

TC  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ BİRİMİ

PROJE SONUÇ RAPORU

Proje No: BAP-SÜF TB (FÖ) 2009-7

Methidation'un Subletal Derişimlerinin *Oreochromis niloticus* ( L., 1758)'nun Karaciğer Dokusu Isı Şok Proteini 70 (HSP70) Gen Ekspresyonuna ve Antioksidan Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Proje Ekibi

Yürütücü: Yrd. Doç. Dr. Ferbal ÖZKAN YILMAZ

Araştırmacılar:

Doç. Dr. Serap YALIN  
Doç. Dr. Nefise Özlen ŞAHİN  
Yrd. Doç. Dr. Arzu ÖZLÜER HUNT  
Arş. Gör. Suna Gül GÜNDÜZ  
Arş. Gör. Mehmet BERKÖZ

Mart 2012

MERSİN

<b>Proje No:</b> BAP-SÜF TB (FÖ) 2009-7
<b>Proje Başlığı:</b> Methidation'un Subletal Derişimlerinin <i>Oreochromis niloticus</i> ( L., 1758)'nun Karaciğer Dokusu Isı Şok Proteini 70 (HSP70) Gen Ekspresyonuna ve Antioksidan Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması
<b>Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar:</b> Yrd. Doç. Dr. Ferbal ÖZKAN YILMAZ (Yürütücü), Doç. Dr. Serap YALIN, Doç. Dr. Nefise Özlen ŞAHİN, Yrd. Doç. Dr. Arzu Özlüer HUNT, Arş. Gör. Suna Gül GÜNDÜZ, Arş. Gör. Mehmet BERKÖZ.
<b>Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:</b> Mersin Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Yenişehir Kampüsü, Mersin
<b>Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:</b> 2009-2012
<b>Öz:</b> Bu çalışmada, Mersin Bölgesi tarım alanlarında yaygın olarak kullanılan organofosforlu pestisitlerden Methidation'un subletal derişimlerinin, tatlısu balık türü olan <i>Oreochromis niloticus</i> karaciğer dokusunda ısı şok proteinlerinden HSP70 gen ekspresyonuna olan etkisi, bazı antioksidan enzim aktiviteleri (glutatyon peroksidaz, süperoksid dismutaz, katalaz) ve lipid peroksidasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır.
<b>Anahtar Kelimeler:</b> <i>Oreochromis niloticus</i> , Methidation, HSP70, Antioksidan Enzimler
<b>Projeden Yapılan Yayınlar:</b> Projeden henüz yayın yapılmamıştır.

## Önsöz

Günümüzde hızla artan sucul ortamdaki pestisit kirliliği, gün geçtikçe dikkatleri bu konu üzerine yoğunlaştırmaktadır. Sucul çevrede kararlılığı ve birikimi biyolojik yaşam için bir tehdit oluşturan pestisitler, tarımda kullanılmaya başlandıkları günden beri önemli çevre problemlerine neden olmaktadır. Bu nedenle, sucul organizmaların korunmasına yönelik stratejilerin belirlenmesi için, kimyasalların zarar veren etkilerinin çalışılması gerekmektedir.

Kirleticilerin balıklara olan etki mekanizmalarının moleküler olarak açıklanması, bazı indikatör genlerin ekspresyonunun kantitatif olarak belirlenmesi ile mümkündür. Bazı spesifik genlerin kantitatif olarak tespiti, kimyasala maruz kalan balığın bu durumdan ne derece etkilendiği hakkında önemli bilgiler verebilir. Sucul organizmaların olumsuz faktörlere karşı tepki olarak ürettikleri stres proteinleri, hücresel seviyedeki etkilerin belirlenmesinde kullanılacak önemli biyomarkırlardan olup, kimyasalların sitotoksik etkisini belirlemede Heat Shock Protein (HSP) 70'in en iyi stres protein gruplarından biri olduğu görülmüştür.

Organizma, oksidatif strese maruz kaldığında antioksidan savunma sistemi içerisinde yer alan antioksidan enzimlerin sentezini etkileyerek cevap verebilmektedir. Eğer antioksidan savunma sistemi, oksidatif stresin ortadan kaldırılmasında etkili olursa dokularda herhangi bir hasar meydana gelmeyecektir. Fakat stresin ortadan kaldırılmasında başarısız olursa, antioksidan enzimler inhibisyona; proteinler, lipitler, DNA ve diğer anahtar moleküller oksidasyona uğrayacaktır. Böylece, hücre ve dokularda hasar meydana gelecektir.

Methidation (O,O-dimethyl-phosphorodithioate, S-ester with 4-(mercaptomethyl)-2-methoxy- $\Delta$ -1,3,4-thiadiazolin-5-one), yaygın olarak kullanılan organofosforlu bir insektisittir ve özellikle asetilkolinesterazi inhibe etmesiyle bilinmektedir. Bunun yanı sıra kanserojenik, mutajenik etkiler oluşturduğu yapılan araştırmalarda bildirilmektedir.

Toksikoloji ve moleküler biyoloji konularını içeren bu çalışmada, Methidation'un, balıklar üzerindeki etkileri, *Oreochromis niloticus*'ün karaciğer dokusu gen ekspresyonları üzerinde kantitatif olarak tespit

edilmiştir. Ayrıca methidation'dan kaynaklanan toksisitenin, balıklarda antioksidan enzim seviyeleri üzerine etkileri belirlenmiştir. Bu konuda balıklar üzerine yeterli bilgi bulunmaması nedeniyle, çalışmanın yeni araştırmalara ışık tutması beklenmektedir.

Bu çalışma Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

## İçindekiler

Sıra	Konu Başlığı	Sayfa
	Özet	
	Abstract	
1.	Giriş	
2.	Materyal ve Yöntem	
2.1.	Materyal	
2.1.1	Balıkların Laboratuvara Getirilmesi ve Adaptasyonu	
2.1.2	Pestisit Uygulanması	
2.2	Yöntem	
2.2.1	Gen Ekspresyonu	
2.2.1.1	Balıklardan Doku Örneklerinin Alınması ve Total RNA izolasyonu	
2.2.1.2	cDNA Kütüphanesinin Oluşturulması	
2.2.1.3	PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile İstenilen Genlerin Çoğaltılması ve Gen Ekspresyonunun Ölçülmesi	
2.2.2	Antioksidan Enzimlerinin ve Lipid Peroksidasyonunun Ölçümü	
2.2.2.1	Protein Ölçümü ( Lowry Metodu)	
2.2.2.2	Katalaz Aktivitesinin Tayini	
2.2.2.3	Süperoksid Dismutaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü	
2.2.2.4	Glutathion Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü	
2.2.3.5.	Malondialdehit Düzeyinin(MDA) Ölçümü	
2.3	İstatistiksel Analiz	
3.	Bulgular	
3.1.	Gen Ekspresyonu ile İlgili Bulgular	
3.2.	Antioksidan Enzimlerle İlgili Bulgular	
4.	Tartışma ve Sonuçlar	
5.	Kaynaklar	

## Tablo Listesi

Sıra	Konu Başlığı	Sayfa
Tablo 1.	<i>O. niloticus</i> Karaciğer Dokusu HSP70 Gen Aktivasyonu Üzerine Methidathion'un Subletal Derişimlerinin Etkileri (Methidathion uygulaması sonucu HSP70 mRNA'sının $\beta$ -aktin ile ilişkisi)	
Tablo 2.	<i>Oreochromis niloticus</i> Karaciğer Dokusu CAT Aktivitesi (U/L mg protein) Üzerine Methidathion'un Subletal Derişimlerin Etkileri	
Tablo 3.	<i>O. niloticus</i> Karaciğer Dokusu SOD Aktivitesi (U/L mg protein) Üzerine Methidathion'un Subletal Derişimlerinin Etkileri	
Tablo 4.	<i>O. niloticus</i> Karaciğer Dokusu SOD Aktivitesi (U/L mg protein) Üzerine Methidathion'un Subletal Derişimlerinin Etkileri	
Tablo 5.	<i>O. niloticus</i> Karaciğer Dokusu MDA Düzeyi (nM/mg protein) Üzerine Methidathion'un Subletal Derişimlerinin Etkileri	

## Özet

Bu çalışmada, organofosforlu pestisitlerden methidation'un subletal derişimlerinin, 4 ve 10 gün süre ile *Oreochromis niloticus* karaciğer dokusunda ısı şok proteinlerinden HSP70 gen ekspresyonuna olan etkisi ile katalaz (CAT), süperoksid dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktiviteleri ve lipid peroksidasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu araştırmada methidathion (%99 sigma) *O. niloticus* için LC50 değeri 0.1045 mg/L olarak belirlenmiştir. Bu değerin 1/4 ve 1/8 değerleri olan 0.026 ve 0.013 mg/L derişimler deneyde subletal olarak uygulanmıştır. Uygulanan gün ve derişimlerde karaciğer katalaz (CAT) enzim aktivitesi önemli düzeyde artmıştır. Süper oksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi, deneyin 4. gününde derişime bağılı olarak artmış, 10. günde ise 0.013 mg/L derişim grubunda artmaya devam ederken 0.026 mg/L derişim etkisinde azalmıştır. Karaciğer dokusu glutathion peroksidaz (GSH-Px) enzim aktivitesi deney boyunca gün ve derişime bağılı olarak artış göstermiştir. Lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA) miktarı, methidathion'un denenen derişimlerinde kontrolşe oranla önemli düzeyde artış göstermiştir. Methidathionun 0.013 ve 0.026 mg/L derişimleri etkisinde HSP70 gen ekspresyonunda 4. günde önemli düzeyde artmış, bununla birlikte 10. günde gen ekspresyonu kontrole göre önemli düzeyde azalmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidan enzimler, HSP70, methidathion *Oreochromis niloticus*.

## Abstract

In this study, effects of sublethal concentrations of organophosphorus pesticides methidathion on HSP70 gene expression with catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathion peroxidase (GSH-Px) activities and lipid peroxidation in liver tissue of *Oreochromis niloticus* were investigated. LC50 for 96 hours of methidathion were determined 0.1045 mg/l as in our study. 0.013 mg/L (1/8 of LC50) and 0.026 mg/l (1/4 of LC50) sublethal concentrations were applied for 4 and

10 days in this experiment. CAT and GPx activities in liver tissue were increased relation to both the time doses applied. SOD activities were increased under the influence of both concentrations in 4 day, but in 10 day, it was decreased with influence of 0.026 mg/L methidathion concentration. The tissue MDA levels were significantly increased in relation to both the time and dose applied. Exposure to doses of methidathion caused significantly increased HSP gene expression on 4<sup>th</sup> days, but significantly decreased on 10<sup>th</sup> days when comparative control.

**Key Words:** Antioxidant enzymes, HSP70, methidathion, *Oreochromis niloticus*.

## 1. Giriş

Pestisitler besinlerin korunması bakımından ekonomik faydalar sağlamak amacıyla günümüzde tarım alanlarında kullanılan kimyasallardır. Tarımsal amaç dışında, evlerde, bahçe işlerinde, kırsal alanlarda yabancı otlarla mücadelede ve böceklerle karşı resmi kuruluşlar tarafından da yaygın şekilde kullanılmaktadırlar. Ancak belirtilen faydalı etkilerinin yanı sıra bıraktıkları kalıntılarla su, toprak, hava ve besin kirlenmesine neden olup, ekolojik sistemin dengesini bozmaktadırlar. Pestisitler; etki ettikleri canlı grubuna göre insektisitler, fungusitler, herbisitler, mollusitler, rodentisitler, akarisitler, nematositler olarak, kimyasal tiplerine göre organofosfatlar, karbamatlar, organoklorlular, sentetik piretroidler, fenoller, morfolinler, organometalikler, kloroalkiltiyoller, azoller, anilinler, kloronitriller, üreler, bipyridium bileşenler olarak sınıflandırılabilirler (Mars and Ballantyne, 2004).

Organofosfatların temel etkisi omurgalı ve omurgasız organizmalarda sinir impulslarında iletimi sonlandırmaktan sorumlu asetilkolinesteraz (AChE) enziminin inhibisyonu yoluyla toksik etki gösterirler. Organofosfatlar merkezi, periferel, nöronal sinapslardaki nörotransmitter asetilkolinin (ACh) hidrolizini bloke ederek ACh'nin aşırı birikimine ve ACh reseptörlerinin aktivasyonuna neden olur (Peña-Llopis, 2003). Asetilkolin vücutta en yaygın bulunan nörotransmitterlerden biridir.



Merkezi sinir sisteminin çeşitli bölgelerinden, somatik sinir sisteminin motor nöronlarından, otonomik sinir sisteminde pre-post ganglionik parasempatik nöronlar ile preganglionik sempatik nöronlardan salınmaktadır (Ganong, 2003). Bu etkilerinin yanı sıra organofasfatlı pestisitlerin oksidatif strese neden olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Data ve Gupta, 1992, Banerjee ve ark., 1999).

Methidathion (MD) [0,0-dimethyl S-(2,3-dihydro-5-methoxy-2-oxo-1,3,4-thiadiazol-3-ylmethyl) phosphorodithioate] bir organofosfatlı pestisit olup tarım alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu bileşiğin tüm organizmaları için yüksek derecede toksik olduğu bildirilmektedir (EPA 2002). Methidathion, bazı antioksidan enzimlerin aktivasyonu ve lipid peroksidasyonu üzerine etkili olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Altuntaş ve ark, 2002, Gökhan ve ark., 2003 Sütçü ve ark, 2006, ). Bu pestisit

Pestisidler, akuatik sistemde kirliliğe neden olarak balıklar üzerinde toksik etki göstermektedir (Barbieri ve Ferreira, 2011). Birçok pestisid türü ile yapılan araştırmalarda pestisid toksisitesi sonucu oksidatif stres olduğu ve lipid peroksidasyonunun oksidatif stres biyomarkırı olarak kullanılabileceği belirlenmiştir (Sayeed ve ark., 2003; Atif ve ark., 2005). Pestisitler oksidatif stresi indükleyebilir, serbest radikallerin üretilmesine ve antioksidan enzim sistemi veya serbest oksijen radikal yakalayıcıları içeren enzim sisteminin değişimine neden olabilirler (Banerjee ve ark., 1999).

Pestisit ile yapılan çalışmalarda omurgalı ve omurgasız canlı türlerinde ısı şok proteinlerinin (HSP) miktarında azalış ve artışlara neden olduğu belirlenmiştir (Ceyhun ve ark., 2010, Atamanalp ve Erdoğan, 2010). Isı şoku proteinleri, adları "ısı" ile anılmakla birlikte sentezlenmeleri soğuk ve sıcak şoku, hiperosmotik basınç, kimyasal maddeler, pestisitler, PCB'ler (Poliklorobifeniller) ağır metaller, oksijen azlığı/yokluğu, besin azlığı/yokluğu gibi stres faktörlerinde de artmaktadır (Gao ve ark., 2008). Isı şoku proteinlerine ait genlerin transkripsiyonunun uyarılması, çevresel stres faktörleri gibi birçok stres sinyaline tepki olarak gerçekleşen bir yanıttır. Bu proteinler, stres koşullarına bağlı olarak ortaya çıkan hücre hasarını sınırlandırmak, proteinlerin agregasyonunu önlemek, bozulan

proteinlerin uzaklaştırılmasını sağlamak ve stres uyarımlı hücre ölümüne engel olmak amacıyla sentezlenirler (Boone ve Vijayan, 2002; Micovic ve ark., 2009).

Biyolojik ve biyolojik olmayan stres faktörleri, sinir sistemini harekete geçirir ve kortikosteroit stres hormonlarının salgılanmasını tetikler (Wendelaar Bonga 1997; Mommsen et al. 1999). Bu hormonların üretimi hipofiz bezinin sıkı kontrolü altındadır. Kortikosteroidlerin fizyolojik etkisi, hedef geni harekete geçiren ya da baskılayan hücresel glukokortikoid reseptör tarafından düzenlenmesidir (Munck ve ark., 1984). Kortikosteroid geni metabolizma, osmoregulasyon, bağışıklık ve davranış gibi birçok fizyolojik olayın ortaya çıkmasında rol oynamaktadır (Wendelaar Bonga 1997; Mommsen ve ark., 1999). Isı şok proteinleri, bir multi protein heterokompleksini oluşturmak için glukokortikoid reseptörler ile birlikte bulunurlar (Pratt ve Welsh 1994, Basu ve ark., 2003).

Isı stres proteinleri, değişik organizmalar arasında amino asit seviyesinde yüksek derecede benzerlik gösteren hücresel bir protein grubudur. Bu proteinler fonksiyonlarına, DNA dizilimlerine ve antikora karşı reaksiyonlarına göre sınıflandırılrsa da genellikle molekül kütleleri dikkate alınarak "HSP90 (80-100 kDa), HSP70 (65-75 kDa), HSP60 (koruyucu) ve HSP40" dört grupta değerlendirilirler (Iwama ve ark., 1998; 1999; Lewis ve ark., 1999). Bunların yanısıra düşük molekül kütleli (HSP 20-30 kDa) stres proteinleri ile lizozomal olmayan ve proteinlerin yıkımında yer alan ökaryotik proteinlerde stres proteinleri arasında yer alır (Lewis et al. 1999). Büyük molekül kütleli HSP'ler geniş organizma aralığında bulunduğundan stres indikatörleri olarak küçük molekül kütleli stres proteinleri ise türlere spesifik olduğundan tanısal amaçlar için kullanılırlar (Iwama ve ark.,1999). Bu nedenle HSP70 ve HSP60 gibi büyük molekül kütleli stres proteinleri genelde protein denatürasyonuna sebep olan toksik maddelere hücresel seviyede verilen tepkinin belirleyicisi olarak kullanılırlar (Lewis ve ark., 1999). Son yıllarda kimyasalların sitotoksik etkisini belirlemede hsp70'in en iyi stres protein gruplarından biri olduğu görülmüştür (Mukhopadhyay ve ark., 2003).

Canlıların maruz kaldığı stres ajanları, protein ekspresyonlarının seviyesini ve tiplerini değiştirebilir. Çünkü organizmanın adaptasyon

stratejisinden dolayı farklı doku ve organlar strese karşı farklı hassasiyet gösterebilirler. İlk başlarda ısı şoku proteinleri ile ilgili araştırmalar daha çok memeliler ve model organizmalar ile sınırlıydı. Son yıllarda ise *Macrobrachium rosenbergii*, *Crassostrea gigas*, *Crassostrea virginica*, *Mytilus edulis*, *Ostrea edulis*, *Cirrhinus mrigala*, *Lepomis macrochirus*, *Oncorhynchus mykiss* gibi farklı türlerde sucul organizmalar ile yapılan çalışmalar artmaktadır (Rahman ve ark., 2004; Choi ve ark., 2008; Cruz-Rodriguez ve ark. 2002; Lyons ve ark. 2003, Piano ve ark. 2004, Das ve ark., 2005, Iwata ve ark., 2007, Aksakal ve ark., 2011). Son yıllarda ısı şoku proteinleri çevre kirliliği çalışmalarında da indikatör olarak kullanılmaktadır.

Gornati ve ark. (2004), deniz levrekleriyle yaptıkları bir çalışmada yoğun yetiştiriciliğin ısı şok proteinleri (HSPs), metalloprotein (MTs) ve sitokrom P4501A (CYP4501A) genleri üzerine etkilerine bakmışlar. İlk olarak deniz levrekleri (*Dicentrarchus labrax, L.*)'ni değişik yoğunluklarda 3 aylık sürede yetiştiriciliğe tabi tutarak karaciğer ve beyin dokularında HSP geninin ekspresyonuna bakmışlar. Karaciğerde 80 ve 100 kg/m<sup>3</sup> olan stoklardan beyinde ise 100 kg/m<sup>3</sup> olan stoktan alınan örneklerde HSP ekspresyonunun olduğunu tespit etmişlerdir.

Viant ve ark., (2003) gökkuşuğu alabalığı ile yaptıkları bir çalışmada 10 hafta boyunca balıklara 15 ve 20°C'lik sıcaklıklara maruz bırakarak HSP63, 72, 78 ve 89'un ekspresyonuna bakmışlar. 20°C'lik sıcaklıkta otolitlerde HSP72 seviyesinde artış olduğunu buna karşın diğer metabolik değerlerin (ATP, glikojen vb.) düştüğünü bildirmişlerdir.

*Cyprinus carpio* ile yapılan bir çalışmada havuz suyuna %1'lik NaCl ilave edilmiş ve HSP ekspresyonu üzerine olan etkisini immunoblot yöntemi ile incelemişler. Karaciğerde HSP70 seviyesinin önemli oranda arttığını buna karşın beyin, solungaç ve kaslarda değişimin olmadığını rapor etmişlerdir (De Wachter ve ark., 1998).

Murtha ve ark. (2003), yaptıkları bir çalışmada zebra balıklarını (*Danio rerio*) 37°C'lik sıcaklığa maruz bırakarak değişik dokulardan RNA izole etmişler ve RT-PCR yöntemi kullanarak HSP ekspresyonlarını karşılaştırmışlardır. Hsp70 ekspresyonu beyin, karaciğer ve kasta düzenli artış göstermesine rağmen HSP47 yalnızca beyinde artış göstermiş,

HSP90 $\alpha$ - $\beta$  ve ısı şok faktör1-a (hsf1-a) üç dokuda da eksprese olduğunu fakat sıcaklık stersine cevap olarak artmadığını bildirmişlerdir. HSP ekspresyonunun karşılaştırılmasında yaşlılarda gençlere nazaran bazal HSP70 ve hsf1a seviyesinde artış gözlemlemişlerdir. Ayrıca ısı şokuna cevapta yaş farklılıklarının olabileceğini ve olgun zebra balıklarının HSP çalışmaları için yaşlanma sürecinde uygun modeller olduğunu kaydetmişlerdir.

Gökkuşığı alabalığıyla (*Oncorhynchus mykiss*) yapılan bir başka çalışmada HSP70 ve glucocorticoid reseptörler arasındaki ilişkiye stresin etkisi araştırılmış ve HSP70 ile glukokortikoid arasında yapısal ve fonksiyonel bir ilişki gözlenmiştir. Bu proteinlerin strese karşı tüm organizmaların yaşam seviyesinde etkili olduğu gözlemlenmiştir. (Basu ve ark., 2003).

Pasifik salmonu (*Oncorhynchus kisutch*) ile yapılan bir çalışmada çinko ve sıcaklığın birlikte kombinasyonu ile HSP ekspresyonu üzerindeki etkisine bakılmış. Balıklara değişik rasyonlar hazırlanmış (düşük sıcaklık çinkosuz diyet, yüksek sıcaklık çinkolu diyet, düşük sıcaklık çinkolu diyet ve yüksek sıcaklık çinkosuz diyet) ve yüksek sıcaklıkta yüksek düzeyde çinko içeren diyetle beslenen balıkların karaciğerinde HSP70 seviyesinin düştüğünü western blot yöntemi ile belirlenmiştir (Bowen ve ark., 2006).

Weber ve ark., (2002) yaptıkları bir çalışmada dört gün boyunca  $\beta$ -naphthoflavone maruz bırakılan dişi juvenil gökkuşığı alabalıklarında karaciğer ve ovaryumdan alınan dokularda HSP70 ekspresyonuna northern blot yöntemi ile bakmışlar. Karaciğerde tüm hücrelerde HSP70 ekspresyonunun önemli derecede artmasına rağmen ovaryumda HSP70 seviyesinde farklılık gözlenmediğini bildirmişlerdir.

Piano ve ark., (2004) kadmiyum (100-500  $\mu$ M/L) ve çinkoya (100-500  $\mu$ M/L) maruz kalan istiridye (*Ostrea edulis*) solungaçlarında ve sindirim bezlerinde HSP70 ve metalloproteinin ekspresyonunda doza bağlı olarak özellikle kadmiyum toksisitesinde artış gözlenirken çinko uygulamasında herhangi bir etki belirlenmemiştir. Her iki metal birlikte uygulandığında ise HSP70 ekspresyonu maksimum seviyeye ulaşmıştır.

Kadmiyuma maruz bırakılan Asya deniz tarağı (*Potamocorbula amurensis*)'nda hsp70 ve hsp76'nın sentezlendiği ve HSP70 miktarının daha fazla olduğu bildirilmiştir (Werner and Hinton 1999).

Varo ve ark., (2002) yaptıkları bir çalışmada chlorpyrifos'un besin zinciri yoluyla medeka balığı (*Aphanius iberus*)'nda HSP70 seviyesinde oluşturduğu değişimleri incelemişlerdir. Çalışmada, bu pestisite maruz bırakılan Artemia'lar ile 32 gün boyunca beslenen Medeka balıklarında HSP70 seviyesinde ciddi düzeyde artış gözlemlenmiştir.

Ağır metallerin subletal dozlarının *in vitro* ve *in vivo* ortamda denendiği pek çok organizmada HSP'leri indüklediği bilinmektedir (Dilworth ve Timbrell, 1998). Blechinger ve ark., (2002) *D. rerio* (zebra balığı) embriyolarında, kadmiyumun HSP70 gen ekspresyonunu arttırmasının yanı sıra balıkta morfolojik anomalilere neden oluşunu da rapor etmişlerdir. Bakırın değişik derişimlerine (0, 25, 50, 100 ve 200 µM) maruz bırakılan gökkuşağı alabalığı (*O. mykiss*)'nin karaciğer dokusunda HSP70 ekspresyonuna bakılmış ve uygulanan doza bağlı olarak arttığı bildirilmiştir (Feng ve ark., 2003). Benzer bir çalışma olarak Bone ve Vijayan (2002), bakır, kadmiyum ve arseniğe maruz bıraktıkları aynı balık türünün karaciğer dokusunda HSP70'i 3-6 kat yükselttiğini, fakat HSC70 (HSP70 ailesini oluşturan üyelerden biri) ekspresyonunda herhangi bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir.

Lele ve ark. (1997), yaptıkları bir çalışmada *D. rerio*'nun embriyolarına sıcaklık ve etanol uygulayarak HSP70 ve HSP47 genlerinin ekspresyonunu northern blot analizi ile incelemişlerdir. Embriyolarda sıcaklık uygulaması sonucunda HSP70 ve HSP47 seviyelerinde önemli derecede artış bulunmasına rağmen, etanol uygulamasında HSP47 seviyesinde değişim bulunmamıştır. De Wachterve ark. (1998), %1'lik NaCl ilave edilen havuz suyuna maruz bırakılan sazan (*C. carpio*)'da HSP70 seviyesinin karaciğerde önemli oranda arttığını buna karşın beyin, solungaç ve kaslarda değişimin olmadığını belirtmişlerdir.

Shen ve ark., (2004) kırk gün boyunca farklı çinko konsantrasyonlarına maruz bıraktıkları *Carassius auratus*'ün karaciğerlerinde HSP70 ekspresyonunu SDS-PAGE ve western blot tekniklerini kullanarak incelemişler, çinko uygulanan tüm grupların HSP70

seviyelerinde önemli bir artış gözlemlenmiştir. Sürekli olarak ağır metal ya da ısı şokuna alternatif olarak yapılan başka bir çalışmada ise *O. mykiss*'de elle yakalamanın stres genlerinden olan HSP70 ve HSP60 üzerine olan etkisi immunoblot yöntemi ile incelenmiş ve elle yakalamanın bu iki gen ekspresyonunu etkilemediğini bildirmişlerdir (Washburn, ve ark., 2002.).

Williams ve ark., (1996) metal kontaminasyonuna maruz kalan gökkuşuğu alabalığının solungaçlarında HSP70'in birikim yaptığını, ağaç endüstri atıkları, SDS, BNF (naphthoflavone) ve ağır metal gibi kirleticilerin çalışılan balık dokularında HSP70 seviyesini yükselttiğini bildirmiştir. Benzer bir çalışma olarak Vijayan ve ark., (1998) ağaç endüstri atıkları ve SDS'nin subletal derişimlerinin 96 saatte karaciğerde total HSP70 seviyesini önemli bir şekilde artırdığını bildirmişlerdir.

Tüm aerobik hücrelerde üretilen oksijen türevli serbest radikaller olan süperoksit ( $O_2^-$ ) ve hidrosil ( $OH^-$ ) radikalleri ile bu radikallerin kaynakları pek çok zararlı etkiye sahiptir. Serbest radikaller, dış atomik orbitallerinde bir veya daha fazla çift oluşturmamış elektron içeren yüksek enerjili, stabil olmayan bileşiklerdir. Bu çiftlenmemiş elektron serbest radikallere büyük bir reaktivite kazandırarak protein, lipid, DNA ve nükleotid koenzimler gibi birçok biyolojik materyale zarar vermelerine neden olmaktadır. Eğer hemen ortamdan uzaklaştırılmazlarsa, biyolojik sistemlere toksik etki yaparlar.

Oksidatif stres, pro-oksidan ajanlar ve antioksidantlar arasındaki dengenin pro-oksidan lehine kayması olarak tanımlanmaktadır. Oksidatif stres başlıca 3 faktör nedeniyle meydana gelmektedir.

1. Reaktif oksijen üretiminde artma,
2. Antioksidant savunma sisteminde bozulma,
3. Oksidatif zararı onarmadaki yetersizlik.

Reaktif oksijen türlerinin başlıca zararları membran lipitleri (lipit peroksidasyon), DNA ve protein gibi hücrel makromoleküllerin değişmesiyle sonuçlanır (Dorval ve Hontela, 2003). Dolayısıyla toksik etki protein inaktivasyonuna, DNA hasarına ve lipit peroksidasyonuna sebep olarak hücrenin yapısal ve fonksiyonel aktivitelerini oksidatif hasara uğratar.

Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddelere “antioksidan” adı verilir (Elliot 1999). Antioksidanlar, mevcut radikallerle reaksiyona girerek bunların daha zararlı formlara dönüşmelerini ve yeni serbest radikal oluşumunu önleyen bileşiklerdir. Bu antioksidanlardan süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) gibi enzim sistemleri serbest radikalleri yok etme yeteneğindedir.

Serbest radikaller pestisitlerin toksisitesinde önemli rol oynamaktadırlar. Pestisitler oksidatif stresi indükleyebilir, serbest radikallerin üretilmesine ve antioksidan enzim sistemi veya serbest oksijen radikal yakalayıcıları içeren enzim sisteminin değişimine neden olabilir (Banerjee ve ark., 1999).

Pestisitlerin sucul ortamlarda canlılar üzerinde oksidatif strese neden olduğu yapılan çalışmalarla belirtilmiştir. Kavitha ve Rao (2004), *Gambusia affinis*’te chlorpyrifosun asetilkolinesteraz ve bazı antioksidan enzimler üzerine etkisini incelemişler. 96 saatlik sonucunda, beyin dokusunda asetilkolinesteraz ve kas dokusunda glutathion redüktaz (GRd), SOD ve CAT enzimlerinin inhibe edildiğini ortaya çıkarmışlardır.

Yapılan bir çalışmada, piretroid insektisit olan deltamethrin etkisinde *Channa punctata*’da karaciğer ve böbrek dokularında GSH-Px, GRd ve Glutathion S transferaz (GST) enzim aktiviteleri ile glutathion (GSH) miktarının ve lipid peroksidasyonunun artış gösterdiği saptanmıştır. Deltamethrinin balık dokularında oksidatif stres indüklemeye potansiyelinin olduğu ve GSH’ın deltamethrin etkisine uyum sağlamak üzere koruyucu bir mekanizma sağladığı bildirilmiştir (Atıf, 2008).

Balıklar sucul çevresel değişikliklere duyarlı bir şekilde tepki verirler. Su kalitesi çalışmalarında balıkların kullanılması, memelilerle yapılan geleneksel in vivo testler ile karşılaştırıldığında daha avantajlı olmaktadır. Yapılan çoğu çalışmalar, kirliliğin genotip, gen havuzuna etkisinin önemli olduğunu belirtmektedir. Ayrıca balıkların daha yüksek omurgalılarla benzer şekilde toksik ajanlara tepki vermesi, insanlar için teratojenik, mutajenik ve karsinojenik potansiyel olan maddelerin değerlendirilmesini mümkün kılmaktadır (Kale ve ark., 1999).

Bu çalışmada, organofosforlu pestisitlerden Methidation'un 0.013 ve 0.026 mg/L subletal derişimlerinin 4 ve 10 gün sürelerde *Oreochromis niloticus* karaciğer dokusunda HSP70 gen ekspresyonu ile CAT, SOD ve GSH-Px enzim aktiviteleri ve lipid peroksidasyonu üzerine etkileri belirlenmiştir.

## **2. Materyal ve Yöntem**

### **2.1. Materyal**

Materyal olarak, Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Tatlı Su İşletmesi'nden temin eden, ortalama 20 g ağırlığında olan *O. niloticus* kullanılmıştır. Deneyler, Mersin Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Temel Bilimler Araştırma Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

#### **2.1.2. Balıkların Laboratuvara Getirilmesi ve Adaptasyonu**

Materyal olarak kullanılan *O. niloticus*, Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Tatlı Su İşletmesi'nden elde edilerek, deneylerin yürütüldüğü Mersin Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Temel Bilimler Araştırma Laboratuvarı'na getirilmiştir. Çalışmada, her biri 40 cm x 100 cm x 40 cm boyutlarında, 160 L kapasiteli ve içerisinde 120 L su olan cam akvaryumlar kullanılmıştır. Akvaryumlara 12'şer adet balık yerleştirilerek, onbeş gün süreyle laboratuvar şartlarına adaptasyonları sağlanmıştır.

#### **2.1.3. Pestisit Uygulaması**

Deneyde % 99 saflık derecesine sahip Methidation kullanılmıştır. Bu pestisit *O. niloticus* için LC50 değeri, yapılan letal derişim çalışmasıyla bulunmuş, buna göre iki farklı subletal derişimi deneyde kullanılmak üzere seçilmiştir. LC50 derişim belirlenmesinde genel olarak bilinen öldürücü dozun alt ve üst düzeylerinde 10 farklı ortam derişimi uygulanmış ve bu sonuçlar Probit analiz yöntemi uygulanarak, LC50 düzeyi 0.1045 mg/L olarak belirlenmiştir.

Bulunan LC50 derişiminin ve 1/4'ü olan 0.026 mg/L ve 1/8'i olan 0.013 mg/L subletal düzeyleri deneyde ortam derişimleri olarak kullanılmıştır. Deney gruplarından bir tanesi, pestisit çözündürülmesinde



kullanılan aseton kontrol grubu, diğler iki grup, methidation'un subletal iki farklı derişimini içermiştir. Pestisite maruz bırakılan balıklar, iki gün arayla temiz akvaryumlara alınarak, kimyasallar yenilenmiştir. Pestisit uygulamasından itibaren 4. ve 10. günlerde 6'şar balık disekte edilerek karaciğler dokuları analiz döneminde incelenmek üzere -80 °C ortamda korunmuştur.

## **2.2. Yöntem**

### **2.2.1. Karaciğler Dokusu HSP70 Gen Ekspresyonunun Ölçümü**

#### **2.2.1.1. Doku Örneklerinin Alınması ve Total RNA izolasyonu**

Kimyasal uygulamalarından sonra balık örneklerinin her birinden karaciğler doku örnekleri alınmış ve total RNA izolasyon kiti kullanılarak izole edilmiştir. Total RNA'ların konsantrasyonları ve varlığı, spektrofotometrik ölçümler ve elektroforez uygulamaları ile kontrol edilmiştir.

#### **2.2.1.2. cDNA Kütüphanesinin Oluşturulması**

Total RNA'lardan cDNA sentez kitiyle cDNA kütüphanesi oluşturulmuş ve örnekler çalışılıncaya kadar -20 °C de saklanmıştır.

#### **2.2.1.3. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile İstenilen Genlerin Çoğaltılması ve Gen Ekspresyonunun Ölçülmesi**

cDNA kütüphanesi üzerinden istenilen bölgeler PCR ile çoğaltılmıştır. Bu amaçla gen spesifik primerlerle istenilen bölgeler amplifiye edilmiştir. Yapılan çalışmada pozitif kontrol için  $\beta$ -aktin gen bölgesi de çoğaltılarak yalancı negatifliğin oluşması engellenmiştir. Ayrıca deney düzeneğinde bir negatif kontrol de kullanılarak olası bir yalancı pozitifliğin önüne geçilmiştir. Elde edilen tüm gen bölgeleri % 2'lik agaroz jelde yürütülerek, görüntüleme ise etidyum bromid sayesinde Bio-Imaging Systems UV Transiluminatörü ile yapılmıştır. Gen ekspresyonunun kıyaslanması ise Bio-Rad Imaging Densitometer ve Bio-Rad MultiAnalyst Densitometer kullanılarak semi-kantitatif olarak gerçekleştirilmiştir.

## **2.2.2. Antioksidan Enzimleri ve Lipid Peroksidasyonu Ölçümü**

Antioksidan enzim incelemeleri için her akvaryumdan 6'şar balık kullanılmış ve her balığın karaciğer dokusu buz üzerinde ayrı eppendorf tüplere alınarak hızla -20 °C'ye konulmuştur.

### **2.2.2.1. Protein Ölçümü ( Lowry Metodu)**

Alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşmaktadır. Bu kompleks fosfomolibdatfosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteus-Phenol Reaktifi) redüklemekte ve koyu mavi bir renk oluşmaktadır. Burada rengin koyuluğu ortamdaki protein derişimi ile doğru orantılıdır (Lowry, 1951).

### **2.2.2.2. Katalaz Aktivitesi Ölçümü**

Katalaz aktivitesi tayini Aebi tarafından tarif edilen yöntemle yapılmıştır. Yöntemin esası, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substratının katalaz ile enzimatik yıkılmasının 240 nm de izlenmesidir (Aebi, 1974).

### **2.2.2.3. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi Ölçümü**

GSH-Px tarafından katalizlenen reaksiyonda GSH'nın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oksidasyonu sonucu oluşan GSSG'nin glutasyon redüktaz (GSSG-Rd) kataliziyle tekrar GSH'a dönüşmesi sırasında tüketilen NADPH konsantrasyonu üzerinden 340 nm'de oluşan absorbans azalmasının 4 dakika boyunca izlenmesi prensibine dayanır (Jocelyn, 1970).

### **2.2.2.4. Süperoksid Dismutaz Enzim Aktivitesi Ölçümü**

Oksidatif yolla enerji üretimi sırasında oluşan endojen ve eksojen kaynaklı toksik süperoksit radikallerinin suya ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandıran SOD enzim aktivitesinin ölçüm prensibi, ksantin varlığında ksantin oksidazın açığa çıkardığı süperoksit radikallerinin nitroblue tetrazolium (NBT) ile 560 nm'de absorblanan rengin ölçülmesine dayanır (Sun ve ark., 1988).

### 2.2.2.5. Lipid Peroksidasyonu (MDA) Ölçümü

Lipit peroksidasyon ürünlerinden en stabili olan MDA'nın tiobarbitürik asit ile reaksiyonu sonucu oluşan pembe kırmızı rengin absorbansı spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi esasına dayanmaktadır. Ohkawa'nın Tiobarbitürik asit reaksiyon metodu ile tayin edilecektir (Ohkawa, 1979).

### 2.3. İstatistiksel Analizler

Deneyler sonucunda elde edilen veriler, SPSS 10.0 paket programında OneWay Anova Tukey testi kullanılarak  $P < 0.05$  önem derecesinde belirlenmiştir. Veriler, Ortalama değer  $\pm$  Standart hata (S.H). şeklinde sunulmuştur.

## 3. Bulgular

### 3.1. Gen Ekspresyonu ile İlgili Bulgular

Deney için seçilen methidathion derişimleri etkisinde *O. niloticus* karaciğer dokusu HSP70 gen ekspresyonu özellikle 96 saatlik uygulama sonucunda belirgin derecede artmıştır ( $P < 0.05$ ) (Tablo 1). Bununla birlikte 10. günde denenen iki ortam derişimi etkisinde gen ekspresyonunda kontrole göre önemli düzeyde azalma bulunmuştur ( $P < 0.05$ ) (Tablo 1).

Tablo 1. *O. niloticus* Karaciğer Dokusu HSP70 Gen Aktivasyonu Üzerine Methidathion'un Subletal Derişimlerinin Etkileri (Methidathion uygulaması sonucu HSP70 mRNA'sının  $\beta$ -aktin ile ilişkisi)

Methidathion Derişimleri (mg/L)	SÜRE (Gün)			
	4		10	
	X $\pm$ SH	*	X $\pm$ SH	*
0.000	0.1631 $\pm$ 0.018	ax	0.2056 $\pm$ 0.013	ax
0.013	0.5013 $\pm$ 0.055	bx	0.0036 $\pm$ 0.001	by
0.026	2.1255 $\pm$ 0.140	cx	0.0045 $\pm$ 0.001	by

X $\pm$ SH : Ortalama  $\pm$  Standart Hata

\* : a, b, c harfleri deney grupları arasında, x, y harfleri süreler arası ayırımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında  $P < 0.05$  düzeyinde istatistik ayırım vardır.

### 3.2. Antioksidan Enzimler ve Lipid Peroksidasyonu ile İlgili Bulgular

Antioksidan enzim aktiviteleri üzerinde 0.013 ve 0.026 mg/L Methidathion derişimlerinin etkileri Tablo2-5 gösterilmiştir.

Deneyde kullanılan 0.013 ve 0.026 mg/L methidathion derişimleri etkisiyle, CAT enzim aktivitesi 4. ve 10. günlerde kontrole oranla önemli düzeyde artış göstermiştir (P<0.05) (Tablo. 2).

Tablo 2. *Oreochromis niloticus* Karaciğer Dokusu CAT Aktivitesi (U/L mg protein) Üzerine Methidathion'un Subletal Derişimlerin Etkileri

Methidathion Derişimleri (mg/L)	SÜRE (GÜN)			
	4		10	
	X±SH	*	X±SH	*
0.000	151.15 ± 7.98	ax	153.52 ± 7.61	ax
0.013	187.17 ± 6.23	bx	197.72 ± 3.66	bx
0.026	195.66 ± 6.38	bx	226.46 ± 5.75	cy

X±SH : Ortalama ± Standart Hata

\* : a, b, c harfleri deney grupları arasında, x, y harfleri süreler arası ayırımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0.05 düzeyinde istatistik ayırım vardır.

Karaciğer SOD enzim aktivitesi, deneyde uygulanan 0.013 mg/L ve 0.026 mg/L ortam derişimlerinde 4. günde kontrole oranla önemli düzeyde(P<0.05) artmıştır (Tablo 3). 10. günde ise her iki ortam derişimi etkisinde SOD aktivitesi kontrole göre önemli düzeyde azalma (p<0.05) göstermiştir.

Tablo 3. *O. niloticus* Karaciğer Dokusu SOD Aktivitesi (U/L mg protein) Üzerine Methidathion'un Subletal Derişimlerinin Etkileri

Methidathion Derişimleri (mg/L)	SÜRE (GÜN)			
	4		10	
	X±SH	*	X±SH	*
0.000	0.76 ± 0.03	ax	0.77 ± 0.03	ax
0.013	0.89 ± 0.03	ax	0.53 ± 0.05	by
0.026	1.05 ± 0.04	bx	0.38 ± 0.02	cy

X±SH : Ortalama ± Standart Hata

\* : a, b, c harfleri deney grupları arasında, x, y, z harfleri süreler arası ayırımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0.05 düzeyinde istatistik ayırım vardır.

*O. niloticus* karaciğer dokusu GHS-Px aktivitesinde 0.013 mg/L ortam derişimi etkisiyle 4. gün kontrole göre fark bulunmamış (p>0.05)

0.026 mg/L ortam derişimi etkisinde ise önemli düzeyde artış bulunmuştur ( $P>0.05$ ) (Tablo 4). 10. günde ise denenen iki ortam derişimi de kontrole oranla enzim aktivitesinde önemli düzeyde artışa ( $P<0.05$ ) neden olmuştur (Tablo 4).

Tablo 4. *O. niloticus* Karaciğer Dokusu GSH-Px Aktivitesi (U/L mg protein) Üzerine Methidathion'un Subletal Derişimlerinin Etkileri

Methidathion Derişimleri (mg/L)	SÜRE (GÜN)			
	4		10	
	X±SH	*	X±SH	*
0.000	57.67 ± 2.68	ax	54.51 ± 6.26	ax
0.013	62.40 ± 2.60	ax	74.26 ± 4.06	by
0.026	80.46 ± 3.32	bx	96.60 ± 4.50	cy

X±SH : Ortalama ± Standart Hata

\* : a, b, c harfleri deney grupları arasında, x, y harfleri süreler arası ayırımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında  $P<0.05$  düzeyinde istatistik ayırım vardır.

Lipit peroksidasyon göstergesi olarak ölçülen balık karaciğer dokusu MDA düzeyi, 4. günde 0.026 mg/L ortam derişimi etkisinde, 10. günde ise her iki pestisit derişimi etkisinde artmış, bu artış önemli istatistiksel farklılık şeklinde bulunmuştur ( $P<0.05$ ) (Tablo.5).

Tablo 5. *O. niloticus* Karaciğer Dokusu MDA Düzeyi (nM/mg protein) Üzerine Methidathion'un Subletal Derişimlerinin Etkileri

Methidathion Derişimleri (mg/L)	SÜRE (GÜN)			
	4		10	
	X±SH	*	X±SH	*
0.000	8.90 ± 0.53	ax	9.46 ± 0.44	ax
0.013	9.38 ± 0.51	ax	18.80 ± 0.81	by
0.026	14.86 ± 0.41	bx	25.94 ± 0.95	cy

X±SH : Ortalama ± Standart Hata

\* : a, b, c harfleri deney grupları arasında, x, y harfleri süreler arası ayırımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında  $P<0.05$  düzeyinde istatistik ayırım vardır.

#### 4. Tartışma ve Sonuçlar

Sucul organizmaların olumsuz faktörlere karşı tepki olarak ürettikleri stres proteinleri, hücresel seviyedeki etkilerin belirlenmesinde kullanılabilir bir parametre olup, özellikle son yıllarda çevre kirliliği ve

yetiştiricilik çalışmalarında indikatör olarak kullanılmaktadırlar (Iwama ve ark., 1998; Lewis ve ark., 1999; Werner, 2003).

Bu çalışmada methidathionun subletal derişimleri etkisinde HSP70 gen ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir. HSP70 ailesi ağır metaller, pestisitler gibi ksenobiyotiklerin etkisinde stres proteinleri içinde en çok indüklenen grup olarak bilinmektedir. Sucul organizmaların hemen hemen hepsinde (rotifer, midye, istiridye, deniz tarağı, balıklar vs.) HSP ailesi ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Bunlarda da benzer şekilde ısı ve toksikantların etkisine bakılmış ve hepsinde HSP seviyesinde artış belirlenmiştir (Piano et al. 2004). Moleküler şaperon olarak HSP'lerin, doğal konformasyonunda olmayan proteinlerin doğal konformasyonlarına dönüşümü, protein agregatlarının yıkımı ve hücreden uzaklaştırılmasında görev aldığı bilinmektedir (Feder ve Hoffman, 1999).

HSP70 ailesi ağır metaller, toksik organokimyasallar gibi ksenobiyotiklerin etkisinde stres proteinleri içinde en çok indüklenen grup olarak bilinmektedir. Civa etkisinde *O. mykiss*'de HSP70 miktarında artış belirlenmiştir (Williams ve ark., 1996). Piretroid insektisid esfenvalerate etkisinde *Oryzias latipes*'de HSP60 ve HSP90 miktarı zamana ve derişime göre artış göstermiştir. HSP70 miktarının ise tüm gruplarda artış bulunmuştur (Werner ve ark., 2002). *D. rerio* embriyo ve larvalarında 3,4-dichloroaniline ve diazinon uygulamalarında HSP70 miktarının artış gösterdiği belirlenmiştir (Scheil ve ark., 2009). *Oreochromis mossambicus*'da organoklorlu insektisid DDT ve ağır metaller bakır, kadmiyum, krom ve nikel etkisinde HSP70 ve HSP74, HSP76 izoformlarının karaciğer dokusunda artış gösterdiği bildirilmiştir (Mlambo ve ark., 2010). *D. rerio* larvalarında nikel klorid ve chlorpyrifosun birlikte ve tek uygulamalarında HSP70 düzeyinde artış belirlenmiştir (Scheil ve ark., 2010). Sentetik piretroid deltamethrin etkisinde *O. mykiss*'de kas dokusunda HSP70 gen ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir (Atamanalp ve Erdoğan, 2010). *O. mykiss*' de kas, karaciğer, solungaç ve böbrek dokularında deltamethrin etkisinde HSP70 gen ekspresyonunda artış bulunmuştur (Ceyhun ve ark., 2010). Serbest radikallerin protein oksidasyonuna neden olduğu bildirilmektedir (Berlett ve Stadtman, 1997). Moleküler şaperon olarak HSP'lerin doğal konformasyonunda olmayan

proteinlerin doğal konformasyonlarına dönüşümü, protein agregatlarının yıkımı ve hücreden uzaklaştırılmasında görev aldığı bilinmektedir (Feder ve Hoffman, 1999). Bu çalışmada HSP70 miktarındaki artışın methidathion etkisinde artan serbest radikallere bağlı olarak oksidatif stresle sonuçlanan protein oksidasyonuna karşı hücreyi korumak için olduğu düşünülmektedir (Singh ve ark., 2009, Gupta ve ark., 2010).

Bu çalışmada methidathionun CAT, SOD ve GPx aktivitelerinde önemli artışa neden olduğu bulunmuştur. Birçok pestisit türü ile yapılan araştırmalarda pestisit toksisitesi sonucu oksidatif stres oluştuğu ve lipid peroksidasyonunun oksidatif stres biyomarkırı olarak kullanılabileceği belirlenmiştir (Sayeed ve ark., 2003; Atif ve ark., 2005).

CAT ve SOD enzim sistemi; oksijen toksisitesine karşı ilk savunma sistemini oluşturur. SOD süperoksit radikalının ( $O_2^-$ ),  $H_2O$  ve  $H_2O_2$ 'e dönüşümünü katalizlerken, oluşan  $H_2O_2$  CAT tarafından detoksifiye edilir. bu enzim sistemleri ksenobiyotikler tarafından sürekli stimüle edilirler. GSH-Px,  $H_2O_2$  ve lipid peroksitlerini indirgerken, GSH'ın GSSG'ye yükseltgenmesini katalizleyen enzimdir ve böylece oksidatif strese karşı önemli bir savunma oluşturmaktadır. Ferreira ve ark., (2005) çeşitli kirleticilere maruz kalınmasıyla artan ROS oluşumuna bağlı olarak *Mugil cephalus* ve *Platichthys flesus*'un karaciğer dokularında CAT enzim aktivitelerinin arttığını bulmuşlardır. Zhang ve ark. (2005), *Carassius auratus* ile yaptıkları çalışmada, 2,4-diklorofenol uygulamasının karaciğerde CAT aktivitesinin arttığını rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada karaciğerde SOD ve GSH-Px aktivitesinin 2,4-diklorofenol derişiminin artışına bağlı olarak belirlenmiştir (Zhang ve ark., 2005). Matos ve ark. (2007), karbarile maruz bırakılan *O. niloticus*'un karaciğer dokusunda CAT ve SOD enzim aktivitelerinin azaldığını bildirmişlerdir. Song ve ark. (2006) tarafından *C. carpio* ile yapılan çalışmada, heksaklorobenzen maruziyeti sonucunda karaciğerde düşük dozlarda SOD enzim aktivitesinde anlamlı bir değişim olmadığı, yüksek dozlarda ise SOD enzim aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir. Peixoto ve ark., 2006 oksiflorfen etkisi *O. niloticus*'ta karaciğer CAT enzim aktivitesinin arttığını, SOD enzim aktivitesinin ise süreye bağlı olarak azaldığını bildirmişlerdir. Ferrari ve ark. 2004, karbarilin *O. mykiss*'in

karaciğer dokularında CAT enzim aktivitesini artırdığını; buna karşılık azinfosmetilin CAT enzim aktivitesini düşürdüğünü bildirmişlerdir.

Bu çalışmada methidathion etkisinde MDA miktarının yüksek bulunması lipit peroksidasyonuna işaret etmektedir. Lipit peroksidasyonu meydana gelmemesi veya düşük düzeylerde olması oksidatif enzimlerin koruyucu etkilerinin göstergesidir. *H. fossilis*'te dichlorvos etkisinde MDA miktarının doza bağlı olarak arttığı belirtilmektedir (Vadhva ve Hasan, 1986). *C. auratus*'ta 15 gün süre ile 3,4 dichloroaniline'nin farklı derişimleri etkisinde karaciğer dokusunda MDA miktarının arttığı, GSH miktarının ise azaldığı bildirilmiştir (Li ve ark., 2003). Reaktif oksijen türlerin açık hedefleri olmaları ve hücre membranında yoğun bulunmaları nedeniyle, poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonları oksidatif stresin önemli bir göstergesidir (Li ve ark., 2003). MDA, lipit peroksidasyonu sonucu oluşan ürünlerden biridir ve oksidatif hasarı göstermede yaygın olarak kullanılan bir parametredir.

Bulgularımıza göre CAT ve SOD ve GSH-Px aktivitesinin artması, methidathion etkisi ile balıklarda serbest radikal oluşumunun arttığını göstermektedir. Enzimatik savunmanın yeterli olmaması ve etkileşmenin süresini uzaması, lipit peroksidasyon oluşumuna ve artmasına neden olmuştur.

## 5. Kaynaklar

- AEBI, H. 1974. Catalase In: Bergmeyer U, ed. Methods of Enzymatic Analysis. New York and London, Academic Press. 673-677.
- ALTUNTAS, I., DELIBAS, N., DEMİRCİ, M. and TAMER, N. 2002. The effects of methidathion on lipid peroxidation and some liver enzymes: role of vitamins E and C. Arch. Toxicol., 76, 470-473.
- ATAMANALP, M., ERDOĞAN, O. 2010. Alterations of HSP70 gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to deltamethrin. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 34(4), 359-363.
- ATIF, F., PARVEZ S., PANDEY, S., ALI, M., KAUR M., REHMAN H., KHAN H.A., RAISUDDIN S. Modulatory effect of cadmium exposure on deltamethrin-induced oxidative stress in *Channa punctata* Bloch. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 2005: 49: 371-377.



- ATIF, F., KAUR, M., ANSARI, R.A. AND RAISUDDIN, S. 2008. *Channa punctata* brain metallothionein is a potent scavenger of superoxide radicals and prevents hydroxyl radical-Induced in vitro DNA damage. J. Biochem. Molecular Toxicology, 22(3), 202-207.
- BANERJEE, B.D., SETH, V., BHATTACHARYA, A., PAHSA, S.T., CHAKRABORTY, A.K. 1999. Biochemical effects of some pesticides on the lipid peroxidation and free-radical scavengers. Toxicol. Lett. 107, 33–47.
- BARBIERI E, FERREIRA LAA, 2011. Effects of the organophosphate pesticide Folidol 600® on the freshwater fish, Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Pestic. Biochem. and Physiol., 99(3), 209-214.
- BASU, N., KENNEDY, C.J., and IWAMA, G.K. 2003. The Effects of stress on the association between HSP70 and the glucocorticoid receptor in rainbow trout. Comp. Biochem. Physiol. A 134, 655-663.
- BERLETT, B.S. and STADTMAN, E.R. 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J. Biol. Chem., 272, 20313-20316.
- BLECHINGER, S.R., WARREN, J. T. JR., KUWADA, J. Y. and KRONE, P. H. 2002. Developmental toxicology of cadmium in living embryos of a stable transgenic zebrafish line. Environ. Health Perspect. 110(10), 1041-1046.
- BOONE, A.N. and VIJAYAN, M.M. 2002. Constitutive heat shock protein 70 (HSC70) expression in rainbow trout hepatocytes: Effect of heat shock and heavy metal exposure. Comp. Biochem. Physiol. C 132, 223-233.
- Bowen, L., Werner, I. and Johnson, M.L. 2006. Physiological and behavioral effects of zinc and temperature on coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Hydrobiologia, 559, 161-168.
- CEYHUN, S.B., MURAT ŞENTÜRK, EKINCI, M.D., ERDOGAN, O., CILTAS, A., and KOCAMAN, E.M. 2010. Deltamethrin attenuates antioxidant defense system and induces the expression of heat shock protein 70 in rainbow trout. Comp. Biochem. Physiol. C 152, 215-223.
- CHOI, C.K., JO, P.G., and CHOI, C.Y., 2008. Cadmium affects the expression of Hsp90 and metallothionein mRNA in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, Comp. Biochem. Physiol. C., 147, 286-292.
- CRUZ-RODRIGUEZ, L.A. and CHU, F.L., 2002. Heat-shock protein (HSP70) response in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, exposed to PAHs sorbed to suspended artificial clay particles and to suspended field contaminated sediments, Aquatic Toxicology, 60, 157-168.

- DAS, P., GUPTA, A., MANNA, S.K., 2005. Heat shock protein 70 expression in different tissues of *Cirrhinus mrigala* following heat stress, *Aquaculture Research*, 36(6), 525-620.
- DATTA, J., GUPTA, J., SARKAR, A., and SENGUPTA, D. 1992. Effects of organophosphorus insecticide phosphomidon on antioxidant defense components of human erythrocyte and plasma. *Indian J. Exp. Biol.* 30, 65-67.
- DE WACHTER, B., SCHOLLIERS, A., and BLUST, B. Semiquantitative Immunoblot Detection of 70kda Stress Proteins in the Carp *Cyprinus carpio*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1998, 60, 37--44.
- Dilworth, C. and Timbrell, J.A. 1998. An investigation into the sensitivity of heat shock proteins as markers of cellular damage: A comparative study of hydrazine and cadmium chloride in primary rat hepatocyte cultures. *Biomarkers*, 3(3), 177-190.
- DORVAL, J. and HONTELA, A. 2003. Role of glutathione redox cycle and catalase in defense against oxidative stress induced by endosulfan in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 192, 191-200.
- FEDER, M.E., and HOFMANN, G.E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*, 61, 243-282.
- FENG Q., BOONE A.N., VIJAYAN M.M. 2003. Copper impact on heat shock protein 70 expression and apoptosis in rainbow trout hepatocytes. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 135, 345-355.
- Ferreira, M., Moradas-Ferreira, P. and Reis-Henriques, M.A. 2005. Oxidative stress biomarkers in two resident species, mullet (*Mugil cephalus*) and flounder (*Platichthys flesus*), from a polluted site in River Douro Estuary, Portugal. *Aquatic Toxicology*, 71. 39-48
- GANONG, W.F. 2003. Review of Medical Physiology. Twenty-first edition. San Francisco: The McGraw-Hill Companies; 367s.
- GOKALP, O., GULLE, K., SULAK, O., CICEK, E. and ALTUNTAS, I. 2003. The effects of methidathion on liver: role of vitamins E and C. *Toxicol. Ind. Health*. 19, (2-6), 63-7.
- GORNATI, R., ELENA PAPI, E., RIMOLDI, S., TEROVA, G., SAROGLIA, M., and BERNARDINI, G. 2004. Rearing density influences the expression of stress-related genes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Gene*, 341, 111-118.

- GUPTA, S.C., ANURAG SHARMA, A., MISHRA, M., RANJIT K. MISHRA, R.K. and CHOWDHURI, D.K. 2010. Heat shock proteins in toxicology: How close and how far? *Life Sciences*, 86, 377-384.
- IWAMA, G.K., THOMAS, P.T., FORSYTH, R.B. and VIJAYAN, M.M. 1998. Heat shock protein expression in fish. *Rev. Fish Biol. and Fisheries*, 8, 35-56.
- IWAMA, G.K., VIJAYAN, M.M., FORSYTH, R.B. and ACKERMAN, P.A. 1999. Heat shock proteins and physiological stress in fish. *American Zoologist*, 39, 901-909.
- JOCELYN, P.C. 1970. The Function of Subcellular fractions in the oxidation of glutathione in rat liver homogenate. *Biochem J.*, 117(5), 951-956.
- KALE M., RATHORE, N., JOHN S. and BHATNAGAR D. 1999. Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen species. *Toxicology Letters*, 105, 197-205.
- KAMAL, A.A., GOMAA, A., EL KHAFIF, M., and HAMMAD, A.S. 1989. Plasma lipid peroxides among workers exposed to silica or asbestos dust. *Environ. Res.*, 49, 173-180.
- KAVITHA, P. and RAO, J. 2008. Toxic effects of chlorpyrifos on antioxidant enzymes and target enzyme acetylcholinesterase interaction in mosquito fish, *Gambusia affinis*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2008, 26, 192-198.
- LELE Z., ENGEL S., and KRONE P. H. 1997. HSP47 and HSP70 gene expression is differentially regulated in a stress- and tissue-specific manner in zebrafish embryos. *Developmental Genetics*. 21, 123-133.
- LEWIS, S., HANDY, R.D., CORD, B., BILLINGHURST, Z. and DEPLEDGE, M.H. 1999. Stress proteins (HSP's): Methods of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicology*, 8, 351-368.
- LI, W., YIN, D., ZHOU, Y.H.U., S., and WANG, L. 2003. 3,4 Dichloroaniline-induced oxidative stress in liver of crucian carp (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 56, 251-255.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J, FARR, A.L. and RANDALL, R.J. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagen. *J. Biol. Chem.* 193(1), 265-275.
- LYONS, C., DOWLING, V., TEDENGREN, M., GARDESTROM, J., HARTL, M.J., O'BRIEN, N., VAN PELT, F., O'HALLORAN, J., SHEEHAN, D. 2003. Variability of heat shock proteins and

- glutathione S-transferase in gill and digestive gland of blue mussel, *Mytilus edulis*. Marine Environmental Research, 56(5), 585-597.
- MARRS, T.C. and BALLANTYNE, B. 2004. Pesticide toxicology and international regulation. John Wiley & Sons, 554 s.
- MATOS, P., FONTAINHAS-FERNANDES, A., PEIXOTO, F., CARROLA, J., ROCHA, E. 2007. Biochemical and histological hepatic changes of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to carbaryl. Pest. Biochem. Physiol., 89, 73-80.
- MICOVIĆ, V., BULOG, A., NATALIA KUCIC, N., JAKOVAC, H., RADOSEVIC-STASIC, B., 2009. Metallothioneins and heat shock proteins 70 in marine mussels as sensors of environmental pollution in Northern Adriatic Sea, Environmental Toxicology and Pharmacology. 28(3), 439-447.
- MLAMBO, S.S., VAN VUREN, J.H.J., BASSON, R. and GRANT, B. 2010. Accumulation of hepatic Hsp70 and plasma cortisol in *Oreochromis mossambicus* following sublethal metal and DDT exposure. African Journal of Aquatic Science, 35: 47-53.
- MOMMSEN, T.P., VIJAYAN, M.M. and MOON, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. Rev. Fish Biol. Fish. 9, 211-268.
- MUKHOPADHYAY, I., NAZIR, A., SAXENA, D.K. and CHOWDHURI, D.K. 2003. Heat shock response: hsp 70 in environmental monitoring. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology . 17(5).
- MUNCK, A., GUYRE, P.M. and HOLBROOK, N.J. 1984. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. Endocr. Rev. 5, 25-44.
- MURTHA, J.M., and KELLER, E.T. 2003. Characterization of the heat shock response in mature Zebrafish (*Danio rerio*). Exp Gerontol, 38, 683-691.
- OHKAWA, H., OHISHI, N., and YAGI, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric Acid Reaction", Anal Biochem. 95, 351-358
- PEIXOTO, F., ALVES-FERNANDES, D., SANTOS, D., FONTAINHAS-FERNANDES, A. 2006. Toxicological effects of oxyXuorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*. Pest. Biochem. and Physiol. 85, 91-96
- PENA-LLOPIS, S., FERRANDO, M.D., PENA, J.B. 2003. Fish Tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on

- glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. *Aquatic Toxicology*, 65, 337-360.
- PIANO, A., VALBONESI, P. and FABBRIO, E. 2004. Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals. *Cell Stress & Chaperones* 9(2), 134-142.
- PRATT, W.B. 1993. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 268, 21455-21458.
- PRATT, W.B. and WELSH, M.J. 1994. Chaperone functions of the heat shock proteins associated with steroid receptors. *Semin. Cell Biol.* 5, 83-93.
- RAHMAN, M.M., WILLE, M., CAVALLI, R.O., SORGELOOS, P., and CLEGG J.S., 2004. Induced thermotolerance and stress resistance in larvae of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (deMan, 1879), *Aquaculture*, 230(1-4), 569-579.
- SAYEED, I., PARVEZ, S., PANDEY, S., BIN-HAFEEZ, B., HAQUE, R. and RAISUDDIN, S. 2003. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 56, 295-301.
- SCHEIL, V., KIENLE, C., OSTERAUER, R., GERHARDT, A. and KOHLER, H.R. 2009. Effects of 3,4-dichloroaniline and diazinon on different biological organisation levels of zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae *Ecotoxicology*, 18, 355-363.
- SCHEIL, V., ZURN, A., KOHLER, H.R., RITA TRIEBSKORN, R. 2010. Embryo Development, Stress Protein (Hsp70) Responses, and histopathology in zebrafish (*Danio rerio*) following exposure to nickel chloride, chlorpyrifos, and binary mixtures of them. *Environ. Toxicol.*, 25(1), 83-93.
- SHEN, H., WANG, X.R., ZHANG, J.F., LIU, H. and ZHAO Y.J. 2004. Western blotting responses of heat shock protein (HSP70) in the liver of young fish, *Carassius auratus* to Lower concentration of zinc (Zn super(2+)). *Journal of Agro-Environment Science.* 23(3), 441-443.
- SINGH, M.P., REDDY, M.M., MATHUR, N., SAXENA, D.K. and CHOWDHURI, D.K. 2009. Induction of hsp70, hsp60, hsp83 and hsp26 and oxidative stress markers in benzene, toluene and xylene exposed *Drosophila melanogaster*: role of ROS generation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 235(2), 226-243, 2009.

- SONG, S.B., XU, Y. and ZHOU, B.S. 2006. Effects of hexachlorobenzene on antioxidant status of liver and brain of common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*, 65, 699-706.
- SUN Y., OBERLEY L.W. and YING L.A. 1988. Simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin. Chem.* 34, 497-500.
- SUTCU, R., ALTUNTAS, I., YILDIRIM, B., KARAHAN, N., DEMIRIN, H., and DELIBAS, N. 2006. The effects of subchronic methidathion toxicity on rat liver: Role of antioxidant vitamins C and E. *Cell Biol Toxicol.*, 22, 221-227.
- US EPA. 2002. Interim reregistration eligibility decision (IRED) methidathion. Prevention, Pesticides and Toxic Substances, U. S. Environmental Protection Agency, Publication. EPA, April, 2002 <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/methidathion-ired.pdf>
- VARO, I., SERRANO, R., PITARCH, E., AMAT, F., LOPEZ F.J., and NAVARRO J.C. 2002. Bioaccumulation of chlorpyrifos through an experimental food chain: Study of protein HSP70 as biomarker of sublethal stress in fish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 229-235.
- VIANT, M.R, WERNER, I, ROSENBLUM, E.S., GANTNER, A.S., TJEERDEMA, R.S. and JOHNSON, M.L. 2003. Correlation between stress protein induction and reduced metabolic condition in juvenile steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) chronically exposed to elevated temperature. *Fish Physiol. Biochem.* 29,159-171
- VIJAYAN, M.M., PEREIRA, C., KRZYNSKI, G. and IWAMA, G.K. 1998. Sublethal concentrations of contaminant induce the expression of hepatic heat shock protein 70 in two salmonids. *Aquatic Toxicology*, 40(2), 101-108.
- WASHBURN, B.S., MORELAND, J.J., SLAUGHTER, A.M., WERNER, I., HINTON, D.E. and SANDERS, B.M. 2002. Effects of handling on heat shock protein expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 21(3), 557-560.
- WEBER, L.P., DIAMOND, S.L., BANDIERAB, S.M. and JANZA, D.M. 2002 Expression of HSP70 and CYP1A protein in ovary and liver of juvenile rainbow trout exposed to b-naphthoflavone. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 131, 387-394
- WANDELAAR-BONGA, S.E. 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, 77, 591-625.
- WERNER, I., GEISTA, J., OKIHIROA, M., ROSENKRANZA, P. and HINTON, D.E. 2002. Effects of dietary exposure to the pyrethroid pesticide esfenvalerate on medaka (*Oryzias latipes*) *Marine Environmental Research*, 54, 609-614.

- WERNER, I. and HINTON, D.E. 1999. Field validation of hsp70 stress proteins as biomarkers in Asian clam (*Potamocorbula amurensis*): Is downregulation an indicator of stress?. *Biomarkers*, 4(6), 473-484.
- WERNER, I., CLARK, S.L. and HINTON, D.E. 2003. Biomarkers aid understanding of aquatic organism responses to environmental stressors. *California Agriculture*, 57(4).
- WILLIAMS J.H., FARAG A.M., STANSBURY M.A., YOUNG P.A., BERGMAN H.L. and PETERSEN N.S. 1996. Accumulation of HSP70 in juvenile and adult rainbow trout gill exposed to metal contaminated water and or diet. *Environ. Toxicol. Chem.*,15, 1324-1328.
- ZHANG, X.Y., ZHANG, M.Z., ZHENG, C.J., LIU,J. and HU, H.J. 2009. Identification of two hsp90 genes from the marine crab, *Portunus trituberculatus* and their specific expression profiles under different environmental conditions, *Comp. Biochem. Physiol. C*, 4, 465-473.