

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KARS ÇAYI'NDA YAŞAYAN *CAPOETA CAPOETA CAPOETA*
(GULDENSTAEDT 1772) ÜZERİNE KOBALT(II) KLORÜR
HEKZAHİDRAT [CoCl₂·6H₂O]' IN ETKİLERİNİN ELEKTROFORETİK
VE HİSTOPATOLOJİK YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

Yasemin BAYRAM
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman
Prof. Dr. Arif BAYSAL

KARS
2010

Bu tez çalışması 2006 – FEF – 09 numaralı proje ile Kafkas Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

T.C.

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

**KARS ÇAYI'NDA YAŞAYAN *CAPOETA CAPOETA CAPOETA*
(GULDENSTAEDT 1772) ÜZERİNE KOBALT(II) KLORÜR
HEKZAHİDRAT [CoCl₂·6H₂O]' IN ETKİLERİNİN ELEKTROFORETİK VE
HİSTOPATOLOJİK YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

**Yasemin BAYRAM
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Danışman
Prof. Dr. Arif BAYSAL**

**KARS
2010**

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Yasemin BAYRAM'ın Prof. Dr. Arif BAYSAL'ın danışmanlığında yüksek lisans tezi olarak hazırladığı "Kars Çayı'nda Yaşayan *Capoeta Capoeta Capoeta* (Guldenstaedt 1772) Üzerine Kobalt (II) Klorür Hekzahidrat [CoCl₂·6H₂O]' ın Etkilerinin Elektroforetik ve Histopatolojik Yöntemlerle İncelenmesi" adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek ile kabul edilmiştir.

...../...../.....

	Adı Soyadı	İmza
Başkan	:
Üye	:
Üye	:

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun/..../2009. gün ve/..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Abdullah DOĞAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Çalışmada; Kars Çayı'nda yaşayan *Capoeta Capoeta Capoeta* (Guldenstaedt 1772) üzerine Kobalt (II) Klorür Hekzahidrat [$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]’ ın etkileri elektroforetik ve histopatolojik yöntemlerle incelenmiştir.

Tez konumun seçiminde, tezimin hazırlanmasında ve sonuçlandırılmasında yol gösterici olan, yoğun çalışmalarından bana zaman ayırarak engin tecrübe ve birikimlerinden yararlanma fırsatı veren, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyduğum değerli bilim insanı ve yönetici danışman hocam Sayın Prof. Dr. Arif BAYSAL’ a ve laboratuvar çalışmalarımın yürütülmesinde ve sonuçlandırılmasında yakın ilgisini, destek ve katkılarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Muhittin YILMAZ’ a da teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Ayrıca çalışmamı maddi yönden destekleyen Kafkas Üniversitesi Araştırma Fonu (2006 – FEF – 09 numaralı proje)’na teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÇİZELGELER DİZİNİ	iii
RESİMLER DİZİNİ	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1 Ağır Metaller	3
2.2. Kobalt	3
2.3. <i>Capoeta capoeta capoeta</i> (Guldenstaedt 1772)'nın Sistematikteki Yeri	5
2.3.1 Familya ve cins özellikleri	5
2.3.2. Alttür <i>Capoeta capoeta capoeta</i> (Guldenstaedt 1772)	7
2.4. Çalışma Alanı Hakkında Genel Bilgi	8
3. MATERYAL VE METOD	9
3.1. Deney Düzenegi	9
3.2. Histopatolojik çalışmalar	9
3.3. Balıklarda Kan Alma Yöntemi	9
3.3.1. Kuyruktan kan alınması	10
3.4. Total Protein Tayini	10
3.5. Elektroforetik Çalışmalar	11
3.5.1. % 30'luk akrilamid çözeltisi	11

3.5.2. Stoklama jel tamponu (0.5 M Tris-HCl , pH 6.8)	12
3.5.3. Ayırma jel tamponu (3 M Tris-HCl, pH 8.8)	12
3.5.4. Yürütme tamponu (0.025 M Tris, 0.192 M Glisin , pH: 8.3)	12
3.5.5. Numune tamponu (0.0625 M Tris- HCl, pH: 6.8)	12
3.5.6. Jelin boyanması işlemi	13
3.5.7. Jelden boya çıkarma işlemi	13
3.5.8. Diğer kimyasallar ve özellikleri	14
3.5.9. Kesikli tampon sistemli jelin hazırlanması	14
3.5.9.1. Ayırma jelin hazırlanması	15
3.5.9.2. Stoklama jelin hazırlanması	15
3.5.10. Ayırma jelin plağa dökülmesi işlemi	16
3.5.11. Stoklama jelin plağa dökülmesi işlemi	17
3.5.12. Serum numunelerinin sulandırılması ve jele yükleme işlemi	18
4.BULGULAR	20
5.TARTIŞMA ve SONUÇ	24
6. KAYNAKLAR	27
7. ÖZGEÇMİŞ	32

ÖZET

Bu çalışmada, *Capoeta capoeta capoeta* (Guldenstaedt 1772) üzerine Kobalt (II) klorür [$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]’ün etkileri elektroforetik ve histopatolojik yöntemlerle araştırıldı. Kars Çayı’ndan yakalanan balıklar 500 litrelik tanklara konularak 15 gün süreyle ortama adaptasyonları sağlandı. Daha sonra 3 gruba ayrılarak I. gruptaki balıklar normal su ortamında, II. ve III. gruptaki balıklar ise sırasıyla 1 ve 2 mg/L CoCl_2 içeren su ortamlarında 10 gün süreyle bekletildi. Bu süre sonunda elektroforetik ve histopatolojik çalışmalar için balıklardan kan ve doku örnekleri alındı. Elde edilen serum örnekleri Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroföresi (SDS-PAGE)’nde yürütüldü. Doku örnekleri ise %10’luk formaldehit solüsyonunda tespit edilerek rutin histolojik yöntemlerle parafin bloklar hazırlandı ve 2-4 μ kalınlığında kesitler alındı ve elde edilen kesitlerin tamamı hematoksilin ve eosin boyama metoduna göre boyanarak ışık mikroskobunda incelendi.

SDS-PAGE’den elde edilen elektroforegramda kontrol grubuna göre deney gruplarındaki birçok protein bandında incelmeler olduğu ve bu incelmelerin 1 mg/L CoCl_2 uygulanan grupta daha fazla olduğu, bununla birlikte 1 mg/L’lik grupta 32,4 kD, 2 mg/L’lik grupta ise 33,3 kD, 30,6 kD ve 28,2 kD’luk yeni proteinlerin sentezlendiği saptanmıştır. Histopatolojik incelemelerde ise; deney gruplarındaki balıkların karaciğer ve bağırsak dokularında doz artışıyla orantılı olarak artan derecelerde dejenerasyonlar gözlemlenmiştir.

Gerek serum protein ekspresyonlarındaki gerekse de karaciğer ve bağırsak dokusundaki değişikliklere göre, Kobalt tüm canlılar için tehlikeli olabilir.

Anahtar Kelimeler: Kobalt klorür, *Capoeta capoeta capoeta*, serum protein, SDS-PAGE, histopatoloji.

ABSTRACT

In this study, the effects of Cobalt chloride [$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$] on *Capoeta capoeta capoeta* species (Guldenstaedt 1772) were searched by electrophoretic and histopathological methods. The fish from Kars River were put into 500 liters tanks and they made to adapt into the medium for 15 days. Later, they were divided into 3 groups. The fish in the 1st group were held in normal water, 2nd and 3rd groups were held in the water containing 1 mg/L and 2 mg/L CoCl_2 respectively for 10 days. At the end of this period blood and tissue samples were taken from the fish for electrophoresis and histopathological examinations. Serum samples obtained were carried out in Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). Tissue samples were fixed in %10 formaldehyde solution and paraffin blocks were prepared by routine histological methods and section 2-4 μ thickness were performed and the sections obtained were dyed hematoxylin and eosin dyeing method and examined under light microscope.

It was determined that in the SDS-PAGE obtained through electrophoregram there were thinning in various protein types of experimental groups in comparison with control group and these thinning were more in the group applied 1 mg/L CoCl_2 , however, it was determined that in group 1 mg/L was took place 32,4 kD new protein band, and in group 2 mg/L 33,3 kD, 30,6 kD and 28,2 kD new protein bands. In histopathological examination, a increasing level of degeneration was observed in the tissues of the livers and intestines in experimental fish groups in proportion with the increasing of dose.

According to changing both in the serum protein expressions and in the tissues, Cobalt can be dangerous to all lives.

Key Words: Cobalt chloride, *Capoeta capoeta capoeta*, serum protein, SDS-PAGE, histopathology.

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 3.4.1: Total protein tayini	11
Çizelge 3.5.9.1: Değişik Konsantrasyonlarda Ayırma Jeli Hazırlama Prosedürü	15
Çizelge 3.5.9.2: Değişik Konsantrasyonlarda Stoklama Jeli Hazırlama Prosedürü	15

RESİMLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Resim 2.3.2: Siraz balığı (<i>Capoeta capoeta capoeta</i>)	7
Resim 4.1: Kobalt klorür'e maruz bırakılan Siraz balığı'nın SDS-PAGE yöntemiyle elde edilen serum proteinlerinin elektroforegramı	21
Resim 4.2: Kobalt klorür'e maruz bırakılan Siraz balığı'ndan elde edilen karaciğer ve bağırsak dokularının histopatolojik görüntüleri	22

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**Simgeler**

kg	Kilogram
gr	Gram
mg	Miligram
µg	Mikrogram
L	Litre
ml	Mililitre
dl	Desilitre
µl	Mikrolitre
m	Metre
cm	Santimetre
mm	Milimetre
µ	Mikron
rpm	devir / dakika
°	Derece
sn	Saniye
dk	Dakika
µm	Mikromol
M	Molar
ppm	Milyonda bir kısım
%	Yüzde
kD	Kilodalton
V	Voltaj
mA	Amper
Cu	Bakır
Fe	Demir
Zn	Çinko

Pb	Kurşun
Hg	Cıva
Co	Kobalt
Mn	Mangan
Cr	Krom
Se	Selenyum
Ni	Nikel
Cd	Kadmiyum
Ag	Gümüş
Mo	Molibden
NaCl	Sodyum klorür
HCl	Hidroklorik Asit

1. GİRİŞ

Çevre, doğa ve insan tarafından biçimlenen öğeler ve koşullar bütünüdür. İnsan ve çevre birbirini tamamlayan, karşılıklı etkileşim içinde olan kavramlardır. Fakat son zamanlarda insan-doğa ilişkilerinin olumsuz yönden çeşitli boyutlara ulaştığı görülmektedir. Çünkü insanoğlu varoluşundan itibaren kendi yaşamsal ve kültürel faaliyetleri için doğal çevresini kirletmiş, değiştirmiş ve doğadaki dengeleri bozmuştur. Hayatın temel öğeleri olan hava, su ve toprakta oluşan kirlilik insan hayatını ve geleceğini olumsuz yönde etkilemektedir. Özellikle doğal su kaynaklarında meydana gelen kirlilik, su kaynaklarının sürekliliğini etkileyecek boyutlara ulaşmıştır. Böylece suyun fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri olumsuz yönde değişmiştir (1).

Doğal dengeyi bozan kirletici unsurlar; organik maddeler, endüstriyel atıklar, petrol türevleri, yapay tarımsal gübreler, deterjanlar, radyoaktif maddeler, pestisitler, inorganik tuzlar, yapay organik kimyasal maddeler ve atık ısı şeklinde gruplandırılabilirler. Ağır metaller bu sınıflandırmaya göre endüstriyel atıklar ve bazı pestisitler içerisinde yer almaktadır (2).

Teknolojinin hızlı gelişimine paralel olarak sanayi ve kentsel atıkların bulunduğu kanalizasyon suları da, boşaltıldığı nehir ve gölleri kirletmekte ve sucul ortamda yaşayan canlı organizmaları da tehdit etmektedir (3). Metaller ve diğer artıklardan oluşan kirleticiler çok çeşitli kaynaklardan ortaya çıkabilmekte olup, yaygın kirlenme nedeni oluşturmaları, çevre koşullarına dayanıklı olmaları, daima biyolojik sistemlere yönelik etki göstermeleri ve kolaylıkla besin zincirine girerek canlılarda artan yoğunluklarda birikebilmeleri nedeniyle diğer kimyasal kirleticiler arasında ayrı bir önem taşımaktadırlar. Çevre ve besin kirlenmesine yol açan metaller arasında arsenik, cıva, kadmiyum, kurşun ve çinko gibi metaller kirletici özelliklerine göre ilk sıralarda yer almaktadırlar (4). Bunlardan bir veya birkaç tanesinin eksikliği yada fazlalığı hücrenin fizyolojik işlevlerini değiştirmektedir. Özellikle fazla miktarda alınan cıva, kurşun ve krom gibi ağır metaller canlı organizmanın organ ve dokularında birikerek toksik etkilere neden olmaktadır (5).

Normal koşullarda ağır metallerin sudaki düzeyi dūřüktür. Canlılarda enzimatik aktivite için belirli konsantrasyonlarda ağır metallere gereksinim vardır. Canlı organizmadaki fizyolojik sınırlar aşıldığı zaman, özellikle gümüş, cıva, bakır, kadmiyum ve kurşun gibi ağır metaller toksik etki yapmakta ve enzimleri inhibe etmektedirler. Ağır metaller, gerekli olsun yada olmasın canlı organizmalar için potansiyel birer toksik ajandır (6).

Bu çalışma, Kars Çayı'ndan yakalanan *Capoeta capoeta capoeta* (Guldenstaedt 1772) türü balıkların karaciğer ve bağırsak dokuları üzerine Kobalt(II) klorür heksahidrat [$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]’un etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Ağır Metaller

Ağır metal; organizmanın sağlıklı büyümesi ve gelişmesi için gerekli olan ve miktarı organizmanın ağırlığının %0,01'inden az olan elemente denir (7). Ayrıca iz elementler veya eser elementler olarak ta adlandırılabilirler. Cu, Fe, Zn, Pb, Hg, Co, Mn, Cr, Se, Ni, Cd gibi elementler ağır metaller olarak adlandırılmaktadır (8).

Metallerin büyük bölümü canlılarda birikim yapmaktadır. Birikim sonucu canlıların bünyesinde yoğunlaşan bu elementler etkili dozlara ulaştıklarında ciddi hastalıklara hatta ölümlere sebep olabilirler (9,10). Cu, Cr, Fe, Mn, Mo, Co, Zn ve Ni gibi elementler esansiyel olup yüksek dozlarda alındıklarında toksik etkilerini göstermektedirler. Bununla birlikte Cd, Hg ve Pb gibi ağır metaller canlılar için esansiyel olmayıp eser miktarları ile toksik etki gösterebilir (11).

2.2. Kobalt

Kobalt doğada yaygın olarak kayalarda, topraklarda, sularda ve sebzelerde bulunmaktadır. Genellikle nikkelle birlikte bulunur. Kobalt, iki formda bulunur (Co^{+2} ve Co^{+3}) (12, 13). Kobalt çoğunlukla, Ni, Ag, Pb, Cu ve Fe elementleriyle birlikte bulunmaktadır(14). Kobalt; araçlar, süper maden alaşımları, yüzey tabakaları, yüksek hız çelikleri, çimento karpitleri, elmas işleme ve seramik endüstrisinde önemli kullanım alanlarına sahiptir (15).

Kobalt, vitamin B₁₂ kompleksinin gerekli bir bileşeni olduğu gibi insanlar ve diğer memeliler için eser miktarda gereklidir (16). Kobalt içeren önemli besin kaynakları, balık (0.01 mg/kg), fındık (0.09 mg/kg), yeşil yaprakla kaplı sebzeler (Brokoli ve ıspanak gibi: 0.009 mg/kg), ve taze tahıllar (yulaf gibi 0.01 mg/kg)'dır. Besin yoluyla alınan kobalt'ın çoğu inorganiktir. İnsanlar tarafından alınan toplam kobalt coğrafya, jeoloji ve beslenme tipine bağlı olarak değişmektedir. Ortalama günlük kobalt alınımı miktarı 0.012 mg'dır (17).

Kobalt içeren sebzeler, geniş getiren hayvanlar için önemlidir (Koyun ve büyükbaş hayvanlar). İnsanlarda kobalt eksikliği ve vitamin B₁₂ eksikliği sonucu merkezi sinir

sistemi ve kansızlık problemleri ortaya çıkmaktadır. Yetişkinler tarafından günlük B₁₂ vitamini gibi 0.1 µm kadar kobalta ihtiyaç duyulur ve günlük 10/1800 µm oranında kobalt alınımı insan sağlığı için bir sorun teşkil etmemektedir (18,19). Kobalt, gerekli bir besin olmasına rağmen, ağız yoluyla yüksek dozda alınması olumsuz sonuçlar doğurabilir. Kobaltın yüksek dozlarda yada yüksek düzeyleri insanlar, karada ve suda yaşayan hayvanlar ile bitkiler için toksiktir (12). En yüksek toksik etkileri alyuvar sayılarında artışa (Polisitemi), kardiyomiyopatiye ve erkek üreme sistemi üzerinedir(20, 21). Yüksek düzeylerde kobalt maruziyeti astım, zatürre ve hırıltılı solumaya sebep olabilmektedir (18). Kobalt çoğunlukla idrarda atılır, ayrıca dışkı ile de bir miktar kobalt atılımı olur (17).

FAO (Birleşmiş Milletler yiyecek ve tarımsal organizasyonu) ve WHO (Dünya sağlık organizasyonu), erişkinlerde besinlerle günlük 2.4 µg vitaminin B₁₂ alınmasını tavsiye eder (Kobalt'ın günlük 0.1 µg'na denk) (22).

2.3. *Capoeta capoeta capoeta* (Guldenstaedt 1772)'nin Sistematikteki Yeri

Regnum (Alem)	: Animalia
Subregnum (Alt alem)	: Metazoa
Phylum (Şube)	: Chordata
Subphylum (Alt şube)	: Vertebrata
Superclass (Üst sınıf)	: Pisces
Class (Sınıf)	: Osteichthyes
Subclass (Alt sınıf)	: Actinopterygii
Superordo (Üst takım)	: Teleostei
Order (Takım)	: Cypriniformes
Family (Aile)	: Cyprinidae
Genus (Cins)	: <i>Capoeta</i>
Species (Tür)	: <i>Capoeta capoeta</i>
<i>Subspecies</i> (Alttür)	: <i>Capoeta capoeta capoeta</i> (23).

2.3.1 Familya ve cins özellikleri

Ülkemizde yaşayan kemikli balıkların, özellikle de tatlı su balıklarının büyük bir kısmını oluşturan bu familya, Kura-Aras Havzasında da oldukça yaygındır. Bu balıklarda baş çıplak, vücut ise sikloit tip pullarla örtülüdür. Ağızda maksiller (maxiller) diş bulunmaz. Bazı türlerde ağız protraktil karakterde (körüklü) olup, tıpkı bir körüklü hortum şeklinde ileriye doğru uzayıp kısalabilir. Yağ yüzgeci (adipöz doku) bulunmaz. Bu familyanın en karakteristik özelliği olarak farinks dişlerinin varlığı gösterilebilir. Bu dişler genellikle operkulumun altında ve 4. solungaç yaylarının gerisindeki faringen kemikler üzerinde olup sıra, sayı ve şekilleri türlere göre büyük farklılıklar gösterir. Bu nedenle, cinslerin ve türlerin ayırımında önemli diagnostik özellikler olarak dikkate alınırlar. Sırtta daima tek dorsal yüzgeç vardır. Ventral yüzgeçler ise, bütün cins ve türlerde abdominal tiptedir. Hava keseleri mevcut olup, daima bir boğumla iki loba ayrılmıştır. Ayrıca pneumatofor adı verilen

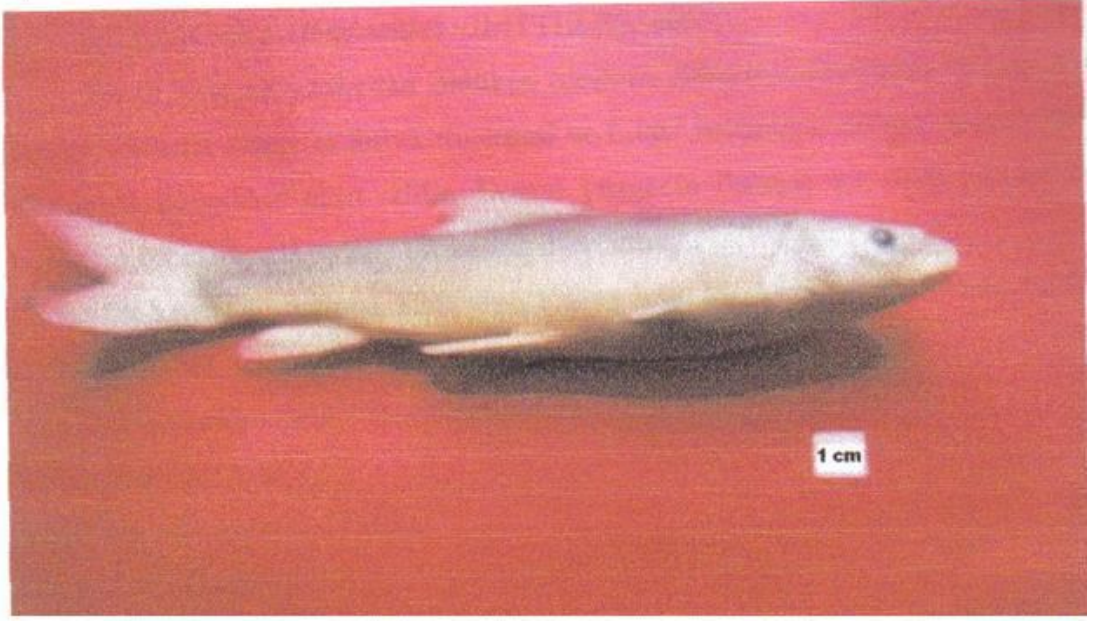
bir kanal sayesinde özofagus ile devamlı irtibat halindedir. Omur şeridinin ilk dört omuru birbiriyle az çok kaynaşarak Weber kemikleri denilen özel bir formasyon meydana getirmişlerdir. Mide civarında pilorik çekum denilen kör bağırsaklar bulunmaz. Genellikle bıyiksız iseler de bazen bir veya iki çift bıyık taşıyan temsilcilerine rastlanmaktadır. Ağız konumu itibariyle terminal, yukarıya yönelik veya alt durumlu olabilir.

Çoğunlukla sürüler halinde yaşarlar. Üreme zamanı ilkbahar ve yaz aylarıdır. Bu zamanda özellikle erkeklerin daha parlak ve süslü bir görünüm kazandığı, özellikle baş ve vücutları üzerinde küçük üreme tüberküllerinin meydana geldiği dikkati çekmektedir.

Ekonomik önemi olan bu familyanın bazı temsilcileri çabuk büyümeleri, yapay dölleme yoluyla yetiştirilmelerinin nispeten kolay olması gibi nedenlerle doğal yaşam alanlarının dışındaki bir çok ülkelere insanlar tarafından taşınmışlardır.

Esas itibariyle, Eski Dünya Kıtaları adını verdiğimiz Asya, Avrupa ve Afrika' da yayılış göstermektedirler. Bununla beraber, Amerika'nın Kuzeye yakın bölgelerinde de bulunmaktadır. Daha da genelleştirecek olursak, Madagaskar, Avustralya, Yeni Zelanda, Güney Amerika, Kuzey Kanada ve Alaska, Grönland ve İzlanda hariç olmak üzere bütün dünyaya dağılmışlardır. Madagaskar ve Amazon civarındaki mevcudiyetleri insanlar tarafından çeşitli maksatlar için taşınmalarıyla mümkün olmuştur. Bu familya dünya yüzünde 15000'e yakın tür ile temsil edilirse de, Türkiye'de 30 cins ve 70 türü yaşamaktadır (23,24).

2.3.2. Alttür *Capoeta capoeta capoeta* (Guldenstaedt 1772)



Resim 2.3.2: Siraz balığı (*Capoeta capoeta capoeta*)

Vücut yuvarlak olup, kısmen iri pullarla örtülmüştür. Baş, boyun, maksimal vücut yüksekliğinden biraz daha büyük veya ona eşit olabilir ve kuyruksuz vücut boyunda 4,3-4,8 defa bulunur. Üzerleri boynuzsu bir madde ile çevrelenmiş ve iyi gelişmiş dudaklar vardır. Ağız köşelerinde bir çift kısa bıyık yer alır. Dorsal'in serbest kenarı hafifçe içeriye doğru kavisli ve sonuncu basit ışının kaideden itibaren 2/3'ü testere şeklinde dişlenmiştir. Aynı ışının serbest ucu ise, tırtıksız, ince ve esnektir.

Renk sırtta koyu esmer, karın bölgesinde kirli sarıdır. Henüz erginlik çağına ulaşmamış genç fertlerde vücut üzerinde siyahımsı renkli küçük benekler görülürse de erginlerde bu benekler tamamen kaybolur ve bütün vücut homojen bir görünüş kazanır. Uzunluğu en fazla 70 cm kadardır.

Esas yayılış alanı Aras ve Kura nehir sistemleri olan bu ırk memleketimizde sadece Kuzeydoğu Anadolu bölgesinde yaşamakta olup, söz konusu nehirlerin sınırlarımız içerisinde kalan kaynak ve kollarında bilinmektedir. Eti lezzetli olup, insan gıdası olarak kullanılır. Bu nedenle memleketimiz için ekonomik önemi vardır (24).

2.4. Çalışma Alanı Hakkında Genel Bilgi

Kars Çayı farklı isimlerle anılan yan kollardan oluşur. Bunlar, Sarıkamış Çayı, Kekeç Çayı, Katranlı Çayı, Bayburt Suyu, Susuz Çayı, Çıldır Gölayağı, Karahan Çayı ve Tazekent Suyudur.

Uzunluğu 93 kilometre olan Kars Çayı'nın en uzun kolu Sarıkamış Çayı'dır. Soğanlı Dağları'nın Aşit Tepe (2350 m) eteklerinden doğan Sarıkamış Çayı, Sarıkamış İlçesi'ni geçtikten sonra Kars Çayı adını alır. Kars Çayı'nın su potansiyeli açısından en önemli kolu Kekeç Çayı'dır. Katranlı Çayı ve Bayburt Suyu ile birleştikten sonra Selim İlçesi Killik Düzü mevkiinde Kars Çayı'na karışır. Bu noktadan itibaren doğu yönünde akışını sürdüren Kars Çayı Kars İli'nin içinden geçerek Kuzeyden gelen Susuz Çayı ve Çıldır Gölü ayağını da alarak Arpaçay Baraj Gölü'ne dökülür (25).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Deney Düzenegi

Bu çalışmada boyutları aynı olan ve ağırlıkları 200-250 g arasında değişen 18 tane *Capoeta capoeta capoeta* kullanıldı. Bu balıklar Kars Çayı'ndan yakalanarak laboratuvar ortamında 500'er L'lik tanklara alındı. 15 gün süreyle ortama adaptasyonları sağlandıktan sonra her grupta 6 balık bulunan 3 ayrı grup oluşturuldu ve I. gruptaki balıklar normal su ortamında, II. ve III. gruptaki balıklar ise sırasıyla 1 ve 2 mg/L CoCl₂ içeren su ortamlarında 10 gün süreyle bekletildi. Özellikle seçilen balıkların sağlık durumlarının iyi olmasına dikkat edildi. Çalışma süresi sonunda elektroforetik ve histopatolojik çalışmalar için balıklardan kan ve doku örnekleri alındı. Alınan kan numuneleri +4 °C ve 3000 rpm' de 10 dk santrifüj edilerek serumun ayrılması sağlandı. Elde edilen serumlar analizler yapıncaya kadar -20 °C' de saklandı. Numunelerin protein konsantrasyonları biüret yöntemi ile ölçüldü (26). Doku örnekleri ise histopatolojik inceleme için %10'luk formalin solüsyonuna alınarak tespit edildi.

3.2. Histopatolojik çalışmalar

Formalin solüsyonunda 48 saat tespit edilen karaciğer ve bağırsak doku örneklerinden 2-4 µ kalınlığında kesitler alındı. Elde edilen kesitlerin tamamı Hematoksilen – eosin boyama yöntemi ile boyanarak ışık mikroskobunda (Olympus BX51, JAPAN) incelendi.

3.3. Balıklarda Kan Alma Yöntemi

Balıkların kalplerinden ve kuyruklarından yeterli miktarda kan alabilmek için aşağıda belirtilen işlemlerden yararlanır.

Canlı: Kan alınacak numune canlı iken başı yukarıda ve kuyruğu aşağıda olacak şekilde tutulur ve bir vuruşta kuyruğu kesilerek dorsal aort damarından kan alımı gerçekleştirilir.

3.3.1. Kuyruktan kan alınması

Balıklar, başlarının hemen arkasından kuyruk kısmı aşağıda kalacak şekilde statife bağlı bir kıskaçla tespit edilirler. Pedünkül hemoskülatör ile kan damarlarını kapatamayacak şekilde sıkıştırılıp hareketsiz hale getirildikten sonra keskin bir bıçak ile kuyruk tek darbeye kesilir ve dorsal aorttan akmakta olan kan normal plastik tüplere direkt alınır.

Hangi yöntemle olursa olsun, balıktan kan alma işlemi en fazla 45 saniyede tamamlanmalıdır.

3.4. Total Protein Tayini

Serum örnekleri 1:10 oranında serum fizyolojik ile sulandırıldıktan sonra Biüret metoduna göre total protein tayini yapıldı (26).

Çizelge 3.4.1. Total protein tayin prosedürü.

Çözeltiler	1-Kör tüpü	2-Standart tüpü	3-Numune tüpü
Albumin standardı (10mg/ml)	--	0.1 ml	--
Serum (Numune)	--	--	0.1 ml
%0,9 NaCl	1.4 ml	1.3ml	1.3 ml
Biüret çözeltisi	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml

Çizelge 3.4.1' de verilen sıraya göre kör, standart ve numune tüpleri hazırlandı. Bir numaralı tüp protein taşımayan “kör tüpüdür”. Tüpler hazırlanırken biüret çözeltisi en son ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Oda sıcaklığında 30 dk bekletildikten sonra kör tüpü ile spektrofotometre 540 nanometre dalga boyunda sıfır absorbansa ayarlandı. Daha sonra standart ve numunelerin absorbansları ölçüldü. Elde edilen

absorbanslardan aşağıda belirtilen formüllere göre total protein miktarı hesaplandı.

Numunenin Protein Konsantrasyonlarının Hesabı:

$$\text{Numune Protein Konsantrasyonu (mg/ml): } \frac{\text{Numunenin Absorbansı}}{\text{Standardın Absorbansı}} \times 10$$

3.5. Elektroforetik Çalışmalar

Biüret metoduna göre total protein tayini yapılan serum numuneleri Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE), vertikal slab jel elektroforez sistemi kullanılarak Laemmli (27) ve O'Farrell (28) metotlarına göre yapılmıştır. Bu uygulama için aşağıdaki çözeltilerin hazırlanması yeterlidir.

3.5.1. % 30'luk akrilamid çözeltisi

7.5 g Akrilamid ve 200 mg Bisakrilamid hassas terazide tartılarak bir miktar distile suda eritildi. Total hacim 25 ml' ye tamamlandı. Bu çözelti oda sıcaklığında koyu renkli şişede 2-3 ay dayanıklıdır. Akrilamid çözeltisinin nörotoksik etkili olması nedeniyle çalışırken eldiven kullanıldı.

SDS-Poliakrilamid jel solüsyonu için pH ve molariteleri farklı stoklama ve ayırma jel tamponları hazırlandı.

3.5.2. Stoklama jel tamponu (0.5 M Tris-HCl , pH 6.8)

1.5 g Tris ve 100 mg SDS hassas terazide tartılarak yaklaşık 10 ml dH₂O' da eritildi. Daha sonra pH' sı 6.8 olana kadar HCl çözeltisinden (1M) ilave edildi (yaklaşık 1 M HCl' den 7ml). Total hacim dH₂O ile 25 ml' e tamamlandı ve +4°C' de muhafaza edildi.

3.5.3. Ayırma jel tamponu (3 M Tris-HCl, pH 8.8)

9.075 g Tris ve 0.2 g SDS (Sodyum dodesil sülfat) hassas terazide tartılarak 7.5 ml dH₂O' da eritildi. Daha sonra tamponun pH' sı 1 M HCl çözeltisi ile 8.8' e ayarlandı.

Total hacim dH₂O ile 25 ml' ye tamamlandı ve +4°C' de muhafaza edildi. 1 M HCl çözeltisi, 11.7 M'lık stok HCl'den 8.55 ml alındı ve total hacim dH₂O ile 100 ml' ye tamamlanmak suretiyle hazırlandı.

3.5.4. Yürütme tamponu (0.025 M Tris, 0.192 M Glisin , pH: 8.3)

3.03 g Tris, 14.4 g Glisin ve 1g SDS hassas terazide ayrı ayrı tartıldı ve ilk önce Tris ve Glisin 750 ml dH₂O' da eritildi, sonra SDS eklenerek pH 8.3' e ayarlandı. Total hacim distile suyla 1000 ml' ye tamamlanarak +4 °C'de muhafaza edildi.

3.5.5. Numune tamponu (0.0625 M Tris- HCl, pH: 6.8)

Stacking jel tamponu	1.25 ml
(0.5 M Tris- HCl, pH 6.8)	
SDS	195 mg
Gliserol (%99'luk)	1 ml
2- Merkaptoetanol	0.5 ml
Bromophenol blue	1-2 mg

Distile suyla 10 ml' ye tamamlandı ve +4°C' de muhafaza edildi.

3.5.6. Jelin boyanması işlemi

Boyama işlemi için önce Coomassie blue çözeltisi hazırlandı.

Boyama çözeltisi:

Coomassie Brilliant Blue R.250	125 mg (%0.025)
Ethanol	200 ml (%40)
Asetik Asit (CH ₃ COOH)	35 ml (%7)

Total hacim distile suyla 500 ml' e tamamlandı. Hazırlanan bu boyama solüsyonu 20-40 defa kullanılabilir. Jeller bu boya solüsyonunda 2-4 saat bekletilmek suretiyle boyanırlar. Her jel için kendi hacminin 5-10 katı hacminde boya solüsyonu kullanıldı. Boyama esnasında hafifçe çalkalama işlemi jellerin daha iyi boyanmasını sağladı. Boyama işlemi çalkalamalı benmari su banyosunda 56-60°C' de bekletilmek

suretiyle daha kısa sürede (20 dk) tamamlanabilir. Bu esnada sık sık çalkalama işlemi yapılmalıdır.

Bu yöntem her çizgide 0.1-0.5 mg proteini boyayabilir.

3.5.7. Jelden boya çıkarma işlemi

Jeli boyadan çıkarma işleminde iki metot vardır. Bunlar;

1. Metot;

Methanol	%40'lık
Asetik asit (CH ₃ COOH)	%7'lik

Bu solüsyonda jeller 1 saat süreyle bekletilerek ve ara sıra çalkalamak suretiyle boya çıkarma işlemi gerçekleştirilir. Protein bantları dışındaki jel kısımlarının daha iyi beyazlaması isteniyorsa süre daha uzun tutulmalıdır.

2. Metot;

Methanol	%5
Asetik asit (CH ₃ COOH)	%7.5

Çalışmamızda boyadan çıkarma işleminde ikinci metod kullanıldı. Bu solüsyonda jellerin boyadan çıkarma işlemi bir gecede tamamlandı. Ancak, bu süre içinde boyadan çıkarma solüsyonu 2-3 defa değiştirilerek daha iyi sonuç elde edildi.

3.5.8. Diğer kimyasallar ve özellikleri

1. TEMED (N,N,N',N' - Tetra methylethylen diamine):

Hazır preparat olarak minimum %99'luk hazır çözeltisi bulunmaktadır. Bu çözelti koyu renkli şişede +4 °C'de konsantre halde süresiz bekletilebilir.

2. %1'lik Amonyum persülfat: Poliakrilamid jel çözeltisine polimerizasyon için ilave edilen bir ajandır. Karışıma çok az ilave edilmesi nedeni ile 5ml'lik veya daha az

hacimde, özellikle deneyden hemen önce hazırlandı. Bu çözeltinin stabil olmaması nedeniyle her deneme için tazesi hazırlandı.

3.5.9. Kesikli tampon sistemli jelin hazırlanması

Kesikli jel sistemi, proteinlerin stoklandığı ve birbirinden ayrıldığı iki farklı konsantrasyonda iki ayrı jelden oluşmaktadır.

Bu jelin hazırlanması için ayırma ve stoklama çözeltileri gereklidir.

3.5.9.1. Ayırma jelin hazırlanması

Çizelge 3.5.9.1: Değişik Konsantrasyonlarda Ayırma Jeli Hazırlama Prosedürü.

	Ayırma jelin son konsantrasyonları (%)							
Stok çözeltisi (ml)	20	17.5	15	12.5	10	7.5	5	
Poliakrilamid çözeltisi (%30)	20	17.5	15	12.5	10	7.5	5	
Ayırma jel tamponu	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	
%1 Amonyum persülfat	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	
TEMED	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	
Distile Su	5.49	7.99	10.49	12.99	15.49	17.9	20.49	

Toplam hacim 30 ml olacak şekilde hazırlanır. Bu jel hazırlanırken dikkat edilmesi gereken husus; %1'lik amonyum persülfatın çözeltiye en son katılmasıdır. Çünkü, çözeltiye amonyum persülfat ilavesinden sonra polimerizasyon işlemi başlamakta ve kısa sürede gerçekleşmektedir.

3.5.9.2. Stoklama jelin hazırlanması

Çizelge 3.5.9.2: Değişik Konsantrasyonlarda Stoklama Jeli Hazırlama Prosedürü.

	Stoklama Jelin Son Konsantrasyonları (%)			
Stok çözeltiler (ml)	6	5	4	3
% 30 Poliakrilamid	2	1.67	1.33	1
Stok Jel Tamponu	2.5	2.5	2.5	2.5
% 1 Amonyum persülfat	0.5	0.5	0.5	0.5
TEMED	0.075	0.075	0.075	0.075
Distile Su	4.925	5.265	5.595	6.425

Total hacim 10 ml olacak şekilde hazırlanır. Bu çözeltiyi de hazırlarken %1'lik amonyum persülfat'ın en son ilave edilmesine dikkat edilmelidir.

3.5.10. Ayırma jelin plağa dökülmesi işlemi

Plağa ilk önce ayırma jel dökülür. Proteinlerin birbirinden ayrılması %10'luk ayırma jelde yapılmıştır. %10'luk jel çözeltisi için;

%30'luk Poliakrilamid çözeltisi	10 ml
Ayırma jel tamponu	3.75 ml
%1'lik Amonyum persülfat	0.75 ml
TEMED	0.01 ml
Distile Su	15.49ml

Yukarıdaki miktarlar 30 ml jel çözeltisi hazırlamak için gerekli olan miktarlardır. Ayırma jel çözeltisinin toplam hacminin 10 ml olması yeterlidir. Bunun için yukarıdaki miktarlar 2/3 oranında azaltıldı. Beher içerisine 1:2 ayırma jel tamponu konuldu ve arkasından 5.163 ml dH₂O ilave edildi. Daha sonra 0.0033 ml TEMED ilave edildi. Eğer jel kalınlığı 1 mm' den küçük ise ortamdaki oksijen uzaklaştırılmalıdır. Bunun için çözeltiyi bir kaç dakika vakum etmek yeterlidir. Aksi takdirde ortamdaki oksijen polimerizasyonda gecikmeye neden olacaktır. Polimerizan ajan olarak % 1'lik amonyum persülfat kullanılmıştır. Amonyum persülfat ilave edildikten sonra çözelti hafifçe karıştırıldı. Hazırlanan ayırma çözelti 10 ml'lik enjektöre alındı ve vakit kaybetmeksizin düzenekteki boşluğa doldurulma işlemine geçildi. Ayırma jel çözeltisi köpürtülmeksizin düzenekteki işaretli yere kadar dolduruldu. Jelin üst yüzeyinin keskin ve düzgün bir çizgi haline geldikten hemen sonra hava ile temasını kesmek için jel yüzeyinde ince bir tabaka oluşturacak kadar dH₂O ilave edildi. %1'lik Amonyum persülfat, 50 mg alınarak 5 ml dH₂O' da çözmek suretiyle hazırlandı. Polimerize olan ayırma jelin üzeri naylon bir poşetle hava almayacak şekilde kapatıldı ve +4 °C' de bir gece bekletildi. Böylece

polimerize olmamış akrilamid ve bisakrilamidlerin polimerizasyonu sağlandı. Tam polimerizasyon sonrası akrilamid ve bisakrilamidin nörotoksitesisi ortadan kalkar, dolayısıyla bu aşamadan sonra jellerle direk temasta hiç bir sakınca yoktur.

3.5.11. Stoklama jelin plağa dökülmesi işlemi

Proteinlerin stoklanması %4'lük stoklama jel üzerinde yapılmıştır. %4'lük stoklama jel solüsyonu hazırlamak için, bir mikropipetle aşağıdaki çözeltilerden uygun miktarlarda alındı ve total hacim 3.5 ml'ye tamamlandı.

Buna göre;

%30'luk Akrilamid çözeltisi	0.468 ml
Stoklama jel tamponu (pH 6.8, 0.5 M)	0.833 ml
%1'lik Amonyum persülfat	0.25 ml
TEMED	0.015 ml
Distile Su	1.95 ml
Toplam Hacim:	3.5 ml

Jel yüzeyindeki distile su boşaltıldı ve iki jelin kolay kaynaşması için ayırma jel yüzeyi stoklama tamponla yıkandı. Daha sonra numune yükleme çukurlarını oluşturmak için tarak cam levhalar arasına yerleştirildi. Tarağın kenarından stoklama jel çözeltisi bir enjektörle yavaş yavaş plağa aktarıldı. Ancak jel içinde hava kabarcığı bulunmamasına dikkat edildi. Bu arada tarak yerleştirildikten sonra protein uygulanacak kanallar cam kalemle işaretlendi. Stok stoklama jel solüsyonu polimerize olduktan sonra tarak alındı ve kanal aralıkları da bir lanset yardımıyla düzeltildi. Protein yükleme çukurları yürütme tamponuyla bir kaç defa yıkanarak jel artıkları temizlendi. Sonra elektroforez tankları yürütme tamponu ile (Tris-Glisin pH 8.6) dolduruldu ve plaktaki lastik conta ve klemler çıkarıldı. Jel tanka yerleştirilerek plağın alt kısmında oluşan hava kabarcıkları enjektör yardımıyla uzaklaştırıldı. Bu işlemlerden sonra serum numunelerinin hazırlanmasına geçildi.

3.5.12. Serum numunelerinin sulandırılması ve jele yükleme işlemi

1 ve 5 numaralı jel çukuruna molekül ağırlıkları bilinen standart proteinler aplike edildi. 2 numaralı jel çukuruna kontrol grubu numunesi, 3 numaralı jel çukuruna 1 mg/L dozda CoCl_2 verilen *Capoeta capoeta capoeta* numunesi, 4 numaralı jel çukuruna, 2 mg/L dozda CoCl_2 verilen *Capoeta capoeta capoeta* serum numuneleri uygulandı. Standart olarak molekül ağırlıkları farklı olan 4 protein kullanıldı. Bunlar; karbonik anhidraz (29 kD), tripsinojen (18 kD), yumurta albumini (45 kD), sığır albumini (66 kD) 'dir. Bu standart proteinlerin her birinden 1'er mg alındı ve 1 ml dH_2O ' da 1 mg/ml'lik standart hazırlandı. 1mg/ml standarttan 200 μl alınıp 200 μl dH_2O ile sulandırıldı. Böylece son protein konsantrasyon 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ oldu. Daha sonra sample tamponla 1/2 oranında sulandırıldı. Jele bu standart proteinlerin her birinden 5 μg uygulandı.

Daha sonra total protein konsantrasyonu bilinen serum numuneleri total proteinlerinin gr/dl cinsinden miktarlarına göre sulandırılması işlemine geçildi. *Capoeta capoeta capoeta*'dan alınan serum numuneleri sulandırılarak son protein konsantrasyonları 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 'ye ayarlandı.

En sonunda her bir numune tüpünden 200 μl serum alındı ve her birinin üzerine 200 μl sample tampon ilave edilerek son protein konsantrasyonu 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ' ye ayarlanmış oldu.

Hazırlanan serum numuneleri bir beher içerisine bir miktar su konularak 100 °C'de 3 dk süreyle kaynatıldı. Numune tamponundaki 2-merkптоethanol proteinlerdeki disülfid bağlarını açar ve denatüre olmalarını sağlar. Böylece serum proteinleri tek polipeptidler haline gelmiş olur. Her jel çukuruna 20' şer μl numune uygulandı. Böylece 40 μg protein jele yüklenmiş oldu. Numuneler plaktaki yerlerine uygulandıktan sonra proteinler 200 V ve 30 mA' de yürütüldü.

Elektroforez de proteinleri yürütme işlemine yaklaşık 2,5 saat devam edildi. Sürenin sonunda jel tanktan alınarak boyama solüsyonda boyama işlemine geçildi. Bu arada plak üzerindeki stoklama jeli kesilerek atıldı. Jeli içinde 250 ml boyama solüsyonu

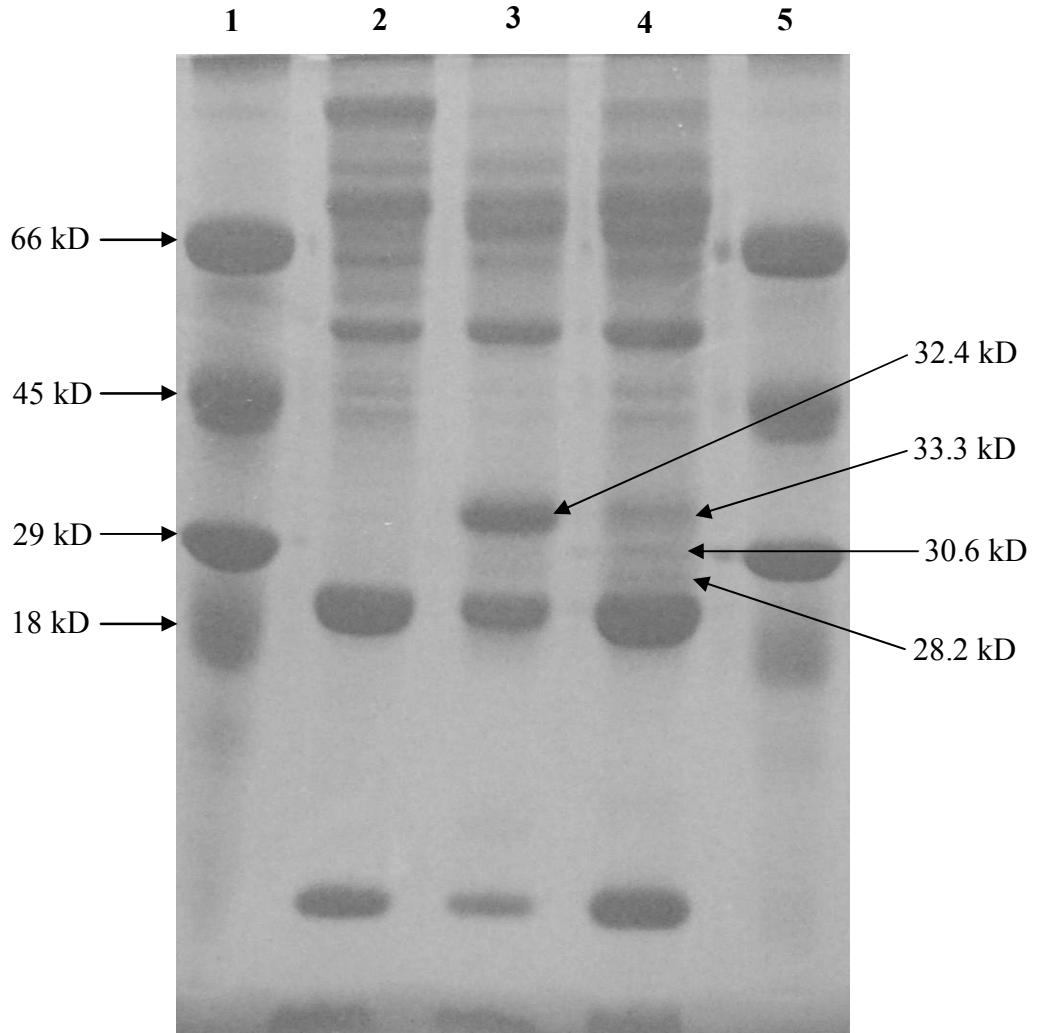
olan bir kaba bırakıldı. Jel, 56-60 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 20-30 dk inkübe edildi. Bu esnada kap içindeki boya çözeltisi hafifçe çalkalanarak jelin daha çabuk boyanması sağlandı.

Bu işlem tamamlandıktan sonra her jel, boyadan çıkarma işlemi için %5 metanol ve %7,5 asetik asit bulunan bir kaba alınarak protein bantları dışındaki jel kısımlarının şeffaflaşması sağlandı. Bu işlem, jellerin su banyosunda 55-60°C' de 60-70 dk bekletilmek suretiyle yapıldı. Bu esnada jeller hafifçe çalkalandı. Ancak, boyadan çıkarma işlemi esnasında boyadan çıkarma çözeltisi bir kaç defa yenilendi. Bu işlemlerden sonra jeller %7'lik asetik asit içinde muhafaza edildi. Sonra jellerin fotoğrafları çekildi. Proteinlerin moleküler ağırlığı Weber ve ark. (1972)'lerinin metoduna göre hesaplandı (29).

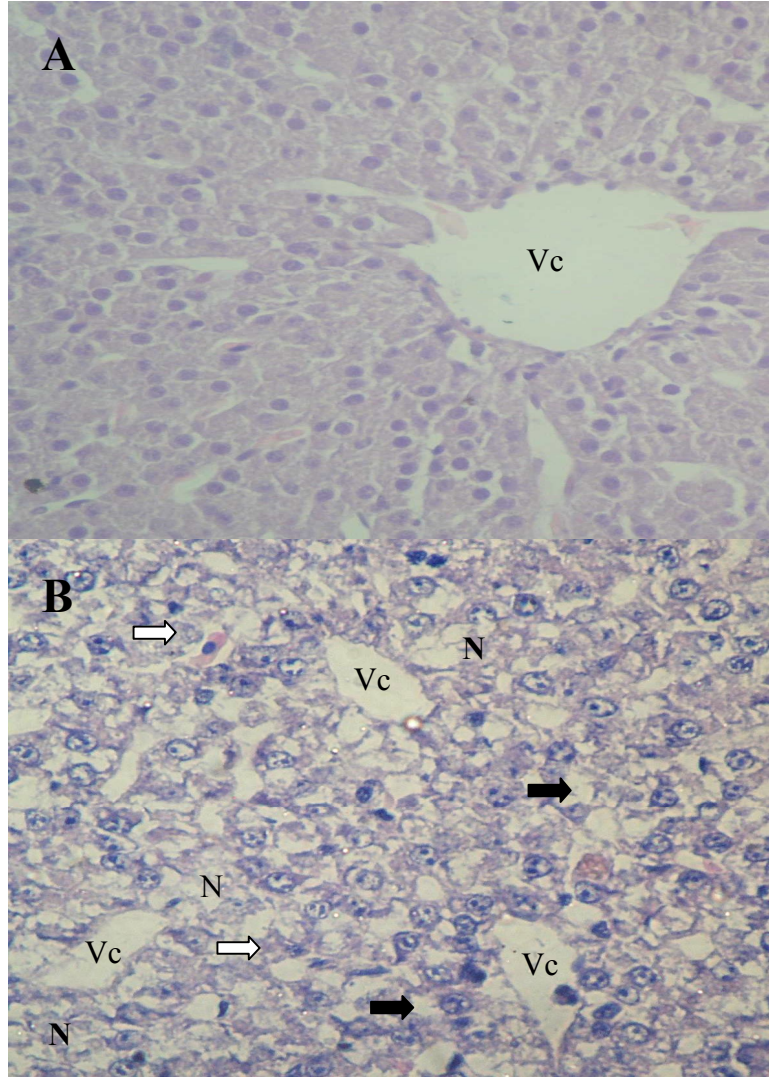
4. BULGULAR

Serum numunelerinin SDS-PAGE' den elde edilen elektroforegramında ise 1 mg/L'lik grupta daha fazla olmak üzere özellikle yüksek molekül ağırlıklı albumin bantları ve düşük molekül ağırlıklı globulin bantlarında her iki deney grubunda da incelmeler olduğu, bununla beraber 1 mg/L'lik deney grubunda 32,4 kD, 2 mg/L'lik deney grubunda ise 33,3 kD, 30,6 kD ve 28,2 kD'luk yeni proteinlerin sentezlendiği saptanmıştır.

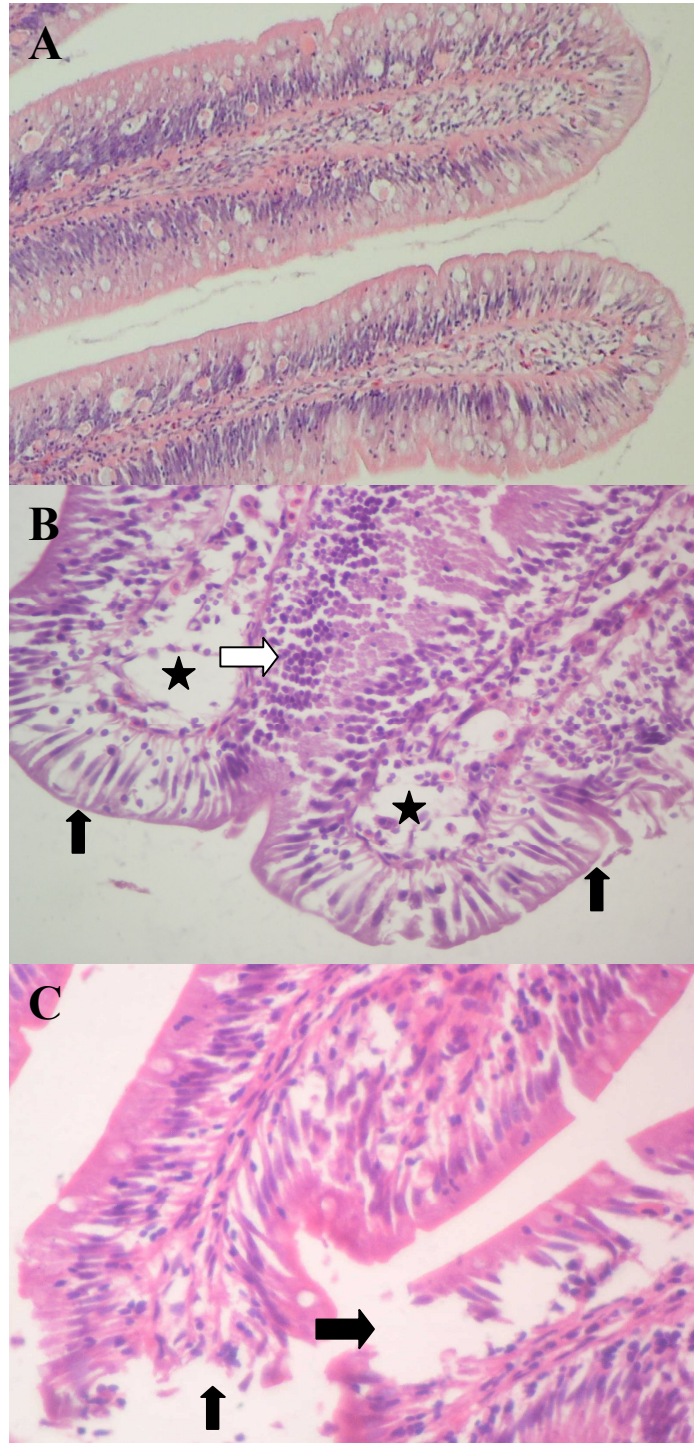
Deneklerden elde edilen karaciğer ve bağırsak preparatlarının ışık mikroskopik incelemelerinde en önemli histopatolojik değişikliklere incelediğimiz karaciğer ve bağırsak dokularında rastlandı. Kontrol grubu örnekleri ise normal görünümdeydi. Deney grubu karaciğer dokusunda kontrol grubuna kıyasla doz artışıyla orantılı olarak artan derecelerde yaygın nekroz alanları, hidropik ve vakuolar dejenerasyonlar ile dissosiasyon gözlemlendi (Resim 4.2). Bağırsak dokularında ise hemoraji, deskuomasyon ve villus epitelinde nekroz odakları tespit edildi (Resim 4.3).



Resim 4.1:Kobalt klorür'e maruz bırakılan *Capoeta capoeta capoeta*'nın SDS-PAGE yöntemiyle elde edilen serum proteinlerinin elektroforegramı. 1-5 standart proteinler, 2. kontrol grubu, 3. 1 mg/L uygulanan balıkların serum proteinleri, 4. 2 mg/L uygulanan balıkların serum proteinleri.



Resim 4.2. A- Karaciğer dokusu kontrol grubu. B- CoCl_2 uygulanan balıklardan elde edilen karaciğer dokusunda yaygın nekroz alanları (N), hidropik (beyaz oklar) ve vakuolar (siyah oklar) ile birlikte dissosiasyon alanları (H-E 40x)



Resim 4.3. A- Bağırsak dokusu kontrol grubu. B- CoCl₂ uygulanan balıklardan elde edilen bağırsak dokusunda deskuomasyon, hemoraji (beyaz ok), villus epitelinde nekroz (siyah oklar) ve lamina propriada dejenerasyon (yıldızlar) (H-E 40x)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Araştırmamızda 1 ve 2 mg/L'lik dozlarda Kobalt klorür heksahidrat'a maruz kalan *Capoeta capoeta capoeta*'nin karaciğer ve bağırsak histopatolojik dejenerasyonlara sebep olduğu ve bu hasarın şiddetinin de doz artışına bağlı olarak arttığı, SDS-PAGE'den elde edilen elektroforegramda ise kontrol grubuna göre deney gruplarındaki birçok protein bandında incelmeler olduğu ve bu incelmelerin 1 mg/L CoCl₂ uygulanan grupta daha fazla olduğu, bununla birlikte 1 mg/L'lik grupta 32,4 kD, 2 mg/L'lik grupta ise 33,3 kD, 30,6 kD ve 28,2 kD'luk yeni proteinlerin sentezlendiği saptanmıştır.

Karaciğer, vücudun hemen hemen bütün sistemleri ile ilişkili son derece karmaşık fonksiyonları olan önemli bir metabolik merkezdir. Karbonhidrat, protein ve lipit metabolizmasında önemli görevleri bulunmaktadır. Yine karaciğer safra salgılanmasında, kandaki besin maddelerinin depolanmasında, birçok plazma proteininin yapımında, vücuda girmiş ilaçların ve zehirlerin meydana getirdiği toksik etkinin ortadan kaldırılmasında görev almaktadır (30). Proteinler ise, hücresel fonksiyonlarda ve hücre yapısında farklı işlevlere sahip olan organik bileşikler olup hücrelerde birçok aktivitenin gerçekleşebilmesi ve homeostatik dengenin sağlanabilmesi için gereklidirler. Toksik maddeler vücuda alındığında oluşan stres süresince organizma gereksinim duyduğu fazla miktardaki enerjiyi karşılamak amacıyla proteinleri hidroliz ederek amino asitlere dönüşümüne neden olabilmektedirler (31). Balıklarda kan serumu ağır metallerin etkilerinin gösterilmesi amacıyla sıkça kullanılmaktadır. Dutta ve ark. (1983). *Lepomis macrochirus* üzerine metil cıvanın serum proteinleri üzerine etkilerini araştırmış ve 24, 48, 72 saatlik maruz kalmada, kontrol grubunda 28 protein bandı gözlenirken, metil cıvaya maruz kalan balıklarda 24 saatlik uygulamada 22, 48 saatlik uygulamada 51 ve 72 saatlik uygulamada 27 serum protein bandı olduğunu bildirmiştir (32). Richmonds ve Dutta (1992) *Lepomis macrochirus*'u malathiona maruz bırakmışlar ve serum proteinleri üzerine elektroforetik etkilerini incelemişlerdir. Globulin bantlarında önemli bir artış ve albumin bantlarında önemli bir azalma olduğunu gözlemişlerdir (33). Bir başka araştırmada, *Channa punctatus*' da serum proteinleri endosülfan uygulanması ile

artmış, daha sonra pestisitlerin artan miktarı ve etkide kalma süresine bağlı olarak azalmıştır. Serum protein düzeyinde gözlenen başlangıçtaki artışın, pestisit etkisiyle su kaybının neden olduğu hemokonsantrasyonun artması sonucu olduğu, daha sonraki azalışın ise böbrek ve karaciğer dokularının zarar görmesi ve protein sentezinin azalması sonucu olduğu şeklinde yorumlanmıştır (34). Shaw ve Handy (2006) *Oreochromis niloticus*'u besin yoluyla 42 gün boyunca bakıra maruz bırakmışlar ve bu süre sonunda balıkların solungaç ve bağırsak dokularında histolojik olarak bir değişiklik saptanmadığını fakat karaciğer dokusunda hepatositlerdeki yağ içeriğinin arttığını belirtmişlerdir (35). Başka bir araştırmada ise Heikkilä ve ark. (1982) Som balığı embriyo hücrelerinde kadmiyum klorür ve çinko klorür uygulamasından sonra 84, 70, 68, 51, 46 ve 28 kD molekül ağırlıklarındaki protein bantlarında önemli derecede artış olduğunu bildirmişlerdir (36).

Yapılan literatür taramalarında kobaltın toksik etkilerinin birçok araştırmacı tarafından çalışıldığı fakat balıklarla ilgili fazla bir çalışmaya rastlanamamıştır. Christova ve ark. (2002) deri altından 60 mg/kg oranında CoCl_2 uyguladıkları kobby ve ratlarda glutatyon seviyesinin indirgendiğini lipid peroksidasyon düzeyinin arttığını bildirmişlerdir (37). Yine Shakoori ve ark. (1992) Çeşitli toksikantların serum proteinleri üzerine etkileri incelemişler ve albumin bantlarında koyulaşma, globulin bantlarında yayılma ve yeni globulin bantlarının oluştuğunu belirtmişlerdir (38). Başka bir araştırmada Koç ve ark. (2008) Kobalt klorür heksahidrat'ın fareler üzerine etkilerini araştırmışlar ve karaciğer dokusunda histopatolojik olarak dejeneratif ve nekrotik bozukluklar olduğunu yine elektroforetik olarak ta düşük doz uygulanan gruptaki hayvanların protein bantlarında incelmeler ve bazı proteinlerin sentezinin inhibe olduğunu, yüksek doz uygulanan gruptaki hayvanların protein bantlarında ise kalınlaşmalar olduğunu bildirmişlerdir (39). Yılmaz ve ark. (2008)'da Kobalt parahidroksibenzoat (CoBHB)'ın *Capoeta capoeta capoeta*'nın serum proteinleri üzerinde doz artışına bağlı olarak yüksek molekül ağırlıklı protein bantlarında kalınlaşmalar, küçük molekül ağırlıklı protein bantlarında ise incelmelere sebep olduğunu, histopatolojik olarak ise karaciğer, solungaç ve bağırsak dokularında yine doz artışıyla orantılı olarak artan derecelerde nekroz ve dejenerasyonlar oluştuğunu belirtmişlerdir (40). Yapılan araştırmada ise

histopatolojik olarak Yılmaz ve ark. (2008) (45) ile uyumlu bulgular elde edilmiş ve doz artışıyla paralellik gösteren dejenerasyonlar elde edilmiştir fakat elektroforetik olarak CoCl_2 'ün CoPHB'a göre albumin bantlarında zıt etkili olduğu globulin bantlarında ise benzer etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu farklılığın canlıların immunolojik olarak farklı toksikantlara karşı farklı etkili olabileceği, ayrıca deney gruplarında protein bantlarında meydana gelen değişikliklerin ve yeni proteinlerin sentezinin ise toksikasyon stresi ve immun sistemin uyarılmasından dolayı kaynaklandığı kanısındayız.

Çalışma sonucu elde edilen bulgulara göre, yüksek dozda Kobalt maruziyetinin toksikasyona sebep olduğu ve başta önemli bir detoksifikasyon merkezi olan karaciğer dokusu olmak üzere organizmada değişik bozukluklara sebep olduğu düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Yıldız, K. Sipahioglu, S., Yılmaz M., “Çevre Bilimi”. *Gündüz Eğitim ve Yayıncılık*, Ankara, 26-28, 104-107 (2000).
- [2] Kaya, S. Pirinçci, İ., Bilgili, A., “Çevre Bilimi ve Çevre Toksikolojisi”. *Medison Yayın Serisi*, Yayın no/36 (1998).
- [3] Sarıyüpoğlu, M., Say, H., “Elazığ Şehir Kanalizasyonunun Baraj Gölüne Döküldüğü Bölgeden Yakalanan *Barbus capito pectoralis*’te Ağır Metal Birikimlerinin Araştırılması”. *Su Ürünleri Sempozyumu*, 121-130 (1991).
- [4] Baş, A.L. Demet, Ö., “Çevresel Toksikoloji Yönünden Bazı Ağır Metaller”. *Ekoloji*, 5, 42-46 (1992).
- [5] Heath, A.G., “Water pollution and Fish Physiology”. *Virginia Polytechnic Institue and Elsenz. Dipl., Arbeit Univ. Heidelberg*, 143, s359 (1995).
- [6] Kayhan, F.E., “Su Ürünlerinde Kadmiyum Biyobirikimi ve Toksisitesi”. *Ege University Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 23(1-2), 215-220 (2006).
- [7] Förstner,G., Wittmann.T., “Metal Pollution in the Aquatic Environment, Berlin Heidelberg”, *Newyork Springer Verlag*, 3, 21, 271-318 (1981).
- [8] Özdemir, H., “Genel Anorganik ve Kimya”. *Matbaa Teknisyenleri Basımevi*, İstanbul (1981).
- [9] Şengül, F., “Çevre Kimyası” *Dokuz Eylül Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi*, İzmir (1993).
- [10] Kargı, F., “Çevre Mühendisliğinde Biyoprosesler”, *Dokuz Eylül Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi Basım Ünitesi*, 2. Baskı İzmir (1995).
- [11] Beyazıt, N., ve Peker, İ., “Atık Sularda Ağır Metal Kirliliği ve Giderim Yöntemleri” In:Atlı, V., Belenli. (Eds), *Kayseri 1. Atık Su Sempozyumu Bildirileri*, 22-24 Haziran 1998 Kayseri, 209-215 (1998).

- [12] Nagpal NK., “Water quality guidelines for cobalt. Ministry of Water, Land and Air Protection, Water Protection Section, Water, Air and Climate Change Branch, Victoria; (2004).
- [13] Palit S, Sharma A, Talukder G., “Effects of cobalt on plants”. *Bot Rev*, 60(2):149–81 (1994).
- [14] Adriano DC. “Trace elements in terrestrial environments”. 2nd. New York: *Springer*; (2001).
- [15] CDI. Cobalt facts. Guilford, UK: Cobalt Development Institute; <http://www.thecdi.com/> [accessed April 2007]. (2006).
- [16] Smith IC, Carson BL. “Trace metals in the environment. Cobalt”, vol. 6. Ann Arbor: *Ann Arbor Science Publ. Inc.*; (1981).
- [17] FSA. “Risk Assessment: Cobalt. UK: Food Standards Agency” (2003).
- [18] ATSDR. “Toxicological profile for cobalt. Agency for toxic substances and disease registry”. Atlanta, GA: U.S. *Department of Health and Human Services, Public Health Service*; (2004).
- [19] Atta-Aly MA. Effect of galia melon seed soaking in cobalt solution on plant growth, fruit yield, quality and sudden wilt disease infection; <http://www.aaaid.org/pdf/magazine/2003/Cobalt%2067-72.pdf> (2003).
- [20] Haga Y, Clyne N, Hatroi N, Hoffman-Bang C, Pehrsson SK, Ryden L., “Impaired myocardial function following chronic cobalt exposure in an isolated rat heart model”. *Trace Elem Electrolytes*;13(2):69–74.(1996)
- [21] USEPA. “Ecological soil screening levels for cobalt.” Washington, DC: US EPA; (2005).
- [22] FAO/WHO. “Human vitamin and mineral requirements. Rome: FAO and WHO”; (2001).

- [23] Kuru, M., “Omurgalı hayvanlar”. *Atatürk Üniversitesi Yayınları*, Erzurum, No:646, s735 (1987).
- [24] Geldiay, R., Balık, S., “Türkiye tatlısu balıkları IV Baskı”, *Ege Üniv. Fen Fak. Kitaplar Serisi*, No:9, İzmir, s361-s367(1988).
- [25] Karakuş, S., “Kars Çayı’ndan avlanan siraz balıklarında (*Capoeta capoeta capoeta* Guldenstaedt, 1772) bazı ağır metallerin (demir, bakır, çinko, krom, kobalt ve kadmiyum) derişim düzeylerinin incelenmesi”, Yüksek lisans tezi, *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kars, 1-33 (2004).
- [26] Robert, R., Michael, J.D., “Enzyme assays”, *Oxford University Pres*. Newyork: 225-332 (1993).
- [27] Laemmlı, U.K., “Cleavage of structural proteins during the assemble, of the head of bacteriophage”. *T4, Nature*, 227,680 (1970).
- [28] O’Farrell, P.H., “High resolution two-dimensonal electrophoresis of biological properties and significance”. *Comp. Biochem. Physiol.*, 88 M, 497-501 (1975).
- [29] Weber, K., Pringle, J., Osborn, M., “Measurment of molecular weights by electrophoresis on sds- acrylamide gel”. *Meth. Enzymol.*, 26,3 (1972).
- [30] Jungueria, C.L., Carneiro, J., Kelley, R.O.. “Basic Histology”. Çeviri:Aytekın,Y., Solakođlu, S., Ahıskalı, B., *Barış Kitabevi*, 503 (1998).
- [31] Özkan, F., Emre, I., “Malathion ve Dieldrin’in Tilapia zilli Gervais, 1848 Dokularında Total Protein Düzeyi Üzerine Etkileri”. *Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 14(2): 251-258 (2002).
- [32] Dutta, H.M. and Lall, S.B., Haghghi, A.Z., “methyl mercury induced changes in the serum proteins of Bluegills – *Lepomis macrochirus* (Teleostei)”. *Ohio J. Sci.*, 83 (3): 119-122 (1983).

- [33] Richmonds, C.R., and Dutta, H.M., “Variations produced by malathion on the serum protein fractions of Bluegill Sunfish *Lepomis macrochirus*”. **Comp. Biochem. Physiol.**, 102 (3): 403-406 (1992).
- [34] Abidi, R., “Endosulfan induced changes in the total serum proteins of *Channa punctatus*”, **Biol. Physiol. Animal.**, Univ. Sao Paula 14, 41-48 (1990).
- [35] Shaw, B.J., Handy, R.D. “Dietary copper exposure and recovery in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*”. **Aquatic Toxicology**, 76 ,111–121 (2006).
- [36] Heikkila, J.J., Schultz, G.A., Iatrou, K. and Gedamu, L., “Expression of a set of fish genes following heat or metal ion exposure”. **J. Biol. Chem.**, 257, 12000-12005 (1982).
- [37] Christova, T.Y., Duridanova, D.B. and Setchenska, M.S., “Enhanced heme oxygenase activity increases the antioxidant defense capacity of guinea pig liver upon acute cobalt chloride loading: comparison with rat liver”. **Comp. Biochem. Physiol.**, Part C 131, 177-184 (2002).
- [38] Shakoori, A.R., et al., “Toxicity of sublethal doses of Trebon (ethofenprox) on total blood serum proteins, acetylcholinesterase activity and page pattern of blood serum proteins of *Cirrhinus mrigala*”. **Pak-J-Zool.**, 24 (3): 235-241 (1992).
- [39] Koç, E., Ersan, Y., Yılmaz, M., Necefoğlu, H., Bozukluhan, Ö.F., Doğan, O., Karaman, M., Özen, H., Kobalt (II) klorid heksahidrat’ın ergin farelerin (*Mus musculus* var. *Albinos*) karaciğer histopatolojisi ile serum ve karaciğer proteinleri üzerine etkileri. **Uluslar arası Katılımlı IX. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi**, s.69. 20-23 Mayıs, Adana (2008).
- [40] Yılmaz, M., Ersan, Y., Karaman, M., Özen, H., Koç, E., Necefoğlu, H., Toxic Effects of Cobalt Parahydroxybenzoate on Tissue Histopathology and Serum Proteins in *Capoeta capoeta capoeta*. **Fresenius Environmental Bulletin**. (17):9a, 1322-1327 (2008).

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: **YASEMİN BAYRAM**

Doğum Yeri: **MERZİFON**

Doğum Tarihi: **17.03.1984**

Medeni Hali: **BEKAR**

Yabancı Dili: **İNGİLİZCE**

Eğitim Durumu(Kurum ve Yıl)

Lise : **SİNOP ANADOLU ÖĞRETMEN LİSESİ**

Lisans : **KAFKAS ÜNİVERSİTESİ FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ
BİYOLOJİ BÖLÜMÜ**

Yüksek Lisans: **KAFKAS ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİDROBİYOLOJİ ANABİLİMDALI**

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

Yayımları(SCI ve diğer):

1. Koç, E., Ersan, Y., Yılmaz, M., Karaman, M., Özen, H., **Bayram, Y.**, Bozukluhan, Ö.F., Çiftçi, Ü. (2008). Kadmiyum Sülfat'ın Fare Serum Proteinleri İle Karaciğer ve Böbrek Histopatolojisi Üzerine Etkilerin Araştırılması. 34. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Atatürk Üniversitesi, s. 69. 6-10 Ekim, Erzurum.
2. **Bayram, Y.**, Ersan, Y., Yılmaz, M., Özen, H., Karaman, M., Koç, E., Uslu, H. (2008). Kadmiyum Sülfat'ın *Leuciscus cephalus* (L. 1758) Üzerine Etkilerinin Elektroforetik ve Histopatolojik Yöntemlerle Araştırılması. 34. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Atatürk Üniversitesi, s. 92. 6-10 Ekim, Erzurum.