

**T.C.**  
**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MULTİJENERASYONEL KADMİYUM (Cd) UYGULAMASINA MARUZ  
KALAN *Drosophila melanogaster*'de BAZI MOLEKÜLER YANITLARIN  
BELİRLENMESİ**

**GÜLİN ÖNGÖREN**


**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı: DOÇ. DR. ZEYNEP BANU DOĞANLAR**

**EDİRNE-2016**

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı



Prof. Dr. Mustafa ÖZCAN  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin Yüksek lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.



Prof. Dr. Ece ŞEN  
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.



Doç. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR  
Tez Danışmanı

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

Jüri Üyeleri

İmza

Doç.Dr.Alpaslan DAYANGAÇ



Doç.Dr.Zeynep Banu DOĞANLAR



Yrd.Doç.Dr.Halide AYDOĞDU



Tarih: 17/05/2016

**T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**  
**DOĞRULUK BEYANI**

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

17/05/2016



Gülin ÖNGÖREN

Yüksek Lisans Tezi

Multijenerasyonel Kadmiyum (Cd) Uygulamasına Maruz Kalan *Drosophila*

*melanogaster*'de Bazı Moleküler Yanıtların Belirlenmesi

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

## ÖZET

Kadmiyum (Cd) toksik ve kanserojen bir ağır metaldir. İnsanların Cd'ye maruziyeti en fazla Cd içeren yiyecek ve suların tüketimi ile olmaktadır. Vücutta biriken Cd insanlarda toksisite ve kalıcı hasarlara neden olabilmektedir. Bu nedenle gıda maddelerinde izin verilen maksimum Cd limitleri yasa ve yönetmeliklerle belirlenmiştir.

Bu çalışmada bazı gıdalarda izin verilen limitlerin (0.1 ve 0.2 ppm) *Drosophila melanogaster* bireylerinde multijenerasyonel etkilerinin belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla *D. melanogaster* üç jenerasyon süresince bu limitleri içeren besin ile beslendi ve her bir jenerasyonda Cd birikimi, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutatyon sentaz (GS) gen ifadeleri, RAPD-DNA polimorfizmi ve mitokondriyal NADH dehidrojenaz 2 bölgesinin sekansı belirlendi.

Çalışma sonucunda birinci jenerasyon ile karşılaştırıldığında ikinci ve üçüncü jenerasyonlarda Cd birikimlerinde ve antioksidan enzimlerin gen ifadelerinde azalma olduğu saptandı. RAPD-DNA profillerinde bant değişimlerinin ve NADH dehidrojenaz 2 gen bölgesinde baz değişimlerinin ise en fazla üçüncü jenerasyon bireylerde olduğu belirlendi.

Sonuç olarak, gıdalarda izin verilen limitlerde multijenerasyonel Cd maruziyetinin *D. melanogaster*'de potansiyel olarak genotoksik olduğu ve yapılacak ileri çalışmaların sonucuna göre yeni ve daha düşük limitlerin belirlenmesi gerektiği düşünüldü.

Yıl : 2016

Sayfa Sayısı : 95

Anahtar Kelimeler : Multijenerasyonel maruziyet, Cd genotoksitesisi, antioksidan enzim gen ifadeleri, NADH dehidrojenaz 2 gen sekansı, RAPD, *D. melanogaster*

Master's Thesis

The Determination of Some Molecular Responses to Multigenerational Cadmium

Exposure in *Drosophila melanogaster*

Trakya University Institute of Natural Sciences

Department of Biotechnology and Genetic

## ABSTRACT

Cadmium is a toxic and carcinogenic heavy metal. Human exposure to Cd mainly via consumption of Cd containing food and drinking water. Cd accumulation in human body can cause toxicity and permanent damage. Therefore, maximum permissible Cd limits for food are determined by regulations.

In this study, we aimed that the determination of multigenerational effect of Cd in permissible limits for some food (0.1 and 0.2 ppm) on *Drosophila melanogaster* individuals. With this aim, *D. melanogaster* fed with media containing Cd at permissible limits during three generations and Cd accumulation, expressions of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione synthase (GS), RAPD-DNA polymorphism and mitochondrial NADH dehydrogenase 2 sequence were determined.

According to results of the study, compared to first generation, the decreases in Cd accumulation and gene expressions of antioxidant enzymes were determined at the second and third generations. The maximum band alterations in RAPD-DNA profiles and base changes in the mtNADH dehydrogenase 2 region were detected at the third generation.

In conclusion, we thought that multigenerational Cd exposure in permissible limits for food potentially genotoxic for *D. melanogaster* and these limits should be revised based on the results of further studies.

Year : 2016

Number of page : 95

Keywords : Multijenerasyonel exposure, Cd genotoxicity, antioxidant enzyme gen expressions, NADH dehydrogenase 2 gene sequence, RAPD, *D. melanogaster*

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince hiçbir zaman bilgi ve desteklerini esirgemeyen, tezimin her aşamasında yardımı olan çok değerli hocam Doç. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR başta olmak üzere, tezimin NADH dehidrojenaz dizisinin analizlerinin yapılması ve yorumlanması konusunda desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR'a,

Tezimin ağır metal ve dizi analizlerinin yapıldığı TÜTAGEM (Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Merkezi) personeline,

Yüksek lisansım süresince Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında eğitim veren tüm bilim insanlarına,

Çalışmamın deneysel aşamalarını gerçekleştirdiğim Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na,

TÜBİTAK projesinde bursiyer olarak çalışmama imkan veren Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalında görevli Arş. Gör. Dr. Ayhan ÜNLÜ'ye,

Tez çalışmamı proje olarak destekleyen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje numarası: TÜBAP 2014-128)'ne ve

Her zaman yanımda olup, beni maddi ve manevi hep destekleyen aileme teşekkürlerimi sunarım.

Gülin ÖNGÖREN  
Edirne, Mayıs 2016

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
SİMGELER.....	viii
KISALTMALAR .....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
TABLolar DİZİNİ .....	xv
BÖLÜM 1: GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2: GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türleri.....	7
2.1.1. Serbest Radikaller .....	8
2.1.1.1. Tekil Oksijen.....	9
2.1.1.2. Süperoksit Anyon.....	10
2.1.1.3. Hidrojen Peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	11
2.1.1.4. Hidroksil Radikali (·OH) .....	12
2.2. Antioksidan Sistem .....	13
2.2.1. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar.....	15
2.2.1.1. Glutasyon (GSH).....	15
2.2.1.2. Melatonin .....	15
2.2.1.3. E Vitamini .....	15
2.2.1.4. C Vitamini.....	15

2.2.1.5. Albumin .....	15
2.2.2. Enzimatik Antioksidanlar .....	16
2.2.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD).....	16
2.2.2.2. Katalaz (KAT).....	16
2.2.2.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px).....	17
2.2.2.4. Glutasyon Redüktaz (GSH-Rd).....	18
2.2.2.5. Glutasyon S-Transferaz (GST).....	19
2.2.2.6. Glutasyon Sentaz .....	19
2.3. Kadmiyumun Oksidatif Stres- Genotoksisite İle İlişkisi .....	20
BÖLÜM 3: MATERYAL VE METOD .....	22
3.1. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in Taksonomisi.....	22
3.1.1. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in Hayat Döngüsü .....	23
3.1.2. Denemede Kullanılan <i>Drosophila melanogaster</i> Kültürünün Yetiştirilmesi .....	25
3.2. Besiyerinin Hazırlanışı.....	26
3.3. Kadmiyum Uygulanması .....	27
3.4. Çekme Yöntemi .....	28
3.5. Kadmiyum Miktarının Belirlenmesi .....	29
3.6. Genetik Analizler .....	30
3.6.1. DNA İzolasyonu.....	30
3.6.2. DNA Miktarının Belirlenmesi.....	31
3.6.3. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik Farklılık; RAPD Yöntemi .....	31
3.6.4. RNA İzolasyonu .....	32
3.6.5. RNA Miktarının Belirlenmesi.....	33
3.6.6. cDNA Eldesi .....	33
3.6.7. Kantitatif Real Time- PCR (qRT- PCR) Analizleri .....	34
3.6.8. mtDNA NADH Dehidrojenaz 2 Sekansı .....	35

3.7. İstatistik Analiz .....	36
3.7.1. DNA Analizleri .....	36
3.7.2. Verilerin Analizleri .....	37
BÖLÜM 4: SONUÇLAR.....	38
4.1. Kadmiyum Birikimi .....	38
4.1.1. Bir Jenerasyon Süresince Cd'ye Maruz Kalan <i>D. melanogaster</i> Bireylerinde Konsantrasyona Bağlı Olarak Cd Birikimleri .....	38
4.1.2. İki Jenerasyon Süresince Cd'ye Maruz Kalan <i>D. melanogaster</i> Bireylerinde Konsantrasyona Bağlı Olarak Cd Birikimleri .....	39
4.1.3. Üç Jenerasyon Süresince Cd'ye Maruz Kalan <i>D. melanogaster</i> Bireylerinde Konsantrasyona Bağlı Olarak Cd Birikimleri .....	40
4.1.4. Cd Uygulaması Yapılan <i>D. melanogaster</i> Bireylerinde Cd Birikiminde Jenerasyonlar Arası Farklılıklar .....	41
4.2. RAPD DNA Polimorfizmi .....	43
4.2.1. RAPD2 Primeri .....	44
4.2.2. B18 Primeri .....	46
4.2.3. OPA11 Primeri.....	48
4.2.4. SP2 Primeri .....	50
4.3. SOD Gen İfadesi .....	52
4.3.1. Bir Jenerasyon Süresince Cd'ye Maruz Kalan <i>D. melanogaster</i> Bireylerinde Konsantrasyona Bağlı Olarak SOD Gen İfadeleri .....	52
4.3.2. İki Jenerasyon Süresince Cd'ye Maruz Kalan <i>D. melanogaster</i> Bireylerinde Konsantrasyona Bağlı Olarak SOD Gen İfadeleri .....	53
4.3.3. Üç Jenerasyon Süresince Cd'ye Maruz Kalan <i>D. melanogaster</i> Bireylerinde Konsantrasyona Bağlı Olarak SOD Gen İfadeleri .....	54
4.3.4. Cd Uygulaması Yapılan <i>D. melanogaster</i> Bireylerinde SOD Gen İfadesinde Jenerasyonlar Arası Farklılıklar.....	55

4.4. KAT Gen İfadesi .....	57
4.4.1. Bir Jenerasyon Süresince Cd'ye Maruz Kalan <i>D. melanogaster</i> Bireylerinde Konsantrasyona Bağlı Olarak KAT Gen İfadeleri .....	57
4.4.2. İki Jenerasyon Süresince Cd'ye Maruz Kalan <i>D. melanogaster</i> Bireylerinde Konsantrasyona Bağlı Olarak KAT Gen İfadeleri .....	58
4.4.3. Üç Jenerasyon Süresince Cd'ye Maruz Kalan <i>D. melanogaster</i> Bireylerinde Konsantrasyona Bağlı Olarak KAT Gen İfadeleri .....	59
4.4.4. Cd Uygulaması Yapılan <i>D. melanogaster</i> Bireylerinde KAT Gen İfadesinde Jenerasyonlar Arası Farklılıklar .....	60
4.5. GS Gen İfadesi .....	62
4.5.1. Bir Jenerasyon Süresince Cd'ye Maruz Kalan <i>D. melanogaster</i> Bireylerinde Konsantrasyona Bağlı Olarak GS Gen İfadeleri .....	62
4.5.2. İki Jenerasyon Süresince Cd'ye Maruz Kalan <i>D. melanogaster</i> Bireylerinde Konsantrasyona Bağlı Olarak GS Gen İfadeleri .....	63
4.5.3. Üç Jenerasyon Süresince Cd'ye Maruz Kalan <i>D. melanogaster</i> Bireylerinde Konsantrasyona Bağlı Olarak GS Gen İfadeleri .....	64
4.5.4. Cd Uygulaması Yapılan <i>D. melanogaster</i> Bireylerinde GS Gen İfadesinde Jenerasyonlar Arası Farklılıklar .....	65
4.6. Kadmiyum Uygulamasının <i>D. melanogaster</i> Bireylerinde Mitokondriyal NADH Dehidrojenaz Dizisi Üzerine Etkisi .....	68
BÖLÜM 5: TARTIŞMA.....	71
KAYNAKLAR .....	78
ÖZGEÇMİŞ .....	92
BİLİMSEL FAALİYETLER .....	93

## SİMGELER

<b>mg</b>	: Miligram
<b>kg</b>	: Kilogram
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>%</b>	: Yüzde değer
<b>ppm</b>	: Milyonda bir
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Süperoksit anyonu
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	: Tekil oksijen
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen peroksit
<b>OH<sup>·</sup></b>	: Hidroksil radikali
<b><sup>1</sup>ΔO<sub>2</sub></b>	: Delta oksijen
<b><sup>1</sup>ΣO<sub>2</sub></b>	: Sigma oksijen
<b>O<sub>2</sub></b>	: Moleküler oksijen
<b>HOCl</b>	: Hipokloroz asit
<b>Cd</b>	: Kadmiyum
<b>Fe<sup>+2</sup></b>	: Demir
<b>α</b>	: Alfa
<b>β</b>	: Beta
<b>γ</b>	: Gama
<b>δ</b>	: Delta
<b>LOOH</b>	: Lipid hidroperoksit
<b>TrxR</b>	: Tioredoksin redüktaz
<b>GSNO</b>	: S-Nitrozoglutasyon
<b>Ca</b>	: Kalsiyum
<b>Zn</b>	: Çinko
<b>mm</b>	: Milimetre
<b>ng</b>	: Nanogram
<b>ml</b>	: Mililitre

**ppb** : Milyarda bir  
**MgCl<sub>2</sub>** : Magnezyum klorid  
**dNTP** : Deoksinükleotit fosfat  
**Pb** : Kurşun



## KISALTMALAR

<b>FAO</b>	: Gıda ve Tarım Örgütü
<b>WHO</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>EFSA</b>	: Avrupa Gıda Tüketimi Veritabanı
<b>NADH</b>	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Dehidrogenaz
<b>SOD</b>	: Süperoksit Dismutaz
<b>DNA</b>	: Deoksiribo Nükleik Asit
<b>RNA</b>	: Ribo Nükleik Asit
<b>GSH</b>	: Redükte Glutasyon
<b>-SH</b>	: Sülfidril
<b>GSSG</b>	: Okside Glutasyon
<b>KAT</b>	: Katalaz
<b>GS</b>	: Glutasyon Sentaz
<b>GSH-Px</b>	: Glutasyon Peroksidaz
<b>Mn-SOD</b>	: Mangan-SOD
<b>Cu-SOD</b>	: Bakır-SOD
<b>Zn-SOD</b>	: Çinko-SOD
<b>GR</b>	: Glutasyon Redüktaz
<b>NADPH</b>	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
<b>FAD</b>	: Flavın Adenin Dinükleotid
<b>GST</b>	: Glutasyon S- Transferaz
<b>GPx</b>	: Glutasyon Peroksidaz
<b><math>\gamma</math>-Glu-Cys</b>	: $\gamma$ -Glutamil Sistein
<b>RAPD</b>	: Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA
<b>PCR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>ICP-MS</b>	: Inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometer
<b>qRT – PCR</b>	: Kantitatif Real Time-PCR
<b>mtDNA</b>	: Mitokondriyal DNA
<b>UV</b>	: Ultra Viyole

**ND2** : NADH Dehidrogenaz 2  
**ATP** : Adenozin Trifosfat  
**IARC** : Amerika Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İnsanların kadmiyuma maruziyet kaynakları.....	4
Şekil 2.2. Kadmiyum maruziyetine bağlı olarak insan iskelet yapısındaki değişim.. .....	7
Şekil 2.3. Serbest radikal reaksiyonunun şematik gösterimi .....	9
Şekil 2.4.. Tekil oksijen oluşumu .....	10
Şekil 2.5. Moleküler oksijenden (O <sub>2</sub> ) reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonu .....	12
Şekil 2.6. Glutatyon redüktaz (GR) enziminin katalizlediği tepkimeyle GSSG NADPH oluşumu.....	17
Şekil 2.7. Glutatyon redüktaz aktivitesinin etki mekanizması .....	18
Şekil 3.1. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in hayat döngüsü.....	24
Şekil 3.2. Sinek kültürlerinin inkübatördeki görünümü.....	25
Şekil 3.3. Besiyeri hazırlanıp kuruyunca aktarılan sineklerin görüntüsü .....	27
Şekil 3.4. Aspiratör ve bölümleri.....	29
Şekil 3.5. Sinek çekme aşamaları .....	29
Şekil 4.1. Bir jenerasyon boyunca Cd uygulaması yapılan <i>D. melanogaster</i> bireylerinde Cd birikimi. ....	39
Şekil 4.2. İki jenerasyon boyunca Cd uygulaması yapılan <i>D. melanogaster</i> bireylerinde Cd birikimi .....	40
Şekil 4.3. Üç jenerasyon boyunca Cd uygulaması yapılan <i>D. melanogaster</i> bireylerinde Cd birikimi .....	41
Şekil 4.4. 0.1 ppm Cd uygulamasının birinci, beşinci ve onuncu günlerinde jenerasyonlar arası Cd birikim farklılıkları .....	42
Şekil 4.5. 0.2 ppm Cd uygulamasının birinci, beşinci ve onuncu günlerinde jenerasyonlar arası Cd birikim farklılıkları .....	43
Şekil 4.6. RAPD2 primeri jel görüntüsü.....	44
Şekil 4.7. B18 primeri jel görüntüsü.....	46
Şekil 4.8. OPA11 primeri jel görüntüsü .....	48

<b>Şekil 4.9.</b> SP2 primeri jel görüntüsü .....	50
<b>Şekil 4.10.</b> Bir jenerasyon boyunca Cd uygulaması yapılan <i>D. melanogaster</i> bireylerinde SOD gen ifadesinin değişimi .....	53
<b>Şekil 4.11.</b> İki jenerasyon boyunca Cd uygulaması yapılan <i>D. melanogaster</i> bireylerinde SOD gen ifadesinin değişimi .....	54
<b>Şekil 4.12.</b> Üç jenerasyon boyunca Cd uygulaması yapılan <i>D. melanogaster</i> bireylerinde SOD gen ifadesinin değişimi .....	55
<b>Şekil 4.13.</b> 0.1 ppm Cd uygulamasının birinci, beşinci ve onuncu günlerinde jenerasyonlar arası SOD gen ifadesi farklılıkları .....	56
<b>Şekil 4.14.</b> 0.2 ppm Cd uygulamasının birinci, beşinci ve onuncu günlerinde jenerasyonlar arası SOD gen ifadesi farklılıkları .....	57
<b>Şekil 4.15.</b> Bir jenerasyon boyunca Cd uygulaması yapılan <i>D. melanogaster</i> bireylerinde KAT gen ifadesinin değişimi .....	58
<b>Şekil 4.16.</b> İki jenerasyon boyunca Cd uygulaması yapılan <i>D. melanogaster</i> bireylerinde KAT gen ifadesinin değişimi .....	59
<b>Şekil 4.17.</b> Üç jenerasyon boyunca Cd uygulaması yapılan <i>D. melanogaster</i> bireylerinde KAT gen ifadesinin değişimi .....	60
<b>Şekil 4.18.</b> 0.1 ppm Cd uygulamasının birinci, beşinci ve onuncu günlerinde jenerasyonlar arası KAT gen ifadesi farklılıkları .....	61
<b>Şekil 4.19.</b> 0.2 ppm Cd uygulamasının birinci, beşinci ve onuncu günlerinde jenerasyonlar arası KAT gen ifadesi farklılıkları .....	62
<b>Şekil 4.20.</b> Bir jenerasyon boyunca Cd uygulaması yapılan <i>D. melanogaster</i> bireylerinde GS gen ifadesinin değişimi .....	63
<b>Şekil 4.21.</b> İki jenerasyon boyunca Cd uygulaması yapılan <i>D. melanogaster</i> bireylerinde GS gen ifadesinin değişimi .....	64
<b>Şekil 4.22.</b> Üç jenerasyon boyunca Cd uygulaması yapılan <i>D. melanogaster</i> bireylerinde GS gen ifadesinin değişimi .....	65
<b>Şekil 4.23.</b> 0.1 ppm Cd uygulamasının birinci, beşinci ve onuncu günlerinde jenerasyonlar arası GS gen ifadesi farklılıkları .....	66
<b>Şekil 4.24.</b> 0.2 ppm Cd uygulamasının birinci, beşinci ve onuncu günlerinde jenerasyonlar arası GS gen ifadesi farklılıkları .....	67

**Şekil 4.25.** NADH Dehidrojenaz 2 (ND2) mtDNA bölgesine ait maksimum parsimoni analiz consensus ağacı..... 69



## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 2.1.</b> Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ'e göre gıda maddelerinde izin verilen maksimum kadmiyum limitleri .....	6
<b>Tablo 2.2.</b> Başlıca reaktif oksijen molekülleri ve metabolizmaları.....	8
<b>Tablo 2.3.</b> Antioksidan moleküller.....	15
<b>Tablo 3.1.</b> Standart <i>Drosophila</i> besiyeri malzemeleri ve miktarları .....	26
<b>Tablo 3.2.</b> Asit karışımında bulunan malzemeler ve miktarları .....	26
<b>Tablo 3.3.</b> RAPD PCR için gerekli malzemeler .....	31
<b>Tablo 3.4.</b> RAPD analizinde kullanılan primerler ve baz dizileri .....	32
<b>Tablo 3.5.</b> cDNA için gerekli malzeme ve miktarları. ....	34
<b>Tablo 3.6.</b> qRT PCR da kullanılan antioksidan enzimler ve dizilişleri.....	35
<b>Tablo 3.7.</b> Mitokondriyal NADH Dehidrojenaz 2 geni dizilemesi için kullanılan PCR bileşenleri ve miktarları.....	36
<b>Tablo 4.1.</b> Cd uygulaması yapılan <i>D. melanogaster</i> bireylerinde RAPD2 primerinde kontrole göre yeni oluşan (Y) ve kaybolan (K) bantlar .....	45
<b>Tablo 4.2.</b> Cd uygulaması yapılan <i>D. melanogaster</i> bireylerinde B18 primerinde kontrole göre yeni oluşan (Y) ve kaybolan (K) bantlar .....	47
<b>Tablo 4.3.</b> Cd uygulaması yapılan <i>D. melanogaster</i> bireylerinde OPA11 primerinde kontrole göre yeni oluşan (Y) ve kaybolan (K) bantlar .....	49
<b>Tablo 4.4.</b> Cd uygulaması yapılan <i>D. melanogaster</i> bireylerinde SP2 primerinde kontrole göre yeni oluşan (Y) ve kaybolan (K) bantlar .....	51
<b>Tablo 4.5.</b> Üç jenerasyon boyunca Cd uygulaması yapılan <i>D. melanogaster</i> bireylerinde ND2 mtDNA bölgelerine ait dal numaralarını içeren apomorfi listesi, consistenci indeks ve ilgili gene ait baz çifti değişimleri.....	70

# BÖLÜM 1

## GİRİŞ

Ağır metaller doğada yaygın olarak bulunan, yüksek atomik ağırlığa ve yoğunluğa sahip olan metalik elementlerdir. Genel olarak suyun yoğunluğundan 5 kat daha fazla yoğunluğa sahip olan metaller ağır metal olarak kabul edilmektedir. Ancak Arsenik gibi metalloidler (metalimsiler) düşük konsantrasyonlarda toksisiteye neden olmalarından dolayı ağır metal olarak kabul edilmektedirler. Ağır metallerin yaşadığımız çevrede geniş dağılım göstermeleri özellikle sanayileşme, endüstrileşme ve hızlı nüfus artışı ile birlikte gündeme gelmiştir. Ağır metaller doğal yollarla, kayaların aşınması ve volkanik patlamalar ile çevreye yayılabildikleri gibi birçok endüstriyel, evsel, tıbbi, ziraat, teknolojik malzeme ve uygulamalar ile ortama yayılabilmektedir ve toksik ağır metaller çevre ve insan sağlığı için gün geçtikçe artan bir tehdit oluşturmaktadır [1]. Ağır metaller yerkabuğunun doğal bileşenleri olarak çevremizde bulunan elementler olmalarına rağmen çevre kirliliğinin çoğu, antropojenik yani insan aktivitesi sonucu madencilik, endüstriyel ürünlerin üretim ve kullanımı, metallerin ve metal içeren bileşiklerin evsel ve zirai olarak kullanımı ile meydana gelmektedir. Çevrede metal miktarının artışı bunlara ilaveten metal korozyonu, atmosferik depolanma, toprak erozyonu ile birlikte süzülme, su kaynaklarından toprağa ve yer altı sularına metal evaporasyonu gibi olaylar ile olabilmektedir. Ağır metallerin organik kirleticilerin aksine yıkılamadıkları ve bu nedenle kirleticiliği kaynak uzaklaştırılsa bile çevrede uzun süre kalıcı olduğu bildirilmiştir [2].

Metaller canlıların çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyonları için gerekli olan esasi metaller (çinko, demir, kobalt, mangan, molibden, magnezyum, nikel, selenyum ve bakır) ve organizmada normal biyolojik fonksiyonlar için gerekli olmayan (alüminyum, antimon, arsenik, kadmiyum, kurşun, civa, berilyum, galyum, indiyum,

platin) metallere olmak üzere sınıflandırılmıştır. Bu metallere esasi olanlar (mikrobesinler) organizmalar için çok düşük miktarlarda gerekli iken yüksek konsantrasyonlarda toksisiteye neden olmaktadır [3,4]. Ancak esasi olmayan metallere çok düşük miktarlarda olsa bile organizmalarda direkt olarak toksik etki göstermektedir [5]. Örneğin bakır birçok enzim için esasi bir kofaktör olarak görev yapmakta ancak aşırı miktarlarda ise Wilson hastalığı ile ilişkili bir hücresel hasara neden olmaktadır. Hem esasi hem de esasi olmayan metallere canlıların dokularında birikerek besin zincirinin daha yüksek düzeylerine transfer olabilirler [6-9].

Kadmiyum (Cd) vücut için çok düşük miktarlarda bile toksik etki gösteren bir ağır metaldir. Vücuda giren kadmiyum fizyolojik ve genetik boyutta birçok sağlık problemlerine neden olmakta ve insan sağlığını olumsuz etkilemektedir. İnsanlar tüketilen gıdalar ile önemli miktarda kadmiyuma maruz kalmaktadır. Bu nedenle gıdalarda Cd için maksimum kalıntı limitleri çeşitli gıdalar için yönetmelikler ile belirlenmiş ve bu limitlerde Cd içeren gıdalar tüketilebilir olarak sınıflandırılmıştır. Bu çalışma kapsamında gıdalarda izin verilen limitlerde Cd içeren ortamda beslenen *Drosophila melanogaster* bireylerinde bu limitlerin multijenerasyonel etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla *Drosophila melanogaster* bireyleri üç jenerasyon süresince bu limitleri içeren besin ile beslenmiş ve her bir jenerasyonda Cd birikimi ile bu birikime canlı organizmanın verdiği moleküler genetik yanıtlar araştırılmıştır.

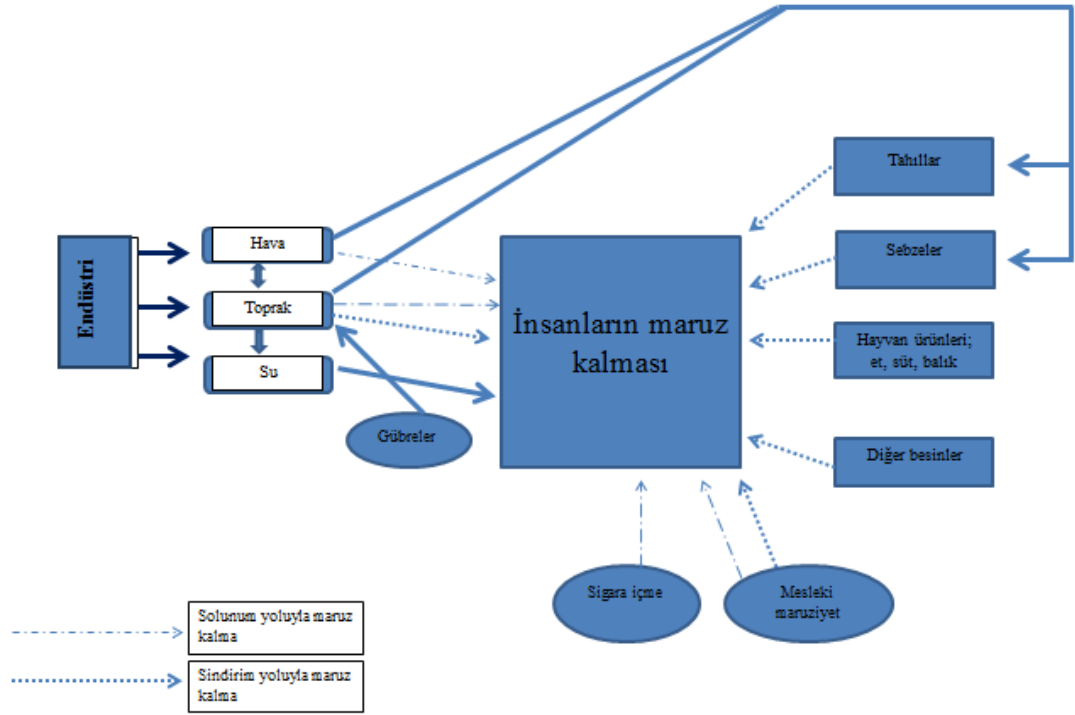
## BÖLÜM 2

### GENEL BİLGİLER

Kadmiyum (Cd) 112.41 atom ağırlığında, +2 değerlikli ve beyaz renkli bir ağır metaldir. Doğada oldukça geniş bir yayılım gösteren Cd yer kabuğunun doğal bileşenlerinden biridir. Kadmiyumun ağır metal kirletici olarak çevreye yayılışı hem doğal yollarla (volkanik hareketler ve Cd içeren kayaların aşınması) hem de insan aktivitesi sonucu (tarımsal ve endüstriyel faaliyetler) olmaktadır. Yer kabuğunda ortalama konsantrasyonu 0.1 mg/kg olan Cd'nin çevrede en yüksek düzeyde sediment kayalarında biriktiği ve marin fosfat kayalarında yaklaşık 15 mg/kg Cd içerdiği bildirilmiştir [10]. Kadmiyum; madencilik, döküm, boya, pil, stabilizer üretiminde yaygın olarak kullanılan bir metaldir ve bu kullanımları sonucunda yaşadığımız çevreye yayılmaktadır. Kadmiyumun deri yolu ile alınımı nadiren görülmekle birlikte insanların Cd maruziyeti en fazla sigara dumanının solunması, Cd içeren yiyecek ve su tüketimi ve Cd ile kirlenmiş alanlarda çalışma ile olmaktadır (Şekil 2.1.) [11, 12].

Hem doğal hem de insan aktivitesi ile çevreye yayılan Cd besin olarak kullanılan yapraklı sebzeler, patates, tahıl, karaciğer, böbrek ve kabuklular ve yumuşakçalarda iz düzeyde bulunabilmektedir [13]. Buna ilaveten karaciğer, mantar, midye, kabuklu deniz canlıları, kakao ve kurutulmuş deniz yosunu gibi kadmiyumca zengin gıdalar insan vücudundaki Cd miktarını önemli düzeyde arttırmaktadır. Vücuda giren Cd, 10 ile 30 yıl arasında değişen ve oldukça yüksek olan yarılanma ömrü sebebi ile vücutta özellikle böbrek ve karaciğer dokularında biriktirilir. Kadmiyum primer toksisitesini böbrek dokusunda özellikle biriktiği yer olan proksimal tübüler hücrelerde gösterir ve böbrek yetmezliğine neden olabilir [14]. Bunun yanı sıra Cd direkt olarak kemik hasarı ile veya dolaylı olarak böbrek yetmezliğinin bir sonucu olarak kemik demineralizasyonuna neden olur. Uzun zaman veya yüksek konsantrasyonda maruziyet tübüler hasara,

glomerular filtrasyon oranının azalmasına ve böbrek işlevini yitirmesine, osteoporoz, anemiye, eozinofiliye, uykusuzluğa ve kronik rinite yol açar [15].



Şekil 2.1. İnsanların kadmiyuma maruziyet kaynakları [14]

Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (The International Agency for Research on Cancer) Cd'ye mesleki olarak maruz kalan insanlarda yapılan çalışmaları temel alarak bu ağır metali Grup 1 insan karsinojeni olarak sınıflandırmıştır [14]. Diğer çalışmalarda ise akciğer, endometrium, mesane, kan, prostat, pankreas, mide ve meme kanseri gibi kanserler ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [16, 17]. FAO/WHO Gıda katkı maddeleri uzman komitesi kadmiyumun geçici tolere edilebilir haftalık alımının 7 µg/kg vücut ağırlığı olduğunu bildirmiştir. 2003-2007 yılları arasında gıda maddelerinin Cd içerikleri ile ilgili olarak yapılan bir araştırmada özellikle kereviz, at eti, balık ve yumuşakçalardan alınan örneklerin %20'sine kadar bir rakamının maksimum sınırı aştığı rapor edilmiştir [14]. Yüksek düzeyde kirli alanlar ve Cd içeren gübrelerin kullanılmasının, zirai ürünlerde ve bunlardan elde edilen türevlerinde kadmiyum kirliliğini artırdığı bilinmektedir.

Avrupa Gıda Tüketimi Veritabanı (European Food Consumption Database: EFSA), beslenme ile alınan Cd'nin en büyük bölümünün tahıl ve tahıl ürünleri, sebzeler, fındık ve baklagiller, nişastalı kökler veya patates, et ve et ürünleri ile olduğunu bildirmiştir. Avrupa ülkelerinde besinlerle Cd alınımının haftalık ortalama 2.3 µg/kg vücut ağırlığı (haftalık 1.9-3.0 µg/kg vücut ağırlığı arasında) olduğu, yüksek konsantrasyonda ise haftalık 3.0 µg/kg vücut ağırlığı (haftalık 2.5-3.9 µg/kg vücut ağırlığı arasında) olduğu tahmin edilmektedir. Kadmiyumca zengin bitkisel ürünleri yüksek düzeyde tüketen vejeteryanların bu yolla haftalık 3.0 µg/kg vücut ağırlığı Cd aldığı, ayrıca çift kabuklu yumuşakçalar ve yabani mantarları düzenli olarak tüketen tüketicilerin sırası ile haftalık 4.6 ve 4.3 µg/kg vücut ağırlığı Cd aldığı bildirilmiştir [14]. Kadmiyumun ekosistemde canlı dokularında biriktirilerek besin zincirinin en altından en üst seviyesine ulaşabilmesi ve insanlarda toksisite ve kalıcı hasarlara neden olabilmesi nedeni ile farklı ülkelerde konu ile ilgili çeşitli otoriteler gıda maddelerinde izin verilen maksimum limitleri belirlemişlerdir. Bu limitler genellikle gıda maddelerinin yenilebilir kısımları için belirlenmekle birlikte kurutulmuş, seyreltilmiş, işlenmiş ve başka bileşenlerle bir araya gelmiş gıda maddelerinde kontaminantların konsantrasyonlarının değişebileceği de göz önünde bulundurulmaktadır.

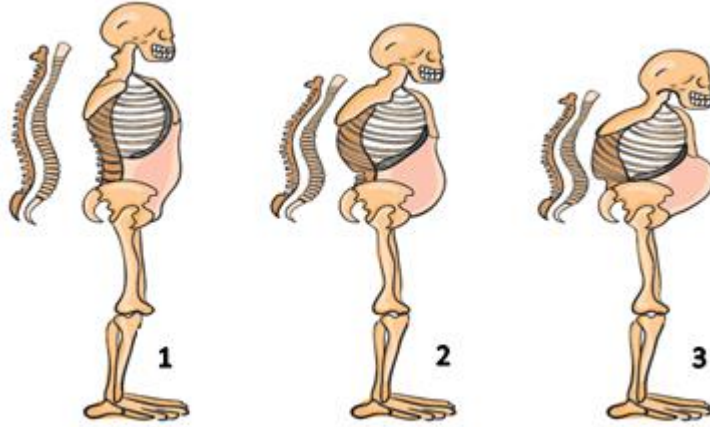
Ülkemizde de besin maddelerindeki maksimum izin verilen Cd limitleri “Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ” ile sınırlandırılmıştır. Türk Gıda Kodeksinin 17.05.2008- 26879 tarih ve sayılı resmi gazetede yayınlanan tebliğinde gıda maddelerindeki maksimum izin verilen Cd limitleri Tablo 2.1. 'de verilmiştir. Bu tabloya göre ülkemizde gıdalarda izin verilen Cd limitlerinin 0.05-1 mg/kg yaş ağırlık (ppm) arasında olduğu görülmektedir.

**Tablo 2.1.** Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ'e göre gıda maddelerinde izin verilen maksimum Cd limitleri

Gıda Maddesi	Maksimum limit (mg/kg yaş ağırlık)
Sığır, koyun, domuz ve kanatlı eti (sakatları hariç)	0.05
At eti (sakatları hariç)	0.20
Sığır, koyun, at, domuz ve kanatlı hayvanların karaciğeri	0.50
Sığır, koyun, at, domuz ve kanatlı hayvanların böbreği	1.00
Balık eti	0.05
Aşağıdaki balık türlerinin etleri	
Hamsiler( <i>Engraulis</i> sp.),	
Torik ( <i>Sarda sarda</i> ),	
Karagöz ( <i>Diplodus vulgaris</i> ),	
Yılanbalığı ( <i>Anguilla anguilla</i> ),	
Kefal ( <i>Mugil labrosus labrosus</i> ),	0.10
İstavrit ( <i>Trachurus</i> sp.),	
Louvar veya luvar ( <i>Luvarus imperialis</i> ),	
Sardalya ( <i>Sardina pilchardus</i> ),	
Sardalya türleri ( <i>Sardinops</i> sp.),	
Orkinos ( <i>Thunnus</i> sp. ve <i>Euthynnus</i> sp., <i>Katsuwonus pelamis</i> ),	
Dilbalığı ( <i>Dicologlossa cuneata</i> )	
Kılıçbalığı ( <i>Xiphias gladius</i> ) eti	0.30
Kabuklular (yengeç etinin kahverengi kısmı, istakoz ve benzeri büyük kabukluların ( <i>Nephropidae</i> ve <i>Palinuridae</i> ) baş ve göğüs etleri hariç)	0.50
Çift kabuklu yumuşakçalar	1.00
Kafadan bacaklılar (iç organları hariç)	1.00
Tahıllar (kepek, embriyo, buğday tanesi ve pirinç hariç)	0.10
Kepek, embriyo, buğday tanesi ve pirinç	0.20
Soya fasulyesi	0.20
Sebzeler ve meyveler (yapraklı sebzeler, taze otlar, mantar, çam fıstığı, saplı sebzeler, köklü sebzeler ve patates hariç)	0.05
Lifli sebzeler, taze otlar, kereviz ve kültür mantarı	0.20
Saplı sebzeler, kereviz hariç köklü sebzeler ve patates (patates için verilen limit soyulmuş patatese uygulanır)	0.10

Kadmiyum alım yolu ne olursa olsun organizmada etkin bir şekilde biriktirilir ve yaşam boyu vücutta kalır. Doğumda göz ardı edilebilecek kadar düşük olan Cd miktarının, yaşam boyu sürekli olarak artarak birikim gösterdiği ve vücudun önemli fonksiyonlarına zarar verdiği özellikle de kemiği oluşturan maddelerin çözünmesine ve

insan vücudunun eğilip bükülmesine neden olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.2.). Japonya'nın Toyama bölgesindeki madencilığe bağlı Cd zehirlenmesiyle oluşan Itai-itai hastalığı buna örnek olarak verilebilir [18].



**Şekil 2.2.** Kadmiyum maruziyetine bağlı olarak insan iskelet yapısındaki değişim  
1) normal insan iskeleti 2) kemikte bükülmelerin ilk evresi 3) son evre [19]

## 2.1. Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türleri

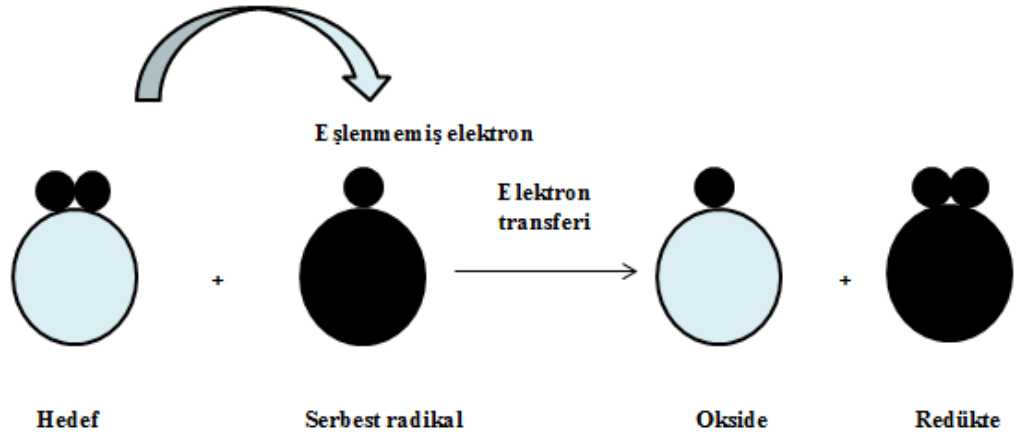
Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi sonucunda meydana gelen ve antioksidan sistem tarafından bu türlerin detoksifiye edilemeyerek hücre redoks dengesinin bozulduğu durum olarak tanımlanmaktadır [20, 21]. Reaktif oksijen türleri normal metabolizma sırasında mitokondriyal oksidatif fosforilasyonda üretilmekte olup antioksidan sistem tarafından uzaklaştırılmakla birlikte bu toksik türlerin miktarının ksenobiyotikler, metaller ve diğer dışsal kaynaklı maddelerden dolayı aşırı miktarda artışı ile oksidan/antioksidan dengenin bozulması oksidatif strese neden olmaktadır. Reaktif oksijen türleri süperoksit anyon ( $O_2^-$ ), tekil oksijen ( $^1O_2$ ) hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikali ( $OH^\cdot$ ), nitrik oksit, peroksinitrit, alkoksi ve lipit peroksil radikalleridir. Tablo 2.2. 'de en yaygın hücre içi reaktif oksijen türleri, hücresel üretim kaynakları ve bu moleküllerin süpürüldüğü antioksidan enzimler verilmiştir [22].

**Tablo 2.2.** Başlıca reaktif oksijen molekülleri ve metabolizmaları [22]

ROS Molekülü	Ana Kaynakları	Enzimatik savunma sistemleri	Ürünler	
Süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ )	Elektron taşıma zincirindeki fazla elektronlar	Süperoksit dismutaz (SOD)	$H_2O_2 + O_2$	
		Süperoksit redüktaz (bazı bakterilerde)	$H_2O_2$	
Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )	Aktif fagositler Ksantin Oksidaz Flavoenzimler	Süperoksit dismutaz (SOD) yoluyla $O_2^{\cdot-}$ ler ile	Glutatyon peroksidaz	
		Katalaz	$H_2O + O_2$	
		NADPH-oksidadaz (nötrofiller) Glikoz Oksidaz Ksantin Oksidaz	Peroksi redoksinler (Prx)	$H_2O$
		Geçiş metallerinin $O_2^{\cdot-}$ ve $H_2O_2$ aracılığıyla		
Hidroksil radikali ( $\cdot OH$ )	Geçiş metallerinin $O_2^{\cdot-}$ ve $H_2O_2$ aracılığıyla			
Nitrik oksit (NO)	Nitrik oksit sentezleri	Glutatyon/TrxR	GSNO	

### 2.1.1. Serbest Radikaller

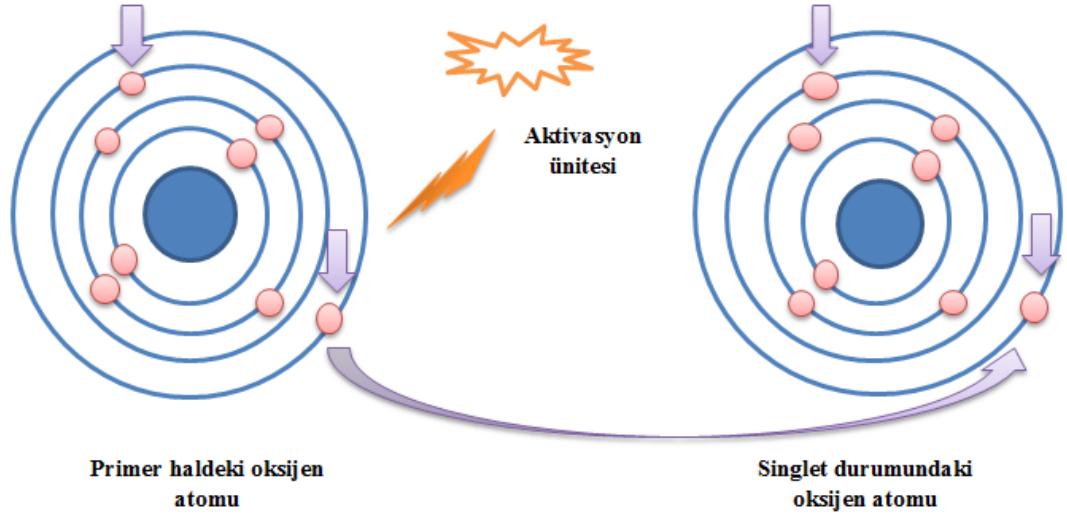
Serbest radikaller dış orbitallerinde tek sayıda elektron yani eşlenmemiş elektron taşıyan molekül veya atomlardır (Şekil 2.3.) [23]. Pozitif, negatif ve nötr yüklü olabilen serbest radikallerin yarılanma ömürleri oldukça kısa ve reaktiviteleri yüksektir [24]. Bu nedenle çevrelerindeki diğer moleküllerden elektron alma veya onlara elektron verme eğilimindedirler [25, 26]. Bu moleküllerin aktivitesi ortamda zincirleme reaksiyonları başlatır ve toksik etkilerini bu şekilde gösterirler [27, 28].



**Şekil 2.3.** Serbest radikal reaksiyonunun şematik gösterimi [27, 28]

#### 2.1.1.1. Tekil Oksijen

Oksijenin dış orbitalindeki paylaşılmamış elektronların spinlerini değiştirmesi ile tekil (singlet) oksijen ( $^1\text{O}_2$ ) meydana gelir (Şekil 2.4.). Uyarılmış elektronlar aynı veya farklı orbitallerde bulunabilir. Delta ( $^1\Delta\text{O}_2$ ) formunda elektronlar aynı orbitalde fakat spinleri birbirine zıt durumda iken, sigma ( $^1\Sigma\text{O}_2$ ) formunda ise yine spinleri birbirine zıt olan elektronlar farklı orbitallerde yerleşmiştir. Tekil oksijen biyolojik sistemlerde fotoeksitasyondan kaynaklanan ışık reaksiyonları ve kimyasal eksitasyondan kaynaklanan karanlık reaksiyonları olmak üzere iki farklı yolla üretilir [29].

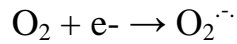


**Şekil 2.4.** Tekil oksijen oluşumu [30]

Tekil oksijen farklı moleküllerle etkileşime girer ve bu etkileşim ile sahip olduğu enerjiyi transfer edebilir. Tekil oksijen bağları karbon-karbon çift bağları ile tepkimeye girer. Ayrıca doymamış yağ asitleri ile de tepkimeye girip peroksi radikalini oluşturmaktadır.

#### 2.1.1.2. Süperoksit Anyon

Moleküler oksijene ( $O_2$ ) bir elektron eklenmesi ile oluşan süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ) lipid membranlardan içeri difüze olamadığından dolayı üretildiği bölümde kalmaktadır (Şekil 2.5.) [31-34].



Bu radikal aşağıda verilmiş olan farklı mekanizmalar esnasında üretilebilmektedir. Bu mekanizmalar;

1- Enzimlerin etkileriyle süperoksit radikali oluşmaktadır.

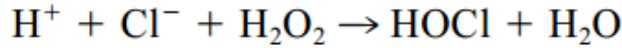
2- Mitokondrinin enerji metabolizmasında oksijen kullanılır. Burada tüketilen oksijenin bir kısmından süperoksit yapılır. Nikotinamid adenin dinükleotid dehidrogenaz (NADH) ve koenzim Q gibi elektron taşıyıcılarından oksijene elektron gider [35, 36].

3- Biyomoleküller tek elektron verip kendileri oksitlenirler. Bu esnada süperoksit radikali de oluşmaktadır. Flavinler, ferredoksinler, hidrokinonlar, katekolaminler süperoksit oluşumunda etkilidirler [37, 38].

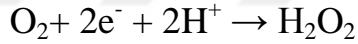
4- Aktif olan bazı fagositik lökositler süperoksit üretirler [39, 40].

### 2.1.1.3. Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmamasına karşın biyolojik membranlardan nüfuz edebilme özelliğinden dolayı son derece önemlidir. Bu molekül HOCl (hipokloroz asit) gibi daha reaktif oksijen türlerinin üretimine aracılık ederek radikal meydana getirici bir rol oynamaktadır [41].

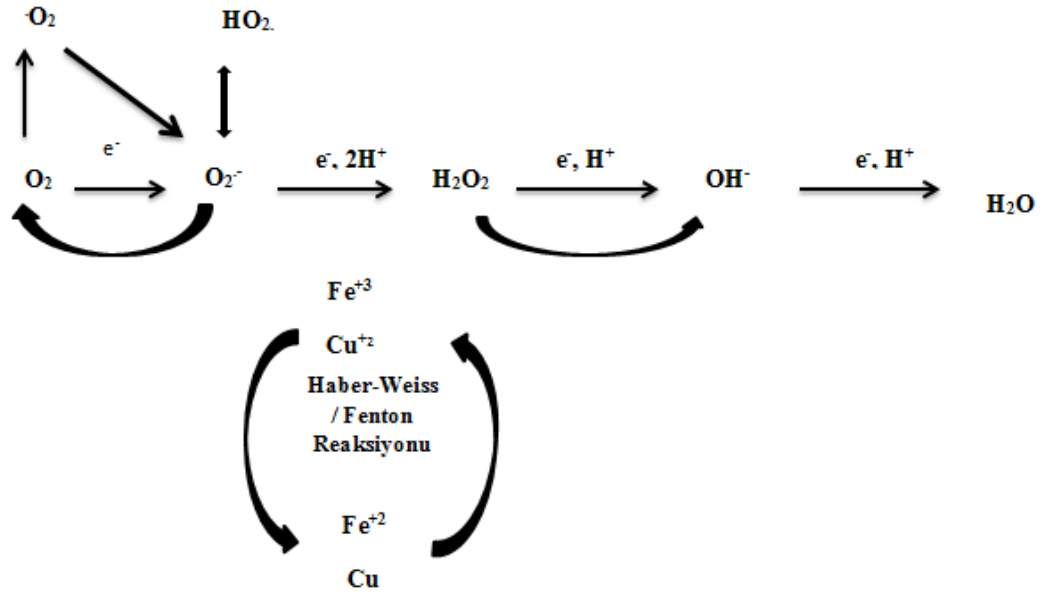


Hücre içinde hidrojen peroksit farklı mekanizmalarla meydana gelebilmektedir. Bunlardan ilki oksijenin iki elektronla redüklenmesi ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşumudur [42]. Bu reaksiyon dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir, çünkü radikal olmayan ürünler oluşur. Bu durum spontan olarak gerçekleşebilir.



Hidrojen peroksit bazen süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenerek oluşabilir [43,44]. Hücre içerisinde meydana gelen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalazlar, glutatyon peroksidazlar ve peroksiredoksinler olmak üzere üç enzim grubu tarafından uzaklaştırılmaktadır [45, 46].

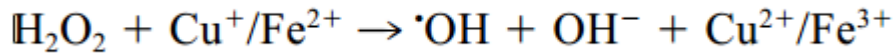
Hidrojen peroksit Fe<sup>+2</sup> veya diğer geçiş metalleri olduğunda Fenton reaksiyonuyla, süperoksit radikalinin (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) varlığında ise Haber-Weiss reaksiyonu sonucunda hidroksil radikalini (OH<sup>-</sup>) oluşturur [47, 48].



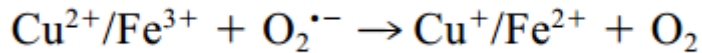
**Şekil 2.5.** Moleküler oksijenden (O<sub>2</sub>) reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonu [49]

#### 2.1.1.4. Hidroksil Radikal (•OH)

Hidroksil radikaller biyomoleküller için güçlü reaktivite gösterdiklerinden dolayı biyolojik sistemler için diğer reaktif oksijen türlerinden daha zararlıdır [50, 51]. Bu radikal hidrojen peroksitten farklı proteinler veya diğer moleküller ile bağlı bulunan demir ve bakır iyonları tarafından katalizlenen ve Fenton reaksiyonu olarak adlandırılan bir reaksiyon ile meydana gelir.



Süperoksit ise yukarıdaki reaksiyondan metal iyonlarının geri dönüşümü için önemli rol oynamaktadır.



Yukarıdaki iki reaksiyonun toplamı Haber-Weiss reaksiyonu olarak tanımlanmaktadır. Bu reaksiyona göre geçiş metalleri hidroksil radikallerinin oluşumunda önemli rol oynamaktadır [51, 52].

Yüksek reaktif özelliklerinden dolayı reaktif oksijen türleri potansiyel olarak toksik, mutajenik veya karsinojenik etki gösterebilirler. Bu moleküllerin hedefleri olan önemli biyomoleküller DNA, lipit ve proteinlerdir [22].

Reaktif oksijen türleri DNA'nın kimyasal modifikasyonuna yol açarak mutajenik etki gösterebilirler. DNA'nın bu moleküller ile (özellikle hidroksil anyon) reaksiyonu sonucunda DNA-protein çapraz bağlanması, pürinlerin oksidasyonu, çift ve tek zincir kırıkları gibi hasarlar meydana gelmektedir. Bu hasarların meydana gelmesinden sonra eğer DNA onarım sistemleri hasarsız bir DNA meydana getiremez ve replikasyon bu hatalarla devam ederse mutasyon meydana gelmektedir. Araştırmacılar bu mekanizmanın oksidatif strese maruz kalan bireylerde yüksek kanser prevalansını açıkladığını bildirmişlerdir [46, 53]. Reaktif oksijen türlerinin DNA'ya hasar vermesi sonucunda meydana gelen olaylardan biri de programlanmış hücre ölümüdür. Yine reaktif oksijen türlerinin hücresel veya tüm organizma düzeyinde yaşlanmaya neden oluşunun mitokondriyal DNA hasarından dolayı olduğu bildirilmiştir [54-57].

Lipitler hücrelerin yapı ve fonksiyonları açısından hayati önem taşıyan hücre zarlarının esasi bileşenleridir. Bu moleküller serbest oksijen radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin primer hedefleridir. Reaktif oksijen türleri sahip oldukları çift bağlarından dolayı poli-doymamış yağ asitlerini hedefleyerek yağ asitlerinin oksidatif yıkımına ve lipit peroksidasyonuna neden olurlar [58, 59]. Lipit peroksidasyonu sonucu malondialdehit gibi sitotoksik yan ürünler ortaya çıkar ve bu maddeler de diğer hücre bileşenlerine zarar verirler.

Reaktif oksijen türleri proteinler ile etkileşime girerek modifiye olmuş, daha az aktif, fonksiyonunu yitirmiş ve denatüre proteinlerin meydana gelmesine sebep olurlar [57, 60]. Sülfür ve selenyum içeren aminoasitler hasarlara karşı daha duyarlıdır ve antioksidan sistem proteinlerin korunmasında görev yapar.

## **2.2. Antioksidan Sistem**

Hücre içerisinde antioksidan sistem tarafından uzaklaştırılmayan aşırı reaktif oksijen türlerinin birikimi yaşamsal öneme sahip moleküller olan lipit, protein ve DNA'ya zarar verir [61]. Bununla birlikte son yirmi yılda, reaktif oksijen türlerinin biyolojik ve fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde sinyal moleküller olarak görev

yaptıkları bildirilmiştir [62]. Araştırmacılar bu durumun evrimin erken dönemlerine reaktif oksijen türlerinin sinyal iletim mekanizması olarak seçildiğini ve canlıların oksidatif çevreye ve besin değişikliklerine karşı adaptasyonunda önemli olduğunu bildirmişlerdir [63]. Hücreler reaktif oksijen türlerinin toksik etkilerini antioksidan mekanizmaları yolu ile yok ederler [64]. Birçok antioksidan savunma mekanizması reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve oluşturdukları hasarı önlemede görevlidir. Bu mekanizmalara "antioksidan savunma sistemleri" ya da "antioksidanlar" denir (Tablo 2.3.) [65].

Hücrelerde bulunan antioksidan moleküllerin etkilerinin dört farklı şekilde gruplanabileceği bildirilmiştir [66-68]. Bu etkiler aşağıda verilmiştir:

- 1. Temizleme:** Enzimlerle oksidanlar zayıf bir moleküle çevrilir. Örneğin; antioksidan enzimler ve küçük moleküller.
- 2. Baskılama:** Bu etki şeklinde; oksidanlara bir hidrojen aktarılarak etkisiz hale getirilir. Örneğin; vitaminler ve flavonoidler.
- 3. Onarma:** Hedef olan moleküllerin hasardan sonra tamir edilmesi ya da temizlenmesi.
- 4. Zincir koparma:** Metal iyonları bağlanır ve radikal oluşum reaksiyonları engellenir. Örneğin; Seruloplazmin, hemoglobin.

Antioksidan savunma sistemi enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere iki grupta incelenmektedir.

**Tablo 2.3.** Antioksidan moleküller [26]

<b>Antioksidan Enzimler/ Proteinler</b>	<b>Enzimler;</b>	<b>Küçük Moleküller</b>	<b>Yağda çözünen bileşikler;</b>
	Glutasyon peroksidaz Glutasyon S- transferaz Katalaz Mitokondrial sitokrom oksidaz Süperoksit Dismutaz (SOD)		<b>α- tokoferol (Vitamin E) β-karoten Bilirubin Flavonoidler Ubikinol</b>
	<b>Metal bağlayıcı proteinler;</b>		<b>Suda çözünen bileşikler;</b>
Albumin Ferritin Hemopeksin/Haptoglobulin Serüloplazmin Transferin	Askorbik asit (Vitamin C) Glutasyon Sistein Ürik asit		

### **2.2.1. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar:**

**2.2.1.1. Glutasyon (GSH):** Karaciğerde sistein, glutamat ve glisin aminoasitlerinden sentezlenir. Glutasyon serbest radikaller ve peroksitlerle tepkimeye girer ve bu sayede oksidatif stresi önler. Ayrıca proteinlerde bulunan sülfidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar. Buradaki amaç oksidasyondan korumaktır [69]. Glutasyon düzeyleri oksidatif stresin belirlenmesinde kullanılan önemli bir parametredir. Oksidatif stres durumunda redükte glutasyon (GSH)/okside glutasyon (GSSG) oranında bir azalma olmaktadır.

**2.2.1.2. Melatonin:** Pineal bezden ve triptofandan sentezlenen bir hormondur. Lipofilik özelliği vardır. Bu sayede membranları kolayca geçebilir. Organizmada oluşan tahrip edici rolü olan hidroksil radikallerini temizlemede de görevlidir [70-72].

**2.2.1.3. E Vitamini:** E vitamininin dört farklı tokoferol olan α, β, γ, δ formu vardır. En yaygın bulunup en aktif olanı d-α-tokoferoldür. E vitamin formları suda çözünmezler fakat yağda çözünürler [73].

**2.2.1.4. C Vitamini:** Hücre zarında bulunup zarı geçebilir. Suda çözünebilmektedir. Demir absorpsiyonunda, kollojen sentezinde görevlidir. Süperoksit, tokoferoller, peroksidler gibi reaktif oksijen türlerini indirgemektedir.

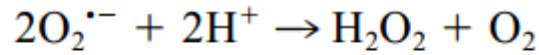
**2.2.1.5. Albümin:** Geçiş metallerini bağlama görevi vardır. Ayrıca hipoklorit (HOCl) ve lipit hidroperoksit (LOOH) toplayıcısıdır [74].

### 2.2.2. Enzimatik Antioksidanlar

Hücrelerdeki enzimatik antioksidan sistem süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) glutatyon sentaz (GS), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), askorbat peroksidaz, guaiakol peroksidaz gibi birçok molekülden oluşmaktadır [75]. Bu enzimlerin oksidatif stresin sebep olduğu hasarın engellenmesinde önemli rolleri vardır.

#### 2.2.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Hücre içinde meydana gelen süperoksit anyon radikalleri SOD enzimi ile detoksifiye edilir. Bu enzim keşfedilen ilk reaktif oksijen türü metabolize eden enzimdir [76]. Fizyolojik şartlarda süperoksit radikali oldukça fazla oluşur. SOD enzimi; süperoksit radikalının hücre içi konsantrasyonunu düşük seviyelerde olacak şekilde tutar. Bu sayede süperoksit seviyelerinin kontrolünü sağlar ve hücrelerin süperoksit radikallerinin etkilerinden korunmasında rolü vardır [77, 78].

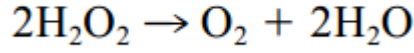


Ökaryotik hücrelerde süperoksit anyonu ( $\text{O}_2^-$ ) iki adet metal içeren SOD izozimi tarafından hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) metabolize edilir. Bu izozimler mitokondride bulunan 80 kDaltonluk tetramerik Mangan-SOD (Mn-SOD) ve sitosolik 32 kDaltonluk dimerik Cu/Zn-SOD'dur. Mn-SOD yapısı homotetramerdir. Alt ünitelerinin her birinde bir Mn iyonu bulunur. Hücrel Mn-SOD içeriği beyin, kalp, böbrek, karaciğer gibi yüksek metabolik aktivitesi olan dokularda fazladır [79, 80]. Cu/Zn-SOD'un iki protein alt ünitesi ve bu her alt üniteye Cu ve Zn atomları yer alır. Memelilerde en çok bulunduğu organlar böbrek, karaciğer, merkezi sinir sistemi ve eritrosittir. SOD tarafından katalizlenen reaksiyonda 2 süperoksit molekülü hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşür. Bu da SOD enziminin hücrel hidrojen peroksit kaynaklarından biri olduğunu göstermektedir [22].

#### 2.2.2.2. Katalaz (KAT)

Glikoprotein yapıda bir hemoprotein olan katalaz enzimi ferriprotoporfirin grubu içeren dört alt üniteye meydana gelmiştir. KAT enzimi; prostetik grubunda  $\text{Fe}^{+3}$

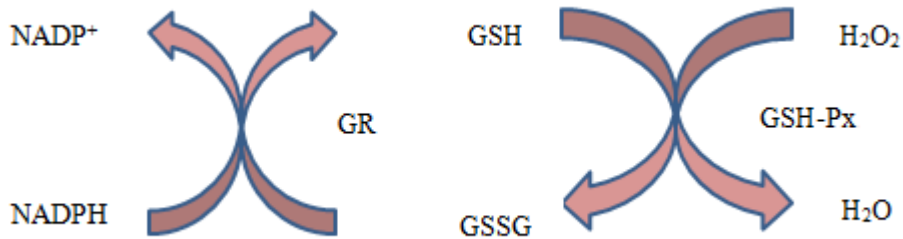
bulunan protoporfirin IX içermektedir. Memeli hücrelerinde en fazla peroksizomlarda bulunan ve hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene katalizleyen enzimdir [81].



KAT enzim aktivitesi ortamda  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin artması ile birlikte artar. Ortamdaki  $\text{H}_2\text{O}_2$  konsantrasyonu düşük olduğunda ise;  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'yi substrat olarak kullanan diğer antioksidan enzimler devreye girerler [82, 83]. Bu enzimler  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin ortamdaki uzaklaştırılmasını sağlarlar [84]. Katalaz ve GSH-Px enzimlerinin benzer etkileri vardır. Ancak hücredeki bulunma ve etki yerleri farklıdır. KAT enziminin bulunma yeri peroksizomlar, GSH-Px enzimi ise sitozol ve mitokondride bulunur [85, 86].

### 2.2.2.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Bu enzim; organik hidroperoksitlerin (lipit hidroperoksitler, DNA hidroperoksitler) ya da hidrojen peroksitin GSH tarafından indirgenme tepkimesinin katalizlenmesini sağlar [87]. GSH-Px'in yapısında selenyum metali olduğundan metalloenzim grubunda değerlendirilmektedir. Redükte glutasyon (GSH) in vitro ortamda okside glutatyon (GSSG) dönüştürülmektedir [88]. Tepkime esnasında GSH, GSSG haline dönüşür, glutasyon peroksidaz enzimi ise  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'yi suya indirger. Glutasyon redüktaz (GR) enziminin katalizlediği tepkimeyle GSSG NADPH harcanarak tekrar redükte hale gelir [89-91]. Şekil 2.6.'da tepkime şematize edilmiştir. Eğer ortamdaki  $\text{H}_2\text{O}_2$  konsantrasyonu düşükse glutasyon peroksidaz (GSH-Px), katalaza göre daha etkilidir [88].

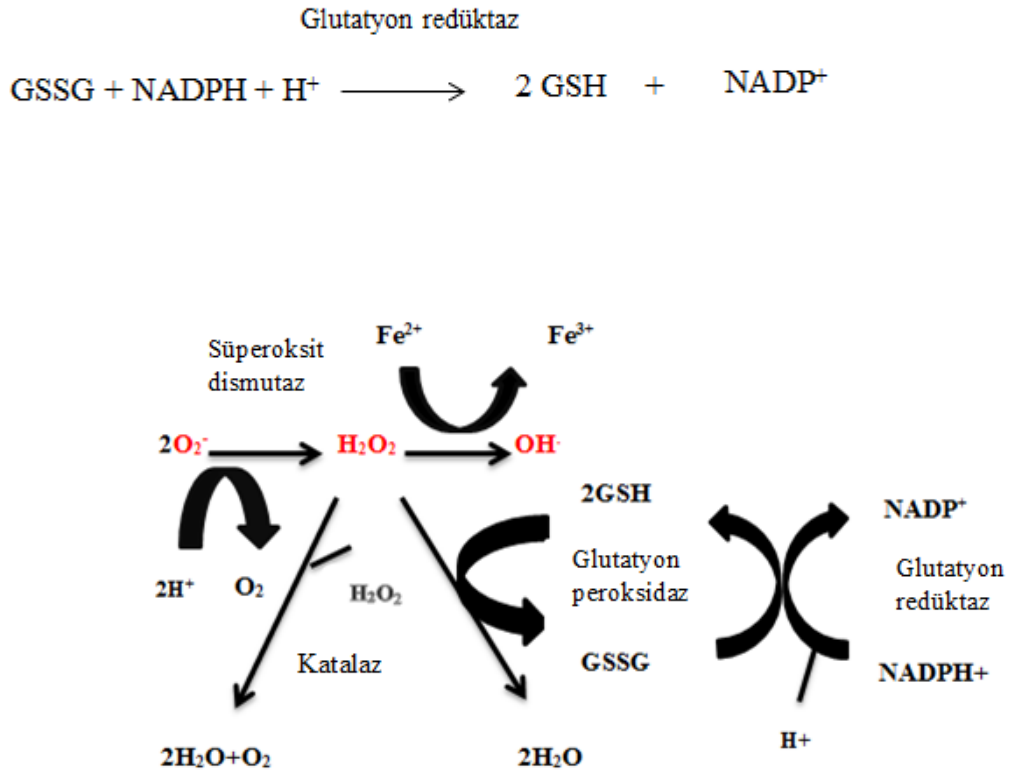


**Şekil 2.6.** Glutasyon redüktaz (GR) enziminin katalizlediği tepkimeyle GSSG NADPH oluşumu

Glutasyon Peroksidaz enzimi selenyum bağı ve selenyum bağı olmayan şekilde ikiye ayrılır. Selenyum bağı olan Glutasyon Peroksidazda hidrojen peroksit bulunmaktadır. Ayrıca buna ek olarak diğer organik peroksitlerin de indirgenmesini sağlayan beş yapı bulunmaktadır. Selenyum bağımsız Glutasyon Peroksidaz yalnızca organik hidroperoksitleri redüklemektedir [91].

#### 2.2.2.4. Glutasyon Redüktaz (GSH-Rd)

Glutasyon redüktaz enzimi, GSH-Px vasıtasıyla hidroperoksitlerin indirgenmesiyle oluşan okside glutasyonun tekrar redükte glutasyona dönüşümünü sağlar. Bakteri, bitki ve hayvanlarda glutasyon redüktaz bulunur. Glutasyon redüktaz enzimi NADPH ile glutasyonun rejenerasyonu için askorbat-glutasyon döngüsü için önemlidir [92]. NADPH varken okside glutasyonu redükte glutasyona dönüştürür (Şekil 2.7.). Bu sayede antioksidan etki gösterir [93].



Şekil 2.7. Glutasyon redüktaz aktivitesinin etki mekanizması [94]

Glutasyon redüktaz iki protein alt ünitesinden oluşur. Bunların her biri aktif merkezinde Flavin Adenin Dinükleotit (FAD) içerir. Enzimin katalizlediği reaksiyonda FAD, NADPH tarafından indirgenmektedir. Buradan gelen elektronlarda enzimin aktif merkezinde olan GSSG'nin iki sistein rezidüsü arasında bulunan disülfid bağına taşınmaktadır. Bu şekilde iki -SH grubu oluşmaktadır ve GSSG iki GSH'a indirgenir [22, 95].

#### 2.2.2.5. Glutasyon S-Transferaz (GST)

Glutasyon S-transferazlar, iki alt birimden oluşurlar. Lipit hidroperoksitlere karşı olan GST'ler Selenyum Bağımsız Glutasyon Peroksidaz aktivitesi göstermektedir:



Glutasyon S-transferazlar, lipit peroksitlerine karşı selenyum-bağımsız GSH-Px aktivitesi gösterirler. Bu şekilde bir antioksidan savunma mekanizması oluşturmaktadırlar. Glutasyon S-transferazların çeşitli bileşikleri metabolize etme yetenekleri bulunur. Bunlar; çevre kirleticilerinden ilaçlara, karsinojenlerden pestisitlere kadar birçok grubu içine alabilmektedir. Glutasyon S-transferazlar lipit peroksitlerinin bozunma ürünleriyle birlikte GSH arasındaki olan konjugasyonda da antioksidan olarak görev yapmaktadırlar.

Balıklarda, organik hidroperoksitlerin detoksifikasyonları için GST'ler GSH-Px'ten çok daha önemli ve gereklidir [96]. GST'ler; yalnızca organik hidroperoksitleri indirgerler. Ayrıca GST'ler selenyuma bağımlı olmadan çalışırlar [91, 97]. Selenyum eksikliği olduğunda GST devreye girer. Böylece kayıp selenyuma bağımlı olarak GPx aktivitesinin boşluğunu doldurur. Eğer selenyum varsa enzimin görevi baskılanır [98]. Glutasyon S-transferazlar; hayvanlar, bitkiler, omurgalılar, omurgasızlar ve bakterilerde bulunmaktadır.

#### 2.2.2.6. Glutasyon Sentaz

Glutasyon (GSH) sentaz glutasyonun  $\gamma$ -glutamil sistein ( $\gamma$ -Glu-Cys) ve glisinden ATP-bağımlı sentezini katalizleyen enzimdir. Glutasyonun amino asit taşınması, protein ve nükleik asit sentezi, enzim aktivitesinin modülasyonu, ksenobiyotik, karsinojen ve reaktif oksijen türlerinin metabolize edilmesi, redoks reaksiyonları, nörotransmisyon ve

nöromodülasyon gibi birçok önemli hücrel olayda önemli görevleri olduğu bilinmektedir [99-104]. Organizmalar için oldukça önemli rolleri olan glutatyonun sentezinden sorumlu glutatyon sentaz enzimi canlıların oksidatif stresin zararlı etkilerinden korunmasında büyük önem taşımaktadır.

### **2.3. Kadmiyumun Oksidatif Stres ve Genotoksisite İle İlişkisi**

Hücre içinde biriken Cd'nin esasi elementler için kullanılan hücrel transport sistemlerini kullandığı ve geçiş metallerinin dereglasyonuna neden olduğu bildirilmiştir. Bu durum Cd alınımının Ca, Fe ve Zn ile rekabete girerek bu metallerin taşınım sistemlerini kullandığını göstermektedir. Cd hücre içerisindeki redoks dengesini bozar ve bu durum Cd ile ilgili patolojik sonuçlara neden olur. Non-fenton metal olarak Cd direkt olarak reaktif oksijen türlerinin üretimini indüklemey. Bununla birlikte redoks aktif metallerle yer değiştirerek redoks süpürücülerini azaltma, antioksidan enzimleri ve mitokondriyal hasara yol açan elektron taşınım sistemini inhibe etme şeklinde dolaylı etkilere neden olur [15]. Bazı çalışmalarda Cd'nin redoks aktif bir metal olan Fe ile yer değiştirdiği, böylece hücre içerisinde serbest Fe miktarının artmasına neden olarak oksidatif stresi indüklediği bildirilmiştir [149]. Fe daha sonra Fenton reaksiyonu ile son derece zararlı hidroksil radikallerinin üretimine neden olur. Kadmiyum hücre içerisinde önemli bir reaktif oksijen türü uzaklaştırıcı antioksidan olan GSH'ı hedefleyerek de oksidatif strese neden olmaktadır. Glutatyon miktarında meydana gelen azalma Cd'nin toksik etkilerinin etkili bir şekilde bertaraf edilememesi ve oksidatif strese neden olan hücrel redoks dengesizliği ile sonuçlanır. Antioksidan metabolit GSH haricinde, Cd toksisitesi antioksidan enzim aktiviteleri ve ekspresyonlarını da etkilemektedir. SOD enziminin aktivitesinin uygulama süresine bağlı olarak Cd tarafından direkt olarak etkilendiği bildirilmiştir [149]. Yine katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz enzimlerinin aktivitelerinde Cd toksisitesine bağlı olarak artış ve azalışların meydana geldiği görülmüştür. Kadmiyum hücre içerisinde sadece antioksidan sistemi değil aynı zamanda mitokondriyal elektron taşınımını da hedef almaktadır [15].

Kadmiyum tarafından indüklenen oksidatif stres DNA'da tek zincir kırıkları, kromozomal aberasyonlar, kardeş kromatit değişimleri, DNA-protein bağlanma hataları ve mutajenik lezyonların meydana gelmesine neden olur. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda Cd'nin genotoksik etkilerinin reaktif oksijen türlerinin üretilmesi ile

dolaylı olarak gerçekleştiği bildirilmiştir. DNA hasarına ilaveten reaktif oksijen turlerinin Cd tarafından indüklenen genomik kalıp kararsızlığı ve karsinojenez ile ilgili olduğu da gösterilmiştir [159]. Moleküler biyolojide son yıllarda meydana gelen hızlı ilerlemeler bazı toksik maddelerin genotoksisitelerinin belirlenmesinde seçici ve duyarlı analizlerin geliştirilmesine olanak tanımıştır. RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA, Randomly Amplified Polymorphic DNA) tekniği günümüzde genotoksisite belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir [106]. Bu yöntem elde edilen genomik DNA'lar üzerinde rastgele seçilmiş olan 9-10 baz çifti uzunluğunda primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılması esasına dayanır. Primerler rastgele bölgelere bağlanırlar ve elde edilen PCR ürünü agaroz jelde koşturularak meydana gelen DNA bantları incelenir. Toksik madde uygulamalarında meydana gelen bantlar kontrol uygulaması ile karşılaştırılır ve değişiklikler belirlenir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda toksik maddelerin DNA üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde RAPD yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra RAPD tekniği az miktarda DNA gerektirmesi, kullanılan organizmanın genomu hakkında çok fazla bilgi gerektirmemesi ve popülasyon içi polimorfizmlerin belirlenmesinde de kullanılması nedeni ile oldukça kullanışlı bir yöntemdir.

Yapılan bu çalışma ile üç jenerasyon boyunca gıdalarda izin verilen limitlerde kadmiyuma maruz kalan bireylerde kadmiyum birikimleri, RAPD-DNA polimorfizmleri, antioksidan enzim genlerinin ifadeleri ve mitokondriyal NADH dehidrojenaz 2 bölgesinin sekansı belirlenmiştir. Çalışma insan genleri ile yüksek homolojiye sahip olan *D. melanogaster* ile yapılarak jenerasyonlar boyu Cd maruziyetinin her bir jenerasyonda ve jenerasyonlar arası etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Tez alışması kapsamında elde edilen verilerin insanların bu metallere maruziyeti hakkında fikir verebileceği ve daha sonraki araştırmalar için ışık tutacağı kanaatindeyiz.

## BÖLÜM 3

### MATERYAL VE METOD

#### 3.1. *Drosophila melanogaster*'in Taksonomisi

*Drosophila melanogaster*; 1830 yılında Johann Wilhem Meigen tarafından tanımlanmıştır. Diptera takımından Drosophilidae familyasının bir üyesi olan *Drosophila melanogaster*'in latince karşılığı "nem seven" anlamına gelmektedir. Meyve sineği ya da sirke sineği olarak da adlandırılır [107].

#### **Taksonomi**

**Alem:** Animalia

**Şube:** Arthropoda (Eklembacaklılar)

Eklembacaklılar olarak bilinen bu şubedeki üyelerin vücutlarında; ilkel bir baş (acron), değişik sayıda segmentlerden oluşan bir gövde ve kuyruk (pijidyum) vardır. Vücuttaki her segment bir çift üye taşımaktadır. Bu şubedeki üyeler birbirlerine bağlanan parçalardan meydana gelmiştir bundan dolayı bunlara eklembacaklı denilmiştir. Kitinli bir dış iskeletleri vardır.

**Altşube:** Mandibulata – Antennata

Bu alt şubedeki canlılarda başlarının üçüncü segmenti vardır. Bu da besinleri çiğnemek için işe yarar.

**Sınıf:** Insecta – Hexapoda

Hexapoda - Insecta (Altı bacaklılar - Böcekler)

Bu grup çok zengindir. Altı bacaklı eklembacaklılardır. Vücutları; baş (cephalon), göğüs (thoraks) ve karın (abdomen) olarak üç bölümden oluşmaktadır. Baş kısmında bir çift birleşik gözleri vardır. Hareket yeteneğinde bir çift antenleri vardır. Göğüs segmentlerinin de her birinde bir çift bacak bulunur.

**Alt sınıf:** Pterygota

Pterygota (Kanatlı böcekler)

Bu sınıf kanatlı böcekleri içerir.

**Üst takım:** Mecopteroidea

**Takım:** Diptera

Diptera (İkikanatlılar)

Bu takımın göğüs kısmından bir çift kanat çıkmaktadır. Bu takımdaki böceklerin arka kanatları halter isminde tokmak şeklinde bir denge organına dönüşür. Bu şekilde diğer böceklerden ayrılmaktadır.

**Alt takım:** Brachycera

Brachycera (Kısa antenliler)

Farklı büyüklüklere sahip 3 segmentte antenleri vardır. Bunlarda en büyük segment üçüncü segmenttir. Üçüncü segmentte arista isminde kıl şeklinde bir çıkıntı vardır. Ergin bireyleri karada yaşamaktadır.

**Aile:** Drosophilidae

Drosophilidae (Sirke sinekleri – Meyve sinekleri)

Boyları 3-4 mm'dir. Bu sinekler genelde çürümekte olan meyve ve bitkilerin çevresinde gelişmektedirler.

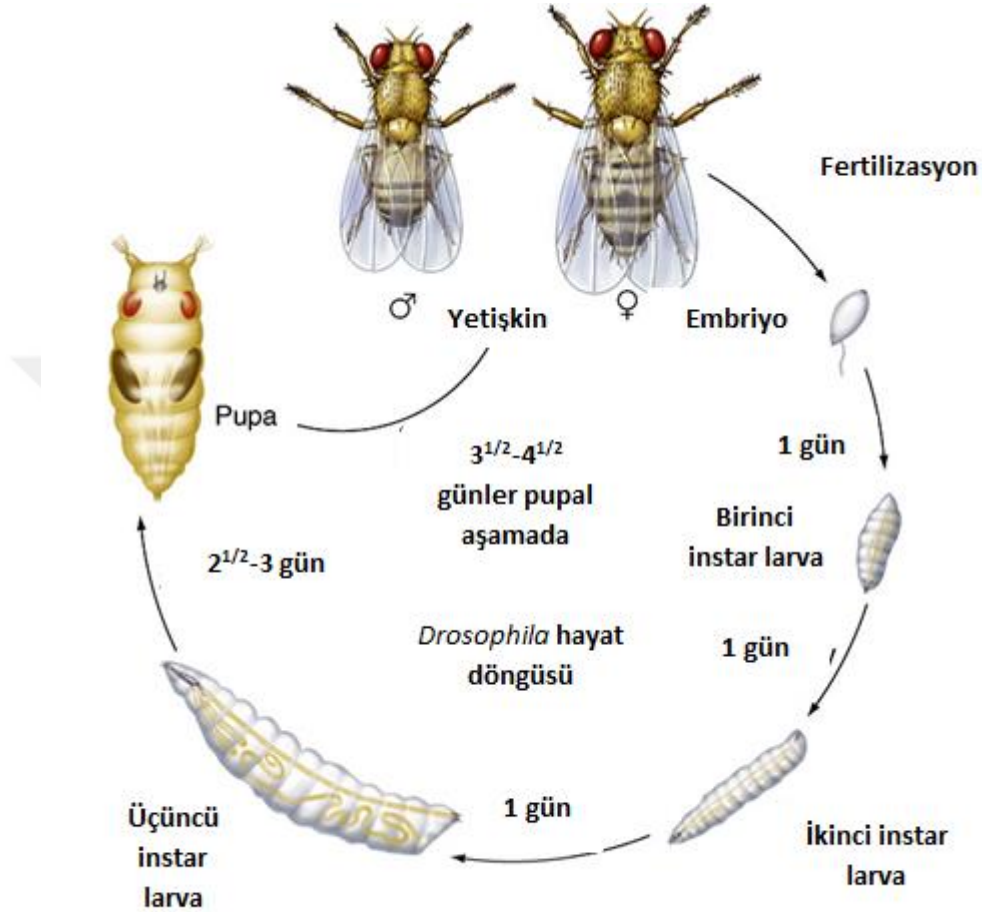
**Cins:** Drosophila

**Tür:** *Drosophila melanogaster* [108, 109]

### 3.1.1. *Drosophila melanogaster*' in Hayat Döngüsü

Laboratuvarında *Drosophila melanogaster* 25±1°C'de ve %60 bağıl nem şartlarında üretilmektedir. Bu şartlarda birinci evre larva, döllenmiş bir *D. melanogaster* yumurtasından 22-24 saat sonra oluşur. Birinci evre larvadan sonra hayat döngüsü ikinci evre larva, üçüncü evre larva, prepupa, pupa ve dokuzuncu günün sonunda ergin birey oluşacak şekilde devam etmektedir. Çevresel faktörler bu süreçte değişiklik olmasına sebep olabilir. Bu faktörler; sıcaklık, beslenme, nem, ışık, kontaminasyon, radyasyon olabilmektedir [110]. Yüksek sıcaklığa maruz kalan erkek bireylerde fertilité gözlemlenebilir. Ayrıca yüksek sıcaklık; bakteri ve mantar oluşumuna da neden olabilmektedir. Düşük sıcaklığın etkisi ise yaşam döngüsünü uzatmaktadır [111]. Hayat döngüsü 28°C'de 7 günde tamamlanır, sıcaklık 31°C'de olduğunda ise erkek bireylerde kısırılık görülebilir, hatta ölüm bile gerçekleşebilir [112]. Tam başkalaşım (holometabol)

geçiren *D. melanogaster* yumurta, larva ve pupa dönemlerini yaklaşık 10 günde tamamlamaktadır (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. *D. melanogaster*' in hayat döngüsü [113]

Meyve sineği ya da sirke sineği olarak da adlandırılan *D. melanogaster* yüz yıldan daha uzun süredir model organizma olarak kullanılmaktadır. İlk olarak Thomas Hunt Morgan tarafından 1901 yılında ilk kez Mendel tarafından önerilen genlerin kromozomlarda bulunduğu teorisinin kanıtlanmasında kullanılmıştır [114]. Morgan kromozomların kalıtımdaki rolünü keşfi ile 1933 yılında Fizyoloji ve Tıp alanında Nobel ödülü kazanmıştır. Herman Müller ise 1946 yılında X ışınlarının *Drosophila*'da mutasyona neden olduğunu kanıtladığı çalışması ile yine Fizyoloji ve Tıp alanında

Nobel ödülü kazanmıştır. 1910 yılından 1960'lara kadar *Drosophila* üzerine de yapılan genetik çalışmalar biyolojik sistemlerde yeni keşiflere neden olmuştur. Son yıllarda toksikoloji çalışmalarında başarılı bir model organizma olarak kullanılan *Drosophila*; kolay ve ucuz kültür oluşturma ve devam ettirme koşulları, çok sayıda döl vermesi ve kısa sürede ergin bireyler elde edilebilmesi ayrıca basit genetik yapısı, sadece dört çift kromozom içermesi ve tüm genom dizisinin bilinmesi nedeni ile uzun yıllardır model organizma olarak kullanılmaktadır. Büyük bir çoğunluğu (%95) üç kromozomunda bulunan yaklaşık 13.600 gen tanımlanmıştır. Bu genlerden %77'sinin insan hastalık genleri ile eşleştiği ve daha da ötesi gen ifadesinin düzenlenmesi ve metabolizma ile ilgili proteinlerin insandakiler ile yakın benzerlik gösterdiği saptanmıştır [115].

### 3.1.2. Denemede Kullanılan *D. melanogaster* Kültürünün Yetiştirilmesi

Tez çalışmasında kullanılan *D. melanogaster* bireyleri Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan laboratuvarında yetiştirilmiştir. Bu bireyler tüm stok çalışmaları ve tez çalışmaları süresince kontrollü koşullar altında  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$  sıcaklık ve  $\%60\pm 10$  oransal nem içeren inkübatörde karanlık ortamda kültüre alınmıştır (Şekil 3.2.). Stok kültürler yumurta bırakmalarının ardından yeni ve taze besin içeren şişelere aktarılarak sağlıklı kültür devamlılığı sağlanmıştır.



Şekil 3.2. Sinek kültürlerinin inkübatördeki görünümü

### 3.2. Besiyerinin Hazırlanışı

Stok kültür ve tez çalışmalarında kullanılan bireyler steril cam şişelerde aşağıda formülasyonu verilen besiyerinde çoğaltılmıştır. Bozcuk [116] tarafından geliştirilen standart besiyerinde toz şeker, mısır unu, bira mayası, agar agar ve distile su (Tablo 3.1.) bulunmakta ayrıca kontaminasyonu önlemek için asit karışımı (propiyonik asit, ortofosforik asit ve distile su) kullanılmaktadır (Tablo 3.2.). Asit karışımı besiyeri hazırlanmadan önce hazırlanmış ve stok halde depolanmıştır [117].

**Tablo 3.1.** Standart *Drosophila* besiyeri malzemeleri ve miktarları

Malzeme	Miktar
Şeker	47 g
Mısır unu	52 g
Maya	9,5 g
Agar	3 g
Asit karışımı	3 ml
Distile su	510 ml

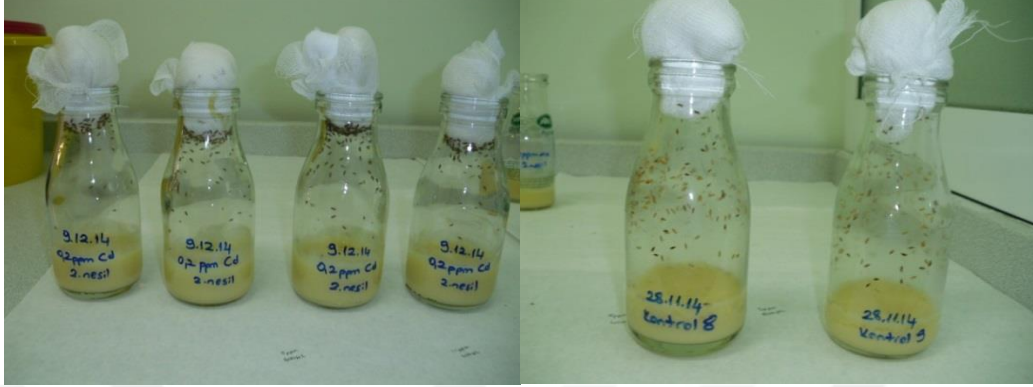
Besiyeri hazırlanırken asit karışımı hariç tüm malzemeler derin bir kaptaki karıştırılarak katılaşıncaya kadar pişirilmiştir. Katılaştıktan sonra besiyeri kısa süre soğutulmuş ve üzerine asit karışımı eklenmiştir. İyi karıştırılan besiyeri sıcak halde iken eşit miktarda olacak şekilde steril şişelerde dökülmüş ve yine steril şekilde kuruması sağlanmıştır.

**Tablo 3.2.** Asit karışımında bulunan malzemeler ve miktarları

Malzeme	Miktar
Propiyonik asit	386 ml
Ortofosforik asit	83 ml
Distile su	1081 ml
<b>Toplam</b>	<b>1550 ml</b>

Hazırlanan besiyerleri tam olarak katılaştıktan ve şişelerin iç kısmı kuruduktan sonra hidrofob pamuk ve steril gazlı bezden yapılan steril tamponlar ile şişelerin ağzı kapatılmıştır. Çalışmamızda kültür devamlılığı ve uygulama yapılması için kullanılan

tüm besiyeleri taze olarak hazırlanmış ve bekletilmeden kullanılmıştır (Şekil 3.3.) [117].



Şekil 3.3. Besiyeri hazırlanıp kuruyunca aktarılan sineklerin görüntüsü

### 3.3. Kadmiyum Uygulanması

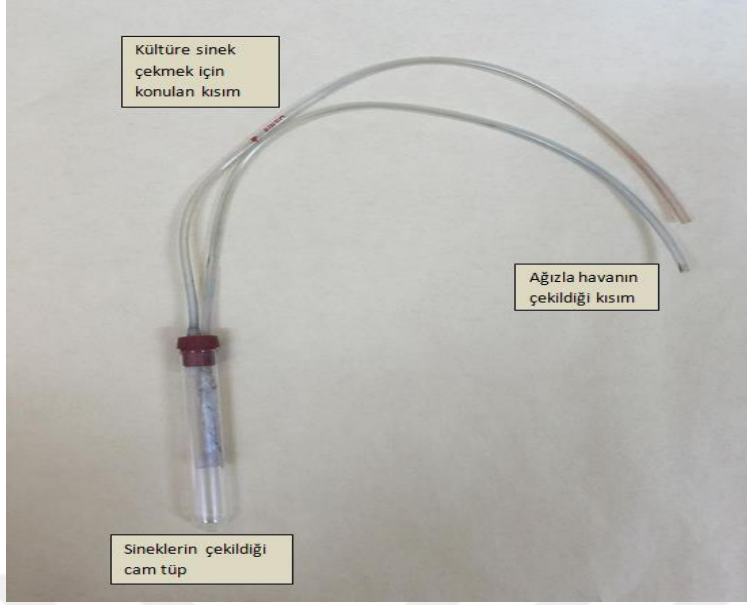
Denemede ülkemizde “Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ” ile belirlenmiş olan Cd miktarları kullanılmıştır. Tebliğde tahıllar, etler ve sebzeler için farklı konsantrasyonlar belirlenmiş olup, çalışmamızda tahıllarda (0.1 ppm) ve sebzelerde (0.2 ppm) izin verilen limitler kullanılmıştır (Tablo 2.1.). Cd uygulaması için stok kültürden aynı gelişim dönemine ait ergin sinekler iki farklı konsantrasyonda Cd ile hazırlanmış standart besiyeri içeren şişelere transfer edilerek bu ortamda beslenmeleri sağlanmıştır. Besiyeri şişeye dökülmeden önce 2 farklı konsantrasyondaki Cd daha önce hesaplanan miktarlarda şişelere konulmuş, üzerine hazırlanan taze besiyeri eklenerek homojen hale gelinceye kadar karıştırılıp katılaşmaya bırakılmıştır. Her bir konsantrasyon için her birinde 25 adet sinek olmak üzere 3 farklı grup ve her grup için 10 adet şişe ile denemeler kurulmuştur.

Denemelerde kullanılacak bireylerin aynı yaşta olması için ilk olarak yumurtlamaya yakın olan dişi bireyler stoktan seçilip yeni hazırlanmış ve kurumuş olan besiyerlerine aktarılmıştır. Birkaç günde yumurta bırakan dişiler besiyerinden uzaklaştırılmıştır. Yumurtadan ergin birey oluşumu yaklaşık 9-10 günde gerçekleşmektedir. Böylece yaşları yakın dişi ve erkek bireyler elde edilmiştir. Kontrol, 0.1 ppm Cd ve 0.2 ppm Cd olacak şekilde üç grup ve 10 tekrarlı besiyerleri hazırlanıp kuruduktan sonra her şişeye yaklaşık 15-20 dişi ve erkek bireyler konulmuştur. Bireyler

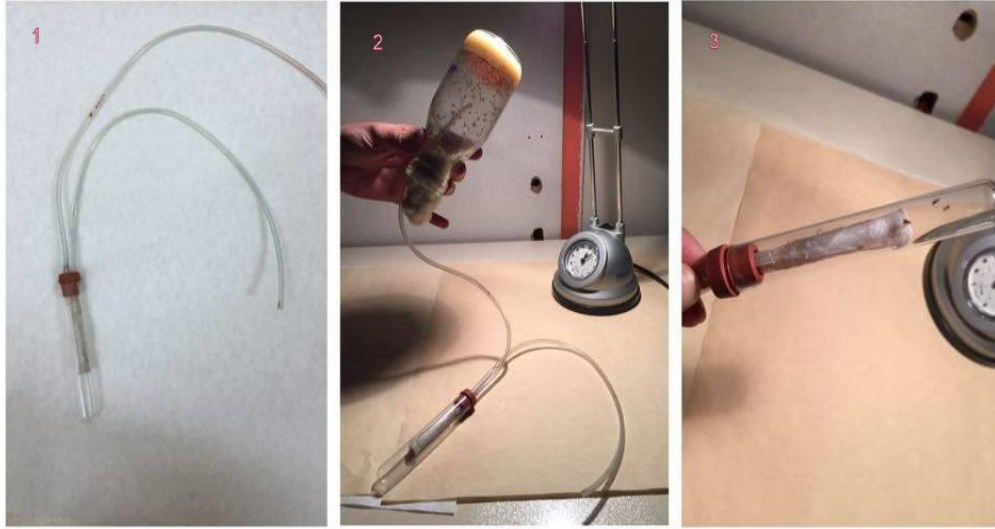
besiyerlerine aktarıldıktan sonra 1. 5. ve 10. günlerde her deneme şişesinden yaklaşık eşit miktarda örnek aspiratör ile çekilerek genetik reaksiyonların fiksasyonu için saf alkol içeren 15 ml'lik falkon tüplere konulup -20°C'lik derin dondurucuda (Vestel) muhafaza edilmiştir. Yaşam döngüsü 9-10 günde gerçekleştiği için çiftleşen dişi ve erkek bireyler bu sürede yumurtalarını bırakmıştır. 10. günden sonra deneme şişelerinde hiç ergin birey bırakılmamıştır. Yeni çıkan bireyler ikinci jenerasyon bireyleridir. Eşit miktarlarda kontrol, 0.1 ppm Cd ve 0.2 ppm Cd şeklinde üç grup olacak şekilde ve 10 tekrarlı ikinci jenerasyon için deneme kurulmuştur. 1. 5. ve 10. günlerde her deneme şişesinden yaklaşık eşit miktarda örnek aspiratör ile çekilerek saf alkol içeren 15 ml'lik falkon tüplere konulup -20°C'lik dondurucuda muhafaza edilmiştir. Yaşam döngüsü 9-10 günde gerçekleştiği için çiftleşen dişi ve erkek bireyler bu sürede yumurtalarını bırakmıştır. 10. günden sonra deneme şişelerinde hiç ergin birey bırakılmamıştır. Yeni çıkan bireyler üçüncü jenerasyon bireyleridir. Eşit miktarlarda kontrol, 0.1 ppm Cd ve 0.2 ppm Cd şeklinde üç grup olacak şekilde ve 10 tekrarlı üçüncü jenerasyon için deneme kurulmuştur.

#### **3.4. Çekme Yöntemi**

Kontrol ve Cd içeren ortamlarda kültüre alınan sinekler uygulamayı takiben 1., 5. ve 10. günlerde ağız aspiratörü (Şekil 3.4.) ile toplanarak 15 ml hacminde falkon tüplere aktarılmıştır. Genetik analizlerde kullanılacak örnekler saf alkol içeren tüplere aktarılarak analizler yapılincaya kadar -20 °C dondurucuda saklanmıştır. Kadmiyum belirlenmesinde kullanılacak sinekler ise alkol içermeyen tüplere alınmıştır.



Şekil 3.4. Aspiratör ve bölümleri



Şekil 3.5. Sinek çekme aşamaları 1) aspiratör görünümü 2) aspiratörün kullanım şekli 3) cam tüpe çekilen sinekler

### 3.5. Kadmiyum Miktarının Belirlenmesi

Çalışmada Cd miktarının belirlenmesi için her gruptan 3 tekrarlı olmak üzere *D. melanogaster* bireyleri alınmış 1 ml nitrik asit (% 65'lik) içerisinde çözünürleştirme işlemi yapılmıştır. Çözünürleştirilen örneklerdeki Cd miktarı Agilent 7700 x ICP-MS

cihazı ile TÜTAGEM (Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Merkezi)'den hizmet alımı yapılarak saptanmıştır.

### 3.6. Genetik Analizler

Çalışmamızda kontrol ve Cd uygulaması yapılan *D. melanogaster* bireylerinde genetik analizleri kapsamında Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik Farklılık (RAPD), SOD, KAT ve GS gen ifadeleri ve NADH Dehidrojenaz 2 bölgesinin DNA dizisinin belirlenmesi çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalardan RAPD ve NADH Dehidrojenaz 2 bölgesinin DNA dizisinin belirlenmesinde sineklerden izole edilen DNA, gen ifadeleri çalışmalarında ise RNA kullanılmıştır. DNA ve RNA izolasyon işlemlerinde her bir tekrar için tek bir birey kullanılmıştır. İzolasyon yapılmadan önce bireyler 2 ml hacminde tüplere alınmış ve üzerlerine 3.2 mm çapında 1 adet paslanmaz çelik bilye (Next Advance SSB32 Stainless Steel Beads) konularak doku parçalayıcı cihazında (Tissue Lyser LT, Qiagen) 15 dk süre ile parçalanmıştır. Bireyler tamamen parçalandıktan sonra izolasyon prosedürleri başlatılmıştır.

#### 3.6.1. DNA İzolasyonu

Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda Cd içeren besiyerlerinde bulunan *D. melanogaster* erginlerinden Genomik DNA'lar DNeasy® Tissue- Blood (Qiagen, USA) kit ile kit protokolü kullanılarak izole edilmiştir. Bu protokole göre,

1-Parçalanmış örneklerin üzerine 180 µl ATL tamponu eklenmiş ve iyice karıştırıldıktan sonra üzerine 20 µl proteinaz K eklenerek 56 °C'de 3 saat bekletilmiştir.

2-Bu karışımın üzerine 200 µl Buffer AL eklenerek iyice vortekslenmiştir.

3-Karışımın üzerine 200 µl etanol (96-100 %) eklenerek vortekslenmiştir.

4-Tüm karışım kit içerisinde bulunan kolonlu yeni tüpe konularak 6000 g de santrifüj edilmiş, kolonun altındaki tüp ve sıvı atılarak yeni tüp konmuştur.

5-Kolona 500 µl Buffer AW1 eklenmiş ve 6000 g de 1 dk santrifüj edilerek alttaki tüp atılmıştır.

6-Kolona 500 µl Buffer AW2 eklenmiş ve 20.000 g de 3 dk santrifüj edilerek alttaki tüp atılmış ve kolon yeni bir kapaklı tüpe alınmıştır.

7-Membranın tam ortasına 60 µl Buffer AE eklenmiş, oda sıcaklığında 1 dk bekletildikten sonra 6000 g de 1 dk santrifüj edilerek izolasyon tamamlanmıştır.

### 3.6.2. DNA Miktarının Belirlenmesi

DNA izolasyonu sonrasında elde edilen DNA miktarlarının belirlenmesi Qubit® Fluorometer (Invitrogen) cihazı ile Qubit® dsDNA BR Assay Kit protokolüne göre yapılmıştır. Bu protokole göre ilk olarak kit içerisinde bulunan tampon ve reaktif ile Qubit çalışma çözeltisi hazırlanmıştır. Kit içerisinde bulunan standartların okutulması için 10 µl standart, örneklerden elde edilen DNA miktarlarının belirlenmesi için ise 2 µl örnek DNA'sı üzerine toplam hacim 200 µl olacak şekilde Qubit çalışma çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra karışımlar 2-3 saniye vorteks yapılmış ve 2 dakika oda ısısında inkübasyon sonrasında cihazda okutulmuştur.

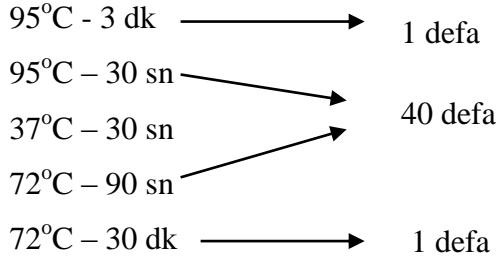
### 3.6.3. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik Farklılık; RAPD Yöntemi

DNA izolasyonu sonucunda kontrol ve uygulama gruplarından elde edilen total DNA'lar, PCR reaksiyonu öncesi nükleaz içermeyen su kullanılarak 25 ng/µl konsantrasyona sulandırılmış ve kalıp DNA olarak kullanılmıştır. RAPD-PCR analizi için 25 µl PCR reaksiyonu hazırlanmıştır (Tablo 3.3.).

**Tablo 3.3.** RAPD PCR için gerekli malzemeler

Malzeme	Miktar
Master mix (Amplitaq gold)	12,5 µl
Primer	0,5 µl
DNA	2 µl
Su	10 µl
<b>Toplam</b>	<b>25 µl</b>

Tüm örnekler PCR tüplerine pipetlenince zaman kaybedilmeden tüpler Applied Biosystems® ProFlex™ PCR cihazına konulup PCR işlemi başlatılmıştır. PCR işleminde döngüler aşağıda belirtildiği gibidir.



Çalışmada 9-11 bazlık 6 farklı RAPD primeri kullanılmış bunlardan 4 tanesi anlamlı bant vermiş ve 4 tanesi de analizlerde kullanılmıştır (Tablo 3.4.);

**Tablo 3.4.** RAPD analizinde kullanılan primerler ve baz dizileri

Primer ismi	Baz dizisi
SP2	5' GGG CAT CGG C-3'
OPA11	5' CAA TCG CCG T-3'
RAPD2	5' ACG GTA CCA G-3'
B18	5' CCA CAG CAG T-3'
P3	5' TGG CCA GTG A-3'
OPW10	5' TCG CAT CCC T-3'

Elde edilen PCR ürünleri % 2 agaroz jel + ethidium bromit, 2×TAE (Tris 1.6 M, asetik asit 0.8 M, EDTA 40 mM) tampon içerisinde 6 saat süre ile yürütülmüştür. Moleküler ağırlık standardı olarak 100 baz çiftlik DNA Ladder (Geneaid) kullanılmıştır. Elde edilen bantlar UV transilluminator (Infinity Capture, Vilber Lourmat) ile fotoğraflanmış ve moleküler ağırlık (baz çifti) analizleri yapılmıştır.

#### 3.6.4. RNA İzolasyonu

Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda Cd içeren besiyerlerinde bulunan *D. melanogaster* erginlerinden genomik RNA'lar Purelink RNA Mini Kit (Life Technologies) ile kit protokolü kullanılarak izole edilmiştir. Bu protokole göre, iyice parçalanmış *D. melanogaster* bireylerinin bulunduğu tüpe 600 µl lizis tamponu ve merkaptetanolden oluşan karışım eklenmiş ve çalkalayıcı blok (Bioer Mixing Block Mb-102) cihazında 15-20 dk bekletilmiş ve protokol aşağıda verildiği şekilde uygulanmıştır:

- 1-Örnek-lizis tamponu karışımı 26.000 g de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- 2-Üstteki homojenattan 500 µl alınıp ependorf tüplerine konulmuş, üzerine 500 µl %70'lik etanol konularak vortekslenmiştir.
- 3-Elde edilen karışım bitene kadar kit içerisinde bulunan kolonlu tüplere aktararak 12.000 g de 15 sn santrifüj edilmiş ve altta kalan sıvı atılmıştır
- 4-Kolon üzerine 700 µl yıkama tamponu 1 eklenerek 12.000 g de 15 sn santrifüj edilmiş ve altta kalan sıvıyla birlikte tüpte atılmıştır.
- 5-Kolon üzerine 500 µl yıkama tamponu 2 eklenerek 12.000 g de 15 sn santrifüj edilmiş ve altta kalan sıvı atılmıştır (Bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır).
- 6-Kolon, kurutma amacı ile boş olarak 12.000 g de 1-2 dk santrifüj edilmiş, alttaki tüp atılarak yeni bir kapaklı tüp konulmuştur.
- 7-Kolonun tam merkezine 30 µl RNAaz içermeyen su pipetlenmiş ve oda sıcaklığında 1 dk inkübe edildikten sonra 12.000 g de 2 dk santrifüj edilmiştir.

#### **3.6.5. RNA Miktarının Belirlenmesi**

RNA izolasyonu sonrasında elde edilen RNA miktarlarının belirlenmesi Qubit® Fluorometer (Invitrogen) cihazı ile Qubit® RNA Assay Kit protokolüne göre yapılmıştır. Bu protokole göre ilk olarak kit içerisinde bulunan tampon ve reaktif ile Qubit çalışma çözeltisi hazırlanmıştır. Kit içerisinde bulunan standartların okutulması için 10 µl standart, örneklerden elde edilen RNA miktarlarının belirlenmesi için ise 2 µl örnek RNA'sı üzerine toplam hacim 200 µl olacak şekilde Qubit çalışma çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra karışımlar 2-3 saniye vorteks yapılmış ve 2 dakika oda ısısında inkübasyon sonrasında cihazda okutulmuştur.

#### **3.6.6. cDNA Eldesi**

İzolasyon sonrası elde edilen RNA miktarları ölçülmüş ve tüm örneklerde eşitlenerek (200 ng) cDNA sentezi yapılmıştır. cDNA sentezi High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Invitrogen) ile kit protokolü uygulanarak gerçekleştirilmiştir. İlk olarak PCR tüplerine toplam hacim 10 µl olacak şekilde RNA ve üzerine Tablo 3.5.'te verilen kit içeriği belirtilen miktarlarda pipetlenmiştir.

**Tablo 3.5.** cDNA için gerekli malzeme ve miktarları

<b>Malzeme</b>	<b>Miktar</b>
10X RT Buffer	2 µl
25X dNTP mix	0,8 µl
10X RT Random Primer	2 µl
Reverz Transkriptaz	1 µl
Nükleaz free su	4,2 µl
<b>Toplam</b>	<b>10 µl</b>

Toplam hacmi 20 µl (10 µl örnek+10 µl kit karışımı) olan PCR tüp içerikleri PCR cihazında 25 °C'de 10 dk; 37 °C'de 120 dk ve 85 °C'de 5 dk tutularak cDNA sentezlenmiştir.

### **3.6.7. Kantitatif Real Time-PCR (qRT-PCR) Analizleri**

Antioksidan enzimlere ait gen ekspresyonları qRT-PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Elde edilen cDNA'lar aşağıda verilmiş primerler ile SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems) kullanılarak gen ifadelerindeki değişimler belirlenmiştir. Buna göre her bir reaksiyon için toplam reaksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems), F ve R primerler ve nükleaz free sudan oluşan karışım ve 2 µl cDNA ile reaksiyon başlatılarak qRT-PCR ile sonuçlar alınmıştır. Reaksiyon karışımlarınıla kullanılacak ilgili genlerin F ve R primer dizileri Tablo 3.6.'da verilmiştir;

**Tablo 3.6.** qRT-PCR da kullanılan antioksidan enzimler ve dizilişleri

Primer ismi	Baz dizisi
<b>SOD</b>	(F) 5'-GTTCCGGTGACAACACCAATG-3' (R) 5'-GGAGTCGGTGATGTTGACCT-3'
<b>KAT</b>	(F) 5'-TACGAGCAGGCCAAGAAGTT-3' (R) 5'-ACCTTGTACGGGCAGTTCAC-3'
<b>GS</b>	(F) 5'-TGGGACCAGCAAGTAAAACC-3' (R) 5'-TCGCGAATGTAGAACTCGTG-3'
<b>RP49</b>	(F) 5'-GCTAAGCTGTCGCACAAATG-3' (R) 5'-TGTGCACCAGGAACTTCTTG-3'

qRT-PCR programı; 1 döngü 2 dakika 50°C ve 10 dakika 95°C, bunu takiben, 40 döngü denatürasyon (95°C 15 sn) ve annelling (primer eşleşmesi) ve elongasyon (primer uzaması) (60°C 'de 1 dakika) ile çoğaltılmıştır. qRT-PCR sonucu elde edilen veriler endogen kontrol olarak kullanılan RP49'a göre normalize edilmiş halde grafik olarak, kontrole göre oransal ifade edilmiştir.

### 3.6.8. mtDNA NADH Dehidrojenaz 2 Sekansı

Mitokondriyal NADH Dehidrojenaz 2 sekansı için "DNA İzolasyonu" bölümünde anlatıldığı şekilde izole edilen DNA'lar PCR ile çoğaltılmıştır. Bunun için kullanılan malzemeler ve miktarları Tablo 3.7.'de verilmiştir.

**Tablo 3.7.** Mitokondriyal NADH Dehidrojenaz 2 geni dizilemesi için kullanılan PCR bileşenleri ve miktarları

<b>Malzeme</b>	<b>Miktarı</b>
Kalıp DNA	2 µl
Taq DNA polimeraz	0.2 U
10x Taq Tamponu (KCl içeren)	5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3 µl
10 × dNTPs	1 µl
F primer	1 µl
R primer	1 µl
Nükleaz içermeyen su	36.8 µl
<b>Toplam</b>	<b>50 µl</b>

Tabloda verilen miktarlarda malzeme PCR tüplerine pipetlenmiş ve ABI ProFlex PCR cihazında (30 döngü 94°C denatürasyon (30 s), 55°C annealing (primer eşleşmesi) (30s) ve 72°C elongasyon (primer uzaması) (90s) ile başlangıç 94°C denatürasyon (3 dk) ve son uzatma 72°C (30 dk)) çoğaltılmıştır. Elde edilen PCR ürünü (5 µl) 1 µl yükleme boyası ile agaroz jele yüklenmiş ve kontrol edilmiştir. Kalan DNA ethidium bromit içeren %1.5'lik agaroz jelde 120 V güç ile 3 saat elektroforeze tabi tutularak UV ışığı altında görüntülenmiştir. Jelde görüntülenen bantlar Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Leusden, The Netherlands) kullanılarak jelden saflaştırılmış ve DNA fragmentleri ABI 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies, USA) ile analiz edilmiştir.

### **3.7. İstatistik Analiz**

#### **3.7.1. DNA Analizleri**

Genetic Analyzer'dan gelen gen dizileri öncelikle DNAMAN 3.1 (Lynnon Corporation, Pointe-Claire, Quebec, Canada) ile toplu halde düzenlenip ve tüm türlerde ortak başlangıç ve bitiş noktaları tespit edilmiştir. Elde edilen bu türler toplu halde MEGA 4 ile açılmış ve öncelikle Clustal W kullanılarak (Open gap penalty= 15.0, extend gap penalty = 6.66) düzenlenmiştir. Elde edilen genel dizi görünümü manuel olarak kontrol edilmiştir.

Analizlerin tümünde PAUP 4.0b10 (Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass.) kullanılmıştır. Cluster oluşturulurken, maximum parsimony yöntemi kullanılmıştır. Kullanılan model doğrultusunda elde edilen ağaçlar içinde sınıflandırmayı en doğru açıklayan ağaç, morfolojik özelliklerin de desteği ile TBR branch swapping (Heuristic search, random=1000, PAUP 4.0.b10) analizi ile belirlenmiştir.

### **3.7.2. Verilerin Analizleri**

Ağır metal birikimlerinin karşılaştırılmasında ve Real Time PCR çalışmalarında gruplar arasında gen ekspresyon farklarının belirlenmesinde  $\Delta\Delta C_t$  metodu ayrıca kalibrasyon eğrisi ve düzeltme faktörü olarak RP49 gen ekspresyonu kullanılmıştır. Kontrol grubu ve deneme gruplarının karşılaştırılmasında tek yönlü ANOVA testi yapılmış ve ortalamaların girdiği gruplar Duncan Testi ( $p \leq 0.05$ ) ile belirlenmiştir. Yapılan analizlerin tamamında SPSS 20 (üniversite lisanslı) ve PAUP demo versiyon istatistik paket programları kullanılmıştır.

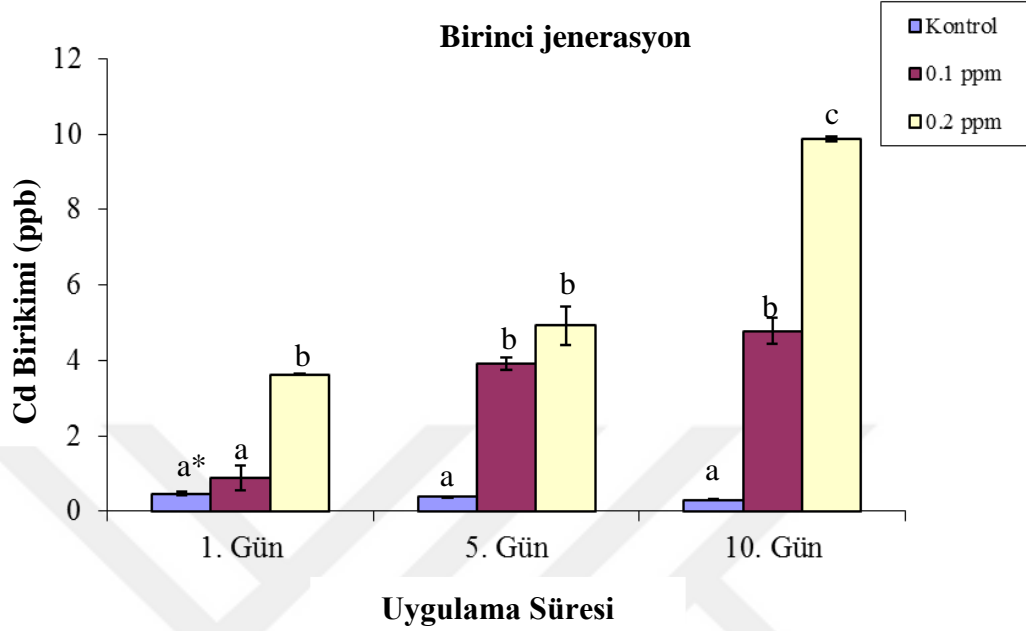
## BÖLÜM 4

### SONUÇLAR

#### 4.1. Kadmiyum Birikimi

##### 4.1.1. Bir Jenerasyon Süresince Cd'ye Maruz Kalan *D. melanogaster* Bireylerinde Konsantrasyona Bağlı Olarak Cd Birikimleri

Bir jenerasyon süresince Cd uygulaması yapılan *D. melanogaster* bireylerinde uygulamanın 1., 5. ve 10. günlerinde belirlenen Cd birikimleri Şekil 4.1.'de verilmiştir. Artan Cd konsantrasyonlarının her üç uygulama zamanında da Cd birikimlerinde kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde farklı Cd birikimine neden olduğu belirlenmiştir (1. günde 0.1 ppm Cd hariç) ( $p \leq 0.05$ ).

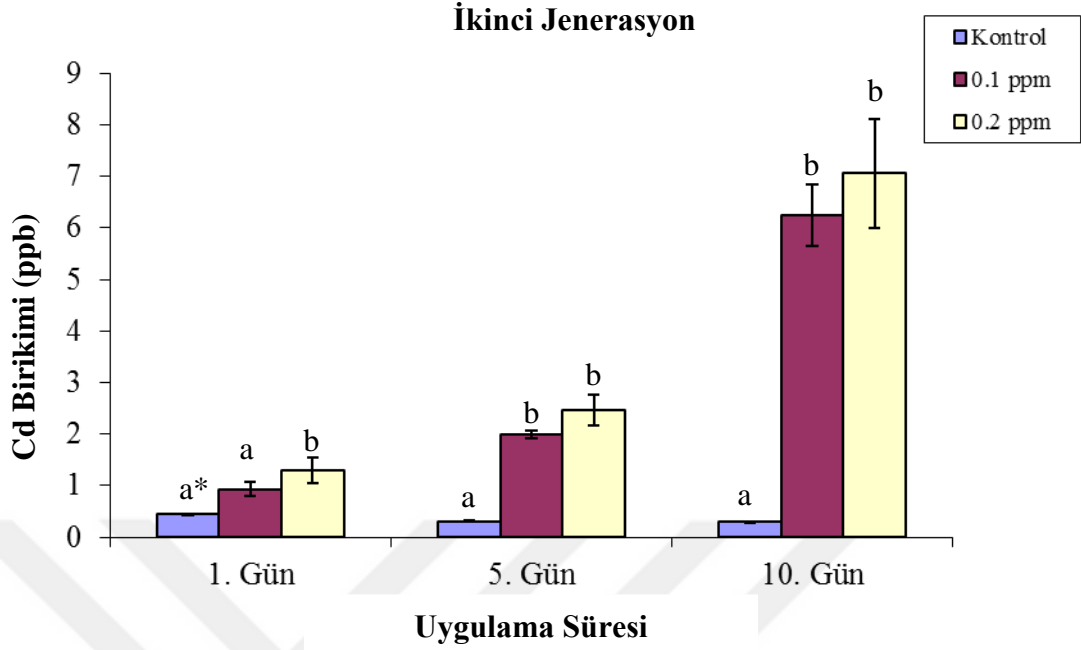


**Şekil 4.1.** Bir jenerasyon boyunca Cd uygulaması yapılan *D. melanogaster* bireylerinde Cd birikimi, n=3, ortalama±standart hata \* Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi,  $P \leq 0.05$ )

En yüksek Cd birikiminin Cd'ye en uzun süre maruz kalan bireylerde 0.2 ppm Cd konsantrasyonunda  $9.86 \pm 0.06$  ppb olduğu saptanmıştır.

#### 4.1.2. İki Jenerasyon Süresince Cd'ye Maruz Kalan *D. melanogaster* Bireylerinde Konsantrasyona Bağlı Olarak Cd Birikimleri

İki jenerasyon sürecince Cd uygulaması yapılan *D. melanogaster* bireylerinde uygulamanın 1., 5. ve 10. günlerinde belirlenen Cd birikimleri Şekil 4.2.'de verilmiştir. Birinci jenerasyona benzer şekilde artan Cd konsantrasyonuna bağlı olarak Cd birikimlerinde kontrole göre istatistik olarak önemli artış meydana geldiği belirlenmiştir ( $p \leq 0.05$ ). En yüksek Cd birikiminin uygulamanın 10. gününde 0.2 ppm konsantrasyonda ( $7.06 \pm 1.06$  ppb) olduğu saptanmıştır.



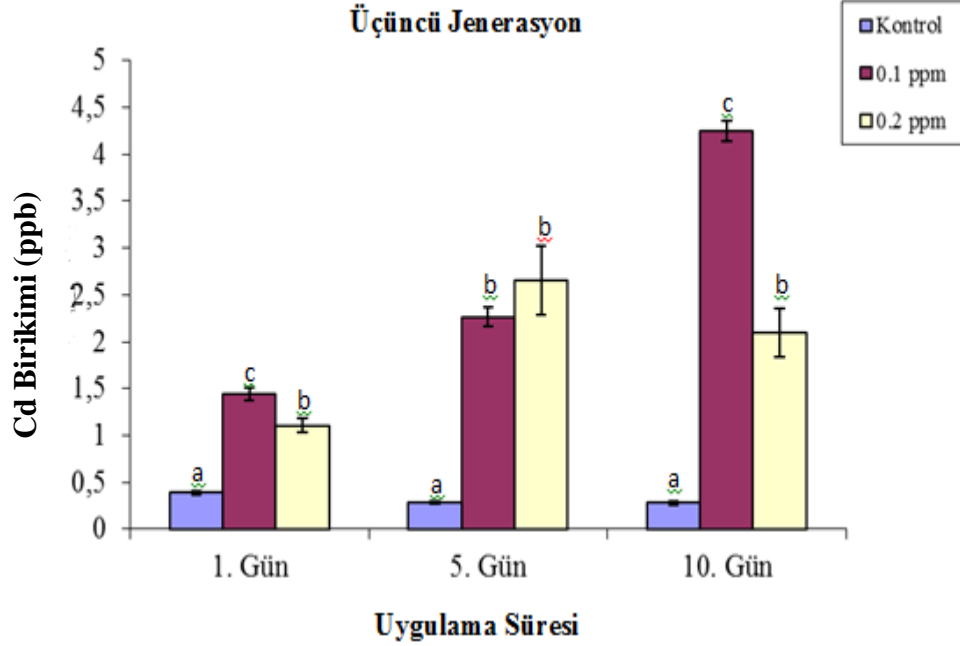
**Şekil 4.2.** İki jenerasyon boyunca Cd uygulaması yapılan *D. melanogaster* bireylerinde Cd birimi, n=3, ortalama±standart hata \* Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi,  $P \leq 0.05$ )

Uygulamanın 1. gününde 0.1 ppm Cd uygulaması yapılan bireylerde Cd birikimi kontrole göre önemli bir fark göstermezken, 0.2 ppm konsantrasyonda meydana gelen birikimin kontrolden istatistiksel olarak önemli ölçüde yüksek olduğu belirlenmiştir. Diğer zamanlarda ise 0.1 ve 0.2 ppm Cd uygulamaları birbirinden istatistiksel olarak fark göstermezken her iki konsantrasyonun kontrolden anlamlı ölçüde yüksek Cd içeriğine sahip olduğu saptanmıştır.

#### 4.1.3. Üç Jenerasyon Süresince Cd'ye Maruz Kalan *D. melanogaster* Bireylerinde Konsantrasyona Bağlı Olarak Cd Birikimleri

Üç jenerasyon sürecince Cd uygulaması yapılan *D. melanogaster* bireylerinde uygulamanın 1., 5. ve 10. günlerinde belirlenen Cd birikimleri Şekil 4.3.'te verilmiştir. Meydana gelen Cd birikimlerinin her üç uygulama süresinde de kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli miktarda yüksek olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte uygulamanın 1. ve 10. günlerinde konsantrasyona bağlı olarak doğrusal bir artışın

olmadığı saptanmıştır. Uygulamanın 5. gününde ise konsantrasyona göre doğrusal bir artış olmasına rağmen 0.1 ve 0.2 ppm Cd konsantrasyonuna maruz kalan bireylerde belirlenen Cd miktarlarının istatistiksel olarak birbirinden farklı olmadığı belirlenmiştir ( $p \geq 0.05$ ).



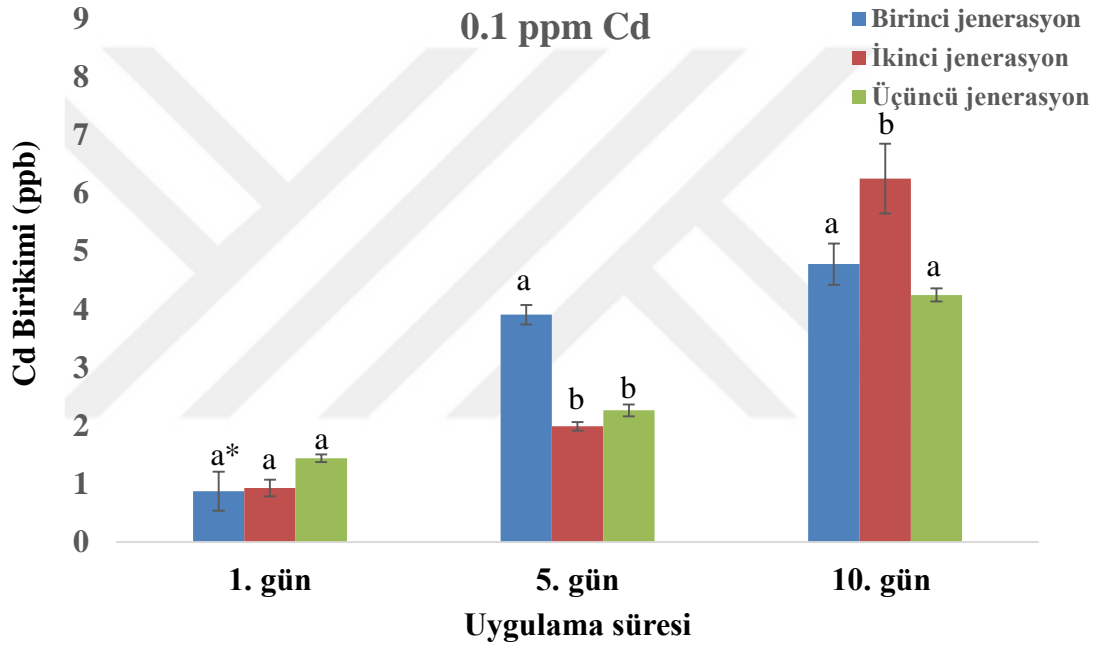
**Şekil 4.3.** Üç jenerasyon boyunca Cd uygulaması yapılan *D. melanogaster* bireylerinde Cd birikimi, n=3, ortalama±standart hata \* Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi,  $P \leq 0.05$ )

En yüksek Cd birikiminin 10 günlük uygulama süresinde 0.1 ppm Cd'ye maruz kalan bireylerde  $4.25 \pm 0.11$  ppb olduğu görülmüştür.

#### 4.1.4. Cd Uygulaması Yapılan *D. melanogaster* Bireylerinde Cd Birikiminde Jenerasyonlar Arası Farklılıklar

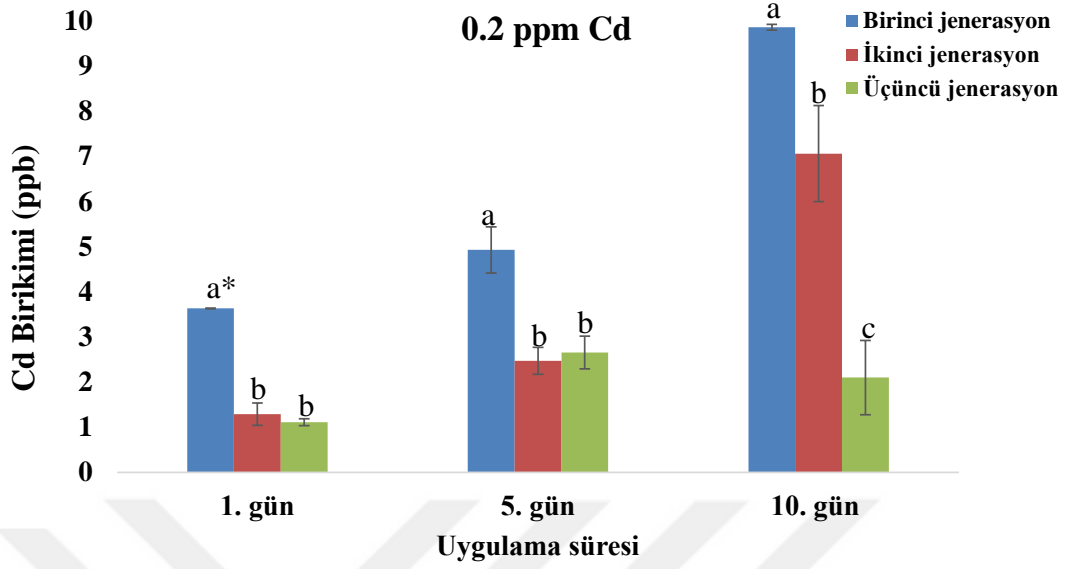
Çalışmamızda her bir jenerasyonda zaman ve konsantrasyona bağlı olarak belirlenen Cd birikim farklılıklarının yanı sıra birikimin jenerasyonlar arası farklılıkları da belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre 0.1 ppm Cd uygulaması yapılan bireylerde farklı uygulama zamanlarında birinci, ikinci ve üçüncü jenerasyon bireylerde saptanan

Cd birikimleri Şekil 4.4.'te verilmiştir. Buna göre, bir gün süre ile 0.1 ppm Cd uygulaması yapılan bireylerde biriken Cd miktarlarının jenerasyonlar arasında istatistiksel olarak önemli olmayan bir değişim gösterdiği ( $p \geq 0.05$ ) belirlenmiştir. 5 günlük uygulamada birinci jenerasyonda belirlenen Cd birikiminin ikinci ve üçüncü jenerasyonlara göre istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek olduğu ( $p \leq 0.05$ ) saptanmıştır. Uygulamanın onuncu gününde ise en yüksek Cd birikiminin ikinci jenerasyon sineklerde saptandığı, birinci ve üçüncü jenerasyon bireylerde ise benzer Cd birikimlerinin olduğu belirlenmiştir ( $p > 0.05$ ).



**Şekil 4.4.** 0.1 ppm Cd uygulamasının birinci, beşinci ve onuncu günlerinde jenerasyonlar arası Cd birikim farklılıkları,  $n=3$ , ortalama±standart hata \* Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi,  $P \leq 0.05$ )

0.2 ppm Cd uygulaması yapılan bireylerde farklı uygulama zamanlarında birinci, ikinci ve üçüncü jenerasyonlardaki bireylerde saptanan Cd birikimleri Şekil 4.5.'te verilmiştir. Buna göre, her üç uygulama zamanı için en yüksek Cd birikiminin birinci jenerasyonda olduğu belirlenmiştir. Uygulamanın birinci ve beşinci günlerinde ikinci ve üçüncü jenerasyon bireylerin Cd birikimlerinde istatistiksel olarak farklılık olmadığı, onuncu günde ise istatistiksel olarak fark gösterdiği belirlenmiştir.



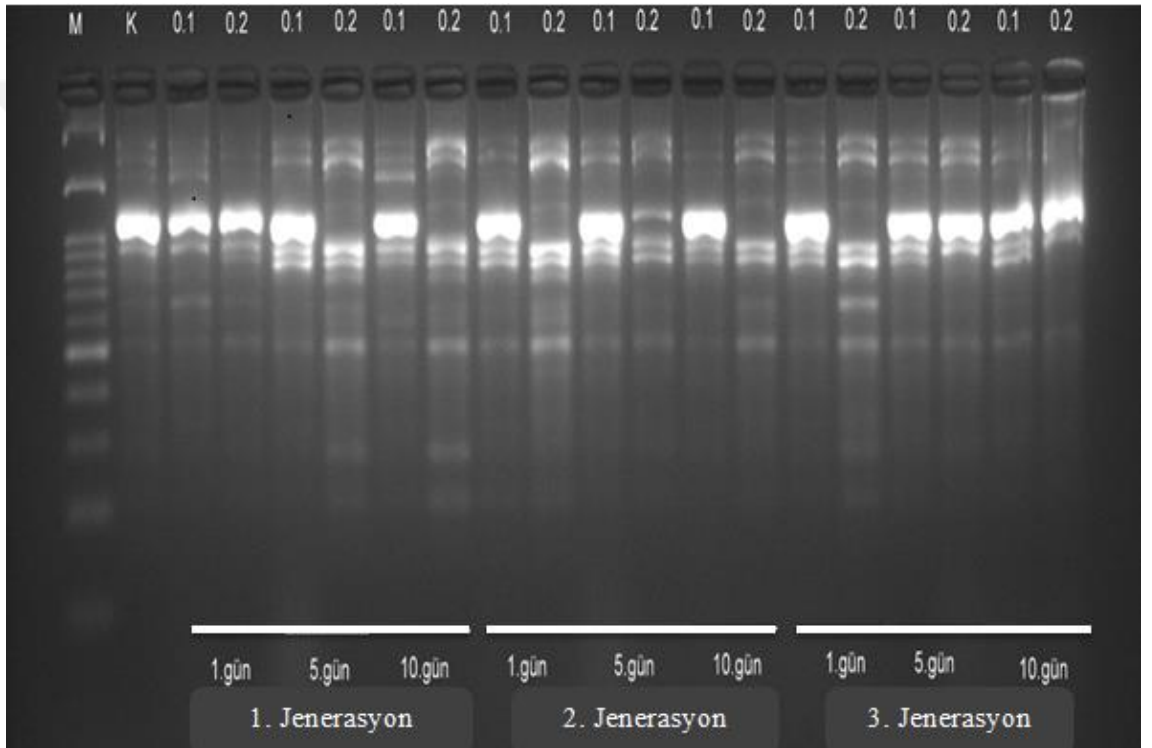
**Şekil 4.5.** 0.2 ppm Cd uygulamasının birinci, beşinci ve onuncu günlerinde jenerasyonlar arası Cd birikim farklılıkları, n=3, ortalama±standart hata \* Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi,  $P \leq 0.05$ )

#### 4.2. RAPD DNA Polimorfizmi

Üç jenerasyon boyunca kontrol ve farklı konsantrasyonlarda Cd uygulaması yapılan *D. melanogaster* bireylerinde DNA polimorfizmlerinin belirlenmesinde anlamlı sonuç veren 4 farklı primere ait agaroz jel fotoğrafları ve kontrole göre yeni oluşan ve kaybolan bantların baz çifti değerleri her bir primer için ayrı ayrı verilmiştir.

#### 4.2.1. RAPD2 Primeri

Kontrol ve Cd uygulaması yapılan bireylerde her bir jenerasyonda uygulamanın birinci, beşinci ve onuncu günlerinde RAPD2 primerine ait agaroz jel fotoğrafı Şekil 4.6.'da verilmiştir. Agaroz jel fotoğrafına göre yapılan analizler sonucunda her bir jenerasyonda Cd uygulamasının kontrol grubuna göre yeni bantların oluşumuna veya var olan bantların kaybolmasına neden olduğu saptanmış ve bu bantların baz çifti (bç) değerleri Tablo 4.1.'de verilmiştir.



Şekil 4.6. RAPD2 primeri jel görüntüsü

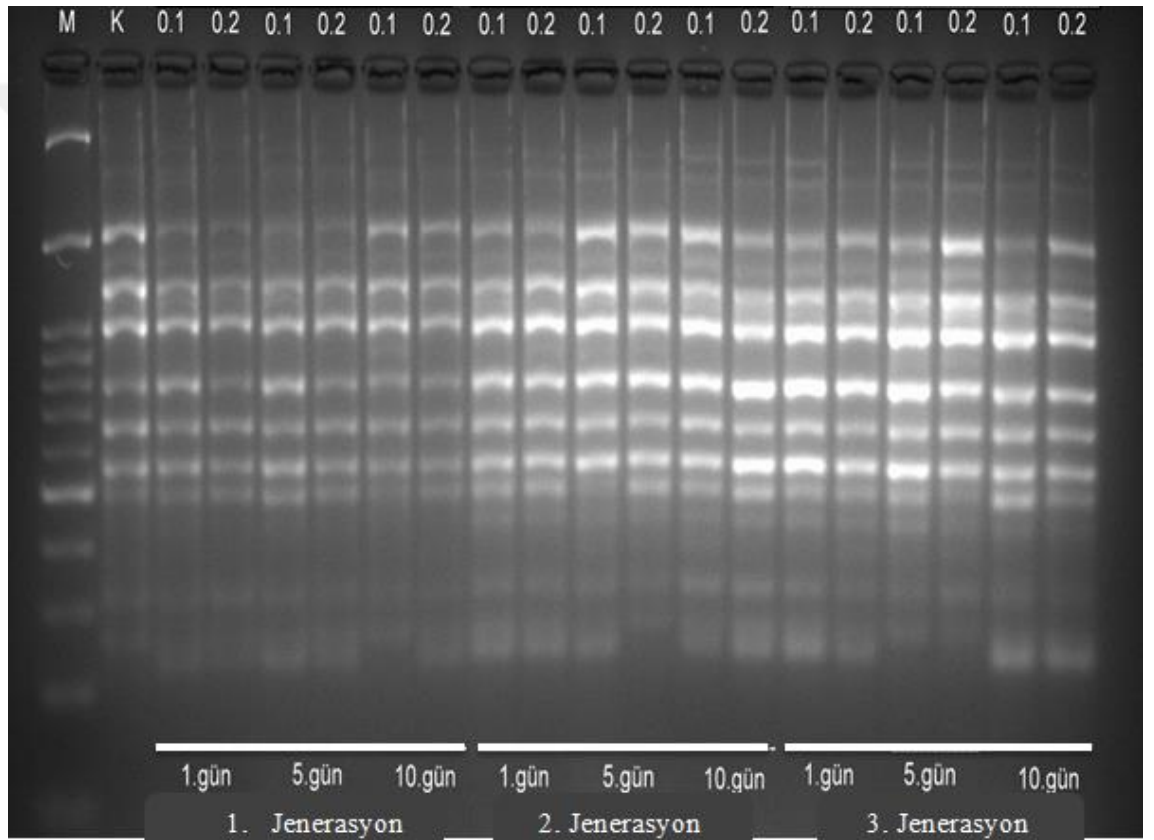
**Tablo 4.1.** Cd uygulaması yapılan *D. melanogaster* bireylerinde RAPD2 primerinde kontrole göre yeni oluşan (Y) ve kaybolan (K) bantlar (baz çifti)

Birinci Jenerasyon						
Kontrol	1. gün		5. gün		10. gün	
	0.1ppm	0.2ppm	0.1ppm	0.2ppm	0.1ppm	0.2ppm
2492; 1628; 1068;936; 542	Y	1699;660 2795;2203; 1122;858; 700	2592;858; 818	2592;2111; 1282;818; 754;300	2592;2111; 1699;858;621	1282;858; 754;300;221
	K	1628;542 2492;2022; 1628;1068	2492; 1628	2492;2022; 1628;1068	2492;2022; 1628	1628;1068; 542
İkinci Jenerasyon						
Kontrol	1. gün		5. gün		10. gün	
	0.1ppm	0.2ppm	0.1ppm	0.2ppm	0.1ppm	0.2ppm
2492; 1628; 1068;936; 542	Y	2592;220 3;818	2592;2111; 858	2795;2111; ;1000;858;500	2795;2297;1215 1122;858	2795;2297; 1353;858; 660
	K	2492;202 2;1628	2492;2022; 1628	2492;2022; ;1068;936;542	2492;2022; 1628;1068; 542	2492;2022; 1628;1068
Üçüncü Jenerasyon						
Kontrol	1. gün		5. gün		10. gün	
	0.1ppm	0.2ppm	0.1ppm	0.2ppm	0.1ppm	0.2ppm
2492; 1628; 1068;936; 542	Y	858	2795;2203; 1282;858; 660;500	2795;2111; 818	2111;500 2592;858;500	1215;1000
	K	1628;542	2492;1628; 1068;542	2492;2022; 1628	2022;1628; 542	2492;1628; 542
						2492;2022; 1068;936; 542

Tablo 4.1.'e göre RAPD2 primerinde kontrolde 542-2492 baz çifti arasında 5 adet bant saptanmıştır. Elde edilen verilere göre bir ve iki jenerasyon süresinde Cd uygulanan bireylerde en fazla bant değişiminin uygulamanın beşinci gününde 0.2 ppm Cd konsantrasyonunda olduğu saptanmıştır. Belirtilen konsantrasyon ve uygulama süresinde birinci jenerasyon bireylerde bant değişimleri 6 adet yeni oluşan ve 4 adet kaybolan bant olmak üzere toplam 10 adet ve ikinci jenerasyon bireylerde ise 6 adet yeni oluşan ve 6 adet kaybolan olmak üzere toplam 12 adet olarak saptanmıştır. Üçüncü jenerasyonda ise en fazla bant değişiminin yine 0.2 ppm Cd konsantrasyonunda ancak uygulamanın birinci gününde 6 adet yeni oluşan ve 4 adet kaybolan olmak üzere toplam 10 bant olduğu saptanmıştır.

#### 4.2.2. B18 Primeri

Kontrol ve Cd uygulaması yapılan bireylerde her bir jenerasyonda uygulamanın birinci, beşinci ve onuncu günlerinde B18 primerine ait agaroz jel fotoğrafı Şekil 4.7.'de verilmiştir. Agaroz jel fotoğrafına göre yapılan analizler sonucunda her bir jenerasyonda Cd uygulamasının kontrol grubuna göre yeni bantların oluşumuna veya var olan bantların kaybolmasına neden olduğu saptanmış ve bu bantların baz çifti değerleri Tablo 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.7. B18 primeri jel görüntüsü

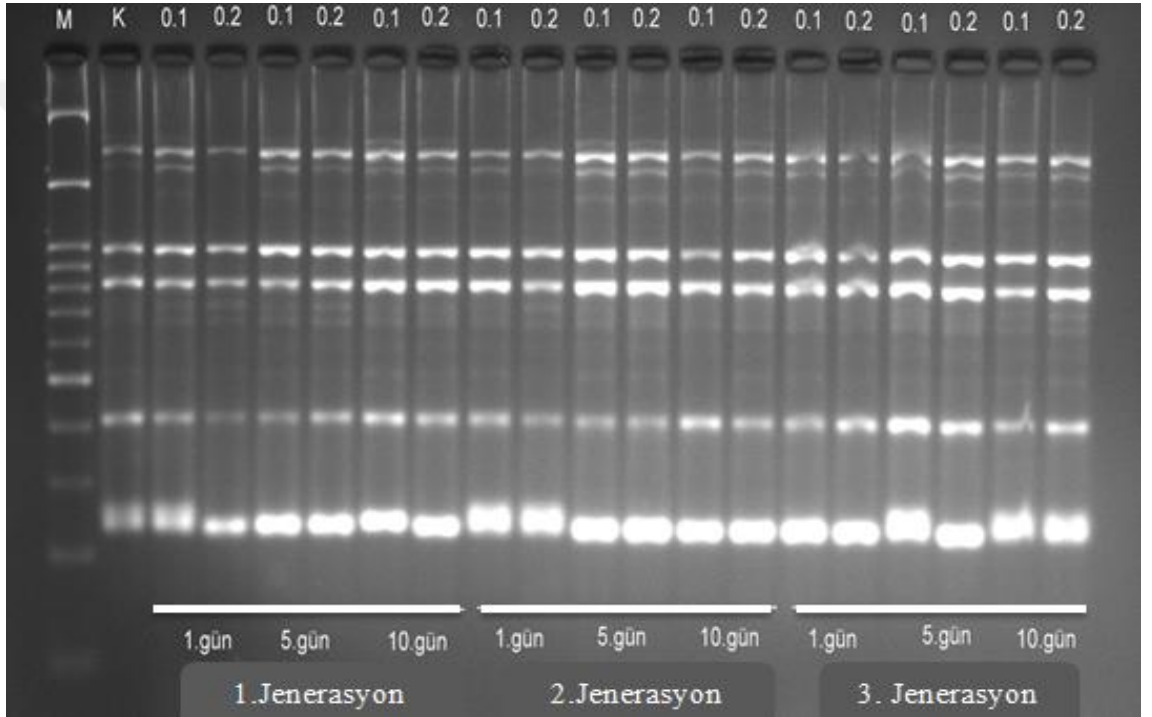
**Tablo 4.2.** Cd uygulaması yapılan *D. melanogaster* bireylerinde B18 primerinde kontrole göre yeni oluşan (Y) ve kaybolan (K) bantlar (baz çifti)

Birinci Jenerasyon						
Kontrol	1. gün		5. gün		10. gün	
	0.1ppm	0.2ppm	0.1ppm	0.2ppm	0.1ppm	0.2ppm
1576; 1344; 1199; 1000; 817;668 ;562	Y 1616;800; 682	1673;1060 ;682;513	1673;1060; 839;682; 574;500	1673;1060; 839;682;574 ;513	1673;1060;857; 682; 574	1673;1277; 1060;839; 682;574;528
	K 1576;1344; 817;668	1576;1344 ;1000;668	1576;1344; 1000;817; 668;562	1576;1344; 1000;817; 668;562	1576;1344; 1000;817;668 ;562	1576;1344; 1199;1000; 817;668;562
İkinci Jenerasyon						
Kontrol	1. gün		5. gün		10. gün	
	0.1ppm	0.2ppm	0.1ppm	0.2ppm	0.1ppm	0.2ppm
1576; 1344; 1199; 1000; 817;668 ;562	Y 1748;1277; 857;682; 613;528	1748;1277; 1060;839; 725;613;528	1616;1060; 839;725; 613	1748;1277; 857; 725;613	1616;1414; 1277;1060; 857; 725;613	1616;839; 725;613;528
	K 1576;1344; 1199;817; 668;562	1576;1344; 1199;1000; 817;668;562	1576;1344; 1000;817; 668;562	1576;1344; 1199;1000; 817;668; 562	1576;1344; 1199;1000; 817; 668	1576;817; 668;562
Üçüncü Jenerasyon						
Kontrol	1. gün		5. gün		10. gün	
	0.1ppm	0.2ppm	0.1ppm	0.2ppm	0.1ppm	0.2ppm
1576; 1344; 1199; 1000 ;817;668 ;562	Y 1060;839; 725;613; 528;478	1616;1060 ;839;725; 613;528	1673;839; 725;613; 528	1060;839;725; 574	1673;1277; 857;800	1616;1060; 857;725;613; 528
	K 1344;1000; 817;668; 562	1576;1344 ;1000;817; 668;562	1576;817; 668;562	1344;1000; 817;668;562	1576;1344; 1000;817	1576;1344; 1000;817; 668;562

Tablo 4.2.'ye göre B18 primerinde kontrolde 562-1576 baz çifti arasında 7 adet bant saptanmıştır. Elde edilen verilere göre bir ve iki jenerasyon Cd'ye maruz kalan bireylerde en fazla bant değişiminin 0.2 ppm Cd konsantrasyonunda ve uygulamanın ilk gününde olduğu saptanmıştır. Bant değişimlerinin her iki jenerasyonda toplam 14 adet bant (7 adet yeni oluşan ve 7 adet kaybolan) olduğu belirlenmiştir. Üçüncü jenerasyonda ise uygulamanın hem birinci hem de onuncu günlerinde 6 adet yeni oluşan ve 6 adet kaybolan olmak üzere toplam 12 bant ile 0.2 ppm Cd uygulamasında olduğu saptanmıştır.

#### 4.2.3. OPA11 Primeri

Kontrol ve Cd uygulaması yapılan bireylerde her bir jenerasyonda uygulamanın birinci, beşinci ve onuncu günlerinde OPA11 primerine ait agaroz jel fotoğrafı Şekil 4.8.'de verilmiştir. Agaroz jel fotoğrafına göre yapılan analizler sonucunda her bir jenerasyonda Cd uygulamasının kontrol grubuna göre yeni bant oluşumuna veya var olan bantların kaybolmasına neden olduğu saptanmış ve bu bantların baz çifti değerleri Tablo 4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.8. OPA11 primeri jel görüntüsü

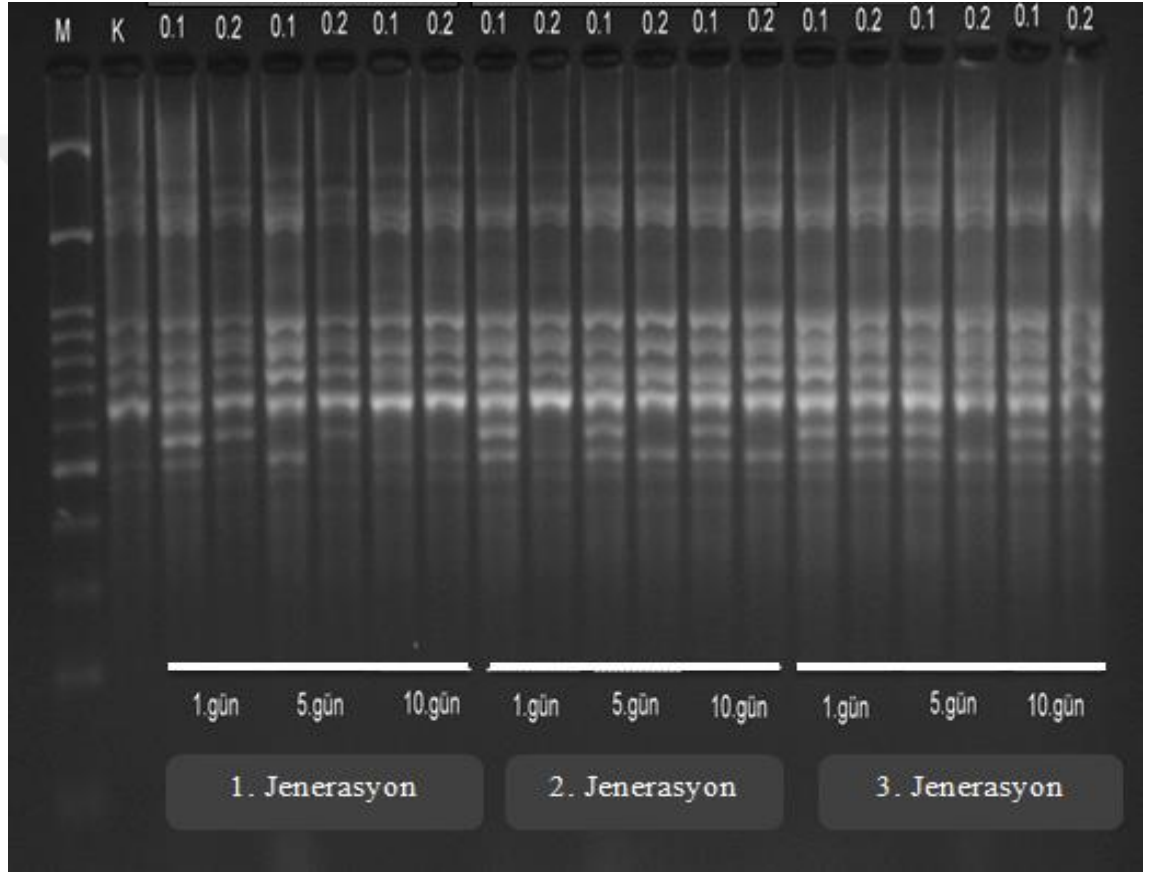
**Tablo 4.3.** Cd uygulaması yapılan *D. melanogaster* bireylerinde OPA11 primerinde kontrole göre yeni oluşan (Y) ve kaybolan (K) bantlar (baz çifti)

Birinci Jenerasyon							
		1. gün		5. gün		10. gün	
Kontrol		0.1ppm	0.2ppm	0.1ppm	0.2ppm	0.1ppm	0.2ppm
2110;1816 ;957;839; 422;251	Y	2208;1859; 1395	2208;235	2016;1734; 1395;235	1734;235	2437;2016; 1656;800; 235	800;235
	K	2110;1816	2110;1816; 251	2110;1816; 1395;251	1816;251	2110;1816; 839;251	1816;839; 251
İkinci Jenerasyon							
		1. gün		5. gün		10. gün	
Kontrol		0.1ppm	0.2ppm	0.1ppm	0.2ppm	0.1ppm	0.2ppm
2110;1816 ;957;839; 422;251	Y	2016;1734 ;800;400	2016;800	2016;1656; 1395;800; 235	2016;1734;1 395;800;400 ;235	400;235	2016;1656; 800;400;235
	K	2110;1816 ;839;422	2110;1816; 839	2110;1816; 839;251	2110;1816; 839;422;251	1816;422; 251	2110;1816; 839;422;251
Üçüncü Jenerasyon							
		1. gün		5. gün		10. gün	
Kontrol		0.1ppm	0.2ppm	0.1ppm	0.2ppm	0.1ppm	0.2ppm
2110;1816 ;957;839; 422;251	Y	1903;1656; 800;235	1903;1000; 800;422; 400;221	400;235	2016;1656; 765;400;221	2016;1566; 765;400;235	2016;1656; 900;765;400; 235
	K	2110;1816; 839;251	2110;1816; 839;251	422	2110;1816; 839;422;251	2110;1816; 839;422;251	2110;1816; 957;839;422; 251

Tablo 4.3.'e göre OPA11 primerinde kontrolde 251-2110 baz çifti arasında 6 adet bant saptanmıştır. Elde edilen verilere göre birinci jenerasyonda Cd'ye maruz kalan bireylerde en fazla bant değişiminin 5 adet yeni oluşan ve 4 adet kaybolan olmak üzere toplam 9 adet bant ile 0.1 ppm Cd konsantrasyonunda ve uygulamanın onuncu gününde olduğu saptanmıştır. İkinci jenerasyonda en fazla bant değişimi toplam 11 adet (6 adet yeni oluşan ve 5 adet kaybolan) ile 0.2 ppm Cd konsantrasyonunda ve uygulamanın beşinci gününde saptanmıştır. Üç jenerasyon Cd'ye maruz kalan bireylerde göre en fazla bant değişiminin 0.2 ppm Cd konsantrasyonunda ve onuncu günde 6 adet yeni oluşan ve 6 adet kaybolan bant olmak üzere toplam 12 bant olduğu belirlenmiştir.

#### 4.2.4. SP2 Primeri

Kontrol ve Cd uygulaması yapılan bireylerde her bir jenerasyonda uygulamanın birinci, beşinci ve onuncu günlerinde SP2 primerine ait agaroz jel fotoğrafı Şekil 4.9.'da verilmiştir. Agaroz jel fotoğrafına göre her bir jenerasyonda farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerinde kontrol grubuna göre yeni oluşan ve kaybolan bantların olduğu saptanmış ve bu bantların baz çifti değerleri Tablo 4.4.'te verilmiştir.



Şekil 4.9. SP2 primeri jel görüntüsü

**Tablo 4.4.** Cd uygulaması yapılan *D. melanogaster* bireylerinde SP2 primerinde kontrole göre yeni oluşan (Y) ve kaybolan (K) bantlar (baz çifti)

Birinci Jenerasyon							
Kontrol		1. gün		5. gün		10. gün	
		0.1ppm	0.2ppm	0.1ppm	0.2ppm	0.1ppm	0.2ppm
2288;1930; 1727;1534; 924;820;75 1;658;500	<b>Y</b>	1814;1685; 1500;900; 720;549; 456	1569;883; 839;720; 616;456	1569;883; 839;720;616; 456	1814;1645; 1500;883; 720;549	1814;1645; 1000;720	1814;1569; 1438;883; 800;720;456
	<b>K</b>	1930;1727; 1534; 924;751	1727;1534 ; 924;820; 751;658	1727;1534; 924;820;751; 658	2288;1930; 1727;1534; 924;751; 500	1930;1727; 751	1930;1727; 1534;924; 820;751
İkinci Jenerasyon							
Kontrol		1. gün		5. gün		10. gün	
		0.1ppm	0.2ppm	0.1ppm	0.2ppm	0.1ppm	0.2ppm
2288;1930; 1727;1534; 924;820;75 1;658;500	<b>Y</b>	1569;1438; 800;700; 616;549; 456	2129;1770; 1569;1438; 883;720 ;616;456	2129;1770; 1500;1438; 883;800; 700;616; 549;456	2129;1500; 883;800; 600;456	2129;1814; 1569;1438; 883;800; 600;520	2027;1770; 1569;1438; 883;800;700; 616;468;433
	<b>K</b>	1727;1534; 820;751; 658	2288;1930; 1727;1534; 924;751; 658	2288;1930; 1727;1534; 924;820; 751;658	2288;1930; 1534;924; 820;751	2288;1930; 1727;1534; 924;820; 751;500	2288;1930; 1727;1534; 924;820;751; 658;500
Üçüncü Jenerasyon							
Kontrol		1. gün		5. gün		10. gün	
		0.1ppm	0.2ppm	0.1ppm	0.2ppm	0.1ppm	0.2ppm
2288;1930; 1727;1534; 924;820;75 1;658;500	<b>Y</b>	2027;1500; 1356;839; 600;520; 468;433	2027;1645; 1500;1356; 839;800;600 ;520;468; 433	2129;1438; 1315;839; 720;572;468 ;433	2027;1438; 1356;572; 468;433	2027;1356; 720;572;45 6;433	2027;1356; 839;572; 456
	<b>K</b>	1930;1727; 1534;924; 751	2288;1930; 1727;1534; 924;820;751 ;500	2288;1930; 1727;1534; 924;820;751	2288;1930; 1727;1534; 924;500	2288;1930; 1727;924; 751	2288;1930; 1727;924; 820

Tablo 4.4.'e göre SP2 primerinde kontrolde 500-2288 baz çifti arasında 9 adet bant saptanmıştır. Elde edilen verilere göre bir jenerasyon sürecince Cd'ye maruz kalan bireylerde en fazla bant değişiminin 0.2 ppm Cd konsantrasyonunda kontrole göre toplam 13 adet bant ile uygulamanın beşinci ve onuncu günlerinde olduğu belirlenmiştir. İkinci jenerasyon Cd uygulamasında en yüksek miktarda bant değişimi yine 0.2 ppm Cd konsantrasyonunda uygulamanın onuncu gününde meydana geldiği ve 19 adet bant (on adet yeni oluşan ve dokuz adet kaybolan bant) değişimi olduğu

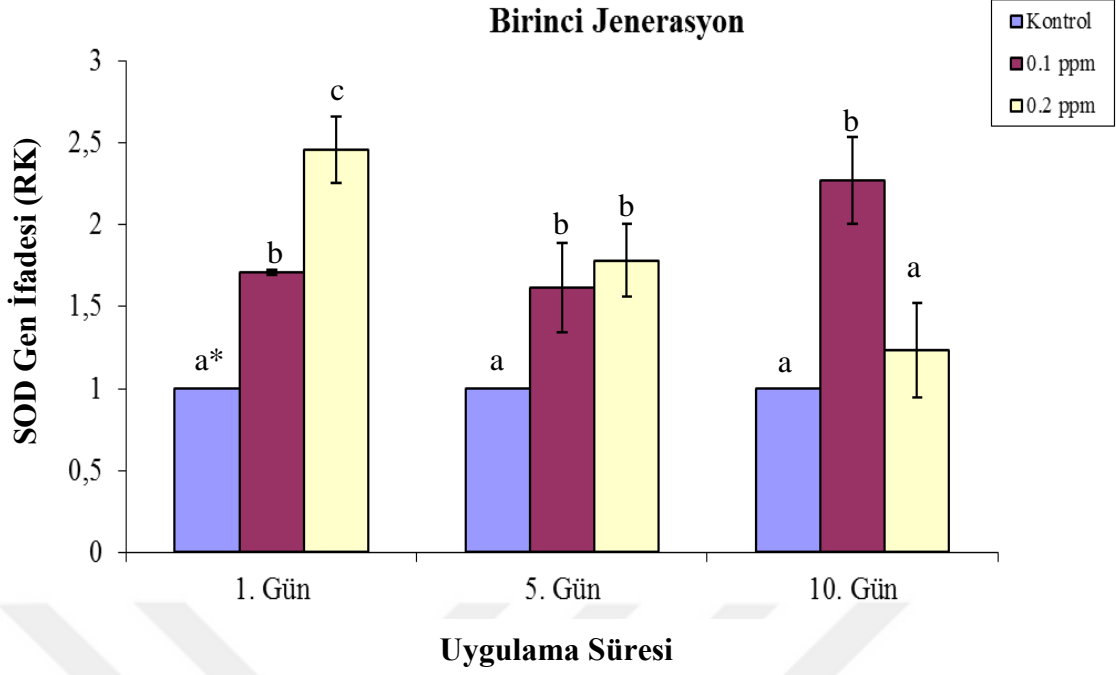
saptanmıştır. Üç jenerasyon boyunca Cd'ye maruz kalan bireylerde ise en fazla bant değişiminin kontrole göre 10 adet yeni oluşan ve 8 adet kaybolan bant olmak üzere uygulamanın birinci gününde meydana geldiği saptanmıştır.

Tüm primerler bir arada değerlendirildiğinde, en fazla bant değişiminin SP2 primerinde 2. jenerasyon 0.1 ppm Cd 5.günde ve 3.jenerasyon 0.2 ppm Cd 1.günde toplam bant farklılığı 18 olarak gözlenmiştir

### **4.3. SOD Gen İfadesi**

#### **4.3.1. Bir Jenerasyon Süresince Cd'ye Maruz Kalan *D. melanogaster* Bireylerinde Konsantrasyona Bağlı Olarak SOD Gen İfadeleri**

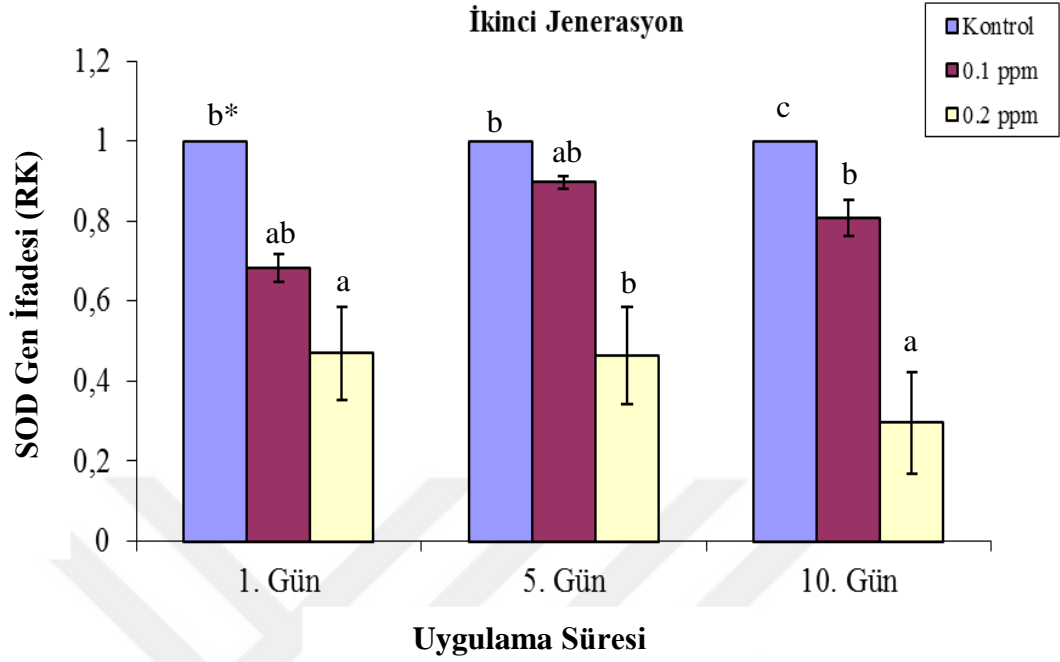
Farklı konsantrasyonlarda Cd uygulaması yapılan birinci jenerasyon *D. melanogaster* bireylerinde belirlenen SOD gen ifade düzeyleri Şekil 4.10.'da verilmiştir. Uygulamanın birinci ve beşinci günlerinde artan Cd konsantrasyonuna bağlı olarak SOD gen ifadesinin kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde artış gösterdiği saptanmıştır ( $p \leq 0.05$ ). Uygulamanın 10. gününde ise 0.1 ppm Cd uygulamasında kontrole göre istatistiksel olarak önemli artış gösterdiği, ancak 0.2 ppm konsantrasyonda ise kontrol ile fark göstermediği belirlenmiştir. En yüksek SOD gen ifadesinin uygulamanın birinci gününde 0.2 ppm Cd konsantrasyonunda kontrole göre 2.46 kat olduğu saptanmıştır. Bunu, kontrole göre 2.27 kat artış ile 10. günde 0.1 ppm Cd uygulamasının takip ettiği belirlenmiştir.



**Şekil 4.10.** Bir jenerasyon boyunca Cd uygulaması yapılan *D. melanogaster* bireylerinde SOD gen ifadesinin değişimi, relatif kat artış n=3, ortalama±standart hata \* Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi,  $P \leq 0.05$ )

#### 4.3.2. İki Jenerasyon Süresince Cd'ye Maruz Kalan *D. melanogaster* Bireylerinde Konsantrasyona Bağlı Olarak SOD Gen İfadeleri

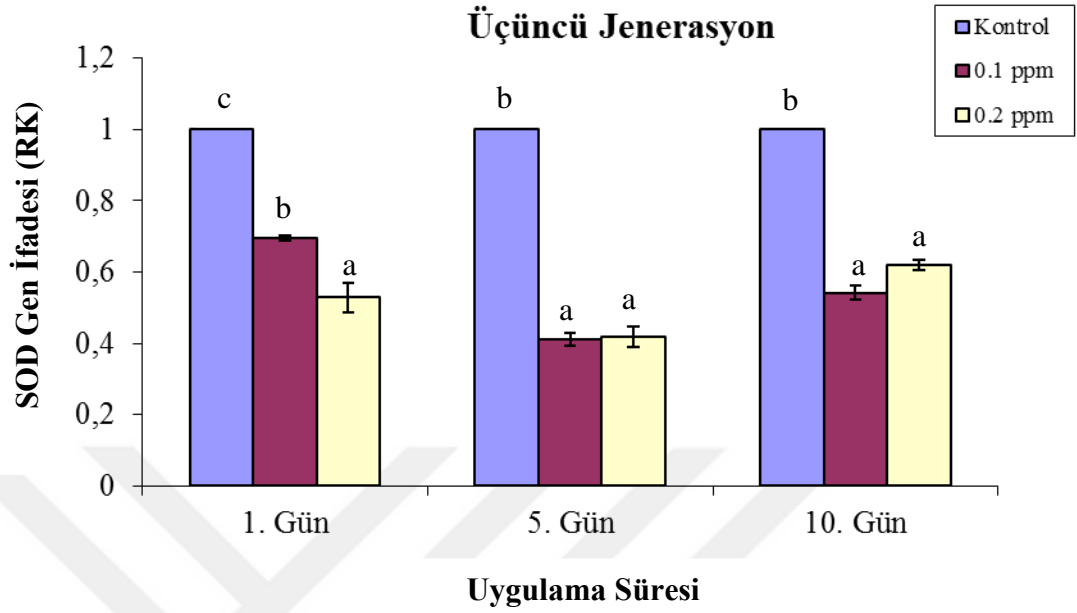
Farklı konsantrasyonlarda Cd uygulaması yapılan ikinci jenerasyon *D. melanogaster* bireylerinde belirlenen SOD gen ifade düzeyleri Şekil 4.11.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi artan Cd konsantrasyonu tüm uygulama sürelerinde SOD gen ifadelerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı azalmaya neden olmuştur ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.11.** İki jenerasyon boyunca Cd uygulaması yapılan *D. melanogaster* bireylerinde SOD gen ifadesinin değişimi, relatif kat artış n=3, ortalama±standart hata \* Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi,  $P \leq 0.05$ )

#### 4.3.3. Üç Jenerasyon Süresince Cd'ye Maruz Kalan *D. melanogaster* Bireylerinde Konsantrasyona Bağlı Olarak SOD Gen İfadeleri

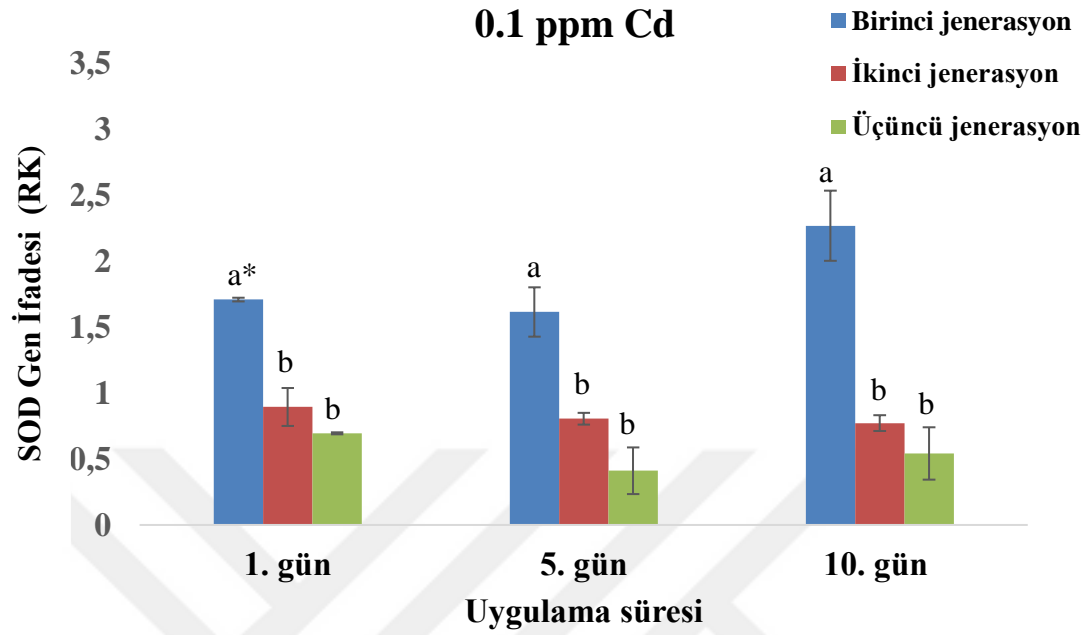
Farklı konsantrasyonlarda Cd uygulaması yapılan üçüncü jenerasyon *D. melanogaster* bireylerinde belirlenen SOD gen ifade düzeyleri Şekil 4.12.'de verilmiştir. Kadmiyum uygulamasının üçüncü jenerasyonunda tüm uygulama sürelerinde SOD gen ifadelerinin kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde azalma gösterdiği saptanmıştır. Uygulamanın birinci gününde artan Cd konsantrasyonuna bağlı olarak SOD gen ifadesinde doğrusal bir azalma görülmüş ve 0.1 ve 0.2 ppm Cd konsantrasyonlarının da birbirinden istatistiksel olarak önemli şekilde farklı düzeyde SOD ifadesine sahip oldukları belirlenmiştir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.12.** Üç jenerasyon boyunca Cd uygulaması yapılan *D. melanogaster* bireylerinde SOD gen ifadesinin değişimi, relatif kat artış n=3, ortalama±standart hata \* Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi,  $P \leq 0.05$ )

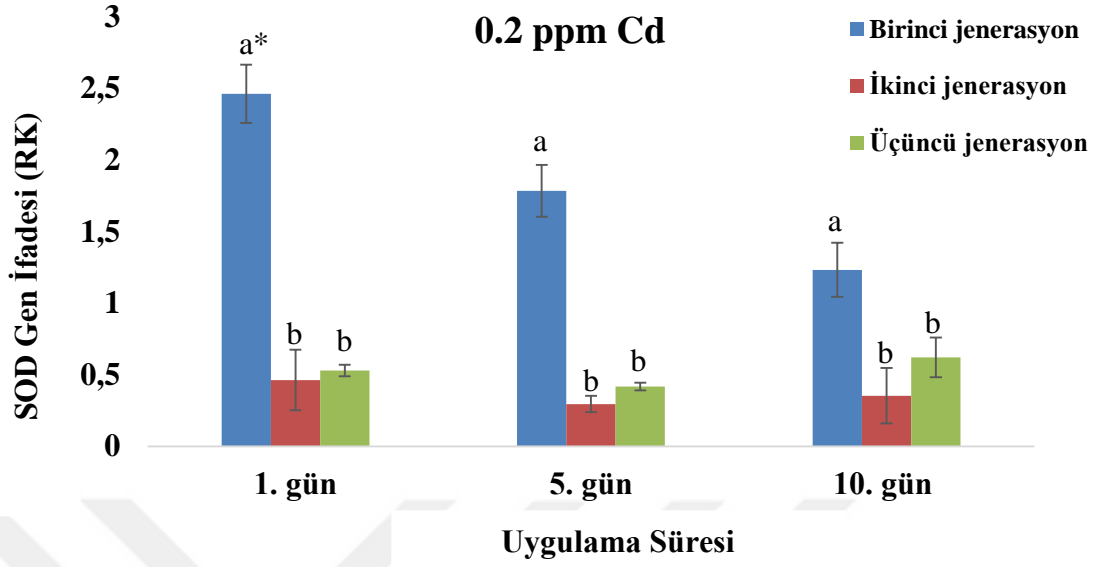
#### 4.3.4. Cd Uygulaması Yapılan *D. melanogaster* Bireylerinde SOD Gen İfadesinde Jenerasyonlar Arası Farklılıklar

Çalışmamızda her bir jenerasyonda zaman ve konsantrasyona bağlı olarak belirlenen SOD gen ifadesi farklılıklarının yanı sıra jenerasyonlar arası farklılıkları da belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre 0.1 ppm Cd uygulaması yapılan bireylerde farklı uygulama zamanlarında birinci, ikinci ve üçüncü jenerasyonlardaki bireylerde saptanan SOD gen ifadeleri Şekil 4.13.'te verilmiştir. Tüm uygulama zamanlarında en yüksek SOD gen ifadelerinin birinci jenerasyonda, en düşük ise üçüncü jenerasyonda olduğu saptanmıştır. Uygulama jenerasyon süresi arttıkça gen ifadesinde azalma meydana gelmiş olmakla birlikte ikinci ve üçüncü jenerasyonlar birbiri ile istatistiksel olarak fark göstermezken, birinci jenerasyondan önemli düzeyde farklılık göstermektedir.



**Şekil 4.13.** 0.1 ppm Cd uygulamasının birinci, beşinci ve onuncu günlerinde jenerasyonlar arası SOD gen ifadesi farklılıkları, relatif kat artış n=3, ortalama±standart hata \* Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi,  $P \leq 0.05$ )

Şekil 4.14.'te 0.2 ppm Cd uygulaması yapılan bireylerde farklı uygulama zamanlarında birinci, ikinci ve üçüncü jenerasyonlardaki bireylerde saptanan SOD gen ifadeleri verilmiştir. Tüm uygulama zamanlarında gen ifadeleri en yüksek değerini birinci jenerasyonda göstermiş ve bu değerlerin diğer jenerasyonlardan istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir. İkinci ve üçüncü jenerasyonlarda gen ifadelerinin benzer olduğu ve birbirleri ile aynı istatistik gruba dahil oldukları saptanmıştır.

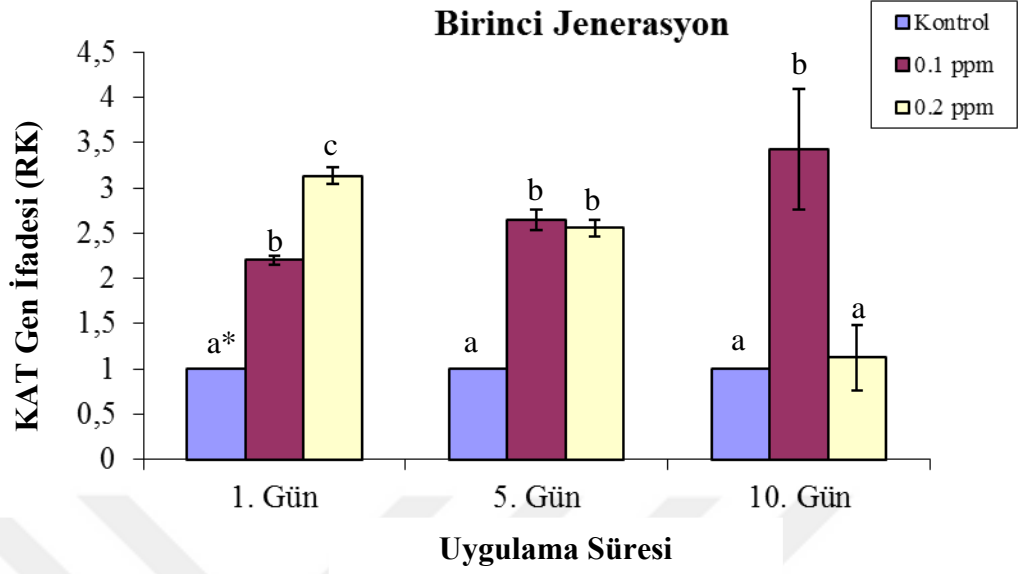


**Şekil 4.14.** 0.2 ppm Cd uygulamasının birinci, beşinci ve onuncu günlerinde jenerasyonlar arası SOD gen ifadesi farklılıkları, relatif kat artış  $n=3$ , ortalama±standart hata \* Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi,  $P \leq 0.05$ )

#### 4.4. KAT Gen İfadesi

##### 4.4.1. Bir Jenerasyon Süresince Cd'ye Maruz Kalan *D. melanogaster* Bireylerinde Konsantrasyona Bağlı Olarak KAT Gen İfadeleri

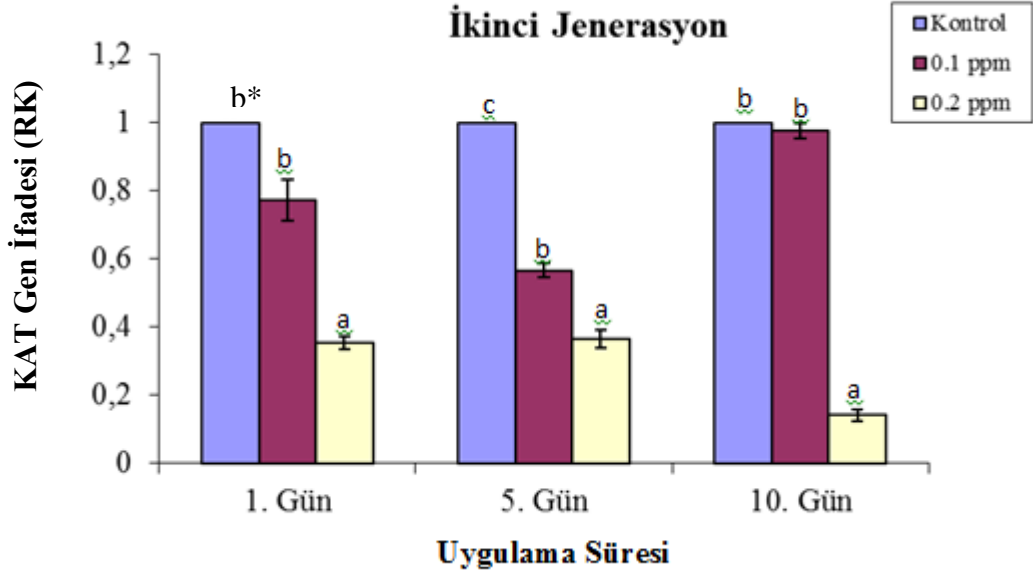
Farklı konsantrasyonlarda Cd uygulaması yapılan birinci jenerasyon *D. melanogaster* bireylerinde belirlenen KAT gen ifadeleri Şekil 4.15.'te verilmiştir. Uygulamanın birinci gününde artan Cd konsantrasyonuna bağlı olarak KAT gen ifadesinin istatistiksel olarak önemli düzeyde artış gösterdiği belirlenmiştir ( $p \leq 0.05$ ). Cd uygulamasının beşinci gününde ise 0.1 ve 0.2 ppm Cd uygulamalarının kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek KAT gen ifadesine sahip olduğu ancak birbirlerinde istatistiksel olarak farklı olmadıkları saptanmıştır. Uygulamanın onuncu gününde ise 0.1 ppm Cd uygulaması yapılan grupta kontrol ve 0.2 ppm konsantrasyona göre yüksek düzeyde KAT gen ifadesinin olduğu saptanmış ve bu fark istatistiksel olarak önemli düzeyde bulunmuştur ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.15.** Bir jenerasyon boyunca Cd uygulaması yapılan *D. melanogaster* bireylerinde KAT gen ifadesinin değişimi, relatif kat artış n=3, ortalama±standart hata \* Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi,  $P \leq 0.05$ )

#### 4.4.2. İki Jenerasyon Süresince Cd'ye Maruz Kalan *D. melanogaster* Bireylerinde Konsantrasyona Bağlı Olarak KAT Gen İfadeleri

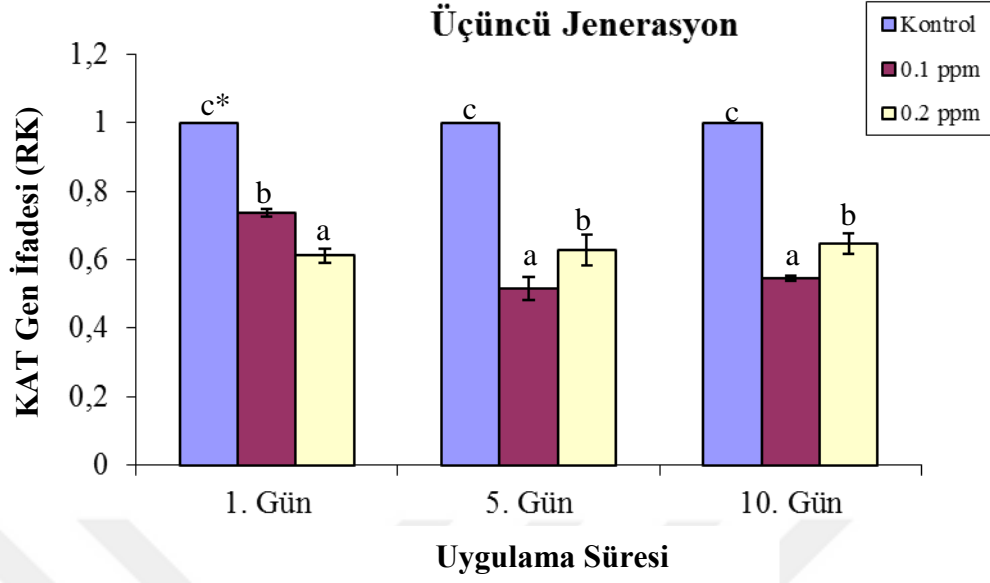
Farklı konsantrasyonlarda Cd uygulaması yapılan ikinci jenerasyon *D. melanogaster* bireylerinde belirlenen KAT gen ifadeleri Şekil 4.16.'da verilmiştir. Cd uygulaması yapılan ikinci jenerasyon bireylerde uygulamanın birinci ve onuncu günlerinde sadece 0.2 ppm Cd uygulanan grupta kontrole göre istatistiksel olarak önemli bir azalma olduğu belirlenmiştir. Uygulamanın beşinci gününde ise her iki Cd konsantrasyonunda belirlenen KAT gen ifadelerinin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma gösterdiği saptanmıştır. En düşük KAT gen ifadesinin on günlük uygulama süresi ve 0.2 ppm Cd konsantrasyonunda olduğu saptanmıştır.



**Şekil 4.16.** İkinci jenerasyonda Cd uygulaması yapılan *D. melanogaster* bireylerinde KAT gen ifadesinin değişimi, relatif kat artış n=3, ortalama±standart hata \* Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi,  $P \leq 0.05$ )

#### 4.4.3. Üç Jenerasyon Süresince Cd'ye Maruz Kalan *D. melanogaster* Bireylerinde Konsantrasyona Bağlı Olarak KAT Gen İfadeleri

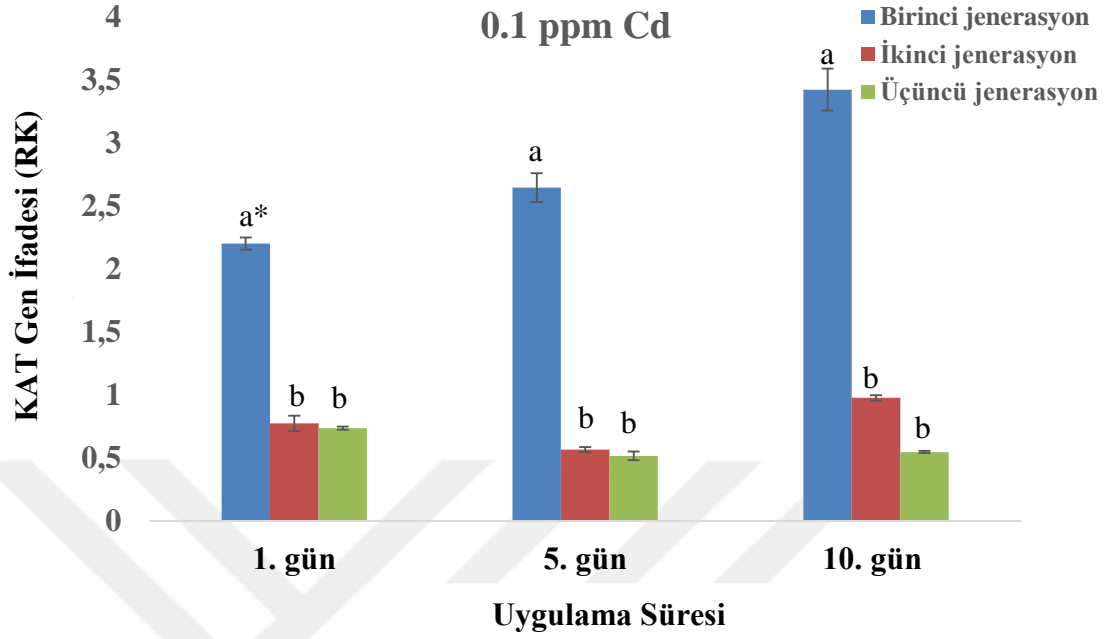
Farklı konsantrasyonlarda Cd uygulaması yapılan üçüncü jenerasyon *D. melanogaster* bireylerinde belirlenen KAT gen ifadeleri Şekil 4.17.'de verilmiştir. Tüm uygulama zamanlarında ve Cd konsantrasyonlarında KAT gen ifadelerinin kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde azaldığı belirlenmiştir ( $p \leq 0.05$ ). Uygulamanın ilk gününde KAT gen ifadesinde artan Cd konsantrasyonuna paralel olarak bir azalma görülmektedir. Ancak uygulamanın beşinci ve onuncu günlerinde 0.1 ppm Cd konsantrasyonunda belirlenen gen ifadesinin 0.2 ppm konsantrasyonda belirlenenden daha düşük düzeyde olduğu saptanmıştır. En düşük KAT gen ifadelerinin uygulamanın beşinci ve onuncu günlerinde 0.1 ppm Cd uygulaması yapılan bireylerde meydana geldiği saptanmıştır.



**Şekil 4.17.** Üç jenerasyon boyunca Cd uygulaması yapılan *D. melanogaster* bireylerinde KAT gen ifadesinin değişimi, relatif kat artış n=3, ortalama±standart hata \* Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi, P≤0.05)

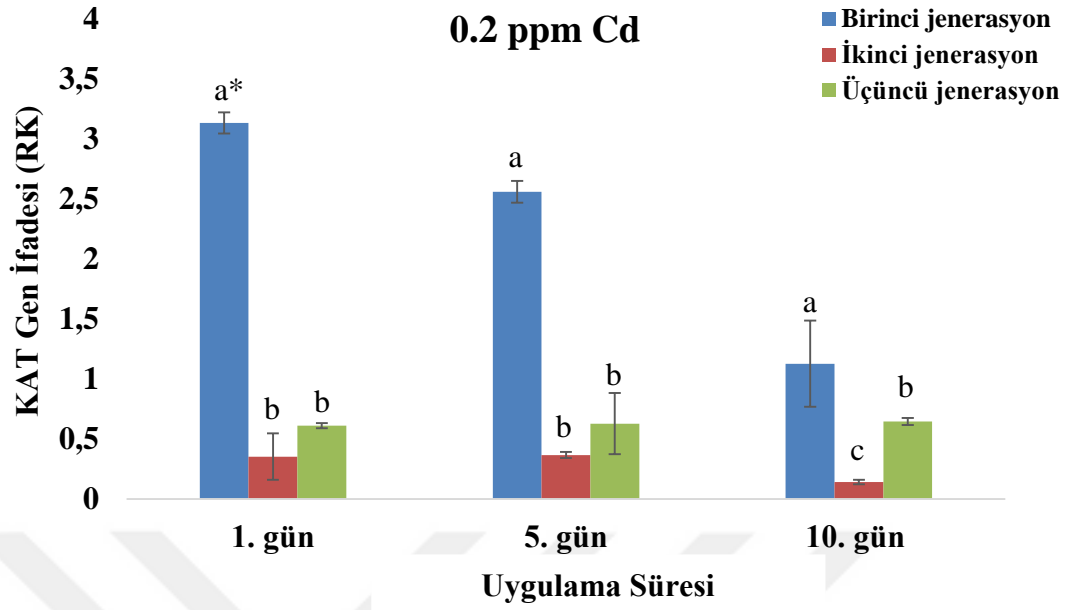
#### 4.4.4. Cd Uygulaması Yapılan *D. melanogaster* Bireylerinde KAT Gen İfadesinde Jenerasyonlar Arası Farklılıklar

Çalışmamızda her bir jenerasyonda zaman ve konsantrasyona bağlı olarak belirlenen KAT gen ifadesi farklılıklarının yanı sıra jenerasyonlar arası farklılıkları da belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre 0.1 ppm Cd uygulaması yapılan bireylerde tüm uygulama zamanlarında jenerasyonlar arası farklılık Şekil 4.18’de verilmiştir. Grafikten de görüldüğü gibi tüm uygulama sürelerinden en yüksek KAT gen ifadelerinin birinci jenerasyon bireylerde olduğu ve bunu ikinci ve üçüncü jenerasyonların izlediği saptanmıştır. İkinci ve üçüncü jenerasyonlar birbirleri ile aynı istatistiksel gruba dahil olurken, birinci jenerasyondaki KAT gen ifadelerinin bu gruplarda istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir.



**Şekil 4.18.** 0.1 ppm Cd uygulamasının birinci, beşinci ve onuncu günlerinde jenerasyonlar arası KAT gen ifadesi farklılıkları, relatif kat artış n=3, ortalama±standart hata \* Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi,  $P \leq 0.05$ )

0.2 ppm Cd uygulaması yapılan bireylerde tüm uygulama zamanlarında jenerasyonlar arası farklılık Şekil 4.19.'da verilmiştir. Buna göre en yüksek KAT gen ifadesinin tüm uygulama zamanlarında birinci jenerasyonda olduğu, diğer jenerasyonda ise birinci jenerasyona göre istatistiksel olarak önemli azalmaların olduğu saptanmıştır.

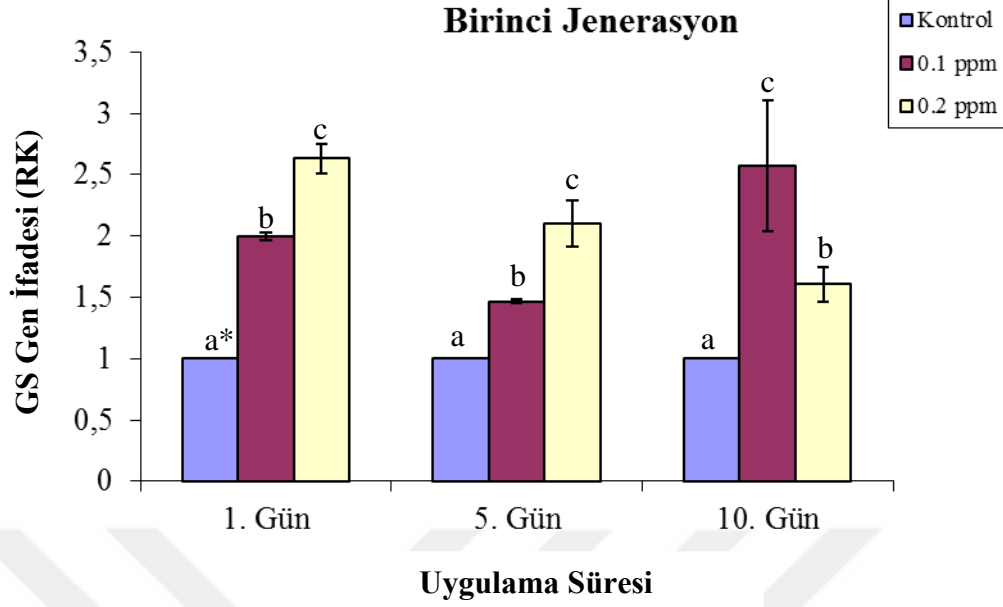


**Şekil 4.19.** 0.2 ppm Cd uygulamasının birinci, beşinci ve onuncu günlerinde jenerasyonlar arası KAT gen ifadesi farklılıkları, relatif kat artış  $n=3$ , ortalama±standart hata \* Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi,  $P \leq 0.05$ )

#### 4.5. GS Gen İfadesi

##### 4.5.1. Bir Jenerasyon Süresince Cd'ye Maruz Kalan *D. melanogaster* Bireylerinde Konsantrasyona Bağlı Olarak GS Gen İfadeleri

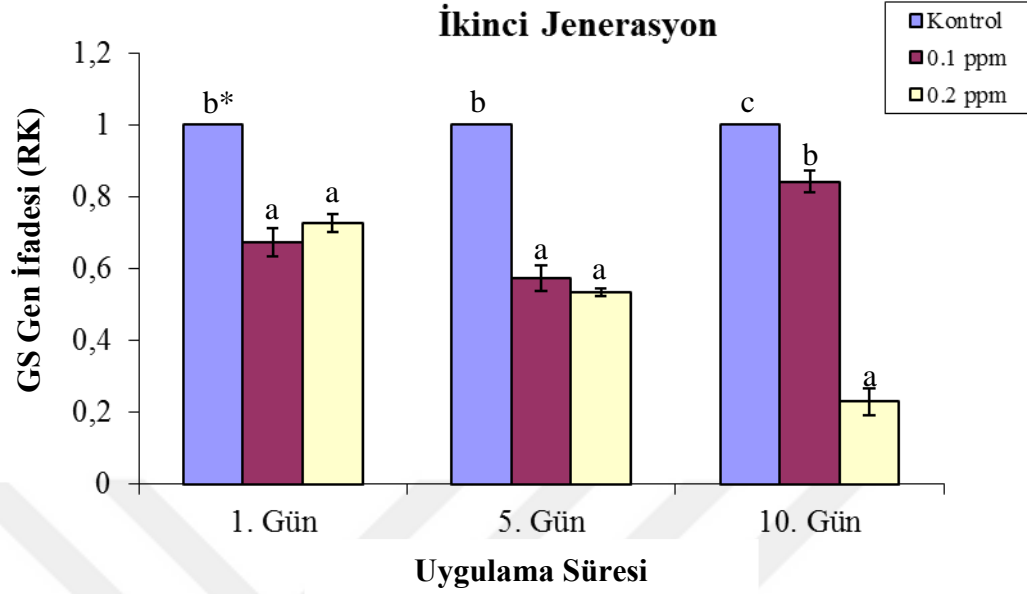
Farklı konsantrasyonlarda Cd uygulaması yapılan birinci jenerasyon *D. melanogaster* bireylerinde belirlenen GS gen ifadelerinin değişimi Şekil 4.20.'de verilmiştir. Uygulamanın birinci ve beşinci günlerinde artan Cd konsantrasyonuna bağlı olarak GS gen ifadesinin doğrusal bir artış gösterdiği ve bu artışların kontrole göre istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Cd uygulamasının onuncu gününde ise GS gen ifadesinde her iki uygulama konsantrasyonunda kontrole göre önemli artışların olduğu belirlenmiş ancak bunun artan konsantrasyona bağlı doğrusal bir artış olmadığı ve 0.1 ppm Cd uygulamasında 0.2 ppm Cd ye göre daha yüksek gen ifadesinin olduğu saptanmıştır. Ayrıca 0.2 ppm Cd uygulamasının artan uygulama süresine bağlı olarak GS gen ifadesinde azalmaya neden olduğu saptanmıştır.



**Şekil 4.20.** Bir jenerasyon boyunca Cd uygulaması yapılan *D. melanogaster* bireylerinde GS gen ifadesinin değişimi, relatif kat artış n=3, ortalama±standart hata \* Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi,  $P \leq 0.05$ )

#### 4.5.2. İki Jenerasyon Süresince Cd'ye Maruz Kalan *D. melanogaster* Bireylerinde Konsantrasyona Bağlı Olarak GS Gen İfadeleri

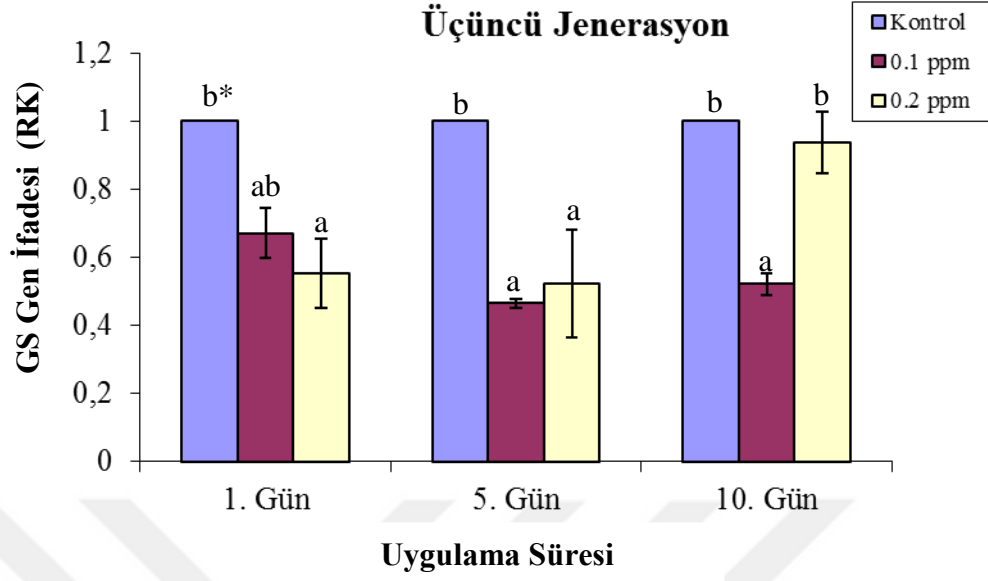
Farklı konsantrasyonlarda Cd uygulaması yapılan ikinci jenerasyon *D. melanogaster* bireylerinde belirlenen GS gen ifadelerinin değişimi Şekil 4.21.'de verilmiştir. Farklı konsantrasyonda Cd uygulamasının uygulamanın birinci, beşinci ve onuncu günlerinde kontrol grubuna göre GS gen ifadelerinde azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Uygulamanın birinci ve beşinci günlerinde her iki Cd konsantrasyonunun GS gen ifadelerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde azalmaya neden olduğu belirlenmiş, ancak Cd uygulaması yapılan grupların birbirleri ile aynı istatistiksel gruba dahil olduğu saptanmıştır. Uygulamanın onuncu gününde ise Cd uygulaması yapılan grupların hem kontrol grubundan hem de diğer gruplardan istatistiksel olarak farklı düzeyde gen ifadesine sahip oldukları saptanmıştır. GS gen ifadesinin en düşük olduğu grup ise 10 gün süre ile 0.2 ppm Cd uygulaması yapılan grup olarak belirlenmiştir.



**Şekil 4.21.** İki jenerasyon boyunca Cd uygulaması yapılan *D. melanogaster* bireylerinde GS gen ifadesinin değişimi, relatif kat artış n=3, ortalama±standart hata \* Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi,  $P \leq 0.05$ )

#### 4.5.3. Üç Jenerasyon Süresince Cd'ye Maruz Kalan *D. melanogaster* Bireylerinde Konsantrasyona Bağlı Olarak GS Gen İfadeleri

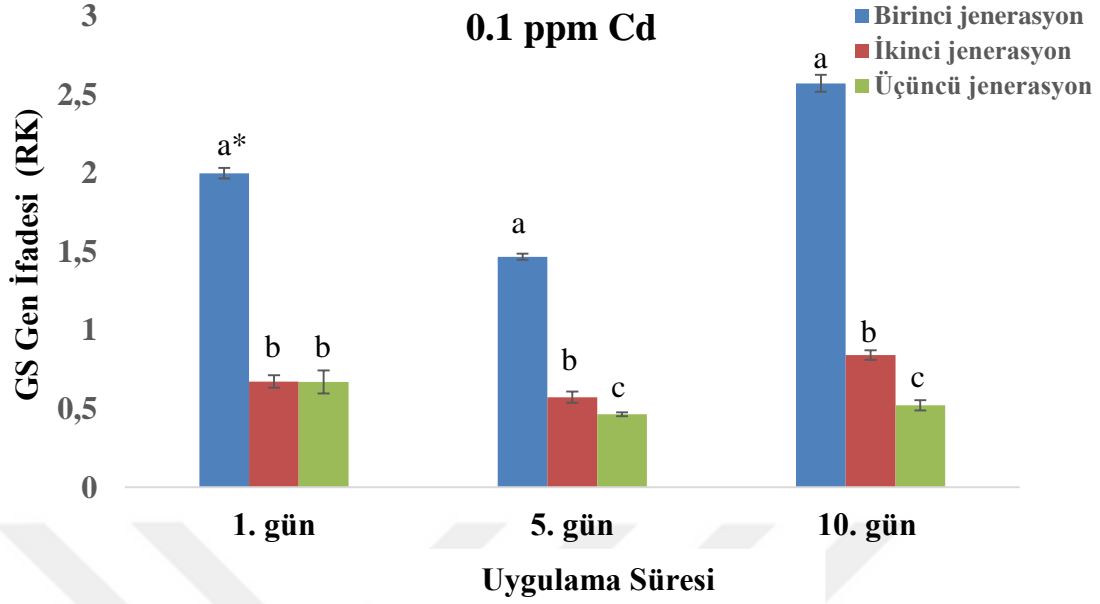
Farklı konsantrasyonlarda Cd uygulaması yapılan üçüncü jenerasyon *D. melanogaster* bireylerinde belirlenen GS gen ifadelerinin değişimi Şekil 4.22.'de verilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda Cd uygulamasının üçüncü jenerasyonunda uygulamanın birinci ve beşinci günlerinde GS gen ifadelerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli azalmalar gösterdiği belirlenmiştir. Uygulamanın birinci gününde artan Cd konsantrasyonuna bağlı olarak azalma görülmüş olur en düşük gen ifadesi 0.2 ppm Cd uygulaması yapılan grupta saptanmıştır. Uygulamanın onuncu gününde 0.2 ppm Cd uygulanan grupta GS gen ifadesinin kontrol düzeyine ulaştığı ve kontrol grubu ile istatistiksel olarak aynı gruba dahil olduğu saptanmıştır.



**Şekil 4.22.** Üç jenerasyon boyunca Cd uygulaması yapılan *D. melanogaster* bireylerinde GS gen ifadesinin değişimi, relatif kat artış n=3, ortalama±standart hata \* Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi, P≤0.05)

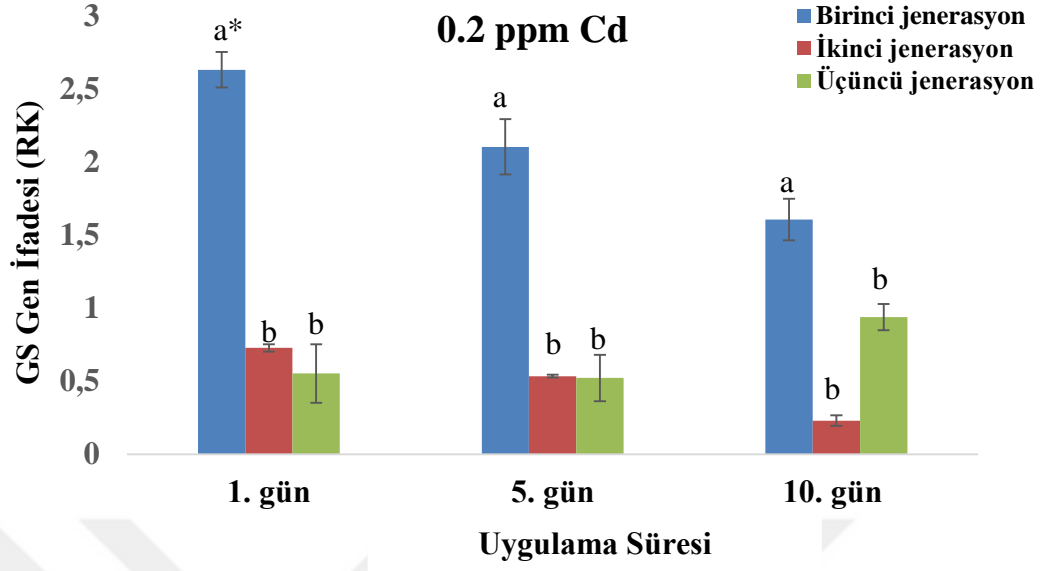
#### 4.5.4. Cd Uygulaması Yapılan *D. melanogaster* Bireylerinde GS Gen İfadesinde Jenerasyonlar Arası Farklılıklar

Çalışmamızda her bir jenerasyonda zaman ve konsantrasyona bağlı olarak belirlenen GS gen ifadesi farklılıklarının yanı sıra jenerasyonlar arası farklılıkları da belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre 0.1 ppm Cd uygulaması yapılan bireylerde tüm uygulama zamanlarında jenerasyonlar arası farklılık Şekil 4.23.'te verilmiştir. Buna göre tüm uygulama zamanlarında en yüksek GS gen ifadesinin birinci jenerasyon bireylerinde olduğu ve diğer jenerasyonlardan istatistiksel olarak önemli şekilde yüksek olduğu saptanmıştır.



**Şekil 4.23.** 0.1 ppm Cd uygulamasının birinci, beşinci ve onuncu günlerinde jenerasyonlar arası GS gen ifadesi farklılıkları, relatif kat artış n=3, ortalama±standart hata \* Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi,  $P \leq 0.05$ )

0.2 ppm Cd uygulaması yapılan *D. melanogaster* bireylerinde uygulamanın birinci, beşinci ve onuncu günlerinde en yüksek GS gen ifadesinin birinci jenerasyon bireylerinde olduğu saptanmıştır. İkinci ve üçüncü jenerasyon bireylerde saptanan GS gen ifadelerinin istatistiksel olarak aynı gruba dahil olduğu ancak birinci jenerasyon bireylerden istatistik olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu saptanmıştır (Şekil 4.24).

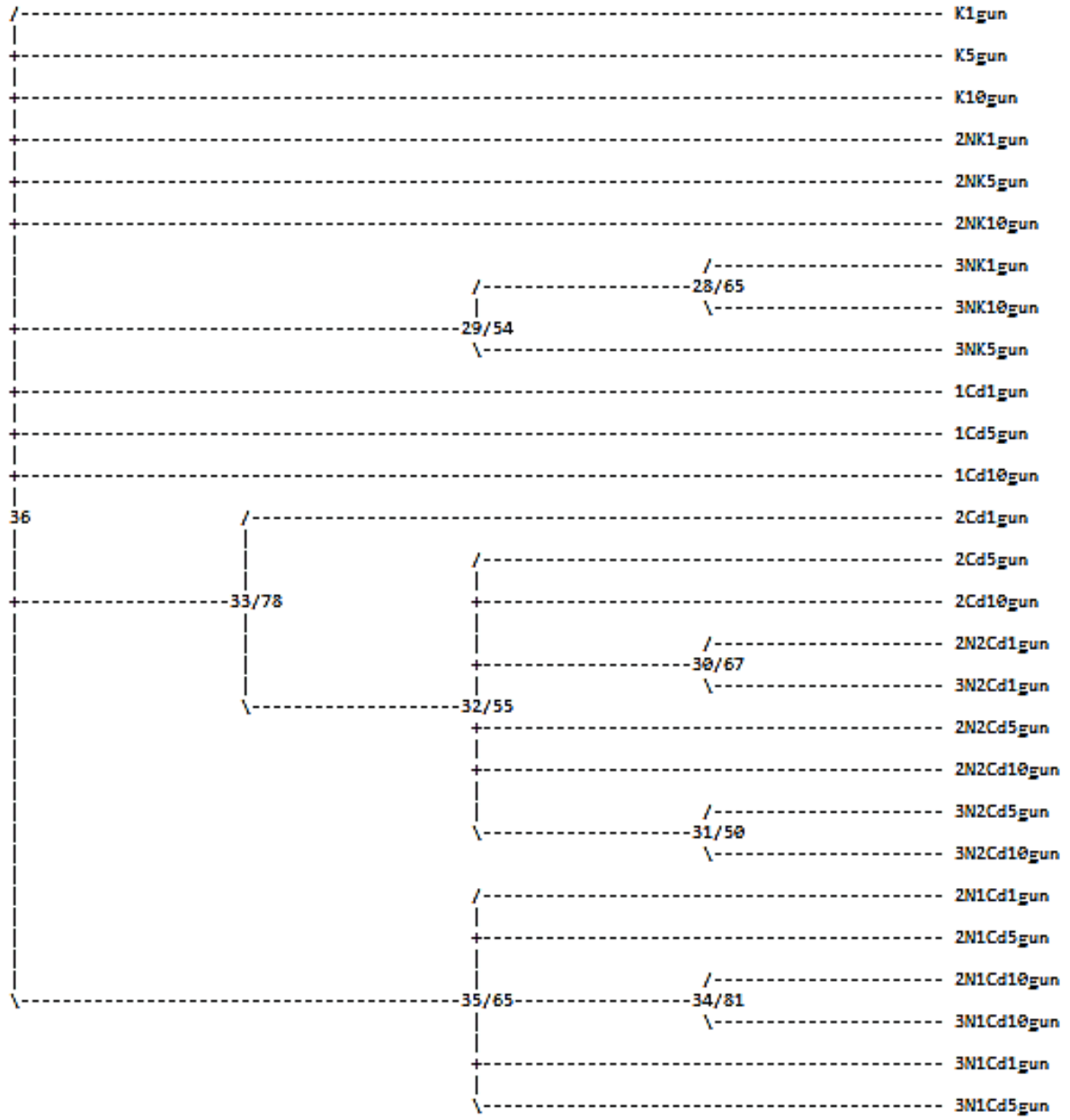


**Şekil 4.24.** 0.2 ppm Cd uygulamasının birinci, beşinci ve onuncu günlerinde jenerasyonlar arası GS gen ifadesi farklılıkları, relatif kat artış  $n=3$ , ortalama±standart hata \* Her bir uygulama süresinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır (tekyönlü-ANOVA, Duncan testi,  $P \leq 0.05$ )

#### 4.6. Kadmiyum Uygulamasının *D. melanogaster* Bireylerinde Mitokondriyal NADH Dehidrojenaz Dizisi Üzerine Etkisi

Çalışmamızda NADH Dehidrojenaz 2 (ND2) mtDNA bölgesine ait primerler ile yapılan PCR sonucunda tüm deneme ve kontrol gruplarında bu bölge çoğaltılmış ve saf PCR reaksiyonu elde edildiği ve jel elektroforezinde tek bir bant verdiği gözlemlenmiş ve bu bölgelerin gen dizileri belirlenmiştir. Mitokondriyal DNA'nın NADH Dehidrojenaz 2 (ND2) mtDNA bölgesine ait gen fragmentlerinin uzunluğu 650–540 baz çifti arasında değişmiş Clustal W ile alignment yapılarak analiz sonucu ortak olan noktalar belirlenmiş ve 525 karakter parsimoni analizde kullanılmıştır. Bu karakterlerin 482 adedi değişmeyen, 2 karakter değişken fakat parsimoni-uninformatif, 41 karakter ise parsimoni-informatif olarak saptanmıştır. NADH Dehidrojenaz 2 (ND2) mtDNA genine ait nükleotid frekansı: A=0.34949 C=0.11510 G=0.09381 T=0.44160 olarak belirlenmiştir. Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı gen bankası veri tabanı (EMBL gen bank) kullanılarak yapılan blast analizi sonucu elde edilen ND2 mtDNA geninin %99 benzerlik skoru ile *D. melanogaster* Oregon R'ye ait sekanslar ile benzer olduğu saptanmıştır. ND2 gen bölgesi sekansları üzerinde yapılan parsimoni analizde 99 eşit uzunlukta ağaç elde edilmiş Consistency indeks=0.4545 Retention indeks 0.6143, Benzerlik indeksi=0.5455 olarak hesaplanmıştır.

ND2 mtDNA gen bölgesi sekansları üzerinde yapılan maksimum parsimoni analizi sonucu bootstrap değerleri (1000 tekrar) ve % 50'nin altındaki dalların çıkarıldığı consensus diyagramı Şekil 4.25'te verilmiş, dallara ait değişim karakterleri Tablo 4.5'te gösterilmiştir.



**Şekil 4.25.** NADH Dehidrojenaz 2 (ND2) mtDNA bölgesine ait maksimum parsimoni analiz consensus ağacı. Sayılar nod numaraları/boot strap analiz skorlarıdır. %50'den daha küçük skor alan dallar gösterilmemiştir. Consistency indeksi (CI) = 0.7188, Homoplasi indeksi (HI) = 0.050, Ağaç uzunluğu =40

NADH Dehidrojenaz 2 (ND2) mtDNA gen fragmenti üzerinde yapılan parsimony analizinde consensus ağacı 36 noddan oluşmuş kontrol grupları %50'den daha büyük bir skor oluşturmamış ve aynı dal üzerine yerleşmişlerdir. Ağaç üzerinde kontrol grupları ve birinci jenerasyon Cd uygulamalarına ait sekanslar ayrı bir grup oluşturmuş, 2 ve 3. jenerasyon ise farklı bir grup oluşturmuştur. Tablo 4.5. incelendiğinde en fazla baz değişiminin üçüncü jenerasyon bireylerde 0.1 ppm Cd uygulamasında beşinci günde (6 baz) ve yine üçüncü jenerasyon bireylerde 0.2 ppm Cd uygulamasında onuncu günde (6 baz) olduğu saptanmıştır. Bu değişimleri yine üçüncü jenerasyondaki bireyler beş baz ile takip etmiştir

**Tablo 4.5.** Üç jenerasyon boyunca Cd uygulaması yapılan *D. melanogaster* bireylerinde ND2 mtDNA bölgelerine ait dal numaralarını içeren apomorfi listesi, consistency indeks ve ilgili gene ait baz çifti değişimleri

node_36 --> node_29	491	1	0.500	A ==> T	node_32 --> node_31	45	1	0.333	T ==> A
node_29 --> node_28	457	1	1.000	A ==> T		51	1	1.000	C ==> G
node_29 --> 3NK5gun	456	1	1.000	A ==> T		97	1	0.500	G --> C
node_36 --> 1Cd1gun	380	1	0.200	A ==> T		114	1	0.500	G ==> C
	393	1	0.167	C ==> G		256	1	0.333	A ==> T
	398	1	0.200	A ==> T		257	1	0.333	A ==> T
	470	1	0.250	A ==> T		354	1	1.000	G ==> C
node_36 --> 1Cd5gun	393	1	0.167	C ==> G		467	1	0.500	T ==> A
	398	1	0.200	A ==> T		506	1	1.000	G ==> C
	470	1	0.250	A ==> T	node_31 --> 3N2Cd5gun	337	1	0.500	C ==> G
node_36 --> 1Cd10gun	380	1	0.200	A ==> T	node_31 --> 3N2Cd10gun	41	1	0.333	T ==> A
	393	1	0.167	C ==> G		90	1	0.500	A ==> T
	469	1	0.500	A ==> T		205	1	0.333	C ==> G
node_36 --> node_33	104	1	1.000	G ==> C		336	1	0.333	C ==> G
	139	1	0.500	T --> A		358	1	0.500	T ==> A
	204	1	1.000	C --> G		416	1	0.333	T --> A
	392	1	1.000	G ==> C	node_36 --> node_35	35	1	1.000	A ==> T
	398	1	0.200	A ==> T		179	1	1.000	G ==> C
	416	1	0.333	A --> T		380	1	0.200	A --> T
node_33 --> 2Cd1gun	393	1	0.167	C ==> G		393	1	0.167	C ==> G
node_33 --> node_32	48	1	0.500	T ==> A		398	1	0.200	A ==> T
	65	1	0.333	G ==> C		470	1	0.250	A ==> T
	226	1	0.500	T ==> A		474	1	0.333	G --> T
	260	1	0.333	A ==> T		491	1	0.500	A ==> T
	417	1	0.500	A --> T	node_35 --> 2N1Cd1gun	474	1	0.333	T --> G
node_32 --> 2Cd5gun	65	1	0.333	C ==> G	node_35 --> 2N1Cd5gun	380	1	0.200	T --> A
	260	1	0.333	T ==> A	node_35 --> node_34	43	1	1.000	A ==> G
node_32 --> 2Cd10gun	65	1	0.333	C ==> G		198	1	1.000	T ==> A
	205	1	0.333	C ==> G		398	1	0.200	T ==> A
	260	1	0.333	T ==> A		469	1	0.500	A ==> T
node_32 --> node_30	41	1	0.333	T ==> A		470	1	0.250	T ==> A
	48	1	0.500	A ==> T		511	1	0.500	T --> A
	139	1	0.500	A ==> T	node_34 --> 3N1Cd10gun	77	1	0.667	A ==> T
	226	1	0.500	A ==> T		110	1	1.000	A ==> T
	336	1	0.333	C ==> G		257	1	0.333	A ==> T
	393	1	0.167	C ==> G		422	1	0.333	G ==> C
	417	1	0.500	T --> A		423	1	0.333	C ==> G
node_30 --> 3N2Cd1gun	45	1	0.333	T ==> A	node_35 --> 3N1Cd1gun	256	1	0.333	A ==> T
	114	1	0.500	G ==> C		422	1	0.333	G ==> C
	257	1	0.333	A ==> T		423	1	0.333	C ==> G
	467	1	0.500	T ==> A		474	1	0.333	T --> G
node_32 --> 2N2Cd5gun	45	1	0.333	T ==> A	node_35 --> 3N1Cd5gun	511	1	0.500	T ==> A
	77	1	0.667	A ==> G		77	1	0.667	A ==> T
	337	1	0.500	C ==> G		110	1	1.000	A ==> G
node_32 --> 2N2Cd10gun	41	1	0.333	T ==> A		256	1	0.333	A ==> T
	90	1	0.500	A ==> T		380	1	0.200	T --> A
	97	1	0.500	G ==> C		422	1	0.333	G ==> C
						423	1	0.333	C ==> G

## BÖLÜM 5

### TARTIŞMA

Yaşadığımız çevrenin kirlenmesinde büyük rolleri olan ağır metallerin çok düşük konsantrasyonlarda bile toksik etkileri bulunmaktadır. Biyosferin ağır metaller tarafından kirlenmesi endüstri devriminin başlamasıyla beraber artmıştır. Ağır metallerin çevreye girişindeki ana kaynaklar trafik, endüstri, zirai ilaç ve gübreler ve evsel atıklardır. Trafik ve endüstriyel üretimden kaynaklı ağır metal kirliliği, metallerin dağınık bir şekilde çevreye yayılmasına örnek olarak verilebilir. Ağır metaller ince partiküller olarak veya çözünmüş bir şekilde çevreye yayılabilirler [118]. Ayrıca toprağa da bulaşıp topraktan bitkilere geçerek besin zincirine girebilirler [119]. Metaller insan vücudu için esasi olan ve olmayan olarak sınıflandırılmaktadır. Bunlardan; çevresel kirliliğe neden olup insan vücudu için ise esasi olmayan metaller insan vücudunda metal yükü oluştururlar. Bu metallerden kadmiyum, alüminyum, kurşun, kalay, krom, gibi bazıları insanların vücudunda ortalama 40 yaşına kadar sürekli birikir ve vücuttaki konsantrasyonlarının artış göstermesi sonucu zararlı etkilere neden olabilirler [120, 121, 122].

Temel olarak gıda maddeleriyle olmak üzere su ve hava yolu ile de vücuda alınmış olan ağır metaller vücuttaki konsantrasyonlarına göre merkezi sinir sistemi bozuklukları, baş dönmesi, uyku bozuklukları, iştahsızlık, nefes darlığı ve hafıza yetersizliği gibi sorunlara neden olabilirler [123, 124]. Ağır metaller ayrıca kalp ve damar hastalıklarına ve kan oluşum sistemlerinin bozulmasına da neden olabilir. Bunların yanında ağır metallerin; zehirlenme, anemi ve erken ölüme de neden oldukları da belirtilmektedir [125]. Ayrıca proteinlerin fonksiyonel gruplarına bağlanıp çok sayıda biyokimyasal reaksiyon üzerinde de etkileri olabildiği gibi farklı yollardaki

enzimatik aktivitelere rol alıp, çekirdek metabolizmasına ve ATP sentezine de etki edebilmektedirler [126].

1817 yılında keşfedilen ağır metallere biri olan Cd, 50 yıldan bu yana endüstride kaplama sanayisinde, boya yapımında, plastik yapımında, nikel-kadmiyum pil sanayisinde, uçak sanayisinde ve nükleer santrallerde nötron absorblayıcısı şeklinde kullanılmaktadır [127, 128]. Gıdaların çoğunda Cd az da olsa bulunabilmektedir. Kabuklular ve mantarlar Cd bakımından zengin gıdalardandır. İlk zamanlarda kullanılması bir sorun teşkil etmezken son yıllarda endüstride sıklıkla kullanılması bu metali ekotoksikolojik olarak daha önemli bir hale getirmiştir [129, 130].

Kadmiyumun çok düşük konsantrasyonu bile yüksek toksik etkiye neden olabilmektedir. Endüstri kaynaklı kirlenmede Cd kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi hastalıklara neden olabilmektedir [131]. Kadmiyumun suda çözünürlüğünün yüksek olması nedeni ile sudan besinlere, besinlerden de hayvan ve insanlara kolaylıkla geçebilmektedir [132, 133]. Bu nedenlerden dolayı Amerika Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından 1. sınıf kanserojen grubunda olduğu rapor edilmiştir [11]. Besinlerde, havada ve suda bulunan kadmiyum; tahıllarda 10-150 µg/kg bulunurken, balık, et ve meyvelerde ise 1-50 µg/kg bulunmaktadır [134, 135]. İçme suyunda Cd değeri; Dünya Sağlık Örgütü [10] ve Avrupa Birliği [136] verilerine göre 0.003-0.005 mg/L arasında; Çevre Koruma Ajansı (U.S. EPA) [137]'na göre ise 0.005 mg/L (5 µg/L veya 5 ppb)'dir. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre belirlenen günlük tolere edilebilen Cd miktarının 60-70 µg olduğu belirtilmiştir. Kadmiyum düzeyi endüstriyel kirliliğin çok olduğu bölgelerde 1000 µg/L'ye kadar ulaşmaktadır. Kadmiyumun belirtilen toksik etkilerinden dolayı çeşitli sağlık örgütleri ve yerel otoriteler, içme sularında ve gıda maddelerinde bulunması gereken maksimum kalıntı limitlerini belirlemişlerdir. Tez çalışması kapsamında gıdalarda izin verilen limitlerde Cd uygulamasının, üç jenerasyon boyunca model organizma olarak kullanılan *D. melanogaster* bireyleri üzerindeki etkileri belirlenmiştir.

Çalışmamızda Cd uygulaması yapılan birinci ve ikinci jenerasyon *D. melanogaster* bireylerinde artan konsantrasyona ve uygulama süresine bağlı olarak Cd birikiminin artış gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.). Üçüncü jenerasyonda ise uygulamanın özellikle 0.2 ppm Cd konsantrasyonuna ve uygulamanın birinci ve onuncu gününde 0.1 ppm Cd uygulamasına göre istatistiksel olarak anlamlı azalmaların

olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3.). Yine özellikle 0.2 ppm Cd konsantrasyonunda daha belirgin olmak üzere en yüksek Cd birikiminin birinci jenerasyonda olduğu ve maruz kalma süresi arttıkça Cd birikiminin azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.3.).

Linda ve ark. (1996) 50 µg/ml kadmiyum içeren ortamda yetiştirdikleri *Zea mays* (mısır) bitkileri ile besledikleri *Locusta migratoria* bireylerinde yüksek miktarda Cd birikiminin olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar Cd miktarının kontrol grubu bireylerinde 0.99 µg/g olduğunu, uygulama sonucunda ise 18.8 µg/g'a yükseldiğini bildirmişlerdir [138]. Yine Doganlar ve ark. (2014) farklı konsantrasyonlarda Fe, Cd, Pb ve Cu'dan oluşan ağır metal karışımı uyguladıkları *D. melanogaster* bireylerinde artan konsantrasyon ve uygulama süresine göre Cd birikiminin arttığını ve en fazla birikimin kontrole göre 17.7 kat ile uygulamanın onuncu gününde olduğunu rapor etmişlerdir [139]. Benzer bir çalışmada Xie ve ark. (2004) 6 mg/L Cd'ye maruz bıraktıkları *Heterandria formosa* bireylerinde uygulamadan 14 saat sonra kontrole göre 2 kat daha fazla Cd birikiminin olduğunu bildirmişlerdir [140]. Artan Cd uygulamasına bağlı olarak Cd birikiminin artması bulgularımız, Linda ve ark. [138]; Doganlar ve ark. [139] Xie ve ark. [140] adlı araştırmacıların bulguları ile paralellik göstermektedir.

Nguyen ve ark. (2014), 20 jenerasyon boyunca farklı konsantrasyonlarda (0.002; 0.02; 0.08; 0.1 ve 0.2 mg/ml) Cd'a maruz bıraktıkları *D. melanogaster* bireylerinde Cd birikiminin 20. jenerasyonda ilk jenerasyondaki bireylere göre 1069 ppb (1.5 kat) daha az olduğunu bildirmişlerdir [141]. Kafel ve ark. (2011), 61 jenerasyon süresinde Cd'ye maruz bıraktıkları *Spodoptera exigua* (çizgili yaprak kurdu) bireylerinde, 33 jenerasyon Cd'ye maruz kalan bireylerin hemolinfinde birinci jenerasyondaki bireylere göre daha yüksek birikimin olmasına karşın maruziyet süresinin uzaması ile Cd birikiminin azaldığını bildirmişlerdir. Nitekim 61 jenerasyon Cd'ye maruz kalan bireylerin hemolinfinde kontrole göre 6 kat daha fazla kadmiyum birikirken, 33 jenerasyon maruziyet sonrasında kontrole göre 8 kat daha fazla Cd birikiminin olduğu rapor edilmiştir. Larvalardaki Cd birikimlerinin ise 1 jenerasyon Cd'ye maruz kalan bireylerde 33 ve 61 jenerasyon maruz kalan bireylere göre sırası ile 1.6 ve 1.2 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir [142]. Bu bulgular bizim üçüncü jenerasyon bireylerde birinci ve ikinci jenerasyon bireylere göre daha düşük miktarda Cd birikiminin olduğu bulgumuz ile paralellik göstermektedir. Bu durumun, multijenerasyonel metal uygulamasına bağlı olarak bireylerde metale direnç gelişmiş

olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir [141]. Nitekim yapılan çalışmalarda *D. melanogaster*'in metallere davranış, detoksifikasyon, kompartimentalizasyon veya dışa verme gibi farklı şekillerde tepkiler verdiği bildirilmiştir [141]. Shirley ve Sibly [143] 20 jenerasyonun üzerinde Cd uygulanmış olan *D. melanogaster*'de hayatta kalma oranının %30 arttığını bildirmişlerdir. *D. melanogaster*'de ağır metal adaptasyonunda en bilinen mekanizma metal bağlayan sisteince zengin proteinler olan metallothioneinlere ait genin duplikasyonudur. Böylece artan metallothionein proteinleri sayesinde vücut içerisine alınan Cd zararsız hale getirilmektedir. Multijenerasyonel Cd uygulamasına bağlı olarak birikimin azalmasının bir diğer nedeninin metallerin dışarı atılma mekanizmasından kaynaklandığı düşünülmektedir [141].

Çalışmamızda Cd uygulamasının genotoksik etkilerinin belirlenmesi için RAPD-PCR yöntemi kullanılmış ve her bir jenerasyona ait bireylerde farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerinde Cd uygulamasının kontrole göre yeni bant oluşumu, bantların kaybolması ve bantların yoğunluğunda artış ve azalmalara neden olduğu saptanmıştır (Şekil 4.6., Şekil 4.7., Şekil 4.8., Şekil 4.9.). En fazla bant değişiminin genellikle 0.2 ppm konsantrasyonlarında olduğu saptanmıştır (Tablo 4.1., Tablo 4.2., Tablo 4.3., Tablo 4.4). Konu ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada uçucu organik bileşiklerden oluşan bir miks uygulanan *D. melanogaster* bireylerinde uygulama yapılan gruplarda kontrole göre yeni oluşan bantların ve kaybolan bantların olduğu ve bazı bantların da yoğunluklarında değişme olduğu rapor edilmiştir [144]. Yine benzer bir çalışmada ağır metal miks uygulanan *D. melanogaster* bireylerinde artan ağır metal konsantrasyonlarının RAPD profilinde değişikliklere neden olduğu saptanmıştır [139]. Arsenik ve Cd uygulanan zebra balıklarının solungaç dokularında RAPD analizi yapılarak belirlenen genomik kalıp kararlılıklarının Cd uygulamasına bağlı olarak azaldığı rapor edilmiştir [145]. Bizim çalışmamızda Cd uygulamasına bağlı olarak RAPD-DNA profillerinde bant değişimlerinin olması bulgumuz, daha önce yapılan bu çalışmalar ile paralellik göstermektedir. Elde edilen veriler ve literatür bilgileri birlikte değerlendirildiğinde RAPD bantlarında kontrole göre meydana gelen değişimlerin, genomun yeniden düzenlenmesinin neden olduğu oligonükleotidlerin bağlanma bölgelerinde meydana gelen değişimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir [146, 147, 148]. Yeni oluşan bantların, Cd toksisitesinin neden olduğu DNA hasarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir [145].

Yapılan bu çalışmada multijenerasyonel Cd uygulamasına bağlı olarak antioksidan sistemde meydana gelen değişimlerin belirlenmesi amacı ile SOD, KAT ve GS gibi bazı antioksidan enzimlerin gen ifadeleri belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre bu genlerin ifadelerinin birinci jenerasyonda Cd konsantrasyonuna bağlı olarak genellikle artış gösterdiği, ikinci ve üçüncü jenerasyonlarda ise azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.10., Şekil 4.11., Şekil 4.12., Şekil 4.15., Şekil 4.16., Şekil 4.17., Şekil 4.20., Şekil 4.21., Şekil 4.22.). Jenerasyonlar arası farklar dikkate alındığında ise her üç enzimin gen ifadelerinin en yüksek değerlerinin birinci jenerasyonda saptandığı ve ikinci ve üçüncü jenerasyon bireylerde gen ifadelerinin birinci jenerasyona göre daha düşük olduğu saptanmıştır (Şekil 4.13., Şekil 4.14., Şekil 4.18., Şekil 4.19., Şekil 4.23., Şekil 4.24.).

Toksik bir metal olan Cd'nin reaktif oksijen türlerinin üretiminde artışa neden olarak oksidatif strese yol açtığı ve meydana gelen oksidatif stresin antioksidan sistemde değişimlere neden olduğu bildirilmiştir [149]. Bu durum stres koşulları altında antioksidan enzimlerin hem aktivitelerinde hem de bu enzimlerin gen ifadelerinde (mRNA düzeylerinde) meydana gelen değişimlerin belirlenmesi ile saptanabilmektedir. Süperoksit dismutaz, antioksidan sistemin en önemli enzimlerindedir ve süperoksit anyonlarının hidrojen peroksit ve suya dismutasyonunu katalizler. Meydana gelen hidrojen peroksit ise katalaz enzimi tarafından suya ve oksijene dönüştürülür [150]. Yine glutatyon sentaz, toksik ksenobiyotiklerin ve elektrofillerin hücrelerden arındırılmasında önemli bir molekül olan glutatyon mekanizmasında önemli bir enzimdir. Konu ile ilgili olarak, Kim ve ark. (2010) 0.4-50 µg/L Cd uygulaması yapılan *Daphnia magna*'da hem katalaz enzim aktivitesinin hem de gen ifadesinin artış gösterdiğini ve en yüksek gen ifadesinin 10 µg/L Cd uygulanan grupta olduğunu bildirmişlerdir [151]. Casanova ve ark., 10 µg/ml Cd ve 20 µg/ml Cu uygulaması yapılan *Colossoma macropomum* (Tambaqui balığı) bireylerinde katalaz gen ifadesinin uygulamadan sonra birinci saatte artarken üç saat sonra azaldığını ve gen ekspresyonundaki değişimlerin maruziyet süreleriyle doğru orantılı olarak değişim gösterdiğini bildirmişlerdir [152]. Yine uçucu organik bileşiklerin, pestisitlerin ve ağır metallerin SOD ve GS gen ifadelerinde uyguma konsantrasyonu, uygulanan madde ve uygulama süresine bağlı olarak değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir [139, 144]. Çalışmamız sonucunda elde edilen verilere göre Cd uygulamasının özellikle birinci

jenerasyonda Cd birikimlerine paralel olarak oksidatif strese ve antioksidan enzimlerin gen ifadelerinde artışa neden olduğu söylenebilir. İkinci ve üçüncü jenerasyonlarda ise birinci jenerasyona göre daha düşük gen ifadelerinin belirlenmesinin bu jenerasyonlarda Cd birikiminde meydana gelen azalma ve uzun süreli maruziyete adaptasyon ile ilişkilendirilebileceği düşünülmektedir.

NADH dehidrojenaz 2 geninin sekansı göz önünde bulundurulduğunda en fazla baz değişiminin üçüncü jenerasyon bireylerde 0.1 ppm Cd uygulamasında beşinci günde (6 baz) ve yine üçüncü jenerasyon bireylerde 0.2 ppm Cd uygulamasında onuncu günde (6 baz) olduğu saptanmıştır. Bu değişimleri yine üçüncü jenerasyondaki bireyler beş baz ile takip etmiştir (0.1 ppm Cd konsantrasyonunda birinci ve onuncu gün). NADH dehidrojenaz-2 mitokondrideki elektron taşınımından, dokulardaki bakır indirgenmesi ve demir metabolizmasından sorumlu özel proteinleri kodlayan ana genidir [153, 154]. Bunlara ilaveten, NADH dehidrojenaz gen ailesi oksidatif streste önemli rol oynar. Bunun nedeni abiyotik strese karşı antioksidan savunma NADH dehidrojenaz ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi proteinleri içermesidir [155, 156]. Bu genlerin ekspresyonu ile sentezlenen Fenton reaksiyon proteinleri daha reaktif serbest radikallerin oluşumunu engellemek için süperoksit ve peroksi radikallerinin degradasyonunu katalizlerler [154, 156]. Ağır metallere maruziyet sonucunda özellikle baz çifti değişimi sonucu gen mutasyonlarının meydana geldiği birçok çalışma ile gösterilmiştir [157, 158]. Bu mutajenler DNA sekansında bazların değişimine ve DNA'nın şeklinde de değişikliğe neden olabilirler. Bu değişimler replikasyon ve transkripsiyon hatalarını da beraberinde getirir.

Çalışmamızda gıdalarda izin verilen limitlerde Cd alınımının model organizma *D. melanogaster*'de Cd birikimine ve genotoksik etkiye neden olduğu belirlenmiştir. *D. melanogaster* bireylerinde jenerasyonlar arası farklılıklar görüldüğü ve ikinci ve üçüncü jenerasyonlarda Cd birikimlerinde azalma olduğu saptanmış ve bu durumun adaptasyon ve/veya direnç gelişimi ile ilgili olabileceği düşünülmüştür. Nitekim bu durum antioksidan enzimlerin gen ifadelerinde de benzerlik göstermiş ve ikinci ve üçüncü jenerasyon bireylerde antioksidan enzimlerin gen ifadelerinin birinci jenerasyona göre daha düşük olduğu saptanmıştır. Bu durumun bireylerde daha düşük Cd birikiminden veya uzun süreli maruziyette antioksidan sistemin baskılanarak etkin çalışmamasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Ancak RAPD-PCR verilerine göre bant değişim

miktarları (yeni oluşan ve kaybolan bantlar) göz önünde bulundurulduğunda en fazla bant değişimlerinin genellikle yüksek Cd konsantrasyonunda ve üçüncü jenerasyon bireylerde olduğu saptanmıştır. Bu nedenle multijenerasyonel Cd maruziyetinin bireylerde genotoksisite göstererek genomik kalıp kararlılığında değişime neden olduğu düşünülmüştür. Yine NADH dehidrojenaz 2 geninin sekansı göz önünde bulundurulduğunda en fazla baz değişiminin üçüncü jenerasyon bireylerde olduğu saptanmıştır. Her ne kadar Cd birikiminin üçüncü jenerasyonda diğer jenerasyonlara göre daha düşük olduğu belirlenmiş olsa da en fazla baz değişiminin bu bireylerde meydana gelmesi jenerasyonlar boyu Cd maruziyetinin bireylerde mutasyona sebep olacağını düşündürmektedir.

Sonuç olarak elde ettiğimiz bulgulara göre gıdalarda izin verilen limitlerde Cd'ye multijenerasyonel maruziyetin genotoksisiteye neden olduğu ve bu limitlerin farklı organizmalarda yapılacak daha ileri çalışmalar ile desteklendiği takdirde revize edilmesi gerekebileceği düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- [1] P. B. Tchounwou, C. G. Yedjou, A. K. Patlolla, D. J. Sutton, *Heavy Metals Toxicity and the Environment*, *EXS*, Author manuscript; available in PMC, (2014).
- [2] J. Babin-Fenske, M. Anand, *Patterns of insect communities along a stress gradient following decommissioning of a Cu-Ni smelter*, *Environmental Pollution*, 159, 3036–3043, (2011).
- [3] A. Kabata-Pendias, H. Pendias, *Trace elements in soils and plants (3rd ed.)*, Boca Raton: CRC, (2001).
- [4] R. Chaffai, H. Koyama, *Heavy metal tolerance in Arabidopsis thaliana*, *Advances in Botanical Research*, 60, 1–49, (2011).
- [5] R. S. Boyd, N. Rajakaruna, *Heavy metal tolerance*, *Oxford bibliographies in ecology*, 1–24, (2013).
- [6] L. R. Peterson, V. Trivett, A. J. M. Baker, C. Aguiar, A. J. Pollard, *Spread of metals through an invertebrate food chain as influenced by a plant that hyperaccumulates nickel*, *Chemoecology*, 13, 103–108, (2003).
- [7] J. E. Gall, N. Rajakaruna, *The physiology, functional genomics, and applied ecology of heavy metal-tolerant Brassicaceae*, In L. Minglin (Ed.), *Brassicaceae: characterization, functional genomics and health benefits*, 121–148, (2013).
- [8] S. Neilson, N. Rajakaruna, *Phytoremediation of agricultural soils: using plants to cleanmetal-contaminated arable lands*, In A. A. Ansari, S. S. Gill, & G. R. Lanza (Eds.), *Phytoremediation: management of environmental contaminants*, 159–168, (2014).
- [9] M. Bouriou, F. Gimbert, L. Alaoui-Sehmer, M. Benbrahim, L. Aleya, B. Alaoui-Sossé, *Sewage sludge application in a plantation: effects on trace metal transfer in soil–plant–snail continuum*, *Science of the Total Environment*, 502, 309–314, (2015).

- [10] Gesamp, *IMO/FAO/UNESCO/WMO/WHO/IAEA/UN/UNEP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution: Report of the seventeenth session*, Geneva, Switzerland: World Health Organization, 31, (1987).
- [11] International Agency for Research on Cancer (IARC), *Monographs- Cadmium*, Lyon, (1993).
- [12] D.C. Paschal, V. Burt, S.P. Caudill, E. W. Gunter, J.L. Pirkle, E.J. Sampson ve ark. *Exposure of the U.S. population aged 6 years and older to cadmium: 1988–1994*, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 38, 377–383, (2000).
- [13] S. Satarug, J. R. Baker, S. Urbenjapol, M. Haswell-Elkins, P.E. Reilly, D. J. Williams ve ark. *A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population*, Toxicol. Lett., 137, 65–83, (2003).
- [14] *Cadmium in food Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain*, The EFSA Journal, 980, 1-139, (2009).
- [15] M. Filipic, *Mechanisms of cadmium induced genomic instability*, Mutation Research, 733, 69– 77, (2012).
- [16] IARC, *Beryllium, Cadmium, Mercury, and Exposures in the Glass Manufacturing Industry, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans*, International Agency on Research on Cancer, 119–238, (1993).
- [17] M.P. Waalkes, S. Rehm, *Cadmium and prostate-cancer*, Journal of Toxicology and Environmental Health, 43, 251–269, (1994).
- [18] <https://prezi.com/ioliwntgiww4/cevre-gazetesi/>, (8 Ocak 2014).
- [19] <https://www.bilgifenerim.com.tr.>, (22 Kasım 2015).
- [20] M. Sevcikova, H. Modra, A. Slaninova, Z. Svobodova, *Metals as a cause of oxidative stress in fish: a review*, Veterinarni Medicina, 56, 537–546, (2011).
- [21] M. Schieber, N. S. Chandel, *ROS Function in Redox Signaling and Review Oxidative Stress*, Current Biology, 24, (2014).
- [22] J. Nordberg, E. S. J. Arner, *Reactive Oxygen Species, Antioxidants and The Mammalian Thioredoxin System*, Free Radical Biology & Medicine 31, 11, 1287–1312, (2001).

- [23] M. Valko, M. Izakovic, M. Mazur, C. J. Rhodes, J. Telser, *Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence*, Mol. Cell Biochem., 266, 37-56, (2004).
- [24] A. Castaner, E. Roig, A. Serra, T. De Flores, J. Magrina, M. Azqueta, G. Sanz, A. Betriu, *Risk stratification and prognosis of patients with recent onset angina*, Eur. Heart J, 11, 868–875, (1990).
- [25] M. Uysal, *Serbest radikaller, lipit peroksitleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengesini etkileyen koşullar*, Klinik Gelişim, 11, 336-340, (1998).
- [26] A.S. Yalçın, *Serbest radikaller ve patolojik etkileri*, Sendrom, 4, 40-43, (1992).
- [27] D. Ersayit, *Kistik ekinokokkozisli hastalarda oksidatif stres: Oksidan ve antioksidan parametreler arasındaki ilişki*, Yüksek lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, (2009).
- [28] G.J. Burton, E. Jauniaux, *Oxidative stress*, Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol., 25, 287-299, (2011).
- [29] T. P. A. Devasagayam, J. P. Kamat, *Biological significance of singlet oxygen*, Indian Journal of Experimental Biology, 40, 680-692, (2002).
- [30] B. D. McKersie, S. R. Bowley, E. Harjanto, O. Leprince, *Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase*, Plant Physiology, 111(4), 1177-1181. (1996).
- [31] P. Kuppusamy, J.L. Zweier, *Characterization of free radical generation by xanthine oxidase, Evidence for hydroxyl radical generation*, J. Biol. Chem., 264, 9880–9884, (1989).
- [32] B. J. Zimmerman, D. N. Granger, *Mechanisms of reperfusion injury*, Am. J. Med. Sci., 307, 284–292, (1994).
- [33] H.A. Kontos, E.P. Wei, E.F. Ellis, L. W. Jenkins, J. T. Povlishock, G. T. Rowe, M. L. Hess, *Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cats*, Circ. Res., 57, 142–151, (1985).
- [34] M. McIntyre, D. F. Bohr, A. F. Dominiczak, *Endothelial function in hypertension*, Hypertension, 34, 539–545, (1999).

- [35] B.P. Dranka, G.A. Benavides, A.R. Diers, S. Giordano, B. R. Zelickson, *Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling*, Free Radic. Biol. Med., 51(9), 1621-35, (2011).
- [36] R. Guevara, M. Gianotti, J. Oliver, P. Roca, *Age and sex-related changes in rat brain mitochondrial oxidative status*, Exp. Gerontol., 46(11), 923-8, (2011).
- [37] R.A. Jacob, B.J. Burri, *Oxidative damage and defense*, Am J Clin Nutr., 63(6), 985S-90S, (1996).
- [38] B. Halliwell, *Antioxidants and Human Disease: curiosity, cause or consequence?*, Lancet, 344, 721-724, (1994).
- [39] T.O. Hirche, J.P. Gaut, J. W. Heinecke, A. Belaaouaj, *Myeloperoxidase plays critical roles in killing Klebsiella pneumoniae and inactivating neutrophil elastase: effects on host defense*, J Immunol., 174(3), 1557-65, (2005).
- [40] W.P. Lafuse, G.R. Alvarez, B.S. Zwillig, *Regulation of Nramp1 mRNA stability by oxidants and protein kinase C in RAW264.7 macrophages expressing Nramp1(Gly169)*, Biochem. J., 351, 3,687-96, (2000).
- [41] C. C. Winterbourn, M. C. Vissers, A. J. Kettle, *Myeloperoxidase*, Curr. Opin. Hematol., 7, 53–58, (2000).
- [42] J.H. Kim, C.R. Patra, J.R. Arkalgud, A.A. Boghossian, J. Zhang ve ark., *Single-molecule detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediating angiogenic redox signaling on fluorescent single-walled carbon nanotube array*, ACS Nano., 5(10), 7848-57, (2011).
- [43] N. Darmon, Y. Fernandez, A. Periquet, S. Mitjavila, *Superoxide anion scavenging capacity measured by a polarographic method. Comparison with a colourimetric method*, Free Radic. Res. Commun., 17(2), 97-107, (1992).
- [44] Z.H. Zhang, S.Z. Yu, Z.T. Wang, B.L. Zhao, J.W. Hou ve ark. *Scavenging effects of tetramethylpyrazine on active oxygen free radicals*, Zhongguo Yao Li Xue Bao, 15(3), 229-31, (1994).
- [45] H.Z. Chae, H.J. Kim, S.W. Kang, S.G. Rhee, *Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin*, Diabetes Res. Clin. Pract., 45, 101–112, (1999).
- [46] J.M. Mates, C. Perez-Gomez, I. Nunez de Castro, *Antioxidant enzymes and human diseases*, Clin. Biochem., 32, 595–603, (1999).

- [47] Y. Jiang, W. Zhu, H. Li, S. Yin, H. Liu ve ark. *Oxidative desulfurization of fuels catalyzed by Fenton-like ionic liquids at room temperature*, ChemSusChem, 4(3), 399-403, (2011).
- [48] S.Y. Pang, J. Jiang, J. Ma, *Oxidation of sulfoxides and arsenic(III) in corrosion of nanoscale zero valent iron by oxygen: evidence against ferryl ions (Fe(IV)) as active intermediates in Fenton reaction*, Environ. Sci. Technol., 45(1), 307-12, (2011).
- [49] E. Vranova, *Signal Transduction During Oxidative Stress*, J Exp. Bot., 53, 1227- 1236, (2002).
- [50] D.J. Betteridge, *What is oxidative stress?*, Metabolism, 49, 3–8, (2000).
- [51] B. Halliwell, *Oxidants and human disease: some new concepts*, FASEB J. 1, 358–364, (1987).
- [52] B. Halliwell, *Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning)*, Free Radic. Res., 31, 261–272, (1999).
- [53] L.J. Marnett, *Oxyradicals and DNA damage*, Carcinogenesis, 21, 361–370, (2000).
- [54] H. Kamata, H. Hirata, *Redox regulation of cellular signalling*, Cell Signal, 11, 1–14, (1999).
- [55] G. Kroemer, B. Dallaporta, M. Resche-Rigon, *The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis*, Annu. Rev. Physiol., 60, 619–642, (1998).
- [56] G.A. Cortopassi, A. Wong, *Mitochondria in organismal aging and degeneration*, Biochim. Biophys. Acta, 1410, 183–193, (1999).
- [57] D. A. Butterfield, T. Koppal, B. Howard, R. Subramaniam, N. Hall, K. Hensley, S. Yatin, K. Allen, M. Aksenov, M. Aksenova, J. Carney, *Structural and functional changes in proteins induced by free radical-mediated oxidative stress and protective action of the antioxidants N-tert-butyl-alpha-phenylnitron and vitamin E*, Acad. Sci., 854, 448–462, (1998).
- [58] S. Yla-Herttuala, *Oxidized LDL and atherogenesis*, Acad. Sci., 874, 134–137, (1999).
- [59] D. Steinberg, *Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance*, J. Biol. Chem., 272, 20963–20966, (1997).

- [60] E.R. Stadtman, B.S. Berlett, *Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease*, Drug Metab. Rev., 30, 225–243, (1998).
- [61] C.E. Cross, B. Halliwell, E.T. Borish, W.A. Pryor, B.N. Ames, R.L. Saul, J.M. McCord, D. Harman, *Oxygen radicals and human disease*, Ann. Int. Med., 107, 526–545, (1987).
- [62] T. Finkel, *Signal transduction by reactive oxygen species*, J. Cell Biol., 194, 7–15, (2011).
- [63] Z.A. Wood, L.B. Poole, P.A. Karplus, *Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling*, Science, 300, 650–653, (2003).
- [64] J.M.C. Gutteridge, B. Halliwell, *Antioxidants in nutrition, health and disease*, Oxford University Press, (1994).
- [65] İ. Akkuş, *Serbest Oksijen Radikalleri ve Fizyopatolojik Etkileri*, Mimoza Basım Yayın ve Dağıtım, (1995).
- [66] I.S. Young, J.V. Woodside, *Antioxidants in health and disease*, J Clin. Pathol., 54, 176-186, (2001).
- [67] S. Taysi, F. Polat, M. Gul, R. A. Sari, E. Bakan, *Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis*, Rheumatol. Int, 21(5), 200-204, (2002).
- [68] A. Cherubini, C. Ruggiero, M.C. Polidori, P. Mecocci, *Potential markers of oxidative stress in stroke*, Free Radic. Biol. Med, 39(7), 841-852, (2005).
- [69] V.M. Lakshmi, T.V. Zenser, B. B. Davis, *Mechanism of 3-(glutathion-S-yl)-benzidine formation*, Toxicol. Appl. Pharmacol., 125(2), 256-63, (1994).
- [70] R.J. Reiter, D. Acuna-Castroviejo, D.X. Tan, S. Burkhardt, *Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system*, Acad Sci., 939, 200-15, (2001).
- [71] B. Poeggeler, R.J. Reiter, D.X. Tan, L. D. Chen, L. C. Manchester, *Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: a hypothesis*, J Pineal Res, 14(4), 151-68, (1993).
- [72] M. Yoshida, A. Fukuda, M. Hara, A. Terada, Y. Kitanaka ve ark. *Melatonin prevents the increase in hydroxyl radical-spin trap adduct formation caused by the addition of cisplatin in vitro*, Life Sci., 72(15), 1773-80, (2003).

- [73] G.O. Tadmouri, A.N. Başak, *B-thalassemia. in Turkey; A review of the clinical epidemiological molecular and evoluinory aspects*, Hemoglobin, 25(2), 227-239, (2001).
- [74] J. Haleng, J. Pincemail, J.O. Defraigne, C. Charlier, J.P. Chapelle, *Oxidative stress*, Rev. Med. Liege, 62(10), 628-38, (2007).
- [75] C. Kaur, E.A. Ling, *Antioxidants and neuroprotection in the adult and developing central nervous system*, Curr. Med. Chem., 15(29), 3068-80, (2008).
- [76] J.M. McCord, I. Fridovich, *Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein)*, J. Biol. Chem., 244, 6049–6055, (1969).
- [77] T. Fukai, M. Ushio-Fukai, *Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases*, Antioxid. Redox Signal., 15(6), 1583-606, (2011).
- [78] E.A. Hileman, G. Achanta, P. Huang, *Superoxide dismutase: an emerging target for cancer therapeutics*, Expert Opin. Ther. Targets, 5(6), 697-710, (2001).
- [79] A. Mansouri, A. Tarhuni, I. Larosche, F. Reyl-Desmars, C. Demeilliers ve ark. *MnSOD overexpression prevents liver mitochondrial DNA depletion after an alcohol binge but worsens this effect after prolonged alcohol consumption in mice*, Dig Dis., 28(6), 756-75, (2010).
- [80] O. Ozden, S.H. Park, H.S. Kim, H. Jiang, M.C. Coleman ve ark. *Acetylation of MnSOD directs enzymatic activity responding to cellular nutrient status or oxidative stress*, Aging (Albany NY), 3(2), 102-7, (2011).
- [81] H. Aebi, *Catalase. In: Bergmeyer, H. U., ed. Methods of enzymatic analyses*, New York: Academic Press, 673–683, (1974).
- [82] L.A. Del Rio, L.M. Sandalio, J.M. Palma, P. Bueno, F.J. Corpas, *Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications*, Free Radic Biol Med, 13(5), 557-80, (1992).
- [83] Y. Nishinaka, M. Yokota, *Free radical*, Nihon Rinsho, 52, 196-200, (1994).
- [84] K.U. Schallreuter, J. Moore, J.M. Wood, W.D. Beazley, D.C. Gaze ve ark. *In vivo and in vitro evidence for hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) accumulation in the epidermis of patients with vitiligo and its successful removal by a UVB-activated pseudocatalase*, J Investig Dermatol. Symp. Proc., 4(1), 91-6, (1999).

- [85] J. Csiszar, M. Szabo, L. Erdei, L. Marton, F. Horvath ve ark. *Auxin autotrophic tobacco callus tissues resist oxidative stress: the importance of glutathione S-transferase and glutathione peroxidase activities in auxin heterotrophic and autotrophic calli*, J Plant Physiol., 161(6), 691-9, (2004).
- [86] A. Spector, Y. Yang, Y.S. Ho, J.L. Magnenat, R.R. Wang ve ark. *Variation in cellular glutathione peroxidase activity in lens epithelial cells, transgenics and knockouts does not significantly change the response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress*, Exp. Eye Res., 62(5), 521-40, (1996).
- [87] M. F. C. M. Knapen, P. L. M. Zusterzeel, W. H. M. Peters, E. A. P. Steegers, *Glutathione and Glutathione-Related Enzymes in Reproduction*, European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 82, 171-184, (1999).
- [88] A.D. Bolzan, M.S. Bianchi, N.O. Bianchi, *Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in human blood: influence of sex, age and cigarette smoking*, Clin Biochem., 30(6), 449-54, (1997).
- [89] T. Fujita, Y. Fujimoto, *Formation and removal of active oxygen species and lipid peroxides in biological systems*, Nihon Yakurigaku Zasshi, 99(6), 381-9, (1992).
- [90] S.K. Jain, *The accumulation of malonyldialdehyde, a product of fatty acid peroxidation, can disturb aminophospholipid organization in the membrane bilayer of human erythrocytes*, J Biol. Chem., 259(6), 3391-4, (1984).
- [91] N. H. P. Cnubben, I. M. C. M. Rietjens, H. Wortelboer, J. Zanden, P.J. Bladeren, *The interplay of glutathione related processes in antioxidant defense*, Environmental Toxicology and Pharmacology, 10, 141-152, (2001).
- [92] W. Hou, H. Liang, C. Wang, D. Liu, *Detection of glutathione reductase after electrophoresis on native or sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 25, 2926-2931, (2004)
- [93] N. I. Cicerali, *Effect of stress on antioxidant defense systems of sensitive and resistant cultivars of lentil (Lens culinaris M)*, Yüksek Lisans Tezi, (2004).
- [94] D.J. Reed, *Mechanisms of Chemically Induced Cell Injuriy and Cellular Protections Mechanisms*, Introduction to biochemical toxicology, 100, 1115–1121, (2000).

- [95] B. Halliwell, O.I. Aruoma, *Free radicals and antioxidants: The need for in vivo Markers of Oxidative stress*, Journal of American Oil Chemistry Society, 75(2),199–212, (1998).
- [96] E. Stephensen, J. Sturve, L. Forlin, *Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout Liver*, Comparative Biochemistry and Physiology, 133, 435- 442, (2002).
- [97] C.K. Sen, L. Packer, *Thiol homeostasis and supplements in physical exercise*, American Journal of Clinical Nutrition, 72, 653-669, (2000).
- [98] G.A. Leblanc, W.C. Dauterman, *Conguation and Elimination of Toxicants*, Introduction to Biochemical Toxicology, Wiley-Interscience, 697, (2001).
- [99] A. Meister, M.E. Anderson, *Glutathione*, Annu. Rev. Biochem., 52, 711-760, (1983).
- [100] K.T. Douglas, *Mechanisms of action of glutathione-dependent enzymes*, In: Advances in Enzymology, ed. A. Meister, New York: John Wiley and Sons, 103-167, (1987).
- [101] A. Meister, *Glutathione metabolism and its selective modification*, J. Biol. Chem., 263, 17205-17208, (1988).
- [102] H. Sies, *Strategies of antioxidant defense*, Eur. J. Biochem., 215, 213-219, (1993).
- [103] C.M. Grant, I.W. Dawes, *Synthesis and role of glutathione in protection against oxidative stress in yeast*, Redox Rep., 2, 223-229, (1996).
- [104] E. Ristoff, A. Larsson, *Disorders of glutathione metabolism*, The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease, (2002).
- [105] A. R. Nair, O. DeGheselle, K. Smeets, E.V. Kerkhove, A. Cuypers , *Cadmium-Induced Pathologies: Where Is the Oxidative Balance Lost (or Not)?*, Int. J. Mol. Sci., 14, 6116-6143, (2013).
- [106] P. Kumar, R. Kumar, N. S. Nagpure, P. Nautiyal, B. Kushwaha, C. D. Nwani, W. S. Lakra, *In vivo assessment of DNA damage in Cyprinus carpio after exposure to potassium dichromate using RAPD*, Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 39, 1210-48, (2015).

- [107] R. Sarıkaya, Ş. Çakır, K. Solak, *Gıdalardaki koruyucu maddelerin Drosophila melanogaster' de (mwh/flr) ömür uzunluğuna etkisi*, Kastamonu Eğitim Dergisi, 14 (1), 173-184, (2006).
- [108] S. Salman, *Omurgasız Hayvanlar Biyolojisi*, Palme Yayıncılık, Ankara, 177-350, (2004).
- [109] A. Jan, M. Sözen, İ. Kandemir, A. Hasbenli, F. Matur, *Pechenik Eklem Bacaklılar*, Nobel Yayıncılık, Ankara, 341-419, (2013).
- [110] A. M. Clark, M. Rockstein, *Aging in insects*, In: The Physiology of Insecta, 1 (6), 227-281, (1964).
- [111] R. O. Flagg, *Carolina Drosophila Manual*, Carolina Biological Supply Company, Burlington, (2005).
- [112] M. Gürbüz, H. Kızılet, *Evaluation of genotoxicity of two sulphate compounds using the somatic mutation and recombination test in Drosophila melanogaster*, Fresenius Environmental Bulletin, 19, 1695-1700, (2010).
- [113] <https://www.drosophilalifecycle.com> (17 Şubat 2016)
- [114] B. H. Jennings, *Drosophila a versatile model in biology&medicine, review*, materialstoday, 14, 5, 191-195.
- [115] C. Ong, L.L. Yung, Y. Cai, B. H. Bay, G. H. Baeg, *Drosophila melanogaster as a model organism to study nanotoxicity*, Nanotoxicology, 9(3), 396-403, (2015).
- [116] A.N. Bozcuk, *Drosophila melanogaster Meig (Diptera:Drosophilidae) Yaşlanması ve Orgel Hipotezi Üzerinde Araştırmalar*, Doçentlik Tezi, Ankara, (1976).
- [117] E. E. Doğan, *Bazı flavonoidlerin Drosophila melanogaster'de Antigenotoksik Aktivitesi ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması*, Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, (2008).
- [118] M. Lombardo, R.M. Melati, S. Orecchio, *Assessment of the quality of the air in the city of Palermo through chemical and cell analyses on Pinus needles*, Atmospheric Environment, 35, 6435-6445, (2001).
- [119] J. Caselles, C. Colliga, P. Zornoza, *Evaluation of trace element pollution from vehicle emissions in Petunia plants*, Water, Air, and Soil Pollution, 136, 1-9, (2002).

- [120] N. Vural, *Toksikoloji*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 73, Ankara, (1996).
- [121] D. Mendil, O.D. Uluozlu, M. Tuzen, M. *Soylak Investigation of the levels of some element in edible oil samples produced in Turkey by atomic absorption spectrometry*, J Hazard Mater, 165, 724-728, (2009).
- [122] E.P. Nardi, F. S. Evangelista, L. Tormen, T.D. Saintpierre, A.J. Curtius, S.S. De Souza, F.B. JR, *The use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of toxic and essential elements in different types of food samples*, Food Chem., 112, 727-732, (2009).
- [123] L. W. Clayton, F.E. Clayton, *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology*, 2, New York, (1994).
- [124] C.D. Klaassen, *Casarett & Doull's Toxicology*, The Basic Science of Poisons. International Edition, (1996).
- [125] F. Kılıçel, M. K. Türkdoğan, B. Dağ, M. S. Ağırtaş, *Bazı Gastrointestinal Kanser Bölgelerindeki Toparlarda Toksik Ağır Metal Düzeyleri*, XIV. Ulusal Kimya Kongresi, Diyarbakır, (2000).
- [126] A. Viarengo, *Biochemical Effects of Trace Metals* II, Marine Pollution Bulletin., 16(4), 153-158, (1985).
- [127] A.R. Aberhart, G.L. Larson, J.R. Mathews, *Heavy metals in surficial sediments of Fontana Lake*, 18, (13), 351-354, North Carolina (1984).
- [128] P. Castaing, R. Assor, J.M. Jouanneau, O. Weber, *Heavy metal origin and concentration in the sediments of the pointe a pitre bay (Guadeloupe-Lesser Antilles)*, Environ. Geol. Water Sci., 8 (4), 175-184, (1986).
- [129] S. Şener, M. Yıldırım, *Veteriner Toksikoloji*, Teknik Yayıncılık, 343, (2000).
- [130] E. M. Conti, G. Cecchetti, *A biomonitoring study: Trace metals in algae and mollusks from Tyrrhenian coastal areas*, Environmental Research, 93, 99-112, (2003).
- [131] M.J. Bebianno, M. Machado, *Concentrations of metals and metallothioneins in Mytilus galloprovincialis along the South Coast of Portugal*, Marine Pollution of Bulletin, 34(8), 666-670, (1997).

- [132] A.K.S. Massoud, A.A. Ezzat, O.A. El-Rayis, H. Hayez, *Occurrence and distribution of chemical pollutants in Lake Maruit, Egypt. II. Heavy Metals, Water, A.R. and Soil Pollution*, 16, 401- 407, (1981).
- [133] *Nordic Council of Ministers Cadmium Review*, Report no 1, Issue no 04, Date of issue 28, (2003).
- [134] M.A. Serafim, R.M. Bebianno, W.J. Langstone, *Effects of temperature and size on metallothionein synthesis and gill of Mytilus galloprovincialis exposed to Cd*, *Marine Environmental Research*, 54, 361-365, (2002).
- [135] R.B. Clark, *Marine Pollution*, Oxford University Press., 5th. Ed. London, England, (2003).
- [136] <http://www.lenntech.com/who-eu-water-standards.html>, (2010).
- [137] <http://www.epa.gov/ogwdw/contaminants/basicinformation/cadmium.html>, (2010).
- [138] L.A. Crawford, N. W. Lepp, I.D. Hodgkinson, *Accumulation and egestion of dietary copper and cadmium by the grasshopper Locusta migratoria r&f (orthoptera: acrididae)*, *Environmental pollution*, 92, 3, 241-246, (1996).
- [139] Z. B. Doganlar, O. Doganlar, K. Tabakcioglu, *Genotoxic Effects of Heavy Metal Mixture in Drosophila melanogaster: Expressions of Heat Shock Proteins, RAPD Profiles and Mitochondrial DNA Sequence*, *Water Air Soil Pollut*, 225, 2104, (2014).
- [140] L. Xie, P.L. Klerks, *Changes in cadmium accumulation as a mechanism for cadmium resistance in the least killifish Heterandria formos*, *Aquatic Toxicology*, 66, 73–81, (2004).
- [141] A.H. Nguyen, L. E. Altomare, M. C. McElwain, *Decreased Accumulation of Cadmium in Drosophila Selected for Resistance Suggests a Mechanism Independent of Metallothionein*, *Biol Trace Elem Res*, 160, 245–249, (2014).
- [142] A. Kafel, A. Zawisza-Raszka, E.Szulinska, *Effects of multigenerational cadmium exposure of insects (Spodoptera exigua larvae) on anti-oxidant response in haemolymph and developmental parameters*, *Environmental Pollution*, 162, 8-14, (2012).

- [143] M. D. F. Shirley, R. M. Sibly, *Genetic basis of a between environment trade-off involving resistance to cadmium in Drosophila melanogaster*, *Evolution*, 53, 826–836, (1999).
- [144] O. Doganlar, Z.B. Doganlar, *Effects of a Mixture of Volatile Organic Compounds on Total DNA and Gene Expression of Heat Shock Proteins in Drosophila melanogaster*, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 68, 395-404, (2015).
- [145] O. Doganlar, Z. B. Doganlar, F. D. Gokalp Muranlı, U. Guner, *Genotoxic Effect and Carcinogenic Potential of a Mixture of As and Cd in Zebrafish at Permissible Maximum Contamination Levels for Drinking Water*, *Water Air Soil Pollut*, 227, 87, (2016).
- [146] C. Conte, I.Mutti, P. Puglisi, A. Ferrarini, G. Regina, E. A. Maestri, N. Manmiroli, *DNA fingerprinting analysis by a PCR based method for monitoring the genotoxic effects of heavy metals pollution*, *Chemosphere*, 37, 2739–2749, (1998).
- [147] F.A. Atienzar, M. Conradi, A.J. Evenden, A.N. Jha, M.H. Depledge, *Qualitative assessment of genotoxicity using random amplified polymorphic DNA: comparison of genomic template stability with key fitness parameters in Daphnia magna exposed to benzo[a]pyrene*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 2275–2282, (1999).
- [148] W. Liu, P. Li, X. Qi, Q. Zhou, L. Zheng, T. Sun, Y. Yang, *DNA changes in barley (Hordeum vulgare) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis*, *Chemosphere*, 61, 158–167, (2005).
- [149] A. Cuypers, M. Plusquin, T. Remans, M. Jozefczak, E. Keunen, H. Gielen, K. Opdenakker, A. R. Nair, E. Munters, T. J. Artois, T. Nawrot ve ark. *Cadmium stress: an oxidative challenge*, *Biometals*, 23, 927–940, (2010).
- [150] P. Chelikani, I. Fita, P.C. Loewen, *Diversity of structures and properties among catalases*, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(2), 192–208, (2004).
- [151] J. Kim, S. Kim, K. W. An, C. Y. Choi, S. Lee, K. Choi, *Molecular cloning of Daphnia magna catalase and its biomarker potential against oxidative stresses*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 152, 263–269, (2010).

- [152] F. M. Casanova, R. T. Honda, M. S. Ferreira-Nozawa, P. H. R. Aride, S. R. Nozawa, *Effects of Copper and Cadmium Exposure on mRNA Expression of Catalase, Glutamine Synthetase, Cytochrome P450 and Heat Shock Protein 70 in Tambaqui Fish (Colossoma Macropomum)*, Gene Expression to Genetical Genomics, 6, 1–8, (2013).
- [153] V. A. Rapisarda, R. N. Chehín, J. De Las Rivas, L. Rodríguez-Montelongo, R. N. Farías, E. M. Massa, *Evidence for Cu (I)-thiolate ligation and prediction of a putative copper-binding site in the Escherichia coli NADH dehydrogenase-2*, Archives of biochemistry and biophysics, 405(1), 87-94, (2002).
- [154] H. Collin, A.L. Meistertzheim, E. David, D. Moraga, I. Boutet, *Response of the Pacific oyster Crassostrea gigas, Thunberg 1793, to pesticide exposure under experimental conditions*, The Journal of experimental biology, 213(23), 4010-4017, (2010).
- [155] C. Bowler, M. Van Montagu, D. Inze, *Superoxide-dismutase and stress tolerance*, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol, 43, 83-116, (1992).
- [156] M. Lesser, *Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology*, Annu. Rev. Physiol., 68, 253-278, (2006).
- [157] W.D. Atchison, M.F. Hare, *Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity*, The FASEB journal, 8 (9), 622-629, (1994).
- [158] I.M. Sokolova, E.P. Sokolov, K.M. Ponnappa, *Cadmium exposure affects mitochondrial bioenergetics and gene expression of key mitochondrial proteins in the eastern oyster Crassostrea virginica Gmelin (Bivalvia: Ostreidae)*, Aquat. Toxicol., 73, 242-255, (2005).
- [159] P. Joseph, *Mechanisms of cadmium carcinogenesis*, Toxicology and Applied Pharmacology, 238(3), 272-9, (2009).

## ÖZGEÇMİŞ

13 Ekim 1991 yılında Tekirdağ' da doğdum. İlköğrenimimi Atatürk İlköğretim Okulu, ortaöğrenimimi ise Hisar İlköğretim Okulunda tamamladım. 2009 yılında da Hayrabolu Anadolu Lisesini bitirdim. Aynı yıl Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazanıp, 2013 yılında lisans eğitimimi tamamladım. 2014 Şubat ayında Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimime başladım ve halen devam etmekteyim. 2015 Eylül ayında kazandığım Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında da yüksek lisans eğitimim halen devam etmektedir. Ayrıca Trakya Üniversitesi Eğitim Fakültesinde de Pedagojik Formasyon eğitimim devam etmektedir.

## BİLİMSEL FAALİYETLER

### SCI-SSCI veya SCI Expanded Kapsamındaki Yayınlar;

O. Doganlar, M. Uzun, Z.B. Doganlar, M.A. Ovali, G. Ongoren, *Potential Biomarkers for Melatonin Deficiency in Thoracic Aorta and Left Ventricle of Pinealectomised Rats*, In Acta Physiologica, 215, 71-71, (2015).

### Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler;

Z.B. Doganlar, O. Doganlar, G. Ongoren, *The protective role of Quercetin against Arsenic-induced genotoxicity in Drosophila melanogaster*, International Journal of Scientific and Technological Research, 1, (2016).

### Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler;

Z. B. Doğanlar, O. Doğanlar, G. Öngören, *Arsenic-induced genotoxicity on expression levels of antioxidant enzymes and heat shock protein genes in D. melanogaster*, 1st Trakia Medical Days International Scientific Conference May 22-23, Stara Zagora, Bulgaria, (2014).

## **Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler;**

O. Doganlar, Z. B. Doganlar, K. Tabakcıoğlu, G. Öngören, R. Serttaş, S. Erdoğan, *Kan Dokusunda Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Potansiyel Karsinojen Etkisi*, Poster Sunumu, Deneysel Hematoloji Kongresi, Kayseri, (2015).

## **Bilimsel Araştırma Projeleri;**

- 1. Multijenerasyon Kadmiyum (Cd) Uygulamasına Maruz Kalan Drosophila Melanogaster'de Bazı Moleküler Yanıtların Belirlenmesi*, Yardımcı Araştırmacı, BAP Proje No: TUBAP 2014/128.
- 2. Alüminyum ve Gıda Boyası (Azorubin) Uygulanan Drosophila Melanogaster'de Bazı Fizyolojik ve Moleküler Cevaplar: Biyogenetik Amin Değişimleri, Antioksidan Enzimler ve Isı Şok Protein Genlerinin Ekspresyonları, DNA Hasarı ve Mitokondriyal DNA Sekansı*, Yardımcı Araştırmacı, BAP Proje No: TUBAP 2015/09.
- 3. Hipertansiyon Oluşturulan Ratlarda Melatonin Yokluğunun Genotoksik Etkilerinin Isı Şok Protein, Antioksidan Enzim Gen Ekspresyonları, RAPD Profili ve Telomer Uzunluğundaki Değişimlere Göre Araştırılması*, Yardımcı Araştırmacı, BAP Proje No: TUBAP 2015/45.
- 4. Kolera Toksinin Üç Boyutlu Yapısının ve Etkileşim Mekanizmasının İncelenmesi*, Yardımcı Araştırmacı, BAP Proje No: TUBAP 2015/215.

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalında Arş. Gör. Dr. Ayhan ÜNLÜ'nün 113S334 Nolu, ***Poli ADP-Riboz Polimerazlarda ve ADP-Ribozilleyen Toksinlerde Nikotinamid Adenin Dinükleotidi Taniyan Ortak Motifin Üç Boyutlu Yapısının Belirlenerek Bu Ortak Motifin Etkileşim Ara Yüzünün ve Bağlanma Enerjileri Yüksek Sıcak Noktalarının Kuramsal ve Deneysel Yöntemlerle Araştırılması*** isimli TÜBİTAK projesinde Mayıs 2015 tarihinden beri TÜBİTAK bursiyeri olarak çalışmaktayım.

