukça önemlidir. Örneğin Japon balığı (*Carassius auratus*), akvaryumdaki dört farklı filtre türüne maruz kaldığında işitme eşiğinde bir kayma ve seslerin maskelenmesi söz konusudur ancak havuzlarda barındırıldığında işitme eşiğinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir (Gutscher *vd.*, 2011).

Graham ve Cooke' un 2008 yılında bir levrek türünde (*Micropterus salmoides*) gerçekleştirdiği çalışmada, balıkları üç farklı tekne gürültü kaynağına maruz bırakmış, kano kürek gürültüsüne maruz kalan balıkların kalp atış hızınının % 29 iken, elektrikli trol motoruna maruziyette % 44 olduğu ve içten yanmalı bir motora maruz kaldığında ise % 67 oranına çıktığını bildirmiştir.

Yetiştiricilik sektöründeki gürültü kaynağı olarak düşük (117 dB, 1µPa RMS) ve yüksek (149 dB, 1µPa RMS) frekanslarda verilen seslerin alabalıklarda gelişim, besin alımı, yaşama oranı ve kondüsyon faktörüne etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışma sonucunda, kısa vadede yüksek seslerin balıklar üzerinde olumsuz etkilere neden olduğu ancak uzun vadede balıkların bu duruma alıştıklarını ve gelişmelerinin etkilenmediğini belirtmişlerdir (Davidson *vd.*, 2009).

Endokrin sistemin şekillenmesi, çevre koşullarına ve üreme organlarına bağlıdır. Çevre koşullarının değişimi duyu sistemi ve beyindeki özel merkezleri uyararak, hipofiz bezinin aktivitesini kontrol altına alır. Hipofiz bezinin salgıları gametogenez, metabolizma ve davranış üzerinde doğrudan etkilidir. Bu hormonlar aynı zamanda gonadların endokrin dokusundaki gelişmeyi ayarlar (Timur 2006).

Yoğun su ürünleri üretim sistemlerinde kullanılan ekipmanların (havalandırıcılar, su pompaları, arıtma sistemleri vb.) kronik gürültüye yol açması nedeniyle balıklarda işitme sorunları, stres ve büyümede gerilemeye neden olabileceği öne sürülmektedir. Ancak sesin uzun vadede işitme, büyüme ve hastalık direnci üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, 8 ay boyunca 115, 130 ve 150 dB ($dB = \sqrt{1\mu Pa}$) gürültüye maruz bırakılan gökkuşuğu alabalıklarında kapalı devre sistemlerin herhangi bir olumsuz etkisi olmadığı sonucuna ulaşılmış ancak bu durumun diğer balık türlerinde farklılık gösterebileceği de belirtilmiştir (Wysocki *vd.*, 2007).

Papoutsoglou ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan bir çalışmada, sazan balıklarına 106 gün boyunca klasik müzik parçalarının dinletilmesinin fizyolojik etkileri araştırılmış, balıklara 4 sa/gün 80 ve 200 lux ışık şiddeti altında müzik uygulanırken, kontrol grubu yalnızca ortam gürültüsüne maruz bırakılmıştır. Deneme bitiminde müzik dinletilen gruplarda SBO ve ağırlık kazancının yüksek olduğu belirlenmiştir. 200 lux ışık şiddetinde günlük yem alımı artarken YDO daha düşük bulunmuştur. Bu sonuçlar ışık şiddetiyle birlikte ortamdaki gürültünün de balıklarda etkisi olduğunu göstermiştir.

Sazangillerden olan koi balıklarında müzik etkisinin araştırılmasında, balıklara 3 sa/gün müzik dinletildiğinde balıkların gelişim performansının arttığı ve müziğin diğer çevresel faktörler (sıcaklık, ışık vb.) gibi büyüme performansında belirleyici olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Vasanth *vd.*, 2003).

Papoutsoglou ve arkadaşları (2007), resirküle sistemde tutulan sazan balıklarında farklı ışık koşullarında müzik uygulamasının gelişim ve fizyoloji üzerine etkilerini araştırarak ışığın olumsuz etkisine karşın 30 dk süreli müzik uygulamasının büyüme performansını

artırdığını, düşük gelişim gösteren gruplarda artan nörotransmitter seviyelerinin stres belirtisi olduğu ve müziğin sakinleştirici bir faktör olabileceğini bildirmiştir.

Catli vd. (2015), düşük şiddette müzik dinletmenin kalkan balıklarında (*Psetta maeotica*) büyüme hızını artırdığı sonucuna varmıştır.

Zebra balığı (*Danio rerio*), yüksek omurgalılara göre önemli avantajlar sunduğu için son yıllarda işitsel fizyoloji (ve diğer araştırma alanları) için alternatif bir model sistem olarak ilgi görmektedir. Zebra balığı (*Danio rerio*), gelişimsel toksikoloji, ilaç taraması, genetik ve hastalık biyolojisinde kullanılan köklü bir biyomedikal modeldir. Zebra balığı genomu insan genomu ile %70 homolojiye sahiptir (Howe vd., 2013). Ek olarak, zebra balığının bakımı kolay, doğurganlığı yüksek ve diğer türlerle karşılaştırıldığında nispeten hızlı gelişmesi de bilimsel çalışmalarda yer etmesi için önemli unsurlardandır. Zebra balığı embriyolarının şeffaf olması, embriyoların genetik manipülasyonuna ve ex vivo gelişimin izlenmesine olanak sağlamaktadır. Ayrıca, zebra balığı ve memeliler arasında nörotransmitter sistemleri genetik olarak korunmakta, bu da nörotransmisyon değişikliklerinin mekanizmalarının ve ilişkili gelişimsel ve hastalık süreçlerinin translyasyonuna izin vermektedir (Horzmann ve Freeman, 2016). Zebra balığı, memelilerle ortak nörotransmitter yollarını paylaşmakla birlikte omurilik, arka beyin ve retina gibi birçok alanda benzer nöroanatomiye sahiptir. Ancak beyin inversiyondan ziyade eversiyonla geliştikçe, memeli beyninin hipokampus, amigdala gibi bazı bölgeleri ve substantia nigra, zebra balıklarında mevcut değildir. Bu alanların işlevi beynin başka bölgelerinde gerçekleştirilirken, zebra balığı ve memeliler arasında işlevsel karşılaştırmalara olanak sağlamaktadır (Cheng vd., 2014). Dopamin (DA) ve serotonin (5HT) dahil olmak üzere aminojirik nörotransmitterler, birkaç önemli beyin fonksiyonuna aracılık etmektedirler. Dopamin, hareket, ödül, hafıza gibi reaksiyonlarla ilişkilendirilen başlıca katekolamin modülatör nörotransmitterlerinden biri olup, bir etilamin yan zinciri ve bir amin grubu olan bir katekol grubu ile karakterizedir. Dopamini epinefrine dönüştüren enzim olan *dbh* yalnızca zebra balığının arka beyinde bulunmakta (Ma, 1997) ve dopamin taşıyıcısı (DAT) *slc6a3* genidir. Dopaminerjik nöronlar, beynin toplam nöronal popülasyonunun %1' inden daha azını oluşturmasına rağmen, beyin fizyolojisi üzerinde önemli etkileri bulunmaktadır (Goldman-Rakic 1997, Schultz

2002). Gürültü stresinin beyindeki hem işitsel hem de bağlantılı işlevleri etkilediği bilinmektedir. Bu etkiler, işitme hasarına ve ayrıca bozulmuş bilişsel işlev, kaygı ve depresyonu yansıtan davranış kalıplarında değişikliklere sebep olmaktadır. Hem nörofizyolojik hem de davranışsal değişiklikler, beyindeki nörotransmitterlerdeki değişikliklerle ilişkilidir. Değişen akustik ortamlara karşı gözlenen davranışsal tepkilerin nörokimyasal mekanizmalarına yönelik araştırmalar halen devam etmektedir. Örneğin Winberg ve Thörnqvist 5HT sisteminin çeşitli stres faktörlerine nasıl tepki verdiğini ve bunun sosyal strese maruz kalan balıkların davranışını nasıl değiştirebileceğini incelemişlerdir. Balıklarda yapılan çalışmalar az olmasına rağmen diğer omurgalılarda, özellikle kemirgenlerde, gürültüye maruz kalmanın beyin nörotransmitter seviyeleri üzerindeki etkileri ortaya çıkarılmıştır. Başta DA ve 5HT dahil olmak üzere monoaminlerin, beyindeki gürültü stresinin hem işitsel hem de bağlantılı işlevlerine etki ettiği ortaya koyulmuştur (Li *vd.*, 2019, Ravindran *vd.*, 2005; Samson *vd.*, 2006). Serotonerjik lifler, koklear çekirdek korteksi, işitsel korteks ve alt kollikulus dahil olmak üzere çeşitli işitsel yapılara dönüşür (Li *vd.*, 2019). Sinapstaki 5HT konsantrasyonu, esas olarak, serotonerjik nöronların bütünlüğünün bir işareti olarak yaygın olarak kullanılan serotonin taşıyıcısı (SERT) tarafından düzenlenir. Düşük yoğunluklu (70 dB SPL) beyaz gürültü, işitsel yollarda yer alan nöronlardaki hücre dışı 5HT seviyelerini artırabildiğinden, merkezi işitsel yapılarda gürültü ile 5HT sinyalinin aktive olduğu ortaya koyulmuştur (Cransac *vd.*, 1998).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Deneme alanı

Denemede, farklı ses grupları uygulamalarının zebra balıklarında (*Danio rerio*) nörotransmitter gen gruplarına ait ekspresyon analizleri incelenmiştir. Balıklarda ses uygulama deneyleri Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü Balıkçılık Araştırma Biriminde gerçekleştirilmiştir. Araştırmanın temelini teşkil eden gen ekspresyon analizler ise Ankara Üniversitesi Teknoloji Geliştirme Bölgesi Agrigenomik Hub Biyomedikal Laboratuvar A.Ş. ne (Ankara) ait laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1.2 Deneme materyali

Denemede ortalama ağırlıkları $0,230 \pm 0,04$ g olan 360 adet zebra balığı (*Danio rerio*, Hamilton, 1822) kullanılmıştır. Tarım ve Orman Bakanlığı Akdeniz Su Ürünleri Araştırma, Üretim ve Eğitim Enstitüsü Müdürlüğü'nden 06.04.2023 tarihindedemin edilen balıklar 1/3 su, 2/3 hava ile doldurulmuş plastik poşetler içerisinde Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü Balıkçılık Araştırma birimine getirilmiş ve bir haftalık karantina sürecinden sonra deneylerin yürütüleceği Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü laboratuvarına alınmıştır.

3.1.3 Deneme ünitesi

Denemede, Balıkçılık Araştırma Biriminde bulunan 96 L (80 x 40 x 30 cm) su hacmine sahip 12 adet akvaryum kullanılarak deneme gerçekleştirilmiştir. Akvaryumların su sıcaklığının sabit tutulabilmesi amacıyla her akvaryuma 300 W dijital termostatl ısıtıcı yerleştirilerek $24 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ' ye ayarlanmıştır. Çözünmüş oksijen

tedariği için merkezi blower sistemine bağlanan hava taşları kullanılmıştır. Akvaryumlar haftada bir kez deney koşullarını etkilemeyecek şekilde temizlenmiş, temizlik işleminde mıknatışlı cam sileceği ile akvaryum camları silindikten sonra sifonlama ile varsa dipteki katı atıklar toplanarak gerekli ise maksimum %10 oranında su değişimi yapılmıştır.

3.1.4 Denemede kullanılan suya ilişkin özellikler

Denemede su kaynağı olarak, dinlendirilmiş şehir şebeke suyu kullanılmış ve çözünmüş oksijen (CO_2), sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$), pH, iletkenlik, toplam askıda katı madde (TDS), tuzluluk değerleri ölçülmüştür. Ölçüm değer aralıkları ve hassasiyetleri Çizelge 3.1' de belirtilmiştir. Tüm ölçümlerde YSI Pro Plus marka multimetre su parametre ölçüm cihazı kullanılmıştır.

Çizelge 3.1 Su parametre ölçüm aralıkları ve hassasiyet değerleri

	Ölçüm Aralığı	Ölçüm Hassasiyeti
CO_2 (mg/L^{-1})	0 – 50	$\pm 0,2$
Su Sıcaklığı ($^{\circ}\text{C}$)	-5 ~ +70	$\pm 0,2$
pH	0 – 14	$\pm 0,2$
İletkenlik ($\mu\text{s/cm}^{-1}$)	0 - 200	$\pm 0,001$
TDS (g/L^{-1})	0 - 100	$\pm 0,64$
Tuzluluk (ppt)	0 - 70	$\pm 0,1$

3.1.5 Denemede kullanılan işitsel uyarılara ilişkin özellikler

İşitsel uyarın olarak tekne gürültüsü, devir daim pompası gürültüsü ve klasik müzik (Mozart - Symphony No. 40 in G minor, K. 550; 1788) olmak üzere üç saf sinüsoidal ton seçilmiştir. Üç işitsel uyarıdan bir dosya web kanalları üzerinden temin edilmiş, diğer iki dosya ise gerçek zamanlı kayıt ile oluşturulmuştur. Klasik müzik uyarını, ilk

kaydının revize edilmiş dört bölümlü orijinal formatı üzerinden hazırlanmıştır. Tekne gürültüsü kaydı, Ankara İl Tarım ve Orman Müdürlüğü Balıkçılık ve Su Ürünleri Şube Müdürlüğüne ait fiberglas tekneye bağlı 60 HP (44,1 KW) gücünde 4 zamanlı benzinli motor ile Ankara'ya 12 km mesafede bulunan Bayındır Barajı - Mavigöl' de gerçekleştirilmiştir. Çoklu ses kayıtları, teknenin stabil halde olması ve farklı hızlarda hareket halinde olması durumlarında alınmıştır. Gürültü kayıtları, yüksek empedanslı hidrofona (Aquarian Audio H1a) bir preamplifikatöre (Behringer UMC22) bağlanarak taşınabilir bilgisayara önceden yüklenen program (Audacity v 3.3) ile gerçekleştirilmiştir. Pompa kayıtları da yine aynı ses düzeneği ile bir resirkülasyonlu balık üretim sisteminden alınmıştır. Üç ses dosyası, Audacity v 3.3 programında düzenlenerek kaydedilmiş, kontrol grubu için de aynı program kullanılarak White noise üretilmiş ve kayıtlar oluşturulmuştur.



Şekil 3.1 İşitsel uyarın olarak tekne gürültüsü

3.1.6 Denemede kullanılan ekipmanlar

a) Multiparametre su analiz cihazı: Su parametrelerinin ölçümünde YSI Pro Plus model multiparametre ölçüm cihazı kullanılmıştır.

b) Hassas Terazi: Denemenin tartım aşaması Kern PLJ 600 (Germany) marka hassas terazi ile yapılmıştır.



Şekil 3.2 Hassas terazi

- c) **Diseksiyon Seti:** Diseksiyon işlemlerinde diseksiyon makası ve pens kullanılmıştır.
- d) **Ölçüm Tahtası:** Balık boylarının ölçülmesinde Vernier Caliper model 0,05 mm hassasiyete sahip kumpas kullanılmıştır.
- e) **Soğutucu (-80):** Dokuların saklanması aşamasında Liebher marka soğutucudan yararlanılmıştır.
- f) **Sarf Malzemeleri:** Denemede çeşitli ebatlarda ve sayıda beher, piset, tartım kabı, parafilm gibi laboratuara ilişkin sarf malzemesi kullanılmıştır.
- g) **Osiloskop:** Denemede Owon SDS 1000 Series marka osiloskop kullanılmıştır.



Şekil 3.3 Osiloskop

h) Ses Kartı: Denemede balıklara müzik dinletilmesi sırasında Preampifikatör Behringer UMC22 kullanılmıştır.



Şekil 3.4 Ses kartı

ı) Bilgisayar: Bilgisayar olarak Lenovo marka Intel i7 işlemci 8G RAM 1TB HDD donanıma sahip cihaz tercih edilmiştir.

j) Amplifikatör: Amplifikatör olarak Midex MP1000 kullanılmıştır.



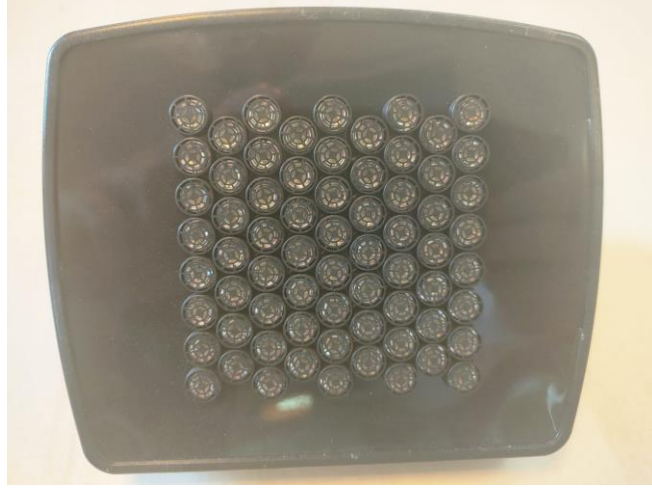
Şekil 3.5 Amplifikatör

k) Hidrofon : Aquarian Audio H1a marka hidrofon (frekans aralığı: 20 Hz-4 kHz, ± 4 dB, voltaj hassasiyeti: -185 dB re. 1 V/ μ Pa) tercih edilmiştir.



Şekil 3.6 Hidrofon

l) Hoparlör : Leta Grup firmasına özel sipariş ile yaptırılan 54 hücreli yönlendirilmiş ses hoparlörleri denemede kullanılmıştır.



Şekil 3.7 Hoparlör

3.2 Yöntem

3.2.1 Deneme planı

İşitsel uyarıların akvaryumlara iletilebilmesi için her akvaryumun üzerine, su yüzeyinden 15 cm yukarıda olacak şekilde hoparlörler (Yönlendirilmiş Ses Sistemleri, Leta Grup, Türkiye) yerleştirilmiştir. Her biri ayrı güç kaynağına bağlı hoparlörlere ses bağlantısı için 3,5 mm Aux stereo kablolar kullanılmıştır. Ses dosyalarının bilgisayardan hoparlörlere aktarımında amplifikatör ve voltaj ön yükselticisi kullanılarak ses dosyalarının çıkış seviyeleri standart hale getirilmiştir. Tekrarlar arasında ve laboratuvar ortamında ses izolasyonunu sağlamak amacıyla her akvaryumun tabanına 3 cm kalınlığında yüksek yoğunluklu strafor levha konulmuş, yan yüzeylerine de 5 cm kalınlığında akustik sünger kaplanmıştır.

Deney gruplarının oluşturulması için karantina sonrası laboratuvara transfer edilen balıklar tartılıp (Kern PLJ 600; 0,001 g) dijital kumpas (0,05 mm) ile boyları ölçülerek akvaryumlara yerleştirilmiştir. Balıkların yeni ortamlarına alışmaları için deneyler öncesinde iki hafta boyunca günde iki sefer hazır akvaryum yemi ile beslenmiştir. Deneme, 3 tekerrürlü tesadüf parselleri düzeninde bir kontrol ve 3 muamamele grubu olmak üzere 4 grupta tekerrür başına 30 balık olacak şekilde toplam

360 balıkla başlatılmıştır. Deney tanklarında 12L:12D ışık rejimi uygulanmıştır. Deneme süresi 30 gün olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.8 Deney tankları

3.2.1.1 Etik izin

Tüm deneyler Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2022-9-87 sayılı izni çerçevesinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.2 Gürültüye maruz bırakma protokolü

Deney akvaryumlarının üzerine konumlandırılan her bir hoparlör, tank dışına yerleştirilmiş bir amplifikatöre bağlanmış, giriş sinyalleri, bir voltaj ön yükselticisi ile 50 dB (çıkış kazancı) seviyesine yükseltilerek ses uyarıları bir bilgisayardan MP3 formatında yürütülerek tekerrürlere iletilmiştir. Üretilen her ses uyarını 24 saat boyunca tekrarlanmıştır. Deney öncesi işitsel uyarıların frekansı ve ses seviyesi, tank içerisindeki hidrofona ile donatılmış bir dijital osiloskop ile ölçülerek ve ses uyarılarında bozulma ve ses kayıtlarında parazit olup olmadığı kontrol edilmiştir. Zebra balıkları, 4 hafta süreyle 50 dB' lik (1 μ Pa RMS) ses seviyesinde (SPL) 100 Hz - 4000 Hz aralığında sürekli tonlara maruz bırakılmıştır. Kontrol grubu için White noise aynı süreler boyunca uygulanmıştır.

3.2.2.1 Doku örneklerinin hazırlanması

Deneme süresinin sonunda, balıklar daha küçük bir tanka alınıp burada yüksek dozda Eugenol ile ötenaziye tabi tutulmuştur. Ötenazi için 10 ml Eugenol (Sigma-Aldrich, %98) 10 mL etanol içinde karıştırılıp bu çözeltinin 10 mL' si saf su ile 1 L' ye tamamlanarak seyreltilmiştir. İmmersiyon süresince kas ve solungaç kapağı hareketleri izlenerek hareketsiz kalan balıklar tanktan çıkarılmış ve hızlı bir şekilde morfometrik ölçümleri alınarak dekapitasyon ile prosedür tamamlanmıştır. Gövdeden ayrılan balıkların kafaları sonraki aşamalarda gerçekleştirilecek analizler için soğuk RNAlater solüsyonunda saklanmıştır.

3.2.2.2 Hedef genlerin belirlenmesi

Ses uyarılarının etkilerini değerlendirmek için yapılacak gen ekspresyonu analizlerinde Glutamat, GABA, katekolaminler, serotonin nörotransmitter gruplarından zebra balıkları için tanımlanmış gen ve reseptörlerden uygun olanlar seçilmiş ve literatürdeki primer çiftleri ile eşlenerek ekspresyon analizlerinde kullanılmıştır (Çizelge 3.2). Kontrol için (housekeeping gene) β -actin kullanılmıştır.

Çizelge 3.2 Hedef genler ve primer setleri

Nörotransmitter	Gen Adı	Gen Sembolü	Primer Sekansı (5'-3')	Kayıt No
Serotonin	<i>tryptophan hydroxylase 2</i>	<i>tph2</i>	F:AAATACTGGGCTCGGAGAGG R:ATCCGATTAAAGGATGTCCTGC	NM_001310068
	<i>solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter) member 4a</i>	<i>slc6a4a</i>	F:CTCCCAACTGCACCCACTAC R:GATGAACCTGCAACACCTGC	NM_001039972
Dopamin	<i>dopamine beta-hydroxylase</i>	<i>dbh</i>	F:TGCTGAACTCGCTCTACGTC R:CACATGGGTATGGGGCTCTC	NM_001109694
	<i>solute carrier</i>	<i>slc6a3</i>	F:GCCTGGTTTTACGGAGTGGA	NM_131755

	<i>family 6 (neurotransmitter transporter), member 3</i>		R:GGAGGATTGAAGGTGGCGAA	
Glutamat	<i>glutamate decarboxylase 1b</i>	<i>gad67</i>	F: TTCCTCGGCTGGTGATATGG R: TCTTCATGCCAGTTTCCTCG	NM_194419
	<i>glutamic- oxaloacetic transaminase 1</i>	<i>got1</i>	F: CTGGTCTCAACCCTAAGCAGG R: AGTGACAGCCTCGTGAATGG	NM_213057
GABA	<i>solute carrier family 6(neurotransmitter transporter), member 1a</i>	<i>slc6a1a</i>	F: ATGTAGCTGCGTCAGGACCG R: CGTGGGAACTCATCCACCAG	NM_001045287
Housekeeping	<i>β-actin</i>		F: AGAGCTATGAGCTGCCTGACG R: CCGCAAGATTCCATACCCA	NM_007393

3.2.2.3 RNA izolasyonu

Beyin dokularının elde edilmesi için gruptaki tüm balıkların RNA later solüsyonunda saklanan kafaları ventral tarafı yukarı gelecek şekilde tutularak, beyni gözlere bağlayan optik sinirlerden oluşan bir yapı olan optik kiazmayı görene kadar yumuşak dokular alınmış ve ardından optik sinirler kesilerek gözler çıkarılmıştır. Ardından kafatası kemikleri açılarak beynin ventral tarafındaki kemik çıkarılmış ve beyin bütün olarak dışarı alınmıştır (Gupta ve Mullins 2010).

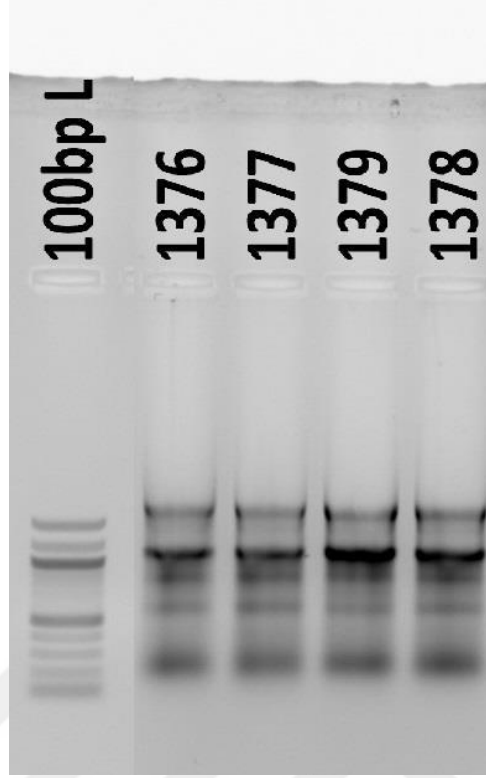
Koruyucu solüsyondan arındırılan balıkların beyin örnekleri 2 ml' lik tüp içerisinde homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örneklerden yaklaşık 500 ng alınarak üzerine 1 ml PureZOL eklenmiştir ve protokolün ilk aşamasından itibaren aşağıdaki işlem basamakları uygulanmıştır.

İşlem Basamakları;

- Örnekler 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- İnkübe edilen örnekler 2 ml' lik farklı tüplere aktarılmıştır.

- 200 µl kloroform kullanılarak ve 15 saniye yavaşça çalkalanmıştır.
- Oda sıcaklığında 5 dakika boyunca periyodik şekilde karıştırılarak inkübe edilmiştir.
- 12.000 x g 15 dakika 4°C' de santrifüjlenmiştir.
- Santrifüj işleminden sonra 3 faz gözlemlenmiş, en üstteki faz farklı bir RNase-free tüpe aktarılmıştır.
- Üst fazdan elde edilen RNA' nın içerisindeki kontaminasyonu engellemek için, orta beyaz fazla temas halinde bulunan ve RNA içeren üst faz kısmı geride bırakılmıştır.
- 500 µl isopropil alkol kullanılmıştır.
- Oda sıcaklığında 5 dakika düzenli olarak karıştırılarak inkübe edilmiştir.
- 12.000 g 10 dakika 4°C' de santrifüjlenmiştir.
- Örneğin süpernatant kısmı atılarak, tüpün alt kısmında beyaz bir pellet olarak görünen RNA kısmı bırakılmıştır.
- RNA peleti 1 ml ölçüde % 75 soğuk etanol ile yıkanmıştır.
- Örnekler yavaşça altüst edilerek, 7.500 g' de 5 dakika boyunca 4°C' de santrifüjlenmiştir.
- Süpernatant dikkatlice atılmıştır.
- 5 - 10 dakika boyunca RNA peletinin kuruması beklenmiştir.
- Elde edilen RNA peletine 100 µl RNase-free su eklenmiştir.

İzolasyon işlemi sonrasında RNA kalitesi, %10 etidyum bromid ile boyanmış %1' lik denatüre agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiş (Şekil 3.1) ve konsantrasyonu bir nanospektrofotometre ile ölçülmüştür (Çizelge 3.3).



Şekil 3.9 Agaroz jel görüntüsü

Çizelge 3.3 Nanospektrofotometre sonuçları

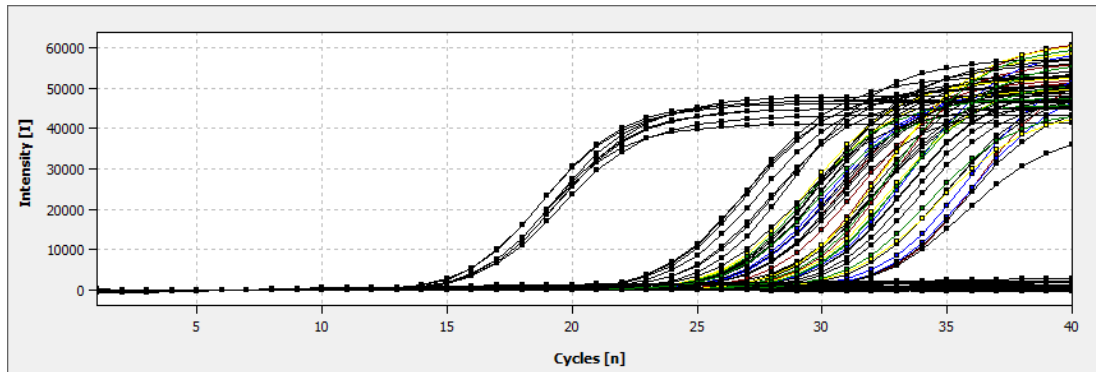
Örnek	RNA Konsantrasyonu	260 / 230 Oranı	260 / 280 Oranı
Tekne Gürültüsü (TS)	116,6	2,19	1,78
Pompa gürültüsü (PS)	111,14	1,26	1,83
Klasik Müzik (KS)	155,72	1,76	1,85
Beyaz Gürültü (BS)	138,23	1,96	1,82

3.2.2.4 Gen Ekspresyonları için RT-qPCR analizleri

Elde edilen RNA örneklerin *Vazyme HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit*' i kullanılarak ve üreticinin protokolü takip edilerek 20 µl RNase-free ddH₂O, 10 µl 2 x RT Mix, 2 µl HiScript II Enzyme Mix, 1 µl Oligo (dT) 23VN (50 µM), 1 µl Random hexamers (50 ng/µl) ve 1 pg - 5 µg Total RNA RNase-free santrifüj tüpünde pipetlenerek karıştırılıp 25°C - 5 dk, 50°C - 15 dk, 85°C - 2 dk döngü protokolünde cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen cDNA örnekleri ile iki tekrarlı olacak şekilde qPCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. qRT - PCR reaksiyonu, 5 µL 1 x Sybr Green Supermix (Biorad, ABD) ana karışımı, gene özgü primerler (0,3 µL F - 0,3 µL R) 3,4 µL saf su ve 1 µL cDNA ile son hacmi 10 µL olarak hazırlanmış ve qRT - PCR reaksiyonları: 95°C' de 30 sn Polimeraz Aktivasyonu ve DNA Denatürasyonu; 98°C' de 10 sn Denatürasyon ve 60 °C' de 20 sn Sentez ile 40 döngü şekline gerçekleştirilmiştir.

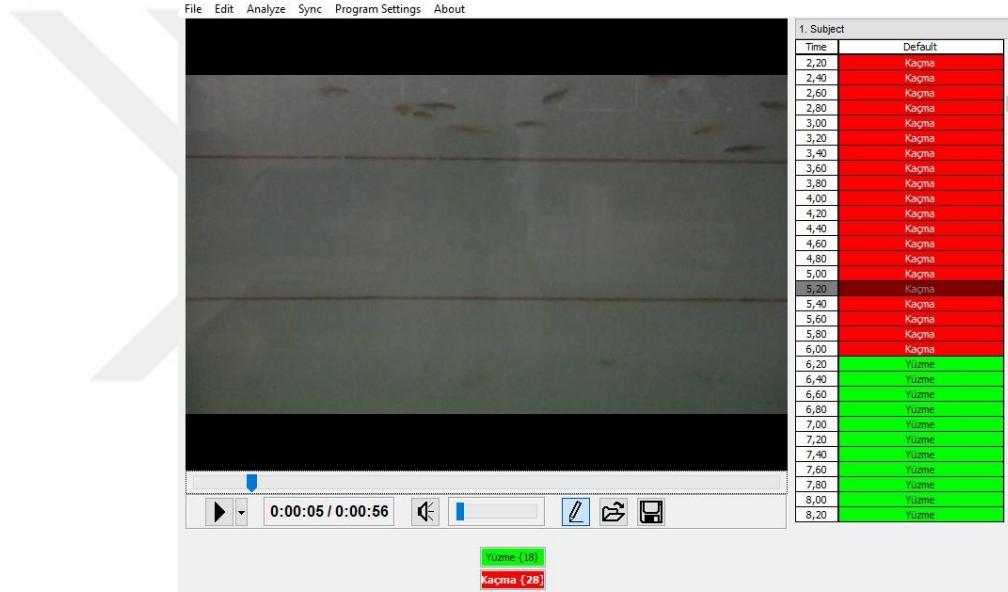
Genomik DNA' nın çıkarıldığını doğrulamak için RNA varlığı olmaksızın ters transkripsiyonun negatif kontrolleri yapılmıştır. Hedef genlerin her ifadesi, *rpl13a* ve ardından kontrole normalize edilmiş, primer çiftlerinin özgüllüğünü ve cDNA' nın kontamine olmadığını teyit etmek için qRT – PCR' nin bir ayrışma eğrisi ve negatif kontrolü de yapılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.10 qRT – PCR Amplifikasyon grafiği

3.2.2.5 Davranış analizi

Yüzme aktivitesi ve gen ekspresyonu arasındaki potansiyel ilişkiyi değerlendirmek için, bir kamera ile balıkların hareketleri kaydedilip yüzme ve pasif hareket için harcanan süreyi ölçmek için Solomon Coder yazılımıyla (v. 17.03.22; Budapeşte, Macaristan) video analizi yapılmıştır. Kaydın başlangıcında bir segmentle başlayarak, 1 saatlik videodaki davranış, yedi adet 1 dakikalık segment için her 9 dakikada bir örneklenmiştir. Derinlik için akvaryumda 30 cm su derinliği 10'ar cm'lik üç zona ayrılarak sırasıyla yüzey, orta ve dip olarak adlandırılmıştır.



Şekil 3.11 Solomon Coder yazılımıyla balıkların hareketleri

3.2.2.6 İstatistik değerlendirme

Transkripsiyon ve yüzme davranışının istatistiksel analizleri, IBM SPSS Statistics for Windows (v. 24.0. IBM Corp, Armonk, NY: IBM Corp.) kullanılarak yapılmış ve sonuçlar Adobe Illustrator ile grafiğe aktarılmıştır. Hedef gen ekspresyonunu (\log_2 -dönüştürülmüş kat değişimi) ve yüzme aktivitesini muamele grupları arasında karşılaştırmak için iki yönlü ANOVA uygulanarak ortalamalar arasındaki farklar Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak $p < 0,05$ güven aralığında değerlendirilmiştir (Kesici ve Kocabaş 2007).

4. BULGULAR

4.1 Büyüme Performansına İlişkin Bulgular

Deneme akvaryumlarında günlük olarak yapılan ölçümlerde 30 günlük deneme süresinde tekerrürlerdeki ortalama su sıcaklığı $24,1 \pm 0,5$ °C, çözülmüş oksijen miktarı $7,25 \pm 0,19$ mgL⁻¹ ve pH $8,14 \pm 0,1$ olarak ölçülmüştür. (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Deney gruplarında ölçülen su kalite değerleri

	Beyaz Gürültü (BS)			Pompa gürültüsü (PS)			Klasik Müzik (KS)			Tekne Gürültüsü (TS)		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Su sıcaklığı (°C)	7,80	7,30	7,10	7,20	7,30	7,10	7,10	7,10	7,30	7,30	7,10	7,30
Ç.O. (mgL ⁻¹)	23,30	23,40	24,00	24,20	24,80	24,30	25,10	24,80	24,00	24,00	24,30	24,10
pH	7,90	8,20	8,10	8,20	8,10	8,20	8,25	8,27	8,20	8,10	8,15	8,05

Deneylerde kullanılan balıkların ortalama başlangıç ve final ağırlıkları, ortalama ağırlık kazancı, spesifik büyüme oranı ve yaşama oranı Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2 Deney gruplarında büyüme performansı (Ortalama \pm SE) (N:90)

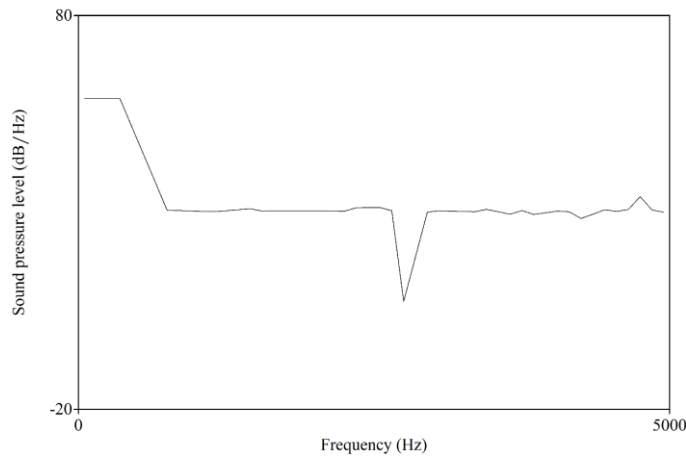
	Beyaz Gürültü (BS)	Pompa gürültüsü (PS)	Klasik Müzik (KS)	Tekne Gürültüsü (TS)
Ortalama Başlangıç Ağırlığı (g)	0,231 \pm 0,04	0,230 \pm 0,04	0,229 \pm 0,05	0,230 \pm 0,04
Ortalama Final Ağırlığı (g)	0,347 \pm 0,04 ^{b*}	0,324 \pm 0,05 ^c	0,373 \pm 0,05 ^a	0,338 \pm 0,03 ^{bc}
Ortalama Ağırlık Kazancı (g)	0,116 \pm 0,001 ^b	0,094 \pm 0,005 ^d	0,144 \pm 0,009 ^a	0,108 \pm 0,004 ^c
Spesifik Büyüme Oranı (% gün ⁻¹)	1,35 \pm 0,00 ^b	1,14 \pm 0,01 ^d	1,63 \pm 0,01 ^a	1,29 \pm 0,00 ^c
Yaşama Oranı (%)	100 \pm 0,00	100 \pm 0,00	100 \pm 0,00	100 \pm 0,00

* Satırlardaki farklı harfler istatistik farkın önemli olduğunu göstermektedir (p<0,05)

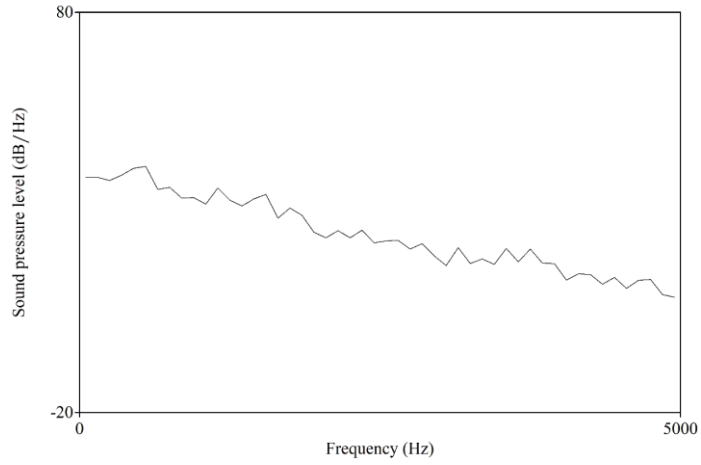
Balıkların elle *ad libitum* beslendiği otuz günlük deneme süresinde yaşama oranının tüm gruplarda %100 olarak gerçekleştiği tespit edilmiştir. En yüksek ortalama final ağırlığına ulaşan grup KS ($0,373 \pm 0,05$ g) olurken bunu sırasıyla BS ($0,347 \pm 0,04$ g), TS ($0,338 \pm 0,03$ g) ve PS ($0,324 \pm 0,05$ g) grupları izlemiştir ve gruplar arası fark önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). Ortalama ağırlık kazancı en yüksek KS grubunda gözlenirken, en düşük PS grubunda gözlenmiştir ve ortalamalar arası farklılık yine istatistik açıdan önemli bulunmuştur. Spesifik büyüme oranları da benzer şekilde ve istatistik açıdan farklı olarak aynı sırayla sonuçlanmıştır.

4.2 İşitsel Uyarılara İlişkin Bulgular

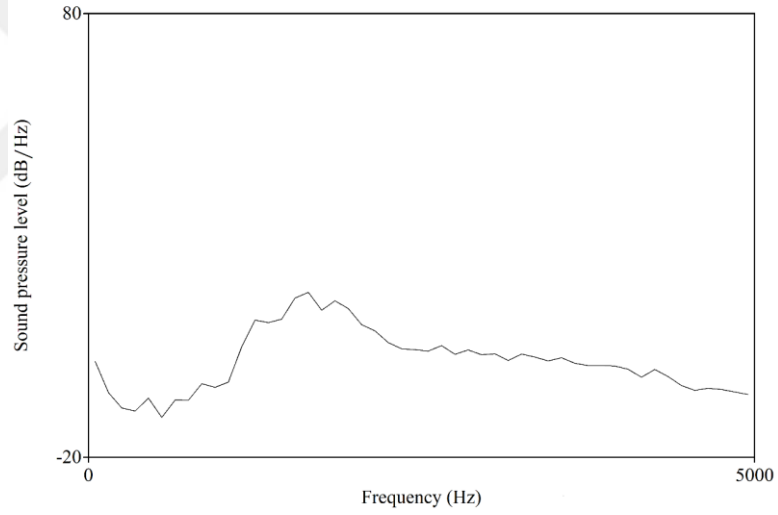
Deney akvaryumlarında hidrofona ile alınan ses kayıtları Audacity v3.3 programında analiz edilerek SPL ve odyogramları çizilmiştir (Şekil 4.1 – Şekil 4.5). Spektral yoğunluklar 100 - 400 Hz aralığında zirve yaparak 1200 Hz' in altında ana enerjiyi göstermiştir. Grafikler, hazırlanan dosyaların gürültüye maruz bırakma protokolünde hedeflenen aralıkta ve zebra balıklarının duyma limitlerine uygun olduğunu teyit etmiştir.



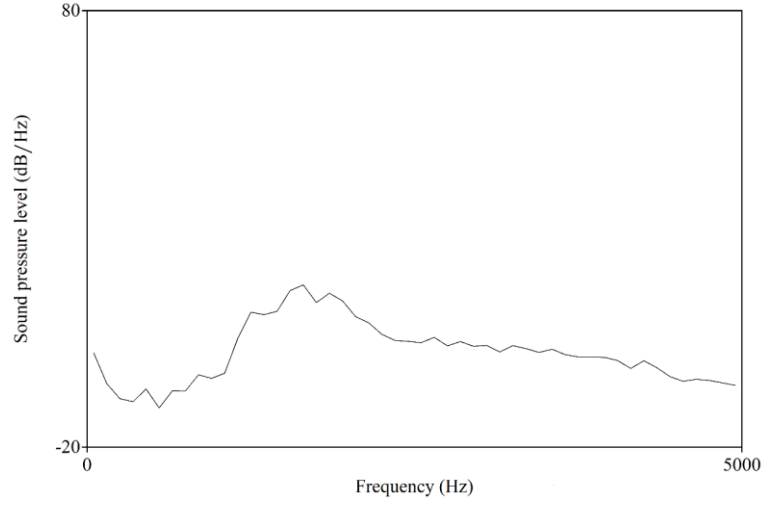
Şekil 4.1 Deney tankında kaydedilen Beyaz gürültü SPL (dB re 1 μ Pa cinsinden) güç spektral yoğunluğu (Spektrogram FFT uzunluğu: 256 Hz; bant genişliği: 10 Hz; Hamming penceresi)



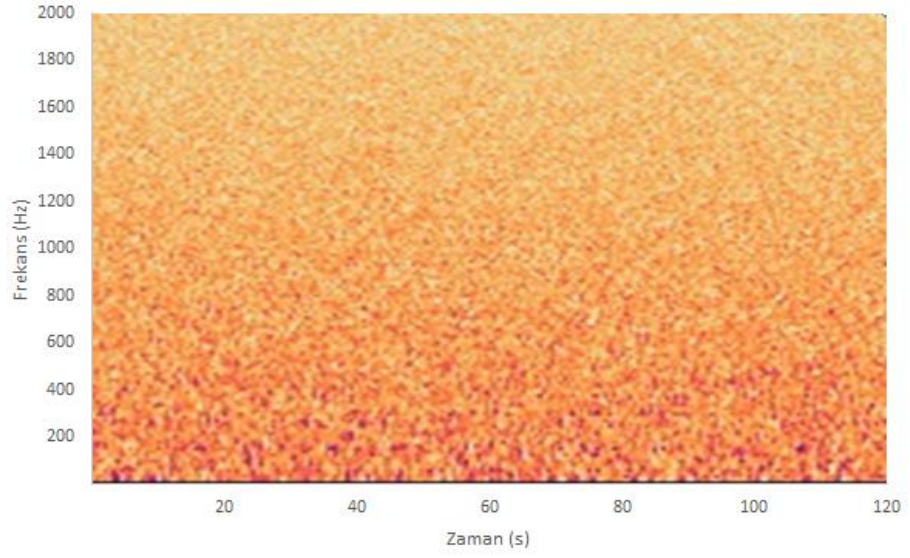
Şekil 4.2 Deney tankında kaydedilen Tekne gürültüsü SPL (dB re 1 μ Pa cinsinden) güç spektral yoğunluğu (Spektrogram FFT uzunluğu: 256 Hz; bant genişliği: 10 Hz; Hamming penceresi)



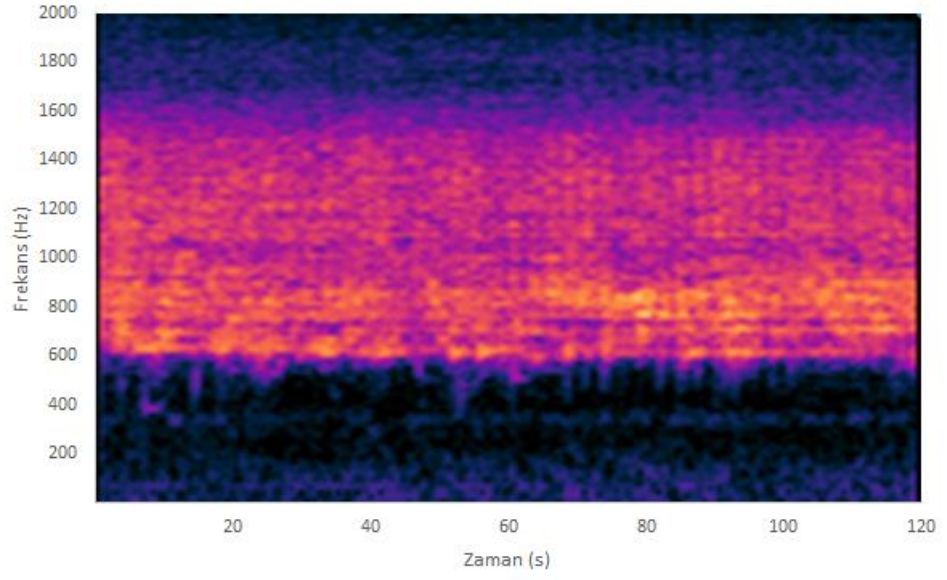
Şekil 4.3 Deney tankında kaydedilen Pompa gürültüsü SPL (dB re 1 μ Pa cinsinden) güç spektral yoğunluğu (Spektrogram FFT uzunluğu: 256 Hz; bant genişliği: 10 Hz; Hamming penceresi)



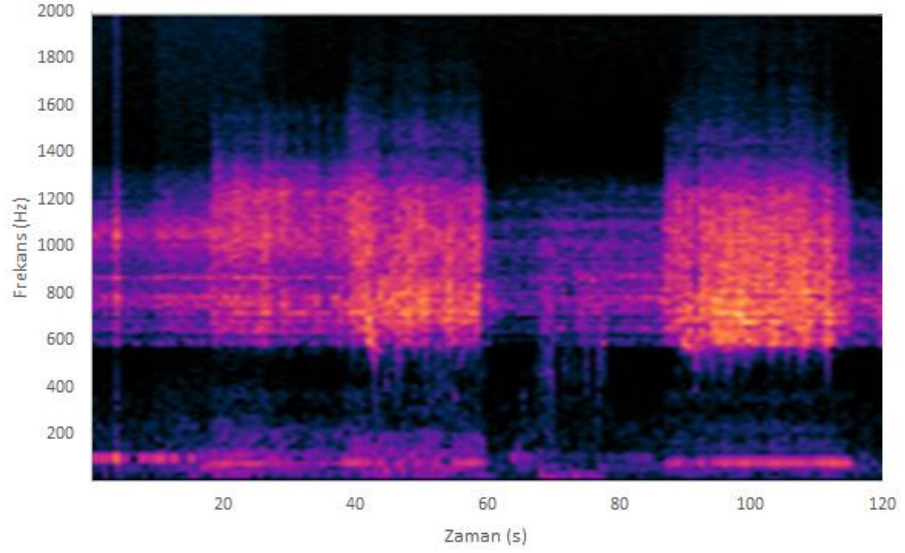
Şekil 4.4 Deney tankında kaydedilen Klasik Müzik SPL (dB re 1 μ Pa cinsinden) güç spektral yoğunluğu (Spektrogram FFT uzunluğu: 256 Hz; bant genişliği: 10 Hz; Hamming penceresi)



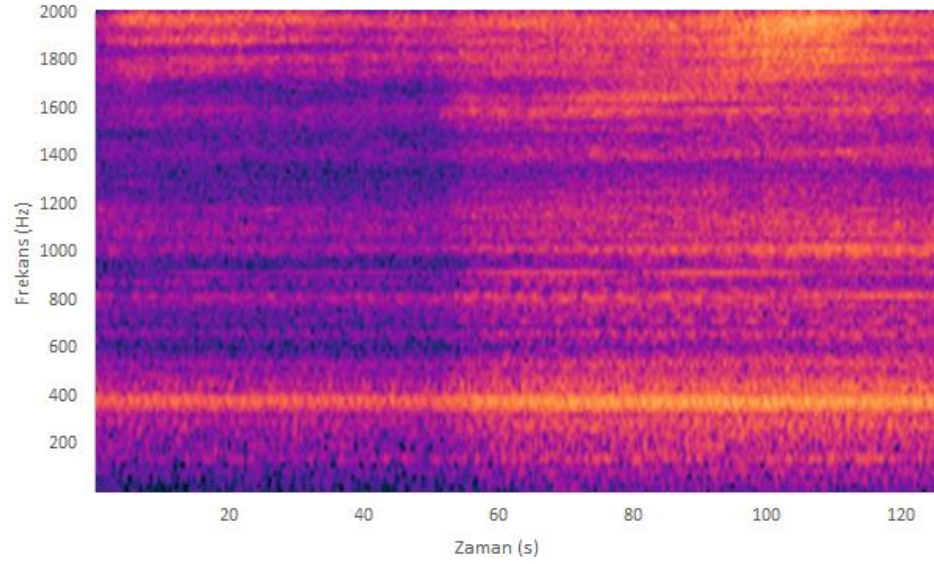
Şekil 4.5 Deney tankında kaydedilen beyaz gürültü spektrum analizi (Audacity v 3.3 ile oluşturulmuştur)



Şekil 4.6 Deney tankında kaydedilen klasik müzik spektrum analizi (Audacity v 3.3 ile oluşturulmuştur)



Şekil 4.7 Deney tankında kaydedilen tekne gürültüsü spektrum analizi (Audacity v 3.3 ile oluşturulmuştur)



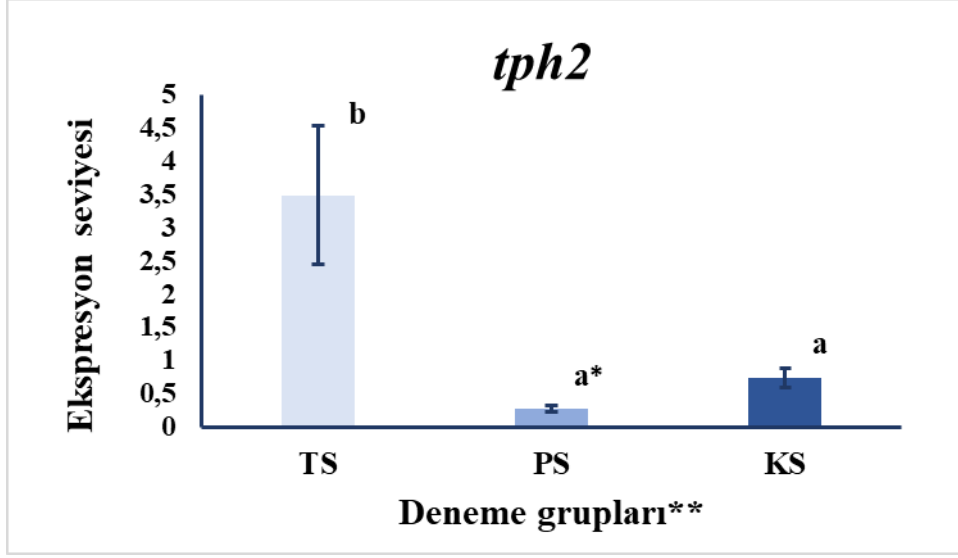
Şekil 4.8 Deney tankında kaydedilen pompa gürültüsü spektrum analizi (Audacity v 3.3 ile oluşturulmuştur)

4.3 Nörotransmitter Gen Gruplarına Ait Ekspresyon Bulguları

4.3.1 Serotonin nörotransmitterine ait bulgular

(5-hidroksitriptamin; 5-HT)

***tph2* (Tryptophan hydroxylase 2)** : Farklı ses tiplerine maruz bırakılan (TS, PS, KS) Zebra balıklarında qRT-PCR analizi sonucu *tph2* genine ait gen ifade düzeylerine ilişkin ortalama değerler (\pm Standart Hata) ve bunlara ait Duncan test sonuçları Şekil 4.9' da sunulmuştur.



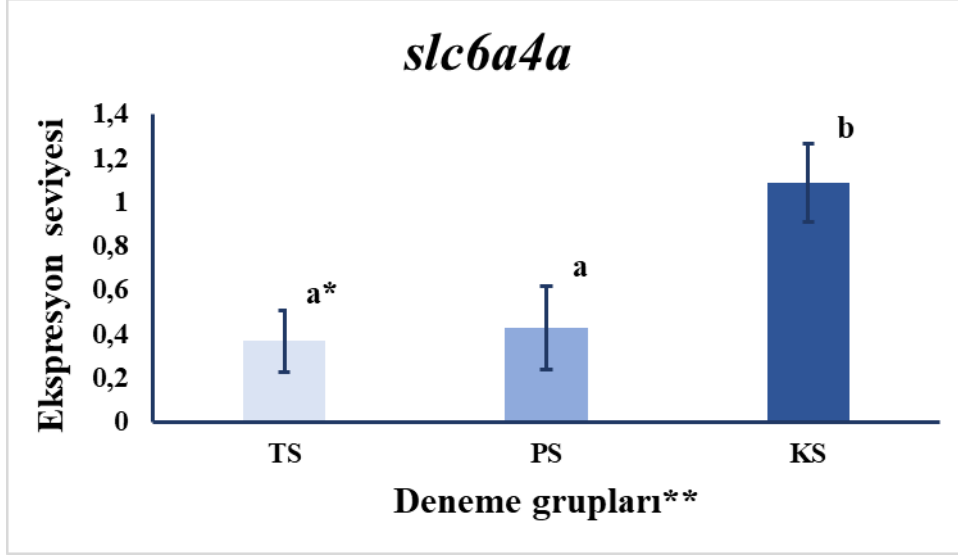
Şekil 4.9 Deneme gruplarında *tph2* genine ait ekspresyon seviyeleri (Ortalama ± Standart hata) (n=3)

* Grafikte farklı harfler istatistik olarak farkın önemli olduğunu göstermektedir (p<0,05).

** TS: Tekne gürültüsü; PS: Pompa gürültüsü; KS: Klasik müzik

Şekil 4.8 incelendiğinde, deneme gruplarında *tph2* ekspresyon seviyelerindeki farklılığın tek yönlü varyans analizi ile istatistik açıdan önemli olduğu belirlenmiştir (p<0,05). Gen ifade değerleri incelendiğinde, TS uygulamasına maruz bırakılan deneme balıklarında, diğer deneme grupları ile karşılaştırıldığında yaklaşık 3 kat düzeyinde up-regüle olmuş bir gen ifadesi saptanmıştır.

***slc6a4a* (SERT; solute carrier family 6):** Farklı ses tiplerine maruz bırakılan (TS, PS, KS) Zebra balıklarında qRT-PCR analizi sonucu *slc6a4a* genine ait gen ifade düzeylerine ilişkin ortalama değerler (\pm Standart Hata) ve bunlara ait Duncan test sonuçları Şekil 4.10' da sunulmuştur.



Şekil 4.10 Deneme gruplarında *slc6a4a* genine ait ekspresyon seviyeleri (Ortalama ± Standart hata) (n=3)

* Grafikte farklı harfler istatistik olarak farkın önemli olduğunu göstermektedir ($p < 0,05$).

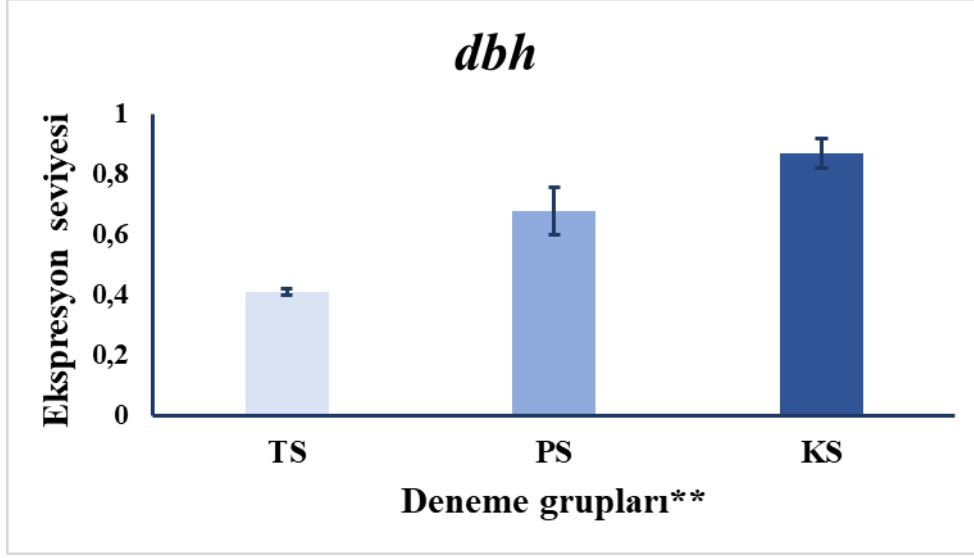
** TS: Tekne gürültüsü; PS: Pompa gürültüsü; KS: Klasik müzik

Şekil 4.10 incelendiğinde, deneme gruplarında *slc6a4a* ekspresyon seviyelerindeki farklılığın tek yönlü varyans analizi ile istatistik açıdan önemli olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). İncelenen gen bakımından KS grubunda saptanan değer; 1,09 ile diğer deneme gruplarına ait değerlerden oldukça yüksek olduğu ve gen ifadesi bağlamında bu uygulamada *slc6a4a* geninin daha fazla artış gösterdiği ifade edilebilir.

4.3.2 Dopamin nörotransmitterine ait bulgular

(DA, 3,4-dihidroksifeniletamin)

***dbh* (Dopamine Beta-Hydroxylase):** Farklı ses tiplerine maruz bırakılan (TS, PS, KS) Zebra balıklarında qRT-PCR analizi sonucu *dbh* genine ait gen ifade düzeylerine ilişkin ortalama değerler (\pm Standart Hata) ve bunlara ait Duncan test sonuçları Şekil 4.11 de sunulmuştur.



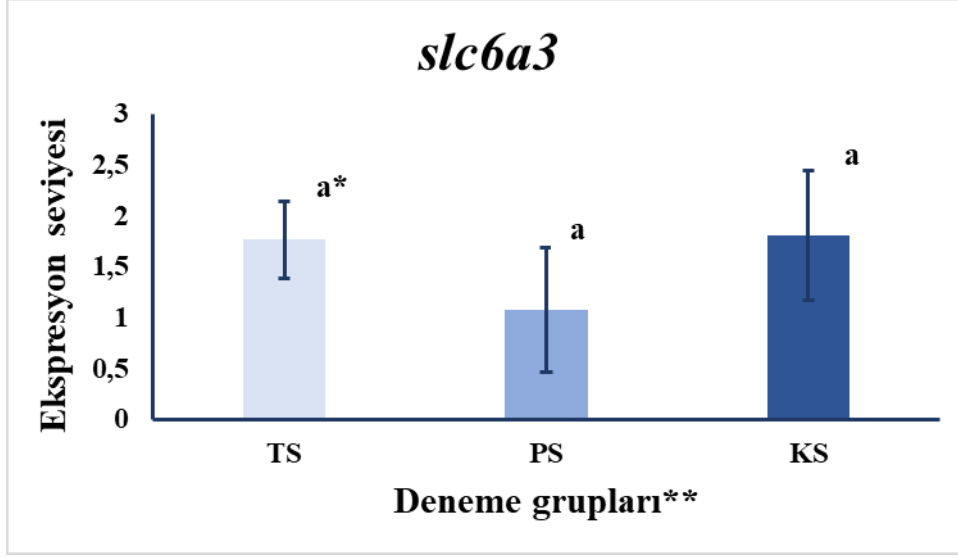
Şekil 4.11 Deneme gruplarında dbh genine ait ekspresyon seviyeleri (Ortalama ± Standart hata) (n=3)

* Grafikte farklı harfler istatistik olarak farkın önemli olduğunu göstermektedir ($p < 0,05$).

** TS: Tekne gürültüsü; PS: Pompa gürültüsü; KS: Klasik müzik

Şekil 4.11 incelendiğinde, deneme gruplarında dbh ekspresyon seviyelerindeki farklılığın tek yönlü varyans analizi ile istatistik açıdan önemli olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). En yüksek gen ifade değeri 0,87 ile KS grubunda belirlenmiştir. Bu değeri, PS ve TS deneme gruplarında sırası ile 0,68 ve 0,41 değeri izlemektedir. KS uygulamasının balıklarda dbh genini incelenen diğer iki uygulamaya (TS ve PS) göre daha yüksek düzeyde up-regüle ettiği saptanmıştır.

slc6a3 (dopamine transporter; DAT): Farklı ses tiplerine maruz bırakılan (TS, PS, KS) zebra balıklarında qRT-PCR analizi sonucu slc6a3 genine ait gen ifade düzeylerine ilişkin ortalama değerler (\pm Standart Hata) ve bunlara ait Duncan test sonuçları Şekil 4.12' de sunulmuştur.



Şekil 4.12 Deneme gruplarında *slc6a3* genine ait ekspresyon seviyeleri (Ortalama ± Standart hata) (n=3)

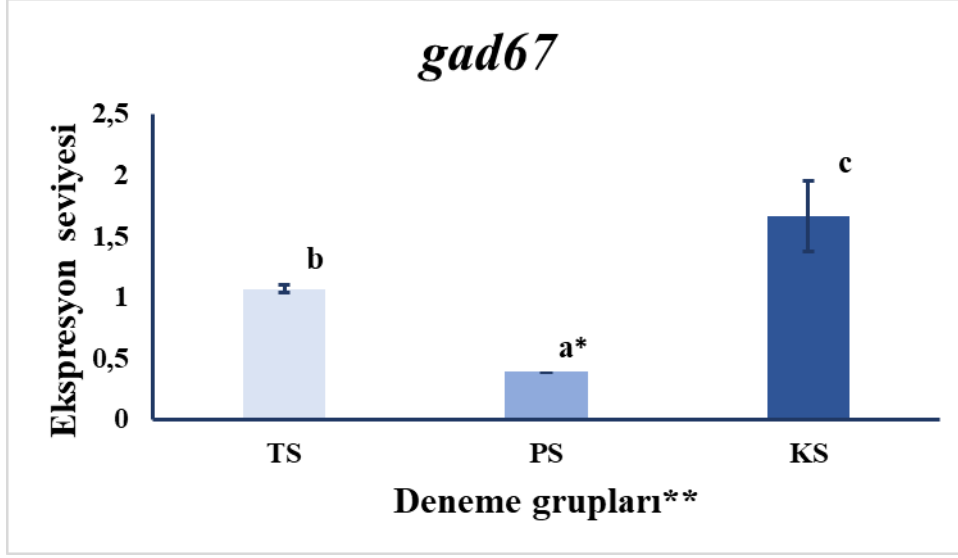
* Grafikte farklı harfler istatistik olarak farkın önemli olduğunu göstermektedir (p<0,05).

** TS: Tekne gürültüsü; PS: Pompa gürültüsü; KS: Klasik müzik

Şekil 4.12 incelendiğinde, deneme gruplarında *slc6a3* ekspresyon seviyelerindeki farklılığın tek yönlü varyans analizi ile istatistik açıdan önemli olmadığı belirlenmiştir (p>0,05). En düşük gen ifade değeri 1,08 ile PS grubunda saptanırken, en yüksek değer 1,77 ile TS grubuna aittir.

4.3.3 Glutamat nörotransmitterine ait bulgular

***gad67* (Glutamic acid decarboxylase):** Farklı ses tiplerine maruz bırakılan (TS, PS, KS) zebra balıklarında qRT-PCR analizi sonucu *gad67* genine ait gen ifade düzeylerine ilişkin ortalama değerler (± Standart Hata) ve bunlara ait Duncan test sonuçları Şekil 4.13'de sunulmuştur.



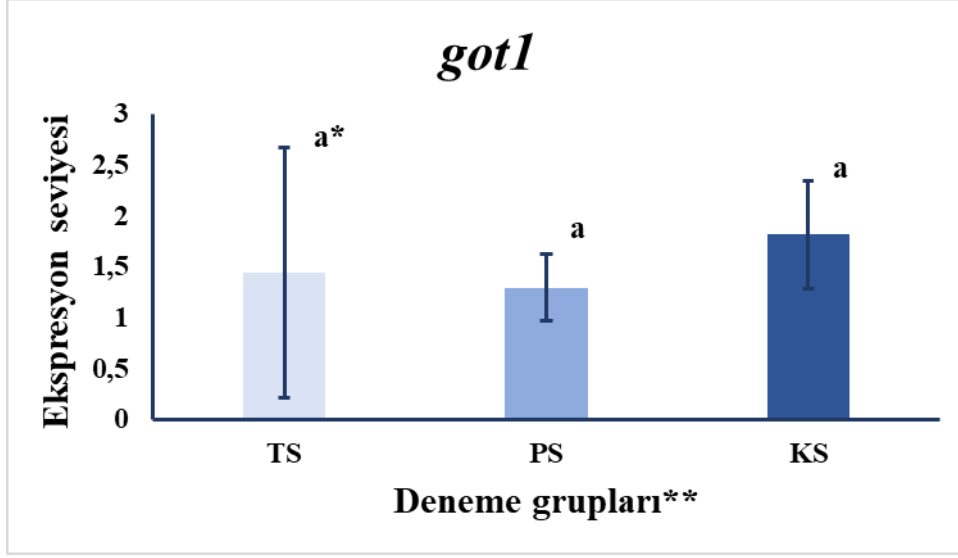
Şekil 4.13 Deneme gruplarında *gad67* genine ait ekspresyon seviyeleri (Ortalama ± Standart hata) (n=3)

* Grafikte farklı harfler istatistik olarak farkın önemli olduğunu göstermektedir (p<0,05).

** TS: Tekne gürültüsü; PS: Pompa gürültüsü; KS: Klasik müzik

Şekil 4.13 incelendiğinde, deneme gruplarında *gad67* ekspresyon seviyelerindeki farklılığın tek yönlü varyans analizi ile istatistik açıdan önemli olduğu belirlenmiştir (p<0,05). Deneme grupları karşılaştırıldığında, KS uygulamasının *gad67* genine ait gen ifade düzeylerini (1,67) önemli derecede up-regüle ettiği saptanmıştır.

***got1* (Glutamic-oxaloacetic transaminase):** Farklı ses tiplerine maruz bırakılan (TS, PS, KS) Zebra balıklarında qRT-PCR analizi sonucu *got1* genine ait gen ifade düzeylerine ilişkin ortalama değerler (\pm Standart Hata) ve bunlara ait Duncan test sonuçları Şekil 4.14' de sunulmuştur.



Şekil 4.14 Deneme gruplarında *got1* genine ait ekspresyon seviyeleri (Ortalama ± Standart hata) (n=3)

* Grafikte farklı harfler istatistik olarak farkın önemli olduğunu göstermektedir (p<0,05).

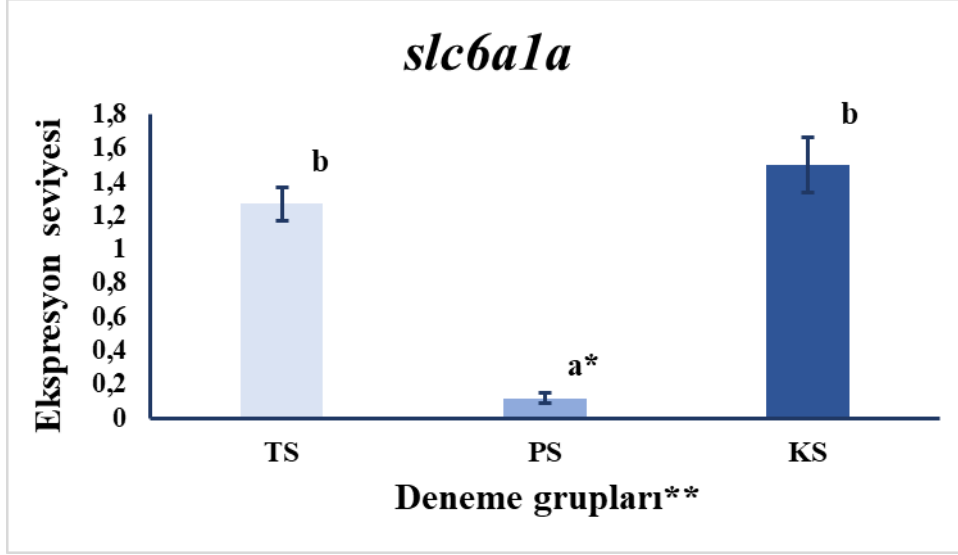
** TS: Tekne gürültüsü; PS: Pompa gürültüsü; KS: Klasik müzik

Şekil 4.14 incelendiğinde, deneme gruplarında *got1* ekspresyon seviyelerindeki farklılığın tek yönlü varyans analizi ile istatistik açıdan önemli olmadığı belirlenmiştir (p>0,05). *gad67* geninde de olduğu gibi karşılaştırılan deneme grupları arasında KS grubunda *got1* genine ait ifade değeri daha yüksek (1,82) bulunmuş, uygulamanın bu grupta *got1* geni bağlamında up-regüle bir gen ifadesi ortaya çıkardığı saptanmıştır.

4.3.4 GABA nörotransmitterine ait bulgular

(γ -aminobutirik asit)

***slc6a1a* (solute carrier family 6 member 1a):** Farklı ses tiplerine maruz bırakılan (TS, PS, KS) Zebra balıklarında qRT-PCR analizi sonucu *slc6a1a* genine ait gen ifade düzeylerine ilişkin ortalama değerler (\pm Standart Hata) ve bunlara ait Duncan test sonuçları Şekil 4.15’de sunulmuştur.



Şekil 4.15 Deneme gruplarında *slc6a1a* genine ait ekspresyon seviyeleri (Ortalama ± Standart hata) (n=3)

* Grafikte farklı harfler istatistik olarak farkın önemli olduğunu göstermektedir (p<0,05).

** TS: Tekne gürültüsü; PS: Pompa gürültüsü; KS: Klasik müzik

Şekil 4.15 incelendiğinde, deneme gruplarında *slc6a1a* ekspresyon seviyelerindeki farklılığın tek yönlü varyans analizi ile istatistik açıdan önemli olduğu belirlenmiştir (p<0,05). Değerlendirilen diğer bazı genlerde (*gad67* ve *got1*) görülen KS uygulamasındaki yüksek gen ifadesi trendi burada da benzer şekilde tekrarlanmış ve en yüksek *slc6a1a* genine ait ifade değeri 1,50 ile yine bu grupta saptanmıştır.

4.4 Davranış Analizine Ait Bulgular

Deneylelerdeki balıkların yüzme ve pasif hareket için harcadığı süre bakımından gruplar arasında istatistik olarak önemli farklılıklar bulunmuştur. Çizelge 4.3’de görüldüğü gibi beyaz gürültü verilen gruptaki balıkların tamamı, ses kaynağına yakın olan yüzey tabakada kalmaya devam ederken sırasıyla PS (%57,78), KS (%52,17) ve TS (%43,48) grupları yoğunluğu azalarak bunu izlemiştir. TS grubunun %54,35’ i orta su seviyesine inme eğilimi gösterirken KS ve PS grupları arasında bir fark görülmemiştir. Yalnızca TS grubunda balıkların %2,17’ sinin dip tabakaya kaçma hareketi sergilediği görülmüştür.

Çizelge 4.3 Deney tankındaki balıkların sesli uyarana karşı yüzey, orta ve dip derinliklerinde bulunma tepkileri

		BS	KS	TS	PS
Frekans	Yüzey**	45	24	20	26
	Orta	0	22	25	19
	Dip	0	0	1	0
Süre	Yüzey	9,2	4,8	4	5,2
	Orta	0	4,4	5	3,8
	Dip	0	0	0,2	0,2
Oran	Yüzey	100 ^a	52,17 ^{bc}	43,48 ^c	57,78 ^b
	Orta	0 ^{c*}	47,83 ^b	54,35 ^a	42,22 ^b
	Dip	0 ^b	0 ^b	2,17 ^a	0 ^b

*Satırlardaki farklı harfler istatistik farkın önemli olduğunu göstermektedir (p<0,05)

** Yüzey 0-10 cm; Orta 10-20 cm; Dip 20-30 cm

Sesli uyarıların başlamasıyla birlikte balıkların kaçma tepkileri reaksiyonel oranları ile Çizelge 4.4’de gösterilmiştir. BS ve KS gruplarındaki tüm bireyler normal yüzme tempolarını devam ettirirken TS grubunun %97,83’ ü, PS grubunun ise %60,87’ si kaçma davranışı sergilemiştir.

Çizelge 4.4 Deney tankındaki balıkların sesli uyarana karşı kaçma tepkileri

		BS	KS	TS	PS
Süre (sn)	Yüzme**	9,2	9,2	0,2	3,6
	Kaçma	0	0	9	5,6
Oran	Yüzme	100 ^a	100 ^a	2,17 ^c	39,13 ^b
	Kaçma	0 ^{c*}	0 ^c	97,83 ^c	60,87 ^b

*Satırlardaki farklı harfler istatistik farkın önemli olduğunu göstermektedir (p<0,05)

** Yüzey 0-10 cm; Orta 10-20 cm; Dip 20-30 cm

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Antropojenik sesler ve/veya gürültüler balık davranışlarında önemli değişikliklere neden olabilir. Çalışmalar, gürültü kirliliğine maruz kalmanın balıklarda stres tepkilerine yol açabileceğini, yüzme desenlerinde, beslenme alışkanlıklarında ve üreme davranışlarında değişikliklere neden olabileceğini göstermektedir. Bazı türler kaçınma davranışları sergileyebilmekte, ancak gürültülü alanlardan uzaklaşma davranışı, habitatların dağılmasına ve kritik göç yollarının etkilenmesine de yol açmaktadır. Ayrıca, yüksek yoğunluktaki gürültüye sürekli maruz kalmanın, balıklarda stres hormonlarının yükselmesiyle ilişkilendirildiği ve bağışıklık sistemlerini ve genel sağlıklarını tehlikeye attığı ortaya koyulmuştur. Bu fizyolojik sonuçlar, balık popülasyonlarını zayıflatabilmekte, onları hastalıklara ve diğer çevresel streslere daha duyarlı hale getirebilmektedir.

Zebra balıklarının bu çalışmadaki ses ve gürültülere karşı davranışsal tepkilerini incelemek üzere yapılan deneyde akvaryum vertikal olarak eşit derinlikte üç zona (yüzey, orta, dip) ayrılarak su yüzeyinden 15 cm yukarıda horizontal olarak tam ortaya yerleştirilen ses kaynağına göre konumları 9 dakikalık video segmentleri üzerinden değerlendirilmiştir. Balık tepkileri vertikal konumlanma ve ortadaki kaynaktan kenarlara doğru uzaklaşma şeklinde iki boyutta incelenmiştir. Gürültü uygulanmayan kontrol grubunda balıkların tamamı yüzey zonunda bulunurken normal yüzme davranışı (%100) sergilemiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında azalma sırasıyla; PS, KS, ve TS şeklinde olmuştur. Pompa gürültüsüne maruz kalan grupta balıkların %57,78' i yüzey zonunda kalırken %42,22' si orta zona inmiş, klasik müziğe maruz kalan grupta balıkların %52,17' si yüzey zonunda kalırken %47,83'ü orta zona inmiş, tekne gürültüsüne maruz kalan grupta ise balıkların %43,48' i yüzey zonunda kalırken %54,35' i orta zona, %2,17' si de dip zonuna inmiştir. Klasik müzik ve tekne gürültüsü dinletilen deney gruplarında sese maruz kalmanın aktive ettiği anksiyete ve stres davranışı profili olduğu görülmektedir.

Balıkların ses kaynağına göre horizontal dağılım gösterdiği ve tepki modeline göre kontrol ve klasik müzik gruplarındaki balıkların rutin yüzme hızlarını koruduğu, pompa

gürültüsüne maruz kalan balıkların %60,87' si, tekne gürültüsüne maruz kalan balıkların ise %97,83' ü ses uygulamasının başladığı ilk 9 dakikalık zaman diliminde merkezden tank kenarlarına doğru kaçma davranışı sergilediği görülmüştür.

Zebra balığı dahil olmak üzere diğer balıklarda ve deniz memelilerinde gürültünün davranışa etkileri hem doğal çevrede hem de laboratuvar simülasyonlarında araştırılmaktadır (Herbert-Read *vd.* 2017; Hanache *vd.* 2020; Pieniazek *vd.* 2020; Leduc *vd.* 2021). Ancak az sayıda çalışma, gürültünün balık davranışlarına etkisini incelerken zamansal modelleme üzerinde durmuştur.

Neo ve arkadaşlarının 2015 yılında deniz levreği (*Dicentrarchus labrax*) üzerine yaptığı bir çalışmada, kazık çakma gibi aralıklı gürültünün sürekli seslere göre daha etkili olabileceğini bildirmiştir.

Denememizde gözlediğimiz dibe inme eğiliminin, değişken tempoya sahip klasik müzik ve tekne gürültüsü uygulamalarında daha yüksek olması, gürültünün şiddeti ve süresi kadar zamansal düzeninin de stres oluşturma yönünde etkili olabileceğini literatürle benzer şekilde ortaya koymaktadır. Bulgularımız, değişken tempodaki gürültülerin irkilme ve daha yüksek strese bağlı olarak ses kaynağından uzaklaşma eğilimini artırdığını göstermiştir.

Zebra balığının nörotransmitter sistemi diğer omurgalılarla aynı yapıdadır. Her ne kadar proteinleri kodlayan genlerin sayısı ve isminde, memeliler ve zebra balığı arasında bazı dikkate değer farklılıklar bulunsa da genel olarak sentez ve metabolizma yolları ortaktır.

Serotonin (5HT) ve dopamin (DA) dahil olmak üzere monoaminlerin, beyindeki gürültü stresinin hem işitsel hem de işitsel olmayan etkilerine aracılık ettiği gösterilmiştir (Li *vd.*, 2019, Ravindran *vd.*, 2005, Samson *vd.*, 2006). Ortam gürültüsünün işitsel yolun ötesinde merkezi sinir sistemini de etkilediği bilinmektedir. Sub-kronik ve kronik gürültü stresi, sıçan beyninin çeşitli bölgelerinde 5HT ve DA' yı artırabilmektedir (Ravindran *vd.*, 2005, Samson *vd.*, 2006). Gürültü stresine maruz kalındığında, hipotalamusta 5HT seviyeleri yükselir ve bu da HPA eksenini aktivasyonuna katılabilir

(Heisler *vd.*, 2007). Ek olarak, diğerk beyin bölgelerindeki 5HT/DA değişimi, kemirgenlerde gürültüye bağlı anksiyete ve depresyon benzeri davranışların altında yatan neden olabilir. Çünkü bu davranışlar nörokimyasal olarak serotoninerjik aktivite ve dopaminerjik sistemlerle bağlantılıdır (Naqvi *vd.*, 2012). Balıklarla ilgili olarak, gürültü stresinin balıklarda işitme kaybına (Breitzler *vd.*, 2020, Smith *vd.*, 2004) ve anksiyete benzeri davranışlara (Neo *vd.*, 2015) neden olduğu gösterilmiş olsa da, serotonerjik veya dopaminerjik yolların katılımı iyi değerlendirilmemiştir. Bazı çalışmalarda ilginç bir şekilde, balıkların klasik müziğe maruz kalmasının işitsel zenginleştirmenin monoaminlerin beyin seviyesini etkileyebileceği ve stres tepkilerini azaltabileceği bildirilmiştir (Barcellos *vd.*, 2018, Papoutsoglou *vd.*, 2013). Yavru gökkuşaağı alabalıklarında, 14 hafta boyunca Mozart ile müzikal uyarılar daha iyi büyüme performansı ile sonuçlanmıştır. Dahası, Mozart grubundaki balıklar, beyaz gürültü ile muamele edilen balıklara kıyasla daha düşük dopaminle ilişkili aktiviteye (daha düşük anksiyete/stres göstergesi) sahiptir, bu da spesifik olmayan yeni akustik uyarandan ziyade müziğin balıkları rahatlatılabileceğini ve olumlu refahı teşvik edebileceğini göstermektedir (Papoutsoglou *vd.*, 2013).

Ayrıca gürültü stresi, omurgalıların beyinlerindeki aminoasit nörotransmitter seviyelerini de değiştirebilir (Kazi ve Oommen, 2014). Beyindeki aminoasit nörotransmitterlerinin seviyelerinin değişmesi, öğrenme ve hafıza gibi bilişsel yeteneklerin bozulmasıyla ilişkilidir (Cui *vd.*, 2009, Cui *vd.*, 2012).

Merkezi sinir sistemindeki birincil uyarıcı ve inhibitör nörotransmitterler sırasıyla Glutamat ve GABA' dır. Darbe gürültüsüne maruz kalmanın (en yüksek ses basıncı 165 dB ve süresi 100 ms olan 20 ses darbesi), maruziyetten sonraki 30 dakika içinde sıçan hipokampusünde glutamat seviyelerini ve NMDA reseptör (NMDAR) ekspresyonunu artırdığı ve yüksek seviyelerin en az 24 saat boyunca devam ettiği gösterilmiştir. Bu çalışmanın yazarları, yüksek glutamat seviyelerinin ve NMDAR ekspresyonunun, uyarıcı ve inhibe edici sinyaller arasında bir dengesizliğe neden olabileceğini ve zayıf uzamsal hafıza ile yansıtılan bilişsel işlevde geçici bir azalmaya yol açabileceğini öne sürmüştür (Cui *vd.*, 2012). Nörotransmitterlerin bozulan dengesi, kronik gürültüye bağlı bilişsel eksikliklere de aracılık edebilir. Kronik gürültüye maruz kaldıktan sonra, sıçan

hipokampusünde glutamat seviyelerinin önemli ölçüde artarken, GABA değerlerinin belirgin şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Aşırı uyarıcı glutamat ve inhibitör GABAerjik kontrolün zayıflamasının sinaps plastisitesini etkileyerek eksitotoksisteye ve uzamsal hafıza bozukluğuna yol açabildiği belirtilmiştir (Cui *vd.*, 2009). Kronik gürültü stresi, sıçan beyninin ayrı bölgelerindeki glutamaterjik ve GABAerjik nörotransmitter sistemlerini farklı şekillerde etkileyebilir (Kazi ve Oommen, 2014) ve farklı nörolojik ve davranışsal bozukluklar olarak ortaya çıkabilir.

Bhandiwad ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptığı bir çalışmada, zebra balığı larvalarının yüksek sese aşırı maruz kalmasının akustik irkilme tepkisine karşı aşırı duyarlı hale getirdiğini ispatlamıştır. Ayrıca, bu aşırı duyarlı duruma AMPA reseptörünün aracılık etmesi, diğer omurgalılara benzer şekilde balıklarda da ortam gürültüsüne yanıt olarak glutamaterjik yolların önemini göstermektedir. Bununla birlikte, gürültüye maruz kalmanın teleostların beyinlerindeki uyarıcı veya engelleyici nörotransmitter seviyelerini nasıl ve ne ölçüde düzenleyebileceğini açıklamak için daha fazla kanıtı ihtiyaç bulunmaktadır.

Nörotransmitter serotonin (5-hidroksitriptamin; 5-HT), bir hidroksil grubu ve bir amin grubu bulunan indol çekirdeğine sahip biyolojik bir amin olup beyin gelişimi, iştah, motor fonksiyon, uyarılma ve ruh hali, nöroendokrin fonksiyon, sirkadiyen ritimler ve depresyon ile ilişkilendirilmektedir (Horzmann ve Freeman 2016). Triptofanı 5-hidroksitriptofana (5-HTP) dönüştüren triptofan hidroksilaz (L-triptofan-5-monooksijenaz; TPH) memelilerde iki genle kodlanır. Bunlardan *tph2* yalnızca beyinde eksprese edilmektedir ve serotonerjik nöronlar için bir belirteç olarak kullanılabilir. Serotonin taşıyıcısı *slc6a4* (SERT), 5-HT' nin alımından sorumlu olup, zebra balığındaki paralogu *slc6a4a*' dir.

Gökkuşuğu alabalığında akut stres etkenine maruz kaldıktan sonra ön beyindeki serotonerjik ve dopaminerjik aktivitelerin tepkisinin kısa ve orta vadeli seyrini araştıran çalışmada hem hipotalamusta hem de telensefalonda serotonerjik aktivitenin hızla arttığı bildirilmiştir (Gesto *vd.* 2013). Benzer şekilde, yemlere katılan farklı konsantrasyonlarda selenometiyone maruz kalmanın yırtıcı hayvanlardan kaçınma, sürü

davranışı ve sosyal grup tercihleri üzerindeki etkilerini araştıran bilim insanları, zebra balığı beyinde, serotonin reseptörlerinin (*htr1aa* ve *htr1b*), bir taşıyıcının (*slc6a4a*) ve triptofan hidroksilaz-2' nin (*tph2*) mRNA ekspresyonunda önemli seviyede yukarı regülasyon olduğunu ifade etmiştir (Attaran ve arkadaşları 2019).

Omurgalılarda serotonerjik nöronların depolarizasyonu, sinir terminallerindeki nörotransmitteri yenilemek için artan 5HT senteziyle ilişkili olup sınırlayıcı enzim olan TPH' nin aktivasyonuna bağlıdır. Chivite ve arkadaşları 2023 yılında gökkuşağı alabalığında, beyin serotonerjik aktivitesinde gerçekleşen periprandial değişikliklerin yem alımıyla ilişkisini irdelemiş ve yem alımından sonra *tph2* mRNA seviyelerinin azaldığını, ancak bu enzimin diensefalondaki ekspresyon seviyelerinin çok düşük olması sebebiyle serotonerjik işlevselliğe katkısının sınırlı olduğunu belirtmiştir. Bu bulgular yem alımı sonrası açlık stresinde gerçekleşen azalmayı işaret etmektedir.

Bizim gerçekleştirdiğimiz çalışmanın deneme gruplarında ise, *tph2* ekspresyon seviyelerinde belirlenen farklılıkların istatistik açıdan önemli olduğu belirlenmiş ($p < 0,05$), gen ifade değerleri incelendiğinde, tekne gürültüsüne maruz bırakılan balıklarda, diğer deneme grupları ile karşılaştırıldığında yaklaşık 3 kat fazla bir gen ifadesi saptanmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar serotonerjik nöronlar için belirteç olan *tph2* ekspresyon seviyelerindeki artışın deneydeki balıkların klasik müzik ve pompa sesine karşı tepkisiz kalırken tekne gürültüsüne karşı hızlı stres tepkisini yansıttığını ortaya koymaktadır. Pompa sesi ve klasik müzik uyarılarından farklı olarak tekne gürültüsünün frekans ve modülasyon bakımından farklı olmasının bu tepkiye yol açtığı düşünülmektedir.

5-HT reseptörlerindeki artış, serotonin sentezi (*tph2*) ve taşınmasında (*slc6a4a*) yer alan genlerin artışına paraleldir ancak beklenenin aksine deney gruplarımızda serotonin taşıyıcısı *slc6a4a* geninin klasik müzik uygulanan grupta daha fazla artış gösterdiği, tekne ve pompa gürültüsüne maruz kalan gruplarda ise düşük kaldığı görülmüştür. Serotonin taşıyıcısı *slc6a4a* (SERT), 5-HT' nin alımından sorumlu olup, gürültüye maruz kalmanın mRNA ifadesini azaltarak ve intrasinaptik serotonin konsantrasyonlarını artırarak serotonerjik sinyalleme bozulmasına yol açmış

olabileceği düşünülmektedir. Balık türü, stres kaynağı ve deney koşulları gibi farklılıkların da bu zıtlıkları açıklamada göz önüne alınması gerekmektedir.

Dopamin, hareket, ödül, hafıza gibi reaksiyonlarla ilişkilendirilen başlıca katekolamin modülatör nörotransmitterlerinden biri olup, bir etilamin yan zinciri ve bir amin grubu olan bir katekol grubu ile karakterizedir. Dopamini epinefrine dönüştüren enzim olan *dbh* yalnızca zebra balığının arka beyinde bulunmakta (Ma, 1997) ve dopamin taşıyıcısı (DAT) *slc6a3* genidir.

Deneme gruplarında *dbh* ekspresyon seviyelerine ait ortalamalar arasındaki farklılıkların istatistik açısından önemli olduğu, klasik müzik uygulamasının balıklarda *dbh* genini incelenen diğer iki uygulamaya (tekne gürültüsü ve pompa gürültüsü) göre daha yüksek düzeyde artış gösterdiği saptanırken, *slc6a3* ekspresyon seviyelerine ait ortalama değerler arasında gözlenen farklılıkların istatistik olarak önemsiz olduğu belirlenmiştir. Sentetik fenolik antioksidanlara maruz bırakılan zebra balığı larvalarında D1 benzeri reseptör (*drd1*) ekspresyonu artarken, D2 benzeri reseptörler (*drd2b* ve *drd2c*) ve *th1* azalmış ve bu durum hücre içi dopamin azalması ve sinaptik dopamin (DA) artışı, larvaların hiperaktivitesi ve hareket kabiliyetinin azalması gibi ilişkilerle açıklanmıştır (Shi vd., 2022). Randall ve Taylor (1991), epinefrinin balıklarda solunum ve oksijen ihtiyacıyla ilişkili olabileceğini paylaşmıştır. Hipoksemiye bağlı olarak artan epinefrin ihtiyacı için artan dopamin salınımına benzer olarak klasik müziğin rahatlatıcı etkisiyle dopamini epinefrine dönüştüren *dbh* geninin ekspresyon seviyesinin yükselmiş olması elde ettiğimiz sonuçları desteklemektedir. *slc6a3* ekspresyon seviyelerinde farklılık olmaması, DAT seviyelerinin dopamin sentez miktarından bağımsız olduğunu ortaya koymaktadır.

Merkezi sinir sisteminde sırasıyla birincil uyarıcı ve inhibitör nörotransmitterler Glutamat ve GABA' dır. Teleost beyindeki en yaygın nörotransmitter olan Glutamat, öğrenme ve hafıza gibi işlevlerde uyarıcı nörotransmitterdir ve sinaptik plastisite ile ilişkili olarak da nöral impulsları modüle edicidir (Zhou ve Danbolt, 2014). Beyindeki glutamatın çoğu, TCA döngüsünün bir ara ürünü olan alfa-ketoglutarattan üretilir. Bu dönüşüm tipik olarak glutamik-oksaloasetik transaminaz 1 (*got1*) geni tarafından

kodlanan aspartat aminotransferaz tarafından gerçekleştirilir ve zebra balığında bu genin ortologu *got1*' dir. GABA, merkezi sinir sisteminde epilepsi, depresyon, şizofreni ve uyku işlev bozukluğu ile ilişkilendirilen ana inhibitör nörotransmitter olup zebra balığında *slc6a1a* ve *gad67* genleri ile kodlanır.

Önceki çalışmalar, akut ve kronik gürültü stresinin beyinde glutamat, asetilkolin ve gama-aminobütirik asit (GABA) gibi nörotransmitterlerin salınmasına neden olduğunu ortaya koymuştur. Zhang ve arkadaşlarına (2022) göre gürültüye maruz bırakılan sarı korvina (*Larimichthys polyactis*) türünde hem *grid2* hem de *loc104931322* genleri önemli ölçüde azaltmıştır. Bu durum glutamat ve GABA iletiminin gürültü stresi ile değiştiğini göstermektedir. Ayrıca sinaptik iletim verimliliği azalmış ve bu azalma sinaptik işlev bozukluğuna yol açmıştır. Bhandiwad ve arkadaşları (2018) yüksek gürültüye aşırı maruz kalmanın zebra balığı larvalarını akustik irkilme tepkisine karşı aşırı duyarlı hale getirdiğini bulmuştur. Ayrıca, bu aşırı duyarlı duruma AMPA reseptörünün aracılık etmesi, diğer omurgalılara benzer şekilde balıklarda da ortam gürültüsüne yanıt olarak glutamaterjik yolların önemini göstermektedir. Ghobeishavi'nin 2023 yılındaki tez çalışmasında, gürültüye maruz bırakılan balıkların kontrol grubuna kıyasla daha düşük hareket kabiliyetine sahip olduğunu ve yüksek düzensiz gürültüye maruz kalan zebra balıklarının beyinde GABA seviyelerinin önemli ölçüde arttığını belirtmiştir. MPTP ile muamele edilip katekolamini tükenmiş japon balığında katekolaminerjik girdinin optik tektum ve telensefalondaki *gad67* modülasyonu yoluyla GABA sentez oranları üzerinde inhibitör etkiler gösterdiği ortaya koyulmuştur (Hibbert *vd.*, 2004). Tributyltin pestisidinin balık anksiyetesi üzerindeki etkisi ve muhtemel mekanizmalarını araştırmak üzere, yetişkin erkek zebra balığı (*Danio rerio*) üzerinde 28 gün boyunca 100 ve 500 ng/L TBT ile muamele edilmiş ve serotonin (5-HT) (*pet1*, *thp2* ve *htr1aa*), dopamin (DA) (*th1*, *slc6a3*, *drd2a* ve *drd2b*) ve gama-aminobütirik asit (GABA) (*gad2* ve *gabrg2*) sentezi ve etkisinden sorumlu genlerin ifadelerinin tümünün önemli ölçüde engellendiği tespit edilmiştir. TBT' ye yanıt olarak 5-HT, DA ve GABA nörotransmitter sistemlerinde etkili olan bu önemli genlerin azalması, balıklarda TBT ile artan anksiyete ile örtüşmektedir (Tu *vd.*, 2020). Elde edilen sonuçlar, glutamat sentezinden sorumlu *got1* geninin ekspresyon seviyelerinin istatistik açıdan farklı olmasa da tekne gürültüsü ve pompa gürültüsüne maruz kalan gruplarda düştüğünü

göstermektedir. GABA kodlayıcısı *gad67* ekspresyon seviyeleri gürültü ile muamele edilen gruplarda, KS dinletilen gruba göre istatistik olarak önemli derecede azalmış, benzer şekilde diğer bazı genlerde (*gad67* ve *got1*) görülen KS uygulamasındaki yüksek gen ifadesi trendi burada da tekrarlanmıştır. Denemelerde ulaşılan ekspresyon seviyelerinin ortaya koyduğu bu baskılanma, diğer çalışmalarla uyumlu olarak anksiyete davranışının gürültü ile tetiklendiğini ortaya koymaktadır.

Jiang ve arkadaşlarının 2024 yılında, sarı korvina (*Larimichthys polyactis*) embriyo ve larvalarında arka plan gürültüsü altında işitsel sistemin gelişim sürecini ortaya çıkarmak için metabonomik ve transkriptomik analizleri kullanarak yaptıkları çalışmada, işitsel sistemle ilişkili 37'si işitme sistemiyle alakalı 4026 diferansiyel olarak ifade edilen gen (DEG) ve 672 diferansiyel metabolit (DM) belirlemiştir. Bu da balıklarda sesin etkilerine yönelik ne kadar geniş bir alanda çalışılması gerektiğini göstermektedir.

Literatür araştırmasında da görüldüğü üzere nörotransmitter sistemin tepkilerine dair araştırmalar ağırlıklı olarak toksik ajanları kapsamaktadır. Bunun nedeni ses ve/veya gürültü kaynaklarının bir stres kaynağı mı yoksa çevresel etken olarak mı ele alınması gerektiğinin bile henüz netleşmemiş olmasıdır. Balıkların yaşama ortamı bakımından büyük bir plastisite varlığının olması, araştırmaların kurgulanmasından ziyade sonuçların yorumlanmasını zorlaştırmaktadır. Tek bir nörotransmitter ile ilişkili kodlayıcı ve taşıyıcı genlerin ekspresyon seviyeleri farklı uyaranlar karşısında ve farklı ortam koşullarında zıt tepkiler verebilir. Yine de literatürde paylaşılan bulgular ve bu çalışmada elde ettiğimiz veriler çerçevesinde farklı ortam seslerinin zebra balığı beyinde nörotransmitter genlerin ekspresyon seviyelerini etkileyebildiğini ve genlerin ifadesindeki değişikliklerin, kodladıkları protein seviyelerindeki değişikliklere nasıl yansıdığını henüz net olmasa da bu tür uyaranların balıklar üzerindeki çok yönlü etkilerini değerlendirmede kullanılabilir olduğunu ortaya koymuştur.

Bugün gelinen noktada, kronik gürültünün balıklar üzerindeki fizyolojik etkisi halen çok sayıda bilinmeyen olan ve gelişmekte olan bir araştırma konusudur. Bununla birlikte, giderek büyüyen veri kümesi, balıklar üzerinde yapılan in-vivo çalışmaların antropojenik seslerin akuatik faunadaki kronik ve akut etkilerinin daha iyi anlaşılmasına

olanak sağlamaktadır. Genel bir yaklaşım olarak antropojenik gürültü, su canlıları için stres kaynağı olarak nitelendirilse de, laboratuvar çalışmalarında elde edilen verilerin doğal popülasyonlar için yorumlanması sırasında türe özgü plastisitenin göz ardı edilmemesi önemlidir. Ayrıca sesli uyarılar simüle edilirken frekans modülasyonu, tempo, süre gibi zamansal modelleme ve maruziyet süresinin doğru ayarlanması gerekmektedir. Balıklarda nörotransmitter sistemle ilişkili genlerin ve kodladıkları proteinlerin çeşitliliği ve antropojenik seslere maruziyetin doğal popülasyonlar ve akuakültür koşullarındaki dinamikliği düşünüldüğünde çeşitli ses kaynaklarının su canlılarında ortaya çıkarabileceği işitme, stres, büyüme, üreme, davranış gibi mekanizmalara etkilerini daha iyi anlamamızı sağlayacak kapsamlı ve çok yönlü araştırmalara ihtiyaç olduğu açıktır. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, gen ifadelerinin nörotransmitter sistemin işleyişi ve biyolojik tepkiler üzerindeki yönlendirme etkisini anlamada kullanışlı ve önemli belirteçler olduğu kanaatini desteklemektedir. Benzer çalışmaların yaygınlaşması ve desteklenmesi, bu mekanizma ve süreçlerin detaylı ve doğru şekilde değerlendirilebilmesi ve verilerin isabetli şekilde yorumlanması için önemlidir.

KAYNAKLAR

- Attaran, A., Salahinejad, A., Crane, A. L., Niyogi, S., & Chivers, D. P. (2019). Chronic exposure to dietary selenomethionine dysregulates the genes involved in serotonergic neurotransmission and alters social and antipredator behaviours in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental pollution*, 246, 837-844.
- Barcellos, H. H., Koakoski, G., Chaulet, F., Kirsten, K. S., Kreutz, L. C., Kalueff, A. V., & Barcellos, L. J. (2018). The effects of auditory enrichment on zebrafish behavior and physiology. *PeerJ*, 6, e5162.
- Bhandiwad, A. A., Raible, D. W., Rubel, E. W., & Sisneros, J. A. (2018). Noise-induced hypersensitization of the acoustic startle response in larval zebrafish. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 19, 741-752.
- Breitzler, L., Lau, I. H., Fonseca, P. J., & Vasconcelos, R. O. (2020). Noise-induced hearing loss in zebrafish: investigating structural and functional inner ear damage and recovery. *Hearing research*, 391, 107952.
- Catli, T., Yildirim, O., Turker, A. 2015. "The Effect of Different Tempos of Music During Feeding, on Growth Performance, Chemical Body Composition, and Feed Utilization of Turbot (*Psetta maeotica*, Pallas 1814)", *Israel J. Aquac. – Bamidgeh*, 67.
- Cervi, A.L., Poling, K.R., Higgs, D.M., 2012. Behavioural measure of frequency detection and discrimination in the zebrafish, *Danio rerio*. *Zebrafish* 9, 1-7.
- Cheng, R. K., Jesuthasan, S. J., & Penney, T. B. (2014). Zebrafish forebrain and temporal conditioning. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1637), 20120462.
- Chivite, M., Ceinos, R. M., Cerdá-Reverter, J. M., Soengas, J. L., Aldegunde, M., López-Patiño, M. A., & Míguez, J. M. (2023). Unraveling the periprandial changes in brain serotonergic activity and its correlation with food intake-related neuropeptides in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 1241019.
- Codarin, A., Wysocki, L. E., Ladich, F., & Picciulin, M. (2009). Effects of ambient and boat noise on hearing and communication in three fish species living in a marine protected area (Miramare, Italy). *Marine Pollution Bulletin*, 58(12), 1880-1887.
- Coombs, S. and Montgomery, J.C. (1999). The Enigmatic Lateral Line System. In: Fay, R.R. and Popper, A.N. (eds.). *Comparative Hearing: Fish and Amphibians*, 319-362.
- Cransac, H., Cottet-Emard, J. M., Hellström, S., & Peyrin, L. (1998). Specific sound-induced noradrenergic and serotonergic activation in central auditory structures. *Hearing Research*, 118(1-2), 151-156.
- Cui, B., Wu, M., & She, X. (2009). Effects of chronic noise exposure on spatial learning and memory of rats in relation to neurotransmitters and NMDAR2B alteration in the hippocampus. *Journal of Occupational Health*, 51(2), 152-158.

- Cui, B., Wu, M., She, X., & Liu, H. (2012). Impulse noise exposure in rats causes cognitive deficits and changes in hippocampal neurotransmitter signaling and tau phosphorylation. *Brain Research*, 1427, 35-43.
- Davidson, J., Bebak, J., Mazik, P. 2009. "The Effects of Aquaculture Production Noise on The Growth, Condition Factor, Feed Conversion, and Survival of Rainbow Trout, (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792)", *Aquaculture*, 288, 337–343.
- Enger, P.S., Kalmijn, A.D. and Sand, O. (1989). Behavioural investigations on the function of the lateral line and inner ear in predation. In: Coombs, S., Görner, P. and Münz, H. (eds.) *The mechanosensory lateral line*. Springer-Verlag, New York, 375-387.
- Gesto, M., López-Patiño, M. A., Hernández, J., Soengas, J. L., & Míguez, J. M. (2013). The response of brain serotonergic and dopaminergic systems to an acute stressor in rainbow trout: a time course study. *Journal of Experimental Biology*, 216(23), 4435-4442.
- Ghobeishavi, A. (2023). *The Effects of noise of Zebrafish (*Danio rerio*) memory* (Doctoral dissertation, University of Saskatchewan).
- Goldman-Rakic, P. S. (1997). The cortical dopamine system: role in memory and cognition. *Advances in Pharmacology*, 42, 707-711.
- Graham, A. L., & Cooke, S. J. (2008). The effects of noise disturbance from various recreational boating activities common to inland waters on the cardiac physiology of a freshwater fish, the largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 18(7), 1315-1324.
- Gupta T, Mullins MC. Dissection of organs from the adult zebrafish. *J Vis Exp*. 2010 Mar 4;(37):1717. doi: 10.3791/1717. PMID: 20203557; PMCID: PMC3144575.
- Gutscher, M., Wysocki, L. E., & Ladich, F. (2011). Effects of aquarium and pond noise on hearing sensitivity in an otophysine fish. *Bioacoustics*, 20(2), 117-136.
- Hanache, P., Spataro, T., Firmat, C., Boyer, N., Fonseca, P., & Médoc, V. (2020). Noise-induced reduction in the attack rate of a planktivorous freshwater fish revealed by functional response analysis. *Freshwater Biology*, 65(1), 75-85.
- Hawkins, A.D. (1993). Underwater sound and fish behaviour. In: Pitcher, T.J. (ed.), *Behaviour of Teleost Fishes* 2nd edition. Chapman & Hall, 129-169.
- Heisler, L. K., Pronchuk, N., Nonogaki, K., Zhou, L., Raber, J., Tung, L., Yeo, G., O’Rahilly, S., Colmers, W., Elmquist, J., Tecott, L. H. (2007). Serotonin activates the hypothalamic–pituitary–adrenal axis via serotonin 2C receptor stimulation. *Journal of Neuroscience*, 27(26), 6956-6964.
- Herbert-Read, J. E., Kremer, L., Brintjes, R., Radford, A. N., & Ioannou, C. C. (2017). Anthropogenic noise pollution from pile-driving disrupts the structure and dynamics of fish shoals. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1863), 20171627.
- Hibbert, B., Fung, I., McAuley, R., Larivière, K., MacNeil, B., Bafi-Yebo, N., Livesey, J., Trudeau, V. (2004). Increased GAD67 mRNA levels are correlated with in vivo

- GABA synthesis in the MPTP-treated catecholamine-depleted goldfish brain. *Molecular Brain Research*, 128 (2), 121-130.
- Higgs, D.M., 2002. Development of the fish auditory system: how do changes in auditory structure affect function, *Bioacoustics* 12, 180-182.
- Horzmann, K. A., & Freeman, J. L. (2016). Zebrafish get connected: investigating neurotransmission targets and alterations in chemical toxicity. *Toxics*, 4 (3), 19.
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Teucke, M., et al. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496 (7446), 498-503.
- Jézéquel, Y., Coston-Guarini, J., Chauvaud, L., & Bonnel, J. (2020). Acoustic behaviour of male European lobsters (*Homarus gammarus*) during agonistic encounters. *Journal of Experimental Biology*, 223 (4), jeb211276.
- Jiang, Q., Liang, X., Ye, T., Zhang, Y., & Lou, B. (2024). Metabonomics and Transcriptomics Analyses Reveal the Development Process of the Auditory System in the Embryonic Development Period of the Small Yellow Croaker under Background Noise. *International Journal of Molecular Sciences*, 25 (4), 1954.
- Jobling, M., 1995. *Environmental Biology of Fishes*, 1st ed., Chapman & Hall, Cornwall, 455 pp.
- Karlsen, H.E. (1992). Infrasound sensitivity in the plaice (*Pleuronectes platessa*). *J. Exp. Biol.* 171, 173- 187.
- Kazi, A. I., & Oommen, A. (2014). Chronic noise stress-induced alterations of glutamate and gamma-aminobutyric acid and their metabolism in the rat brain. *Noise and Health*, 16 (73), 343.
- Kesici, T., & Kocabaş, Z. (2007). *Biostatistics*. Ankara University Faculty of Pharmacy. Publication, (94).
- Knudsen, F.R., Schreck, C.B., Knapp, S.M., Enger, P.S. and Sand, O. (1997). Infrasound produces flight and avoidance response in Pacific juvenile salmonids. *J. Fish Biol.* 51, 824-829.
- Leduc, A. O., Nunes, J. A. C., de Araújo, C. B., Quadros, A. L., Barros, F., Oliveira, H. H., Simoes, C.R., Winandy, G.S.M., Slabbekoorn, H. (2021). Land-based noise pollution impairs reef fish behavior: a case study with a Brazilian carnival. *Biological Conservation*, 253, 108910.
- Li, I., Shih, J. H., Jhao, Y. T., Chen, H. C., Chiu, C. H., Chen, C. F. F., Huang, Y.S., Shiue, C.Y., Ma, K. H. (2019). Regulation of noise-induced loss of serotonin transporters with resveratrol in a rat model using 4-[18f]-ADAM/small-animal positron emission tomography. *Molecules*, 24 (7), 1344.
- Ma, P. M. (1997). Catecholaminergic systems in the zebrafish. III. Organization and projection pattern of medullary dopaminergic and noradrenergic neurons. *Journal of Comparative Neurology*, 381 (4), 411-427.

- Mann, D. A., Higgs, D. M., Tavalga, W. N., Souza, M. J., & Popper, A. N. (2001). Ultrasound detection by clupeiform fishes. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 109 (6), 3048-3054.
- Mann, D. A., Zhongmin, L., Hastings, M.C. and Popper, A.N. (1998). Detection of ultrasonic tones and simulated dolphin echolocation clicks by a teleost fish, the American shad (*Alosa sapidissima*). *J. Acoust. Soc. Am.* 104, 562-568.
- Naqvi, F., Haider, S., Batool, Z., Perveen, T., & Haleem, D. J. (2012). Sub-chronic exposure to noise affects locomotor activity and produces anxiogenic and depressive like behavior in rats. *Pharmacological Reports*, 64 (1), 64-69.
- Neo, Y. Y., Parie, L., Bakker, F., Snelderwaard, P., Tudorache, C., Schaaf, M., & Slabbekoorn, H. (2015). Behavioral changes in response to sound exposure and no spatial avoidance of noisy conditions in captive zebrafish. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9, 28.
- Normandeau Associates, Inc. 2012. Effects of noise on fish, fisheries, and invertebrates in the U.S. Atlantic and Arctic from energy industry sound-generating activities. A literature synthesis for the U.S. Dept. of the Interior, Bureau of Ocean Energy Management. Contract #M11PC00031. Bedford (NH): U.S. Dept. of the Interior, Bureau of Ocean Energy Management. 153 pp. Available from: http://www.data.boem.gov/homepg/data_center/other/espis/espismaster.asp?appid=1, last accessed on 30 February 2014.
- Papoutsoglou, S. E., Karakatsouli, N., Louizos, E., Chadio, S., Kalogiannis, D., Dalla, C. and Papadopoulou-Daifoti, Z. 2007. "Effect of Mozart's music (Romanze-Andante of "Eine Kleine Nacht Musik", sol major, K525) stimulus on common carp (*Cyprinus carpio* L.) physiology under different light conditions", *Aquacultural Engineering*, 36 (1), 61-72.
- Papoutsoglou, S. E., Karakatsouli, N., Papoutsoglou, E. S., & Vasilikos, G. (2010). Common carp (*Cyprinus carpio*) response to two pieces of music ("Eine Kleine Nachtmusik" and "Romanza") combined with light intensity, using recirculating water system. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36 (3), 539-554.
- Papoutsoglou, S. E., Karakatsouli, N., Skouradakis, C., Papoutsoglou, E. S., Batzina, A., Leonaritis, G., & Sakellaris, N. (2013). Effect of musical stimuli and white noise on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth and physiology in recirculating water conditions. *Aquacultural Engineering*, 55, 16-22.
- Picciulin, M., Sebastianutto, L., Codarin, A., Calcagno, G., & Ferrero, E. A. (2012). Brown meagre vocalization rate increases during repetitive boat noise exposures: a possible case of vocal compensation. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 132 (5), 3118-3124.
- Pieniasek, R. H., Mickle, M. F., & Higgs, D. M. (2020). Comparative analysis of noise effects on wild and captive freshwater fish behaviour. *Animal Behaviour*, 168, 129-135.
- Pine, M. K., Jeffs, A. G., & Radford, C. A. (2014). The cumulative effect on sound levels from multiple underwater anthropogenic sound sources in shallow coastal waters. *Journal of Applied Ecology*, 51 (1), 23-30.

- Popper, A.N., 1971. The effects of size on the auditory capabilities of the goldfish. *Journal of Auditory Research* 11, 239-247.
- Popper, A. N., & Fay, R. R. (1999). The auditory periphery in fishes. In *Comparative hearing: fish and amphibians* (pp. 43-100). Springer, New York, NY.
- Popper, A. N., Fewtrell, J., Smith, M. E., & McCauley, R. D. (2003). Anthropogenic sound: effects on the behavior and physiology of fishes. *Marine Technology Society Journal*, 37 (4), 35-40.
- Popper AN, Hastings MC. 2009. The effects of anthropogenic sources of sound on fishes. *J Fish Biol.* 75:455–489.
- Randall, D.J., Taylor, E.W. Evidence of a role for catecholamines in the control of breathing in fish. *Rev Fish Biol Fisheries* 1, 139–157 (1991). <https://doi.org/10.1007/BF00157582>
- Ravindran, R., Devi, R. S., Samson, J., & Senthilvelan, M. (2005). Noise-stress-induced brain neurotransmitter changes and the effect of *Ocimum sanctum* (Linn) treatment in albino rats. *Journal of Pharmacological Sciences*, 98 (4), 354-360.
- Richardson, W.J., Greene, C.R.G. jr., Malme, C.I. and Thomson, D.H. (1995). *Marine Mammals and Noise*. Academic Press, San Diego, 576 pp.
- Rogers, P. H., Hawkins, A. D., Popper, A. N., Fay, R. R., & Gray, M. D. (2016). Parvulescu revisited: small tank acoustics for bioacousticians. In *The effects of noise on aquatic life II* (pp. 933-941). Springer New York.
- Rowell, T. J., D’Spain, G. L., Aburto-Oropeza, O., & Erisman, B. E. (2020). Drivers of male sound production and effective communication distances at fish spawning aggregation sites. *ICES Journal of Marine Science*, 77 (2), 730-745.
- Samson, J., Devi, R. S., Ravindran, R., & Senthilvelan, M. (2006). Biogenic amine changes in brain regions and attenuating action of *Ocimum sanctum* noise exposure. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 83 (1), 67-75.
- Sand, O. (1984). Lateral line system. In Bolis, L. Keynes, R. and Maddess, S. (eds.), *Comparative physiology of sensory systems*. Cambridge University Press, Cambridge, 3-32.
- Schultz, W. (2002). Getting formal with dopamine and reward. *Neuron*, 36 (2), 241-263.
- Selen, H., 2006. “Ses ve Deniz Canlıları – II”, *Yunus Araştırma Bülteni (SÜMAE)*. 6 (3), 10-11.
- Shi, Z., Liang, X., Zhao, Y., Liu, W., & Martyniuk, C. J. (2022). Neurotoxic effects of synthetic phenolic antioxidants on dopaminergic, serotonergic, and GABAergic signaling in larval zebrafish (*Danio rerio*). *Science of the Total Environment*, 830, 154688.
- Smith, M. E., Kane, A. S., & Popper, A. N. (2004). Noise-induced stress response and hearing loss in goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Experimental Biology*, 207 (3), 427-435.
- Timur M., 2006. *Balık Fizyolojisi*, Nobel Yayın No: 957, 192 s.

- Tu, X., Li, Y. W., Chen, Q. L., Shen, Y. J., & Liu, Z. H. (2020). Tributyltin enhanced anxiety of adult male zebrafish through elevating cortisol level and disruption in serotonin, dopamine and gamma-aminobutyric acid neurotransmitter pathways. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 203, 111014.
- Urick, R.J. (1983) *Principles of Underwater Sound*. 3rd Edition, McGraw-Hill, New York.
- Vasantha, L., Jeyakumar, A., and Pitchai, M. A., 2003. "Influence of music on the growth of KOÍ Carp, *Cyprinus carpio* (Pisces: *Cyprindae*)", *NAGA, WorldFish Center Quarterly*. 26 (4), 25-26.
- Vasconcelos, R. O., Amorim, M. C. P., & Ladich, F. (2007). Effects of ship noise on the detectability of communication signals in the Lusitanian toadfish. *Journal of Experimental Biology*, 210 (12), 2104-2112.
- Wahlberg, M. and Westerberg, H. (2005). Hearing in fish and their reactions to sound from offshore wind farms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 288, 295-309.
- Winberg, S., Thörnqvist P. (2016). Role of brain serotonin in modulating fish behavior. *Current Zoology*, Volume 62, Issue 3, Pages 317–323.
- Wysocki, L. E., Dittami, J. P., and Ladich, F. 2006. "Ship noise and cortisol secretion in European freshwater fishes", *Biological Conservation*, 128 (4), 501-508.
- Wysocki, L. E., John, W., Davidson, J. W., Smith, M. E., Frankel, A. S., Ellison, W. T., Mazik, P. M., Popper, A. N., and Bebak, J., 2007. "Effects of Aquaculture Production Noise on Hearing, Growth, and Disease Resistance of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* W, 1792)", *Aquaculture*, 272, 687–697.
- Zeddies, D.G., Fay, R.R., 2005. Development of the acoustically evoked behavioral response in zebrafish to pure tones. *Journal of Experimental Biology* 208 (7), 1363-1372.
- Zeddies, D. G., Fay, R. R., Alderks, P. W., Shaub, K. S., & Sisneros, J. A. (2010). Sound source localization by the plainfin midshipman fish, *Porichthys notatus*. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 127 (5), 3104-3113.
- Zhang, Xuguang, Jun Zhou, Wengang Xu, Wei Zhan, Huafeng Zou, and Jun Lin. 2022. "Transcriptomic and Behavioral Studies of Small Yellow Croaker (*Larimichthys polyactis*) in Response to Noise Exposure" *Animals* 12, no. 16: 2061. <https://doi.org/10.3390/ani12162061>
- Zhou, Y., & Danbolt, N. C. (2014). Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *Journal of Neural Transmission*, 121, 799-817.