



TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

POLİAROMATİK HİDROKARBONLARIN (PAH)
BALIKLARDAKİ KANSEROJEN ETKİSİ
VE
BUNA BAĞLI OLARAK DNA'DA OLUŞAN
AROMATİK DNA - EKLEMELERİ

1997-1287

PROJE NO:YDABÇAG-35

Yer Deniz Atmosfer Bilimleri ve
Çevre Araştırma Grubu

Earth Marine Atmospheric Sciences and
Environmental Researches Grant Group

**POLİAROMATİK HİDROKARBONLARIN (PAH)
BALIKLARDAKİ KANSEROJEN ETKİSİ
VE
BUNA BAĞLI OLARAK DNA'DA OLUŞAN
AROMATİK DNA - EKLEMELERİ**

1997-1287

PROJE NO:YDABÇAG-35

YÜRÜTÜCÜ: PROF. DR. MUSTAFA ÜNSAL

Arş.Gör. FATMA TELLİ KARAKOÇ

Yd.Doç. Dr. ABDULLAH TULİ

Mr. ALAN HEWER

Prof. ALEC F. GAINES

Prof. GÜNEŞ YÜREĞİR

Prof. DAVID PHILLIPS

ODTÜ
Deniz Bil. Enst.

İçel

S-46

R-16

Tr. En

**MART 1997
Erdemli- MERSİN**

**POLİAROMATİK HİDROKARBONLARIN (PAH)
BALIKLARDAKİ KANSEROJEN ETKİSİ
VE
BUNA BAĞLI OLARAK DNA'DA OLUŞAN
AROMATİK DNA - EKLEMELERİ**

1997-1287

PROJE NO: YDABÇAG-35

YÜRÜTÜCÜ: PROF. DR. MUSTAFA ÜNSAL

Arş.Gör. FATMA TELLİ KARAKOÇ

Yd.Doç. Dr. ABDULLAH TULİ

Mr. ALAN HEWER

Prof. ALEC F. GAINES

Prof. GÜNEŞ YÜREĞİR

Prof. DAVID PHILLIPS

ODTÜ
Deniz Bil. Enst.

İçel

S-46

R-16

Tr. En

**MART 1997
Erdemli- MERSİN**

ÖNSÖZ

TÜBİTAK desteğinde yürütülen “**Poliaromatik Hidrokarbonların (PAH) balıklardaki Kanserojen Etkisi ve Buna Bağlı olarak DNA’da Oluşan Aromatik DNA Eklemeleri**” projesi, ODTÜ-Erdemli Deniz Bilimleri Enstitüsü, İngiltere’de Haddow Laboratories Institute of Cancer Research ve Çukurova Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı (Ç.Ü.,SBE-BKABD) tarafından müşterek olarak yürütülmüştür. Ayrıca örnek alımında Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Trabzon Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü’nün teknelerinden önemli ölçüde yararlanılmıştır. Katkılarından dolayı bu kuruluşlara teşekkür ederiz.

Bu rapor yukarıda adı geçen proje ile ilgili 01.11.1994 - 01.11.1996 tarihleri arasında yapılan alan ve laboratuvar çalışmalarının sonuç ve yorumlarını içermektedir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Tablolar listesi	v
Şekiller listesi	vii
Özet ve Anahtar Kelimeler	viii
Summary and Key Words	x
1. Giriş	1
2. Projeyi destekleyen ve işbirliği yapılan kuruluşlar	4
2.1. Türkiye Bilimsel Araştırma Kurumu-TÜBİTAK	4
2.2. Institute of Cacer Research	4
2.3. Ç.Ü. Sağlık Bilimleri Enst. Biyokimya Anabilim Dalı	5
2.4. Orta Doğu Teknik Üniversitesi	
Deniz Bilimleri Enstitüsü	5
3. Projenin Amaçları	6
4. Projede Uygulanan Metodlar	8
4.1. Örneklerin toplanması ve saklanması	8
4.2. DNA izolasyonu	8
4.2.1. Kandan DNA izolasyonu	8
4.2.2. Balık Karaciğerinden DNA izolasyonu	9
4.3. Aromatik DNA -eklemelerinin belirlenmesi.....	10
4.4. Balık Karaciğerinde PAH ölçümü	13
5. Elde Edilen Bulgular	14
5.1. Balık Türlerinde Aromatik DNA-eklemelerinin	
saptanması	14
5.1.1. Kefal balığı	14
5.1.2. Çaçı balığı	15
5.1.3. Mezgıt balığı	16
5.1.4. Babun balığı	17
5.1.5. Pisi balığı	18

5.1.6. ODTÜ-Deniz Bilimleri limanından yakalanan	
Kefal balığı	18
5.2. Farklı balık türlerinde tespit edilen aomatik DNA-eklemelerinin	
karşılaştırılması	19
6. Karşılaşılan Güçlükler	23
7. Sonuçlar	24
8. Harcamalar	25
9. Referanslar	26

TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
1. 1994 yılında Karadeniz'den avlanan balık örneklerine ait biyolojik parametreler (seks, boy, ağırlık) ve aromatik DNA-eklemeleri ölçüm sonuçları (adduct/10 ⁸ nükleotid).....	29
2. 1995 yılında Karadeniz'den avlanan balık örneklerine ait biyolojik parametreler (seks, boy, ağırlık) ve aromatik DNA-eklemeleri ölçüm sonuçları (adduct/10 ⁸ nükleotid).....	30
3a. 1996 yılında Karadeniz'den avlanan balık örneklerine ait biyolojik parametreler (seks, boy, ağırlık) ve aromatik DNA-eklemeleri ölçüm sonuçları (adduct/10 ⁸ nükleotid).....	31
3b. 1996 yılında Karadeniz'den avlanan balık örneklerine ait biyolojik parametreler (seks, boy, ağırlık) ve aromatik DNA-eklemeleri ölçüm sonuçları (adduct/10 ⁸ nükleotid)	32
3c. 1996 yılında Karadeniz'den avlanan balık örneklerine ait biyolojik parametreler (seks, boy, ağırlık) ve aromatik DNA-eklemeleri ölçüm sonuçları (adduct/10 ⁸ nükleotid)	33
4. 1995 yılında ODTÜ-DBE Limanından avlanan balık örneklerine ait biyolojik parametreler (seks, boy, ağırlık) ve aromatikDNA-eklemeleri ölçüm sonuçları (adduct/10 ⁸ nükleotid)	34
5. 1996 yılında ODTÜ-DBE Limanından avlanan balık örneklerine ait biyolojik parametreler (seks, boy, ağırlık) ve aromatikDNA-eklemeleri ölçüm sonuçları (adduct/10 ⁸ nükleotid)	34
6. Ocak 1996 yılında Karadeniz'den avlanan balıklarda ölçülen poliaromatik hidrokarbon (PAH) konsantrasyonları	35
7. 1996 yılında avlanan Kefal balığının kan ve karaciğerinde ölçülen aromatik DNA-eklemeleri ile boy, ağırlık ve karaciğerindeki PAH miktarı arasındaki ilişki	36
8. 1996 yılında avlanan Pisi balığının kan ve karaciğerinde ölçülen aromatik DNA-eklemeleri ile boy, ağırlık ve karaciğerindeki PAH miktarı arasındaki ilişki	36

9. 1996 yılında avlanan Barbun balığının kan ve karaciğerinde ölçülen aromatik DNA-eklemeleri ile boy, ağırlık ve karaciğerindeki PAH miktarı arasındaki ilişki 36
10. 1996 yılında avlanan Mezgıt balığının kan ve karaciğerinde ölçülen aromatik DNA-eklemeleri ile boy, ağırlık ve karaciğerindeki PAH miktarı arasındaki ilişki 37
11. 1996 yılında avlanan Çaçı balığının kan ve karaciğerinde ölçülen aromatik DNA-eklemeleri ile boy, ağırlık ve karaciğerindeki PAH miktarı arasındaki ilişki 37

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

1. Örnekleme istasyonları	39
2. İnce tabaka kromatografi kağıdında D1, D3 ve D4 çözeltilerinin yürüme yönleri	13
3. 1994 yılında Karadeniz'den avlanan Kefal (K), Çaçı (Ç), Mezgit (M) ve Tirsi (T) balıklarında ölçülen DNA - eklemeleri	40
4. 1995 yılında Karadeniz'den avlanan Pisi (P) ve Mezgit (M) DNA - eklemeleri	41
5a. 1996 yılında Karadeniz'den avlanan Mezgit (M) ve Pisi (P) balıklarında ölçülen DNA - eklemeleri	42
5b. 1996 yılında Karadeniz'den avlanan Kefal (K) ve Çaçı (Ç) balıklarında ölçülen DNA - eklemeleri	43
5c. 1996 yılında Karadeniz'den avlanan Barbun (B) balıklarında ölçülen DNA - eklemeleri	44
6. 1995 yılında ODTÜ-DBE Limanından avlanan Kefal (K) balıklarında ölçülen DNA - eklemeleri	45
7. 1996 yılında ODTÜ-DBE Limanından avlanan Kefal (K) balıklarında ölçülen DNA - eklemeleri	45
8a. 1996 yılında Karadeniz'den avlanan Kefal (K), Çaçı (Ç), ve Pisi (P) balıklarında ölçülen poliaromatik hidrokarbon (PAH) konsantrasyonları	46
8b. 1996 yılında Karadeniz'den avlanan Mezgit (M) ve Barbun (B) balıklarında ölçülen poliaromatik hidrokarbon (PAH) konsantrasyonları	46

ÖZET VE ANAHTAR KELİMELELER

Bu raporda, “**Poliaromatik Hidrokarbonların (PAH) balıklardaki Kanserojen Etkisi ve Buna Bağlı Olarak Oluşan Aromatik DNA-Eklemeleri**” adlı proje çerçevesinde Karadeniz’de yaşayan Kefal, Mezgit, Çaç, Barbun, Pisi, Tirsi ve referans bölge olarak seçilen ODTÜ-DBE Limanından avlanan Kefal balıklarında aromatik DNA-eklemeleri sonuçları yıllara göre verilmiştir.

Adı geçen proje, Türkiye Bilimsel Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)’ın parasal katkısı, İngiltere’den Institute of Cancer Research (ICR) ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı (Ç.Ü.-SBE-BKABD) laboratuvarları kullanılarak Orta Doğu Teknik Üniversitesi Deniz Bilimleri Enstitüsü (ODTÜ-DBE) tarafından yürütülmüştür.

Proje içeriğinde, Doğu Karadeniz Trabzon Havaalanı ve Yomra Limanından Aralık ve Ocak aylarında yılda bir kere ve üç yıl süre ile örnek-leme yapılmıştır. Örneklerde aromatik DNA-eklemelerinin farklı balık türle- rinde ve yıllara göre değişimleri incelenmiştir.

1996 yılında balıklarda ölçülen aromatik DNA-eklemeleri sonuçla- rına bakıldığında kandan ve karaciğerden elde edilen sonuçlar türlere göre farklılıklar göstermektedir. Karaciğer sonuçlarına göre en yüksek aromatik DNA-eklemesi ODTÜ-DBE Limanından avlanan ve referans balık olarak seçilen Kefal balığında ölçülmüştür. Kanda en yüksek değer ise Pisi balığında ölçülmüştür.

1996 yılında ölçülen poliaromatik hidrokarbon konsantrasyonu da yine türler arasında farklılık göstermektedir. Buna göre Kefal (40.2 ± 17.0 $\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık) ve Çaçı (40.2 ± 17.0 $\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık) balıklarında poliaromatik hidrokarbon (PAH) konsantrasyonu yüksek değerlerde ölçülmüşken, Pisi balığında ölçülen PAH konsantrasyonu oldukça düşük (11.5 ± 5 $\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık) düzeyde bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Kefal, Mezgit, Pisi, Barbun, Tirsi, Çaçı, Aromatik DNA-eklemeleri, Doğu Karadeniz.

SUMMARY AND KEY WORDS

The present report includes the annual changes of aromatic DNA-adducts in Grey mullet, Whiting, Sprat, Red Mullet, Flounder and Twaite Shad living in the eastern Black Sea and in Grey mullet living in the METU-IMS Harbour chosen as a reference area. These studies were carried out within the framework of the project **“The Carcinogenic Effects of Polyaromatic Hydrocarbons on Fish and Aromatic Adduct Formation in DNA”**

The project was conducted by the Middle East Technical University, Institute of Marine Sciences with the financial support of the State Planning Office, Turkish Scientific and Technical Research Council (TÜBİTAK) and in collaboration with the Institute of Cancer Research (ICR) and Çukurova University, Institute of Health Sciences, Department of Biochemistry (Ç.Ü, HIS-DB).

During this project, fish samples were taken offshore near Trabzon Airport and from Yomra Harbour in the eastern Black Sea in December and/or January of each year for a period of three years (1994, 1995 and 1996). The yearly variation of aromatic DNA-adducts was studied in different fish species.

In 1996, the concentrations of aromatic DNA-adducts obtained from blood and liver samples showed species-dependent changes. The highest aromatic DNA-adduct concentration in livers was measured in Grey mullet collected from METU-IMS Harbour, the chosen reference area though this was lower than DNA-adduct concentrations observed in Mersin Harbour. The highest adduct value in the blood was found in Flounder.

The Polyaromatic Hydrocarbon (PAH) concentrations measured in 1996, showed variations among fish species; high concentrations were measured in Grey mullet ($40.2 \pm 17.0 \mu\text{g/g}$ dry weight) and in Sprat ($35.1 \pm 22.0 \mu\text{g/g}$ dry wt.), while the Flounder contained the lowest value ($11.5 \pm 5.0 \mu\text{g/g}$ dry wt.).

Key words: Grey mullet, Whiting, Flounder, Red mullet, Twaite shad, Sprat, Aromatic DNA-adducts, Eastern Black Sea.

1. GİRİŞ

M.Ö 4000 yıllarında Hippokrates yaptığı deneylerle kanserleşmeyi tespit edip adına yunanca *Karkinoma* demiştir. Bu kelime latince *Cancer* kelimesinin karşılığıdır. Kanser hakkındaki ilk bilgiler, endüstri devriminden önce maden ve metal işlerinde çalışan işçilerde yoğun olarak akciğer kanserine rastlanmasından sonra ortaya çıkmıştır (Giles, 1996).

Poliaromatik hidrokarbonlar (PAH) doğadaki tam olarak yanmamış fosil yakıtların bir ürünü olarak ortaya çıkar (Lunde ve Bjorseth, 1977, bkz. Giles ve ark., 1996). Kanser yapan PAH'lar metabolik olarak endoplazmik retikulum mikrozomlarında bulunan mixed function oxidaz (MFO) enzim sistemi yardımıyla epoksidlere dönüşürler ve oluşan bu gruplar çok aktif olup kovalent bağlarla DNA, RNA, proteinler vb. bağlanırlar ve aromatik DNA-adduct'larını (DNA-eklemeleri'ni) oluştururlar (Geacintov ve ark., 1982; Gupta ve Earley, 1988; Masento ve ark., 1989; Phillips ve ark., 1990; Giles ve ark, 1995, 1996). Bu DNA-eklemeleri canlı vücudunda kanser başlangıcının en önemli basamaklarından biridir.

³²P-sondan ekleme (postlabelling) tekniği oldukça hassas, spesifik olmayan (non-specific) bir metod olup aromatik DNA-eklemeleri'nin tespiti için kullanılır (Gupta ve ark., 1982; Phillips ve ark., 1986; Schoket ve ark., 1990).

Xenobiotiklerin (canlı organizmaya zarar veren maddeler) özellikle free radical (serbest kökler) oluşturanlarının ara , ya da son ürünlerinin kanser etkisi 1940'lardan beri bilinmektedir (Mason ve ark., 1982). Dünya üzerindeki sucul ortamlar gün geçtikçe daha fazla miktarlarda xenobiotik'le kirlenmektedir. Bu nedenle denizlere, nehirlere, göllere giren yabancı maddeler ve bunların canlı sistemlere yapmış olduğu zararlar hakkında bilim

adamları yoğun bir şekilde çalışmalarını sürdürmektedir. Bu çalışmalarla son yıllarda balıklarda tümör oluşumlarının arttığı tespit edilmiştir. Bu nedenle xenobiotiklerin canlı organizma tarafından alınması, vücuttaki dağılımı, belirli yerlerde birikimi metabolize oluşu ve dışarı atılması hakkında da çalışmalar yapılmıştır (Neff 1979, Hun ve Allen, 1974 in Balk ve ark., 1984).

Benzo(a)pyrene PAH'lar arasında üzerinde en çok çalışılan ve hem memelilerde hemde balıklarda oldukça yüksek kanserojen etkisi olduğu bilinen bir xenobiotiktir (Neff, 1979; Balk ve ark., 1984). Benzo(a)piren ve birçok PAH denizlere atmosfer, karalardan denizlere akan her türlü su kaynakları (nehirler, dereler v.s) ve sucul ortamlara petrolün doğrudan akmasıyla ulaşır.

Yukarıda da anlatıldığı gibi deniz ortamlarının gün geçtikçe daha da çok kirlenmesi ve denizsel besin kaynaklarının insan sağlığı için risk oluşturması bu konu üzerine daha da çok eğilmeyi gerektirmiştir. Denizlerdeki kirlenmenin miktarını deniz suyunda ölçmek çoğu zaman mümkün olmayabilir. Bu nedenle oluşan kirliliği akümüle eden canlılarla çalışmak hem yapılan çalışmayı anlamlı hale getirir hemde var olan tehlikeyi algılamakta kolaylık sağlar.

Proje çalışmalarında farklı ortamlarda yaşayan ve farklı besinlerle beslenen beş balık türü kullanılmıştır:

Mezgit Balığı (*Merlangius merlangus euxinus*); Genellikle kıyı sularında çamurlu sedimanda yaşarlar. Yaşadıkları derinlikler 30-120 m arasında olmasına karşın genellikle en çok tercih ettikleri derinlik 85 m. civarındadır. Genel olarak çaça, hamsi, barbun, küçük kabuklular ve kurtlarla beslenirler. Beslenme alışkanlıkları mevsime göre değişir (Fisher, 1973 ve İşmen, 1995).

Çaça Balığı (*Sprattus sprattus phalericus*); Pelajik bir tür olan Çaça balığı sürüler halinde hareket ederler. Mevsimsel göçleri vardır. Zooplankton (kopepod), balık yumurtaları başlıca besin kaynaklarıdır (Fisher, 1973 ve Avşar, 1993).

Pisi Balığı (*Platichthys flesus luscus*); Karadenizde yaşayan bir türdür. Sığ ve yumuşak deniz diplerinde yaşarlar. Acı sularda yaşamayı tercih ederler. Besinlerini kabuklular, küçük yumuşakçalar ve kurtlar oluşturmaktadır (Fisher, 1973).

Kefal Balığı; Sığ sularda gruplar halinde yaşarlar. Yaşama alanları oldukça geniştir, lagünler, acı sular, farklı tuzluluktaki denizlerde rahatça yaşayabilirler. Bu çalışmada *Lisa ramada*, *Oedolechilus labeo*, ve *Mugil saliens* türleri kullanılmıştır. Dipte yaşayan canlılar, planktonik organizmalar, askıda organik maddelerle beslenirler (Fisher, 1973).

Barbun Balığı (*Mullus barbatus ponticus*); Sığ sularda kumlu ve çakıllı diplerde yaşar. Tercih ettikleri ortalama derinlik 30m dir. Küçük kabullular (kurt ve yengeç) başlıca besin kaynaklarıdır (Fisher, 1973).

Tirsi Balığı (*Alosa fallax nilotica*); Pelajik deniz balığıdır. Gruplar halinde bulunurlar ve göç ederler. Küçük balıklar, zooplanktonlar temel besin kaynağıdır (Whitehead ve ark., 1989).

2. PROJEYİ DESTEKLEYEN VE İŞBİRLİĞİ YAPILAN KURULUŞLAR

Projeyi destekleyen ve işbirliği yapan kuruluşlar şunlardır:

- Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TUBİTAK)
- Orta Doğu Teknik Üniversitesi-Erdemli Deniz Bilimleri Enstitüsü (ODTÜ-DBE)
- Institute of Cancer Research - İngiltere
- Çukurova Üniversitesi- Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı (Ç.Ü.- S.B.E., B.A.B.D.)

2.1. TÜRKİYE BİLİMSEL ve TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU-TÜBİTAK

Çalışma Türkiye Bilimsel ve Tekni Araştırma Kurumu bünyesindeki Yer Deniz Atmosfer Bilimleri ve Çevre Araştırma Grubu (YDABÇAG) tarafından YDABÇAG-35 Projesi kapsamında desteklenmiştir.

2.2. INSTITUTE OF CANCER RESEARCH (Kanser Araştırma Enstitüsü)

İngiltere'deki bu enstitü, 1993 ve 1994 yıllarında balıklardan izole edilerek gönderilen DNA örneklerinde aromatik DNA eklemelerini saptamıştır. 1995 yılında 60 tane örnek yine bu laboratuvarda analiz edilmiştir. 1996 yılında toplanan yaklaşık 150 örnek ODTÜ-DBE tarafından yine aynı enstitünün alet ve kimyasalları kullanılarak analiz edilmiştir.

2.3. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI (Ç.Ü.- SBE-BKABD)

1996 yılına kadar olan tüm laboratuvar çalışmaları bu enstitünün laboratuvarlarında yapılmıştır.

2.4. ORTA DOĞU TEKNİK ÜNİVERSİTESİ DENİZ BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

1996 yılındaki son örneklemede toplanan balıklardan DNA izolasyonu bu enstitüde yapılmıştır. Ayrıca projenin tüm ara raporları yine bu enstitü tarafından hazırlanıp TUBİTAK'a sunulmuştur.

3. PROJENİN AMAÇLARI

Poliaromatik hidrokarbonların (PAH) doğada var oluş kaynakları doğal olarak, petrol ve insan (anthropogenic) kökenlidir. Su ve deniz ortamında var olma sebebi ise insan kaynaklıdır (Cossa ve ark., 1983). Bazı poliaromatik hidokarbonların ise yüksek oranda kanserojen oldukları bilinmektedir (Dipple, 1976; Gelboin ve Pop, 1981; IARC, 1978; Crouch ve Harshbager, 1985; Stein ve ark., 1990; Phillips ve ark., 1995). PAH'lar oksitlenerek hidodiol ve hidrodol epoksitlere dönüşürler ve oluşan bu yapılar kovalent bağla DNA'ya bağlanarak aromatik DNA-eklemeleri (aromatic DNA-adducts) oluştururlar (Hawkins ve ark., 1990; Ashurst ve ark., 1983; Phillips ve ark., 1986; Varanasi ve ark., 1989). Oluşan bu DNA-eklemeleri DNA'nın kendini onarma yeteneğine bağlı olarak geri dönüşümlüdür yani DNA kendini onararak normal hale dönebilir. DNA hasarlı kısımlarını enzimler yardımıyla tamir etme yeteneğine sahiptir. Bu tip tamirler genelde ultraviyole ışınlarının neden olduğu hasarlar ve kimyasalların oluşturdukları DNA-eklemelerinde görülür (Bohr ve ark., 1987). Kalıcı aromatik DNA-eklemeleri ise kanser oluşumunun başlangıcıdır. PAH'ın *in vivo* olarak metabolize oluşu canlılarda (örneğin, insanda ve balıkta) birbirine benzemektedir (Varanasi et al., 1989).

Yukarıdaki bilgilerin ışığında bu projenin uzun vadede amacı;

- Kansere neden olan poliaromatik hidrokarbonların balıktaki mekenizmasının belirlenmesi,
- İnsandaki kanser biyokimyası ve fizyolojisinin belirlenmesinde hangi balığın model olarak kullanılabileceği şeklinde özetlenebilir.

Temel amacı ise;

- Karadenizde yaşayan balıklardaki PAH konsantrasyonu ile aromatik DNA eklemelerinin oluşumu arasındaki ilişkiyi belirlemek,

- Türk karasularında kanserojen maddelerin DNA üzerindeki kanser etkisini kolayca görebileceğimiz balık türlerini seçmek ve
- Balıklarda aromatik DNA-eklemeleri ile yaşam için gerekli olan enzimler arasındaki ilişkiyi belirlemektir.

4. PROJEDE UYGULANAN METODLAR

4.1. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI VE SAKLANMASI

Mezgit, Çaça, Barbun ve Pisi örnekleri Trabzon havaalanı açıklarından ve Kefal örnekleri Yomra'daki küçük limandan 1994,1995 ve 1996 Ocak-Şubat aylarında yılda 1 kez trol ya da gırgır ağlarıyla toplandı. Referans bölge olarak seçilen ODTÜ-DBE limanından alınan kefal örnekleri ise germe (mani) ağı ile avlandı. Toplanan balık örneklerinin karaciğerlerinde PAH, kan ve karaciğerinde aromatik DNA eklemeleri tespit edildi.

Canlı olarak yakalanan balıkların kuyrukları kesilerek kanları, içerisinde hazır olarak etilen diamintetra asetik asitli (EDTA) bulunan tüplere alındı, tüpler 5-6 kez alt-üst edilerek yavaşça karıştırıldı ve deney yapılıncaya kadar buz dolabında (+4 °C) saklandı. Kanı alınan balığın karaciğeri de çıkarılıp aliminyum folyoya sarılarak deney yapılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

4.2. DNA İZOLASYONU (AYRIMI)

DNA'nın balık kanından ve karaciğerinden izolasyon metodu temel olarak Gill ve ark. (1985) ve Gupta (1984) tarafından tanımlanmıştır. Araştırmada bu metotlar kullanılmıştır.

4.2.1. KANDAN DNA İZOLASYONU

a) 500 µl kan örneği 1.5 ml tampon çözeltinin (0.01 M Tris-HCl, 0.01 M EDTA, 0.1 M NaCl, %2 sodyum dodesil sülfat - SDS, pH 8.0) içine konuldu, üzerine 75-100 µl Proteinase K (10mg/ml) eklenerek 37 °C'de 1 gece inkube edildi,

- b) Örnek distile edilmiş eşit hacimde (~2 ml) fenol ile 5 dk. karıştırıldı ve 4000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi,
- c) Üstteki süpernatant (sıvı) kısmı alındı, 1 ml fenol ve 1 ml sevag (kloroform: izoamil alkol, 24:1) eklendi, tekrar 5 dk. karıştırılıp 10 dk. 4000 rpm' de santrifüj edildi,
- d) Yine üstteki süpernatant alındı ve 2 ml sevag ile aynı işlem tekrarlandı,
- e) Üstteki süpernatant fazına 0.1 hacim (200 µl) 5 M NaCl ve 1-2 hacim (2-4 ml) daha önceden -20 °C'de soğutulmuş etanol eklenerek DNA'nın çökmesi sağlandı. Çökelen DNA %70'lik etanol ile tekrar yıkandı,
- f) Bu DNA 2 ml 1/100'lük SSC (150 mM NaCl ve 15 mM Na-sitrat) içerisinde çözüldü,
- g) DNA'dan RNA artıklarını temizlemek için, 240 µl 50 mM Tris (pH 7.4) içerisine 30 µl RNase T1 (150 unit) ve 30 µl RNase A (300 µg) konuldu, hazırlanan çözeltiye DNA eklendi ve 37 °C'de 15 dk. inkübe edildi,
- e) Karışıma 1 hacim (~2ml) sevag eklenerek 5 dk. çalkalandı ve 4000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Daha sonra üstteki süpernatant kısmı alınarak aynı işlem bir kez daha tekrar edildi,
- h) DNA 2 ml 1/100'lük SSC içinde çözüldü ve -20 °C de saklandı.

4.2.2. BALIK KARACİĞERİNDEN *DNA* İZOLASYONU

- a) 0.5 g donmuş balık karaciğeri tampon çözeltinin (0.01M Tris-HCl, 0.01 M EDTA, 0.1 M NaCl , %2 SDS, pH 8.0) içinde homojenize edilip üzerine 100 µl Proteinase K (10 mg/ml) eklendi ve 37 °C'de 1 gece inkübe edildi,
- b) Distile edilmiş eşit hacimde (~2ml) fenol ile 5 dk. karıştırıldı ve 4000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi,
- c) Üstteki süpernatant (sıvı) kısmı alındı, 1 ml fenol ve 1 ml sevag (kloroform : izoamil alkol, 24:1) karışımı ile 5 dk. karıştırılıp 10 dk. 4000 rpm'de santrifüj edildi,

- d) Tekrar üstteki süpernatant alındı ve eşit hacimde (2 ml) sevag ile aynı işlem tekrarlandı,
- e) Üstteki süpernatant fazına 0.1 hacim (200 μ l) 5M NaCl ve 1-2 hacim (2-4 ml) daha önceden -20°C 'de soğutulmuş etanol eklenerek DNA' nın çökmesi sağlandı. Çökelen DNA, %70 lik etanol ile tekrar yıkandı ve 2 ml 1/100'lük SSC'de çözüldü,
- f) Çözünen balık karaciğer DNA'sını glikojenden ayırmak için 100,000 rpm'de 1 saat santrifüj edildi. Daha sonra RNA artıklarından temizlemek için 240 μ l 50 mM Tris (pH 7.4) içine 30 μ l RNase T1(150 unit) ve 30 μ l RNase A (300 μ g) eklenerek hazırlanan çözeltiye bu DNA eklendi ve 37°C 'de 15 dk. inkübe edildi,
- g) Karışıma 2 ml sevag eklenerek 5 dk. çalkalandı ve 4000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Daha sonra üstteki süpernatant kısmı için aynı işlem tekrarlandı,
- h) Elde edilen DNA 2 ml 1/100'lük SSC içinde çözüldü ve -20°C de saklandı.

4.3. AROMATİK DNA-EKLEMELERİNİN BELİRLENMESİ (ÖLÇÜLMESİ)

İzole edilen DNA'nın 230-260-280 nm dalga boylarındaki absorpsiyonu ölçüldü. 230/260 optik dansite oranının 0.390-0.420, 260/280 optik dansite oranının ise 1.85-1.88 aralığında olması DNA'nın saf ve veriminin yüksek olduğunu gösterir.

Aromatik DNA-eklemelerinin belirlenmesi için uygun DNA miktarı 4 μ g olup bu miktar 260 nm optik dansiteden hesaplandı; 260 \times 500 (500 sabitedir). Bu 4 μ g DNA kuruyuncaya kadar solvent (çözücü) uçuruldu ve daha sonra 1.2 μ l mikrokokal nükleas (MN) - spleen fosfodiesteraz (SPD) (0.12 U MN/ μ l + 1 μ g SPD) karışımı, 0.8 μ l CaCl₂-Na succinate (1:1)

karışımı ve 2.8µl saf su eklenerek 37 °C'de bütün gece inkübe edildi. Daha sonra eklemeli ve normal DNA'lar nuclease P1 veya butanol yöntemiyle birbirinden ayrıldı (extraction). Yapılan çalışmalarda her iki metod da kullanıldı. Butanol ekstraksiyonu çok zaman alıcı bir metod olmasına karşın balıklar için daha uygun olduğu düşünülerek rapora sadece butanol ekstraksiyon sonuçları konuldu.

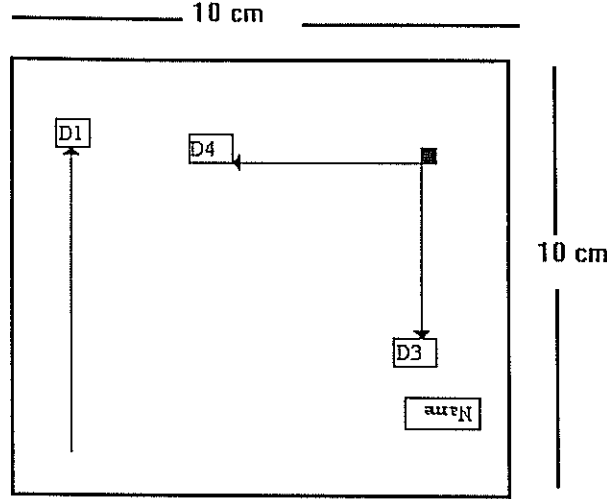
Bütanol ekstraksiyonu:

Yukarıda enzimlerle parçalanmış DNA'nın toplam hacmi yaklaşık 5µl olup bu hacmi 50 µl'ye tamamlamak için 45 µl saf su eklendi. 15µl tampon A (100m M amonyum format, pH 3.5) ve 15µl tampon B (10 mM tetrabutil amonyum klorit) ve 70µl saf su ile bir karışım oluşturuldu. Bu karışım (100µl), örneğin bulunduğu tüpün kenarına bırakıldı (DNA örneği ile karışmamalı) ve hemen ardından 150µl 1-bütanol (damıtılmış ve su ile doyurulmuş) eklenerek 30 saniye karıştırıcıda (vortex) karıştırıldı ve 90 saniye 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Üst faz (bütanol fazı) temiz bir tüpe alındı ve dipte kalan kısma tekrar 150 µl bütanol eklenerek ekstraksiyon ve santrifüj işlemleri tekrarlandı. Üst faz tekrar alınıp bir önceki alınmış bütanolün üzerine eklendi. Bu karışıma 200 µl saf su (bütanol ile doyurulmuş su) eklendi, 20 saniye karıştırılıp daha sonra 90 saniye 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Kalan örneğin üzerine 3 µl 200m M Tris (pH 9.5) eklenip vortexle karıştırıldı. Daha sonra Girovac aleti yardımıyla vakumlu bir ortamda ve bütanolün yoğunlaşmasını sağlayan kuru buz dolu bir yakalayıcının (trap) olduğu sistemde kurutuldu. Daha sonra 10 µl saf su eklenip tüpün çeperleri yıkandı son olarak ta santrifüj edilerek örnekler tüpün altında toplandı. Hazırlanan örnek ³²P-sondan ekleme (³²P-post-labelling) deneyi için hazır hale getirildi.

³²P- Postlabelling:

Bütanol ekstraksiyonu yapılan örneğe 1.0 µl Kinaz tamponu, 6U T4 Kinaz ve yarılanma ömrü göz önünde tutularak hesaplanan ve konsantrasyonu 50 µCi olacak şekilde ³²P -ATP'den gerekli miktarda eklendi, iyice karıştırıldı ve 1 saat 37 °C'de inkübe edildi. Bu arada önceden yıkanmış (pre-washed) ve kurutulmuş ince tabaka kağıtları (TLC) 10×20 ebatlarında kesilip uçlarına *whatman-1* kurulma kağıdı zumbalanarak hazırlandı ve hazırlanan örnek pipet yardımıyla TLC'ye damlatıldı (yaklaşık 14 µl). TLC'ler 100 ml D1 tamponu (1 M fosfat pH 6.0) içeren tanklara konularak 1 gece çözücünün TLC 'nin ucuna doğru yürümesi (run) sağlandı. Ertesi gün TLC kağıtlarına ekli kurutma kağıtları çıkarıldı, TLC kağıtlarının yarısı kesildi ve örneğin uygulandığı taraf alınarak diğer taraf atıldı. 10×10 cm'lik TLC kağıtları 10 dk. 500 ml distile su içinde yıkandı. Daha sonra D2 (2.5 M amonyum format, pH 3.5) tamponunda (20 ml D2, 500 ml distile su) 5 dk. yıkandı, saç kurutma makinası ile soğuk hava akımıyla 5 dk. kurutuldu. Daha sonra D3 (3.5 M lityum format, 8.5 M üre, pH 3.5) tamponu (100 ml), TLC kağıtlarının D2 yönünde alt kısmı suda ıslatıldıktan sonra bu kağıtlar üzerinde yaklaşık 2.5 saat yürütüldü. Bu arada tankın ağzı kapalı olmalı. Yürüme işi tamamlanınca tankın kapağı açıldı ve 15 dk. beklendi. TLC kağıtları, 5 ml 1.3 M Tris ve 500 ml saf su karışımı içinde 10 dk. yıkandı. Daha sonra 5 dk. saf su ile yıkandı ve kurutuldu. Kuruyan TLC kağıtlarını D4 yönünde yürütmek için yine alt kısmı biraz saf su ile ıslatılıp bu sefer D4 (0.8 M lityum klorit, 0.5 M Tris-HCl, 8.5 M üre, pH 8.0) tamponuna 2.5 saat süre ile (100 ml) konup kapağı kapatıldı. Yürüme işlemi tamamlandıktan sonra tankın kapağı 15 dk. süre ile açıldı ve TLC kağıtları tanktan çıkarılıp 10 dk. saf su ile yıkandı ve kurutuldu. Daha sonra Autograph aletinde TLC kağıdındaki radyoaktifite sayıldı. Sonuç adduct /10⁸ nükleotid

olarak verildi. TLC kağıtlarındaki aromatik DNA-eklemelerinin görünür hale gelmesi için bu kağıtlar röntgen filmi ile birlikte 2.5 gün -70°C 'de derin dondurucuda bekletilir. Bu süre sonunda TLC kağıtları üzerindeki radyoaktivite bu arada aromatik DNA-eklemeleri filmlere alınmış olur. Bu filmler gerektiğinde kullanılmak üzere saklanır.



Şekil 2. İnce tabaka kromatografisi kağıdında D1, D3 ve D4 çözeltilerinin yürüme yönleri

4.4. BALIK KARACİĞERİNDE PAH ÖLÇÜMÜ

Balık karaciğeri düşük basınç altında 40°C 'de kurutuldu. Kuruyan örnekten 0.2 g alınıp 0.75 g potasyum hidroksit ve 20 ml etanol eklenerek 90-120 dakika extract edildi. Daha sonra bu karışıma 20 ml hekzan eklenerek oda sıcaklığında soğutulur. Bir miktar arık su (distilled water) ekleyerek 2 faz oluşturuldu. Üst faz hekzan faz olup bu fazı başka bir balona alındı. Su fazına tekrar 20 ml hekzan eklenerek tekrar ekstrakt edildi. Toplanan örnek miktarının hacmi 60 ml olduğu kaydedildi. Örneğin floresans değeri spektrofloreometrede 310 sönme (extinction) ve 360 nm'de yayma (emmission) dalga boyları ölçüldü. Daha sonra örneğe 0.8 μg chrysene ilave edilip tekrar ölçüldü (UNEP/FAO/IOC/IAEA, 1986).

5. ELDE EDİLEN BULGULAR

Mezgit, Çaç, Barbun ve Pisi balıkları Trabzon havaalanı açıklarından ve Kefal örnekleri Yomra'daki küçük limandan 1994, 1995 ve 1996 Ocak-Şubat aylarında, yılda bir kez avlanmış ve avlanan bu balık örneklerinin sadece karaciğerinde PAH, kan ve karaciğerinde aromatik DNA-eklemeleri ölçülmüştür.

Toplanan tüm örneklerin boy ve ağırlıkları ölçülmüş, eşey tayini yapılmış ve diğer ölçüm sonuçları ile birlikte tablolar halinde verilmiştir (Tablo 1, 2, 3a, 3b, 3c, 4 ve 5).

5.1. BALIK TÜRLERİNDE AROMATİK DNA-EKLEMELERİNİN SAPTANMASI

5.1.1. KEFAL BALIĞI

Trabzon Yomra limanından toplanan Kefal balıklarındaki aromatik DNA eklemeleri Tablo 1 ve 3b'de gösterilmiştir. Kefal balığının kan ve karaciğerinden izole edilen DNA'da, materyal ve metod da anlatılan yöntemle aromatik DNA-eklemeleri tespit edilmiştir. Yomra limanından 1994 ve 1996 yıllarında toplanan kefal balıklarının kan ve karaciğerinde ölçülen DNA-eklemelerinin ortalama değerleri sırasıyla kanda 23.1 ± 5.0 ve 21.3 ± 9.0 karaciğerde ise 35.5 ± 11.0 ve 15.7 ± 9 olarak bulunmuştur (Tablo 1 ve 3b). Sonuçlar ayrıca Şekil 3 ve 5b'de gösterilmiştir. 1994 yılında avlanan kefal balıklarının karaciğerinde ölçülen DNA-eklemelerinin miktarı kandakine göre daha yüksek olmasına karşın (Şekil 3), 1996 yılında tam tersi sonuçlar elde edilmiş ve analiz edilen tüm örneklerde kandaki DNA-eklemelerinin değeri daha yüksek bulunmuştur (Şekil 5b).

Kefal balığının karaciğerindeki PAH miktarları Tablo 6'da görüldüğü gibi 16.0-149.0 µg/g (kuru ağırlık) arasında değişmektedir. Bu değerler ayrıca Şekil 8a'da da gösterilmiştir. Tablo 6 ve Şekil 8a'dan da görüleceği gibi bu türde ölçülen PAH konsantrasyonları diğer türlerden daha yüksek bulunmuştur. Çünkü kefal kıyıda yaşayan bir balık türüdür. Ayrıca örnekler, petrol kirliliğinin yüksek olabileceği Yomra limanından alınmıştır. Halbuki diğer türler bu limana göre daha temiz olan bölgeden (havaalanı açığından) alınmıştır. Bu nedenle kefal balıklarının diğer türlere göre yüksek PAH konsantrasyonları içermesi doğaldır.

5.1.2. ÇAÇA BALIĞI

Çaça balığı örnekleme de 1994 ve 1996 yıllarında yapılmıştır. Bu balık türünün 1994 yılında trolde alınan örnekleri canlı çıktığı için kan örnekleri alınabilmiş, buna karşın 1996 yılında gırgır teklerinden alınan balıklar tekneye ölmüş olarak çıktığından kan örneklerinde aromatik DNA-eklemeleri ölçülememiştir. Her iki örnekleme zamanında ölçülen aromatik DNA-eklemelerinin miktarları Tablo 1 ve 3b'de gösterilmiştir. 1996 yılı örnekleme ortalaması (16.4 ± 5.0), 1994'den (30.6 ± 24.0) daha küçük gibi görünse de 1994 yılı için bulunan yüksek standard sapma aralarında farkı önemsiz kılmaktadır. 1994 ve 1996 yılları aromatik DNA-eklemeleri sonuçları ayrıca Şekil 3 ve 5b'de sunulmuştur. Özellikle 1994 yılında bu türün karaciğerinde gerek diğer türlere, gerekse kandakine göre oldukça yüksek aromatik DNA-eklemeleri ölçülmüştür (Şekil 3). Oysaki 1996 yılında karaciğerde ölçülen aromatik DNA-eklemeleri barbun hariç diğer türlerle yaklaşık aynı düzeydedir (Tablo 5b).

Çaça balığının karaciğerinde ölçülen poliaromatik hidrokarbonların konsantrasyon ortalaması 35.1 ± 22.0 µg/g kuru ağırlık olarak ölçülmüş ve Tablo 6 ile Şekil 8a'da gösterilmiştir. Her ne kadar ortalama değer, kefal

hariç diğer türlere göre yüksek ise de, bu sadece iki örnekte (13 ve 14) ölçülen yüksek konsantrasyondan kaynaklanmaktadır (Tablo 6). Diğer örneklerin değerleri aynı zamanda avlanan Mezgıt ve Barbun balıklarıyla yaklaşık aynı düzeydedir (Şekil 8a,b).

5.1.3. MEZGİT BALIĞI

Mezgıt balığının 1994-1995-1996 yılında örnekleme yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 1 ,2 ,ve 3a'da gösterilmiştir. 1994 yılında yapılan örneklemede kullanılan ekipmanın yetersiz olması nedeniyle sadece üç adet balık örneği alınabilmiştir. Bu örneklerde ölçülen ortalama aromatik DNA eklemeleri (adducts/ 10^8 nükleotid) karaciğerde 24.0 ± 6.0 , kanda ise 31.4 ± 1.0 olarak bulunmuştur. 1995 yılı sonuçları ise kanda 4.4 ± 5.0 iken karaciğerde 4.3 ± 7.0 olarak ölçülmüştür (Tablo 1, 2).

1996 yılında elde edilen sonuçlar, 1994 ve 1995 yıllarında ölçülen değerlerin arasında bir değer göstermiştir. Buna göre kanda 11.8 ± 7.0 iken karaciğerde 11.0 ± 3.0 adduct/ 10^8 nükleotid bulunmuştur. Sonuçların standard sapmaları dikkate alındığında bile yıllar arasında fark olduğu görülmektedir (Tablo 1, 2 ve 3a). 1995 yılındaki sonuçlar oldukça farklı olduğu için sadece 1994 ve 1996 yılı değerleri karşılaştırılmıştır. Sonuçlarının bu denli farklı olmasının nedeni tam olarak anlaşılmasına karşın bu farkın ölçüm hatasından kaynaklandığı düşünülmektedir. 1994 ve 1996 yıllarındaki sonuçların az çok birbirine yakın olmaları 1995 yılında bir hata olasılığını arttırmaktadır.

Aynı zamanda 1996 yılında avlanan Mezgıt balığının karaciğerinde PAH miktarı da ölçülmüş ve sonuçlar Tablo 6 'da ve Şekil 8b'de sunulmuştur. Mezgıt balığında ortalama PAH miktarı 25.2 ± 16.0 $\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık olarak bulunmuştur. Bu yüksek ortalama değer, üç örnekte (4, 9 ve

12) ölçülen yüksek değerlerden kaynaklanmaktadır. Diğer örneklerin PAH konsantrasyonları 10 ile 20 $\mu\text{g/g}$ arasında değişmektedir. Yüksek standard sapma da ölçüm değrleri arasındaki farkı yansıtmaktadır.

5.1.4. BARBUN BALIĞI

Barbun balığının 1994 ve 1996 yıllarında örnekleme yapılmıştır. Bu yıllara ait kan ve karaciğerdeki aromatik DNA-eklemeleri sonuçları sonuçları Tablo 1 ve 3c'de verilmiştir. Ortalama değerler ise, 1994 yılı için kanda 23.8 ± 2.0 , karaciğerde 18.6 ± 4.0 , 1996 yılı için kanda 17.4 ± 8.0 ve karaciğerde 22.6 ± 5.0 adduct/ 10^8 nukleotid'dir. Standard sapmalara bakıldığında yıllara göre balık örnekleri arasında büyük bir fark olmadığı görülmektedir (Şekil 3 ve 5c). Organlar kendi aralarında karşılaştırıldığında, 1994 yılında karaciğerde ölçülen aromatik DNA-eklemeleri kandakinden daha düşük, 1996 yılında ise daha yüksek bulunmuştur. Bu farkın boy, dolayısıyla yaş ile bir ilgisi olabilir. Çünkü 1994 yılında analiz için kullanılan barbun balıklarının boyu 9-10 cm, 1996 yılında kullanılanların ise 17-18 cm'dir. Diğer bir anlatımla 1996 yılında kullanılan barbun balıkları, 1994 de kullanılanlara göre boy olarak iki katı daha büyük dolayısıyla yaş olarak da daha yaşlıdırlar.

Barbun balığında ölçülen PAH miktarlarına ait minimum ve maksimum değerler 7.7-55.1 $\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık olarak Tablo 6'da verilmiş ve Şekil 8b'de gösterilmiştir. Yüksek değer (55.1 $\mu\text{g/g}$) sadece bir örnekte ölçülmüştür. Diğer örneklerde PAH konsantrasyonları 10 ile 20 $\mu\text{g/g}$ arasında değişmektedir ki bu değerler kefal hariç diğer balık türleri ile yaklaşık aynı düzeydedir.

5.1.5. PİSİ BALIĞI

Pisi balığı örnekleme 1995 ve 1996 yıllarında yapılmıştır. Aromatik DNA eklemeleri sonuçları 1995 yılında, 1996 yılına göre oldukça düşük bulunmuştur. Yukarıda da değinildiği gibi 1995 yılındaki ölçümler diğer iki yıla göre çok farklı (az) bulunmuştur. Örneğin 1995 yılında kanda 3.3 ± 3.0 , karaciğerde 3.5 ± 2.0 aromatik adduct/ 10^8 nükleotid iken 1996 yılında kanda 30.6 ± 15.0 , karaciğerde 14.6 ± 9.0 adduct/ 10^8 nükleotid ölçülmüştür (Tablo 2 ve 3a; Şekil 4 ve 5a). Bu fark için düşünülebilecek tek sebep bir ölçüm hatasının olabileceğidir. 1996 yılında kandaki değerin karaciğere göre yüksek olması, kirleticinin (PAH) vücuda yeni alındığı ve henüz karaciğere ulaşmadığı şeklinde açıklanabilir.

Pisi balığı karaciğerinde ölçülen PAH miktarı Tablo 6'da sunulmuştur. Minimum ve maximum değerler 5.7-21.3, ortalama değer ise 11.5 ± 5.0 $\mu\text{g/g}$ kuru ağırlıktır. Bu ortalama değer, analiz edilen diğer türlere göre oldukça düşük düzeydedir. Bu fark, bu türün yaşadığı ortamdan aldığı PAH'ın henüz karaciğerine ulaşmadığını göstermektedir. Çünkü yukarıda açıklanan aromatik DNA-eklemelerinin sonuçları da bu varsayımı desteklemektedir.

5.1.6. ODTÜ-DBE LİMANINDAN YAKALANAN KEFAL BALIĞI

Çok küçük bir liman olması ve kimyasal girdilerinin az olması nedeniyle referans bölge olarak seçilen bu limandan tutulan kefal balığından elde edilen aromatik DNA-eklemeleri sonuçları aslında bu bölgenin sanıldığı kadar temiz olmadığını göstermiştir. Buna karşın sudaki PAH miktarı açısından büyük limanlarla karşılaştırıldığında oldukça temiz olduğu yapılan ölçümlerle tespit edilmiştir. Kefal balığı, hem Karadeniz hemde Akdeniz'de

bulunması ve uzun süreli gözlemlerde kullanıma uygun olması nedeniyle seçilmiştir .

1995 yılında sadece karaciğer sonuçları, 1996 yılında hem kan hem de karaciğer sonuçları Tablo 4 ve 5'de sunulmuştur. 1995 yılı ortalaması karaciğer için 3.3 ± 2.0 iken 1996 yılı karaciğer ve kan değerleri sırasıyla 25.2 ± 6.0 ve 11.6 ± 8.0 adduct/ 10^8 nükleotid olarak bulunmuştur (Şekil 6 ve 7).

5.2. FARKLI BALIK TÜRLERİNDE TESPİT EDİLEN AROMATİK DNA-EKLEMELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Tablo 1- 5'de görüldüğü gibi 1995 yılı hariç 1994 ve 1996 yıllarında elde edilen aromatik DNA ölçüm sonuçları genel olarak birbirini tamamlamaktadır. Çalışma süresince analiz edilen bazı balık türlerinde, kandaki aromatik DNA-eklemeleri daha fazla ölçülmüşken karaciğerde buna göre daha az miktarlarda tespit edilmiştir. Sunuçların genel olarak birbirine benzemesine karşın tek tek bakıldığında ortaya çıkan bu farklılıklar canlının yaşadığı ortamdaki günlük veya haftalık değişimlerin bir sonucu olarak kabul edilebilir. Balıkların yaşadığı çevrede meydana gelen ani değişiklikler (örneğin ortama ani PAH girdisi) önce bu canlıların vasiküler (yani dolaşım) sistemlerinde tespit edilir. Ortamdan alınan kirleticilerin kana ve karaciğere ulaşma süresi saatler ve gün düzeyinde olmaktadır (Shugart ve ark., 1987). Kan bir depo organı olmayıp yaşam için gerekli birçok maddenin ve kirleticilerin taşınma yollarından biridir. Karaciğer ise lipofilik (yağ seven) kirleticilerin (PAH'ların) depolandığı önemli organlardan biridir. Poliaromatik hidrokarbon kirliliğinin olduğu bir ortamda yaşayan balıklarda PAH öncelikle kanda ve daha sonra karaciğer ve diğer organlarda tespit edilir. Kirlilik etkeni ortadan kalktığında, yani yeni girdilerin olmaması ve var

olanların sedimana çökmesi ve/veya mikroorganizmalar tarafından parçalanması halinde, kandaki kirletici seviyesi azalırken karaciğerdeki miktarı kan yoluyla taşınanların etkisiyle bir süre daha artmakta ve uzunca bir süre bu organda depolanmaktadır. Mevcut çalışmada elde edilen sonuçlar da bu farklılığı açıkça ortaya koymaktadır. Buna göre; 1994 yılında Barbun balığında ortalama aromatik DNA eklemeleri kanda 23.8 ± 2.0 , karaciğerde 18.6 ± 4.0 adduct/ 10^8 nükleotid olarak ölçülmüştür. Bu durumda Barbun balığının kısa süre önce PAH kirliliği olan bir bölgede kaldığı söylenebilir. 1996 yılında ise kan ve karaciğer sonuçları 1994'ün tam tersini göstermektedir (kanda 17.4 ± 8.0 ve karaciğerde 22.6 ± 5.0). 1994 yılında Mezgit ve Tirsi balığında da kandaki aromatik DNA-eklemeleri miktarı karaciğer göre daha fazla ölçülmüştür. Kefal balığı ve Çaçı balığında durum ise tersinedir yani kandaki aromatik DNA-eklemeleri miktarı karaciğerdekine göre daha az bulunmuştur (Tablo1).

1994 yılında avlanan balıklarda karaciğer sonuçları üzerinden değerlendirme yapıldığında Kefal balığı en fazla aromatik DNA-eklemesi ölçülen balık türü iken Tirsi balığı en düşük konsantrasyona sahiptir. Karadeniz'den yakalanan Kefal balığı Yomra limanından avlanmıştır ve burada kültür balıkçılığı yapılmaktadır. Balıklar balık yemi ile beslenmektedir. Arta kalan atıklar Yomra Limanı'nın tabanında birikmekte ve kefal balıkları çoğunlukla bu atık yemler üzerinden beslenmektedirler. Yine bu limanda küçük balıkçı kayıkları bulunmaktadır. Böyle verimli ve az su hareketinin olduğu yerde yaşayan kefal balıklarında yüksek miktarda aromatik DNA-eklemelerinin bulunması şaşırtıcı değildir. Tirsi balığı ise açık denizlerde , pelajik (su kolonunda yaşayan) bir tür olduğu için daha az konsantrasyonda aromatik DNA-eklemesi tespit edilmiştir.

1995 yılında Karadeniz'den avlanan balıklardan elde edilen ölçüm sonuçları diğer iki yılda elde edilen sonuçlardan daha düşük düzeyde olduğu

için veriler sadece tablo (Tablo 2) ve grafikler (Şekil 4) halinde sunulmuş olup 1994 ve 1996 verileri ile karşılaştırılmamışlardır.

1996 yılında avlanan balık türlerinde ilginç sonuçlar, referans bölge olarak seçilen ODTÜ Limanı'ndan yakalanan kefal balıklarından elde edilmiştir. Elde edilen (özellikle 1996'da) yüksek DNA-eklemeleri sonuçlarına göre bu liman sanıldığı kadar izole bir ortam değildir. Bir diğer varsayım da kefal balıklarının gezginci olmaları nedeniyle bir yerde sürekli kalmayıp çok uzun mesafeler olmasada kısa mesafelere günlük veya haftalık göçler yapabildiğidir. Bu nedenden dolayı ODTÜ limanından avlanan kefal balıklarının bir kısmı Mersin Limanından gelip tesadüfen yakalanmış olabilirler. Kurulec ve ark., (1989) da benzer sonuçlar elde etmişlerdir.

1996 yılında avlanan balıkların karaciğerlerinde aromatik DNA-eklemeleri ile birlikte Poliaromatik Hidrokarbon konsantrasyonları da ölçülmüştür. Tablo 6'da da görüleceği gibi en yüksek PAH konsantrasyonu Yomra'dan yakalanan Kefal balığında tespit edilmiştir. Bunu Çaçı balığı takip etmektedir. Aslında Çaçı balığının pelajik bir balık olmasına karşın 69 µg/g gibi yüksek düzeyde PAH içermesi anormal bir durum gibi görünmektedir. Yapılan örnekleme sırasında hemen tüm Çaçı balıklarının karaciğerleri parazit tarafından istila edilmişti. Bazılarının karaciğeri sanki parazit dolu bir kese halini almıştı. Bu denli parazit istilasına uğrayan Çaçı balığı karaciğerinin normal fonksiyonlarını yapması beklenemez. Karaciğerin fonksiyonlarını yapamamasından dolayı metabolize olmayan ve dolayısıyla parçalanıp vucuttan atılamayan PAH, karaciğerde depolanmış olabilir. Bu nedenle Çaçı balığında yüksek miktarlarda PAH konsantrasyon bulunması doğaldır.

1996 yılında yakalanan balıkların kan ve karaciğerinde ölçülen aromatik DNA-eklemeleri ve PAH konsantrasyonu ile bu balıkların boy ve ağırlıkları arasında bir ilişkinin olup olmadığını saptamak için Spearman

Rank Korelasyonu yapılmış ve elde edilen sonuçlar Tablo 7–11’de gösterilmiştir. Karadeniz Yomra Limanından yakalanan Kefal balıklarının kan ve karaciğerinde ölçülen aromatik DNA-eklemeleri arasında pozitif bir ilişki ($P_{0.05}$) bulunmuştur (Tablo 7). Pisi balığında ise karaciğerde ölçülen DNA-eklemeleri ile yine aynı organda ölçülen PAH miktarı arasında negatif, buna karşın boy ile pozitif bir ilişki ($P_{0.05}$) görülmektedir (Tablo 8). Barbun ve Çaçı balıklarının sadece boy uzunluğu ile PAH miktarı arasında ters bir ilişki bulunmuş, diğer parametreler arasında herhangi bir ilişki gözlenmemiştir (Tablo 9 ve 11). Mezgit balığında parametreler arasında negatif ya da pozitif bir ilişki saptanamamıştır (Tablo 10).

1996 yılında ölçülen poliaromatik hidrokarbon konsantrasyonu ise türler arasında farklılık göstermektedir. Buna göre Kefal ($40.2 \pm 17.0 \mu\text{g/g}$ kuru ağırlık) ve Çaçı ($40.2 \pm 17.0 \mu\text{g/g}$ kuru ağırlık) balıklarında PAH konsantrasyonu yüksek değerlerde ölçülmüşken, Pisi balığında en düşük değer $11.5 \pm 5 \mu\text{g/g}$ kuru ağırlık) bulunmuştur.

6. KARŞILAŞILAN GÜÇLÜKLER

Proje süresince üç Enstitü (ODTÜ-Deniz Bilimleri Enstitüsü, Ç.Ü.-Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı ve Institute of Cancer Research-İngiltere) arasındaki mükemmel işbirliğine karşın tüketim maddelerinin (özellikle kimyasalların) sağlanmasında bazı zorluklar ve olanaksızlıklarla karşılaşmış, bu da işlerin yavaşlamasına ve zaman kaybına neden olmuştur. Diğer yandan ODTÜ-DBE'nün desteği ve parasal katkısıyla bu Enstitüde kurulması planlanan Biyokimya laboratuvarı şu anda bitme aşamasındadır. Bu da çekilen güçlüklerin bir ödülü olarak değerlendirilebilir.

Yukarıda da açıklandığı gibi ölçümler üç ayrı Enstitüde ve bazen farklı kişiler tarafından yapılmıştır. Bu da sonuçlarda bazı farklılıkların doğmasına neden olmuştur. Bu nedenle 1995 yılındaki örnekleme sonuçlarının diğer iki yıldan farklı olması, belki de farklı kişilerin ölçüm yapmasından kaynaklanmaktadır.

7. SONUÇLAR

1994-1996 yılları arasında Doğu Karadeniz Bölgesinde Trabzon dolaylarından avlanan 6 farklı balık türü; Kefal, Barbun, Pisi, Mezgit, Çaçı ve Tirsi ve referans bölge olarak seçilen ODTÜ - Deniz Bilimleri Enstitüsü Limanından avlanan Kefal balıklarında ölçülen aromatik DNA-eklemeleri belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlara bakıldığında balık türleri arasında yıllara göre önemli bir konsantrasyon farkı gözlenmemesine karşın bu türlerin kan ve karaciğerde ölçülen aromatik DNA-eklemeleri arasında farklar gözlenmiştir. Her iki organdaki aromatik DNA-eklemeleri konsantrasyonu, balık türlerinin yaşadığı ortama ve/veya göçlerine bağlı olarak değişmektedir. Elde edilen sonuçların birbirlerine yakın olması bu çalışmada uygulanan yöntemin ne kadar sağlıklı ve başarılı olduğunu göstermektedir.

DNA- eklemeleri sonuçlarının aksine, 1996 yılında ölçülen poliaromatik hidrokarbon konsantrasyonları türler arasında farklılık göstermektedir. Buna göre Kefal balıklarında PAH konsantrasyonu yüksek değerlerde ölçülmüşken, Pisi balığında en düşük değer bulunmuştur.

8. HARCAMALAR

Proje bütçesi ve harcamaların dağılımı (TL)

Harcama Çeşitleri	İstenen ve kabul edilen ödenek	Bugüne kadar yapılan harcamalar	Kalan miktar
Teçhizat sabit yatırım	325.000.000	324.485.000	515.000
Seyahat ve nakliye	9.900.000	9.880.000	20.000
Bilgi işlem harcamaları	29.900.000	29.778.000	122.000

9. REFERANSLAR

- Avşar, D., *The biology and population dynamical parameters of the Sprat (Sprattus sprattus phalericus) RISSO on the southern coast of the Black Sea.* (Doktora Tezi) ODTÜ- Deniz Bilimleri Enstitüsü, Erdemli- Mersin, (1993).
- Balk, L., Meijer, J., Depierre, J.W. ve Appelgren, L-E., The uptake and disyribution of [³H] Benzo(a)pyrene in the northern pike (*Esox lucius*). Examination by whole-body autoradiography and scintillation counting. *Toxology and Applied Pharmacology*, 74, 430-449, (1984).
- Fisher, W., FAO species identification sheets for fishery purposes. Mediterranean and Black Sea (Fishing Area 37). Vol.1, Rome. (1973).
- Geaçintov, N.E., Yoshida, H., Ibanez, V. ve Harvey, R.G., Noncovalent binding of 7β, 8α-dihydroxy-9α, 10α-epoxytetrahydrobenzo(a)pyrene to deoxyribonucleic acid and its catalytic effect on the hydrolysis of the diol epoxide to tetrol. *Biochemistry*, 21, 1864-1869, (1982).
- Giles, A.S., Seidel, A. ve Phillips, D.H., In vitro reaction with DNA of the fjord-region diol epoxides of benzo(g)chrysene and benzo(c) phenanthrene as studied by ³²P-postlabeling. *Chemical Research in Toxicology*. 8 (4), 591-599, (1995).
- Giles, A.S., Seidel, A. ve Phillips, D.H., Covalent DNA adducts formed in mouse epidermis by benzo(g)chrysene. *Carcinogenesis*, 17(6), 1331-1336, (1996).
- Giles, A.S., *Characterisation of DNA aduucts formed by environmental polycyclic aromatic hydrocarbons*, (Doktora tezi), Inst. Of Cancer Research, Haddow Laboratories, İngiltere, (1996).
- Gupta, R.C. ve Early, K., 32P-adduct assay: comparative recoveries of structurally diverse DNA adducts in the various enhancement procedures. *Carcinogenesis*, 9 (9), 1687-1693, (1988).

- İşmen, A.**, *The biology and population parameters of the whiting (Merlangius merlangus euxinus NORDMAN) in the Turkish coast of the Black Sea.* (Doktora tezi), ODTÜ-Deniz Bilimleri Enstitüsü, Erdemli-Mersin, (1995).
- Masento, M.S., Hewer, A., Grover, P.H. ve Phillips, D.H.**, Enzyme-mediated phosphorylation of polycyclic hydrocarbon metabolites: detection of non-adduct compounds in the ³²P-postlabelling assay. *Carcinogenesis*, 10 (8), 1557-1559, (1989).
- Mason, R.P., Harrelson, W.G., Kalyanamaran, B., Mottley, C., Peterson, F.J. ve Holtzman, J.L.**, Free radical metabolites of chemical carcinogens in *Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer*, ed: McBrien, D.C.H. ve Slater, T.F., Academic Press, London, New York, (1982), p:377- 400.
- Neff, J.M.**, Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment (source, fates and biological effects. Applied Science Publishers, (1974), pp: 262.
- Phillips, D.H., Hewer, A. ve Grover, P.L.**, Aromatic DNA adducts in human bone marrow and peripheral blood leukocytes. *Carcinogenesis*, 7 (12), 2071-2075, (1986).
- Phillips, D.H., Schoker, B., Hewer, A. ve Grover, P.L.**, DNA adduct formation in human and mouse skin by mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Complex Mixtures and Cancer Risk*. ed: Vainio, H., M.Sorsa, M. ve Mc Michael A.J., Lyon, International Agency for Research on Cancer IARC, (1990), p:223-229.
- Schoket, B., Horkay, I., Kosa, A., Paldeak, L., Hewer, A., Grover, P.L. ve Phillips, D.H.**, Formation of DNA adducts in the skin of psoriasis patients in human skin in organ culture and in mouse skin and lung following topical application of coal-tar and juniper tar. *The Journal of Investigative Dermatology*. Vol.94, 2, 241-246, (1990).
- Whitehead, P.J.P., Bauchot, M.L., Hureau, J.C., Nielsen, J., ve Tontonese, E.**, Fishes of the mediterranean Atlantic and the Mediterranean. Unesco 1984, 1989, İngiltere, 510 sayfa, (1989).

T A B L O L A R

Tablo 1. 1994 yılında Karadeniz'den⁽¹⁾ avlanan balık örneklerine ait biyolojik parametreler (seks, boy, ağırlık) ve aromatik DNA-ekdemeleri ölçüm sonuçları (adduct/10⁸ nükleotid) (*)

Balık türleri (**)	Seks	Boy (cm)	Ağırlık (gr.)	Aromatik DNA- ekdemeleri			
				Kan	Ort.	K.ciğer	Ort.
Kefal 1	1E	22.5	94.5	21.1	23.1 ± 5.0	40.6	35.5 ± 11.0
Kefal 2	1E	23.8	113.6	29.5		46.7	
Kefal 3	1D	24.3	117.9	23.6		--	
Kefal 4	1E	17.3	45.8	18.3		21.0	
Kefal 5	1E	21.0	74.4	--		33.8	
Barbun 1	4D;1E	10.6	6.7	22.9	23.8 ± 2.0	19.7	18.6 ± 4.0
Barbun 2	4D;1E	9.8	4.5	22.3		22.0	
Barbun 3	5D	9.3	4.0	26.3		14.0	
Çaça 1	1D	10.2	5.6	--	22.4 ± 9.0	16.0	30.6 ± 24.0
Çaça 2	4D;1E	10.1	5.6	11.2		37.4	
Çaça 3	4D;1E	10.0	5.2	37.3		11.5	
Çaça 4	5D	10.1	5.6	23.1		73.6	
Çaça 5	3E;2D	9.3	4.1	28.8		14.5	
Çaça 6	5D	9.4	4.1	14.4		147.7	
Çaça 7	4D;1E	9.2	4.3	17.7		78.7	
Çaça 8	4D;1E	11.2	5.6	29.1		195.8	
Çaça 9	3D;2E	10.8	5.7	--		23.1	
Çaça 10	3D;2E	10.8	5.7	--	--	23.1	
Çaça 11	5D	9.7	4.8	17.6		8.2	
Mezgit 1	2D;1E	14.2	16.6	--	31.4 ± 1.0	27.9	24.6 ± 6.0
Mezgit 2	1D;2E	12.9	14.5	30.6		28.5	
Mezgit 3	2D;1E	13.4	18.9	32.1		17.5	
Tirsi 1	1D	27.0	134.7	10.8	28.3 ± 14.0	7.8	13.3 ± 3.0
Tirsi 2	1E	27.5	47.7	--		13.9	
Tirsi 3	1D	23.5	84.3	45.3		15.6	
Tirsi 4	1D	23.7	94.4	26.4		15.3	
Tirsi 5	1E	22.0	76.7	30.7		13.9	

(1) Kefal balıkları Yomra limanından, Barbun, Çaça, Mezgit ve Tirsi balıkları Trabzon Havaalanı açıklarından avlanmıştır.

(*) Barbun, Çaça ve Mezgit örnekleri kompozit olarak, Kefal ve Tirsi örnekleri ise bireysel olarak değerlendirilmiştir.

(**) Türlerin karşısındaki sayılar örnek numaralarını göstermektedir (1.,2. örnek vb.)
E: Erkek ; D: Dişi

Tablo 2. 1995 yılında Karadeniz'den⁽¹⁾ avlanan balık örneklerine ait biyolojik parametreler (seks, boy, ağırlık) ve aromatik DNA-eklemeleri ölçüm sonuçları (adduct/10⁸ nükleotid)

Balık türleri (*)	Seks	Boy (cm)	Ağırlık (gr.)	Aromatik DNA-eklemeleri			
				Kan	Ort.	K.ciğer	Ort.
Pisi 1	1D	24.0	120.0	1.15	3.30 ± 3.0	1.57	3.50 ± 2.0
Pisi 2	1D	25.5	150.0	8.42		3.56	
Pisi 3	1D	26.5	160.0	1.88		4.44	
Pisi 4	1D	26.5	160.0	4.01		6.46	
Pisi 5	1D	25.0	130.0	0.54		3.08	
Pisi 6	1D	28.5	210.0	0.10		6.05	
Pisi 7	1D	26.0	170.0	0.36		1.20	
Pisi 8	1D	27.0	190.0	2.96		1.64	
Pisi 9	1D	26.0	160.0	4.10		--	
Pisi 10	1D	21.5	90.0	9.60		--	
Pisi 11	1E	19.5	66.0	--		3.12	
Mezgit 1	1D	21.3	70.0	25.09	4.40 ± 5.0	1.50	4.3 ± 7.0
Mezgit 2	1D	20.8	60.0	0.46		1.03	
Mezgit 3	1D	21.0	60.0	0.62		3.00	
Mezgit 4	1D	20.3	60.0	1.57		1.33	
Mezgit 5	1D	20.8	60.0	1.35		1.12	
Mezgit 6	1E	20.0	60.0	4.99		5.27	
Mezgit 7	1D	19.4	40.0	11.24		4.82	
Mezgit 8	1D	20.5	60.0	2.13		3.34	
Mezgit 9	1D	19.0	50.0	5.04		3.77	
Mezgit 10	1D	20.8	70.0	0.89		3.18	
Mezgit 11	1E	20.8	70.0	1.94		2.45	
Mezgit 13	1E	20.8	55.0	--		3.38	
Mezgit 14	1E	19.4	60.0	0.47		6.13	
Mezgit 15	1E	17.0	35.0	0.34		1.02	
Mezgit 16	1D	19.6	50.0	--		3.86	
Mezgit 17	1E	18.8	50.0	--		5.12	
Mezgit 18	1E	17.8	42.0	--		9.74	
Mezgit 19	1D	18.4	50.0	--		23.49	
Mezgit 20	1E	18.4	50.0	--		2.27	

(1) Tüm balık türleri Trabzon Havaalanı açıklarından avlanmıştır.

(*) Türlerin karşısındaki sayılar örnek numaralarını göstermektedir (1.,2. örnek vb.)

Tablo 3a. 1996 yılında Karadeniz'den⁽¹⁾ avlanan balıklara ait biyolojik parametreler (seks, boy ağırlık) ve aromatik DNA-eklemeleri ölçüm sonuçları (adduct/10⁸ nükleotid)

Balık türleri (*)	Seks	Boy (cm)	Ağırlık (gr.)	Aromatik DNA-eklemeleri			
				Kan	Ort.	K.ciğer	Ort.
Mezgit 1	1D	27.0	99.5	11.7	11.8 ± 7.0	7.2	11.0 ± 3.0
Mezgit 2	1D	27.0	200.2	28.7		8.4	
Mezgit 3	1D	24.5	131.1	8.2		7.8	
Mezgit 4	1D	23.0	106.6	10.7		9.4	
Mezgit 5	1D	23.5	141.9	7.9		7.9	
Mezgit 6	1D	31.0	268.2	19.9		--	
Mezgit 7	1D	27.0	190.8	6.7		11.1	
Mezgit 8	1D	26.5	144.1	6.0		12.8	
Mezgit 9	1D	25.0	138.7	8.3		11.9	
Mezgit 10	1D	24.0	118.3	19.6		--	
Mezgit 11	1D	27.0	177.2	8.2		16.5	
Mezgit 12	1D	25.0	121.8	12.8		14.8	
Mezgit 13	1D	27.0	176.2	10.5		16.2	
Mezgit 14	1D	21.5	90.4	--		--	
Mezgit 15	1D	22.0	86.9	6.2		7.7	
Pisi 1	1D	23.5	122.3	13.0	30.6 ± 15.0	--	14.6 ± 9.0
Pisi 2	1D	24.5	117.5	27.9		13.6	
Pisi 3	1D	26.0	166.5	27.6		30.5	
Pisi 4	1D	27.0	180.0	46.4		--	
Pisi 5	1D	26.0	179.0	18.9		--	
Pisi 6	1E	27.0	189.2	--		10.3	
Pisi 7	1D	27.5	190.3	17.6		36.5	
Pisi 8	1D	25.0	168.7	40.3		15.0	
Pisi 9	1D	33.0	279.4	25.2		20.0	
Pisi 10	1D	30.0	301.5	12.9		--	
Pisi 11	1D	30.0	265.6	46.2		--	
Pisi 12	1D	30.5	269.5	41.3		12.4	
Pisi 13	1D	18.0	225.5	31.7		10.3	
Pisi 14	1D	30.5	281.5	67.5		13.0	
Pisi 15	1E	22.5	98.1	43.7		12.3	
Pisi 16	1E	22.0	87.4	9.7		8.8	
Pisi 17	1D	25.5	171.2	18.4		13.1	
Pisi 18	1E	19.0	62.0	44.4		19.4	
Pisi 19	1E	20.0	67.3	19.4		10.4	
Pisi 20	1E	18.0	50.0	29.9		11.9	

(1) : Tüm balık türleri Trabzon Havaalanı açıklarından avlanmıştır.

(*) : Türlerin karşısındaki sayılar örnek numaralarını göstermektedir (1.,2. örnek vb.)

Tablo 3b. 1996 yılında Karadeniz'den⁽¹⁾ avlanan balıklara ait biyolojik parametreler (seks, boy ağırlık) ve aromatik DNA-eklemeleri ölçüm sonuçları (adduct/10⁸ nükleotid)

Balık türleri (*)	Seks	Boy (cm)	Ağırlık (gr.)	Aromatik DNA-eklemeleri			
				Kan	Ort.	K.ciğer	Ort.
Kefal 1	1E	29.0	206.7	16.3	21.3 ± 9.0	8.1	15.7 ± 9.0
Kefal 2	1E	24.6	134.4	17.3		19.6	
Kefal 3	1J	27.5	179.2	--		9.9	
Kefal 4	1D	29.8	231.9	9.8		--	
Kefal 5	1D	28.5	218.2	26.0		17.2	
Kefal 6	1E	22.5	106.5	19.1		26.2	
Kefal 7	--	27.5	186.1	16.2		13.0	
Kefal 8	1J	23.5	118.2	13.1		14.1	
Kefal 9	1J	23.0	104.3	14.0		10.2	
Kefal 10	1J	21.8	80.4	31.2		24.8	
Kefal 11		24.0	114.9	28.7		22.6	
Kefal 12	1J	21.5	87.1	22.9		20.4	
Kefal 13	--	25.5	149.9	41.1		29.6	
Kefal 14	1E	24.3	124.3	--		9.2	
Çaça 1	5D	11.3	8.8	--		22.2	16.4 ± 5.0
Çaça 2	5D	12.2	11.4	--		9.7	
Çaça 3	5D	12.2	10.9	--		14.0	
Çaça 4	5D	12.1	10.9	--		11.7	
Çaça 5	5D	12.8	12.1	--		18.6	
Çaça 6	5D	11.9	9.8	--		15.4	
Çaça 7	5D	12.4	11.2	--		13.8	
Çaça 8	5D	11.4	9.1	--		20.5	
Çaça 9	5D	11.9	9.9	--		17.5	
Çaça 10	5D	11.9	9.9	--		31.2	
Çaça 11	5D	11.6	9.6	--		13.6	
Çaça 12	5D	12.1	9.9	--		13.3	
Çaça 13	5D	11.7	9.5	--		17.8	
Çaça 14	5D	11.5	9.6	--		14.3	
Çaça 15	5D	10.8	7.7	--		16.4	

(1) : Kefal balıkları Yomra limanından, Çaça balıkları Trabzon Havaalanı açıklığından avlanmıştır.

(*) : Türlerin karşısındaki sayılar örnek numaralarını göstermektedir (1.,2. örnek vb.)
E: Erkek ; D: Dişi ; J: Juvenil

Tablo 3c. 1996 yılında Karadeniz'den⁽¹⁾ avlanan balıklara ait biyolojik parametreler (seks, boy ağırlık) ve aromatik DNA-eklemeleri ölçüm sonuçları (adduct/10⁸ nükleotid)

Balık türü (*)	Seks	Boy (cm)	Ağırlık (gr.)	Aromatik DNA-eklemeleri			
				Kan	Ort.	K.ciğer	Ort.
Barbun 1	1D	17.5	56.7	22.9	17.4 ± 8.0	--	22.6 ± 5.0
Barbun 3	1D	19.0	85.5	28.9		--	
Barbun 4	1D	17.5	59.2	25.7		20.2	
Barbun 6	1D	18.5	63.7	11.6		22.8	
Barbun 7	1D	17.5	63.2	8.9		--	
Barbun 8	1D	17.0	56.0	18.8		--	
Barbun 9	1D	18.5	71.9	13.4		--	
Barbun 10	1E	16.0	48.4	9.1		--	
Barbun 11	1D	15.0	41.4	--		32.7	
Barbun 12	1D	17.3	57.3	--		19.4	
Barbun 13	1E	15.0	41.9	--		29.4	
Barbun 14	1D	16.5	54.1	--		18.9	
Barbun 15	1D	17.0	49.6	--		18.8	
Barbun 16	1D	18.0	64.3	--		18.7	
Barbun 17	1D	16.0	50.2	--		--	
Barbun 18	1D	17.2	62.9	--		--	
Barbun 19	1D	16.2	48.4	--		--	
Barbun 20	1D	15.6	41.8	--		--	

(1) : Tüm balık türleri Trabzon Havaalanı açıklarından avlanmıştır.

Tablo 4. 1995 yılında ODTÜ-DBE Limanından avlanan Kefal Balığına ait biyolojik parametreler (seks, boy, ağırlık) ve aromatik DNA-eklemeleri ölçüm sonuçları (adducts/10⁸ nükleotid)

Balık türü (*)	Seks	Boy (cm)	Ağırlık (gr.)	Aromatik DNA-eklemeleri K.ciğer	Ort.
Kefal 2	1E	36.0	414.6	3.89	3.3 ± 2.0
Kefal 4	1E	30.0	223.9	1.83	
Kefal 5	1E	32.0	268.0	1.80	
Kefal 6	1E	40.0	677.5	0.97	
Kefal 7	1E	41.0	698.6	1.63	
Kefal 8	1E	34.0	383.6	3.95	
Kefal 11	1E	25.5	152.2	2.77	
Kefal 12	1E	31.5	239.7	8.23	
Kefal 13	1E	27.5	188.9	2.40	
Kefal 15	1E	26.5	162.7	5.88	

(*) : Türlerin karşısındaki sayılar örnek numaralarını göstermektedir (1.,2. örnek vb.)

Tablo 5. 1996 yılında ODTÜ-DBE Limanından avlanan Kefal Balığına ait biyolojik parametreler (seks, boy, ağırlık) ve aromatik DNA-eklemeleri ölçüm sonuçları (adducts/10⁸ nükleotid)

Balık türü (*)	Seks	Boy	Ağırlık (gr.)	Aromatik DNA-eklemeleri Kan	Ort.	K.ciğer	Ort.
Kefal 1	1E	27.0	140.5	6.6	11.6 ± 8.0	31.3	25.2±6.0
Kefal 2	1D	29.3	214.5	9.8		19.1	
Kefal 3	1D	29.0	202.0	11.7		26.0	
Kefal 4	1D	28.0	162.0	--		23.8	
Kefal 5	1E	27.0	167.0	12.2		--	
Kefal 6	1E	28.0	190.6	5.7		33.1	
Kefal 7	1E	30.3	213.0	6.3		--	
Kefal 8	1D	27.0	169.8	29.2		--	
Kefal 9	1E	26.0	133.0	--		17.9	

(*) Türlerin karşısındaki sayılar örnek numaralarını göstermektedir (1.,2. örnek vb.)

Tablo 6. Ocak 1996 yılında Karadeniz'den⁽¹⁾ avlanan balıkların karaciğerinde ölçülen poliaromatik hidrokarbon (PAH) konsantrasyonları.

Türler	PAH (µg/g K.A.)	Ortalama	Türler	PAH (µg/g K.A.)	Ortalama	
Kefal 6	16.0	40.2 ± 17.0	Barbun 1	12.9	17.9 ± 10.0	
Kefal 7	28.0		Barbun 3	11.8		
Kefal 8	35.0		Barbun 4	15.1		
Kefal 10	49.0		Barbun 6	11.0		
Kefal 11	51.0		Barbun 7	14.5		
Kefal 12	62.0		Barbun 8	23.4		
Kefal 13	149.0		Barbun 9	11.1		
Çaça 3	15.0		35.1 ± 22.0	Barbun 10		19.3
Çaça 4	18.4			Barbun 11		20.3
Çaça 5	25.0			Barbun 12		7.7
Çaça 7	26.0			Barbun 13		19.2
Çaça 14	57.0			Barbun 14		14.4
Çaça 14	69.0			Barbun 15		15.8
Pisi 1	5.7	11.5 ± 5.0		Barbun 16		10.8
Pisi 2	11.7		Barbun 17	21.1		
Pisi 3	5.7		Barbun 18	15.3		
Pisi 6	11.7		Barbun 19	23.6		
Pisi 9	11.7		Barbun 20	55.1		
Pisi 10	5.7					
Pisi 11	11.7					
Pisi 12	11.7					
Pisi 13	11.7					
Pisi 15	21.3					
Pisi 16	21.3					
Pisi 19	8.2					
Mezgit 4	43.0	25.2 ± 16.0				
Mezgit 5	13.0					
Mezgit 7	21.0					
Mezgit 8	13.0					
Mezgit 9	52.0					
Mezgit 10	21.0					
Mezgit 11	7.3					
Mezgit 12	52.0					
Mezgit 13	21.0					
Mezgit 14	21.0					
Mezgit 15	13.0					

(1) : Kefal balıkları Yomra limanından, diğer türler Trabzon Havaalanı açıklarından avlanmıştır.

(*) : Türlerin karşısındaki sayılar örnek numaralarını göstermektedir (1.,2. örnek vb.)

K.A.: Kuru ağırlık

Tablo 7.1996 yılında avlanan Kefal balığının kan ve karaciğerinde ölçülen aromatik DNA-eklemeleri ile boy, ağırlık ve karaciğerdeki PAH miktarı arasındaki ilişki

	n	Kan	Karaciğer	Boy	Ağırlık	PAH
Kan	7	1.000				
Karaciğer	7	0.750**	1.000			
Boy	7	-0.071	-0.143	1.000		
Ağırlık	7	-0.281	-0.285	0.929*	1.000	
PAH	7	0.714	0.321	-0.071	-0.071	1.000

Tablo 8. 1996 yılında avlanan Pisi balığının kan ve karaciğerinde ölçülen aromatik DNA-eklemeleri ile boy, ağırlık ve karaciğerdeki PAH miktarı arasındaki ilişki

	n	Kan	Karaciğer	Boy	Ağırlık	PAH
Kan	14	1.000				
Karaciğer	14	0.160	1.000			
Boy	14	0.240	0.577**	1.000		
Ağırlık	14	0.336	0.270	0.760**	1.000	
PAH	14	0.217	-0.524**	-0.128	-0.128	1.000

Tablo 9. 1996 yılında avlanan Barbun balığının kan ve karaciğerinde ölçülen aromatik DNA-eklemeleri ile boy, ağırlık ve karaciğerdeki PAH miktarı arasındaki ilişki

	n	Kan	Karaciğer	Boy	Ağırlık	PAH
Kan	8	1.000				
Karaciğer	8	0.381	1.000			
Boy	8	0.381	0.295	1.000		
Ağırlık	8	0.262	0.310	0.970*	1.000	
PAH	8	-0.048	-0.048	-0.872**	-0.810**	1.000

**: $P_{0.01}$

*: $P_{0.05}$

Kan: Balık kanında ölçülen aromatik DNA-eklemeleri

Karaciğer: Balık karaciğerinde ölçülen aromatik DNA-eklemeleri

Tablo 10. 1996 yılında avlanan Mezgit balığının kan ve karaciğerinde ölçülen aromatik DNA-eklemeleri ile boy, ağırlık ve karaciğerdeki PAH miktarı arasındaki ilişki

	n	Kan	Karaciğer	Boy	Ağırlık	PAH
Kan	11	1.000				
Karaciğer	11	-0.203	1.000			
Boy	11	0.195	0.093	1.000		
Ağırlık	11	-0.049	0.357	0.642	1.000	
PAH	11	-0.196	-0.330	-0.227	-0.301	1.000

Tablo 11. 1996 yılında avlanan Çaçı balığının kan ve karaciğerinde ölçülen aromatik DNA-eklemeleri ile boy, ağırlık ve karaciğerdeki PAH miktarı arasındaki ilişki

	n	Karaciğer	Boy	Ağırlık	PAH
Karaciğer	15	1.000			
Boy	15	-0.417	1.000		
Ağırlık	15	-0.433	0.969*	1.000	
PAH	6	0.371	-0.542**	-0.464	1.000

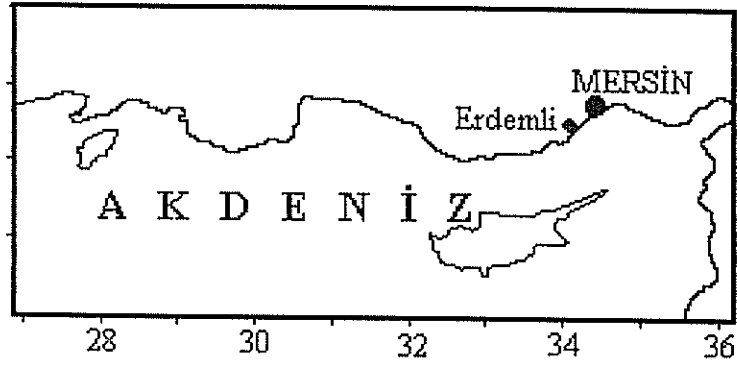
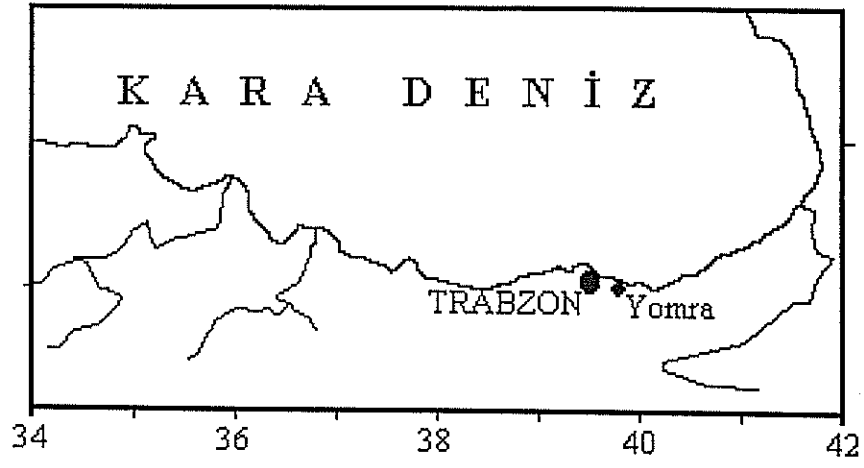
**: $P_{0.01}$

*: $P_{0.05}$

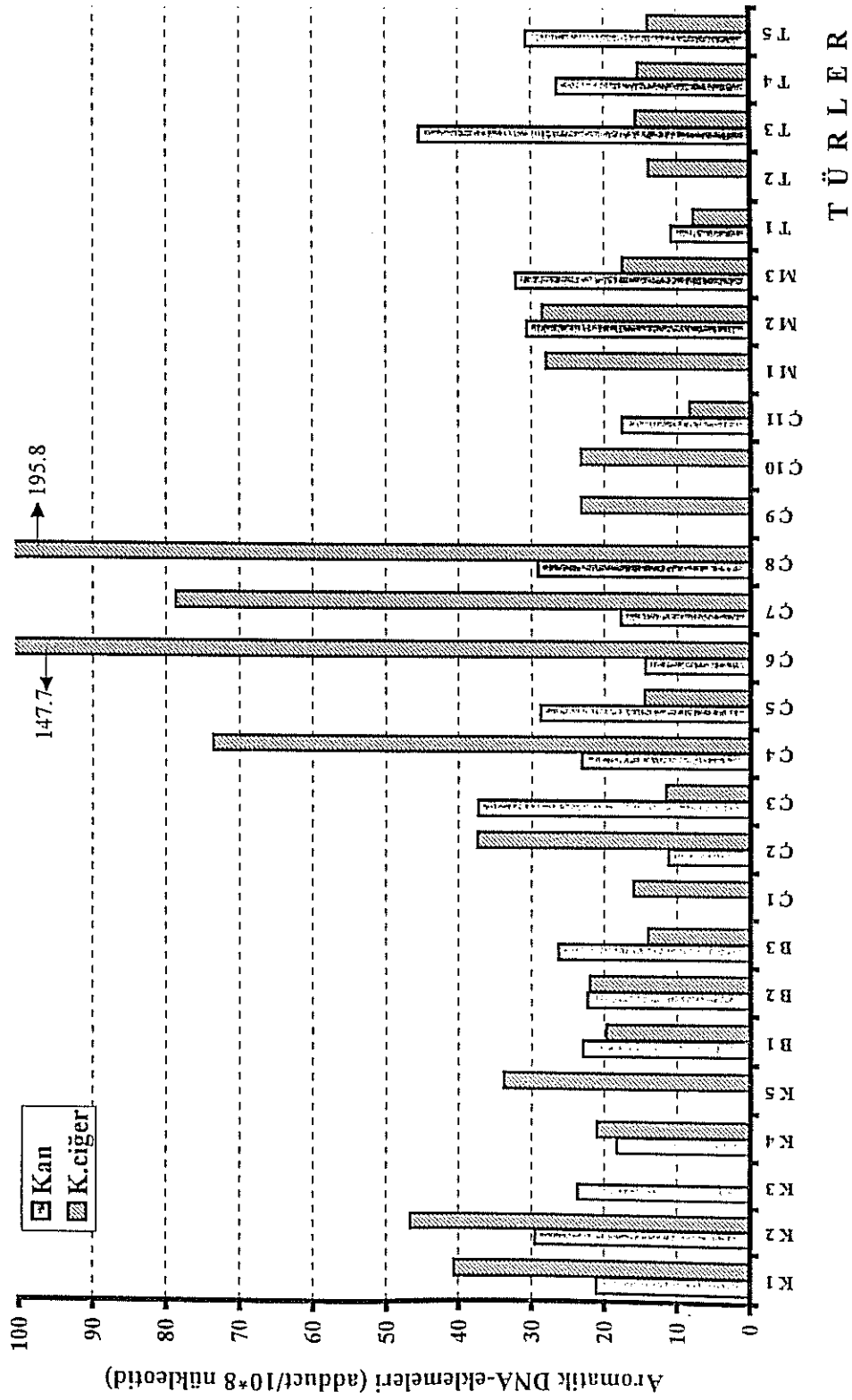
Kan: Balık kanında ölçülen aromatik DNA-eklemeleri

Karaciğer: Balık karaciğerinde ölçülen aromatik DNA-eklemeleri

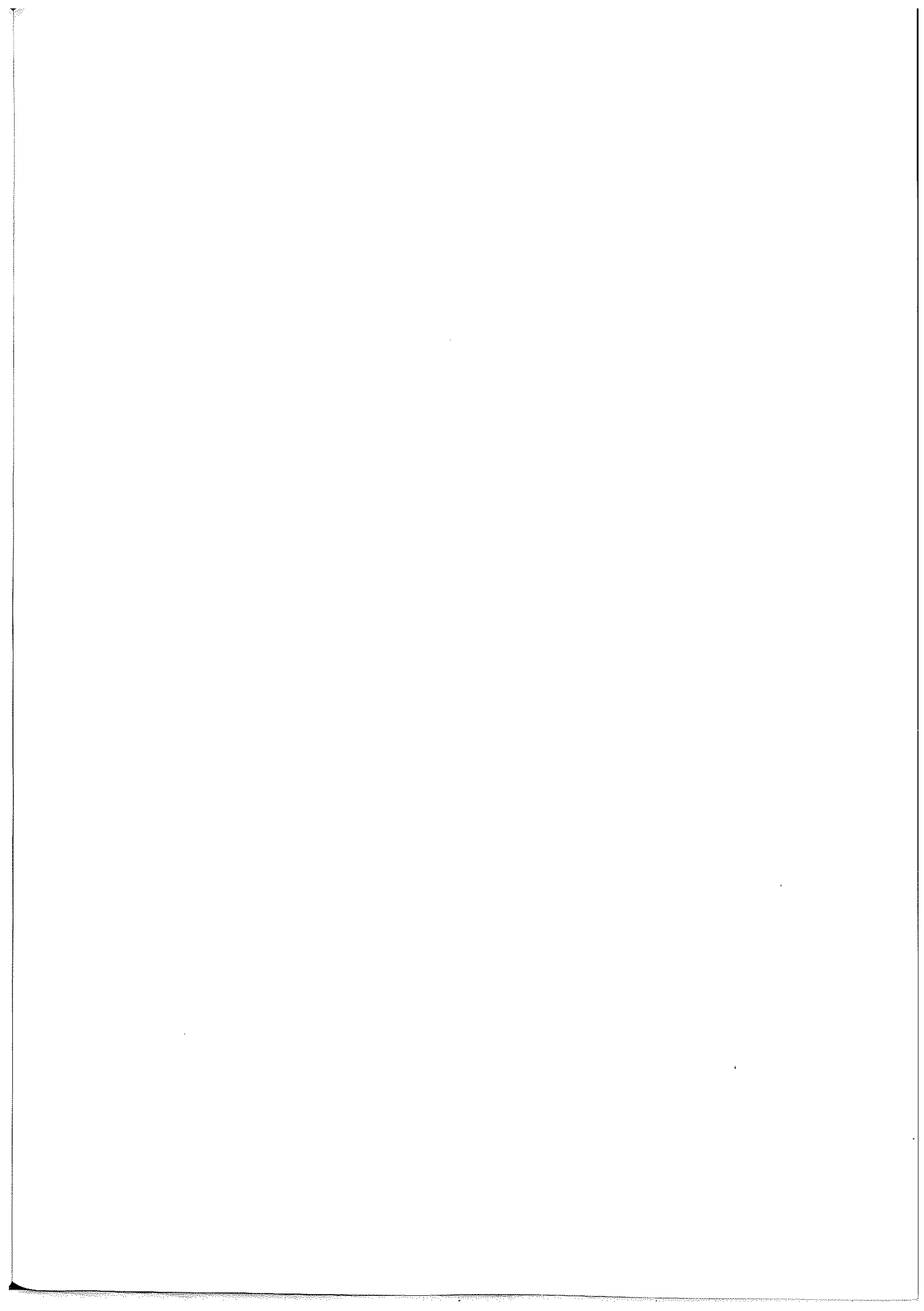
Ş E K İ L L E R

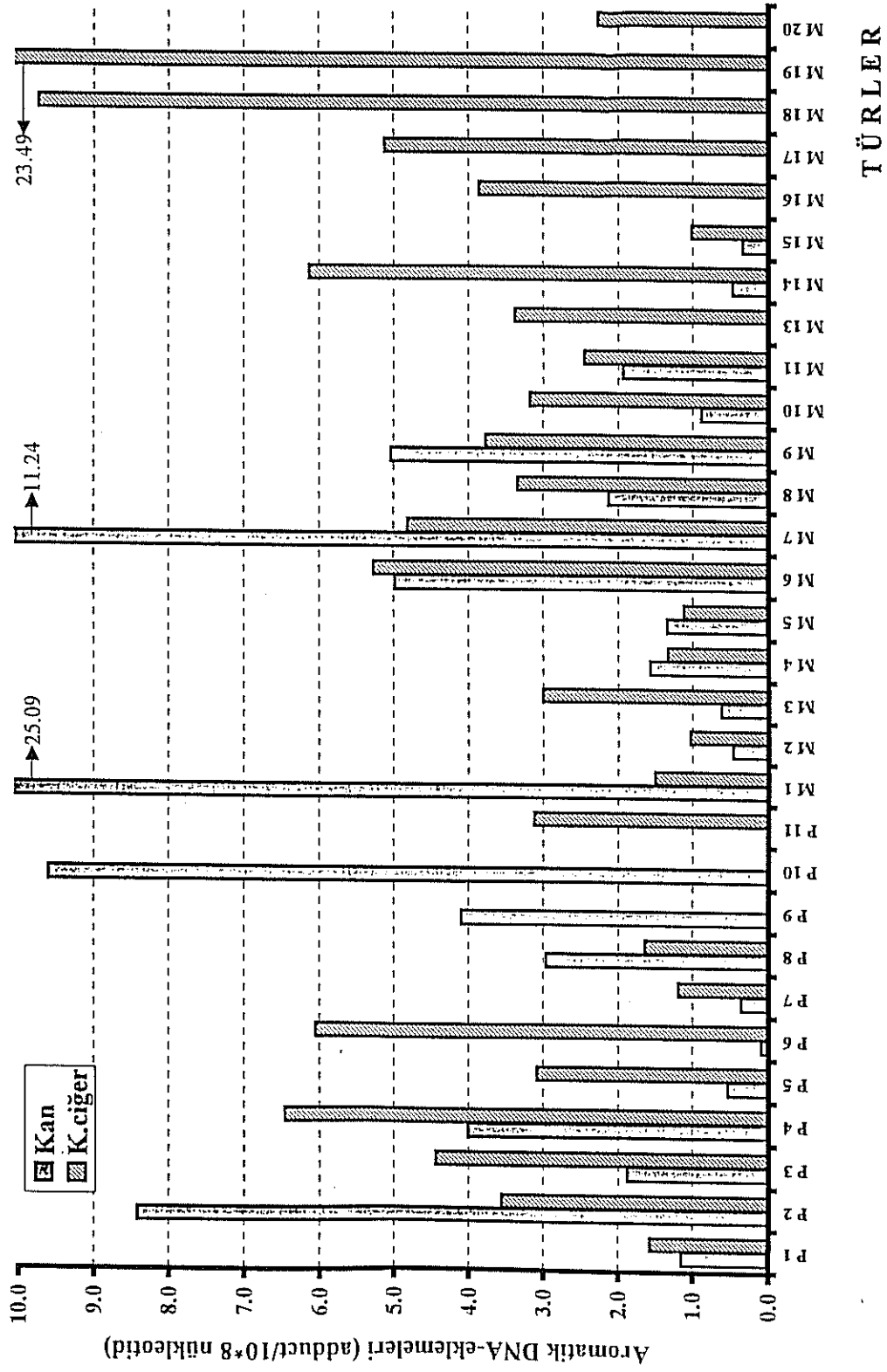


Şekil 1. Örnekleme istasyonları

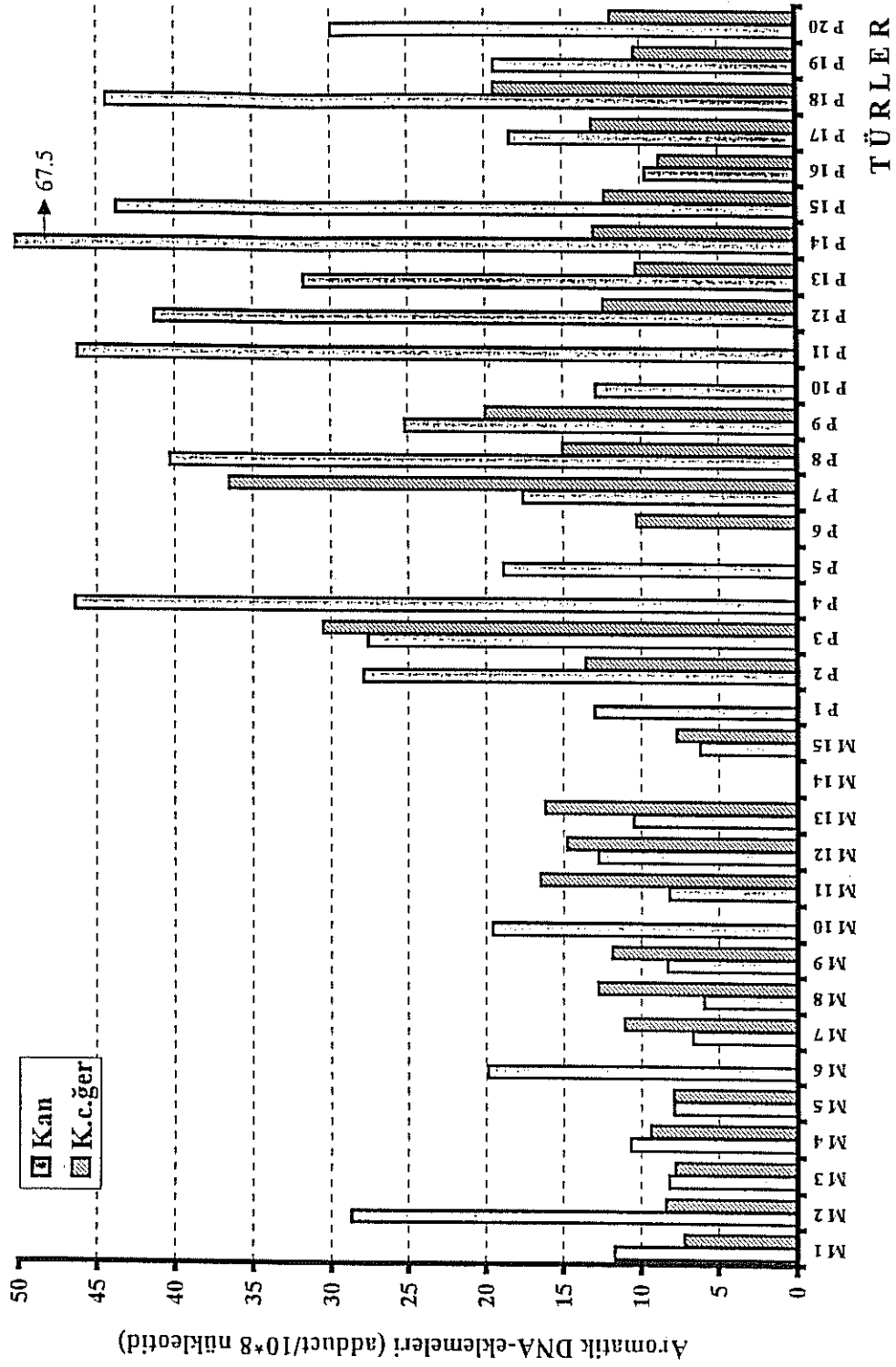


Şekil 3. 1994 yılında Karadeniz'den avlanan Kefal (K), Barbun (B), Çaç (Ç), Mezgit (M) ve Tirsi (T) balıklarında ölçülen DNA- eklemeleri.

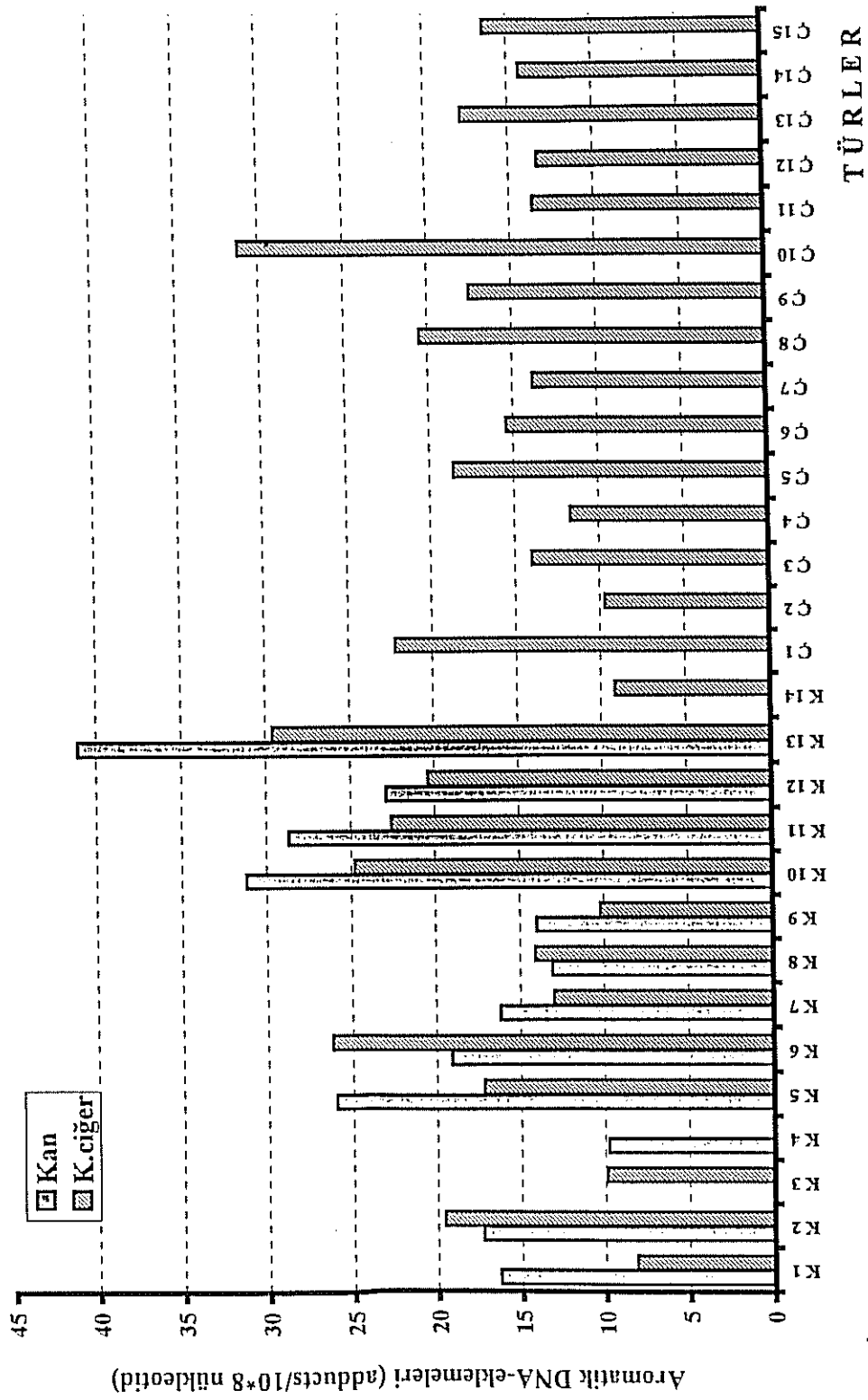




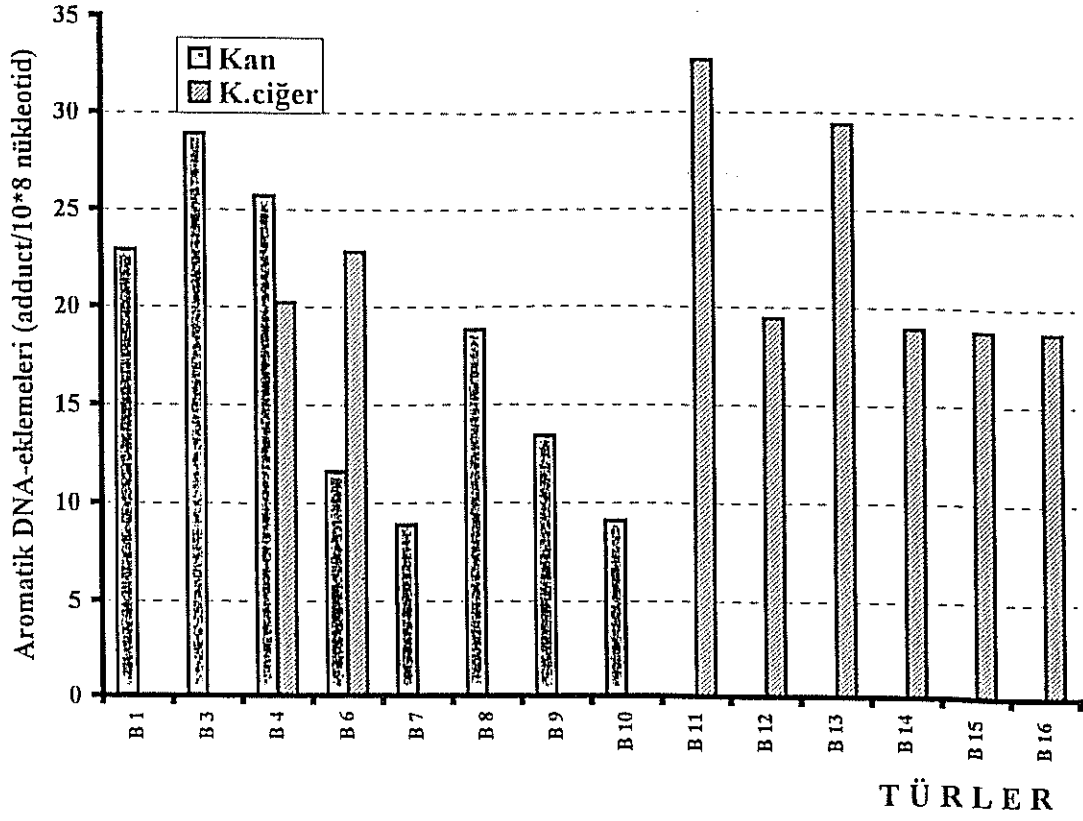
Şekil 4. 1995 yılında Karadeniz'den avlanan Pisi (P) ve Mezgit (M) balıklarında ölçülen aromatik DNA- eklemeleri



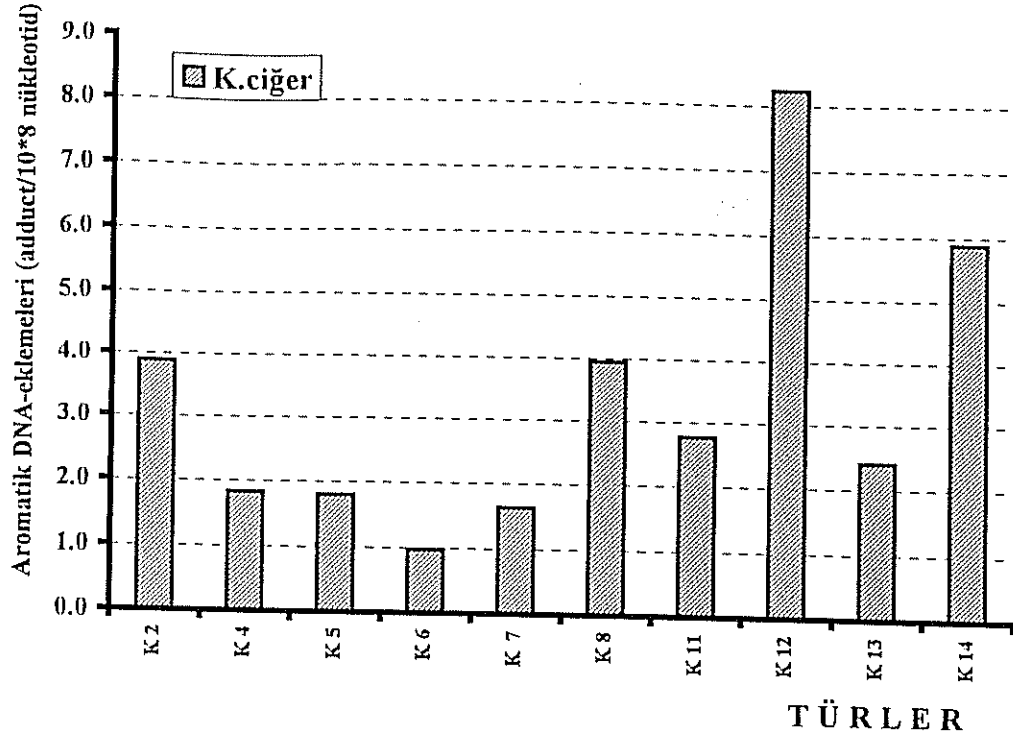
Şekil 5a. 1996 yılında Karadenizden avlanan Mezgit (M) ve Pisi (P) balıklarında ölçülen aromatik DNA- eklemeleri



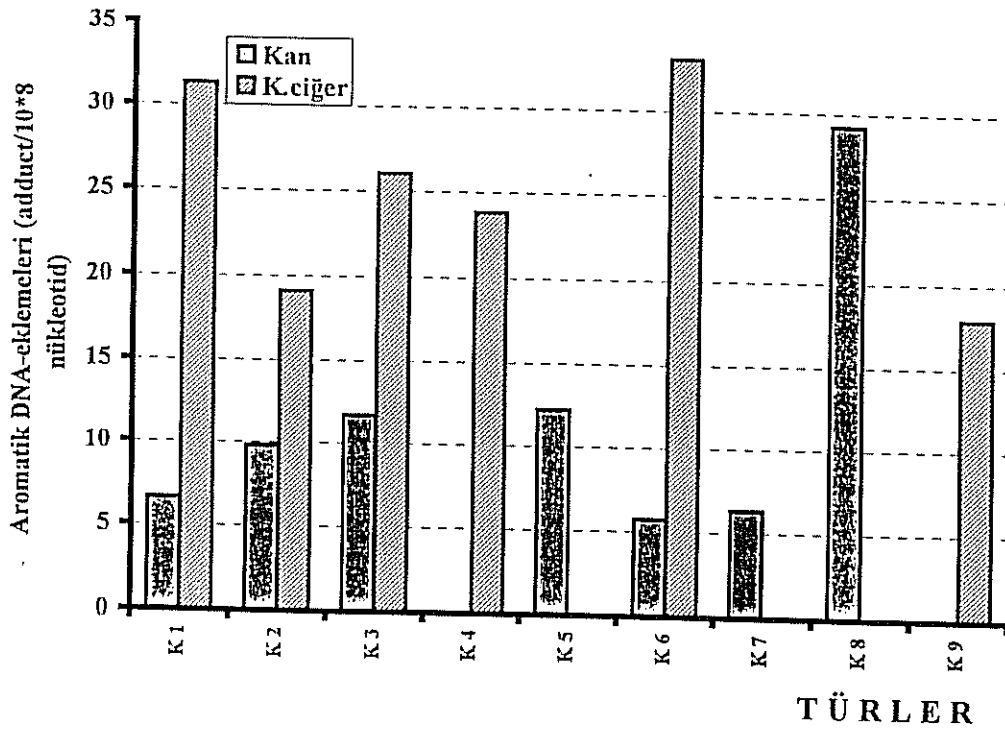
Şekil 5b. 1996 yılında Karadeniz'den avlanan Kefal (K) ve Çaç (Ç) balıklarında ölçülen aromatik DNA- eklemeleri



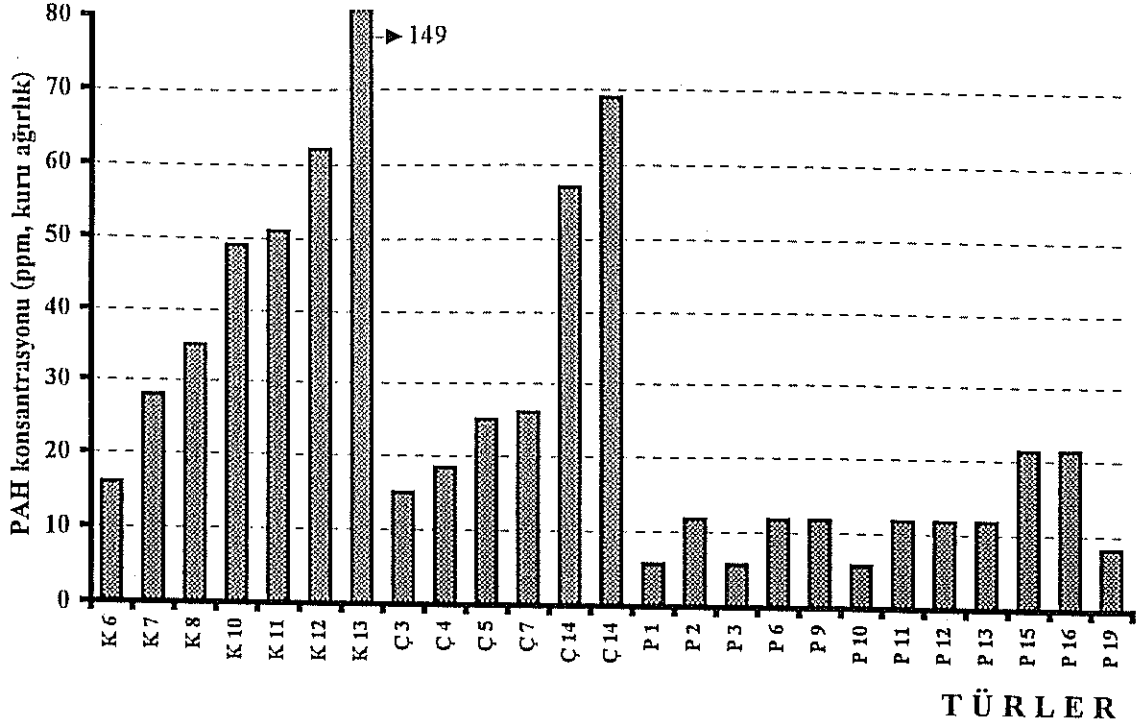
Şekil 5c. 1996 yılında Karadeniz'den avlanan Barbun (B) balıklarında aromatik ölçülen DNA- eklemeleri.



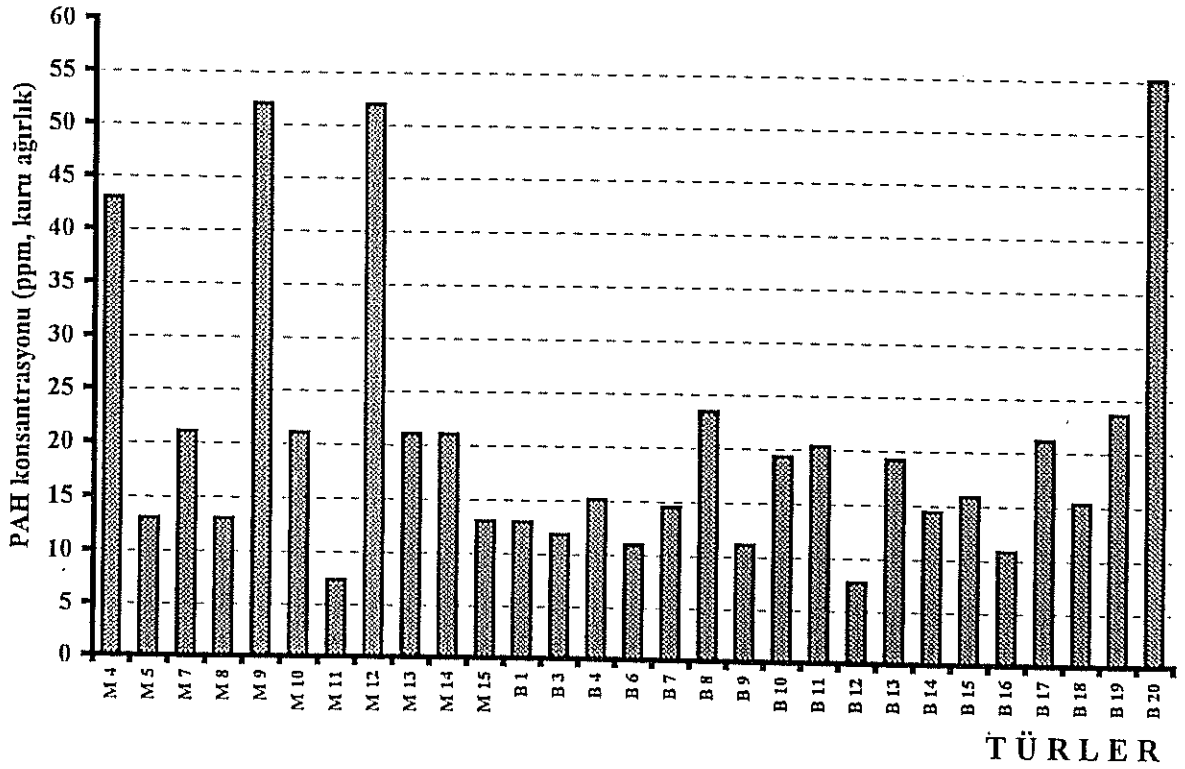
Şekil 6. 1995 yılında ODTÜ-DBE limanından avlanan kefal balıklarında ölçülen aromatik DNA- eklemeleri.



Şekil 7. 1996 yılında ODTÜ-DBE limanından avlanan kefal balıklarında ölçülen aromatik DNA- eklemeleri.



Şekil 8a. 1996 yılında Karadeniz'den avlanan Kefal (K), Çaç (Ç) ve Pisi (P) balıklarında ölçülen poliaromatik hidrokarbon (PAH) konsantrasyonları.



Şekil 8b. 1996 yılında Karadeniz'den avlanan Mezgit (M) ve Barbun (B) balıklarında ölçülen poliaromatik hidrokarbon (PAH) konsantrasyonları.

BİBLİYOGRAFİK BİLGİ FORMU

1- Proje No: YDABÇAG-35

2- Rapor Tarihi: 1997

3- Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01.11.1994-01.11.1996

4- Projenin Adı: Poliaromatik Hidrokarbonların (PAH) Balıklardaki Kanserojen Etkisi ve Buna Bağlı Olarak Oluşan Aromatik DNA-Eklenmeleri

5- Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar: Yürütücü: Prof.Dr.Mustafa ÜNSAL
Yardımcı Araştırmacılar: Prof.Dr.Güneş YÜREĞİR; DR. David PHILLIPS; Araştırma Görevlisi: Fatma TELLİ KARAKOÇ; Prof.Dr.F.Alec GAINES; Teknisyen: Alan HEWER6- Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: ODTÜ Deniz Bilimleri Enstitüsü PK: 28, 33731
ERDEMLİ/İÇEL

7- Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:

1- TÜBİTAK-Atatürk Bulvarı, No:221 06100 Kavaklıdere/ANKARA

2- Ç.Ü.Sağlık Bil.Ens.Biyokimya A.B.D. Balçalı-ADANA

3- Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey-İNGİLTERE

8- Öz (Abstract): Bu raporda, "Poliaromatik Hidrokarbonların (PAH) balıklardaki Kanserojen Etkisi ve Buna Bağlı Olarak Oluşan Aromatik DNA-Eklenmeleri" adlı proje çerçevesinde Karadeniz'de yaşayan Kefal, Mezgit, Çaç, Barbun, Pisi, Tirsi ve referans bölge olarak seçilen ODTÜ-DBE Limanından avlanan Kefal balıklarında aromatik DNA-eklenmeleri sonuçları yıllara göre verilmiştir.

Adı geçen proje, Türkiye Bilimsel Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'ın parasal katkısı, İngiltere'den Institute of Cancer Research (ICR) ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı (Ç.Ü.-SBE-BKABD) laboratuvarları kullanılarak Orta Doğu Teknik Üniversitesi Deniz Bilimleri Enstitüsü (ODTÜ-DBE) tarafından yürütülmüştür.

Örneklere aromatik DNA-eklenmelerinin farklı balık türlerinde ve yıllara göre değişimleri incelenmiştir. Ölçülen aromatik DNA-eklenmeleri sonuçlarına bakıldığında kandan ve karaciğerden elde edilen sonuçlar türlere göre farklılıklar göstermektedir. Karaciğer sonuçlarına göre en yüksek aromatik DNA-eklenesi ODTÜ-DBE Limanından avlanan ve referans balık olarak seçilen Kefal balığında ölçülmüştür. Kanda en yüksek değer ise Pisi balığında ölçülmüştür.

PAH konsantrasyonu da yine türler arasında farklılık göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Aromatik DNA-eklenmeleri; Doğu Karadeniz, PAH, balık

9- Proje ile ilgili Yayın/Tebliğlerle ilgili Bilgiler 1 adet makale yayınlandı
1 adet makale kabul edildi.
1 adet makale yayın için gönderildi.
2 adet tebliğ sunuldu.

10- Bilim Dalı:

Doçentlik B. Dalı Kodu: 611.01.00

ISIC Kodu:

Uzmanlık Alanı Kodu:

11- Dağıtım (*): Sınırlı Sınırsız

12- Raporun Gizlilik Durumu :

 Gizli Gizli Değil

(*) Projenizin Sonuç Raporunun ulaştırılmasını istediğiniz kurum ve kuruluşları ayrıca belirtiniz