

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

ALÜMİNYUM ZEHİRLENMESİNİN *Capoeta capoeta capoeta*
(GULDENSTAEDT 1772) 'NİN SERUM PROTEİNLERİ VE SOLUNGAÇ
HİSTOPATOLOJİSİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Sevda GÖĞTEPE
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Muhittin YILMAZ

KARS

2010

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

ALÜMİNYUM ZEHİRLENMESİNİN *Capoeta capoeta capoeta*
(GULDENSTAEDT 1772) 'NİN SERUM PROTEİNLERİ VE SOLUNGAÇ
HİSTOPATOLOJİSİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Sevda GÖĞTEPE
YÜKSEK LİSANS TEZİ


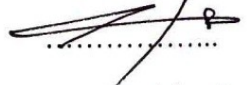
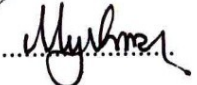
Danışman
Yrd. Doç. Dr. Muhittin YILMAZ

KARS

2010

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Sevda GÖĞTEPE' ın Yrd. Doc. Dr. Muhittin YILMAZ' ın danışmanlığında yüksek lisans tezi olarak hazırladığı “ Alüminyum Zehirlenmesinin *Capoeta capoeta capoeta*'nın serum proteinleri ve solungaç histopatolojisi Üzerine Etkileri” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oybirliği..... ile kabul edilmiştir.

23/06/2010

	Adı Soyadı	İmza
Başkan	: Prof. Dr. Arif BAYSAL.....	
Üye	: Doc. Dr. Ali ALAF.....	
Üye	: Yrd. Doc. Dr. Muhittin YILMAZ (Danışmanı).....	

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun .../.../2010. gün ve/..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

ÖNSÖZ

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

Çalışmada; Alüminyum zehirlenmesinin *Capoeta capoeta capoeta*'nın serum proteinleri ve solungaç histopatolojisi üzerindeki etkileri 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 Yrd. Doç. Dr. Muhittin YILMAZ' a ve laboratuvar çalışmalarımın yürütülmesinde ve sonuçlandırılmasında yakın ilgisini, destek ve katkılarını esirgemeyen değerli hocam ve arkadaşım olan doktora öğrencisi Duygu Tanrıku ve Evren Koç'a da teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
RESİMLER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1 Alüminyum	4
2.2. Alüminyum Metabolizması	5
2.3. Alüminyum Toksikitesi	7
2.4. <i>Capoeta capoeta capoeta</i> (Guldenstaedt 1772)'nin Sistematikteki Yeri	9
2.4.1 Familya ve cins özellikleri	9
2.4.2. Alttür <i>Capoeta capoeta capoeta</i> (Guldenstaedt 1772)	11
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER	12
3.1. Deney Düzenegi	12
3.2. Histopatolojik çalışmalar	12
3.3. Balıklarda Kan Alma Yöntemleri	12
3.3.1. Kalpten kan alınması	13
3.3.2. Kuyruktan kan alınması	13

3.4. Total Protein Tayini	14
3.5. Elektroforetik Çalışmalar	15
3.5.1. % 30'luk akrilamid çözeltisi	16
3.5.2. Stoklama jel tamponu	16
3.5.3. Ayırma jel tamponu	16
3.5.4. Yürütme tamponu	16
3.5.5. Numune tamponu	17
3.5.6. Jelin boyanması işlemi	17
3.5.7. Jelden boya çıkarma işlemi	18
3.5.8. Diğer kimyasallar ve özellikleri	18
3.5.9. Kesikli tampon sistemli jelin hazırlanması	19
3.5.9.1. Ayırma jelin hazırlanması	19
3.5.9.2. Stoklama jelin hazırlanması	20
3.5.10. Ayırma jelin plağa dökülmesi işlemi	20
3.5.11. Stoklama jelin plağa dökülmesi işlemi	21
3.5.12. Serum numunelerinin sulandırılması ve jele yükleme işlemi	22
4.BULGULAR	25
5.TARTIŞMA ve SONUÇ	30
6. KAYNAKLAR	35
7. ÖZGEÇMİŞ	42

ÖZET

Bu çalışmada, Alüminyum klorürün ($AlCl_3$) zehirlenmesinde *Capoeta capoeta capoeta*'nın serum proteinleri ve solungaç histopatolojisi üzerindeki etkileri araştırıldı. Kars Çayı'ndan yakalanan balıklar 300 litrelik tanklara konularak 10 gün süreyle ortama adaptasyonları sağlandı. Daha sonra her grupta 7 adet balık bulunan 3 gruba oluşturulmuştur. I. gruptaki balıklar normal su ortamında, II. ve III. gruptaki balıklar ise sırasıyla 0,03 ve 0,06 mg/L $AlCl_3$ 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 Elektroforezi (SDS-PAGE)'nde yürütüldü. Doku örnekleri ise %10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edilerek rutin histolojik yöntemlerle parafin bloklar hazırlandı ve 3-5 μ kalınlığında kesitler alındı ve elde edilen kesitlerin tamamı hematoksilin ve eosin boyama metoduna göre boyanarak ışık mikroskopunda incelendi.

Serum numunelerinin SDS-PAGE'den elde edilen elektroforegramında kontrol grubundaki balıkların protein bantlarına göre 0,03 mg/L $AlCl_3$ uygulanan gruptaki balıkların 59 kD'luk protein bandında incelme, 94 kD, 74 kD, 46 kD, 35 kD'luk protein bantlarında kalınlaşma meydana geldiği ve 71 kD'luk protein bandının ise kaybolduğu tespit edildi. Yine kontrol grubu balıklara göre, 0,06 mg/L $AlCl_3$ uygulanan gruptaki balıklarda 101 kD, 74 kD, 71 kD, 59 kD, 46 kD, 26 kD'luk protein bantlarında incelme, 94 kD'luk protein bandında kalınlaşma meydana geldiği ve 86 kD'luk protein bandının da kaybolduğu saptandı.

Histopatolojik incelemelerde, 0.03 mg/L $AlCl_3$ uygulanan gruptaki balıkların sekonder lamellerin epitel hücrelerinde dejenerasyon, 0.06 $AlCl_3$ mg/L uygulanan gruptaki balıkların sekonder lamellerin epitel hücrelerinde de dejenerasyon, ayrıca hiper sellülerite ve bazı sekonder lamellerin uçlarında kütleşme görüldü.

Sonuç olarak, 0.03 ve 0.06 mg/L'lık $AlCl_3$ uygulamasının *Capoeta capoeta capoeta* için toksik olduğu kanaatine varıldı.

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

ABSTRACT

In this study, the effects of Aluminium chloride (AlCl_3) on *Capoeta capoeta capoeta* species (Guldenstaedt 1772) were searched by electrophoretic and histopathological methods. The fish caught from Kars River were put into 300 liters tanks and they were enabled to adapt into the medium for 10 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 0,03 mg/L and 0,06 mg/L AlCl_3 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 3-5 μ thickness were performed and all of the sections were stained according to hematoxylen and eosin method and investigated under light microscope.

In SDS-PAGE examination of Serum proteins, it was determined that in group applied 0.03 mg/L AlCl_3 was narrowed in protein band of 59 kD, and it was determined that in group applied 0.03 of mg/L AlCl_3 was thickened in protein bands of 94 kD, 74 kD, 46 kD, 35 kD. It was seen that protein band of 71 kD was slices. It was observed that in group applied 0.06 mg/L AlCl_3 was thinned in protein bands of 101 kD, 74 kD, 71 kD, 59 kD, 46 kD, 26 kD. It was determined that in group applied 0.03 of mg/L AlCl_3 was thickened in protein band of 94 kD. It was seen that protein band of 86 kD was slices.

In histopathological examination, in group treated 0.03 mg/L AlCl_3 was observed degeneration in the epithelial cell of secondary lamella, in group treated 0.06 mg/L AlCl_3 was determined degeneration in the epithelial cells of secondary lamella, as well as hyper cellularity and ends of some secondary lamellae were seen blunt-recovery.

As a result, it was concluded that applications of 0.03 and 0.06 mg/L AlCl_3 could be a toxic for health of *Capoeta capoeta capoeta*.

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

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 3.4.1: Total protein tayin prosedürü	15
Çizelge 3.5.9.1: Değişik Konsantrasyonlarda Ayırma Jeli Hazırlama Prosedürü	19
Çizelge 3.5.9.2: Değişik Konsantrasyonlarda Stoklama Jeli Hazırlama Prosedürü	20

RESİMLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Resim 2.4.2: Siraz balığı (<i>Capoeta capoeta capoeta</i>)	11
Resim 4.1: Alüminyum Klorür'e maruz bırakılan <i>Capoeta capoeta capoeta</i> 'nın SDS-PAGE yöntemiyle elde edilen serum proteinlerinin elektroforegramı	26
Resim 4.2: Alüminyum Klorür'e maruz bırakılan <i>Capoeta capoeta capoeta</i> 'dan elde edilen solungaç dokusunun histopatolojik görünümü	27

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
C	Santigrant
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
Co	Kobalt
Mn	Mangan
Cr	Krom
Se	Selenyum
Ni	Nikel
Cd	Kadmiyum
Al	Alüminyum
Mo	Molibden
NaCl	Sodyum klorür
HCl	Hidroklorik Asit
CoBHB	Kobalt parahidroksibenzoat
AlCl₃	Alüminyum klorür

1. GİRİŞ

Doğa için en önemli kirliliklerden biri ağır metaller tarafından meydana getirilmektedir. Bugün sanayide kırktan fazla metal ve alaşımın kullanıldığı bilinmektedir. Ağır metaller tarafından meydana getirilen kirlilik insan sağlığını tehdit eder bir seviyeye ulaşmıştır [1]. 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 [2].

Ağır metaller özgül ağırlığı 5 g/cm^3 'ün üzerinde olan ve nispi atom ağırlığı 40'ın üzerindeki elementlerdir ve nispeten geniş bir grup oluştururlar [3].

Ağır metaller, normal koşullarda yağmur, rüzgar ve erozyon gibi doğal olaylar sonucunda sucul ekosistemlerde ng/L veya $\mu\text{g/L}$ düzeylerinde bulunur [4]. Ancak insan nüfusundaki hızlı artış, endüstrileşme, kentleşme ve modern tarım uygulamaları gibi temelde insan aktivitesine dayalı faktörler, ağır metallerin sucul ekosistemlere katılımını artırmaktadır [5].

Sucul organizmaların bazıları ağır metalleri belli bir dereceye kadar bünyelerinde depolayabilirler. Bu ağır metaller, organizmalar için zehirli veya zararlı olmasa bile besin zinciri yoluyla insana ulaştığında, insan sağlığını etkilerler [6]. Balık dokularındaki metal konsantrasyonlarının; sudaki besin zincirine, av rekabetine, su kimyasına ve göldeki hidrodinamiklere bağlı olarak değiştiği ifade edilmektedir [7].

Ağır metallerin biyolojik moleküllerle alımı bazı aşamalar içermektedir. Yapılan bilimsel araştırmalar ağır metallerin metal bağlama verimliliğinin ilk aşamada çok hızlı bir şekilde cereyan etmekte olduğunu ve bu olayda metal iyonlarının hücre duvarlarına temas eder etmez hemen yüzey adsorpsiyonu ile mikroorganizmaların hücre yüzeyine bağlandığını göstermektedir. Yüzey adsorpsiyonun fiziko-kimyasal bir olay olduğu, birçok biyolojik moleküllerin; örneğin hücre duvarı bileşenleri olan polisakkaritlerin, proteinlerin ve lipitlerin sahip olduğu fonksiyonel gruplar ile gerçekleştiği belirtilmektedir [8,9]. Bu fonksiyonel gruplar amino, karboksilik,

sülfidril, fosfat ve tiol grupları olup metalleri bağlamada farklı affinite ve özgülüğe sahiptirler [8].

Çeşitli yollarla su ortamına karışan toksik maddelerin sucul organizmalar üzerindeki etkileri çok ciddi ve önemlidir. Çünkü bu bileşikler kanser de dahil olmak üzere birçok hastalığa neden olma kabiliyetine sahiptirler [10]. Ayrıca bu toksik etkenler mutasyon ve seleksiyon gibi olaylara aracılık ederek canlıların genetik yapısını etkilemektedirler [11].

İnsan ve canlı yaşamı için hayati öneme sahip olan suyun kullanılabilir olması için tehlikeli kimyasallardan ve bakterilerden temizlenmesi gerekmektedir. Ayrıca derelerden ırmaklardan ve göllerden alınarak yerleşim yerlerindeki insanların kullanımına sunulan su belirli standartlara uymak zorundadır. Aksi durumda kullanılması tehlikeli sonuçlar doğurabilmektedir. Günümüzde teknolojinin gelişmesi, nüfus artışı gibi etkenlerden dolayı su kaynakları olan dereler, göller ve yeraltı suları aşırı kirlenme ile yüz yüze kalmaktadır. Çünkü yerleşim yerlerinin (şehir, kasaba, vs.) ve fabrikaların atık suları derelere veya göllere bağlanmaktadır [12].

Esansiyel elementler canlı vücudunda önemli fonksiyonlara sahiptirler. İskelet yapısının formasyonu, koloidal sistemin (osmotik basınç, viskozite, difüzyon) devamı ve asit-baz dengesinin düzenlenmesinin yanı sıra hormonlar ve enzimleri aktive eden önemli bileşenlerdir. Spesifik iz metaller (Fe, Mn, Cu, Co, Zn, Mo, Se vb.) metalloenzimlerde, tek bir katalitik fonksiyonu yürüten özel bir protein ile birleşirler ve birçok enzim sisteminde kofaktör olarak görev yaparlar [13,14].

Cd, Cu, Cr, Ni, Zn ve Mn gibi ağır metaller canlı bünyesinde birikir, belirli miktarın aşılması halinde zehir etkisi yapar, birikim miktarının etki süresi ve ortam değişimine göre artar [15].

Bu çalışmada, bir ağır metal olan Alüminyum'un histopatolojik ve elektroforetik etkilerini saptamak amacıyla Kars Çayı'ndan yakalanan *Capoeta capoeta capoeta* (Guldenstaedt 1772) bireyleri üzerine Alüminyum klorür uygulanarak solungaç

dokusundaki histopatolojik ve serum proteinlerindeki elektroforetik değişiklikler belirlenmeye çalışıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Alüminyum

Doğada yaygın olarak bulunan alüminyum (Al) besinsel, endüstriyel, çevresel ve kozmetik alanlarındaki yaygın kullanımı ile günlük yaşantımızda çok sık olarak karşılaştığımız elementlerden biridir. [16].

Periyodik cetvelde 3-A grubunda bulunan bu elementin atom numarası 13, atom ağırlığı 26,98, yoğunluğu $2,70\text{gr/cm}^3$, erime noktası $660,32^\circ\text{C}$ ve kaynama noktası 2519°C 'dir. Alüminyum, yumuşak ve hafif bir metal olup mat gümüşümsü renktedir. Bu renk, havaya maruz kaldığında üzerinde oluşan ince oksit tabakasından ileri gelmektedir [17].

Tabiatta saf halde bulunmayan alüminyumun saf hali suda çözünmemektedir. AlCl_3 ise suda kolayca çözünebilmekte ve kuvvetli asidik aşındırıcı bir özellik göstermektedir [17].

Alüminyum, doğada genellikle boksit cevheri halinde bulunur ve oksidasyona karşı üstün direnci ile tanınır. Endüstrinin pek çok alanında milyonlarca farklı ürünün yapımında kullanılmaktadır [18].

Alüminyum, demir-çelikten sonra dünyada en çok kullanılan metaldir. 1900'lü yılların başlarında dünya alüminyum üretimi 172.000 ton iken, 1977'de 13.360.000 tona, 1980'lerde 17.5 milyon tona ulaşmıştır. Demir dışındaki diğer metaller yanında alüminyum metal üretimi ve tüketimindeki yüksek artış hızının nedenleri arasında alüminyumun düşük yoğunluğa sahip olması, yüksek ısı ve elektrik iletkenliği, ışık ve ısı yansıtıcılığı, sıcak ve soğuk şekillendirilebilme kolaylığı, farklı dayanım olanakları, yeniden kullanılabilme gibi özelliklerinin yanı sıra fiyatının 1974 yılına kadar diğer rakip metallere göre daha düşük oranda artmış olması da yer almaktadır. Bugün bütün dünyada alüminyum ve alaşımları, büyük ticari değeri olan ve büyük miktarlarda üretilen bir malzeme grubu halini almıştır. Alüminyumun uçak ve otomotiv sanayinde önemli bir role sahip olması "stratejik" bir metal sayılmasına neden olmuştur. Alüminyum ve alaşımları bütün imalat sanayinin hemen her

dalında, inşaat, kimya, gıda, ulaştırma elektrik ve elektronik sektörlerinde giderek artan oranlarda kullanılmaktadır [19].

Boksit ($Al_2O_3 \cdot 2H_2O$), Kriyolit ($3NaF \cdot AlF_3$), Şap ($Al_2O_3 \cdot SiO_2$), Korindon ($\alpha-Al_2O_3$) ve Kaolin ($H_2Al_2Si_2O_8 \cdot H_2O$) endüstriyel açıdan en önemli Al kaynaklarına örnek olarak verilebilir. Ayrıca bu metal kil, mika, feldispat ve bentonit ($Al_2O_3 \cdot 4SiO_2 \cdot H_2O$) gibi birçok bileşiğin yapısında da bulunmaktadır [20].

Alüminyum yeryüzü kabuğunda en yaygın bulunan üçüncü elementtir. Aynı zamanda en fazla rastlanan metaldir. Alüminyum, orta asidik veya nötr pH değerlerine sahip topraklarda, özellikle çözünmeyen formlar olan alüminyum silikat ya da alüminyum oksit şeklinde bulunur. Ancak, toprak çeşitliliği arttıkça alüminyumun fitotoksik formları kök ve bitki büyümesini etkileyen seviyelere ulaşır [21, 22].

2.2. Alüminyum Metabolizması

Alüminyum absorpsiyonlarından ilki solunum yolu ile gerçekleşen emilimdir. Alüminyumun vücuda bu yolla alınması ayrıntılı olarak çalışılmamıştır. Çünkü bu elementin kuvvetli bir radyoaktif izotopu bulunmamaktadır [23].

Solunum yolu ile alınan alüminyum hariç vücuda alınan alüminyumun en önemli kaynağı gıdalar ve içme sularıdır [24, 25, 26].

Alüminyum içerip yaygın şekilde kullanılan gıdalar kabartma tozu, kek karışımları, donmuş hamur ve pankek karışımlarıdır [27]. Ayrıca tedavi amacıyla kullanılan birçok ilacın yapısında da Al bulunmaktadır. Örneğin Alüminyum hidroksit hem antiasidik olarak hem de aşılarda fosfat bağlayıcı olarak kullanılmaktadır [25].

Absorpsiyonun bir diğer şekli ise mide-bağırsak yolu ile olmaktadır. Sayısal analizlerin fazla gelişmemiş olması nedeniyle son yıllara kadar antiasid ve fosfat bağlayıcı olarak kullanılan Al tuzlarının absorbe olmadığı düşünülmekteydi. Ancak hiperkalami veya hiperfosfataminin kontrolünde Al hidroksit veya Al içeren reçineyi yüksek dozda kullanan üremili hastaların serum Al düzeylerinde yükselme olduğunun gözlenmesi ile alüminyumun absorbe olabileceği ve toksik etki

gösterebileceği görüşü ağırlık kazanmıştır [28]. Böbrek yetmezliği olan kişilerde Al absorpsiyonunun olduğu kanıtlanmıştır [29,30].

Böbrek yetmezliği olan hastalarda alüminyum, parantral ve diyaliz solüsyonlarının hazırlanmasında kullanılan su ve ham maddeler, diyaliz ve parantral solüsyonların ambalajlanmasında kullanılan materyaller, Hiperfosfotomi ve peptik ülser tedavisinde kullanılan oral alüminyum içeren antiasitler ve diğer hastalıklarda uygulanan alüminyum içerikli farmasötik dozaj şekilleri ile vücuda alınmaktadır [31].

Oldukça toksik bir etkiye sahip olan Al'un sindirim sistemindeki emilimi yeterince anlayamamıştır. Bunun nedeni emilimi doğrudan ölçebilecek bir radyoizotopun bulunmayışı ve bilinen radyoizotopların yarılanma sürelerinin 7 dakikadan daha az ya da çok uzun olması olarak bilinmektedir [32].

İnsan ve hayvanlarda alüminyumun emilimini etkileyen faktörler arasında paratiroid hormonu, dihidroksivitamin D3, çinko eksiklikleri, gıdasal faktörlerin (sitrat ve inorganik anyonlar) yer aldığı bildirilmektedir [33, 24].

Yapılan çalışmalarda sağlıklı bir insanın vücut dokularında bulunan en yüksek Al düzeyi akciğerde bulunmuş ve bu değer yaş ağırlık cinsinden yaklaşık olarak 20 mg/kg olduğu bildirilmiştir. Bu elementin bu organda yüksek seviyede bulunması hava ile akciğerlere giren çözünmez özellikteki Al bileşiklerinden kaynaklanmaktadır [34]. Sağlıklı insanlarda akciğerlerden sonra en fazla birikim kemik ve kas dokularında görülmüştür [35]. Diğer yumuşak dokularda ise yaş ağırlık cinsinden yaklaşık olarak 0,3-0,8 mg/kg Al tespit edilmiştir. Deri, sindirim kanalının alt kısmı, lenf nodülleri, adrenal ve paratiroid bezlerinde de Al seviyesinin yüksek olduğu gözlenmiştir. Beyindeki Al seviyesine ilişkin veriler değişiklik göstermektedir. Genel olarak beyindeki normal Al düzeyi yaş ağırlık cinsinden 0,25-0,75mg/kg olarak ölçülmüştür [34].

Alüminyumun gerek hayvanlarda gerekse insanlarda vücuttan atılmasına ilişkin mekanizmayı açıklamaya yönelik çalışmalar yeterli değildir. Sekiz sağlıklı insanda yapılan 20 günlük bir çalışmada; 5 mg Al/gün diyetle beslenen kontrol grubunda,

alınan Al'un % 74'ten fazlasının, 125 mg Al/gün diyetle beslenen grupta ise %96'sından fazlasının feçesle atıldığı, idrarla atılan miktarın ise kontrole kıyasla günde 2-5 kez daha fazla olduğu rapor edilmiştir [36].

2.3. Alüminyum Toksikitesi

Alüminyum toksisitesi üzerine gerek deney hayvanlarında gerekse bitkilerde birçok çalışma yapılmış ve oldukça ilginç bulgulara rastlanılmıştır. Alüminyumun solunum sistemi üzerindeki toksik etkisi silika ile birlikte akciğer fibrozisiyle karakterize edilen endüstriyel bir hastalık olan shaver hastalığının ortaya çıkmasıyla gözlenmiştir [37]. Başka bir çalışmada ise alüminyumun mitokondrideki enerji metabolizmasını baskıladığı ve geçirgenliği artırdığı kaydedilmiştir [38].

Alüminyumun ağız yoluyla büyük miktarlarda alınmasının insanlarda, laboratuvar hayvanlarında ve çiftlik hayvanlarında fosforun emilimini engellediği ve dokularda fosforilasyon mekanizmasını bozduğu bilinmektedir [39]. İlave olarak, alüminyumun kronik toksikasyonunda mineral madde dengesinde bozulma meydana gelmekte ve organizmada alüminyum iyonları demir ve magnezyum iyonları ile yer değiştirmektedir. Ayrıca ferritine Fe bağlanmasını azaltıp, hem sentezini de bozmaktadır [40].

İnsanlarda yüksek konsantrasyonlardaki alüminyumun ölüme ve beyin korteksinin zarar görmesine sebep olduğu bildirilmektedir [41]. İn vitro şartlarda alüminyum nörotoksik etkiler göstermiş ve aynı zamanda B-amiloid proteinin birikimini arttırmıştır. Bilindiği gibi bu protein beyinde yaşlılık plakalarının aşırı birikimine yol açmaktadır [42].

İn vivo şartlardaki çalışmalarda oral yolla alüminyumla uzun süre muamele edilen kemiriciler miyelin zarının fosfolipid kompozisyonunda değişme ve asetil kolinesteraz enziminin artan veya azalan aktivitelerini göstermişlerdir. Altı ay boyunca haftada üç kez alüminyum glukonatın ekolojik dozlarına intraperitoneal olarak maruz kalan ergin ratlarda Alzheimer hastalığında gözlenen davranışsal ve nöropatolojik modifikasyonlar görüldüğü tespit edilmiştir [42].

Yapılan çalışmalarda, alüminyumun canlı hücreler üzerinde yararlı bir etkiye sahip olmadığı görülmüştür. Alüminyum insanda sindirim bozukluğu ve besinlerin emiliminin durmasına neden olmaktadır [43].

Alüminyum ve membran stabilitesi arasındaki ilişki *Thermoplasma acidophilum* mikroorganizmasına çalışılmış ve bu mikroorganizmanın membranının lipit akışında düşüş görülmüştür [38].

1965'te Kato ve arkadaşları alüminyum tuzları kullanarak tavşan beyinde nörofibriler dejenerasyon yapmayı başardılar [44]. Fakat, çift helikal flamanlar görülmemiştir. Crapper ve arkadaşları Alzheimer'lı dört hastanın beyinde artmış alüminyum konsantrasyonları buldular. Sonuçta beyin dokusunda bölgesel değişiklikler olduğunu bildirdiler. Fakat bu verileri destekleyecek bulgular elde edilememiş, geçerlilikleri tartışmalıdır [45,46].

Diğer bir çalışmada da alüminyumun kalsiyum metabolizmasını etkilediği, özellikle kalsiyumun renal atılımını artırdığı, kemik rezorpsiyonunun artması ile kalsiyumun kemikten uzaklaştığı ve yerine alüminyumun biriktiği, dolaşıma geçen kalsiyumun ise paratiroid hormon sekresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [47,48].

Alüminyumun kemiklerde birikmesi ile kemik dokusunu meydana getiren hücrelerin aktivitelerinin engellenmesi sonucu, kemik oluşum hızının azaldığı ve kemikleşmenin bozulduğu, sonuçta kemikte lezyonların biriktiği gözlenmiştir. Alüminyumun kemikleşmeye engel olduğu ilk defa 1973 yılında rapor edilmiştir. Kronik hemodiyaliz hastalarında görülen mikrositik hipokromik anemiden de bu element sorumlu tutulmuştur [48, 49, 50, 51].

2.4. *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> [52].

2.4.1 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 faringien 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

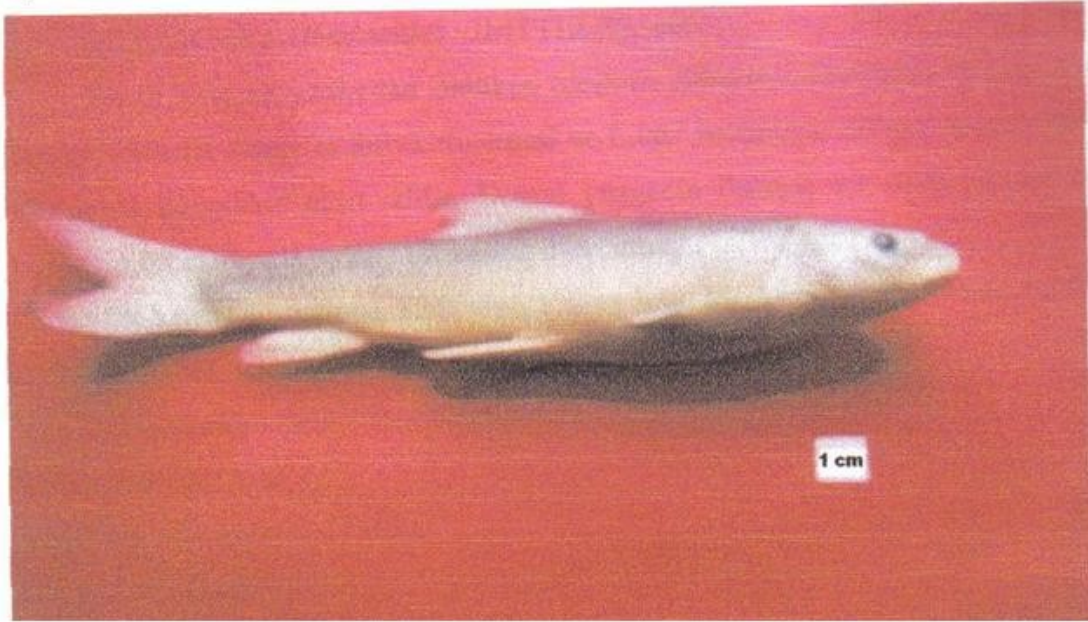
bir kanal sayesinde özofagus ile devamlı irtibat halindedir. Omur şeridinin ilk dört omuru birbiriyle az çok kaynaşarak Weber kemikleri denilen özel bir formasyon meydana getirmişlerdir. Mide civarında pilorik çekum denilen kör bağırsaklar bulunmaz. Genellikle bıyiksız iseler de bazen bir veya iki çift 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 dölllenme 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 [52,53].

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



Resim 2.4.2: 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'ın 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 esnek.

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 [53].

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Deney Düzenegi:

Bu incelemede Kars çayı'nda yaşayan ve ağırlıkları 200-250 g arasında değişen 21 tane *Capoeta capoeta capoeta* kullanıldı. Balık örneklerinin toplandığı nehir suyunun kalitesi pH 8.1-8.3, çözülmüş oksijen miktarı 4.95-10.51 mg/l ve sıcaklığı 16.5-18.2 °C olarak bildirilmektedir [54]. Bu balıklar Kars çayı'ndan yakalanarak laboratuvar ortamında 300'er L'lik tanklara alındı. 10 gün süreyle ortama adaptasyonları sağlandıktan sonra 7'şer balık bulunan 3 grup oluşturuldu. I. gruptaki balıklar normal su ortamında, II. ve III. gruptaki balıklar ise sırasıyla 0,03 ve 0,06 mg/L AlCl₃ içeren su ortamlarında 10 gün süreyle bekletildi. 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. Alınan serumlar analizler yapıncaya kadar -20 °C'de saklandı. Numunelerin protein konsantrasyonları biüret yöntemi ile ölçüldü [55]. Doku örnekleri ise histopatolojik inceleme için %10'luk formalin solüsyonuna alınarak tespit edildi.

3.2 Histopatolojik Çalışmalar:

Formalin solüsyonunda 48 saat tespit edilen solungaç doku örneklerinden 3-5 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 Yöntemleri

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

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

1. Canlı iken;

a- Kalpten

b- Kuyruk kesilerek

3.3.1 Kalpten Kan Alınması

Siraz balıkları canlı iken, elektroşok, anestezi veya başa darbe ile vurularak bayıldıktan hemen sonra balık sol tarafına yatırıldı. Diğer bir kişinin yardımı ile balık karın ve kuyruk kısmından tutulur. Sağ solungaç kaldırıldıktan sonra *cleithrum* kemiğinin oluşturduğu kemerin hemen önünden alt üçte bir mesafeden 1.3 numaralı hipodermik iğne ile yatay düzleme 40-45 derecelik bir açı yapacak şekilde direkt kalbe girilip enjektörle yeterli miktarda (3-4 ml) kan alınır. Ayrıca, laparotomi yapılan bir balıktan hipodermik iğne ile kalbe girilip balığın ağırlığı ile orantılı olarak istenilen miktarda kan alındı [55].

3.3.2. 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 alındı [55].

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

2. Elektroşokla

a- Kalpten

b- Kuyruk kesilerek.

Elektroşok: Kan almadan önce balıklar bireysel olarak içerisinde 20 L su bulunan kovalara alınır. Elektroşok (medica) ile suya 5-10 sn 5 voltluk elektrik akımı verilerek balıklar hareketsiz hale getirilir.

3. Anestezi edilerek

a- Kalpten

b- Kuyruk kesilerek

Anestezi: Anesteziye tabi tutulacak balıklarda içerisinde 20 L su bulunan ve 0.4 ml Chinaldin ($C_{10}H_9N$) karıştırılan kovalara tek tek bırakılır, 15-45 saniyede hareketsiz hale getirilir.

4. Başlarına darbe

a- Kalpten

b- Kuyruk kesilerek

Darbe: Bir yardımcı tarafından başın arka kısmından ve kuyruk kısmından tutulan balığın başına uygun ağırlıkla bir cisimle darbe yapılır.

5. Laporatomi

a- Kalpten

Laporatomi: Bir yardımcı tarafından sırt üstü yatırılan ve hareketsiz hale getirilen balığın göğüs ve karın boşluğu arzu edilen şekilde dişli pens ve bisturi ile açılır.

3.4. Total Protein Tayini

Derin dondurucudan çıkarılan serum numunelerinin çözülmesi beklenildi ve total protein tayini işlemine geçildi. Analiz öncesi her serum numunesi serum fizyolojikle 1:10 sulandırıldı. Numunelerin total protein tayini biüret metoduyla yapıldı [56].

Çizelge 3.4.1. Total protein tayin prosedürü.

Çözeltiler tüpü	1-Kör tüpü	2-Standart tüpü	3-Numune
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.

Numunenin Protein Konsantrasyonlarının Hesabı:

Numunenin Absorbansı

Numune Protein Konsantrasyonu (mg/ml): _____x10

Standartın Absorbansı

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 [57] ve O’Farrell [58] metotlarına göre yapıldı. Bu uygulama için aşağıdaki çözeltilerin hazırlanmıştır.

3.5.1. % 30'luk Akrilamid Çözeltisi

Hassas terazide 7.5 g Akrilamid ve 200 mg Bisakrilamid 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)

Hassas terazide 1.5 g Tris ve 100 mg SDS 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)

Hassas terazide 9.075 g Tris ve 0.2 g SDS (Sodyum dodesil sülfat) 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 (CH₃COOH) 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 (CH₃COOH) %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 (CH₃COOH) %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.

Stok çözeltisi (ml)	Ayırma jelin son konsantrasyonları (%)							
	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 çözeltiliye en son katılmasıdır. Çünkü çözeltiliye 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.

Stok çözeltiler (ml)	Stoklama Jelin Son Konsantrasyonları (%)			
	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	15.49 ml

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 köpürtülmezsizin 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 klempler 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 $AlCl_3$ verilen *Capoeta capoeta capoeta* numunesi, 4 numaralı jel çukuruna, 2 mg/L dozda $AlCl_3$ 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) şeklindedir. 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 μ l alınıp 200 μ l dH_2O ile sulandırıldı. Böylece son protein konsantrasyonu 0.5 μ g/ μ l oldu. Daha sonra sample tamponla 1/2 oranında sulandırıldı. Jele bu standart proteinlerin her birinden 5 μ g 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 μ g/ μ l'ye ayarlandı.

En sonunda her bir numune tüpünden 200 μ l serum alındı ve her birinin üzerine 200 μ l sample tampon ilave edilerek son protein konsantrasyonu 2 μ g/ μ l'ye ayarlandı.

Hazırlanan serum numuneleri bir beher içerisine bir miktar su konularak 100 °C'de 3 dk süreyle kaynatıldı. Numune tamponundaki 2-merkapt ethanol proteinlerdeki disülfid bağlarını açar ve denatüre olmalarını sağlar. Böylece serum proteinleri tek polipeptidler haline gelmiş olur. Her jel çukuruna 20' şer μ l numune uygulandı. Böylece 40 μ g 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

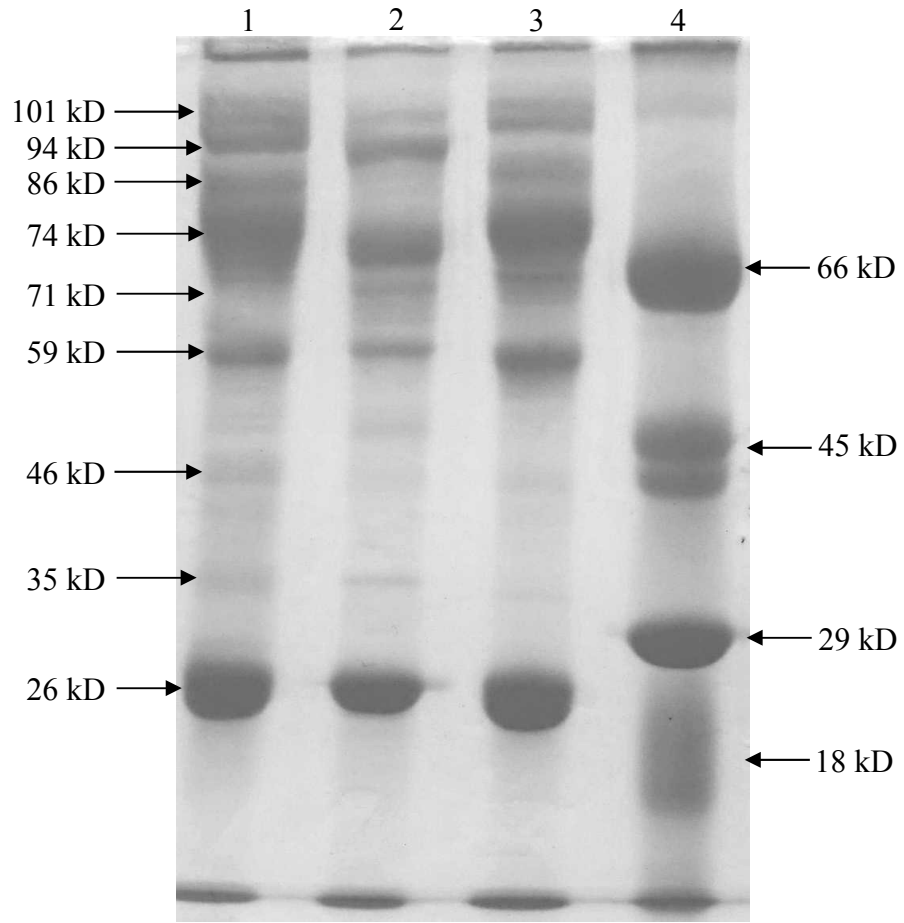
edildi. Bu esnada kap içindeki boya çözeltisi hafifçe çalkalanarak jelin daha çabuk boyanması sağlandı.

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)'larının metoduna göre hesaplandı [59].

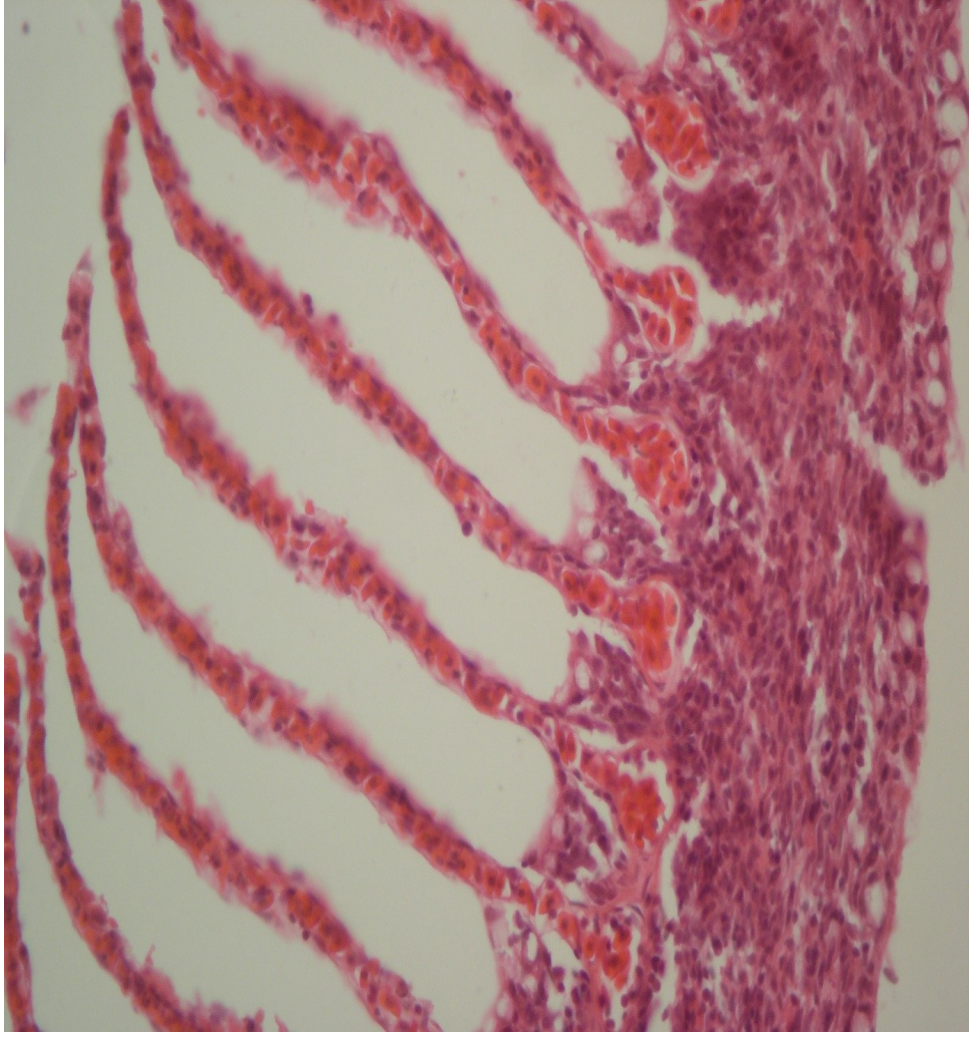
4. BULGULAR

Serum numunelerinin SDS-PAGE'den elde edilen elektroforegramında kontrol grubundaki balıkların protein bantlarına göre 0,03 mg/L AlCl₃ uygulanan gruptaki balıkların 59 kD'luk protein bandında incelme, 94 kD, 74 kD, 46 kD, 35 kD'luk protein bantlarında kalınlaşma meydana geldiği ve 71 kD'luk protein bandının ise kaybolduğu tespit edildi. Yine kontrol grubu balıklara göre 0,06 mg/L AlCl₃ uygulanan gruptaki balıklarda 101 kD, 74 kD, 71 kD, 59 kD, 46 kD, 26 kD'luk protein bantlarında incelme, 94 kD'luk protein bandında kalınlaşma meydana geldiği ve 86 kD'luk protein bandının da kaybolduğu saptandı.

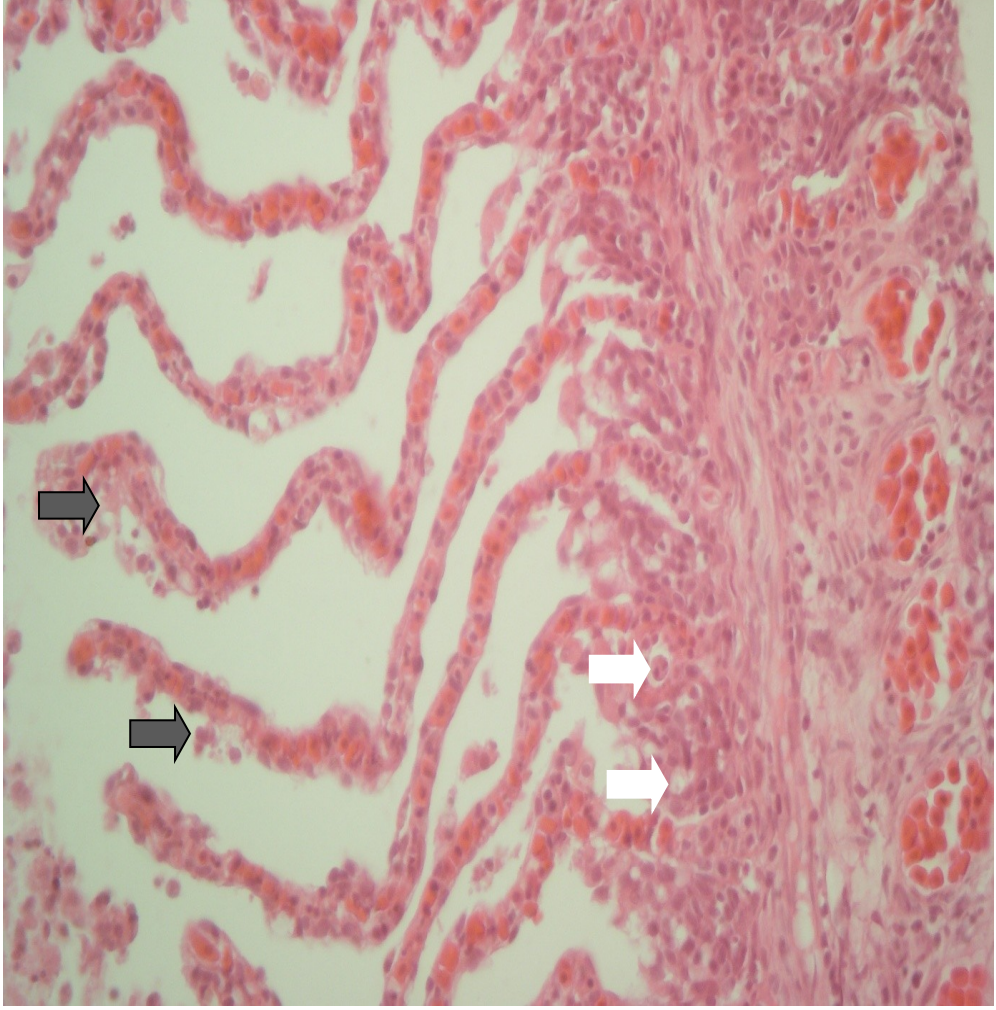
0.03 mg/L AlCl₃ uygulanan gruptaki balıkların sekonder lamellerinin epitel hücrelerinde dejenerasyon, 0.06 AlCl₃ mg/L uygulanan gruptaki balıkların sekonder lamellerinin epitel hücrelerinde de dejenerasyon, hiper sellüerite ve bazı sekonder lamellerde kütleşme görüldü.



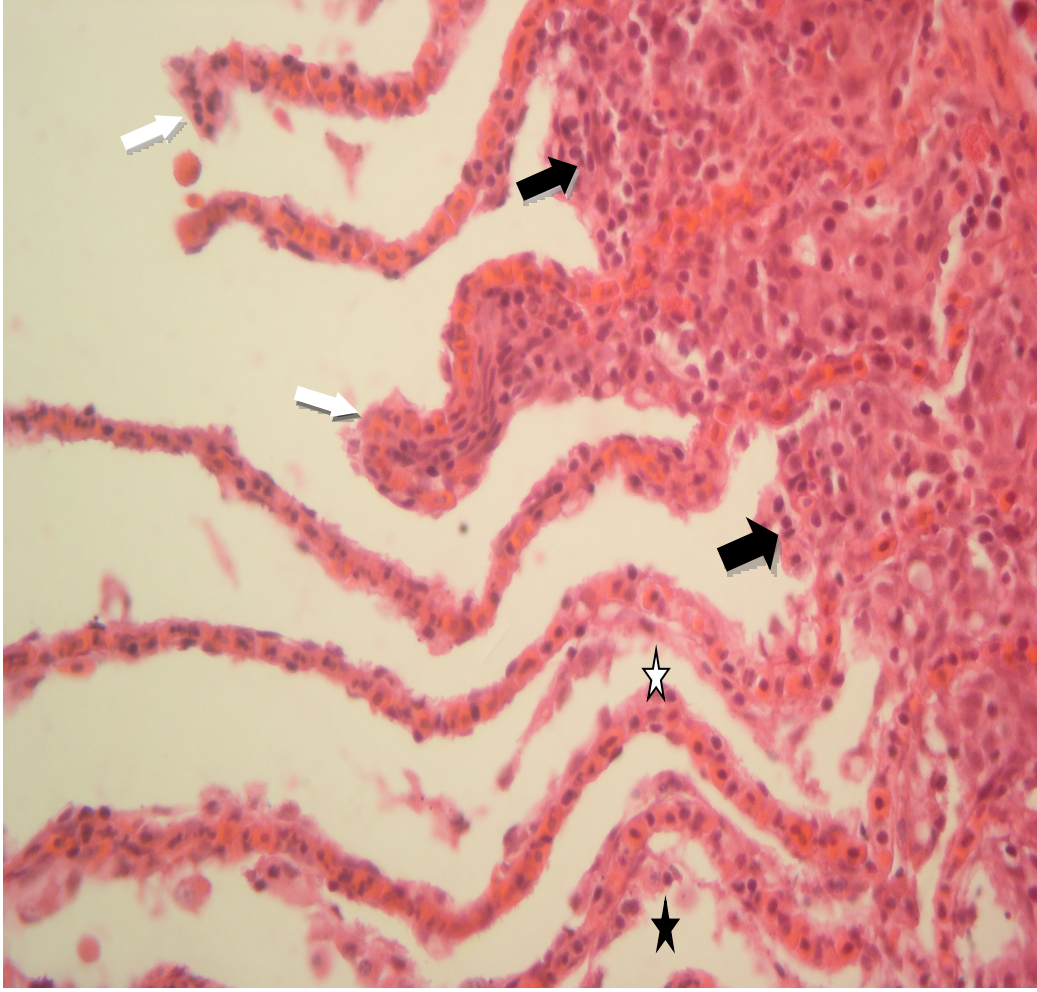
Resim 4.1: Alüminyum klorür'e maruz bırakılan *Capoeta capoeta capoeta*'nin SDS-PAGE yöntemiyle elde edilen serum proteinlerinin elektroforegramı. 1. 0,03 mg/L, 2. 0,06 mg/L $AlCl_3$ uygulanan balıkların serum proteinleri, 3. kontrol grubu, 4. standart proteinler.



Resim 4.2: Kontrol grubu solungaç dokusu.(X.360)



Resim 4.3: 0.03 mg/L $AlCl_3$ uygulanan balıklardan elde edilen solungaç dokusunda vakuoler dejenerasyon (beyaz ok) ve hidropik dejenerasyon (siyah ok). (X.360).



Resim 4.4: 0.06 mg/L $AlCl_3$ uygulanan balıklardan elde edilen solungaç dokusunda hiper sellüerite (siyah ok), bazı sekonder lamellerde kütleşme (beyaz ok), hidropik dejenerasyon (beyaz yıldız) ve vakuoler dejenerasyon (siyah yıldız). (X.360).

5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Araştırmamızda 0.03 ve 0.06 mg/L'lik dozlarda Alüminyum klorür'e maruz kalan *Capoeta capoeta capoeta*'nın solungaç yüzgecinde histopatolojik dejenerasyonlara sebep olduğu ve bu hasarın şiddetinin de doz artışına bağlı olarak arttığı, serum numunelerinin SDS-PAGE'den elde edilen elektroforegramında kontrol grubundaki balıkların protein bantlarına göre 0,03 mg/L AlCl₃ uygulanan gruptaki balıkların 59 kD'luk protein bandında incelme, 94 kD, 74 kD, 46 kD, 35 kD'luk protein bantlarında kalınlaşma meydana geldiği ve 71 kD'luk protein bandının ise kaybolduğu tespit edildi. Yine kontrol grubu balıklara göre 0,06 mg/L AlCl₃ uygulanan gruptaki balıklarda 101 kD, 74 kD, 71 kD, 59 kD, 46 kD, 26 kD'luk protein bantlarında incelme, 94 kD'luk protein bandında kalınlaşma meydana geldiği ve 86 kD'luk protein bandının da kaybolduğu saptandı.

0.03 mg/L AlCl₃ uygulanan gruptaki balıkların sekonder lamellerinin epitel hücrelerinde dejenerasyon, 0.06 AlCl₃ mg/L uygulanan gruptaki balıkların sekonder lamellerinin epitel hücrelerinde dejenerasyon, hiper sellülerite, bazı sekonder lamellerde kütleşme görüldü.

Sazan (*Cyprinus carpio L.*) balığı üzerinde yapılan bir araştırmada, bakır, çinko ve bakır-çinko etkileşiminde karaciğer, solungaç ve kas dokularındaki metal birikimi incelenmiş ve sonuçta bakır-çinko karışımının etkisinde solungaç dokusundaki çinko birikimi dışında en yüksek bakır ve çinko birikimi karaciğerde olurken, en düşük birikim kas dokusunda meydana gelmiştir. Karışımın etkisinde doku ve organlardaki bakır ve çinko birikimi, metallerin tek tek etkisinde belirlenen metal birikiminden düşük düzeyde olmuştur [60]. Yine sazan balığında (*Cyprinus carpio*) kadmiyum ve çinko maruziyetine bağlı olarak metalotiyonin miktarındaki değişiklikleri araştırılmış ve hepatopankreas, böbrek, solungaç gibi organlardaki metalotiyonin içeriğinin Zn>Cd>kontrol şeklinde olduğu belirtilmiştir [61]. Tatlısu çipurası (*Oreochromis niloticus*) üzerinde yapılan çalışmada, besin yoluyla 42 gün boyunca bakıra maruz bırakılan balıklarda, çalışma süresi sonunda balıkların solungaç ve bağırsak dokularında histolojik olarak bir değişiklik saptanmadığı fakat karaciğer dokusunda hepatositlerin yağ içeriğinin arttığı belirtilmiştir [62].

Kobalt parahidroksibenzoat (CoBHB)' in *Capoeta capoeta capoeta*' nin serum proteinleri üzerindeki etkileri incelenmiş ve doz artışına bağlı olarak yüksek molekül ağırlıklı protein bantlarında kalınlaşmalar, küçük molekül ağırlıklı protein bantlarında ise incelmeler olduğu, histopatolojik olarak ise karaciğer, solungaç ve bağırsak dokularında yine doz artışıyla orantılı olarak artan derecelerde nekroz ve dejenerasyonlar oluştuğunu belirtilmiştir [63]. Bizim çalışmamızda da AlCl₃ uygulanan balıkların solungaç dokusunda doz artışına bağlı olarak nekroz ve dejenerasyon oluştuğu gözlenmiştir. Protein bantlarında da doz artışına bağlı olarak incelmeler olduğu saptanmıştır. Çalışmamız litaretürle uygunluk göstermektedir.

Hamur fabrikaları klor ağartma deşarjının biyolojik sonuçlarını inceleyen bir çalışmada, şiddetli yüzgeç aşınmasının kaybolmasından 1 yıl sonra, bir İsveç hamur fabrikasının atık suyunda bulunan *Perca fluviatilis*'de, epitel dokudaki hiperplazinin bir belirtisi olarak kuyruksu yapıdaki yüzgeç derisinde makroskopik kalınlaşma görülmüştür. Aynı çalışmada, şiddetli yüzgeç aşınmasının kaybolmasından 3 ay sonra, kısalmış solungaç filamentlerinin yanı sıra ikincil lamellerde füzyon görülmüş, 1 yıl sonra, solungacın ikincil lamelinin hücrel ve hücrel olmayan morfometrik çalışmalarında, maruz kalan ve maruz kalmayan balık arasında hiç bir fark görülmemiştir. Benzer bir çalışma Yeni Zellanda'daki hamur fabrikası klor ağartma atıklarının aktığı bir nehirde, Japon balığı (*Carassius auratus*) için yapılmıştır. Japon balığında da özdeş hastalık izlerine rastlanmış olup, İsveç'teki levreğe göre şiddetli ve iyileşmiş yüzgeç aşınması görülmüştür. Japon balığında da kuyruksu yapıdaki yüzgeç derisinde makroskopik kalınlaşma görülmüştür. Japon balığının yüzgeçlerinin patolojik histolojisi, yüzgeç aşınmasının şiddetli aşamalarında, ödem ve lokal enfeksiyonun yanında yüzgeç uçlarında buna bağlı kangren olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada, atıklardaki bir veya daha fazla toksik maddenin dahil olduğu fizyolojik rahatsızlığı kapsayan etiyolojideki gibi farklı hamur fabrikasının atık suyunda yaşayan farklı balık türlerinde yüzgeç aşınması görüldüğü sonucuna varılmıştır [64].

Gökkuşağı alabalığı üzerinde doku kalıntı analizi ve alüminyum-spesifik histokimyası araştırılmış ve alüminyuma kronik olarak maruz kalan gökkuşağı

alabalıklarının beyinde sistemik alüminyum birikimi ve farklı bir neuropatoloji gözlenmiştir. Alüminyumun; beynin serebrovasküler endoteli ile kalbin arteria soğanındaki endotel ve epitel yüzeyler ile bağlantılı olduğu saptanmıştır. Alüminyumun zarlara bariyer özelliğinden ödün verdirme potansiyeli, onun balıklar için toksik olduğunun belirtisidir [65].

Kurşun ve alüminyum iyonlarının laboratuvar hayvanlarına kısa dönem ve uzun dönemde ağız yoluyla uygulanması sırasında, geniş spektrumlu biyolojik etkiler meydana gelmiştir. Bu metallerin kısa dönemli bir deney sırasında genel toksik ve gonadotoksik etkilerinin birbiri ile aynı olduğu ortaya çıkmış ve bu etkilerin korelasyonu sürekli deneyler sırasında muhafaza edilmiştir. Sudaki kurşun(0.03 mg/l.) ve alüminyum(0.5 mg/l.) konsantrasyonları popülasyonun sağlığı için tehlikeli olabileceğinden içme suyu kalitesi açısından standartlara dahil edilmesi için hijyenik standartlar önerilmektedir [66].

Tatlı su balık türlerinin sudaki alüminyuma karşı bağıl duyarlılıklarını incelemek amacıyla İskandinavya'ya özgü yaygın yedi balık türü Al yönünden zengin asidik su, Al yönünden fakir asidik su ve kontrol amaçlı yaklaşık olarak nötr suya maruz bırakılmışlardır. Akut alüminyum tehdidinde karşı türler arasındaki Atlantik somonu, (*Salmo salar*) en duyarlı iken daha sonra kızılöz balığı (*Rutilus rutilus*), golyan balığı, (*Phoxinus phoxinus*), levrek, (*Perca fluviatilis*), gölgebalığı, (*Thymallus thymallus*), deniz alası, alabalık (*Salmo trutta*) ve Arktik çar, (*Salvelinus alpinus*) gelmiştir. Al yönünden zengin ortama maruz bırakıldıklarında bütün türler arasında azımsanmayacak bir ölüm oranı gözlemlenmiş ve golyan balığı, kızılöz balığı ve denizalası türlerinde asidik Al yönünden fakir ortama ve kontrol ortamına maruz bırakıldıklarında da bir miktar ölüm oranı olduğu görülmüştür. Arktik çarda alüminyuma karşı yüksek dayanım gözlemlenirken, levreğin alüminyuma karşı beklenilenden daha fazla duyarlı olduğu gölge balığında ise sudaki alüminyuma karşı ilk kez toksik etki bildirilmiştir. Kontrollü deneysel çalışmalar sayesinde elde edilen sonuçlar, tatlı su balık türleri için alüminyumun asitli suların toksisitesi açısından önemli bir faktör olduğunu doğrulamaktadır [67].

Hidroksialuminosilikatların balıklardaki toksisitesi üzerine yapılan bir çalışmada balıklardaki akut alüminyum zehirlenmesinin silikon ile bertaraf edilmesinde hidroksialuminosilikatların büyük rolü olduğunu kanıtlanmıştır [68].

Toksik alüminyum ve düşük pH'ın gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*) larvasının solungaç gelişimine etkileri incelenmiş, yalnız düşük pH ve yalnız alüminyuma maruz bırakılan larvaların solungaçları normal bir gelişme göstermekle birlikte filament uçlarında hafif bir kalınlaşma gözlenmiştir. Alüminyum ve düşük pH kombinesine maruz bırakılan larvalarda filamentler tamamen kalınlaşmış, kısalmış ve birbirine yapışık durumdayken, lameller sadece filamentlerin alt kısmında mevcut olup, filamentlere yapışık durumdadırlar. Filament ve lamella uzunluğu, her bir filamentte ki lamella sayısı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede ($P < 0.001$) düşük bulunmuştur [69]. Bizim çalışmamızda $AlCl_3$ uygulanan balıkların doz artışına bağlı olarak filament uçlarında kalınlaşma gözlenmiştir.

Salmo salar balıkları üzerinde yapılan bir çalışmada, balıklar üç yapay kanaldan tutulup, solungaçlarındaki morfometrik inceleme araştırılmıştır. Bir kanaldaki suya işlem yapılmazken (ortalama pH 6.25); diğerlerine asit ilavesi (ortalama pH 5.6) ya da asit ve alüminyum (ortalama pH 5.5; ortalama değiştirilebilir Al 158 f.j.g litre⁻¹) ilavesi yapıp 16 ile 23 gün sonrasında solungaçları incelenmiştir. Primer lamellerdeki klorid hücreleri her iki deneysel işlemde kontrol grubundaki balıklara göre daha fazla bulunmuştur. Buna karşılık ikincil lamellerdeki klorid hücrelerinin sayısı sadece Al katkısı olmaksızın aside maruz kalan balıklarda artmıştır. Klorid hücre büyüklüğü ve şekli de zaman ve işlem ile değişiklik göstermiştir. Asit ve Al'a maruz kalmış balıklarda kontrol grubundakilerden daha az mukoz hücresi bulunmuştur. Alım arttırılarak sağlanan klorid hücre çoğalması ve yapısal değişiklikler düşük pH gerilimli artan iyonik akıntıları telafi etmeye yönelik bir girişimi açıklıyor olabilir. Ancak, Al konsantrasyonları yüksekse klorid hücreleri ikincil lameller boyunca çoğalmaz ya da çoğalan hücreler zarar görür ve kaybolur. Bu, iyon alımını artırma potansiyelini kısıtlayabilir [70].

Sonuç olarak, sucul ortamlara düşük miktarlarda da olsa alüminyuma karışması durumunda, ortamda yaşayan balıklar üzerine toksik etki yapabileceği sonucuna varılmıştır. Bu nedenle, Alüminyumun sucul ortamlara karışmaması için endüstri bölgelerinde önlemler alınması gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Güley, M. , Vural, N. , “Toxicology”, *Ankara University Faculty of Pharmacy Publication*, No: 48 (1987).
- [2] Yıldız, K., Sipahioglu, S., Yılmaz M., “Çevre bilimi”. *Gündüz Eğitim ve Yayıncılık*, Ankara, 26-28, 104-107 (2000).
- [3] Seregin, I.V. and Ivanov, V.B., “Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants”, *Russian Journal of Plant Physiology*, 48(4): 523-544 (2001).
- [4] Nussey, G., J.H.J. Van Vuren and H.H. Du Preez, “Effect of copper on haematology and osmoregulation of the mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae)”, *Comp. Biochem. Physiol.*, 111 (c): 369-380 (1995).
- [5] Wepener, V. , J.H.J. , Van V Vuren and H.H. Du Preez, “Uptake and distribution of a copper, iron and zinc mixture in gill, liver and plasma of a freshwater teleost *Tilapia sparmanii*”, *Water SA* 27(1): 99-108 (2001).
- [6] Merlini, M. , “Heavy metal contamination , in impingement of man on the Oceans”, *London and Newyork* , 461-468 (1971).
- [7] Förster, G., Wittmann. T., “Metal Pollution in the aquatic environment, Berlin heidelberg”, *Newyork Springer Verlag* , 3(21), 271-318 (1981).
- [8] Ting, Y.P., Lawson ,F., and Prince I.G., “Uptake of cadmium and zinc by the alga *Chlorella vulgaris* II Multi-ion stiation”, *Biotechnol. Bioeng.* 37: 445-455 (1991).
- [9] Holan, Z.R., Volesky, B. and Prasetyo, I. “Biosorption of cadmium by biomass of marine algae”, *Biotechnol. Bioeng.* 41: 819-825 (1993).
- [10] Wegrzyn, G. And Czyz, A., “Detection of mutagenic Pollution of natural environment using microbiological assays”, *Journal of Applied Microbiology*, 95: 1175-1181 (2003).

- [11] Turan, C., Genetik. “Populasyonlarda allel frekansı değişikliğine sebep olan faktörler”, *Mustafa Kemal Üniversitesi,Su Ürünleri Fakültesi Ders Kitabı* ISBN 128-2, Hatay 2002.
- [12] <http://www.suvakfi.org.tr/>(18.03.2008).
- [13] Lall, P.S., The Minerals. In: Halver E. J., (ed), “ Fish nutrition”, *Academic Press Inc.* Sandiago, USA, 219-256, (1989).
- [14] Ginneken, V.L., Chowdhury J.M., Blust, R., Environmental Toxicology and Chemistry,18,2295-2304, (1999).
- [15] Kargın, F. and Erdem, C., “accumulation of copper in liver, spleen, stomach, intestine, gill and muscle of *cyprinus carpio*”, *Doğa Tr.J. of Zool.*,15, 306-314, (1991).
- [16] Aydınlı, D., “Biyolojik materyalde alüminyumun nicel olarak saptanması”, Bilim uzmanlığı tezi, *Hacettepe üniversitesi, sağlık bilimleri enstitüsü* ,(1988).
- [17] Kirk, E.R., ve Othmer, F.D., “Encyclopedia of chemical technology”, Vol 1, *Johnwiley and Sons. Interseience Publishers*, (1947).
- [18] Kasaplar, G., “Alüminyum yüzeyindeki oksit tabakasının okzalik asit anodizing yöntemiyle geliştirilmesi”, *Çukurova Üniversitesi, Fen bilimleri enstitüsü*, (2007).
- [19] www.gencmuhendisler.com.tr (18.12.2008).
- [20] Browning, E., “Toxicity of industrial metals, butter worths, 2nd ed, london, 3. bukowska, b. and kowalska, s., 2004. phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes”, *Toxicol. Lett.*, 152(1), 73-84, (1969).
- [21] Huang, J.W., Pellet, D.M., Papernik, L.A., and Kochion, L.V., “Aluminum interactions with voltage-dependent calcium transport in plasma membrane vesicles isolated from roots of aluminum- sensitive and-resistant wheat cultivars”, *Plant physiol.* 110: 561-569, (1996).

- [22] Tolr'a, R.P., Poschenrieder, C., Luppi, B., Barcel, J., "Aluminium- induced changes in the profiles of both organic acids and phenolic substances underlie Al tolerance in *Rumex acetosa* L." *Environmental and Experimental Botany* 54, 231-238, (2005).
- [23] Sjögren, B., Lidums, V., "Aluminium in the blood and urine of industrially exposed workers", *Br.J. Ind. Med.*, 40, 301-304, (1983).
- [24] Greger J.L. "Aluminium Metabolism", *Annu. Rev. Nutr.* 13:43-63, (1993).
- [25] Gonzalez M.A., Roma M.G., Bernal C.A., Alvaraz M.L., Carrillo M.C., "Biliary secretory function in rats chronically intoxicated with aluminium", *Toxicological Sciences*. 79, 189-195 (2004).
- [26] Ganrot, P.O., "Metabolism and possible health effects of aluminium," *Environmental Health Perspectives*. 65: 363-441, (1980).
- [27] Mohammed A., Mayyas I, Elbetieha A., Shoeter A., Khamas W., Elnasser Z., "Toxicity evaluation of aluminium chloride on adult female mice", *J. of Anim. and Vet. Adv.* 7 (5) : 552-56 (2008).
- [28] Berlyne, G.M., Ben-Ari, J., Pest, D., Weinberger, J., Stern, M., Gilmore, G.R., Levine, R., "Hyperaluminemia from aluminium resins renal failure", *Lancetii*, 494-496, (1970).
- [29] Clarkson, E.M., Luck, V.A., Hynson, W.V., Bailey, R.R., Eastwood, J.B., Woodhead, J.S., Clements, V.R., O'Riordan, J.L.H., De Wordener, H.E., "The Effect of aluminum balances, the serum parathyroid hormone concentration and the aluminium concentration and the aluminium content of bone in patients with chronic renal failure", *Clin. Sci.* 43, 519-531 (1972).
- [30] Biswas, C.K., Arze, R.S., Ramos, J.M., Ward, M.K., Dewar, J.H., Kerr, D.N.S., Kenward, D.H., "Effect of aluminium hydroxide on serum ionised calcium, immunoreactive parathyroid hormone, and aluminium in chronic renal failure", *Br. Med. J.*, 284, 776-778 (1982).

- [31] Keshavah, P., Leuhmann, D., “The importance of water treatment in haemodialysis and haemofiltration”, *Proc ED-TA-ERA* 21, 111-128, (1984).
- [32] Jouhanneau P., Eaisbeck M.G., Yiou F., Lacour B., Banide H., Drüeke B. T., “Gastrointestinal absorption, tissue retention, and urinary excretion of dietary aluminium in rats determined by using”, *Clinical Chemistry*. 43:6 1023-1028 (1997).
- [33] Beynon H., Casidy M.J.D., “Gastrointestinal Absorption of Aluminium”, *Nephron*, 55:235-236 (1990).
- [34] Ganrot, P.O., “Metabolism and possible health effects of aluminium”, *Environ Health Presp.*, 65, 363-441, (1986).
- [35] Tsuchiya, K., “Aluminium handbook on the toxicology of metals, specific metals de”, vol 2 Ed :L. Friberg, G.F. Nordberg, V.B. Elsevier Amsterdam, 1 (1986).
- [36] Greger, J.L., Baier, M.J., “Excretion and retention of low or moderate levels of aluminium by human subjects”, *Food Chem. Toxicol.*, 21, 473-477, (1983).
- [37] Casarett, L.J., “Toxicology, the basic science of Poisons”, *Mac millan Publishing Co., Inc.*, New York (1980).
- [38] Burnatowska- Hledin, M., Ebner, K.V., Mayor, G.H., “In vivo and in vitro effects of aluminium treatment on rat liver mitochondrial function”, *Biol. Trace Elem. Res.*, 10, 235-242, 2(1986).
- [39] Ondreicka R., Ginter E., Kortus J., “Chronic toxicity of aluminium in rats and mice and its effects on phosphorus metabolism”, *Brit. J. Industr. Med.*, 23, 305 (1966).
- [40] Kowalczyk E., Kopff A., Kedziora J., Blaszczyk J., Kopff M., Niedworok J., Fijalkowski P., “Effect of long- term aluminium chloride intoxication on selected biochemical parameters and oxidative-antioxidative balance in experimental animals”, *Polish J. Of Environmental Studies*, 13 (1): 41-43, (2004).

- [41] Exley, C., “A vexing Commentray on the important issue of aluminium and Alzheimer disease”, *Journal of Alzheimer’s Disease*, 10 (4): 451-2, (2006).
- [42] Yasushi, N., Toshiro, K., Tomomi, Y., Mutsuo, H., Akira, M., Takefumi, Y., Toru, I., “Aluminum chloride does not facilitate deposition of human synthetic amyloid β 1-42 peptide in the rat ventricular system of a short-term infusion model”, *Neuropathology* 25 (3) : 195-200, (2005).
- [43] Güven, K., “Biyokimyasal ve Moleküler Toksikolojisi”, *Dicle Üniversitesi Basımevi*, 2005,Diyarbakır (1999).
- [44] Klatzo I., Wisniewsk, H., Streicher, E., “Expermental production of neurofibrillay degeneration I: Light microscopic observations”, *J. Neuropathol Exp. Neurol*, 24:187-196,(1965).
- [45] Mann D.M., “changes in protein synthesis alzheimer disease”, *B. Reisberg* (Ed), New york, Free Press, s.107-115,(1983).
- [46] Mann DM, Neory, D., Yates P.N., “Alterations in protein synthethic cabability of nerve cells in Alzheimer disease”, *J.Neurol Neurosurg Psycihartry*, 44:97-102, (1981).
- [47] Gannata, J.B., Junor, B.J.R., Briggs, J.D., et al., “Effect of acute aluminium overload on calcium and Parathyroid-hormone metabolism”, *Lancet*, 501-503, (1983).
- [48] Şahin, G., Dur S. “Alüminyum toksisitesi”, *Yeni Tıp Dergisi*, 11 (3) , 23 -32 (1994).
- [49] Parkinson, I.S.,Ward, M.K.,Kerr, D.N.S., “Dialysis encephalopathy, bone disease and anemia”, *J.Clin Pathol*, 34 : 1285-1294, (1981).
- [50] Winship, K.A., “Toxicity of aluminium, ahistorical review”, past 2. Adverse *Durg React Toxicol Rev*, 12(3) :177-211, (1993).

- [51] Driieke, T.B., “A dynamic bone disease, anemia, resistance to erythropoietin and iron-aluminium interaction”, *Nephrol oial Transplant.*, (suppl.1): 12-16, (1993).
- [52] Kuru, M., “Omurgalı hayvanlar”. *Atatürk Üniversitesi Yayınları*, Erzurum, No:646, s735 (1987).
- [53] Geldiay, R., Balık, S., “Türkiye tatlısu balıkları IV Baskı”, *Ege Üniv. Fen Fak. Kitaplar Serisi*, No:9, İzmir, s361-s367(1988).
- [54] Yılmaz,M., Ersan,Y., Karaman , M., Koç, E., and Necefoğlu, H., “Toxic effects of cobalt parahydroxy-benzoate on tissue histopathology and serum proteins in *Capoeta capoeta capoeta*”, *Fresenius environmental bulletin*, 17(9a), 1322-1327 (2008).
- [55] Robert, R., Michael, J.D., “Enzyme assays”, *Oxford University Pres.* Newyork: 225-332, (1993).
- [56] Laemmli, U.K., “Cleavage of structural proteins during the assemble, of the head of bacteriophage”. *T4, Nature*, 227,680 ,(1970).
- [57] O’Farrell, P.H., “High resolution two-dimensonal electrophoresis of biological properties and significance”. *Comp. Biochem. Physiol.*, 88 M, 497-501, (1975).
- [58] Weber, K., Pringle, J., Osborn, M., “Measurment of molecular weights by electrophoresis on sds- acrylamide gel”. *Meth. Enzymol.*, 26,3 (1972).
- [59] Vosyliene, M.Z., “The effect of heavy metals on haematological indices of fish (Survey)”. *Acta Zoologica. Hydrobiologia.* Vol. 9, No.2. 76-82, (1999).
- [60] Cicik, B. “Bakır-Çinko etkileşiminin sazan (*Cyprinus carpio L.*)’nın karaciğer solungaç ve kas dokularındaki metal birikimi üzerine etkileri”, *Çevkor ekoloji çevre dergisi* 12, 48 32-36, (2003).
- [61] Kito, H., Ose, Y., Sato, T., “Cadmium-binding protein (Metallothionein)’in Carp”. *Environmental Health Perspectives*, 65, 117-124, (1986).

- [62] Shaw, B.J., Handy, R.D. “Dietary copper exposure and recovery in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*”. *Aquatic Toxicology*, 76 ,111–121, (2006).
- [63] 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).
- [64] Lindesjö, E., Thulin, J. “Histopathology of skin and gill of fish in pulp mill effluents”. *Diseases of aquatic organisms*.18, 81-93, (1994).
- [65] Exley, C. “Aluminium in the brain and heart of the rainbow trout”. *Journal of biology*, 48, 706-713, (1996).
- [66] Krasovskii,N.G., Vasukovich, Y.L., and Chariev,G.O., “Experimental study of biological effects of lead and aluminium following oral administration” *Environmental health perspectives*, 30, 47-51,(1979).
- [67] Poleo, B.S.A., Ostbye, K., Oxnevad, A.S., Andersen, A.R., Heibo, E., and Vollestad, A., “Toxicity of acid aluminum-rich water to seven fresh water fish species: a comparative laboratory study” *Environmental pollution*, 96(2), 129-139, (1997).
- [68] Exley, C., Pinnegar, K.J., and Taylor, H., “Hydroxyaluminosilicates and acute aluminium toxicity in fish”, *J. Theor.biol.* 189, 133-139, (1997).
- [69] Çalta, M. “The effects of toxic aluminium and low ph on gill development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss, Walbaum*) larvae”. *Tr. J. of zoology*, 23, 285-291, (1999).
- [70] Jagoe, H.C.,and Haines, A.T., “Changes in gill morphology of atlantic salmon smolts due to addition of acid and aluminum to stream water”, *Environmetal pollution*, 97(1-2) 137-146 (1997).

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: **SEVDA GÖĞTEPE**

Doğum Yeri: **BAKIRKÖY**

Doğum Tarihi: **12.01.1987**

Medeni Hali: **BEKAR**

Yabancı Dili: **İNGİLİZCE**

Eğitim Durumu(Kurum ve Yıl)

Lise : **MEHMET NİYAZİ ALTUĞ LİSESİ**

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

Yüksek Lisans: **KAFKAS ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİDROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI.**