

151440

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

151440

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Özgür FIRAT

**CYPRINUS CARPIO'DA BAKIRIN KARACİĞER VE SOLUNGAÇ
DOKULARINDA BİRİKİMİ VE METAL BAĞLAYICI PROTEİN
SENTEZİNE ETKİSİ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2004

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

CYPRINUS CARPIO'DA BAKIRIN KARACİĞER VE SOLUNGAÇ
DOKULARINDA BİRİKİMİ VE METAL BAĞLAYICI PROTEİN
SENTEZİNE ETKİSİ

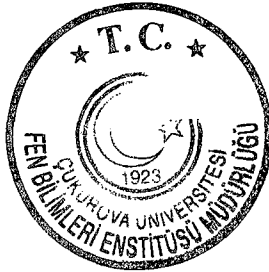
Özgür FIRAT
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BIYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 16.08/2004 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.

İmza:.....	İmza:.....	İmza:.....
Prof. Dr. Ferit KARGIN	Prof. Dr. Seyhan TÜKEL	Yrd. Doç. Dr. Hatice K. GÜVENMEZ
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No: 2391



Prof. Dr. Fikri AKDENİZ
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür

Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: FEF2003YL21

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

CYPRINUS CARPIO'DA BAKIRIN KARACİĞER VE SOLUNGAÇ DOKULARINDA BİRİKİMİ VE METAL BAĞLAYICI PROTEİN SENTEZİNE ETKİSİ

Özgür FIRAT

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman: Prof. Dr. Ferit KARGIN

Yıl:2004., Sayfa :59

Jüri: Prof. Dr. Ferit KARGIN

: Prof. Dr. Seyhan TÜKEL

: Yrd. Doç. Dr. Hatice K. GÜVENMEZ

Bu araştırmada 0.1 ve 1.0 ppm derişimlerinde Cu içeren ortama 10 ve 20 günlük sürelerle bırakılan *Cyprinus carpio*'nun karaciğer ve solungaçlarında bakırın birikimi ve metal bağlayıcı protein düzeylerine etkisi incelenmiştir.

Denenen tüm koşullarda organlardaki bakır birikimi süreye ve ortam derişimine bağlı olarak artmıştır. En yüksek bakır birikimi karaciğerde bulunmuş, bunu solungaç dokusu izlemiştir.

C. carpio'nun karaciğer ve solungaç proteinleri SDS-poliakrilamid jel elektroforez yöntemiyle saptanmıştır. Çalışılan tüm konsantrasyonlarda, karaciğerde 40-54 kDa arasında orta molekül ağırlıkta (OMAP) 5 band, 66-170 kDa arasında yüksek molekül ağırlıklı (YMAP) 6 band olmak üzere toplam 11 protein bandı, solungaçlarda ise 64-101 kDa arasında YMAP'den 4 band ve 25-48 kDa arasında OMAP'den 5 band olmak üzere toplam 9 protein bandı saptanmıştır.

Deney gruplarının tümünde karaciğerde saptanan 11 protein bandının densitometredeki ölçümlerin de 170, 136, 113 ve 88 kDa olan YMAP bantlarında ve 40 kDa OMAP bandının protein yoğunluğu kontrol balıklarıyla karşılaştırıldığında önemli derecede artmıştır. Solungaçlarda ise 90 ve 72 kDa olan YMAP bantlarında ve 30, 26 ve 25 kDa olan OMAP bantlarının protein yoğunluklarının önemli oranda arttığı belirlenmiştir.

Hem karaciğer hem de solungaçlarda protein bantlarındaki yoğunluk artışı derişim ve süre açısından bir ayırım göstermemiştir.

Anahtar Kelimeler :Bakır, Balık, Birikim, Metal Bağlayıcı Protein, *Cyprinus carpio*

ABSTRACT

MSc THESIS

ACCUMULATION OF COPPER IN THE LIVER AND GILL TISSUES OF *CYPRINUS CARPIO* AND ITS EFFECT ON THE METAL BINDING PROTEIN SYNTHESIS

Özgür FIRAT

DEPARTMENT OF BIOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor: Prof. Dr. Ferit KARGIN

Year: 2004, Pages:59

Jury: Prof. Dr. Ferit KARGIN

: Prof. Dr. Seyhan TÜKEL

: Assist. Prof. Dr. Hatice K. GÜVENMEZ

In this study, metal binding protein synthesis and accumulation of copper in the liver and gill tissues of *Cyprinus carpio* were investigated over 10 and 20 days period at concentrations of 0.1 and 1.0 ppm Cu in the medium.

In all experimental conditions, tissue accumulation of copper increased with increasing concentrations of copper in the medium and exposure period. The highest accumulation occurred in the liver followed by the gill.

Liver and gill proteins of *C. carpio* were determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. In all concentrations tested, electrophoretic pattern of the liver and gill proteins consist of 11 and 9 bands, respectively. The 11 bands for liver are between 40 – 54 kDa medium molecular weights proteins (MMWP) for 5 bands and between 66 – 170 kDa high molecular weight proteins (HMWP) for 6 bands. The result for gill (9 bands) are as follows: between 64 – 101 kDa HMWP for 4 bands and between 25 – 48 kDa MMWP for 5 bands.

In all of the experimental groups, in densitometric measurements of 11 protein bands of liver, protein density of 170, 136, 113 and 88 kDa HMWP bands and 40 kDa MMWP band significantly increased when compared with the control groups. Similarly, gill protein density of 90 and 72 kDa HMWP bands and 30, 26 and 25 kDa MMWP bands a significant increase were determined.

The increased density of protein bands of both gill and liver do not dependent upon exposure dose and time.

Key Words : Copper, Fish, Accumulation, Metal Binding Proteins, *Cyprinus carpio*

TEŞEKKÜR

Sadece tez çalışmamda değil, diğer zamanlarda da büyük desteğini ve yardımlarını gördüğüm ve kendileriyle çalışmaktan son derece onur duyduğum hocam sayın Prof. Dr. Ferit KARGIN'a içtenlikle teşekkür ederim. Deneysel çalışmalarında laboratuvar imkanlarından yararlandığım sayın Prof. Dr. Ömer ÇOLAK'a teşekkür ederim. Çalışmalarım sırasında bilgilerinden ve yardımlarından faydalandığım ve her zaman ilgi ve desteğini gördüğüm sayın Yrd. Doç. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ'e teşekkür ederim. Yine yardımlarından dolayı Araş. Gör. Hikmet Y. ÇOĞUN, Araş. Gör. Tüzin A. YÜZEREROĞLU, Araş. Gör. Serhat ÇOŞKAN, Araş. Gör. Gülcihan GÜZELDAĞ, Araş. Gör. Asabil AYGAN, Araş. Gör Sedefgül YÜZBAŞIOĞLU ve uzman biyolog Osman GÜLNAZ'a teşekkür ederim.

Çocukları olmaktan her zaman gurur duyduğum sevgili annem Vahide FIRAT ve babam Haydar FIRAT'a ve diğer değerli aile üyelerime teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca her zaman desteğini yanımda hissettiğim sayın Birgül ŞAHİN'e teşekkür ederim.

Çalışmalarımızı maddi olarak destekleyen Ç. Ü. Araştırma Fonuna ve burs imkanlarından yararlandığım TÜBİTAK-Bilim Adamı Yetiştirme Grubuna da teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Bakır.....	2
1.2.Metal Bağlayıcı Proteinler.....	4
1.3. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE).....	6
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	9
3. MATERYAL VE METOD.....	15
3.1.Dokulardaki Metal Birikiminin Saptanması için Örneklerin hazırlanması.....	16
3.2. Elektrofrez Deneyleri İçin Örneklerin Hazırlanması.....	16
3.2.1. SDS-PAGE Jellerin Hazırlanması.....	17
3.2.1.1. Ayırıcı (Separating) Jelin Hazırlanması (%9'luk).....	17
3.2.1.2. Toplayıcı (Dengeleyici) Jelin Hazırlanması (%3.5).....	19
3.2.2 Protein Örneklerinin SDS-PAGE Jeline Uygulanması ve Ayırımı.....	20
3.2.3. Jelin Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBR-250) ile Boyanması.....	21
3.2.4. Protein Bandlarının Moleküler Ağırlığının Hesaplanması.....	22
3.2.5. Protein Bandlarının Dansitometrik Ölçümleri.....	22
4. BULGULAR.....	23
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	39
KAYNAKLAR.....	45
ÖZ GEÇMİŞ.....	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3.1.	SDS-PAGE stok çözeltileri ve hazırlanışı.....	17
Çizelge 3.2.	SDS-PAGE çalışma çözeltileri ve hazırlanışı.....	18
Çizelge 3.3.	Ayırıcı jelin bileşenleri.....	18
Çizelge 3.4.	Toplayıcı jelin bileşenleri.....	19
Çizelge 3.5.	CBR-250 stok çözeltisi(boyama çözeltisi).....	21
Çizelge 3.6.	Boyayı geri alma çözeltisi.....	21
Çizelge 4.1.	<i>C. carpio</i> 'da 10. günde farklı ortam derişimlerinde karaciğer ve solungaç dokusunda bakır birikimi ($\mu\text{g/L k.a}$).....	24
Çizelge 4.2.	<i>C. carpio</i> 'da 20. günde farklı ortam derişimlerinde karaciğer ve solungaç dokusunda bakır birikimi ($\mu\text{g/L k.a}$).....	25
Çizelge 4.3.1.	10. günde karaciğer dokusundaki protein bandlarının elektroforetik protein analizi.....	31
Çizelge 4.3.2.	20. günde karaciğer dokusundaki protein bandlarının elektroforetik protein analizi.....	32
Çizelge 4.4.1.	10. günde solungaç dokusundaki protein bandlarının elektroforetik protein analizi.....	37
Çizelge 4.4.2.	20. günde solungaç dokusundaki protein bandlarının elektroforetik protein analizi.....	38

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 4.1.	Bakır derişimi ve absorbands arasındaki doğrusal ilişki.....	23
Şekil 4.2.	Farklı ortam derişimlerinde <i>C. carpio</i> 'nun solungaç (A) ve karaciğerin (B) dokularında etkide kalma süresinin bakır birikimi üzerine etkisi.....	26
Şekil 4.3.	Karaciğer örneklerinin SDS-PAGE ile analizi.....	27
Şekil 4.4.1.	Kontrol balıklarının karaciğer dokusundaki protein bandlarının dansitometrik ölçümleri.....	29
Şekil 4.4.2.	10. gün 0.1 ppm bakır etkisindeki balıkların karaciğer dokusundaki protein bandlarının dansitometrik ölçümleri.....	29
Şekil 4.4.3.	10. gün 1.0 ppm bakır etkisindeki balıkların karaciğer dokusundaki protein bandlarının dansitometrik ölçümleri.....	30
Şekil 4.4.4.	20. gün 0.1 ppm bakır etkisindeki balıkların karaciğer dokusundaki protein bandlarının dansitometrik ölçümleri.....	30
Şekil 4.4.5.	20. gün 1.0 ppm bakır etkisindeki balıkların karaciğer dokusundaki bandlarının dansitometrik ölçümleri.....	31
Şekil 4.5.	Solungaç örneklerinin SDS-PAGE ile analizi.....	33
Şekil 4.6.1.	Kontrol balıklarının solungaç dokusundaki protein bandlarının dansitometrik ölçümleri.....	35
Şekil 4.6.2.	10. gün 0.1 ppm bakır etkisindeki balıkların solungaç dokusundaki protein bandlarının dansitometrik ölçümleri.....	35
Şekil 4.6.3.	10. gün 1.0 ppm bakır etkisindeki balıkların solungaç dokusundaki protein bandlarının dansitometrik ölçümleri.....	36
Şekil 4.6.4.	20. gün 0.1 ppm bakır etkisindeki balıkların solungaç dokusundaki protein bandlarının dansitometrik ölçümleri.....	36
Şekil 4.6.5.	20. gün 1.0 ppm bakır etkisindeki balıkların solungaç dokusundaki protein bandlarının dansitometrik ölçümleri.....	37

1. GİRİŞ

Ağır metaller, yoğunlukları 5g/cm^3 'den büyük elementlerin oluşturduğu bir grup olarak tanımlanmakta ve bu kategoriye giren 40 kadar elementten oluşmaktadır (Srivastav, 1994; Zenk, 1996). Çevredeki bu metallerin yüksek derişimleri doğal ve antropojenik orijinli kaynakların bir sonucudur. Kömür, petrol ve mazotta bulunan metaller rüzgar ve yağmurlarla su ortamına girmektedirler. Cu, Zn, Cd, Pb, Hg, Ni, Co ve As gibi ağır metaller, endüstriyel aktiviteler, atık su deşarjları ve asit yağmurlarıyla su ortamlarına girmektedir (Moiseenko ve Kudryavtsera, 2001). Ağır metaller besin zincirine katılabilen ve organizmalarda birikebilen tehlikeli kirleticilerdir. Endüstriyel atıklar, kentsel atıklar ve diğer kirleticilerin ortama gelişigüzel boşaltılması, çevrenin kirlenmesine ve hedef organizmaların fizyolojik ve biyokimyasal aktivitelerinin olumsuz etkilenmesine neden olmaktadır.

Organizmaların çoğunda farklı yaşamsal olayların sürdürülebilmesi için gerekli olan metalleri vücutlarında yoğunlaştırma yetenekleri bulunmaktadır. Bu yetenek belli metabolik süreçlerin artışıyla veya hayvanların beslenme ritminin değişmesiyle artabilmektedir. Ağır metallerin bir çoğunun organik maddelerle kompleks yapabilme yeteneklerinden dolayı dokulara yerleşebilme ve buradan ayrılmama eğiliminde oldukları belirtilmiştir (Menezes ve Quasim, 1984).

Metallerin bir çoğu yeterli miktarda bulunduklarında toksik değildir, su veya besinde yeterli düzeyde bulunmaları gereken mikrobeseleyiciler olarak düşünülmektedir. Balıklarda Ca, Fe, Mg, Se ve Zn gibi elementler yeterince alınmadığında birtakım hastalık belirtileri ortaya çıkarken, Cr, Ni, Va, Ar ve Si gibi elementler omurgasızlarda besleyici elementlerdir. Cd, Hg ve Pb gibi metaller, besleyici bir rolleri olmadığı gibi düşük düzeylerde bile organizmalara çok toksik etki yapmaktadır. Besleyici elementler genellikle metalloenzim ve enzimatik reaksiyonlarda kofaktör olarak görev yapan anahtar elementlerdir.

Aquatik ortamlardaki metallerin düzeylerini belirlemek çeşitli nedenlerden dolayı oldukça güçtür. Bu nedenler arasında 1. Metallerin çoğu (Cu, Zn, Co, Sr, Ni ve Fe) gerekli metallerdir ve organizmalarda doğal olarak eser düzeyde bulunmaktadır. 2. Metalden etkilenme, hem metalin doğrudan etkisinde kalma hem

de mutajenik, embriyotoksik, gonadotoksik ve kanserojenik etkilerini içeren uzun bir süre biyobirikimin sonucu olabilmesi 3. Organizmaya toksik etkilerin, metalin özelliğine, metallerin kombinasyonuna ve diğer fiziko-kimyasal faktörlere bağlı olabilmesidir (Moiseenko ve Kudryavtsera, 2001).

Ağır metaller su kirleticilerinin büyük bir bölümünden sorumlu tutulmaktadır çünkü dünyanın bir çok bölgesinde kritik düzeyde bulunduğu saptanmıştır. Ağır metaller her zaman her yerde bulunmakta, suda çabuk çözünüp taşınmakta, akuatik organizmalar tarafından hemen alınmakta ve proteinlerin sülfidril gruplarına bağlanarak protein ve enzimlerin yapısını değiştirerek organizmaya toksik etki yapmaktadır (Hodson, 1988).

Balıklar tarafından ağır metaller; su, sediment ve besin yoluyla olmak üzere üç farklı şekilde alınmaktadır (Douben, 1989a, b). Metaller suda serbest iyon şeklinde veya inorganik ve organik anyonların çözünmüş kompleksi şeklinde bulunmaktadır. Buna ek olarak çözünmemiş kompleks ve organik partiküller şeklinde de bulunmaktadır. Bunun sonucu olarak organizmalar ağır metallerin serbest iyon şeklinde olanlarını sudan doğrudan alırken, ağır metallerin bazılarını besin zinciri yoluyla bazılarını da sedimentten doğrudan aldıkları belirlenmiştir (Hodson, 1988; Klark ve Fraleigh, 1997).

1.1. Bakır

Zn ve Fe metalleri gibi bakır da yaşam için temel bir elementtir ve enzimatik reaksiyonlarda kofaktör olarak işlev yapmaktadır. Bakır, Askorbik asit oksidaz, tirosinaz, amin oksidaz, ürikaz, betahidroksilaz ve sitokrom oksidaz gibi bazı enzimlerin, glikoproteinlerin ve hemosiyanin gibi önemli moleküllerin yapısında bulunmaktadır (Prosser ve Brown, 1966; Goyer, 1986; Torres ve ark., 1987;). Bakır, gastrointestinal sistemde Fe'in absorpsiyonunda, kemik oluşumunda, hemoglobin sentezinde ve sinir sisteminde miyelin kılıfının korunmasında görev yapan önemli bir metaldir (Sorensen, 1991). Bakır, elektririk, kağıt ve boya endüstrilerinden, metal işleme sanayinden, fosil yakıtların yanmasından ve benzeri kaynaklardan ortama boşaltılmaktadır. Yaygın kullanım alanlarının bulunması nedeniyle bakır iyonlarının

akuatik sistemin kirlenmesine ve organizmalarda birikime neden olduğu saptanmıştır (Kargın, 1996 ,1998).

Bakır, balıklarda hem gerekli hem de toksik bir metaldir. Balıkların çoğu sudaki gerçek konsantrasyonlardan bağımsız olarak bakırı seçici bir şekilde almaktadırlar. Metabolik gereksinimi aşan bakır derişimleri, balıklara zarar vermektedir (Villar ve ark., 2000). Balıklarda bakırın subletal derişimlerinin bir çok olumsuz etkileri olduğu belirtilmiştir. Bu etkiler arasında karaciğer ve solungaç enzimlerinin inhibisyonu (Nemscok ve Hughes, 1988), histidin, sistein ve metionin içeren proteinlere bağlanarak işlevlerinin engellenmesi (Camakaris ve ark., 1999), hücresel düzeylerde reaktif oksijen türlerinin oluşumu (Haris ve Gitlin, 1996) hematokrit düzeyinde değişiklikler (Tort ve ark., 1987), üremenin azalması, oksijen tüketiminde değişiklikler (Felts ve Heath, 1984) ve dokularda birikim önem taşımaktadır (Çoğun ve Kargın; 2004).

Balıklarda organ veya dokulardaki ağır metal birikimi ve toksisitesi, metalin alınıp şekli ve etkide kalan dokunun fizyolojik ve fonksiyonel yapılarıyla ilişkilidir (Campana ve ark., 2003). Doğal ve laboratuvar koşullarında kirleticilerin etkisinde kalan balıkların karaciğerinde oluşabilen biyokimyasal ve histo-sitolojik değişiklikler, kirleticilerin ortamdaki düzeylerinin belirlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır (Hinton ve Lauren, 1990). Karaciğer metal iyonlarının birikimi için önemli bir organ olup, Cu, Cd, Fe, Pb, ve Zn gibi metaller karaciğerde yüksek düzeyde birikmektedir. Bu metalleri yüksek düzeyde biriktirmesinin nedeni bu organın metal detoksifikasyon sisteminin önemli bir merkezi olmasından kaynaklanmaktadır (McCarter ve ark., 1982; Viarengo ve ark., 1985; Hermes ve ark., 2001). Ağır metaller düşük düzeylerde ilk olarak solungaçlarda birikmektedir (Collvin 1984; Kargın ve Erdem, 1992). Balık solungaçları, gaz transferinde, azotlu artıkların uzaklaştırılmasında ve iyon dengesinin düzenlenmesinde önemli görevler üstlenmiştir (Claiborne ve ark., 2002; Marshall, 2002;). Gaz değişimini kolaylaştırmak amacıyla bronşiyal epitelyumun, geniş bir yüzey alanı oluşturması nedeni ile kirleticilerin absorpsiyonu kolaylaşmakta (Jonsson ve ark., 2003) bunun sonucunda kirleticiler solungaçlarda yüksek düzeyde birikmektedir. Dokulardaki

metal birikimi, ortamdaki metal derişimine ve metalin özelliğine ve vücuda alınma şekline bağılı olarak değişim göstermektedir.

1.2. Metal Bağlayıcı Proteinler

Vücut sıvısı yada dokularda biyokimyasal, selular ve fizyolojik biyomarkırların ölçülmesi, çevredeki kontaminantlara karşı organizmaların tepkilerini göstermek açısından büyük önem taşımaktadır. Proteinler, ağır metallere karşı ilgileri nedeniyle, metaller için spesifik biyomarkırlar olarak kabul edilmektedir.

Genelde ağır metaller, organik ligandlarla kompleks yapabilme yeteneklerinden dolayı dokulara yerleşebilmekte ve oradan kolay bir şekilde ayrılmamaktadır (Menezes ve Quasim, 1984). Metallerin etkisinde kalan organizmalarda metal stresine karşı adaptasyon moleküler ve hücresele düzeyde yanıtlar ile oluşmaktadır. Bunlar metallothioneinler (MT) (Roesijadi, 1992; Roesijadi ve Robinson, 1994) ve diğer metal bağlayıcı proteinlerdir (MPB) (Ochi ve ark., 1988; Kegoh ve ark., 1994).

Proteinler, organizmaların metabolizmasında önemli bileşenlerdir. Ağır metaller bu makro moleküllerin normal çalışmalarına katılarak protein metabolizmasında önemli değişikliklere neden olmaktadır. Proteinlerin bozulması veya sentezlerinin artması ve bazı enzimlerin aktivasyonunu artırma veya inhibisyonu metallerin neden olduğu önemli değişikliklerdir (Hilmy ve ark., 1985; De Smet ve Blust, 2001).

Akuatik organizmalarda metallerin biyokimyasal etkileri ile ilgili çalışmaların çoğu metallothionein ve diğer metal bağlayıcı proteinlerin özellikleri ve sentezi üzerine yoğunlaşmıştır (Thaker ve Haritos, 1989; Renwranzt ve ark., 1998; De Smet ve Blust, 2001). Biyolojik sistemler üzerine ağır metal kirliliğinin etkisinin ölçülmesinde, metal bağlayıcı proteinlerin kullanılması bir çok araştırmacı tarafından önerilmektedir (McCarter ve ark., 1982; Renwranzt ve ark., 1998; Olsvik ve ark., 2001).

Balıklarda iki tip metal bağlayıcı protein tanımlanmıştır. Bunlardan biri tek tip protein içeren metallothionein (MT) adı verilen metal bağlayıcı proteinlerdir. MT ilk olarak at böbreğinden izole edilmiştir. MT hayvanlarda 60-63 aminoasitten ibaret olup, düşük molekül ağırlığı (6000-8000 dalton) sahip, %30 oranında sistein ve %6-11 oranında metal içeren aromatik karakterli metal bağlayan bir protein grubudur (Cherian ve Goyer, 1978; Cousins, 1985; Pierson, 1985).

İkincisi ise thionein olmayan metal bağlayıcı proteinlerdir. Bu metal bağlayıcı proteinler çok düşük sistein ve fenil alanin gibi aromatik aminoasit içeren ve yaklaşık 7000-30.000 dalton molekül ağırlığına sahip proteinlerdir. Balıklarda bu sınıfa ait 4 tane protein bulunmaktadır (Pierson, 1985).

MT ve diğer yüksek molekül ağırlıklı metal bağlayıcı proteinler (YMAP) hayvanlar aleminin yanı sıra yüksek yapılı bitkilerde, eukaryotlarda ve prokaryotlarda fazla miktarda bulunmaktadır (Kito ve ark., 1982a; Pierson, 1985; Overnell ve ark., 1987; Irato ve ark., 2003). Balıklarda biriken ağır metaller yalnızca MT değil aynı zamanda YMAP de indüklediği bilinmektedir (McCarter ve ark., 1982; Roch ve ark., 1982). MT ve YMAP balıkların karaciğer, böbrek ve dalak gibi organlarında izole edilmiştir (Cherian ve Goyer, 1978; Thomas ve ark., 1983). Bu dokulardan karaciğer, metal bağlayıcı proteinlerin en fazla sentezlendiği önemli bir organ olarak kabul edilmektedir (Noel-Lambot ve ark., 1978; Dixon ve Sprgue, 1981; Thomas ve ark., 1983).

Ağır metalleri bağlamada MT ve diğer metal bağlayıcı proteinler etkin rol oynamaktadır. Genellikle bu proteinlerin hücre büyümesi ve gelişmesi için gerekli olan Zn ve Cu gibi önemli metallerin regülasyonunda ve Cd ve Hg gibi gerekli olmayan metallerin eliminasyonunda önemli rol oynadıkları kabul edilmektedir (Mackay ve ark., 1993). Metal bağlayıcı proteinler, metallerin artan derişimlerinde organizmaların iklime uyma göstermelerinde büyük önem taşımaktadır. Bu metal bağlayıcı proteinler, enzim ve proteinler üzerindeki serbest sitosolik metalleri bağlayarak metallerin toksik etkilerini azaltmaktadır (Olsvik ve ark., 2001). Ağır metallerin etkisi altında strese giren balıklarda oluşan serbest oksijen radikalleri metal bağlayıcı proteinler tarafından yok edilmektedir buna ek olarak organizmayı alkil ajanlarına karşı korumada da önemli bir rol aldıkları belirlenmiştir (Kito ve ark.,

1986; Irato ve ark., 2003). Akuatik organizmalarda metal bağlayıcı proteinlerin, gerekli metallerin metabolizmasında, toksik metallerin alınıp, depolama, taşınma ve atılımında görev yaptıkları belirlenmiştir (Martinez ve ark., 1991).

Genelde hayvansal organizmalar Cu, Zn, Cd, ve Hg gibi çeşitli ağır metallerin subletal derişimlerinin etkisinde kısa süreli kaldıklarında, buna spesifik metal bağlayıcı proteinleri sentezleyerek cevap vermektedirler (Bryan ve Hidalgo, 1976; Marcano ve ark., 1996; Irato ve ark., 2003). Ağır metallerin çoğunun, balıklarda MT ve yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin sentezini indüklediği bir çok araştırmacı tarafından saptanmış ve en etkili indükleyici metallerin kadmiyum ve çinko olduğu belirtilmiştir (Bryan ve Hidalgo, 1976; Roch ve McCarter, 1984).

Metal bağlayıcı proteinlerin oluşumuna metallerin dışında stres, sakatlanma, enfeksiyonlar, karaciğer hasarları, alkali ajanlar ve glukokortikoid hormonlar gibi çok sayıda endojen ve eksojen faktörlerde neden olmaktadır (Overnell ve ark., 1987; Gagne ve ark., 1990). Buna ek olarak aşırı sıcak veya soğuk ortamlar, yanıklar ağır eksersizler gibi çeşitli stres faktörleri dokularda MT ve diğer yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin sentezini indükleyebilmektedir (Cousins, 1985).

Metallerin etkisinde kalan organizmaların dokularında öncelikle karaciğerde metal düzeyi yükselmeye başlar, bunu MT ve diğer metal bağlayıcı proteinlerin sentezi izler, bu da karaciğerde metalin tekrar birikime devam etmesini sağlar (Cousins, 1985).

Organizmalarda metal bağlayıcı proteinlerin oluşumu ve dokulardaki artışı, sadece metalin etkisiyle değil aynı zamanda metal birikimini etkileyen faktörlere bağlı olarak da değişim göstermektedir (Howard ve Hacker, 1990). Organizmalarda metal derişimleri dolayısıyla metal bağlayıcı proteinler, türe, organlara, yaşa, gelişme durumuna, ve diğer fizyolojik faktörlere göre değişim göstermektedir (Kagi ve Schaffer, 1988).

1.3. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

Proteinler, izoelektrik noktalarının (pI) üzerindeki pH değerlerinde (-) yüklüdürler ve elektriksel alanda anoda doğru göç ederler; izoelektrik noktalarının

altındaki pH değerlerindeyse (+) yüklüdürler ve katoda doğru göç ederler. Bu özellikleri nedeniyle protein karışımlarının ayrılmasında elektroforez yönteminden geniş çapta yararlanılmaktadır. Elektroforez, molekül ağırlığının saptanmasında, miktar tayininde, saflık kontrolünde ve oligomerik proteinlerin alt birimlerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Ertan ve Arda, 1999).

Poliakrilamid jeller, ortamda inisiyator (başlatıcı) ve katalizör bulunduğunda N-N'-metilen bis akrilamid ile akrilamidin çapraz bağlar oluşturmasıyla polimerize olarak porlu bir yapı oluştururlar. Jeldeki akrilamid-bis akrilamid oranı oldukça önemlidir. Çünkü jeldeki bu bileşenlerin yüzdesi düşük olursa jelin por çapı genişler ve bunlar, molekül ağırlığı büyük olan proteinlerin ayrılmasına olanak sağlar. Yüksek jel yüzdeleri ise küçük porlar oluşturacağından bu tip jeller, molekül ağırlığı küçük proteinlerin ayrılmasında kullanılır. Örneklerin ayrılması sırasında protein örneklerinin düzgün bir şekilde ayırıcı jele geçmesini sağlamak amacıyla polimerizasyondan sonra ayırıcı jelin üzerine por çapı daha büyük olan dengeleyici jel dökülerek tarak yerleştirilir ve örnekler oluşan gözlere yerleştirilir (Gaal ve ark., 1980).

SDS-PAGE yöntemi yaygın olarak proteinlerin analizi ve özelliklerinin saptanmasında kullanılmaktadır. Sodium dodesil sülfat (SDS) anyonik bir deterjan olup proteinlere sıkı sıkıya bağlanarak proteinleri denatüre etmektedir. Her bir SDS molekülü bir polipeptid zincirindeki iki amino asit artığına bağlanır. SDS'nin proteine bağlanma özelliği farklı protein konsantrasyonlarında denenmiş ve bir gram protein için ortalama 1.4 g SDS kullanılması gerektiği saptanmıştır. SDS'nin proteinlere bağlanması onları negatif yüklü yapacağından SDS-protein kompleksleri elektroforez ortamında anoda doğru göç ederler. Elektroforez ortamında poliakrilamid jellerin elek etkisi nedeniyle farklı büyüklükteki proteinlerin, farklı şekillerde hareket ettikleri görülür. Bu yüzden SDS ile muamele edilmiş proteinlerin separasyonu, proteinlerin büyüklüğündeki farklılığı gösterir. Bu özellikler dikkate alındığında SDS-PAGE yönteminin moleküler ağırlıkları bilinmeyen proteinlerin analizleri için uygun bir yöntem olduğu belirtilmiştir (Weber ve Osborn, 1969).

Poliakrilamid jellerde ayırımı yapılan proteinlerin molekül ağırlıkları, standart protein markırları kullanarak elektroforez ortamındaki hareketlerinin karşılaştırılmasıyla hesaplanır. Moleküler ağırlık hesaplamaları %10 akrilamid jeller kullanılarak yapılmaktadır (Weber, 1972; Podulso, 1980; Walker ve ark., 1988).

SDS-PAGE'den sonra protein bandlarını görünür hale getirmek için bir çok yöntem kullanılmaktadır. Bunlar arasında en fazla kullanılan bandların boyandıktan sonra değerlendirilmesidir. Bu amaç için en uygun ve hassas olanları, Coomassie Brilliant Blue R-250 ve Gümüş Boyama yöntemleridir (Granzier ve Wang, 1993; Küntzer ve ark., 1994).

Ağır metallerin etkisine bırakılan *C. carpio*'da MBP'ler üzerine yapılan araştırmalar (Cinier ve ark., 1998; De Smet ve Blust, 2001; De Boeck, 2003) genelde MT'ler üzerine yoğunlaşmıştır. Sazanlarda MT'ler dışındaki diğer MBP'ler üzerine yapılan araştırmalar oldukça azdır. Bu nedenle bu araştırmada *Cyprinus carpio*'nun solungaç ve karaciğer dokusunda bakır birikimi ve bakırın, MT'lerin dışındaki MBP'lerin sentezi üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Noel-Lambot ve ark. (1978), *Anguilla anguilla* (yılan balığı)'nın solungaç ve karaciğer dokularında Cu, Zn ve Cd gibi ağır metallerin birikimini ve metallothionein (MT) gibi metal bağlayıcı proteinlerin metal etkisindeki miktarlarını incelemişlerdir. Araştırmada yılan balığından izole edilen MT'lerin memeli dokularındakine benzediği ve Cd etkisinde MT'nin karaciğerde yüksek düzeyde, solungaçlarda ise ölçülebilecek düzeyin altında olduğunu saptanmıştır.

Zengin sistein artığı içeren fakat düşük düzeyde yada hiç aromatik amino asit artığı içermeyen 10-12 kDa moleküler ağırlığındaki Cd bağlayıcı proteinler, *Scyllia serrata* (Olafson ve ark. 1979) ve *Cancer pagurus* (Overnell ve Trehella, 1979) yengeçlerinde izole edilmiştir. Bu proteinler, Cd'un yanı sıra fark edilir düzeyde Cu ve Zn miktarlarını da içermiştir.

Ridlington ve ark. (1981), dört deniz organizmasının karaciğer ve böbreklerinde 10 kDa moleküler ağırlığında metal bağlayıcı proteini izole etmiştir ve bu proteinin amino asit kompozisyonlarının ve moleküler ağırlıklarının sıçan MT'lerine benzemediğini saptamışlardır.

Lyon ve ark. (1983), tatlı su istakozunun (*Austropotamobius pallies*), in vivo ve in vitro olarak uygulanan Cu, Zn ve Cd iyonlarının etkisinde hepatopankreasta üç tane 3.6, 5.5 ve 12 kDa moleküler ağırlığında metal bağlayıcı proteinleri rapor etmişlerdir. Yapılan incelemeler bu proteinlerin tipik MT'ler olmadıklarını göstermiştir.

Thomas ve ark. (1983), Gökkuşuğu alabalığının (*Salmo gairdneri*) karaciğer, böbrek ve solungaçlarındaki Cd birikiminin ve Cd bağlayıcı proteinlerin karşılaştırılması çalışmalarında balık vücudundaki Cd'un %99'undan fazlasının karaciğer, böbrek ve solungaçlarda biriktiğini ve Zn, MT'lere bağlanırken Cd'un iki tane düşük moleküler ağırlıklı proteinlerce depo edildiğini rapor etmişlerdir.

Menezes ve Quasim (1984), *Tilapia mossambica*'nın serum, hemoglobin ve göz lens proteinlerini elektroforetik örneklerinde civa birikiminin etkilerini incelemişlerdir. Hemoglobinde en hızlı ilerleyen banttaki protein yoğunluğunda bir artış gözlenmiştir. Yüksek civa konsantrasyonunda serum protein bantlarındaki

protein fraksiyonlarında yoğunluk, hareketlilik ve miktar yönünden önemli değişiklikler görülmüştür. Göz lens proteinlerinde ise etkide kalma süresince önemli değişiklikler gözlenmemiştir.

McCarter ve Roch (1984), Cu'nun subletal derişimlerinin (1, 50, 100 ve 150 µg/L) etkilerini ve MT metabolizmasının kinetiğini çalışmışlardır. MT senteziyle Cu alınımı arasındaki oran Cu-thionein içeriğindeki Cu değerleriyle tutarlıydı. Bakır etkisindeki *Coho* salmon'ların karaciğerinde Cu-thionein sentezinin meydana geldiği gözlenmiş ve sentez oranının balığın aldığı Cu oranına bağlı olduğu saptanmıştır.

Thomas ve ark. (1985), *Salmo gairdneri*'yi ön-muamele olarak ya 9 µg Cd/L yada 100 µg Zn/L'ye maruz bıraktıktan sonra balıkları 54 µg Cd/L içeren akvaryuma aktardıklarında balıkların karaciğer solungaç ve böbreklerinde Cd'nin yalnızca iki düşük moleküler ağırlıklı proteinlerle, Zn (ve Cu) 'in ise isoMT'lerle ortaklaşa bulunduğunu gözlemlemişlerdir.

Kay ve ark. (1986), Cd etkisinde *Salmo gairdneri* gökkuşağı alabalığında karaciğer, solungaç ve böbreklerde Cd'nin MT özelliklerinden farklılık gösteren iki düşük moleküler ağırlıklı proteine bağlandığını rapor etmişlerdir.

Baksi ve ark. (1988), *Morone saxatilis*'e CdCl₂ (0.2 mg Cd/enjeksiyon) 3 günlük enjeksiyonda sitosolik metal bağlayıcı protein indüksiyonunda zamana bağlı olarak artış meydana gelmiştir. Bu düşük moleküler ağırlıklı proteinde yaklaşık 2.6 katlık bir artış olmuştur.

Harrison ve ark. (1988), hem doğal ortamlarda hem de laboratuvar koşullarında metallerin etkisine bırakılan *Mytilus edulis* populasyonlarının her ikisinde de hem MT'leri içeren düşük moleküler ağırlıklı hem de metalloenzimleri içeren yüksek moleküler ağırlıklı metal bağlayıcı protein fraksiyonlarında artan bir metal birikimini gözlemlemişlerdir.

Krezoski ve ark. (1988), yaptıkları bir çalışmada 11 tatlısu balığının karaciğer sitosollerinde Cu ve Zn'yi bağlayan 10 kDa ağırlığındaki metal bağlayıcı proteinin oluştuğunu gözlemlemişlerdir.

Langston ve ark. (1989), deniz yumuşakçalarıyla yaptıkları bir çalışmada Cd'nin *Littorina littorea* ve *Mytilus edulis*'te MT-benzeri, *Macoma balthica* (bivalve)'de ise yüksek moleküler ağırlıklı metal bağlayıcı proteinlerce depo edildiğini göstermişlerdir.

Andersen ve ark. (1989), *Nassarius reticulatus* salyangoz sitosolünde düşük moleküler ağırlıklı metal bağlayıcı bir protein bulmuşlardır ki, bu protein ortama kontamine olmuş ağır metaller tarafından indüklenmiştir. SDS-merkaptotanol poliakrilamid jel sistemlerinde bu protein 19 kDa moleküler ağırlığa sahip bir protein olarak davranmıştır. Amino asit kompozisyonu bu proteinin kesinlikle MT-benzeri bir protein olmadığını kanıtlamıştır.

Erdem ve Kargın (1990), *Tilapia nilotica*'nın dokularında bakır birikiminin derişim ve etkide kalma süresine bağlı olarak arttığını belirtmişlerdir. Çalışmada en yüksek bakır birikiminin karaciğerde olduğu gözlenmiştir.

Kargın ve Erdem (1991), *Cyprinus carpio*'da bakırın doku ve organlardaki birikimi ile ilgili çalışmalarında en yüksek bakır birikiminin karaciğer ve dalakta en düşük bakır birikiminin ise kas da olduğunu rapor etmişlerdir.

Conner ve Fowler (1994), *Ictalurus punctatus*'un karaciğerinde Pb-bağlayıcı bir proteini izole etmişlerdir. Proteinin moleküler ağırlığı SDS-PAGE'de hesaplanarak 10 kDa olduğu bulunmuştur. Protein yüksek miktarda glisin (%18.3), aspartik asit (%10.2) ve serin (%15.1) içermekteydi. Western blot analizleri bu hepatik proteinin memelilerdeki düşük moleküler ağırlıklı metal bağlayıcı proteinlerden farklı olduğunu göstermiştir.

Sanders ve Martin (1994), *Strongylocentrus purpuratus* embriyolarında 2-boyutlu elektroforez ayırımıyla elektroforetik olarak 10^{-9} M Cu'da 60 kDa moleküler ağırlığında bir proteinin sentezlendiğini rapor etmişlerdir.

Kargın (1996), *Mullus barbatus* ve *Sparus aurata* 'da çeşitli metallerin karaciğer, solungaç ve kas dokusundaki birikimi ile ilgili çalışmasında her iki türde de bakır birikiminin en fazla karaciğerde olduğunu bunu da solungaç ve kasın takip ettiğini belirtmiştir.

Ueng ve ark. (1996), Tilapia'da Cd etkisinde karaciğerde ve solungaçta MT indüksiyonunu rapor etmişlerdir. Cd ile MT indüksiyonu doz-yanıt ilişkisinde kontrolle karşılaştırıldığında karaciğerde 14 ve solungaçta 10 katlık bir artış göstermiştir.

Marcano ve ark. (1996), 0.2 mg Cu/L ve 10mg Zn/L subletal konsantrasyonlarına 24 günlük bir etkide kalma periyodunun sonunda dokulardaki Zn ve Cu konsantrasyonlarını sırasıyla 319 µg/g ve 29.6 µg/g k.a. olarak bulmuşlardır. Çalışmalarında ayrıca Cu'ya yüksek bir affiniteye sahip (>60 kDa) metalloproteinlere ek olarak Cu'ya nazaran Zn'ye daha fazla affinite gösteren 10-20 kDa ağırlığındaki MT-benzeri proteinlerin varlığını da ortaya çıkarmışlardır. Bu bilgiler, düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı metal bağlayıcı proteinlerin Cu ve Zn'in regülasyonunda rol oynadığını göstermektedir.

Hamza-Chaffai ve ark. (1997), Tunus kıyı balıkları üzerine yaptıkları bir çalışmada *Scorpaena porcus* ve *Serranus scriba*'nın karaciğerindeki MT-benzeri protein düzeylerinin (3.09 mg/g *S. porcus*; 1.59mg/g *S. scriba*) solungaçlardaki düzeylerinden (sırasıyla 0.13 mg/g; 0.40 mg/g) daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir.

Renwranz ve ark. (1998), *Mytilus edulis* serum proteinlerini, gradient PAGE ile araştırmışlardır. Protein kompozisyonları midye bireyleri arasında çeşitlilik göstermesine rağmen 35 ± 1.8 , 136 ± 4.0 , 287 ± 16.5 , 423 ± 26.3 , 498 ± 7.5 , 667 ± 24.8 kDa moleküler ağırlığına sahip 6 tane major band elde edilmiştir. Yaklaşık 35 kDa ağırlığındaki Serum Protein Band I (SBPI) yüksek konsantrasyonlarda tüm midyelerde bulunmuş ve bu protein fraksiyonunun ağır metallerle güçlü bir şekilde reaksiyona girdiği görülmüştür.

Cinier ve ark. (1998), 115 gün süreyle 440 µg/L Cd'un etkisine bırakılan *Cyprinus carpio*'da Cd'un karaciğere oranla daha çok böbreklerde biriktiğini gözlemlemişlerdir. Cd etkileşiminden sonra MT düzeyleri karaciğerde 13.7 g/kg, böbreklerde ise 8.7 g/kg k.a. olarak bulunmuştur.

Shen ve ark. (1998), Shing Mun nehrinden toplanan Tilapia'nın karaciğerindeki metal bağlayıcı protein fraksiyonlarını analiz etmişler ve Cd'nin daha çok 2 kDa 'luk çok düşük moleküler ağırlıklı, Zn'in esas olarak iki tane daha

yüksek moleküler ağırlıklı ve Cu'nun ise başlıca MT olarak kabul edilen fraksiyonlarda buna ek olarak da yüksek moleküler ağırlıklı fraksiyonlarda bulunduğunu gözlemlemişlerdir.

Maher ve ark. (1999), Avustralya'da Macquarne NSW Gölündeki *Mugil cephalus*'da arsenik'in doku ve kandaki birikimi üzerine yaptıkları çalışmalarında arsenik konsantrasyonunu solungaçlarda 0.54 µg/g ve karaciğerlerde 19.2 µg/g k.a. olarak bulmuşlardır ki, karaciğerdeki arsenik birikiminin diğer tüm dokulardan oldukça fazla olduğu belirlenmiştir.

De Smet ve ark. (2001), rayoaktif Cd etkisinde iki boyutlu elektroforezis jellerinin Western blotting analizinde *Cyprinus carpio*'nun plazmasında Cd'nin başlıca iki yüksek moleküler ağırlıklı proteinlere bağlandığını rapor etmişlerdir. Bu metal bağlayıcı proteinlerinden biri 60 kDa diğeri 70 kDa ağırlığında olup bunlardan 70 kDa ağırlığındaki proteinin bir transferin proteini olduğu belirlenmiştir.

De Smet ve Blust (2001), Cd etkisinde *Cyprinus carpio*'da protein metabolizmasındaki değişikliklere bakmışlardır. Cd birikimi en fazla böbreklerde en az da solungaçlarda olmuştur. Hematokrit, hemoglobin, plazma glukoz, plazma laktat ve dokulardaki toplam protein içeriklerinde önemli değişiklikler gözlenmiştir. Cd bağlayıcı MT düzeylerinin en fazla karaciğerde en az da solungaçlarda olduğu belirlenmiştir.

Hollis ve ark. (2001), Cd etkisinde bırakılan genç gökkuşağı alabalığında Cd'un en fazla böbrekte olduğunu bunu solungaç ve karaciğerin izlediğini gözlemlemişlerdir. Tüm dokulardaki MT konsantrasyonları 30 günlük Cd etkisinde artmıştır. MT düzeylerindeki artış en fazla karaciğerde olup bunu böbrek ve solungaçlar takip etmiştir.

Olsvik ve ark. (2001), biri Cu diğeri de Cd/Zn ile kontamine olmuş Norveç'deki iki nehirde yaşayan alabalıkların (*Salmo trutta*) karaciğer, solungaç ve böbreklerindeki metal birikimlerini ölçmüş ve Cu'nun yüksek düzeylerini karaciğerde bulmuşlardır. Böbrek ve karaciğerdeki CuMT düzeyleri, bu metalin ortamdaki konsantrasyonlarını ve dokulardaki birikimini gösterir.

Bervoets ve ark. (2001), doğal tatlısulardaki *Gasterosteus aculeatus* dokularındaki metal birikiminin sediment ve sudaki metal düzeyleriyle ilişkili olduğunu ve metalin yüksek düzeylerinin solungaç ve karaciğerlerde olduğunu rapor etmişlerdir.

Xie ve Klerks (2003), 6 mg/L Cd'ye maruz kalan *Heterandria formosa*'da 26 saatlik etki süresinden sonra MT-benzeri proteinlerin indüklendiğini rapor etmişlerdir. Bu proteinin Cd'nin depolanmasında görevli olduğu öne sürülmüştür

De Boeck ve ark. (2003), bir hafta süreyle subletal Cu düzeylerinin etkisine bırakılan *Oncorhynchus mykiss*, *Cyprinus carpio* ve *Corassius auratus gibelio* gibi türlerin solungaç, karaciğer ve böbreklerdeki Cu birikimi, MT sentezine eş değerde olduğu bulunmuştur. *C. carpio*'nun solungaçlarındaki Cu miktarı diğer türlere oranla 3-4 kat artmıştır. *C. carpio*'nun karaciğerindeki Cu miktarı ve MT düzeyleri oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir.

Gillis ve ark. (2003), *Tubifex tubifex*'de Cd alınımlı ve MT-benzeri protein indüksiyonunun ilk 24 saatte hızlı olduğunu MT-benzeri protein (87 ± 1.8 nmol/g) ve Cd'nin (60.8 ± 11 µmol/g) sırasıyla 96 saat ve 4 haftalık etkide kalmada maksimuma ulaştığını rapor etmişlerdir.

Irato ve ark. (2003), Venike Lagünündeki *Mytilus galloprovincialis*, *Scapharca inaequivalvis* ve *Tapes philippinarum*'da metal birikimi ve metal bağlayıcı protein indüksiyonunu incelemişlerdir. Çalışılan üç türde de sindirim bezleri ve solungaçlarda önemli miktarlarda metal birikimi gözlenmiştir. Solungaçlar, incelenen MT düzeyleriyle artan kirlilik için iyi bir organ olup, özellikle solungaçlardaki Zn ve MT içeriği arasındaki ilişki *M. Gallprovincialis* ve *S. inaequivalvis*'in Zn kirliliği için kullanabilecek indikatör organizmalar olabileceğini göstermiştir.

Papagiannis ve ark. (2004), Pamvotis Gölündeki balıklardaki Cu ve Zn düzeylerinin belirlenmesi çalışmasında en yüksek metal içeriğinin diğer balıklara oranla *Cyprinus carpio* ve *Rutilus ylikiensis*'de, dokulardaki birikimin ise en fazla karaciğer ve gonadlarda olduğunu rapor etmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

Bu araştırmada kullanılan *Cyprinus carpio*'lar D.S.İ. işletmesinden alınmış ve 40X120X40 cm boyutlarındaki yedi stok akvaryum içerisinde iki ay süre ile laboratuvar koşullarına adaptasyonları sağlanmıştır. Bu süre içerisinde balıklar, 12.4 ± 1.74 cm boy ve 40.9 ± 7.4 g. ağırlığa ulaşmışlardır.

Deneyler $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta yürütülmüş, akvaryumlar merkezi havalandırma sistemi ile havalandırılmış ve günde sekiz saat aydınlanma (8 saat gündüz - 16 saat gece) periyodu uygulanmıştır. Balıklar, laboratuvar koşullarına adaptasyonları boyunca hazır balık yemiyle (Pınar Balık Yemi, Türkiye) beslenmiştir. Denemeler başlamadan iki gün önce yem kesilmiş, denemeler süresince balıklar, vücut ağırlıklarının % 2'si kadar yem ile günde iki defa beslenmiştir.

Deney ortam suyunun kimyasal özellikleri:

Toplam sertlik: 278.81 ± 0.39 ppm CaCO_3

pH: 8.36 ± 0.09

Çözünmüş Oksijen: 7.32 ± 0.08 mg./ L

Akvaryum ısısı: $21.01 \pm 0.27^{\circ}\text{C}$

Balıklar 10 ve 20 günlük sürelerle bakırın 0.1 ve 1.0 mg/L derişimlerinin etkisine bırakılmıştır. Bu amaçla 40X120X40 cm boyutlarında olan ve her birinin içerisinde 12 adet balık olacak şekilde 3 tane akvaryum kullanılmıştır. Bu akvaryumlardan ilk ikisi farklı bakır derişimlerini denemek, üçüncüsü ise kontrol akvaryumu olarak kullanılmıştır. Deney akvaryumlarından her birine 100'er litre belirli bir bakır çözeltisi konmuş, kontrol akvaryumuna ise aynı hacimde çeşme suyu konmuştur. Deneyler denenen her derişim için üç tekrarlı olarak yürütülmüş ve her tekrarda iki balık kullanılmıştır.

Deneylerde kullanılan bakır çözeltisinin ($\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) akvaryumlarda homojen dağılması ve akvaryum tabanına çökmesini önlemek amacıyla Trisodyumsitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$) çözeltisi kullanılmıştır. Deney akvaryumlarında kullanılan bakır çözeltilerinin derişimlerinde buharlaşma, adsorbsiyon ve akümülayon gibi nedenlerle derişimler olabileceği dikkate alınarak

çözeltiler iki günde bir taze hazırlanan stok çözeltilerden uygun seyreltmeler yapılarak değiştirilmiştir.

Belirlenen her sürenin sonunda deney akvaryumlarından alınan balıklar çeşme suyu ile iyice yıkanarak temizlenmiş ve kurutma kağıdı ile yüzeylerinde bulunan su damlacıkları alınarak karaciğer ve solungaç dokularının diseksiyonu yapılmıştır. Disekte edilen karaciğer ve solungaç dokuları bakır birikiminin belirlenmesi ve elektroforetik deney için -35°C 'de derin dondurucuda saklanmıştır.

3.1. Dokulardaki Metal Birikiminin Saptanması için Örneklerin Hazırlanması

Bakır analizi için her bir derişim ve sürede karaciğer ve solungaç dokularından bir miktar alınıp etüvde 150°C 'de 48 saat süreyle kurumaya bırakılmıştır. Kuru ağırlıkları belirlenen doku ve organlar deney tüplerine aktararak üzerlerine 2 mL nitrik asit (Merck, % 65, d : 1.40) ve 1 mL perklorik asit (Merck, % 60, d :1.53) eklenmiş (Muramoto, 1983) ve çeker ocakta 120°C ' de 3 saat süreyle yakılmıştır. Yakımı tamamlanan örnekler polietilen tüplere aktarılmış ve üzerleri distile su ile 5 mL' ye tamamlanarak bakır analizine hazır hale getirilmiştir..

Dokulardaki bakır analizi Perkin Elmer AS 3100 Atomik Absorbsiyon Spektrofotometrik yöntemlerle saptanmıştır. Deneylerden elde edilen verilerin istatistik analizleri “ Regresyon analizi” ve “ Student-Newman Keul's Test (SNK)” testleri uygulanarak yapılmıştır (Rohlf ve Sokal, 1969; Sokal ve Rohlf, 1969).

3.2. Elektoroforez Deneyleri İçin Örneklerin Hazırlanması

Elektoroforetik çalışmalarda kullanılmak üzere *C. carpio*'nun diseksiyonu esnasında difrizde -35°C 'de saklanan, denenen tüm süre ve derişimlerdeki karaciğer ve solungaç örneklerinin her birinden 0.5 g tartılıp 2 mL Fritz'in çözündürme (örnek) tamponu içinde Ultra-Turrax 25 homojenizatörü kullanılarak 9500 rpm'de 3 dakika homojenizasyona tabi tutulmuştur (Granzier ve Wang, 1993).

Homojenizasyondan sonra homojenatlar polipropilen tüplere alınıp 56 °C'lik su banyosunda 30 dakika inkübe edilerek proteinlerin denatürasyonu sağlanmıştır (Groschup ve ark, 1991). Karışım oda sıcaklığında 30 dakika 5000 rpm'de (Hettich marka santrifüj kullanılarak) santrifüj edildikten sonra her bir süpernatant, elektroforez deneylerinde kullanılmak üzere eppendorf tüplerine alınarak -35 °C'de saklanmıştır.

3.2.1. SDS-PAGE Jellerin Hazırlanması

3.2.1.1. Ayırıcı Jelin (%9'luk) Hazırlanması)

Çizelge 3.1. SDS-PAGE stok çözeltileri ve hazırlanışı (Bollag ve Edelstein, 1991).

Stok Çözeltileri	Hazırlanışı
Tris HCl 2 M	24,2 g Tris tartılır, 75 mL saf suda çözülür, konsantre HCl ile pH 8.8'e ayarlanır ve saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.
Tris HCl 1 M	12,2 g Tris tartılır, 75 mL saf suda çözülür, konsantre HCl ile pH 6.8'e ayarlanır ve saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.
SDS (%10)	10 g SDS tartılır, saf su ile 100 mL tamamlanır.
Gliserol (% 50)	50 mL %100 gliserol alınır, saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.
Bromfenol Mavisi (%1)	100 mg Bromfenol Mavisi tartılır saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.

Çizelge 3.2. SDS-PAGE çalışma çözeltileri ve hazırlanışı (Bollag ve Edelstein,1991).

Çalışma Çözeltileri	Hazırlanışı
Çözelti A % 30 Akrilamid, % 0.8 bisakrilamid (100 mL).	29,2 g. Akrilamid ve 0.8 g Bisakrilamid tartılır saf su ile 100 mL tamamlanarak çözünür ve buzdolabında saklanır.
Çözelti B (4X) (100 mL).	2M Tris HCl (pH 8.8) 75 mL, %10'luk SDS 4 mL, saf su 21 mL buzdolabında saklanır.
Çözelti C (4X) (100 mL)	1M Tris HCl (pH 6.8) 50 mL, %10'luk SDS 4 mL, saf su 46 mL buzdolabında saklanır.
Amanyumpersülfat (% 10)(5 mL)	0,5 g AMPS tartılır, saf su ile 5 mL tamamlanır.
Elektroforez Tamponu (1L)	Tris (25 mM) 3 g, glisin (192mM) 14,4 g. SDS (%10) 1g tartılır saf su ile 1L'ye tamamlanır. pH 8.3
Fritz Örnek Tamponu	8 M Üre, 2 M Thioüre, %3 SDS, 25 mM Tris-Cl, 75 mM DTT (Dithiothreitol), pH 6.8 (Granzier ve Wang, 1993)

Çizelge 3.3. Ayrıcı jelin bileşenleri (%9'luk) (Bollag ve Edelstein, 1991).

Çözelti A	5,85 mL
Çözelti B	4,5 mL
Saf Su	9,65 mL
AMPS	66 µL
TEMED	15 µL

1. Çizelge 3.2’de verilen maddeler çizelge 3.3’de belirtilen miktarlarda alınarak 30 mL’lik cam bir şişede karıştırılır ve moleküler oksijenin uzaklaştırılması için vakum pompasıyla 5 dakika degaz yapılır (Jeyaseelan ve ark, 1987).
2. Bu karışıma %10’luk AMPS (Amonyumpersülfat, inisiyator)’den 66 µL, TEMED (N,N,N¹,N¹- tetrametilen- etilen daimin, katalizör) çözeltisinden 15 µL ilave edilir ve şişe bu halde birkaç kez alt üst edilir.
3. Hazırlanan jel karışımı zaman geçirmeden bir enjektör yardımıyla önceden hazırlanmış ve aralarında 1 mm boşluk bırakılmış cam plakalar arasına dökülür.
4. Jel yüzeyinin düzgün olması ve atmosferik oksijenin jele difüzyonunu engellemek için ayırıcı jelin dökümünden hemen sonra jelin üst yüzeyi ince bir su tabakasıyla kapatılır ve oda sıcaklığında 30-60 dakika polimerizasyona bırakılır (Bollag ve Edelstein, 1991).

3.2.1.2. Toplayıcı (Dengeleyici) Jelin (%3.5) Hazırlanması

Çizelge3. 4. Toplayıcı jelin bileşenleri (Rasmussen ve ark., 1991).

Çözelti A	1,5 mL
Çözelti C	2,25 mL
Saf Su	5,25 mL
AMPS	30 µL
TEMED	10 µL

1. Çizelge 3.4’de verilen çözeltiler belirtilen miktarlarda 30 mL’lik bir cam şişe içinde karıştırılıp 5 dakika vakum pompasıyla degaz yapılır.
2. Bu karışıma 30 µL AMPS ve 10 µL TEMED ilave edilerek şişe birkaç kez alt üst edilir.
3. Ayırıcı jelin üstündeki su döküldükten sonra bir enjektör yardımıyla hazırlanan karışım kabarcık oluşmamasına dikkat edilerek polimerize olmuş ayırıcı jelin üzerine dökülür ve dikkatlice tarak yerleştirilir.
4. Jel bu halde 1 gece polimerizasyona bırakılır.

5. Polimerizasyon gerçekleştikten sonra tarak, aradaki duvarlar zarar görmeyecek şekilde yavaşça çıkarılır ve böylece örnek çukurlarının oluşması sağlanır (Bollag ve Edelstein, 1991).

3.2.2 Protein Örneklerinin SDS-PAGE Jeline Uygulanması ve Separasyonu

Fritz'in örnek tamponu içerisinde hazırlanan karaciğer ve solungaç dokularının denenen tüm süre ve derişimlerdeki protein karışımları 1:5 oranında %20'lik süktroz çözeltisiyle karıştırılmıştır (10 µL süktroz, 50 µL örnek). Hazırlanan bu protein karışımlarından, jelde oluşturulangozlere 100 µL mikro pipet yardımıyla hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek yüklenmiştir. Gözlerden birine separasyona uğratılacak örneklerin moleküler ağırlıklarını hesaplamaya olanak sağlayacak markır proteinden (Protein Standart Mixture IV; Cytochrom C 12300 Da, Myoglobin 16949 Da, Carboanhydrase 30000 Da, Ovalbumin, 66250 Da, Ovotransferrin 78000 Da) 50 µL konulmuştur. Elektroforez esnasında moleküllerin jeldeki hareketlerini gözlemleyebilmek için örneklerden birine bromfenol mavisini ilave edilmiştir (Gaal ve ark, 1980; Himber, 1993).

Örneklerin yüklenmesinden sonra jel, elektroforez tankına dikey pozisyonda yerleştirilip, üst ve alt rezervuara elektroforez tamponundan konulduktan sonra 16 mA'de yaklaşık 12 saat süreyle (Anderson ve ark, 1991) oda sıcaklığında separasyona bırakılmıştır. Elektroforez işlemi bromfenol mavisini jelin sonuna yaklaştığında (0.5-1 cm) sonlandırılmıştır (Granzier ve Wang, 1993).

3.2.3. Jelin Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBR-250) ile Boyanması

Bu yöntem, 0.1 µg kadar küçük miktarlardaki protein bandlarının boyanarak görünmesini sağlar (Bollag ve Edelstein, 1991).

Çizelge 3.5. CBR-250 stok çözeltisi (boyama çözeltisi) (1L)

Coomassie Blue R-250	1,0 g
Metanol	450 mL
Glasial Asetik Asit	100 mL
Saf su	450 mL

Çizelge3.6. Boyayı geri alma çözeltisi (1L).

Metanol	100 mL
Glasial Asetik Asit	100 mL
Saf su	800 mL

1. Elektroforezi takiben jel, cam plakalar arasından dikkatlice alınarak içinde yeterli miktarda boya çözeltisi bulunan boyama kabına alınır ve kapağı kapatılır.
2. Jel, 2-3 saat çalkalayıcıda boyanmaya bırakılır.
3. Sürenin bitiminde boya kaptan alınır ve jel saf su ile birkaç kez yıkanır.
4. Yıkama işleminden sonra jelin bulunduğu kaba boyayı geri alma çözeltisinden jelin yüzeyini kaplayacak miktarlarda konur ve çalkalayıcıda 1 gece bekletilir.
5. Süre tamamlandığında çözelti alınarak jel, saf su ile birkaç kez yıkanır ve ışık kutusu üzerinde fotoğraflanır (Bollag ve Edelstein, 1991).

3.2.4. Protein Bandlarının Moleküler Ağırlığının Hesaplanması

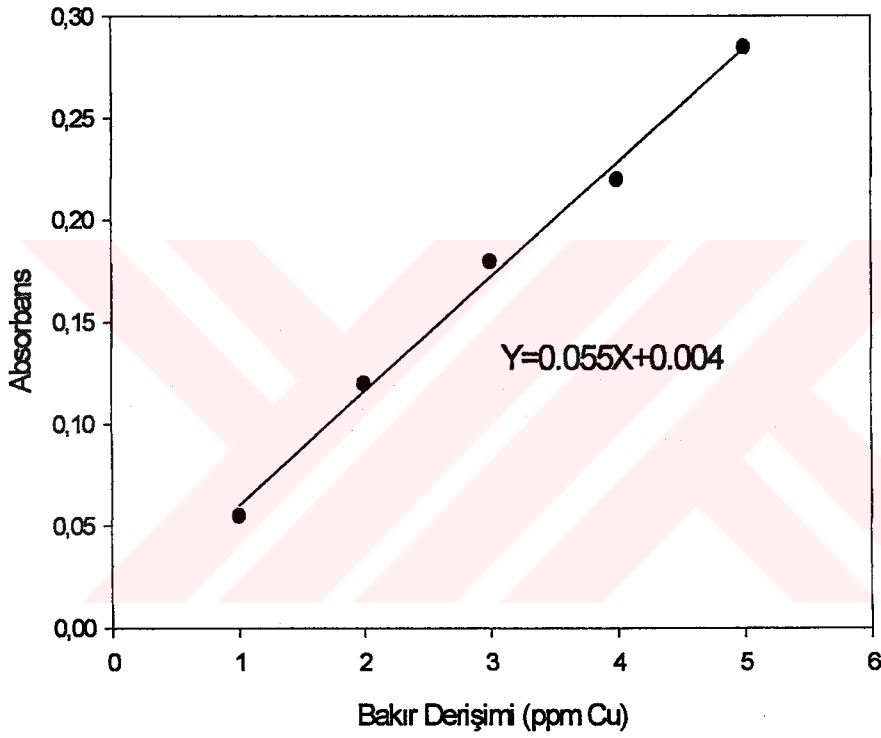
SDS-PAGE jeline yapılan ayırımdan sonra ortaya çıkan protein bandları tespit edilmiş ve markır proteinler ile bu proteinlerin jel içerisinde göç ettikleri mesafe karşılaştırılarak moleküler ağırlıkları yaklaşık olarak hesaplanmıştır (Tyagi ve ark, 1993; Himber, 1993; Rhyum ve ark, 1994).

3.2.5. Protein Bandlarının Dansitometrik Ölçümleri

Karaciğer ve solungaç dokularının SDS-PAGE'deki ayırımından sonra ortaya çıkan protein band örneklerindeki protein miktarları Ç.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında Cliniscan2-1261 model Scaning Dansitometre kullanılarak 545 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

4. BULGULAR

Cyprinus carpio dokularında bakır düzeylerini saptamak amacıyla bakır standartları ile absorbans arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu kullanılmıştır.



Şekil 4.1: Bakır derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki.

Bakır standartlarının absorbans değerlerinden $Y=0.055X + 0.004$ formülü bulunmuştur. Burada X bakır derişimini ; Y değeri de absorbansı göstermektedir. Solungaç ve karaciğer dokularındaki bakır düzeyleri, bu regresyon formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

Belirlenen her derişim ve sürede bir doku için üç tekrarlı olarak saptanan bakır düzeylerinin aritmetik ortalamaları ve standart hataları Çizelge 4.1 ve 4.2’de verilmiştir. 20 günlük süre sonunda aynı derişimde bakır birikimi bakımından doku ve organlar arasındaki ayrımı belirlemek, aynı şekilde 20 günlük süre sonunda artan derişimin bir doku ve organdaki bakır birikimine etkisini saptamak amacıyla veriler SNK testi (Student Newman Keul’s Test) ile analiz edilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.1 ve 4.2’de verilmiştir. Çizelgelerde a, b ve c harfleri derişimler arasında x ve y harfleri ise bir doku veya organda artan derişimin etkisini göstermek amacıyla kullanılmıştır.

Çizelge 4.1. *C. carpio*’da 10.günde farklı ortam derişimlerinde karaciğer ve solungaç dokusunda bakır birikimi ($\mu\text{g/g}$ k.a.)

	KARACİĞER	SOLUNGAÇ
DERİŞİM	$\bar{X} \pm S\bar{X} \quad *$	$\bar{X} \pm S\bar{X} \quad *$
0.0 ppm Cu	$6.02 \pm 5.15 \quad ax$	$4.62 \pm 2.15 \quad ay$
0.1 ppm Cu	$178.4 \pm 4.22 \quad bx$	$18.11 \pm 2.27 \quad by$
1.0 ppm Cu	$342.4 \pm 3.11 \quad cx$	$43.46 \pm 3.11 \quad cy$

* : a, b ve c harfleri derişimleri belirlemek; x ve y harfleri dokular arası ayrımı belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında istatistik ayrım vardır ($P < 0.05$)

$\bar{X} \pm S\bar{X}$: Aritmetik ortalama $\pm$ Standart hata

Belirli bir ortam derişiminde etkide kalma süresinin dokularda bakır birikimine etkisini saptamak amacıyla verilerin istatistiksel analizleri yapılmış ve sonuçlar şekil 4.1 ve 4.2’de verilmiştir.

Belirli bir zaman süreci dikkate alındığında ortamda bulunan bakır derişimi arttıkça karaciğer ve solungaçlardaki bakır birikiminin de önemli oranlarda arttığı belirlenmiştir. Bu artış her iki dokuda ve tüm derişimler arasında istatistik önem

Çizelge 4.2. *C. carpio*'da 20.günde farklı ortam derişimlerinde karaciğer ve solungaç dokusunda bakır birikimi (µg/g k.a.)

	KARACİĞER	SOLUNGAÇ
DERİŞİM	$\bar{X} \pm S\bar{X}^*$	$\bar{X} \pm S\bar{X}^*$
0.0 ppm Cu	27.11 ± 3.21 ax	5.82 ± 2.21 ay
0.1 ppm Cu	214.0 ± 4.57 bx	25.42 ± 1.88 by
1.0 ppm Cu	387.0 ± 3.32 cx	56.82 ± 3.32 cy

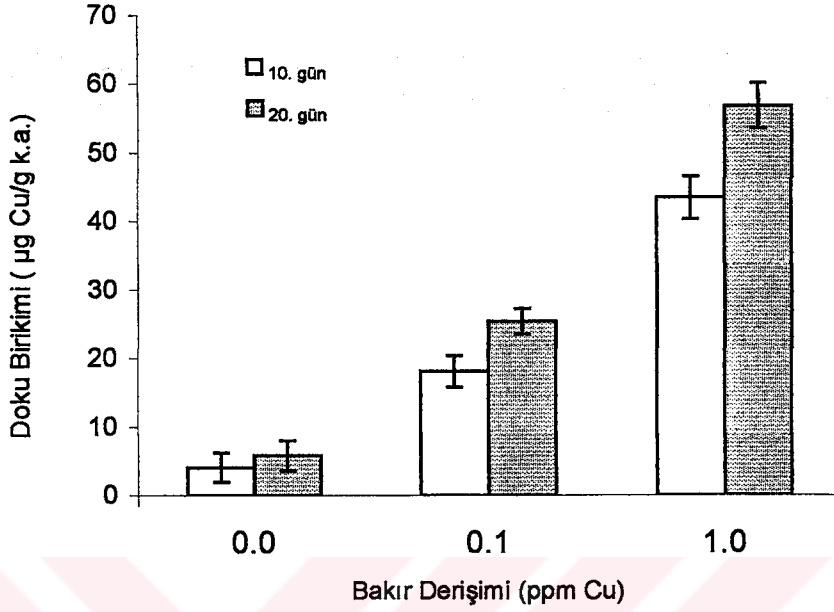
* : a, b ve c harfleri derişimleri belirlemek; x ve y harfleri lar arası ayırımı belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında istatistik ayırım vardır (P<0.05)

$\bar{X} \pm S\bar{X}$: Aritmetik ortalama ± Standart hata

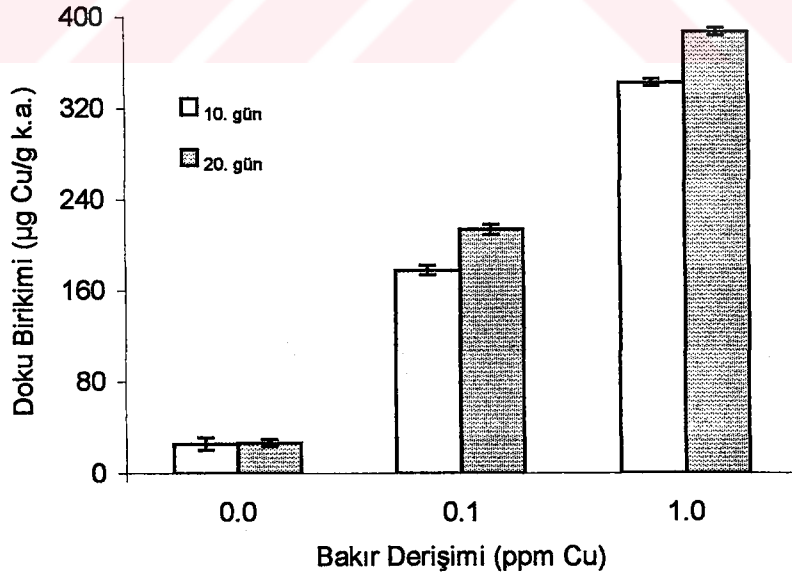
taşımaktadır. Ortam derişiminde 10 katlık bir artış dokulardaki bakır birikiminde 1,5-2 katlık bir artışa neden olmuştur. Denenen her iki ortam derişiminde en yüksek bakır birikimi karaciğerde bulunmuş, bunu solungaçlar izlemiştir (Çizelge 4.1 ve 4.2; SNK P<0.05). Belirli bir ortam derişiminde karaciğerde biriken bakır miktarı, solungaçtaki biriken miktarın yaklaşık 8-10 katı kadar fazla olduğu saptanmıştır.

Aynı ortam derişiminde, etkide kalma süresi ile dokularda bakır birikimi arasında lineer bir ilişki vardır. Sürenin uzamasıyla dokulardaki bakır birikiminin de arttığı belirlenmiştir.

A

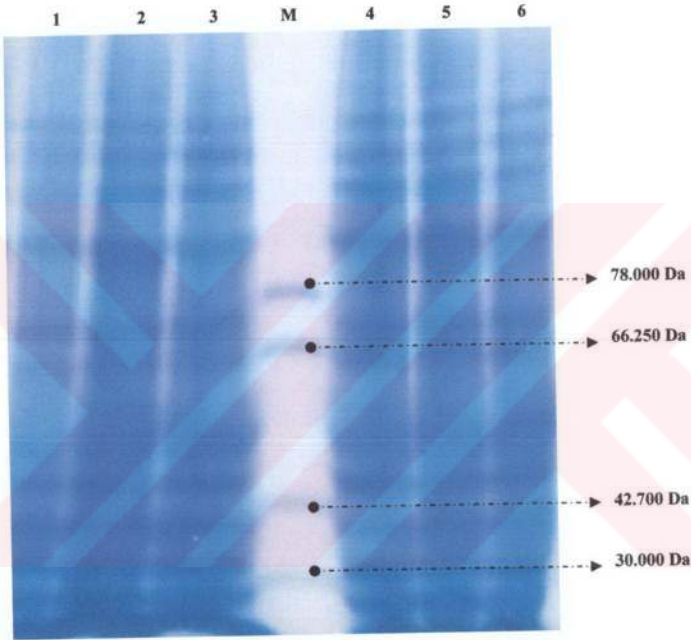


B



Şekil 4.2. Farklı ortam derişimlerinde *C. carpio*'nun solungaç (A) ve karaciğer (B) dokularında etkide kalma süresinin bakır birikimi üzerine etkisi.

C. carpio'nun karaciğer ve solungaç proteinleri, SDS-Polyakrilamid jel elektroforezi (% 9) ile separe edilmiştir. Elektroforez sonucu yoğunlukları farklı birçok protein bandları belirlenmiştir. Bu proteinler, markır proteinlere göre değerlendirilip molekül ağırlıkları yaklaşık olarak hesaplanmıştır.



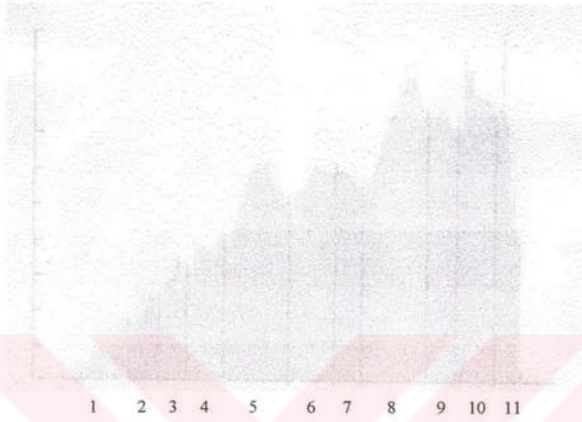
Şekil 3. Karaciğer örneklerinin SDS-PAGE ile analizi

Şekil 3, karaciğer örneklerinin SDS PAGE sonuçlarını göstermektedir. Örnek sırası; 1- 20. gün 1.0 ppm Cu; 2- 20.gün 0.1 ppm Cu; 3-ve 6- kontrol; 5- 10. gün 0.1 ppm Cu; 4- 10. gün 1.0 ppm Cu; ortamlarındaki protein bandlarını ve M harfiyse markır proteinleri (Ovotransferrin 78.000 Da, Albumin 66.250 Da, Ovalbumin 42.700 Da, Carbonhyrase 30.000 Da) göstermektedir.

Denenen tüm süre ve derişimler de balıkların karaciğerinde SDS-Polyakrilamid jel elektroforeziyle 40-54 kDa arasında orta molekül ağırlıkta (OMAP) 5 band, 66-170 kDa arasında yüksek molekül ağırlıkta (YMAP) 6 band olmak üzere toplam 11 protein bandı elde edilmiştir (Şekil 4.3). Bu bandlar kontrol ve bakırın etkisindeki deney gruplarının tamamında gözlenmiştir.

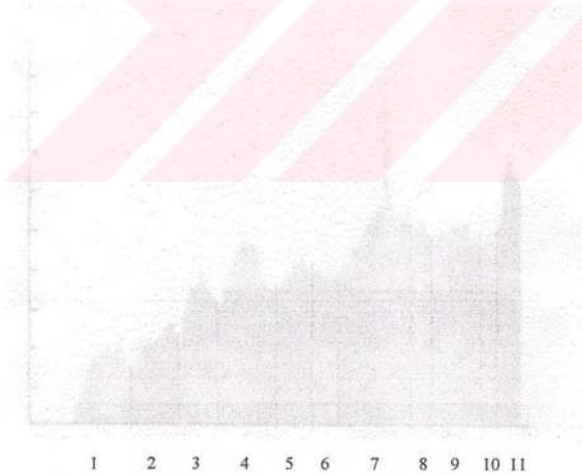
Her iki derişim ve sürede karaciğer örneklerinin elektroforetik analizinden sonra oluşan bu 11 bandaki proteinlerin dansitometredeki ölçümleri şekil 4.4.1-4.4.5'de verilmiştir. Denenen tüm süre ve derişimlerde bakırın etkisinde kalan balıkların karaciğerinde 170, 136, 113 ve 88 kDa olan yüksek molekül ağırlıklı protein bandlarında ve 40 kDa orta molekül ağırlıktaki protein bandının protein yoğunluklarında kontrol balıklarıyla karşılaştırıldığında önemli oranlarda artışların olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.3.1 ve 4.3.2). Bu bandların dışındaki diğer bandların protein yoğunluklarında önemli değışiklikler saptanmamıştır.

10 gün süreyle bakırın 0.1 ve 1.0 ppm ortam derişimlerinin etkisinde kalan balıkların elektroforetik örneklerinin 170-113 kDa arasındaki yüksek molekül ağırlıklı üç bandın protein yoğunluklarında kontrol balıklarına oranla yaklaşık 2 katlık bir artışın olduğu belirlenmiştir. Bakırın 0.1 ve 1.0 ppm ortam derişimlerinin etkisinde 20 gün süreyle kalan balıkların karaciğer elektroforetik örneklerinde ilk üç bandın (YMAP) protein yoğunluğunda kontrol balıklarına oranla yaklaşık 2-2.5 katlık bir artışın olduğu saptanmıştır. 20 gün süreyle bakırın 1.0 ppm ortam derişiminin etkisinde kalan balıkların karaciğerin elektroforetik örneklerinde 40 ve 42 kDa orta molekül ağırlığındaki bandların protein yoğunluğunda bir artış olurken, 0.1 ppm ortam derişiminde ise sadece 40 kDa molekül ağırlığındaki bandın protein yoğunluğunda bir artışın olduğu saptanmıştır.



Fraksiyon	%
1	2.4
2	2.8
3	3.4
4	6.6
5	12.2
6	11.1
7	6.9
8	21.4
9	9.7
10	7.2
11	7.0

Şekil 4.4.1. Kontrol balıklarının karaciğer dokusundaki protein bandlarının dansitometrik ölçümleri.



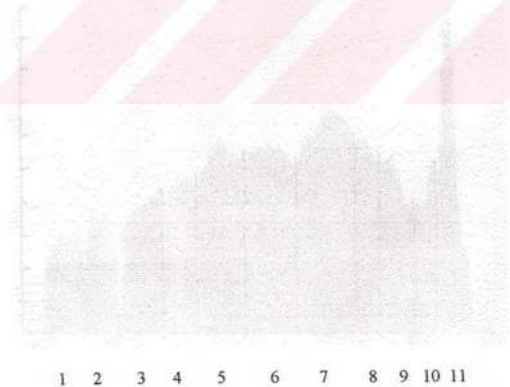
Fraksiyon	%
1	5.1
2	5.8
3	7.3
4	8.4
5	11.2
6	7.2
7	6.2
8	22.5
9	11.1
10	3.9
11	8.5

Şekil 4.4.2. 10. gün 0.1 ppm bakır etkisindeki balıkların karaciğer dokusundaki protein bandlarının dansitometrik ölçümleri.



Fraksiyon	%
1	5.7
2	4.9
3	7.3
4	7.3
5	13.0
6	9.3
7	6.6
8	21.0
9	13.4
10	5.5
11	8.7

Şekil 4.4.3. 10. gün 1.0 ppm bakır etkisindeki balıkların karaciğer dokusundaki protein bandlarının dansitometrik ölçümleri.



Fraksiyon	%
1	5.5
2	5.4
3	8.1
4	7.5
5	13.1
6	13.0
7	6.2
8	20.2
9	11.2
10	4.9
11	9.5

Şekil 4.4.4. 20. gün 0.1 ppm bakır etkisindeki balıkların karaciğer dokusundaki protein bandlarının dansitometrik ölçümleri.



Fraksiyon	%
1	5.6
2	6.0
3	7.4
4	8.6
5	12.2
6	12.1
7	6.3
8	12.0
9	9.8
10	11.3
11	11.2

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

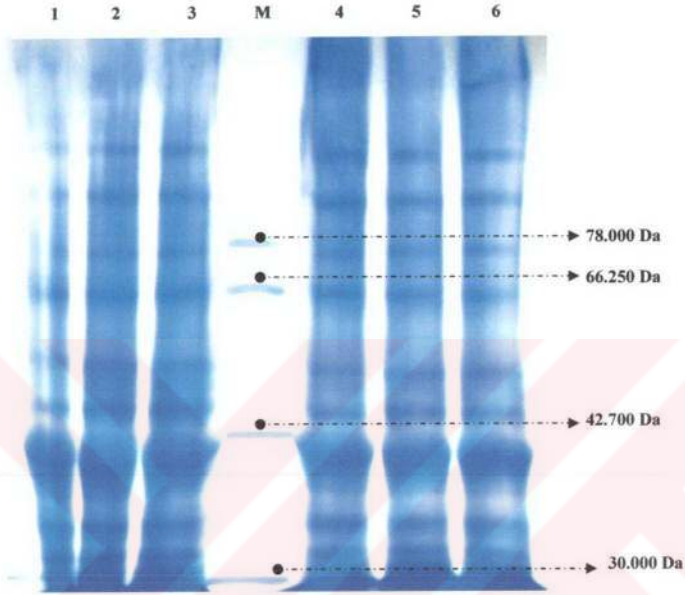
Şekil 4.4.5. 20. gün 1.0 ppm bakır etkisindeki balıkların karaciğer dokusundaki protein bantlarının dansitometrik ölçümleri.

Çizelge 4.3.1. 10. günde karaciğer dokusundaki protein bantlarının elektroforetik protein analizi.

	Fraksiyonlar										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Kontrol	2.4	2.8	3.4	6.6	12.2	11.1	6.9	21.4	9.7	7.2	7.0
Her bir Fraksiyondaki Protein Yüzdesi											
0.1 ppm Cu	5.1	5.8	7.3	8.4	11.2	7.2	6.2	22.5	11.1	3.9	8.5
1.0 ppm Cu	5.7	4.9	7.3	7.3	13.0	9.3	6.6	21.0	13.4	5.5	8.7

Çizelge 4.3..2. 20. günde karaciğer dokusundaki protein bantlarının elektroforetik protein analizi.

		Fraksiyonlar										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Kontrol		2.4	2.8	3.4	6.6	12.2	11.1	6.9	21.4	9.7	7.2	7.0
Her bir												
Fraksiyondaki												
Protein Yüzdesi	0.1 ppm Cu	5.5	5.4	8.1	7.5	13.1	13.0	6.2	20.2	11.2	4.9	9.5
	1.0 ppm Cu	5.6	6.0	7.4	8.6	12.2	12.1	6.3	12.0	9.8	11.3	11.2



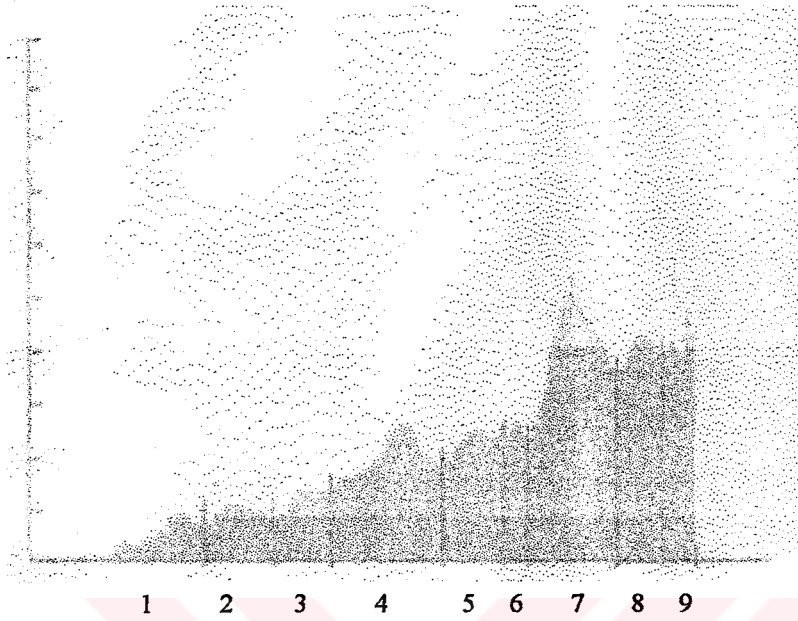
Şekil 5. Solungaç örneklerinin SDS-PAGE ile analizi

Şekil 5, solungaç örneklerinin SDS PAGE sonuçlarını göstermektedir. Örnek sırası; 1-ve 4- kontrol; 2- 10. gün 0.1 ppm Cu; 3- 10. gün 1.0 ppm Cu; 5- 20.gün 0.1 ppm Cu; 6- 20. gün 1.0 ppm Cu ortamlarındaki protein bandlarını ve M harfiye markır proteinleri (Ovotransferrin 78.000 Da, Albumin 66.250 Da, Ovalbumin 42.700 Da, Carbonhyrase 30.000 Da) göstermektedir.

Denenen her iki derişim ve sürede SDS-PAGE jelindeki solungaç örneklerinin separasyonundan moleküler ağırlıkları 101, 90, 72 ve 64 kDa olan 4 tane YMAP ve 48, 44, 30, 26 ve 25 kDa olan 5 tanede OMAP olmak üzere toplam 9 protein bandı elde edilmiştir (Şekil 4.5). Bu bandlar kontrol ve bakırın etkisindeki deney gruplarının tümünde görülmüştür.

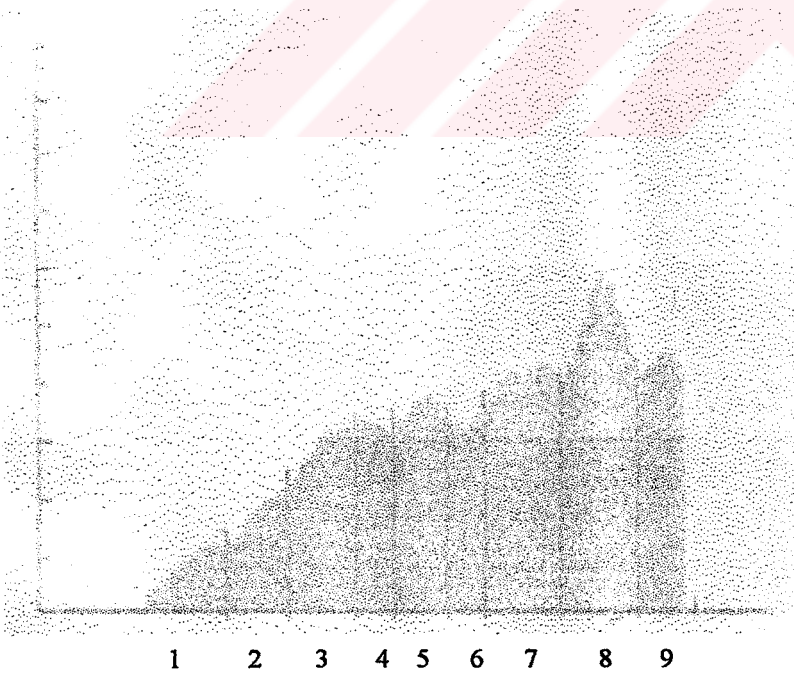
Deney gruplarının tümünde solungaç örneklerinin elektroforetik ayırımından sonra oluşan 9 bandın proteinlerinin dansitometredeki ölçümleri şekil 4.6.1-4.6.5’de verilmiştir. Tüm derişim ve sürelerde 90 ve 72 kDa moleköl ağırlığındaki iki yüksek moleköl ağırlıklı ve 30, 26 ve 25 kDa ağırlığındaki 3 orta moleköl ağırlıklı protein bantlarının yoğunlukları, kontrol balıklarının değerleriyle karşılaştırıldığında önemli düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.4.1 ve 4.4.2). Diğer dört bandın protein yoğunluklarında önemli değişiklikler saptanmamıştır.

Denenen tüm süre ve derişimler de 72 kDa moleköl ağırlığına sahip YMAP bandının yoğunluğunda kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldığında % 100’lük bir artış olurken, 90 kDa moleküler ağırlığındaki bandın yoğunluğunda ise yaklaşık %30 düzeyinde bir artışın olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.4.1ve 4.4.2). *C. carpio*’nun solungaçlarında kontrol balıklarına oranla 30, 26 ve 25 kDa moleküler ağırlığındaki OMAP ve 90 ve 72 kDa moleküler ağırlığındaki YMAP bandlarının yoğunluk artışı, derişim ve süre açısında önemli bir ayırım göstermemiştir.



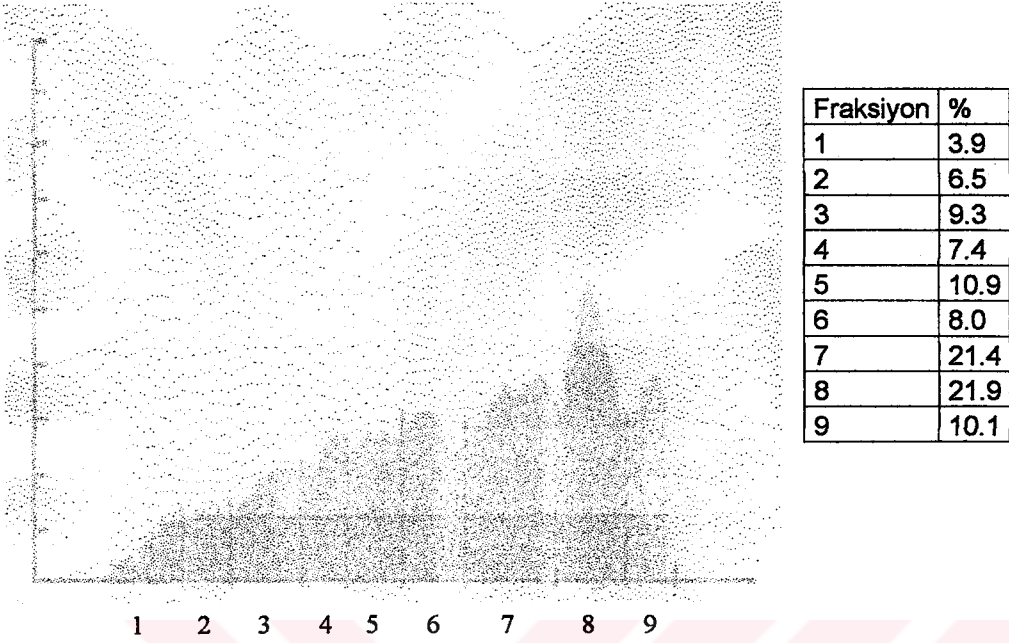
Fraksiyon	%
1	4.2
2	5.0
3	5.4
4	8.0
5	11.1
6	7.0
7	16.8
8	15.0
9	9.9

Şekil 4.6.1. Kontrol balıklarının solungaç dokusundaki protein bandlarının dansitometrik ölçümleri.

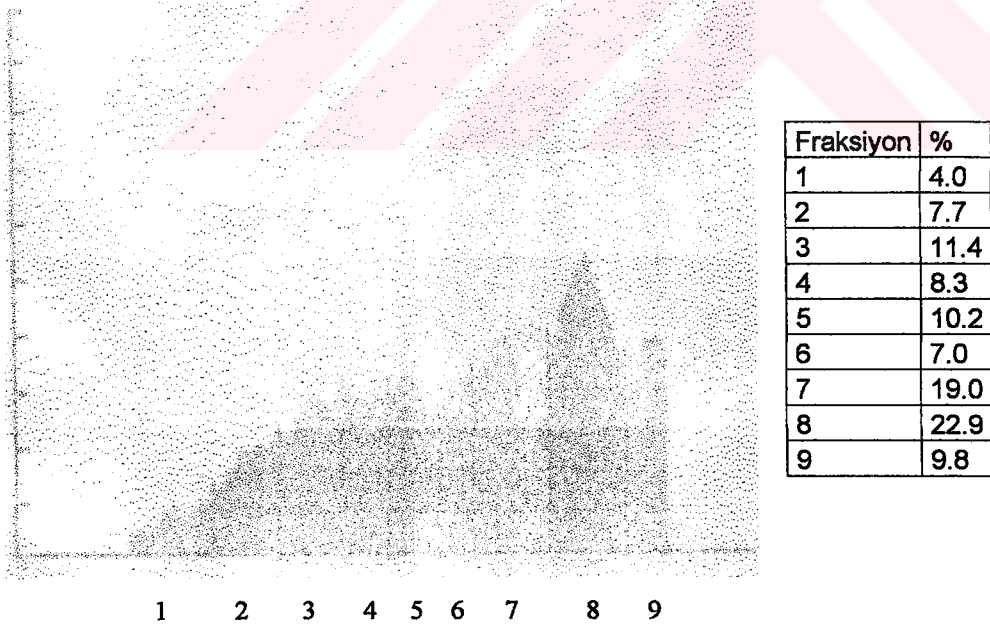


Fraksiyon	%
1	4.1
2	6.4
3	11.6
4	7.3
5	11.1
6	7.4
7	18.6
8	22.8
9	10.7

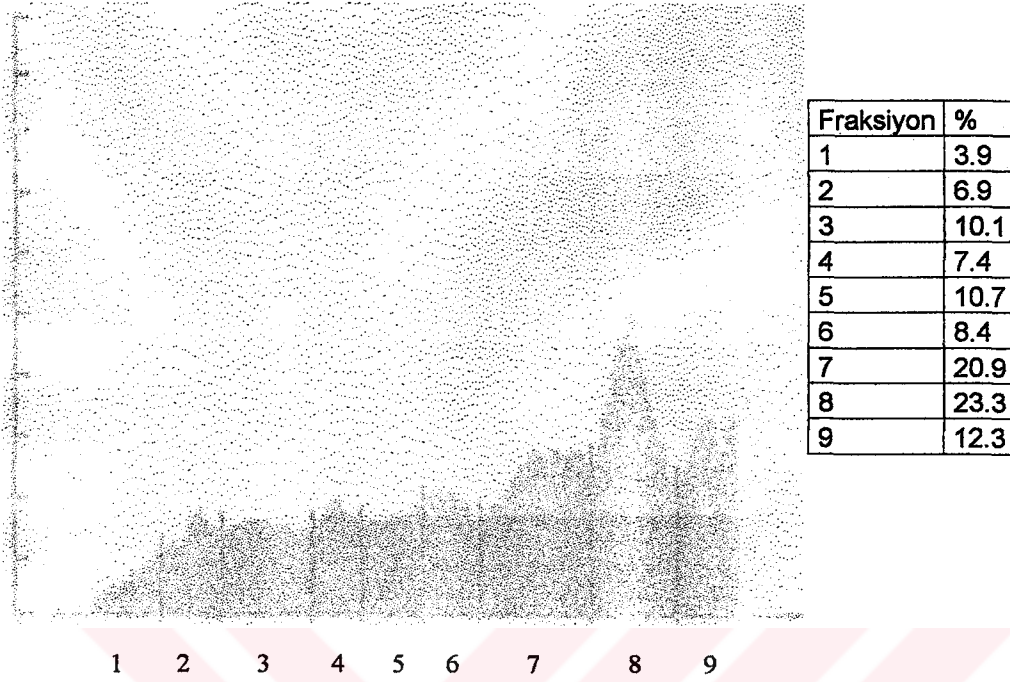
Şekil 4.6.2. 10. gün 0.1 ppm bakır etkisindeki balıkların solungaç dokusundaki protein bandlarının dansitometrik ölçümleri.



Şekil 4.6.3. 10. gün 1.0 ppm bakır etkisindeki balıkların solungaç dokusundaki bandlarının dansitometrik ölçümleri.



Şekil 4.6.4. 20. gün 0.1 ppm bakır etkisindeki balıkların solungaç dokusundaki protein bandlarının dansitometrik ölçümleri.



Şekil 4.6.5. 20. gün 1.0 ppm bakır etkisindeki balıkların solungaç dokusundaki protein bandlarının dansitometrik ölçümleri.

Çizelge 4.4.1. 10. günde solungaç dokusundaki protein bantlarının elektroforetik protein analizi.

		Fraksiyonlar								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Kontrol		4.2	5.0	5.4	8.0	11.1	7.0	16.8	15.0	9.9
Her bir										
Fraksiyondaki										
Protein Yüzdesi	0.1 ppm Cu	4.1	6.4	11.6	7.3	11.1	7.4	18.6	22.8	10.7
	1.0 ppm Cu	3.9	6.5	9.3	7.4	10.9	8.0	21.4	21.9	10.1

Çizelge 4.4.2. 20. günde solungaç dokusundaki protein bantlarının elektroforetik protein analizi.

		Fraksiyonlar								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Kontrol		4.2	5.0	5.4	8.0	11.1	7.0	16.8	15.0	9.9
Her bir										
Fraksiyondaki										
Protein Yüzdesi	0.1 ppm Cu	4.0	7.7	11.4	8.3	10.2	7.0	19.0	22.9	9.8
	1.0 ppm Cu	3.9	6.9	10.1	7.4	10.7	8.4	20.9	23.3	12.3

Bakır, *C. carpio*'nun dokularında karaciğerde yüksek molekül ağırlıklı proteinlere (YMAP) bağlanırken, solungaçlarda ise daha çok orta molekül ağırlıklı proteinlere (OMAP) bağlandığı belirlenmiştir.

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu araştırmada *C. carpio*'da 1.0 ppm ortam derişimin de deneylerin sona erdirildiği 20 günlük süre içersinde ölüm gözlenmemiştir. Bir organizmanın ağır metal içeren bir ortam içersinde yaşaması ve toksik etkilerinden korunma oranı metabolizmasının iklime uyma durumuna ve detoksifikasyon mekanizmasına bağlıdır (Dange, 1986; Hilmy ve ark., 1987).

C. carpio'nun dokularındaki bakır birikimi yaşadıkları ortam derişimine ve etkide kaldıkları süreye bağlı olarak değışim göstermektedir. Ortam konsantrasyonu arttıkça ve belirli bir konsantrasyonda yaşadıkları süre uzadıkça dokularda biriken bakır miktarı artmaktadır. Balıkların doku ve organlarındaki bakır birikimi, etkide kalınan süre ve ortam derişimine paralel olarak arttığı bir çok araştırmacı tarafından saptanmıştır (Brungs ve ark., 1973; Kargın ve Erdem, 1991; Erdem ve Kargın, 1992).

Bu araştırmada her iki ortam derişiminde de deneyin ilk 10 günlük süresi içersinde *C. carpio*'nun dokularında bakır alınınının çok hızlı olduğu ve daha sonra ise alınının yavaşladığı belirlenmiştir. Çoğun ve Kargın (2004) *Oreochromis niloticus* ile yaptıkları bir araştırmada bakır alınınının ilk 7 gün içersinde çok süratli olduğunu ve dokularda yüksek düzeyde biriktiğini saptamışlardır.

Su organizmalarında ağır metal birikimini etkileyen bir çok faktör vardır. Bunların arasında etkide kalma süresi ve derişim, eşey, organizmanın tür ve yaşı önemli bir yer tutmaktadır (Linde ve ark., 1999). Balıkların dokularında metalleri biriktirebilmesi, metal alını ve eliminasyonu veya transformasyonu arasındaki ilişki belirlemektedir. Balıklar ağır metalleri solungaç epiteli ve deriden direkt olarak ve sindirim yoluyla da indirekt olarak almaktadır (Mzimela ve ark., 2003).

Ağır metaller genelde balıkların bazı dokularında yüksek düzeyde birirmektedir. Balıklarda karaciğer, böbrek ve solungaç yüksek düzeyde metal biriktiren organlardır. Ancak farklı organlar metal birikiminde farklı kapasiteler göstermektedir. Organizmalarda metalin birikimi organın işlevi ile uyum gösterdiği saptanmıştır (Swaileh ve Adelung, 1994). *C. carpio*'da denenen tüm ortam derişimlerinde bakır birikimi en fazla karaciğerde bulunmuş, bunu solungaç dokusu izlemiştir. Her iki ortam derişiminde de karaciğerdeki bakır birikimi, solungaçlardaki

birikimden yaklaşık 8-10 kat daha fazla olduğu bulunmuştur. Karaciğerde bakırın yüksek düzeyde depolanması bu organın işlevinden kaynaklanabilir.

Balıklarda karaciğer çevresel kirliliğı belirlemede diğeri organlarla kıyaslandığında iyi bir indikatör organ olduğı belirlenmiştir (Al-Yousuf ve ark., 2000). Aynı zamanda spesifik metabolizma prosesleri, enzim katalizleme reaksiyonları ve metallothionein (MT) gibi proteinlerin sentezi karaciğerde olmaktadır (Heath,1987; Hodson,1988; Bendell Young ve Harvey, 1989; Cinier ve ark., 1999; Olsvik ve ark., 2001). Bu araştırmada karaciğerde yüksek düzeyde bakır birikmesi, büyük bir olasılıkla karaciğerin bakırı ortamdaki bulunandan daha yüksek düzeyde biriktirmesinden kaynaklandığı düşünölmektedir. Doğal ve laboratuvar koşullarında yapılan araştırmalarda balıklarda bakır birikimi ile karaciğer dokusu arasında pozitif bir ilişkinin olduğı belirlenmiştir (Buckley ve ark., 1982; Hodson, 1988; Erdem ve Kargın,1992; Çoğun ve ark., 2003). Bu araştırmada elde edilen sonuçlardan karaciğerin bakır için hedef bir organ olduğı belirlenmiştir. Olsvik ve ark. (2001) *Salmo trutta* ile yaptıkları bir araştırmada bakırın karaciğerde, böbrek ve solungaçlarla kıyaslandığında yüksek düzeyde biriktiğini, buna ek olarak bu organda metallothionein gibi proteinlerin oluşumunu hızlandırdığını saptamışlardır.

Balık solungaçları gaz değışimi ve osmoregülasyonda görev yapan önemli bir dokudur. Ağır metallerin direkt etkisi altında bulunan balıklarda metallerin çoğı balıklar tarafından solungaçların yarı geçirgen zarından pasif veya aktif difüzyonla alınmaktadır (Heath,1987). Solungaçlar yoluyla vücuda alınan metaller kan dokusuna transfer olmakta ve hedef organların sitoplazmik kompartmanlarına dağılmaktadır (Mzimela ve ark., 2003). Kontrol gurubuyla karşılaştırıldığında solungaçlardaki bakır birikimi deneyler süresince arttığı saptanmıştır. Bu büyük bir olasılıkla bakırın solungaçlardaki mukus tabakasında birikmesi ve geniş bir yüzey alanına sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Bakırın solungaçlara kıyasla karaciğerde daha yüksek oranda birikmesi, büyük bir olasılıkla bakırın solungaçlardan depolanmak üzere karaciğere taşındığını düşündürmektedir.

Deneyler süresince karaciğer ve solungaçlardaki bakır düzeyi durağan bir düzeye ulaşmamıştır. Etkide kalma süresinin artışıyla bu dokulardaki bakır birikimi de sürekli artmıştır. Bunun, büyük bir olasılıkla bakırın sürekli olarak solungaçlardan

alınarak depolanmak üzere karaciğer ve böbreklere taşınmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Geniş coğrafik yayılış gösteren sazanlar, dünyada en geniş bir şekilde kültürü yapılan balık türlerinden biridir (Jhigran , 1977). Omnivor olarak beslenen sazanlar genelde sedimentten beslendiklerinden diğer pelajik balıklara oranla ağır metallerin etkilerine daha fazla maruz kalmaktadırlar (Philips, 1980). Sazanların geniş yayılım göstermeleri, üremelerinin kolay olması ve insanlar tarafından çok fazla tüketilmeleri bu balık türünün önemini arttırmaktadır.

Hemen tüm balıklarda bakır dokularda proteinlere bağlanmaktadır. Bununla birlikte bu metal bağlayıcı proteinlerin büyüklüğü ve doğal olarak bulunabilirliği balık türlerinde farklılık göstermektedir (Noel-Lambot ve ark., 1978; McCarter ve ark., 1982; Roch ve McCarter, 1984; Krezoski ve ark., 1988; Andersen ve ark., 1989). Yüksek molekül ağırlıklı proteinler, organizmalarda oksijenin taşınmasında ve organizmanın dokuları arasında metalin taşınmasında işlev yapan önemli yapılardır. Buna ek olarak metallerin hücresel düzeyde kontrolünde ve bağlanmasında da önemli bir rol oynamaktadır (Marcano ve ark., 1996).

Denenen tüm deney gruplarında ve kontrol balıklarında SDS-PAGE jelindeki karaciğer örneklerinin ayırımından 11 protein bandı saptanmıştır. Bu bandlardan 5 tanesi yüksek molekül ağırlıklı proteinleri (YMAP), 6 tanesi ise orta molekül ağırlıklı proteinleri (OMAP) içerirken, solungaç dokusunun elektroforetik analizi sonucu 9 protein bandı saptanmıştır. Bu bandlardan 4 tanesi YMAP'leri, 5 tanesi ise OMAP'leri içermektedir. Benzer bir çalışma *Nassarius reticulatus* ile yapılmış olup, SDS-Polyakrilamid jel elektroforeziyle metal bağlayıcı protein bandlarının hem deney grubundaki hemde kontrol grubundaki hayvanlarda olduğu, fakat kontrol hayvanlarında bu protein bandlarının zayıf olduğu belirlenmiştir (Andersen ve ark., 1989).

Deney gruplarından elde edilen sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bakırın, *C. carpio*'nun karaciğerinde yüksek molekül ağırlıklı dört proteinin (170-88 kDa) ve orta molekül ağırlıklı bir proteinin (40 kDa) yoğunluğunu arttırdığı saptanmıştır. Bakırın etkisine bırakılan *Oncorhynchus kisutch*'da karaciğerde düşük ve yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin olduğu ve sürenin uzamasıyla bu

proteinlerin yoğunluğunun arttığı belirtilmiştir (McCarter ve ark., 1982). Cd'un etkisindeki *Callianassa tyrrhena*'ın hepatopankreasında yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin etkilendiği polyakrilamid jel elektroforeziyle gözlenmiş olup, 0.6 ppm Cd'un etkisindeki hayvanlarda 6 tane protein bandının yoğunluğunun arttığı belirtilmiştir (Thaker ve Haritos, 1989).

Denenen her iki derişim ve sürede *C. carpio*'nun karaciğerinde biriken bakır hem OMAP'lere hem de YMAP'lere bağlanmış, genelde bu bağlanma YMAP'lerde OMAP'lere oranla daha fazla olmuştur. Ağır metallerin etkisinde tatlı su balıklarında çok miktarda metal bağlayıcı proteinlerin oluştuğu ve bakırın büyük bir kısmının bu proteinlere bağlandığı belirlenmiştir (Krezoski ve ark., 1988). *Tilapia mossambica*'da karaciğerdeki metal bağlayıcı proteinler üzerine yapılan bir çalışmada, çinkonun YMAP'lere bağlandığı gözlenmiştir (Shen ve ark., 1998). Kadmiyumun etkisine bırakılan *C. carpio*'da Cd'un metallothioneinlere ve yüksek molekül ağırlıklı proteinlere bağlandığı belirtilmiştir (Kito ve ark., 1982a). Langston ve ark. (1989) deniz yumuşakçalarıyla yaptıkları bir araştırmada Cd'un *Littorina littorea* ve *Mytilus edulis*'de metallothionein benzeri proteinlerde, *Macoma balthica*'da ise yüksek molekül ağırlıklı proteinlerde depo edildiğini göstermişlerdir. *Guniada maculata*'da metal bağlayıcı proteinler üzerine yapılan bir araştırmada Ni'in çoğunun düşük molekül ağırlıklı (< 4 kDa), Zn'un ise yüksek molekül ağırlıklı fraksiyonlarda (> 35 kDa) bulunduğu belirlenmiştir (Eriksen ve ark., 1989). *C. carpio*'da Cd birikimi ve metallothionein sentezi üzerine yapılan bir çalışmada Cd'un karaciğer ve böbreklerde ilk olarak MT sentezini arttırdığını, daha sonra ise Cd-bağlayıcı YMAP'lerin sentezini arttırdığı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Kito ve ark., 1986).

Bu araştırmada denenen tüm koşullarda yüksek düzeyde bakır birikiminin karaciğerde saptanması nedeniyle, karaciğerdeki bakır birikimi ile bu organdaki metal bağlayıcı protein sentezi arasında pozitif bir ilişkinin olduğu düşünülmektedir. *C. carpio*'da kadmiyumun etkisinde metal bağlayıcı proteinlerin indüksiyonuna paralel olarak, karaciğer ve böbreklerde metal birikiminin de arttığı belirtilmiştir (Hermesz ve ark., 2001). Dixon ve Sprague, (1981) Cu ve Cd'un etkisine bıraktıkları balıkların karaciğerinde önemli oranlarda metal bağlayıcı proteinlerin sentezlendiğini

saptamışlardır. *Salmo gairdneri*'nin karaciğerinde, Cu, Zn ve Cd gibi metallerin YMAP'lere kontrol balıklarına oranla daha fazla bağlandığı belirtilmiştir (Roch ve ark,1982). Karaciğerde bakır ve Cu-bağlayıcı proteinler arasında bir korelasyonun bulunması, bu organın Cu kirliliği için iyi bir indikatör olduğunu göstermektedir. Ağır metallerin çoğu, metal bağlayıcı proteinlerin sentez yeri olan karaciğer gibi organlarda yüksek derişimlerde bulunur (Thomas ve ark., 1983; Cinier ve ark., 1998; Hermesz ve ark., 2001; Olsvik ve ark., 2001). Bu araştırmada tüm deney koşullarında karaciğerde yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin yoğunluğundaki artış, büyük bir olasılıkla karaciğerde yüksek düzeyde bakır birikiminden kaynaklanmaktadır.

Denenen tüm ortam koşullarda bakırın etkisinde kalan balıkların solungaçları, kontrol balıklarıyla karşılaştırıldığında yüksek molekül ağırlıklı iki protein bandında (90 ve 72 kDa) ve orta molekül ağırlıklı üç protein bandında (30-25 kDa) protein yoğunluğunun arttığı belirlenmiştir. Tüm deney gruplarında *C. carpio*'nun solungaçlarında biriken bakır hem OMAP'lere hemde YMAP'lere bağlanmış, genelde bu bağlanma OMAP'lerde YMAP'lere oranla daha fazla olmuştur. Cu, Cd ve Zn etkisine bırakılan *S. trutta*'da solungaç dokusunda metal bağlayıcı proteinlerinin sentezinin düşük olduğu saptanmış ve Cd'un MT'den çok YMAP'lere bağlandığı belirtilmiştir (Olsvik ve ark., 2001). 31 gün süre ile 5 mg/L Cd'un etkisine bırakılan sazanların solungaçlarında kadmiyum, 1.günden sonra YMAP'lere, 4.günden sonra ise MT'lere bağlanmıştır (Kito ve ark., 1982b). *Palaemonetes pugio*'da Cd'un %85'nin 10 kDa luk proteinlere geriye kalanın ise YMAP'lere bağlandığı saptanmıştır (Howard ve Hecker, 1990). *S. gairneri*'de bakırın solungaç dokusunda düşük düzeyde metal bağlayıcı protein indüksiyonuna neden olduğu belirtilmiştir (Lauren ve McDonald, 1987). Araştırmamızda solungaçlarda biriken bakırın hem OMAP'lere hemde YMAP'lere bağlandığı, fakat bu bağlanmanın derişim ve süre açısından bir ayrım göstermediği saptanmıştır. Noel-Lambot ve ark. (1978) yaptıkları bir çalışmada Cd'un etkisine bırakılan *Anguilla anguilla*'nın solungaçlarında etkide kalmadaki ilk saatlerde yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin yoğunluğunun arttığını, sürenin uzamasıyla bu artışın devam ettiğini saptamışlardır. Balıklarda bakır, etkide kalınan ilk saatlerde veya günlerde bir şok etkisi yaratarak dokulara zarar verdiği daha sonra ise hızlı bir koruyucu ve tamir sisteminin devreye

girdiği belirtilmiştir (McDonald ve Wood, 1993). Araştırmamızda büyük bir olasılıkla *C. carpio*'nun solungaçlarındaki metal bağlayıcı proteinlerin bakırı bağlayarak hareketsiz bir durumda tuttuğu ve bunun sonucunda hücrelerin, bakırın olası olumsuz etkisinden koruduğu düşünülmektedir.

Metal bağlayıcı proteinler, büyüklük, eşey, süre, derişim ve suyun sıcaklığına bağlı olarak değişim göstermektedir (Nolel-Lambot ve ark., 1978; Olsson ve ark., 1987; Howard ve Hecker, 1990). Bu araştırmada hem karaciğer hem de solungaçlarda metal bağlayıcı protein yoğunluğu, süre ve derişim açısından bir değişim göstermemiştir.

Bu araştırmada iki organ, metal ve metal bağlayıcı protein yoğunluğu açısından karşılaştırıldığında, metal birikimi ve protein sentezi artışı karaciğerde solungaçlardan daha yüksek düzeyde olmuştur. Karaciğerde yüksek molekül ağırlıklı protein bandlarında protein yoğunluğu artarken, solungaç dokusunda genelde orta molekül ağırlıklı protein bandlarında protein yoğunluğunun arttığı belirlenmiştir. Bu büyük bir olasılıkla organların metabolik rollerinin (Absorbsiyon, depolama, eliminasyon) farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Hamza-Chaffai ve ark. (1997) Tunus kıyılarındaki balıklarla yaptıkları bir çalışmada *Scopaena porcus* ve *Serranus scriba*'nın karaciğerindeki metal bağlayıcı protein düzeylerinin solungaçlarındaki düzeylerinden daha yüksek olduğunu saptamışlardır.

C. carpio'da bakırın solungaçlarda ve özellikle de karaciğerde YMAP'lere bağlanması, Winge ve ark. (1973) ve Brown ve Parsons (1978) tarafından ortaya atılan spillover hipotezine uygunluk göstermektedir. Bu hipoteze göre MT'lerin bakırı bağlayarak inhibitör etkisinin diğer proteinlere ulaşmasını engellemekte, bununla birlikte Cu alınıminin devam etmesi durumunda ise YMAP'lerin bakırı bağladığı ve bunun sonucunda bakırın dokularda depo edilerek homeostasisin korunduğu belirtilmektedir.

Araştırmamızdaki bulgulardan *C. carpio*'da OMAP ve YMAP'lerin bakırı bağladığı ve bakırın metabolizmasında rol oynadığını ve bu tür metal bağlayıcı proteinlerin, metal risk değerlendirilmelerinde potansiyel başvurular veya markırlar olabileceği belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- AL-YOUSUF, M. H., EL-SHAHAWI, M. S. and AL-GHARIS, S. M., 2000. Trace Metals in Liver, Skin and Muscle of *Lethrinus lentjan* Fish Species in Relation to Body Length and Sex. The Science of Total Environment. 256. 87-94.
- ANDERSEN, R. A., ERIKSEN, K. D. H. and BAKKE, T., 1989. Evidence of Presence of a Low Molecular Weight, Non-Metallothionein-Like Metal-Binding Protein in the Marine Gastropod *Nassarius reticulatus* L. Comp. Biochem. Physiol. 94B, 285-291.
- ANDERSON, N. L., BLASKO, R. E., HOFOMAN, J. P. and ANDERSON, N. G., 1991. A Two-Dimensional Gel Database.
- BAKSI, S. M., LIBBUS, N. and FRAZIER, J. M., 1988. Induction of Metal Binding Proteins in Striped Bass, *Morone saxatilis*, Following Cadmium Treatment. Comp. Biochem. and Physiol. Part C: Comp. Pharma. And Toxicol. 91, 355-363.
- BENDEL YONG, L. and HARVEY, H. H., 1989. Concentrations and Distribution of Fe, Zn, and Cu in Tissues of the White Sccer (*Catostomus commersoni*) in Related to Elevated Levels of Metals and Low pH. Hydrobiologia. 176/177, 346-354.
- BERVOETS, L., BLUST, R. and VERHEYEN, R., 2001. Accumulation of Metals in the Tree Spined Stickelback (*Gasterosteus aculeatus*) from Natural Fresh Waters. Ecotoxicol. Environ. Safety. 48, 117-127.
- BOLLAG, D. M. and EDELSTEIN, S. J., 1991. Protein Methods. VILLEY-LISS Pres.
- BROWN, D. and PARSONS, T. R., 1978. Relationship Between Cytoplasmic Distribution of Mercury and Toxic Effects to Zooplankton and Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) Exposed to Mercury in a Controlled Ecosystem. J. Fish. Res. Bd. Can. 35, 880-884.
- BRUNGS, W. A., LEONARD, E. N. and McKIM, J. M., 1973. Acute and Long-Term Accumulation of Copper by the Brown Bullhead, *Ictalurus nebulosus*. J. Fish. Res. Board. Can. 30, 583-586.

- BRYAN, S. E. and HILDAGO, H. A., 1976. Nuclear ^{115}Cd Uptake and Disappearance Correlated With Cadmium-Binding Protein Synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 68, 858.
- BUCKLEY, J. T., ROCH, M., McCARTER, J. A., RENDELL, C. A. and MATHESON, A. T., 1982. Chronic Exposure of Coho Salmon to Sublethal Concentrations of Copper-I. Effect on Growth, on Accumulation and Distribution on of Copper and on Copper Tolerance. *Comp. Biochem. Physiol.*, 72C, No. 1, 15-19.
- CAMAKARIS, J., VOSKOBOINIK, I. and MERCER, J. F., 1999. Breakthroughs and View: Molecular Mechanisms of Copper Homeostasis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 261, 225-232.
- CAMPANA, O., SARASQUETE, C. and BLASCO, J., 2003. Effect of Lead on ALA-D Activity, Metallothionein Levels, and Lipid Peroxidation in Blood, Kidney, and Liver of the Toadfish *Halobatrachus didactylus*. *Ecotoxicol. And Environ. Safety.* 55, 116-125.
- CHERIAN, M. G. and GOYER, R. A., 1978. Metallothioneins and Their Role in the Metabolism and Toxicity of Metals. *Life Sci.* 23, 1-10.
- CINIER, C. C., PETIT-RAMEL, M., FAURE, R. and BORTOLATO, M., 1998. Cadmium Accumulation and Metallothionein Biosynthesis in *Cyprinus carpio* Tissues. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 793-799.
- CINIER, C. C., PETIT-RAMEL, M., FAURE, R., GARIN, D. and BOUVET, Y., 1999. Kinetics of Cadmium Accumulation and Elimination in Carp *Cyprinus carpio* Tissues. *Comp. Biochem. And Physiol. Part C.* 122, 345-352.
- CLAIBORNE, J. B., EDWARDS, S. L. and MARRISON-SHETLAR, A. I., 2002. Acide-Base Regulation in Fishes: Cellular and Molecular Mechanisms. *J. Exp. Zool.* 293, 302-319.
- COLVIN, L., 1984. Uptake of Copper in the Gills and Liver of Perch, *Perca fluviatilis*. *Ecological Bulletins.* 36, 57-61.

- CONNER, E. A. and FOWLER, B. A., 1994 Preliminary Purification and Partial Characterization Studies of a Low-Molecular Weight Cytosolic Lead-Binding Protein in Liver of the Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquatic Toxicology*. 28, 29-36.
- ÇOĞUN, H. Y. and KARGIN, F., 2004. Effect of pH on the Mortality and Accumulation of Copper in Tissues of *Oreochromis niloticus*. *Chemosphere*. 55, 277-282.
- ÇOĞUN, H. Y., YÜZEREROĞLU, T. A. and KARGIN, F., 2003. Accumulation of Copper and Cadmium in Small and Large Nile Tilapia *Oerochromis niloticus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 71, 1265-1271.
- COUSINS, R. J., 1985. Absorbsion, Transport and Hepatic Metabolism of Copper and Zinc Special Reference to Metallothionein and Ceruloplasmin. *Physiol. Rev.* 65, 238-309.
- DE BOECK, G., NGO, T. T. H., CAMPENHOUT, K. V. and BLUST, R., 2003. Differential Metallothionein Induction Patterns in Tree Freshwater Fish During Sublethal Copper Exposure. *Aquatic Toxicology*. 65, 413-424.
- DANGE, A. D., 1986. Changes in Carbonhydrate Metabolism in Tilapia *Oreochromis mossambicus*, During Short-Term Exposure to Different Types of Pollutants. *Environmental Pollution*. 41, 165-177.
- DIXON, D. G. and SPAREGUE, J. B., 1981. Copper Bioaccumulation and Hepatoprotein Synthesis During Acclimation to Copper by Juvenil Trout. *Aquat. Toxicol.* 1, 67-81.
- DE SMET, H. and BLUST, R., 2001. Stress Responses and Changes in Protein Metabolism in Carp *Cyprinus carpio* During Cadmium Exposure. *Ecotoxicol. And Environ. Safety*. 48, 255-262.
- DE SMET, H., BLUST, R. and MOENS, L., 2001. Cadmium-Binding to Transferin in the Plasma of the Common Carp *Cyprinus carpio*. *Comp. Biochem. And Physiol. Part C* 128, 45-53.
- DOUBEN, P. E. T., 1989a. Uptake and Elimination of Waterborne Cadmium by the Fish *Neomacheilus barbatulus* (Stone Loach). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 18, 576-586.

-, 1989b. Metabolic Rate and Uptake and Loss of Cadmium from Food by the Fish *Neomacheilus barbatulus* (Stone Loach). Environ. Poll. 59, 177-202.
- ERDEM, C. ve KARGIN, F., 1990. Farklı Ortam Derişimlerinde *Tilapia nilotica* (L)'nin Doku ve Organlarında Bakır Birikimi. Doğa-Tr. J. Of Zoology. 14, 173-178.
-, 1992. A Comparative Study on the Accumulation of Copper in Liver, spleen, Stomach, Intestine, Gill and Muscle Tissues of *Cyprinus carpio* and *Tilapia nilotica*. Biyokimya Dergisi Cilt XVII, 1, 13-27.
- ERIKSEN, K. D. H., ANDERSEN, T., GRAY, J. S., STENERSEN, J. and ANDERSEN, R.A., 1989. Metal Binding in Polychaetes: Quantitative and Qualitative Studies of Five Species. Marine Environmental Research. 28, 167-171.
- ERTAN, H. ve ARDA, N., 1999. Proteinlerin İzolasyonu ve Saflaştırılması (G. TEMİZKAN ve N. ARDA, editör) Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti, İstanbul, s. 152.
- FELTS, P. A. and HEATH, A. G., 1984. Interactions of Temperature and Sublethal Environmental Copper Exposure on the Energy Metabolism of Bluegill, *Lepomis macrochirus*. J. Fish. Biol., 25, 444-453.
- GAAL, O., MEDGYESI, G. A. and VERECZKEY, L., 1980. Electrophoresis in the Separation of Biological Macromolecules. A Wiley-Interscience Publication. New york-Barisbane-Toronto.
- GAGNE, F., MARION, M. and DENIZEAU, F., 1990. Metal Hemeostasis and Metallothionein Induction in Rainbow Trout Hepatocytes Exposed to Cadmium. Fund. Appl. Toxicol. 14, 429-437.
- GILLIS, P. L., DIXON, D. G., BORGMANN, U. and REYNOLDSON, T. B., 2003. Uptake and Depuration of Cadmium, Nickel and Lead in Laboratory- Exposed *Tubifex tubifex* and Corresponding Changes in the Concentration of a Metallothionein-Like Protein. Environ. Toxicol. And Chemist. 23, 76-85.

- GOYER, R. A., 1986. Toxic Effects of Metals, In KLAASSEN, C. D., AMDUR, M. O. And DOULL, J. (Ed.). Caserett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, MacMillan Publ. Co., New York, 582.
- GRANZIER, H. L. M. and WANG, K., 1993. Gel Electrophoresis of Glant Proteins: Solubilization and Silver-Staining of titin and Nebulin from Single Muscle Fiber Segments. Electrophoresis. 14, 56-64.
- GROSCUP, MH., BOSCHWITZ, J. and TIMONEY, J. F., 1991. A Convenient Gel Holder for Preperative Electrophoretic Separation of Aggregated Bacterial Proteins. Electrophoresis. 12, 90-93.
- HAMZA-CAFFAI, A., AMIARD-TRIQUET, C. and ABED, A., 1997. Metallothionein-Like Protein: Is It an Efficient Biomarker of Metal Contamination? A Case Study Based on Fish from the Tunisian Coast. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 33, 53-62.
- HARRIS, Z. L. and GITLIN J. D., 1996. Genetic and Molecular Basis for Copper Toxicity. Am. J. Clin. Nutrit. 63, 836-841.
- HARRISON, F. L., LAM, J. R. and NOVACEK, J., 1988. Partitioning of Metals Among Metal-Binding Proteins in the Bay Mussel, *Mytilus edulis*. Marine Environmental Research. 24, 167-170.
- HEATH, A. G., 1987. Water Pollution and Fish Physiology. CRC Press. 24 pp. Florida USA.
- HERMESZ, E., ABRAHAM, M. and NEMCSOK, J., 2001. Tissue-Specific Expression of Two Metallothionein Genes in Common Carp During Cadmium Exposure and Temperature Shock. Comp. Biochem. And Physiol. Part C. 128, 457-465.
- HILMY, A. M., SHABANA, M. B. and DAABEES, A. Y., 1985. Bioaccumulation of Cadmium: Toxicity in *Mugil cephalus*. Comp. Biochem. Physiol. 81C(1), 139-143.
- HILMY, A. M., EL DOMIATY, N. A., DAABEES, A. Y. and ALSAHRA, A., 1987. The Toxicity to *Claria lazera* of Copper and Zinc Applied Jointly. Comp. Biochem. Physiol. 83C, 309-314.

- HIMBER, J., 1993. Horizontal Semi-Dry Electrophoresis for the Detection of the Low Density Lipoprotein Receptor in Solubilized Liver Membranes. *Electrophoresis*. 14, 794-797.
- HINTON, D. E. and LAUREN, D. J., 1990. Liver Structural Alterations Accompanying Chronic Toxicity in Fishes: Potential Biomarkers of Exposure. In: McCARTHY, J. F., SHUGART, L. R. (Eds.) *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis, Boca Raton. 17-57.
- HODSON, P. V., 1988. The Effect of Metal Metabolism on Uptake, Disposal and Toxicity in Fish. *Aquatic Toxicology*. 11, 3-18.
- HOLLIS, L., HOGSTRAND, C. and WOOD, C. M., 2001. Tissue-Specific Cadmium Accumulation, Metallothionein Induction, and Tissue Zinc and Copper Levels During Chronic Sublethal Cadmium Exposure in Juvenile Rainbow Trout. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 468-474.
- HOWARD, C. L. and HACKER, C. S., 1990. Effects of Salinity, Temperature, and Cadmium on Cadmium-Binding Protein in the Grass Shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19, 341-347.
- IRATO, P., SANTOVITO, G., CASSINI, A., PICCINNI, E. and ALBERGONI, V., 2003. Metal Accumulation and Binding Protein Induction in *Mytilus galloprovincialis*, *Scapharca inaequivalvis* and *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44, 476-484.
- JEYASEELAN, K., CHUNG, M. C. M. and KON, O. L., 1987. *Genes and Proteins*. First Edition. U.S.A.
- JHINGRAN, V. G., 1977. *Fish and Fisheries of India*. Hindustan Publishing Corporation (India), Jawaahar Nagar, Delhi, India, pp. 954.
- JONSSON, M., ABRAHAMSON, A., BRUNSTRÖM, B., BRANDT, I., INGERBRIGTSEN, K. and JORGENSEN, E. H., 2003. EROD Activity in Gill Filaments of Anadromous and Marine Fish as a Biomarker of Dioxin-Like Pollutants. *Comp. Biochem. And Physiol. Part C* 136, 235-243.
- KAGI, J. H. R. and SCHAFFER, A., 1988. Biochemistry of Metallothionein. *Biochemistry*. 27, 8509-8515.

- KARGIN, F. ve ERDEM, C., 1991. *Cyprinus carpio*'da Bakırın Karaciğer, Dalak, Mide, Barsak, Solungaç ve Kas Dokularındaki Birikimi. Doğa-Tr. J. of Zoology. 15; 306-314.
1992. Bakır- Çinko Etkileşiminde *Tilapia nilotica* (L.)'nın Karaciğer, solungaç ve Kas Dokularındaki Metal Birikimi. Doğa-Tr. J. of Zoology. 16; 343-348.
- KARGIN, F., 1996. Seasonal Changes in Levels of Heavy Metals in Tissues of *Mullus barbatus* and *Sparus aurata* Collected from İskenderun Gulf (Turkey). Water, Air, and Soil Pollution, 90, 557-562.
-, 1998. Metal Concentrations in Tissues of Freshwater Fish *Capoeta barroisi* from the Seyhan River (Turkey). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 60, 5, 822-828.
- KAY, J., THOMAS, D. G., BROWN, M. W., CRYER, A., SHURBEN, D., SOLBE, J. F. G. and GARVEY, S., 1986. Cadmium Accumulation and Protein Binding Patterns in Tissues of the Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*. Environmental Health Perspectives. 65, 133-139.
- KEOGH, J. P., STEFFEN, B. and SIEGERS, C. P., 1994. Cytotoxicity of Heavy Metals in the Human Small Intestinal Epithelia Cell Line I-407: The Role of Glutathione. J. Toxicol. Environ. Health. 43, 351-359.
- KITO, H., TAZAVA, T., OSE, Y., SATO, T. and ISHIKAWA, T., 1982a. Protection by Metallothionein Against Cadmium Toxicity. Comp. Biochem. Physiol. 73C, 1, 135-139.
- KITO, H., OSE, Y., MIZUHIRA, V., SATO, T., ISHIKAWA, T. and TAZAWA, T., 1982b. Separation and Purification of (Cd, Cu, Zn)-Metallothionein in Carp Hepato-pankreas. Comp. Biochem. Physiol. 73C, 121-127.
- KITO, H., OSE, Y. and SATO, T., 1986. Cadmium-Binding Protein(Metallothionein) in Carp. Environ. Health Perspect. 65, 117-124.
- KLERKS, P. L. and FRALEIGH, P. C., 1997. Uptake of Nickel and Zink by the Zebra Mussel *Dreissena Polymorpha*. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 32, 191-197.

- KREZOSKI, S., LAIB, J., ONANA, P., HARTMANN, T., CHEN, P., SHAW, F. and PETERING, D. H., 1988. Presence of Zn, Cu-Binding Protein in Liver of Freshwater Fishes in the Absence of Elevated Exogenous Metal: Relevance to Toxic Metal Exposure. *Marine Environmental Research*. 24, 147-150.
- KUNTZER, H. M., REICHERT, A. SCHNEIDER, K. H. and GIFFHORN, F., 1994. Isolation and Characterization of a L-Glucitol Dehydrogenase from the Newly Isolated Bacterium *Pseudomonas* sp. *Ac. J. Biotechnol.* 36, 157-164.
- LANGSTON, W. J., BEBIANNO, M. J. and MINGJIANG, Z., 1989. A Comparison of Metal-Binding Proteins and Cadmium Metabolism in the Marine Molluscs *Littorina littorea* (Gastropoda), *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* (Bivalvia). *Marine Environmental Research*. 28, 195-200.
- LAUREN, D. J. and McDONALD, D.G., 1987. Accilimation to Copper by Rainbow Trout, *Salmo gairdneri* *Biochem. Can. J. Aquat. Sci.* 44, 105-111.
- LINDE, A. R., SANCHES-GALAN, S., KLEIN, D., GARCIA-VAZQUEZ, E. and SUMMER, K., H. 1999. Metallothionein and Heavy Metals in Brown Trout (*Salmo trutta*) and European Eel (*Anguilla anguilla*): A Comparative Study. *Ecotoxicol. And Environ. Safety*. 44, 168-173.
- LYON, R., TAYLOR, M. and SIMKISS, K., 1983. Metal-Binding Proteins in the Hepatopancreas of the Crayfish (*Austropotamobius pallipes*). *Comp. Biochem. Physiol.* 74C, 51-54.
- MACKAY, E. A., OVERNELL, J. and DUNBAR, B., 1993. Complete Amino Acid Sequences of Five Dimeric and Four Monomeric Forms of Metallothionein from the Edible Mussel *Mytilus edulis*. *Eur. J. Biochem.* 218, 183-194.
- MAHER, W., GOESSLER, W., KIRBY, J. and RABER, G., 1999. Arsenic Concentrations and Speciation in the Tissues and Blood of Sea Mullet (*Mugil cephalus*) from Lake Macquarie NSW, Australia. *Marine Chemistry*. 68, 169-182.
- MARSHALL, W. S., 2002. Na^+ , Cl^- , Ca^{+2} and Zn^{+2} Transport by Fish Gills: Retrospective Review and Prospective Synthesis. *J. Exp. Zool.* 293, 264-283.

- MARCANO, L., NUSETTI, O., RODRIGUEZ-GRAU, J. and VILAS, J., 1996. Uptake and Depuration of Copper and Zinc in Relation to Metal-Binding Protein in Polychaete *Eurythoe complanata*. *Comp. Biochem. Physiol.* 114C, 3, 179-184.
- MARTINEZ, M., DEL-RAMO, J., TORREBLANCE, D. M. and PASTOR, A. 1991. Presence of Cd Binding proteins in Pre-exposed and not Pre-Exposed Cd Brine Shrimp *Artemia*. *Toxicol. And Environ. Chemistry.* 31, 417-424.
- MCCARTER, J. A., MATHESON, A. T., ROCH, M., OLAFSON, R. W. and BUCKLEY, J. T., 1982. Chronic Exposure of Coho Salmon to Sublethal Concentrations of Copper II. Distribution of Copper Between High-and Low Molecular Weight Proteins in Liver Cytosol and the Possible Role of Metallothionein in Detoxification. *Comp. Biochem. Physiol.* 72C, 1, 21-26.
- MCCARTER, J. A. and ROCH, M., 1984. Chronic Exposure of Coho Salmon to Sublethal Concentrations of Copper-III. Kinetics of Metabolism of Metallothionein. *Comp. Biochem. Physiol.* 77C, 83-87.
- MCDONALD, D. G., and WOOD, C. M., 1993. Branchial Mechanisms of Acclimation to Metals in Freshwater Fish. In: RANKIN, J. C., JENSEN, F. B. (Eds), *Fish Ecophysiology*. Chapman and Hall, London, pp. 197-321.
- MENEZES, M. R. and QASIM, S. Z., 1984. Effects of Mercury Accumulation on the Electrophoretic Patterns of the Serum, Hemoglobin and Eye Lens Proteins of *Tilapia mossambica* (Peters). *Water. Res.* 18, 153-161.
- MOISEENKO, T. I. and KUDRYAVTSEVA, L. P., 2001. Trace Metal Accumulation and Fish Pathologies in Areas Affected by Mining and Metallurgical Enterprises in the Kola Region, Russia. *Environmental Pollution.* 114, 285-297.
- MURAMATO, S., 1983. Elimination of Copper from Contaminated Fish by Long-Term Exposure to EDTA and Freshwater. *J. Environ. Sci. Health.* A18, 3, 455-461.
- MZIMELA, H. M., WEPENER, V. and CYRUS, D. P., 2003. Seasonal variation of Selected Metals in Sediments, Water and Tissues of the Groovy Mullet, *Liza*

- dumerelii* (Mugilidae) from the Mhlathuze Estuary, South Africa. Marine Pollution Bull. 46, 659-676.
- NEMCSOK, J. G. and HUGHES, G. M., 1988. The Effect of Copper Sulfate on Some Biochemical Parameters of Rainbow Trout. Environ. Pollut. 49, 77-85.
- NOEL-LAMBOT, F., GERDAY, C. H. and DISTECHE, A., 1978. Distribution of Cd, Zn and Cu in Liver and Gill of the Eel *Anguilla anguilla* With Special Reference to Metallothioneins. Comp. Biochem. Physiol. 61C, 177-187.
- OCHI, T., OTSUKA, F., TAKAHASHI, K. and OHSAWA, M., 1988. Glutathione and Metallothioneins as Cellular Defense Against Cadmium Toxicity in Cultured Chinese Hamster Cells. Chem-Biol. Interact. 65, 1-14.
- OLAFSON, R. W., KEARNS, A. and SIM, R. G., 1979. Heavy Metal Induction of Metallothionein Synthesis in the Hepatopancreas of the Crab *Scylla serrata*. Comp. Biochem. Physiol. 62B, 417-424.
- OLSSON, P. E., HAUX, C. and FORLIN, L., 1987. Variation in Hepatic Metallothionein, Zinc and Copper Levels During an Annual Reproductive Cycle in Rainbow Trout *Salmo gairdneri*. Fish Physiol Biochem. 3(1): 39-47.
- OLSVIK, P. A., GUNDERSEN, P., ANDERSEN, R. A. and ZACHARIASSEN, K. E., 2001. Metal Accumulation and Metallothionein in Brown Trout, *Salmo trutta*, from Two Norwegian Rivers Differently Contaminated with Cd, Cu and Zn. Comp. Biochem. And Physiol. Part C. 128, 189-201.
- OVERNELL, J. and TREWHELLA, A., 1979. Evidence for the Natural Occurrence of Cadmium-Copper Metallothionein in the Crab, *Cancer pagurus*. Comp. Biochem. Physiol. 64C, 69-76.
- OVERNELL, J., MCINTOSH, R. and FLETCHER, T. C., 1987. The Enhanced Induction of Metallothionein by Zinc, its Half-Life in the Marine Fish *Pleuronectes platessa*, and the Influence of Stress Factors on Metallothionein Levels. Experientia. 43, 178-181.
- PAPAGIANNIS, I., KAGALOU, I., LEONARDOS, J., PETRIDIS, D. and KALFAKAKOU, V., 2004. Copper and Zinc in Four Freshwater Fish Species from Lake Pamvotis (Greece). Environment International. 30, 357-362.

- PHILLIPS, D. J. H., 1980. Toxicity and Accumulation of Cadmium in Marine and Estuarine Biota. In: NRIAGU, J. O. (Ed.) Cadmium in the Environment. Part I: Ecological Cycling. John Wiley and Sons, New York, 425-569.
- PIERSON, K. B., 1985. Occurrence and Synthesis of a non-thionein, Zinc-Binding Protein in the Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). Comp. Biochem. Physiol. 81 C, 1, 71-75.
- PODULSO, J. F., 1980. Molecular Weight Estimating Using SDS-Pore Gradient Electrophoresis. Anal. Biochem. 101, 394-406.
- PROSSER, C. L. and BROWN, F. A., 1966. Comparative Animal Physiology, 2nd ed., Philadelphia. 688.
- RENWRANTZ, L., SCHMALMACK, W. and STEENBUCK, M., 1998. Molecular Size of Native Proteins of *Mytilus* Serum which Contains a Dominant Fraction with Heavy Metal-Binding Properties. Com. Biochem. And Physiol. A . 121, 175-180.
- RHYUM, S. B., JIN, B. R., PARK, H. R. and HONG, H. J., 1994. High Level Expression of Hepatitis B Virus PreS1 Peptide in *Escherichia coli*. Journal of Biotechnology. 36, 221-230.
- RIDLINGTON, J. W., CHAPMAN, D.C., GEORGE, D. E. and WHANGER, P. D., 1981 Metallothionein and Cu-Chelatin: Characterization of Metal-Binding Proteins from Tissues of Four Marine Animals. Comp. Biochem. And Physiol. Part C: Comp. Pharmacol. And Toxicol. 70, 93-104.
- ROCH, M., McCARTER, J. A. and CLARK, M. J. R., 1982. Hepatic Metallothionein in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) as an Indicator of Metal Pollution in the Campbell River System. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 39, 1596-1601.
- ROCH, M. and McCARTER, J. A., 1984. Metallothionein Induction, Growth, and Survival of Chinook Salmon Exposed to Zinc, Copper, and Cadmium. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 32, 478-485.
- ROESIJADI, D., 1992. Metallothioneins in Metal Regulation and Toxicity in Aquatic Animals. Aquat. Toxicol. 22, 81-114.

- ROESIJADI, D. and ROBINSON, W. E., 1994. Metal Regulation in Aquatic Animals: Mechanism of Uptake, Accumulation and Release. In: MALINS, D. C., OSTRANDER, G. K. (Eds.). *Aquatic Toxicology*. Boca Raton: Lewis, 387-420.
- ROHLF, J. F. and SOKAL, R. R., 1969. *Statistical Tables*. W. H. Freeman and Company, San Francisco. 253 pp.
- SANDERS, B. M. and MARTIN, L. S., 1994. Copper Inhibits the Induction of Stress Protein Synthesis by Elevated Temperatures in Embryos of the Sea Urchin *Strongylocentrus purpuratus*. *Comp. Biochem.* 109C, 3, 295-307.
- SHEN, L., LAM, K. L., KO, P. W. and CHAN, K. M., 1998. Metal Concentrations and Analysis of Metal Binding Protein Fractions from the Liver of *Tilapia* Collected from Shing Mun River. *Marine Environmental Research*. 46, 597-600.
- SOKAL, R. R. and ROHLF, J. F., 1969. "Biometry" W. H. Freeman and Company, San Francisco. 776 pp.
- SORENSEN, E. M. B., 1991. Metal Poisoning in Fish. Chap. 7, Copper. CRC Pres, Boca Raton, Florida, 235-276.
- SRIVASTAV, R. K., GUPTA, S. K., NIGAM, K. D. P. and VASUDEVAN, P., 1994. Treatment of Chromium and Nickel in Wastewater by Using Aquatic Plants. *Water Res.* 28, 7, 1631-1638.
- SWAILEH, K. M. and ADELUNG, D., 1994. Levels of Trace Metals and Effect of Body Size on Metal Content and Concentration in *Arctica islandica* L. (Mollusca: Bivalvia) from Kiel Bay, Western Baltic. *Marine Pollution Bulletin*. Vol 28, 8, 500-508.
- THAKER, A. A. and HARITOS, A. A. 1989. Cadmium Bioaccumulation and Effects on Soluble Peptides, Proteins and Enzymes in the Hepatopancreas of the Shrimp *Callinassa tyrrhena*. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 94C. 1, 63-70.
- THOMAS, D. G., CRYER, A., SOBLE, J. F. L. G. and KAY, J., 1983. A Comparison of Accumulation and Protein Binding of Environmental Cadmium in the Gill, Kidney and Liver of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri* Richardson).

- Comp. Biochem. Physiol. Part. C. Comp. Pharmacol. And Toxicol. 76, 2, 241-246.
- THOMAS, D. G., BROWN, M. W., SHURBEN, D., SOLBE, J. F. G., CRYER, A. and KAY, J., 1985. A Comparison of the Sequestration of Cadmium and Zinc in the Tissues of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) Following Exposure to the Metals Singly or in Combination. Comp. Biochem. Physiol. Part. C. Comp. Pharmacol. And Toxicol. 82,1, 55-62
- TORRES, P., TORT, L. and FLOS, M., 1987. Acute Toxicity of Copper to Mediterranean Dogfish. Comp. Biochem. Phsiol. 86 C., 1, 169-171.
- TORT, L. TORRES, P. and FLOS, R., 1987. Effects on Dogfish Haematology and liver Composition After Acute Copper Exposure. Comp. Biochem. Physiol., 87 C (2), 349-353.
- TYAGI, R. K., BABU, B. R. and DATTA, K., 1993. Simultaneous Determination of Native and Subunit Molecular Weights of Proteins by Pore Limit Electrophoresis and Restricted Use of Sodium Dodecyl Sulfate. Electrophoresis. 14, 826-828.
- UENG, Y.-F., LIU, C., LAI, C.-F., HUNG, Y.-Y. and UENG, T.-H., 1996. Effects of Cadmium and Environmental Pollution on Metallothionein and Cytochrome P450 in Tilapia. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 57, 125-131.
- XIE, L. and KLERKS, P. L., 2003. Metallothionein-Like Protein in the Least Killifish *Heterandia formosa* and Its Role in Cadmium Resistance. Environ. Toxicol. And Chemistry. 23, 173-177.
- VIARENGO, A., PALMERO, S., ZANICCHI, G., CAPELLI, R., VAISSIERE, R. and ORUNEUSU, M., 1985. Role of Metallothioneins in Cu and Cd Accumulation and Elimination in the Gill and Digestive Gland Cell of *Mytilus galloprovincialis* Lam. Marine Environmantal Research. 16, 23-36.
- VILLAR, C. A., GOMEZ, S. E. and BENTOS, C. A., 2000. Lethal Concentration of Cu in the Neotropical Fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Cyprinodontiformes). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 65, 465-469.
- WALKER, J., WINDER, J. and STARKEY, M., Introduction Workshop on Tecniques in Molecular Biology. Hatfield, Herts.

- WEBER, K. and OSBORN, M., 1969. The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406.
- WEBER, K., 1972. Measurements of Molecular Weight by Electrophoresis on SDS Acrylamide Gel. *Methods in Enzimology.* 26, 3-27.
- WINGE, D., Krasno, J. and Colucci, A. V., 1973. Cadmium Accumulation in Rat Liver. Correlation Between Bound Metal and Pathology. In: HOEKSTRA, W. G., SUTTIE, J. W. And MERTZ, W. (Ed.) *Trace Element Metabolism in Animals.* Universty Park Pres. Baltimore. M. D.
- ZENK, M. H., 1996. Heavy Metal Detoxification in Higher Plants- A Review. *Gene*, 179, 21-30.



ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Muş'un Varto ilçesinde doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Adana'da tamamladım. 1997 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne girdim. 2001 yılında bölümümden mezun olup aynı yıl Ç. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans eğitimime başladım.

