



TÜRKİYE BİLİMSEL VE  
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL  
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

KİRLETİCİLERİN KEFAL BALIĞI  
(*Mugil cephalus*)'un KARACİĞERİNDEKİ  
DNA ÜZERİNE ETKİLERİ

1954035

PROJE NO: YDABÇAG-190

2003-43

Yer Deniz ve Atmosfer Bilimleri Araştırma Grubu

Earth Marine and Atmospheric Sciences  
Researches Grant Group

KİRLETİCİLERİN KEFAL BALIĞI  
(*Mugil cephalus*)'un KARACİĞERİNDEKİ  
DNA ÜZERİNE ETKİLERİ

1954035

PROJE NO: YDABÇAG-190

#2003-43

Prof. Dr. ALEC F. GAINES  
Dr. FATMA TELLİ KARAKOÇ  
Doç. Dr. ABDULLAH TULİ  
ALAN HEWER

MAYIS 1997  
MERSİN

## ÖNSÖZ

TÜBİTAK desteğinde yürütölen “Kirleticilerin *Mugil cephalus*’un karaciğerindeki DNA üzerindeki Etkileri” adlı projesi, ODTÜ-Erdemli Deniz Bilimleri Enstitüsü, İngiltere, Institute of Cancer Research, Haddow Laboratories ve Çukurova Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı tarafından müşterek olarak yürütölmüştür. Ayrıca örnek alımında Tarım ve Köy İşleri 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 01.03.1995-01.03.1997 tarihleri arasında yapılan alan ve laboratuvar çalışmalarının sonuç ve yorumlarını içermektedir.

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Önsöz.....	2
Tablolar listesi.....	5
Şekiller listesi.....	8
Özet ve Anahtar Kelimeler.....	9
Summary and Key Words.....	10
1. Proje destekleyen ve işbirliği yapılan kuruluşlar.....	11
1.1. Türkiye Bilimsel Araştırma Kurumu- TÜBİTAK.....	11
1.2. Institute of Cancer Research.....	11
1.3. Ç.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı.....	11
1.4. ODTÜ- Deniz Bilimleri Enstitüsü.....	11
2. Giriş.....	12
3. Projenin Amaçları.....	14
4. Projede Uygulanan Metodlar.....	15
4.1. Örneklerin toplanması ve saklanması.....	15
4.2. Deniz suyunda PAH analizi.....	16
4.3. Kefal balığında PAH analizi.....	16
4.4. Kefal balığında enzim analizleri ve protein tayini.....	17
4.4.1. Homojenat Hazırlama.....	17
4.4.2. Protein Tayini.....	17
4.4.3. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G-6-PD).....	18
4.4.4. Glutasyon Peroksidaz (GSH-P).....	18
4.4.5. Glutasyon Redüktaz (GSH-R).....	18
4.4.6. Glutasyon (GSH).....	18
4.4.7. Süperoksit Dismütaz (SOD).....	19
4.4.8. Malindialdehit (MDA).....	19
4.4.9. Hesaplamalar.....	19

4.5. Kefal balığında DNA izolasyonu ve DNA- <sup>32</sup> P-sondan	
ekleme tekniği.....	20
<sup>32</sup> P-Postlabelling.....	21
1. Butanol Ekstraksiyon Yöntemi.....	21
2. Nükleaz P1 Zenginleştirme Yöntemi	
(Nuclease P1-enhancement (NP1)).....	22
4.6. Thin Layer Chromatografi (TLC).....	22
5. Elde Edilen Bulgular.....	24
5.1. Enzim sonuçları.....	24
5.1.1 İki Akdeniz Limanının Karşılaştırılması.....	25
5.2 DNA-eklemeleri.....	27
5.2.1. Mersin Limanı.....	27
5.2.2. ODTÜ-DBE Limanı.....	29
5.2.3. Yomra Limanı.....	30
5.2.4. Aromatik DNA-eklemeleri açısından üç farklı limanın	
değerlendirilmesi.....	30
6. Tartışma.....	31
7. Karşılaşılan Güçlükler.....	32
8. Harcamalar.....	33
9. Referanslar.....	34
10. Tablolar .....	38
11. Şekiller .....	65
12. Projeden çıkan yayınlar.....	ek.

## TABLolar LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1. Mersin Limanından yakalanan kefal balığının ( <i>Oedolechilius labeo</i> ) sex, boy, ağırlık, karaciğer ağırlığı ve protein konsantrasyonu.....	38
Tablo 2. Mersin Limanından yakalanan <i>Oedolechilius labeo</i> 'un karaciğerindeki Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi.....	38
Tablo 3. Mersin Limanından yakalanan <i>Oedolechilius labeo</i> 'un karaciğerindeki Glutasyon peroksidaz aktivitesi.....	39
Tablo 4. Mersin Limanından yakalanan <i>Oedolechilius labeo</i> 'un karaciğerindeki Glutasyon redüktaz aktivitesi.....	39
Tablo 5. Mersin Limanından yakalanan <i>Oedolechilius labeo</i> 'un karaciğerindeki Glutasyon aktivitesi.....	40
Tablo 6. Mersin Limanından yakalanan <i>Oedolechilius labeo</i> 'un karaciğerindeki Malindialdehit konsantrasyonu.....	40
Tablo 7. Mersin Limanından yakalanan <i>Oedolechilius labeo</i> 'un karaciğerindeki Süperoksit dismütaz aktivitesi.....	41
Tablo 8. <i>O. labeo</i> 'un G-6-PD, GSH-P, GSH-R and SOD'aktivitesi ve GSH, MDA konsantrasyonunun Spearman Rank korelasyonu ile istatistiksel ifadesi.....	41
Tablo 9. Mersin Limanından yakalanan <i>Lisa ramada</i> 'nın sex, loy ağırlık, karaciğer ağırlığı ve protein miktarı.....	42
Tablo 10. Mersin Limanından yakalanan <i>Lisa ramada</i> 'nın karaciğerindeki Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi (U: µmol/ml).....	43
Tablo 11. Mersin Limanından yakalanan <i>Lisa ramada</i> 'nın karaciğerindeki Glutasyon peroksidaz aktivitesi (U: µmol/ml).....	44
Tablo 12. Mersin Limanından yakalanan <i>Lisa ramada</i> 'nın karaciğerindeki Glutasyon redüktaz aktivitesi (U: µmol/ml).....	45

Tablo 13. Mersin Limanından yakalanan <i>Lisa ramada</i> 'nın karaciğerindeki Glutasyon aktivitesi (U: $\mu\text{mol/ml}$ ).....	46
Tablo 14. Mersin Limanından yakalanan <i>Lisa ramada</i> 'nın karaciğerindeki Malindialdehit aktivitesi (U: $\mu\text{mol/ml}$ ).....	47
Tablo 15. Mersin Limanından yakalanan <i>Lisa ramada</i> 'nın karaciğerindeki Süperoksit dismutaz aktivitesi (U: $\mu\text{mol/ml}$ ).....	48
Tablo 16. <i>Lisa ramada</i> da ölçülen enzim aktivitelerine uygulanan istatistiksel analiz (Spearman rank korelasyonu) sonuçları.....	48
Tablo 17. ODTÜ-DBE Limanından yakalanan kefal balığının sex, boy, ağırlık, karaciğer ağırlığı ve protein miktarı.....	49
Tablo 18. ODTÜ-DBE Limanından yakalanan <i>Mugil sp.</i> in karaciğerindeki Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi.....	50
Tablo 19. ODTÜ-DBE Limanından yakalanan <i>Mugil sp.</i> in karaciğerindeki Glutasyon peroksidaz dehidrogenaz aktivitesi.....	51
Tablo 20. ODTÜ-DBE Limanından yakalanan <i>Mugil sp.</i> in karaciğerindeki Glutasyon redüktaz aktivitesi.....	52
Tablo 21. ODTÜ-DBE Limanından yakalanan <i>Mugil sp.</i> in karaciğerindeki Glutasyon aktivitesi.....	53
Tablo 22. ODTÜ-DBE Limanından yakalanan <i>Mugil sp.</i> in karaciğerindeki Malindialdehit aktivitesi.....	54
Tablo 23. ODTÜ-DBE Limanından yakalanan <i>Mugil sp.</i> in karaciğerindeki Süperoksit dismutaz aktivitesi.....	55
Tablo 24. ODTÜ-DBE 'den yakalanan <i>Mugil sp.</i> için yapılan Spearman rank korelasyonu.....	55
Tablo 25. Mersin ve ODTÜ-DBE limanlarından yakalanan kefal balıklarında ölçülen enzim aktivitelerinin karşılaştırılması.....	56
Tablo 26. Yomra, Mersin ve ODTÜ-DBE limanlarından alınan deniz suyunda ve kefal karaciğerinde ölçülen PAH miktarı ( $\mu\text{g/L}$ su için; $\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık karaciğer için).....	57
Tablo 27. Kefal balığı karaciğerindeki PAH konsantrasyonu.....	57

Tablo 28. Mersin Limanı kefal balıklarının sex, boy, somatic karaciğer index, ağırlık ve kan ve karaciğerde aromatic DNA-eklemeleri konsantrasyonu.....	58
Tablo 29. Mersin Limanından yakalanan kefal balıklarına uygulanan spearman rankkorelasyonu.....	59
Tablo 30. ODTÜ-DBE limanından yakalanan balıkların sex, boy, ağırlık, karaciğer ağırlığı ve somatik karaciğer indeksi (SLI).....	60
Tablo 31. ODTÜ-DBE limanından yakalanan balıkların sex, boy, ağırlık, karaciğer ağırlığı ve somatik karaciğer indeksi (SLI).....	61
Tablo 32. ODTÜ-DBE limanından yakalanan kefal balıklarının kan ve karaciğerinde ölçülen aromatik DNA-eklemeleri.....	61
Tablo 33. Yomra Limanından yakalanan <i>Mugil saliens</i> 'in sex, boy, ağırlık, karaciğer ağırlığı, somatic karaciğer indeksi (SLI) dağılımı.....	62
Tablo 34. Yomra Limanından yakalanan kefal balıklarının kan ve karaciğerinde ölçülen aromatic DNA-eklemeleri.....	63
Tablo 35. Akdeniz ve karadenizden seçilen limanlarda yakalanan kefal balığının kan ve karaciğerinde ölçülen aromatik DNA eklemeleri.....	64
Tablo 36. Bütanol ekstraksiyon ve nükleaz P1 zenginleştirilmesi arasındaki farkın farklı balık türlerinde yapılan çalışmalarla ortaya konması.....	64



## ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1. İnce tabaka (TL) plakası üzerinde çokyönlü kromatografinin yönleri (Gupta 1984'ten adapte edilmiştir).....	65
Şekil 2. İnce tabaka kromatografisi (Gupta 1984'dan adapte edilmiştir).....	66
Şekil 3. <i>O. labeo</i> 'nun enzim sonuçları (protein'e göre hesaplanmış).....	67
Şekil 4. <i>L. ramada</i> ' da ölçülen enzimlerin Lineer regresyon analiz sonuçları...68	
Şekil 5. Protein miktarına karşı MDA, SOD, GSH-R, GSH, G-6-PD ve GSH-P 'in Lineer regresyon analizi.....	69
Şekil 6. G-6-PD, GSH-P- GSH-R, GSH, SOD ve MDA konsantrasyonlarının üç farklı kefal grubu için karşılaştırılması.....	70
Şekil 7. Aromatik DNA eklemelerinin otoradyografteki görüntüsü (Gupta, 1993'den alındı) a. Blank solvent, b. Benzo(a)pyrene.....	71
Şekil 8. İnce tabaka kromatografisinde belirlenen iki spot (nokta).....	72
Şekil 9. Mersin Limanındaki iki dominant kefal türünde ölçülen aromatik DNA eklemeleri.....	73

## ÖZET VE ANAHTAR KELİMELER

Bu proje çerçevesinde Akdeniz ve Karadenizden seçilen limanlarda yaşayan bazı kefal balığı türlerinde, kirliliğin etkisiyle fizyolojilerindeki enzimatik değişiklikler ve DNA'larındaki bozulmalar mikroskop altına alınmıştır.

Farklı kefal balığı türlerinde (*Lisa ramada*, *Oedolechilius labeo*, *Lisa aurata*) ölçülen enzim aktiviteleri birbirine çok yakın türlerin hatta aynı habitatı kullanan türler arasındaki farkı ortaya koymuştur. Farkın hem türün kendisine has özelliklerine hemde beslenme seçimlerine bağlı olduğu yapılan çalışma ile ortaya konmuştur. Birçok antioksidant enzim yardımıyla (Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, Glutasyon peroksidaz, Glutasyon redüktaz, Glutasyon, Süperoksit Dismütaz, Malindialdehit) kefal balığı türlerinin farklı kirlilik seviyelerine karşı gösterdiği tepki ortaya konmuştur. Kirliliğin artması SOD aktivitesini düşürürken GSH-P, GSH-R, MDA miktarları artarken G-6-PD, GSH miktarları dalgalanmalar göstermiştir.

Aromatik DNA eklemeleri de farklı türlerde ve farklı limanlarda değişimler döstermiştir. Buna göre Mersin limanı kefal balıkları DNA bozulmalarından en fazla etkilenen türler olmuşlardır. ODTÜ-DBE liman kefal balıkları ise daha az etkilenmişlerdir. Kan ve karaciğer arasında Mersin ve ODTÜ-DBE liman kefal balıkları arasında oldukça bariz fark varken Yomra limanı kefal balıklarında fark bulunamamıştır.

Aromatik DNA eklemeleri için kullanılan iki metod arasındaki farkın nükleaz P1 zenginleştirilmesi yapılırken bazı eklemelerin enzimatik olarak parçalanması sonucunda ortaya çıktığı literatür bilgileriyle de desteklenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Akdeniz, Karadeniz, Kefal balığı, glutasyon redüktaz, glutasyon peroksidaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, süperoksit dismütaz, malindialdehit, aromatik DNA eklemeleri, butanol ekstraksiyon, nükleaz P1 zenginleştirilmesi

## SUMMARY AND KEY WORDS

With this project, the effects of pollution on enzyme systems and aromatic DNA adduct formation of some grey mullet species living in Black sea and Mediterranean sea have been under microscope.

Different grey mullet species (*Lisa ramada*, *Oedolechilius labeo*, *Lisa aurata*) have different enzyme activities, although they share the same habitats. These differences may come from either individual differences or different feeding habits. Many antioxidant enzymes (Glutathione reductase, Glutathione peroxidase, Glutathione, Superoxide dismutase, Malondialdehyde, Glucose-6-phosphate dehydrogenase) were used as a biomarker for the understanding of the reaction of the grey mullet species to the pollution. SOD activities were decrease with decreasing pollution level but GSH-P, GSH-R and MDA concentration were increased. The GSH concentration were fluctuated in different harbours.

The level of aromatic DNA adduct were fluctuated in harbours and in different grey mullet species. The maximum aromatic DNA adduct were measured in Mersin Harbour grey mullet. METU-IMS harbour species was less effected with the pollution according to the level of aromatic DNA-adduct formation. The differnces between blood and liver aromatic DNA-adduct formation were very obvious in Mersin and METU-IMS harbours while this differences were not noticed in Yomra harbour grey mullet.

The differences between butanol extraction and nuclease P1 enhancement techniques may come from breakdown of some adducts with nuclease P1 enzyme.

**Key words:** Black Sea, Mediterranean Sea, grey mullet, glutathione reductase, glutathione peroxidase, glutathione, glucose-6-phosphate dehydrogenase, superoxide dismutase, malondialdehyde, aromatic DNA-adduct, butanol extraction, nuclease P1

## **1. DESTEKLEYEN VE İŞBİRLİĞİ YAPAN KURULUŞLAR**

### **1.1. TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU-TÜBİTAK**

Çalışma Türkiye Bilimsel Araştırma Kurumu bünyesindeki Yer Deniz Atmosfer Bilimleri ve Çevre araştırma Grubu (YDABÇAG) tarafından YDABÇAG-190 projesi kapsamında desteklenmiştir.

### **1.2. INSTITUTE OF CANCER RESEARCH (KANSER ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ)**

İngilterede bulunan bu enstitü, 1993 yılından bu yana balıklardan elde edilen DNA örneklerinde aromatik DNA-eklemeleri çalışmalarını gerek buradan bir araştırmacı giderek gerekse sadece örnekleri göndererek çalışmalara tam destek vermiştir. 1993 yılından bu yana tuzlerce balık kanı ve karaciğeri örneği bu laboratuvarında analiz edilmiştir.

### **1.3. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ODTÜ-Deniz Bilimleri enstitüsü'nün alt yapısı kuruluncaya kadar (1996) tüm örnekler bu enstitüde analiz edilmiştir.

### **1.4. ORTADOĞU TEKNİK ÜNİVERSİTESİ DENİZ BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

1996 yılından sonra yapılan tüm analizler bu enstitü'de yapılmıştır. Projenin tüm ara raporları bu enstitüde yazılmıştır. Yine proje yürütücüsü bu enstitü görevlidir.

## 2. GİRİŞ

Yabancı maddelerle sürekli kirlenen sucul ortamlar alarm seviyesine gelmektedir. Kirlenen sucul ortamlarda yaşayan canlılar besin zinciri yoluyla taşıdıkları bu kirliliği insana kadar getirmektedir (Ariza ve ark., 1995). Poliaromatik hidrokarbonlar (PAH) sucul ortamları kirlüten kirleticilerin önemli bir grubunu oluşturmaktadır. PAH'lar balık dokularında metabolize olurlar ve lipofilik özelliklerinden dolayı özellikle karaciğer, solungaç, beyin ve hepatopankreaslarda birikirler (Couch ve ark., 1979, Dunn, 1991, Stegeman ve Hahn, 1994). PAH'lar balık dokularında metabolize olurlar. PAH'lar lipofilik (yağseven) bileşiklerdir ve karaciğer hepatopankreas, solungaç ve beyinde birikirler. PAH'lar birçok antioksidant enzim tarafından karaciğerde detoksifiye olurlar ve enson ürün organizmadan dışarı atılır. Bu metabolik makinada birçok farklı enzim görev alır. Bunların bir kısmı katalaz, sitokrom P450, enzim sistemi, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, süperoksit dismutaz, ksantin oksidazdır. Bu enzimler sayesinde vucuda giren yabancı maddeler lipofilik karakterden hidrofilik karektere değişerek vucuttan atılırlar. Fakat bazen, reaktif metabolitler (elektrofilik ve aktif grupları olan bileşikler) DNA, RNA veya proteine bağlanıp bu moleküllerin yapısını bozabilirler. Bu bozulmalar geri dönüşümlü olabilmektedir. Yani canlı daha temiz bir ortama geçerse oluşan bu bozulmalar düzelebilmektedir (Stegeman ve Hahn, 1994).

Gelişen dünya ve değişen politikalar, bilimsel çalışmalarda memeli canlıların kullanımına sınırlama getirmiştir. Bu nedenle balıklar, kimyasalların neden olduğu kanser çalışmalarında mükemmel bir model olabilmektedir (Varanasi ve ark, 1986).

Karadeniz ve Akdenizden seçilen toplam 3 farklı liman örnekleme alanı olarak belirlenmiştir.

Karadeniz yarı kapalı bir deniz olup Akdenize iki ayrı dar boğazla (İstanbul ve Çanakkale boğazı) bağlanmıştır. Yüzey alanı 423500km<sup>2</sup> ve hacmi 537000 km<sup>3</sup> tür. En derin yeri 2245m olup ortalama derinliği 1271 m'dir. Karadeniz avrupadan gelen 3 büyük ve kirli nehrin aktığı ve yine birçok küçük nehrin boşaldığı bir denizdir. Taşıdıkları yük nedeniyle her gün tonlarca kirletici Karadeniz'e boşalmaktadır (Tolmazin, 1985; Mee, 1992, Kıdeys, 1994).

Akdenizin Atlantik okyanusu ile tek bağlantı yeri Cebelitarık boğazıdır. Akdeniz etrafındaki gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerin aktiviteleri ve nil nehrinin getirdiği yüklerle kirlenmektedir. Akdenizdeki var olan kirliliğin %80-90'ı karasal kaynaklıdır. Türk kıyılarındaki turizm ve tarımsal faaliyetler kirlilik nedenlerinin başında gelmektedir. Bunun yanında rafineriler ve petrol boru hattı ve bunların neden olduğu kirlilikte oldukça önemli seviyelerdedir.

Biyolojik çalışmalarda, balık türlerinin omurgalılar arasında özel bir yeri bulunmaktadır. Yaşayan omurgalıların %42sini balık türleri oluşturmaktadır. Yeryüzünde 300 milyon yıldır yaşayan bu grup omurgalı canlılar hemen her yerde bulunabilmektedir (Klontz, 1995).

Bu çalışma için seçilen kefal balığı taşlık benzeri mideye sahip olup mikroalg, bitki kalıntıları ve küçük yaratıklarla beslenirler bunları mineral parçacıklar sayesinde ezerler (gizzard-like stomach).

Balıklarda kan miktarı vucut ağırlığının % 1.8-3.8'ini oluşturmaktadır (Hoar ve Randall, 1970). Balık kanı çok özel bir sıvı olup metabolitlerin ve besin tuzlarının, hormonların, gaz ve hücre taşınmasında rol oynar. Diğer görevi ise homeostasi ve immün cevap verme özelliğidir. Bunun yanında karbondioksit ve oksijen taşınmasında da rol almaktadır. Balık kırmızı kan hücresi çekirdeklidir (Kuntzmann, 1991). Genel olarak kırmızı kan hücreleri balık türlerinde  $4 \times 10^{12}$  hücre/l ve beyaz kan hücreleride 1 mm<sup>3</sup> te 20000-150000 dir.

Balık karaciğeri sitokrom P-450 enzim sisteminin en çok bulunduğu organdır. Bu nedenle bu sistemin inaktif olması bu organda detoksifiye işlemlerinin yapılamamasına ve toksisitenin yukselmesine neden olur. Hepatosit hücreleri tarafından salgılanan safra konjuge metabolitlerin sindirim sistemine taşınmasına veya tekrar intrahepatik sirkülasyona girmesini sağlar.

## 2. PROJENİN AMAÇLARI

Poliaromatik hidrokarbonlar (PAHs), dünyada şehirleşmenin en yoğun olduğu yerlerde görülür. Sedimana, biyotaya akümüle olur ve etkili bir şekilde eliminasyonu mümkün değildir. PAH'lar lipofilik bileşiklerdir ve canlı organizmaya alımı pasif ve kontrollü difüzyonla olduğuna inanılmaktadır ( Ware, 1995).

Sucul ortamlarda xenobiotik (organizmaya yabancı maddeler) kontaminasyonu artık alarm seviyesine ulaşmıştır. Meydana gelen bu kirlilik sucul ortamlarda yaşayan canlılar ve indirekt olarak onlar üzerinden beslenen insanların sağlığını tehdit eder boyuttadır. PAH kirliliği hakkında birçok çalışma yapılmıştır (Couch et al., 1979; Cossa et al., 1983; Jackson et al., 1994). PAH'lar canlı organizmalarda metabolize olurlar (Midye, balık, gibi). PAH'lar lipofilik olması nedeniyle ençok karaciğer, hepatopankreas, solungaç ve beyinde birikir. PAH'lar birçok antioksidant enzim yardımıyla karaciğerde detoksifiye olur ve oluşan son ürün genellikle vucuttan atılır (Stegeman and Hahn, 1994). PAH'ların biyotransformu için gerekli enzimler, katalaz, sitokrom P450-enzim sistemi, glutasyon peroksidaz, glutasyon redüktaz, superoksit dismütaz and ksantin oksidazdır. Bu enzimlerin birçoğu genel olarak toksik maddeleri daha az toksik maddeye çevirmek ve lipofilik özelliklerinin hidrofilik özelliğe çevrilmesiyle vucuttan atımını kolaylaştırmaktan sorumludur. Tüm bu işlemler sırasında oluşan metabolitler bir kısmı metabolizasyon sırasında daha fazla reaktif hale gelmektedir. Reaktif metabolitler elektrofilik bir yapıya sahiptirler ve kovalent bağla

DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilirler. DNA daki bu değışiklik, hücrenin yaralanmasına, mutasyonuna veya kansere neden olabilir. DNA'daki bu bağlanmalar geridönüşümlü (reverseble) bir reaksiyondur. Mesela balıklar eğer yaşadıkları ortamı değıştirip temiz bölgelere giderse bir süre sonra DNA'daki bu bozulmalar düzelebilir (Stegeman and Hahn, 1994).

Politik ve sosyal baskılar nedeniyle memeli canlıların deneylerde kobay olarak kullanımının kısıtlanması alternatif model arayışlarına neden olmuştur. Bu anlamda, sucul canlılar istenilen çoklukta çalışmaya olanak vermesi ve hassas çalışmaların yapılmasına olanak vermesi açısından iyi bir model teşkil etmektedir (Zelikoff, 1996).

Yukarıda belirtilenlerin ışığı altında bu projenin uzun vadede amacı;

- Kefal balığının tüm dünya sularında bulunması nedeniyle indikatör canlı olarak kullanılabileceğini göstermek,
- Kanser çalışmalarında bugüne kadar kullanılan deney hayvanlarına alternatif olabileceğini göstermek,
- Kefal balığının iyi bir biyo-indikatör olduğunu verilerle ortaya koymaktır.

#### **4. PROJEDE UYGULANAN METODLAR**

Bu proje kapsamında deniz suyunda ve kefal balığında poliaromatik hidrokarbonlar ölçüldü. Kefal karaciğerinde bazı antioksidant enzimlerin aktivitesi ve protein miktarı ölçüldü. Enzim sonuçları hem aktivite hemde mg protein cinsinden hesaplandı. Yine kefal balığının kan ve karaciğerinde aromatik DNA eklemeleri iki farklı metod (hem bütanol hemde nuklease P1 tekniğı) kullanılarak ölçüldü. Kan ve karaciğer arasındaki DNA-eklemeleri açısından fark ortaya kondu.



#### **4.1. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI VE SAKLANMASI**

Kefal Balığı Haziran 1995, Ekim 1995, ve Mayıs 1996 tarihlerinde Mersin ve Erdemli Liman'larından, Şubat 1994, 1995 ve Ocak 1996 tarihlerinde de Yomra Limanı'ndan yakalandı. Kefal örnekleri Mersin, Erdemli ve Yomra limanlarından çevirme ağla, germe ağla veya olta ile avlandı. Toplanan balıklar hemen bayıltılıp karaciğerleri çıkartıldı ve kuru buz içinde laboratuvara kadar taşındı. Laboratuvarda analize kadar -70°C'de saklandı. Kan örnekleri +4°C'de 1 gün içinde analiz yapılmak üzere saklandı.

Enzim analizleri, karaciğer ve kan örneklerinden DNA izolasyonu Ç.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü laboratuvarlarında yapıldı. Elde edilen DNA'lar İngiltere'ye Institute of Cancer Research'e gönderildi. Yine bu dönemde Ç.Ü. SBE ve ODTÜ-DBE'den birer araştırmacı İngiltereye örneklerin analizi için gönderildi.

#### **4.2. DENİZ SUYUNDA PAH ANALİZİ**

Deniz suyunda PAH analizi UNEP, (1986) metoduna göre yapılmıştır. 2.5 L 'lik amber cam şişelerde alınan deniz suyuna 50 ml n-hexan eklendi. 10 dakika hızlı bir şekilde çalkalandı. Ayırma hunisi yardımıyla hexan fazı su fazından ayrıldı. Ayrılan hexan fazı ex:310 nm ve em:360 nm'de spektrofloreometrede krisen standardına karşı okundu.

#### **4.3. KEFAL BALIĞINDA PAH ANALİZİ**

0.2 g kefal karaciğeri 0.75g potasyum hidroksit ve 20 ml etanol ile 90-100 dakika ekstrakte edildi (reflux), (UNEP,1992). Reflux işlemi bittikten sonra 20 ml hexan bu karışıma eklendi. İki faz oluşumunu sağlamak için karışıma distile su eklendi. Üste hexan fazı altta su fazı oluştu. Üst faz temiz bir balona alındı ve alt faz iki kez 20'şer ml n-hexan ile yıkandı. Her seferinde üst faz alındı. Toplam 60 ml'lik

hexan hacmi not edildi. Ex: 310, Em:360 nm'de spektrofotometrede krisen standartına karşı okundu.

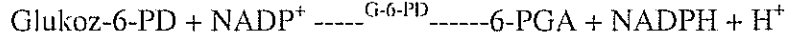
#### 4. 4. KEFAL BALIĞINDA ENZİM ANALİZLERİ VE PROTEİN TAYİNİ

**4.4.1. Homojenat Hazırlama:** 1-2 g balık karaciğeri 1/ 4 oranında (w/v) soğuk 1.15%KCl ile homojenize edildi. Hazırlanan homojenat 9000g'de +4°C'de santrifüj edildi. Üstteki süpernatant küçük porsiyonlar halinde ependorf tüplere alındı ve -70°C'de enzim analizine kadar saklandı. Hazırlanan süpernatantta glutatyon (GSH), glutatyon redüktaz (GSH-R), Glutatyon peroksidaz (GDH-P), glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G-6-PG), süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri ve malindialdehit (MDA) konsantrasyonu ölçüldü.

**4.4.2. Protein Tayini:** Protein tayininde Lowry, ve ark. (1951) metodu kullanıldı. Bovin Serum Albümininden 2 mg/ml suda çözülerek stok standart çözeltisi hazırlandı. Küçük porsiyonlar halinde -20°C' saklandı (Uzun süre bozulmadan saklanabilir).

Protein tayini için balık örnekleri 1/50 oranında (v/v) seyreltildi. Seyrelmiş örnekten 10 µl tüpe kondu. Üzerine 0.5 µ NaOH eklendi, vortekslendi ve 10 dakika bekletildi. Daha sonra 1 ml Lowry tamponundan eklendi (*Lowry tamponu: a) solusyon A; 20 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 4g NaOH, 0,2g NaK tartarat tartılıp 1 L distile su içinde çözüldü. b) solusyon B; 0.5%CuSO<sub>4</sub>*), vortexle karıştırıldı ve 15 dakika bekletildi. Son olarak 1/1.3 oranında sulandırılmış folin çikalto eklendi ve 45 dakika bekletildi. 730 nm'de spektrofotometrede ölçüldü. Sonuçlar bovin serum albumin ile yapılan standart eğriden mg/ml olarak hesaplandı.

**4.4.3. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G-6-PD):** G-6-PD'enzim aktivitesinin tayini için Beutler (1975) metodu kullanıldı.



Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak 340 nm'de NADPH'in oluşumunun tayinine bağlıdır. Deney ortamına; 0.3 ml tampon çözelti (1M Tris-HCl + 5mM EDTA pH 8), 0.3 ml 0.1M'lik MgCl<sub>2</sub>, 0.3ml 2mM NADP, 0.3 ml 6mM G-6-P ve 1.7 ml distile su eklendi. Üzerine 0.1 ml süpernatant eklendi ve 340 nm'de ölçüldü.

**4.4.4. Glutasyon Peroksidaz (GSH-P):** GSH-P enzim aktivitesi Beutler (1975) metoduna göre yapıldı. GSH-P enzimi GSH'nin GSSG'ye oksidasyonundan sorumludur. 100µl tampon (1M Tris HCl + 5mM EDTA pH 8), 20µl of 0.1M GSH, 100µl 100 U/ml glutasyon redüktaz, 100µl 2mM NADPH, 10µl süpernatant ve 670 µl su ile 37°C'de inkübe edildi. Üzerine 10µl 7mM t-butyl hydroperoksit eklendi ve 340 nm'de 10 dakika boyunca değişim izlendi. Sonuçlar µmol/mg protein üzerinden hesaplandı.

**4.4.5. Glutasyon Redüktaz (GSH-R):** Beutler (1975) metoduna göre GSH-R enzim aktivitesi hesaplandı. GSH-R okside glutasyonun (GSSG) indirgenmesini NADPH'in varlığında katalizler. Aktivite 340 nm'de spektrofotometrik olarak okundu. Deney ortamı için 100mM sodyum fosfat tamponu pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 1 mM GSSG ve 0.12mM NADPH karıştırıldı. Hazırlanan bu tampondan 0.9ml alınıp üzerine 0.1 ml süpernatant eklendi. Enzim aktivitesindeki değişiklik 10 dakika süreyle spektrofotometrede izlendi. Enzim sonucu µmol/mg protein cinsinden ifade edildi.

**4.4.6. Glutasyon (GSH):** Glutasyon bir enzim olmayıp, kırmızı kan hücrelerinde protein olmayan sulfidril grupların 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoik asit, DTNB)' indirgenmesinin 412 nm'de spektrofotometrede okunması ile tespit edildi. Deney ortamı için, 3 ml çöktürücü solüsyon (1.67 g glacial metafosforik asit, 0.2 g

disodyum EDTA ve 30 g NaCl 100 ml distile su içinde çözüldü) un üzerine 2 ml süpernatant eklendi ve santrifüj edildi. 5 dakika bekledikten sonra filtre edildi. Filtre edilmiş örnekten 1 ml alındı ve üzerine 4 ml 0.3M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> eklendi. 412 nm'de ölçüldü. Sonuç kaydedildi. Daha sonra üzerine 1 ml DTNB solüsyonu (20mg DTNB 100 ml %1 sodyum sitrat içinde çözüldü) eklendi ve tekrar okundu, aradaki fark GSH miktarı olarak not edildi. Sonuç µmol/mg protein olarak verildi (Beutler, 1975)

**4.4.7. Süperoksit Dismutaz (SOD):** SOD enzim aktivitesi Randox kit (1993) metoduna göre tayin edildi. Ksantin ve ksantin oksidaz INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4 nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride) ile reaksiyona girip kırmızı formazin boya açığa çıkar. 505nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

**4.4.8. Malindialdehit (MDA):** Bus ve Gibson, (1979); Ohkawa, Ohishi ve Yagi, (1979) metodlarının modifikasyonu ile MDA miktarı hesaplandı. MDA tiobarbitürik asit esasına göre hesaplandı. 532nm'de spektrofotometrede ölçüldü.

#### **4.4.9. Hesaplamalar:**

SOD Randox kiti ile standardize edildi. MDA 1,1,3,3, tetra methoxypropan kullanılarak hazırlanan standart eğriden hesaplandı.

G-6-PD, GSH-R, GSH-P enzimleri aşağıda verile eşitliğe göre hesaplandı.

Unit: µmol/ml

Enzim aktivitesi (µmol/ml)=((ΔOD/T)/(6.22)) x (V<sub>t</sub>/V<sub>s</sub>)

Protein üzerinden U/mg protein=(enzim aktivitesi/protein miktarı (mg/ml))

#### **GSH için:**

Konsantrasyon (U/mg protein)=(((ΔOD/T)/13.6)\*(5/2))/mg/ml protein

ΔOD: Deneyin başlangıcı ve sonu artasındaki zaman farkında oluşan optikal değişiklik

T: Zaman

$V_t$ : Kuvvet hacmi

$V_s$ : Kuvvettteki örnek hacmi

6.22: NADPH' in indirgenmesinde kullanılan sabit sayı

13.6: DTNB'nin indirgenmesinde kullanılan sabit sayı

#### 4. 5. KEFAL BALIĞINDA DNA İZOLASYONU VE DNA -32P SONDAN EKLEME TEKNİĞİ

DNA izolasyonunda Gill ve ark., 1985 ve Gupta, (1984) metodları kullanıldı. Sondan ekleme tekniğinin ileri aşamalarında Gupta (1984, 1985) metodları kullanıldı.

3. Yakalanan kefal ballıkları bayıltılıp kaudal (kuyruk yüzgeci) yüzgeçleri kesildi. Kan, EDTA'lı tüpe alındı ve +4°C'de saklandı.
4. 500µl balık kanı 1.5 ml tampon solüsyon ( 0.01M Tris-HCl, 0.01M EDTA, 0.1M NaCl pH 8, %2 SDS) ve 100-150µl proteinase K (10mg/ml) eklenerek 37°C'de bir gece (overnight) bekletildi. Balık karaciğeri için 0.5 g karaciğer alındı ve kandaki kullanılan miktarlarda tamponlar eklendi ve aynı işlem basamakları uygulandı.
5. Ertesi gün örnek 10 dakika eşit hacimde fenol ile ekstrakte edildi ve 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
6. Üst faz temiz bir tüpe alındı. 1:1 oranında fenol:sevag (kloroform:isoamil alkol 24:1) karışımı ile 10 dakika ekstrakt edildi ve 2400 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
7. Üst faz temiz bir tüpe alındı. 1 hacim sevag ile 10 dakika ekstrakt edildi, 2400 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
8. Üst faz 0.1 hacim 5M NaCl eklendi. DNA'nin çökmesi için 1-2 hacim soğuk (-20°C'de ekletilmiş) etanol eklendi. Tüpün yavaşça alt üst edilmesiyle DNA iplikçikleri ortaya çıkarıldı.
9. Bir araya toplanan DNA %70'lik etanol ile yıkandı.

10. DNA 500-1000µl 1M EDTA, 50mM Tris pH 8'de çözüldü.
11. Balık karaciğerinde glikojen olduğu için kandan farklı olarak bu aşamada 100.000g'de 1 saat santrifüj edildi. Alttaki çökelék glikojen olup üstteki sıvı faz alındı. Üst faz bir sonraki basamak olan RNA ekstraksiyonu için kullanıldı.
12. DNA örneğini RNA'dan ayırmak için RNase T1 (150 units, 30µl) ve RNase A (3000µg, 30µl), 240µl Tris (50mM, pH 7.4) içine eklendi ve 37°C'de 15 dakika inkübe edildi.
13. İnkübasyondan sonra iki kez 1 hacim sevag ile ekstrakt edildi ve santrifüj edildi.
14. Toplanan DNA 2 ml 1/100 SSC tampon (150mM NaCL, 15mM Na-sitrat) içinde çözüldü ve -20°C'de saklandı.
15. DNA'nın saflık derecesi 230, 260, 280 nm'de spektrofotometrede ölçüldü. OD<sub>230</sub>/OD<sub>260</sub> 0.416-0.451 arasında, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 1.860-1.971 arasında istenilen saflıkta olmalıdır.

**<sup>32</sup>P-Postlabelling:** DNA eklemeleri butanol ekstraksiyonu (Gupta, 1985) ve nukleaz P1 (Reddy ve Randerath, 1986) metodları ile tespit edildi. 4 µg DNA örneği alındı ve Gyrovap concentrator de kuruluğa kadar tutuldu. Daha sonra 2.8µl su, 1.2µl mikrokokal nukleaz/spleen fosfodiesteraz (MN/SPD) ve 0.8µl CaCl/Na süksinat eklendi bir gece bekletildi.

### 15.3. Butanol Ekstraksiyon Yöntemi: 1-10µg DNA için;

**A Tamponu:** 100mM amonyum format, pH 3.5

**B Tamponu:** 100mµ tetrabütülamonyum klorit (27.8 mg/10ml)

1. 15µl tampon A, 15µl tampon B ve 70µl su eklendi vortekste karıştırıldı. Karışım kurutulan örneğin üzerine eklendi. 150µl 1-butanol (redistilled, water saturated) eklendi. 30 saniye vortekslendi. 18000g'de 90 saniye santrifüj edildi.
2. Üst faz temiz bir kaba alındı ve birinci işlem tekrarlandı.

3. 200 µl su (butanolle doyurulmuş) eklendi ve 20 saniye vortekslendi ve 18000g de 90 saniye santrifüj edildi.
4. Aİltaki su kısmı atıldı. 3. basamak tekrarlandı.
5. Daha sonra 3 µl 300mM Tris pH 9.5 örneğe eklendi ve vortekslendi.
6. Hazırlanan bu örnek girovac'ta kurutuldu ve 10µl su da tekrar çözüldü, vortekslendi ve postlabelling (sondan ekleme) işlemi için hazırlandı.

#### 15.4. Nükleaz P1 Zenginleştirme Yöntemi (Nuclease P1-enhancement (NP1))

DNA'nın bir gecelik inkübasyondan sonra (bütanol ekstraksiyonundan önce) DNA'ya 2.4µl Na acetat (0.25M pH 5.0), 1.44 µl ZnCl<sub>2</sub> (2mM) ve 0.96 µl nuklease P1 (1.25µg/µl) eklendi ve 37°C'de 60 dakika inkübe edildi. Reaksiyon 1.92µl 0.5µ Tris-base ile durduruldu.

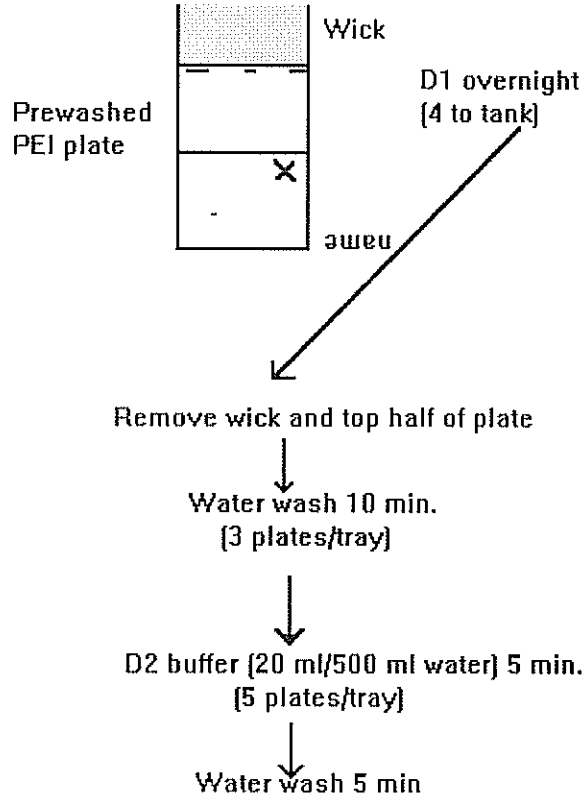
#### *SONDAN EKLEME (POSTLABELLING):*

Postalbelling için DNA'ya 1µl kinaz tamponu, 0.6µl T4 kinaz ve yarılanma ömrü hesaplanarak ....µl [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP eklendi ve 37°C'de yarım saat inkübe edildi.

#### 4.6. Thin Layer Chromatografi (TLC):

İşaretlenmiş DNA'lar anyon değiştiren TCL'de (anion-exchange TLC) birbiriden ayrıldı (Gupta ve ark., 1982). Örnek polietilenimin cellulose TLC plakalarına uygulandı. PEI-TLC plakaları önceden distile su ile yıkanmalıdır. TLC plakalarına uygulanan örneklere 3 yönde kromatografi uygulandı (Şekil 1 ve 2).

İnce tabaka kromatografisinde kullanılan D1 çözeltisi, konsantre tuz çözeltisidir. Bu çözelti ile normal nükleotitler ayrıldı sadece plakanın orijininde eklemeli olan DNA kütlesi kaldı. D3 ve D4 çözeltileri ise yüksek miktarda parçalayıcı ajan olan üreden



ürlerin plaka boyunca hareketini  
 şan noktaların (spots) hesaplanması  
 konrak  $-70^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika ile 4 gün  
 lendi. Daha sonra Sintilasyon sayacı

ctar)-(kördeki miktar))  
 laki miktar))



## 5. ELDE EDİLEN BULGULAR

### 5.1. ENZİM SONUÇLARI

Proje çerçevesinde Karadeniz kıyısından seçilen Yomra Limanı, Akdeniz'den seçilen Mersin Limanı ve ODTÜ -DBE Limanı'ndan yakalanan farklı tür kefal balıklarında ölçülen enzim aktiviteleri, deniz suyunda ve balıkta ölçülen poliaromatik hidrokarbon (PAH) konsantrasyonu, balık kan ve karaciğer DNA'sında meydana gelen bozulmalarla ilgili araştırma sonuçları sunulmuştur.

Mersin ve ODTÜ-DBE Liman'larından yakalanan farklı kefal balığı türlerinde Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon, süperoksit dismütaz, malindialdehit ölçümlerinin sonuçları tablolar halinde sunulmuştur.

Mersin limanı, *Oedolechilius labeo*, *Lisa ramada*'nın boy, ağırlık, karaciğer ağırlığı ve protein miktarı tablo 1 ve 9'da gösterilmiştir. Yakalanan her iki tür balığın cinsiyet dağılımı farklılık göstermiştir. *O. labeo* 'da 2 dişi 9 erkek bireylerden , *L. ramada* 'da 2 erkek 13 dişi bireyden oluşmuştur. Protein ve karaciğer ağırlıklarının ortalamaları da birbirinden farklılık göstermiştir. Genel görüntü olarak *O. labeo* *L. ramada* dan daha küçük yapıdadır (Tablo 1ve 9). *O. labeo* ve *L. ramada* 'nın karaciğerindeki Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi tablo 2 ve 10'de gösterilmiştir. G-6-PD aktivitesi her iki tür de (U/mg karaciğer üzerinden hesaplandığında) birbirinden farklılık göstermektedir. GSH-P, GSH-R, SOD aktiviteleri farklı birimlerde (unit) tablo 3, 4, 7, 11, 12 ve 15'de gösterilmiştir. MDA ve Glutatyon konsantrasyonları da tablo 5, 6, 13 ve 14'de sunulmuştur.

İstatistiksel olarak ölçülen *O. labeo*'da ölçülen enzimlerin birbirleri ile olan korelasyonu (Spearman rank korelasyon) tablo 8'de sunulmuştur. Buna göre sadece G-

6-PD ve GSH-P arasında bir korelasyon görülmektedir ( $P<0.05$ ). *L. ramada* 'da ise G-6-PD ve SOD arasında negatif bir korelasyon görülmektedir ( $P<0.01$ ) (Tablo 16).

Şekil 3 ve 4, *O. labeo* ve *L. ramada* enzim sonuçlarının protein üzerinden gösterimi ve aralarındaki istatistiksel ilişkiyi göstermektedir.

Aynı habitatı paylaşan *O. labeo* ve *L. ramada* anadromus balık olup küçük dip canlıları ve planktonik canlılarla beslenirler. Sadece *L. ramada* askıda katı maddelerle de beslenir (Fisher, 1979). Mersin limanı oldukça kirli bir limandır ve askıda katı maddelerin çok yoğun olduğu bir yerdir. Askıda katı maddelerle beslenen *L. ramada* boyut olarak daha büyük ve daha kirli olmasının nedeni beslenme tercihinden kaynaklanmaktadır.

ODTÜ-DBE limanı küçük bir liman olup sadece küçük kayıkların giriş çıkışına ve konaklamasına müsait bir limandır. Dominant tür olarak kefal balığı türleri bulunmaktadır (*Oedolechilus labeo*, *L. ramada* ve *Lisa aurata*) (Tablo 17). Boy ve ağırlık olarak Mersin Limanı Kefal balığından *O. labeo* ya yakın özellikler göstermektedir. Buna rağmen, karaciğer ağırlığı ve protein miktarı olarak Mersin Limanı kefal balıklarından oldukça düşük ölçülmüştür.

Tablo 18, 19, 20, 21, 22 ve 23'de ODTÜ-DBE limanından yakalanan kefal balıklarında ölçülen enzimlerin (G-6-PD, GSH-R, GSH-P, GSH, SOD ve MDA) aktiviteleri ve konsantrasyonları gösterilmiştir.

Referans limandan toplanan kefal balıklarının karaciğerindeki enzim aktiviteleri arasında GSH-P ve GSH-R ( $P<0.01$ ) istatistiksel olarak (Spearman rank korelasyonu) negatif korelasyon bulunmuştur (Tablo 24). G-6-PD ve GSH-P, GSH-R, GSH ve SOD ( $P<0.05$ ) aralarında da negatif korelasyon bulunmuşken GSH-P ve GSH-R ( $P<0.01$ ) arasında pozitif korelasyon bulunmuştur (Table 24).

ODTÜ-DBE limanı kefal balıklarında ölçülen enzimler aktivitelefinin protein miktarı arasındaki istatistiksel ilişki (linear regression) şekil 5' de sunulmuştur.

### 5.1.1 İKİ AKDENİZ LİMANININ KARŞILAŞTIRILMASI

İki Akdeniz limanı ve buralardan yakalanan 3 farklı grup kefal balığı (*O. labeo*, *L. ramada* ve ODTÜ-DBE *Mugil* sp.) arasındaki enzimatik fark Tablo 25' de gösterilmiştir. Buna göre G-6-PD sonuçları her üç kefal grubunda da aşağı yukarı aynı konsantrasyon ölçülmüşken, GSH-P miktarı ODTÜ-DBE kefal balığında oldukça düşük konsantrasyonda ölçülmüştür. Glutasyon peroksidaz aktivitesi, Mersin Limanı'ndan yakalanan iki kefal türü için aynı iken ( $0.15 \pm 0.3$  U/mg protein), ODTÜ-DBE limanı kefal balığında oldukça düşük aktivite de ( $0.019 \pm 0.003$  U/mg protein) bulunmuştur. Bu düşük aktivitenin nedeni hücrelerdeki süperoksit iyonlarının ve hidrojen peroksit konsantrasyonunun artması şeklinde yorumlanabilir (Babo and Vaseur, 1992). Glutasyon redüktaz aktivitesi ODTÜ-DBE limanından yakalan balıklarda düşük bulunmuştur. Bunun nedeni GSH-P'in eksikliği ve NADPH'in uygunluğu ile ilişkili olabilir. NADPH oksidatif pentoz fosfat yolundan sağlanır. Bu sistemin ilk enzimi G-6-PD'dir. Bu enzim her üç kefal türünde de aynı aktiviteyi verdiği için farklılığın kaynağı olarak NADPH görülmektedir. Glutasyon miktarı türlere göre değişiklik göstermektedir.

Karadeniz kefal balığında, istavrit ve mezigit balıklarında yapılan ölçümlerde GSH-R ve G-6-PD aktiviteleri sonuçları (sırasıyla  $1.33 \pm 0.4$  U/g karaciğer GSH-R and  $1.3 \pm 0.1$  U/g karaciğer G-6-PD;  $3.5 \pm 1.5$  U/g karaciğer and  $11.7 \pm 0.9$  U/g karaciğer) proje kapsamında yapılan çalışmalardan daha düşük bulunmuştur (Birinci, 1992).

MDA konsantrasyonu Mersin Limanı kefal balıklarında ODTÜ-DBE'den yakalanan kefal balıklarına göre daha yüksek bulunmuşken Birinci (1992)'nin yaptığı kontrollü deneylerde bir fark bulunamamıştır.

Superoksit dismutaz aktivitesi her iki Akdeniz Limanı balıklarında yüksek bulunmuştur. Mersin Limanında yaşayan iki tür kefal balığının davranışları birbirinden farklıdır. *O. labeo* askıda katı maddelerle beslenmez. Bu nedenle belkide *L. ramada*'dan daha temiz bir beslenme alışkanlığına sahiptir. Eğer balık temiz ise SOD aktivitesi biraz daha yüksek bulunabilmektedir. Bu durum şöyle açıklanabilir. SOD, Oksijen atomu ve hidrojen atomlarını hidrojen peroksit ve oksijen molekülüne katalizler. Biyolojik sistemlere oksijen atomunun zararını engelleyen SOD enzimidir. Tüm ökaryot canlılarda bulunur ve siglet oksijeni hidrojen peroksite katalizler (Bize et al., 1980).

GSH-P ve SOD aktiviteleri Genova körfezinden yakalanan farklı tür balıklardan daha düşük bulunmuştur (Mather-Mihaich ve Guilio,1986) (sırasıyla  $4.13 \pm 0.19$  ve  $214.1 \pm 20$  U/mg protein). Kolaylı ve ark., (1997) GSH-P aktivitesi balık türlerine göre farklılıklar göstermektedir ( 19.3 to 133.9 U/g wet weight). Tatlı su ve deniz türleri arasında da farklılık olduğunu da ortaya koymuşlardır.

Tüm bu sonuçlar göstermiştir ki Mersin Limanı diğer limanlara göre daha kirlidir Balıklardaki  $H_2O_2$  miktarı Mersin Limanı balıklarında diğer liman balıklarına göre daha fazla bulunmuştur.

Canlı sistemlerde, oksiradikal üretimine neden olabilecek kirleticiler;

- Geçiş metalleri (Fe, Cu, Ni etc.) ile redoks reaksiyonları ve organik radikaller
- Quinon, nitroaromatikler ve aromatik aminler
- Sitokrom P-450 yi indükleyiciler

Organik ksenobiotikler canlılarda antioksidant enzimlerin aktivitesini artırıcı etki yaparlar (Livingstone et al., 1993). Livingstone ve ark., (1993), tarafından yapılan çalışmalar proje sonuçları ile uyum içindedir. Canlıdaki enzimatik değişimlerin

nedeni PAH yada PCB'nin yanında sedimanda bulunan diğer kontaminantlarında (metal gibi) etkisinin olduğu yapılan çalışmalarla vurgulanmıştır (Livingstone, 1993)

## 5.2 DNA-EKLEMELERİ

### 5.2.1. MERSİN LİMANI

Aromatik DNA eklemelerine neden olan kirleticilerden poliaromatik hidrokarbonlar (PAH) suda ve kefal karaciğerinde ölçölmüştür. Sonuçlar tablo 26 ve 27' de sunulmuştur. Buna göre Mersin ve Yomra liman suyunda ölçölen PAH konsantrasyonu ODTÜ-DBE limanında ölçölen konsantrasyondan daha fazla bulunmuştur (sırasıyla, 1.1 µg/l, 1.12 µg/l ve 0.2µg/l)

Mersin Limanı, ODTÜ-DBE limanı ve Yomra limanından yakalanan kefal balığı türlerinde aromatik DNA-eklemeleri ölçölmüştür. Aromatik DNA eklemelerinin ölçümü için iki farklı metod kullanılmıştır. Bunlar bütanol ekstraksiyon ve nükleaz P1 zenginleştirmesi metodlarıdır. Her iki metodun karşılaştırıldığı ve aralarındaki farkın ortaya konduğu bu çalışmanın sonuçları tablo ve şekillerle sunulmuştur.

Tablo 28 de Mersin limanından yakalanan kefal balıklarının morfometrik özelliklerini, aromatik DNA eklemelerini göstermektedir. Karaciğer ve kan aromatik DNA eklemeleri arasındaki fark tablo 28'de gösterilmiştir. Karaciğerin bir depo organı olması ve tüm enzimatik reaksiyonların burada olması farkın bu kadar yüksek olmasına neden olmaktadır. Kan ise tüm vücudu dolaşan taşıyıcı bir system olup depo özelliği yoktur. Bu nedenle oluşan DNA-eklemeleri konsantrasyonunda oldukça düşüktür.

Mersin limanındaki iki dominant kefal türü arasında somatik karaciğer indeksi ve karaciğer ağırlığı açısından bir fark görülmemektedir ( $P>0.05$ ) (Tablo 28). Fakat aromatik DNA eklemeleri arasında oldukça büyük fark bulunmuştur. Birbirine yakın iki tür arasındaki böyle bir fark şaşırtıcıdır. *L. ramada* ve *O. labeo* aynı limanda yaşayıp farklı beslenme alışkanlıklarına sahip olması nedeniyle kirleticilerden ve bunların etkilerinden farklı şekilde etkilenmektedirler. Malin ve ark., 1988 bu durumu türler arasındaki kirliliğe gösterilen tepkinin farklı olmasına ve beslenme alışkanlıklarının farklı olmasına bağlamıştır. Mersin Limanındaki balıkçılar, *L. ramada*'nın daha kirli yerleri tercih ettiğini belirtmişlerdir. Balıkçıların bu gözlemleri DNA eklemeleri sonuçlarına da uymaktadır. *O. labeo* da DNA eklemeleri *L. ramada*'dan daha az bulunmuştur.

Mersin Limanı'ndan yakalana kefal balıklarında yapılan istatistik sonucu tablo 29' da verilmiştir.

### 5.2.2. ODTÜ-DBE LİMANI

ODTÜ-DBE limanından yakalana kefal balıklarından elde edilen DNA'lara hem bütanol ekstraksiyon hemde nükleaz P1 metodları uygulanarak DNA eklemeleri tespit edilmiştir. Tablo 30 ve 31'de kefal balıklarının özellikleri ve DNA eklemeleri sonuçları verilmiştir. Bu bölgeden yakalanan kefal balıklarında boy dağılımı arasında büyük farklar vardır. Bu nedenle standart sapmaları oldukça fazla bulunmuştur ( $313.3\pm 45.8$ ).

Kefal balıklarının sadece karaciğer DNA'sı ele edilmiş olup iki metod ile DNA eklemeleri tespit edilmiştir. Her iki metod arasında istatistiksel olarak fark bulunmuştur. Buna göre bütanol ekstraksiyonunda elde edilen DNA eklemelerinin konsantrasyonu nükleaz P1'den daha fazla bulunmuştur ( $P<0.05$ ) (sırasıyla,  $12.7\pm 4.6$

3.3±0.7 adduct/10<sup>8</sup> nucleotides). Metodlar arasındaki bu farkın birçok nedeni olabilir. Limanda aromatik amin ve alkilleyen ajanlar DNA üzerinde eklemeler yapabilir. Bu eklemeler nükleaz PI zenginleştirme işlemi sırasında bozulur fakat butanol ekstraksiyonunda bozulmaz. Buda iki metod arasındaki farkı açıklamaktadır (Hemminki et al., 1993).

Kandaki DNA eklemelerinin noktasal olarak konsantrasyonu tüm diagonal bölgenin yarı konsantrasyonunu oluşturmaktadır. Fakat karaciğer örneklerinde noktasal olarak DNA-eklemelerinin diagonal bölgeye göre çok küçük kaldığı gözlenmiştir. Referans liman olarak seçilen ODTÜ-DBE limanı kefal balıkları diğer liman balıklarından daha temiz olduğu gözlenmiştir.

### 12.2.3. YOMRA LİMANI

Karadeniz Yomra Liman'ında kültür balıkçılığı yapılmaktadır. Burada yaşayan kefal balıkları bu kafeslerden dökülen yiyeceklerle ve askıda bulunan maddelerle beslenirler. Burada yaşayan kefal balıklarında aromatik DNA eklemeleri ölçülmüştür. Genel olarak Yomra limanı küçük olup hiçbir girdisi yoktur. Fakat balık çiftliklerinde kullanılan balık yemlerinden gelen kirlilik ve balıkların dışkılarından gelen girdiler söz konusudur. Yomra limanından elde edilen kefal balıklarının morfometrik özellikleri tablo 33 'de gösterilmiştir. Yomra limanından yakalanan kefal balığında (*Mugil saliens*) ölçülen aromatik DNA eklemeleri kan ve karaciğer arasında farklılıklar bulunmuştur (Tablo 34).

#### 5.2.4. AROMATİK DNA-EKLEMELERİ AÇISINDAN ÜÇ FARKLI LİMANIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Tablo 35'de her üç limandan yakalanan kefal balığı türlerinin kan ve karaciğerdeki aromatik DNA eklemeleri sonuçları sunulmuştur. Buna göre ODTÜ-DBE ve Mersin limanı kefal balıklarında kan ve karaciğer dokusu arasında büyük fark varken Yomra Limanı kefal balığında fark yoktur. Yomra liman suyunda PAH konsantrasyonunda diğer iki limana göre çok yüksek bulunmuştur. Deniz suyundaki bu yüksek konsantrasyonun kefal balığı dokularındaki aromatik-DNA eklemeleri üzerindeki etkisi canlının iki sisteminde de homojen bir dağılıma neden olmuş olabilir. Balıkların sürekli liman içinde yaşaması kirlilikle temasın kronik bir hal aldığını göstermektedir. Yomra limanı balıkları genel olarak tek tip besin üzerinden beslenmektedirler. Buda balık çiftliğinden gelen hazır besindir. Bu tip besinlerde yüksek oranda yağ ve PAH daha önceki çalışmalar sırasında gözlenmiştir. Oysa Mersin Limanı ve ODTÜ-DBE Limanında balıkların yiyecekleri çeşitlidir. Bu besinlerin kimi temiz kimi kirli olabilir. Genel olarak beslenme alışkanlığındaki bu fark üzerinden düşünmek bu farkı anlamamıza yardımcı olabilir (Telli Karakoç, 1998).

Aromatik DNA eklemelerin farklı metodlarla ölçülmesi iki metodun karşılaştırılmasına olanak sağlamıştır. Bu şekilde hangi metodun hangi çalışmaya daha uygun olacağı gösterilmiştir. Aromatik DNA eklemelerinin TLC kağıdı üzerindeki dağılımı ve bu proje çerçevesinde yapılan bir örneğin kromatografik görüntüsü şekil 7 ve 8'de gösterilmiştir. Tablo 36'da bu çalışma ile paralel yürüten başka bir çalışmanın sonuçları karşılaştırma amacıyla sunulmuştur. Buna göre kan ve karaciğer örneklerinde aromatik DNA eklemeleri nükleaz P1 metodu ile daha az tespit edilmiştir. Butanol ekstraksiyon metodu PAH gibi aromatik lipofilik bileşikler için uygun bir methodur. Nükleaz P1 metodu ise bulki-aromatik ve non-aromatikler için uygun bir methodur. Fakat birçok arilamin nükleaz P1 enzimi ile muamele sonunda tamamen kaybolur (Hemminki ve ark., 1993).



## 6. TARTIŞMA

Canlı sistemine yabancı maddeler, PAH gibi, birçok enzimin yer aldığı sistemde lipofilik yapıları değişerek hidrofilik hale dönerler (metabolizma sırasında) ve organizmadan atılırlar. Yabancı maddelerin metabolize olmaları sırasında birçok reaktif ara ürünler ortaya çıkar. Bu reaktif ürünler DNA, RNA ve protein moleküllerine bağlanıp hücrelerin yaralanmasına, mutasyona uğramasına veya kanser oluşumuna neden olabilirler. Meydana gelen bu reaksiyonlar canlı sistemlerde geri dönüşümlüdür. Şartların uygun olmasıyla meydana gelen bu bozulmalar düzelebilmektedir. Enzim sistemlerinin sağlıklı olarak çalışması canlının bünyesinin sağlam olmasıyla da ilgilidir. Mersin limanından yakalanan kefal balıklarında GSH-P ve GSH-R aktiviteleri ile MDA konsantrasyonu artarken SOD aktivitesi azalmıştır. G-6-PD ve GSH aktiviteleri dalgalanmalar göstermiştir.

Aromatik DNA eklemeleri konsantrasyonunda limanlara göre değişimler göstermiştir. Limanların kirlilik seviyesindeki artış aromatik DNA eklemeleri konsantrasyonunda artırmıştır. Bu çalışmanın en önemli özelliklerinin biride balık kanında DNA eklemeleri çalışmasının başarı ile yapılmasıdır. Böylece istenirse balıklardan alınacak 500µl kan örneği ile aynı balık üzerinde uzun süreli deneyler yapılabilir. Böyle bir çalışma bize deney hayvanlarında yapılan uzun süreli aynı canlı ile çalışma olanağını vermektedir.

Aromatik DNA eklemeleri için uygulanan metodlar arasındaki fark ve bunun nedenleri ortaya konmuş ve bu çalışma için uygun olan metodun bütanol ekstraksiyonu olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında nukleaz P1 metodunun çok kolay olması ve bulki-PAH'lar ve non aromatik bileşikler dışında oldukça efektif bir metod olduğu görülmüştür.

## 7. KARŞILAŞILAN GÜÇLÜKLER

Projede karşımıza çıkan en önemli sorun uluslararası örnek toplanmasında yaşandı. Yurt dışından temin edilecek kefal balıklarını proje kapsamında Amerika ve Hindistandan yola çıkmasına rağmen zamanında elimize ulaşamadı. Taşıma süresinin umulanın üzerinde olması örneklerin bozulmasına neden oldu. Amerika'dan yola çıkan örnek bir hafta sonra Almanya'da Münih havaalanında ortaya çıktı ve zaten taşıma şartlarının uygunsuzluğu nedeniyle örnekler bozuldu.

Proje amaçlarından biri olan karşılaştırılmalı bu çalışma sadece yurt içi limanlardan toplanan kefal balıkları arasında yapılabildi.

Projede meydana gelen güçlüklerin yanında olanakların maksimum kullanılması ve iyi bir program yapılması nedeniyle bu proje ve YDABÇAG-35 projesinden bir doktora tezi ve 4 uluslararası yayın yapılmıştır.

## 8. HARCAMLAR

Harcama Kalemleri	Alınan Malzemeler	Markası	Fiyatı (TL)
Makine ve Techizat	Elektroforez sistemi	PAC 300 (wide mini subcell + power)	117,633,730
Makine ve Techizat	Sıvı azot tankı		Yaklaşık 57,000,000 (477.57 GMP FOB fiyatı)
Sarf malzemesi	Elektrik malzemelsi		17,500,000
Sarf malzemesi	DHL posta		2,440,000

## 9. REFERANSLAR

1. **Ariza-Rodriguez F.M. Diaz-Mendez, J.I. Navas, C. Pueyo and J. Lopez-Barea, 1995.** Metabolic activation of carcinogenic aromatic amines by fish exposed to environmental pollutants. *Environ. Mol. Mutagen.* Vol. 25, 50-57.
2. **Babo S., P. Vasseur, 1992.** In vitro effects of thiam on liver antioxidant enzyme activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* Vol. 22, 61-68.
3. **Beutler E., 1975.** Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods, 3<sup>rd</sup> edition, 160 p. Grune and Stratton, San Diego, CA.
4. **Birinci S., 1992.** Bazı balık türlerinin karaciğer glutatyon redüktaz ve glukoz-6-posfat dehidrogenaz aktiviteleri ile ağır metal miktarları arasındaki ilişkinin incelenmesi. Karadeniz Teknik Üniv. Sağlık Bil. Ens. Biyokimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, 42p, Trabzon.
5. **Cossa D., M. Picard-Berube and J. P. Gouygou, 1983.** Polynuclear aromatic hydrocarbons in mussels from the estuary and northeastern Gulf of St. Lawrence. *Canada. Bull. Environ. Contam. Toxicol.* Vol. 31, 41-47.
6. **Couch J. A., L. A. Courtney, J.T. Winstead and S.S. Foss, 1979.** The American oyster (*Crassostrea virginica*) as an indicator of carcinogens in the aquatic environment. Animals as Monitors of Environmental Pollutants. National Academy of Sciences Washington, D.C., 65-84.
7. **Dunn B.P., J.J. Black and A. Maccubbin, 1987.** <sup>32</sup>P-postlabelling analysis of aromatic DNA adducts in fish from polluted areas. *Cancer Res.* Vol. 47, 6543-6548.
8. **Fisher W., (Ed.), 1979.** Rome, FAO, Pag. var. FAO species identification sheets for fisher purposes. Mediterranean and Black Sea (fishing area 37). Vol.1.
9. **Gill, P., A. J. Jeffreys and Awerrett D. J., 1985.** Forensic application of DNA "fingerprints". *Nature.* Vol. 318, 577-579.
10. **Gupta R.C., M. V. Reddy, K. Randerath, 1982.** <sup>32</sup>P-postlabelling analysis of nonradioactive aromatic carcinogen DNA adducts. *Carcinogenesis.* Vol. 3, 1081-1092.
11. **Gupta R.C., 1984.** Nonrandom binding of the carcinogen N-hydroxy-2-acetylaminofluorene to repetitive sequences of rat liver DNA in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81, 6943-6947.

12. **Gupta R.C., 1985.** Enhanced sensitivity of  $^{32}\text{P}$ -postlabeling analysis of aromatic carcinogen DNA adducts. *Cancer Res.* Vol. 45, 5656-5662.
13. **Hemminki K, A. Försti, M. Löfgren, D. Segerbäck, C. Vaca and P. Vodicka, 1993.** Testing of quantitative parameters in the  $^{32}\text{P}$ -postlabelling method. Postlabelling Methods for Detection of DNA Adduct. ED. D.H. Phillips, M. Castegnaro and H. Bartsch. IARC Scientific Publications No 124, 392p. Lyon.
14. **Hoar W.S., D.J. Randall and J.R. Brett, 1979.** Fish physiology. Vol. VIII. Bioenergetics and Growth. 786 p. Academic press. New York.
15. **Jackson J. T., T. L. Wade, T. J. McDonald, D.L. Wilkinson and J. M. Brooks, 1994.** Polynuclear aromatic hydrocarbon contaminations in oysters from the Gulf of Mexico (1986-1990). *Environ. Poll.* Vol. 83, 291-298.
16. **Kideys A.E., 1994.** Recent dramatic changes in the Black Sea ecosystem: The reason for the sharp decline in Turkish anchovy fisheries. *J. Mar. Sci.* 5, 171-181.
17. **Klontz G.W., 1995.** Care of fish in biological research. *J. Anim. Sci.* Vol. 73, 3485-3492
18. **Kolaylı S., M. Arıkan, D. Uzunosmanoğlu, B. Kiran, R. Sagban, 1997.** Comparative studies on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in different fish species. *Tr. J. of Zoology.* Vol. 21, 171-173.
19. **Kunzmann A., 1991.** Blood physiology and ecological consequences in Weddell Sea fishes. Dissertation, Nath. Naturwiss. Fak. Univ. Kiel. 79p.
20. **Livingstone D.V., P. Lemaire, A. Matthews, L. Peters, D. Bucke and R.J. Law, 1993.** Pro-oxidant, antioxidant and 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity responses in liver of Dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals. *Mar. Poll. Bull.* Vol. 26, 11, 602-606.
21. **Lowry O., N.J. Rosebrough, A.L. Parr and R. J. Randal, 1951.** Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, Vol. 193, 265-275.
22. **Malins D.C., B.B. McCain, J.T. Landahl, M.S. Myer, M.M. Krahn, D.W. Brown, S.L. Chan, and W.T. Roubal, 1988.** Neoplastic and other diseases in fish in relation to toxic chemicals: an overview. *Aq. Toxicol.* Vol. 11, 43-67.
23. **Mather-Mihaich E. and R. T. Di Giulio, 1986.** Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde, Glutathione and Methemoglobin concentrations in

channel catfish exposed to DEF and N-butyl mercaptan. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol.85C, 2, 427-432.

24. **Mee L., 1992.** The Black Sea in crisis: The need for concerted international action. *Ambio*. Vol. 21, 4, 278-286.
25. **RANDOX Manual procedures, 1993.** Randox Ltd., Northern Ireland, 3<sup>rd</sup> Edition, 993p.
26. **Reddy M. V., K. Randerath, 1986.** Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of <sup>32</sup>P-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts. *Carcinogenesis*. Vol. 7, 9, 1543-1551.
27. **Stegeman J.J., M.E. Hahn, 1994.** Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: Current perspectives on forms, functions and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular perspectives*. Ed. D. C. Malins and G. K. Ostrander. Pp 87-206. Lewis Publishers. London.
28. **Telli-Karakoc, F., 1998.** The carcinogenic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on fish DNA and relation with some antioxidant enzymes. ODTÜ-DBE. Doktora tezi. 193 sayfa. Erdemli, İÇEL .
29. **Tolmazin D., 1985.** Changing coastal oceanography of the Black Sea I: Northern shelf. *Oceanography*, Vol. 15. 4, 217-276.
30. **UNEP, 1986.** Baseline studies and monitoring of oil and petroleum hydrocarbons in marine waters (MED POL 1). MAP technical Report Series, No. 1, pp. 81-86. United nations Environment Programme, Geneva.
31. **UNEP, 1992.** Determination of petroleum hydrocarbons in sediments. Reference methods for marine pollution studies. No. 20, pp 36-40. United Nations Environment Programme, Geneva.
32. **Varanasi U., M. Nishimoto, W. L. Reichert, and B.-T. Le Eberhart, 1986.** Comparative Metabolism of benzo(a)pyrene and covalent binding to hepatic DNA in English Sole, Starry Flounder and Rat. *Cancer Res.* Vol. 46, 3817-3824.
33. **Ware W.G., 1995.** Reviews of environmental contamination and toxicology. Vol. 143, 174p. Springer, New York.
34. **Zelikoff J.T., Wang W., Islam N., Flescher E, Twerdok L.E., 1996.** Modulators Immune Responses. (Pap. Conf.), 1995, 425-442. Ed.Stolen J.S. Publisher: SOS Publications, Fair Haven, N.J.

## TABLolar

Tablo 1. Mersin Limanından yakalanan kefal balığının (*Oedolechilius labeo*) sex, boy, ağırlık, karaciğer ağırlığı ve protein konsantrasyonu

Örnek No.	Sex	Boy (cm)	Ağırlık (g)	Karaciğer ağı. (g)	Doku homojenatı (g/ml)	Protein (mg/ml)
1	M	32.0	377.8	5.0	10	22
2	M	26.0	244.5	3.6	10	35
3	F	31.0	356.3	7.7	10	14
4	M	27.0	252.0	3.9	10	40
5	M	29.0	285.0	5.4	10	31
6	F	33.0	444.8	6.6	10	25
7	M	30.0	311.0	5.5	10	36
8	M	30.0	348.0	7.0	10	33
9	M	31.0	339.7	6.3	10	22
10	M	35.0	420.0	6.0	10	53
11	M	32.0	410.9	7.8	10	59
<b>Ortalama</b> <b>± SE</b>		<b>30.5</b> <b>± 0.8</b>	<b>344.5</b> <b>± 20.1</b>	<b>5.9</b> <b>± 0.4</b>		<b>33.6</b> <b>± 4.0</b>

Tablo 2. Mersin Limanından yakalanan *Oedolechilius labeo* 'un karaciğerindeki Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi (U= $\mu$ mole/dak/ml)

Örnek No	OD/5	Aktivite U	U/mg protein	U/g Karaciğer	U/100g Organizma
1	0.012	0.29	0.013	2.89	3.83
2	0.032	0.77	0.022	7.72	11.36
3	0.01	0.24	0.017	2.41	5.21
4	0.035	0.84	0.021	8.44	13.06
5	0.017	0.41	0.013	4.10	7.77
6	0.004	0.10	0.004	0.96	1.43
7	0.092	2.22	0.062	22.19	39.24
8	0.103	2.48	0.075	24.84	49.96
9	0.017	0.41	0.019	4.10	7.60
10	0.077	1.86	0.035	18.57	26.53
11	0.096	2.32	0.039	23.15	43.95
<b>Ortalama</b> <b>± SE</b>		<b>1.09</b> <b>± 0.3</b>	<b>0.03</b> <b>± 0.006</b>	<b>10.85</b> <b>± 2.8</b>	<b>19.1</b> <b>± 5.3</b>

OD: Optical densite

U:  $\mu$ mol/ml

Tablo 3. Mersin Limanından yakalanan *Oedolechilius labeo* 'un karaciğerindeki Glutasyon peroksidaz aktivitesi (U= $\mu$ mole/dak/ml)

Örnek No	OD/5	Aktivite U	U/mg protein	U/g Karaciğer	U/100g Organizma
1	0.209	3.36	0.15	33.60	44.47
2	0.245	3.94	0.11	39.39	58.00
3	0.323	5.19	0.37	51.93	112.22
4	0.256	4.12	0.10	41.16	63.70
5	0.16	2.57	0.08	25.72	48.74
6	0.262	4.21	0.17	42.12	62.50
7	0.326	5.24	0.15	52.41	92.69
8	0.23	3.70	0.11	36.98	74.38
9	0.417	6.70	0.30	67.04	124.33
10	0.264	4.24	0.08	42.44	60.63
11	0.231	3.71	0.06	37.14	70.50
<b>Ortalama</b> <b>± SE</b>		<b>4.27</b> <b>± 0.3</b>	<b>0.15</b> <b>± 0.03</b>	<b>42.7</b> <b>± 3.3</b>	<b>73.8</b> <b>± 7.7</b>

Tablo 4. Mersin Limanından yakalanan *Oedolechilius labeo* 'un karaciğerindeki Glutasyon redüktaz aktivitesi (U= $\mu$ mole/dak/ml)

Örnek No	OD/2.5	Aktivite U	U/mg protein	U/g Karaciğer	U/100g Organizma
1	0.186	0.30	0.014	2.990	3.95
2	0.191	0.31	0.009	3.071	4.52
3	0.178	0.29	0.020	2.862	6.18
4	0.127	0.20	0.005	2.042	3.16
5	0.195	0.31	0.010	3.135	5.94
6	0.185	0.30	0.012	2.974	4.41
7	0.134	0.22	0.006	2.154	3.81
8	0.18	0.29	0.009	2.894	5.82
9	0.17	0.27	0.012	2.733	5.07
10	0.186	0.30	0.006	2.990	4.27
11	0.168	0.27	0.005	2.701	5.13
<b>Ortalama</b> <b>± SE</b>		<b>0.28</b> <b>± 0.01</b>	<b>0.01</b> <b>± 0.002</b>	<b>2.8</b> <b>± 0.1</b>	<b>4.8</b> <b>± 0.3</b>

OD: Optical density

U:  $\mu$ mol/ml



Tablo 5. Mersin Limanından yakalanan *Oedolechilius labeo* 'un karaciğerindeki Glutatyon aktivitesi (U=nmole/dak/ml)

Örnek No	OD	Konsantrasyon U	nmole/mg protein	nmole/g Karaciğer	nmole/100g Organizma
1	0.029	5.3	0.2423	53	70.1
2	0.024	4.4	0.1261	44	65.0
3	0.017	3.1	0.2232	31	67.5
4	0.062	11.4	0.2849	114	176.4
5	0.023	4.2	0.1364	42	80.1
6	0.064	11.8	0.4706	118	174.6
7	0.022	4.0	0.1123	40	71.5
8	0.028	5.1	0.1560	51	103.5
9	0.043	7.9	0.3593	79	146.6
10	0.022	4.0	0.0763	40	57.8
11	0.04	7.4	0.1246	74	139.6
<b>Ortalama</b> <b>± SE</b>		<b>6.2</b> <b>± 0.9</b>	<b>0.21</b> <b>± 0.04</b>	<b>62.3</b> <b>± 9.1</b>	<b>104.8</b> <b>± 13.8</b>

Tablo 6. Mersin Limanından yakalanan *Oedolechilius labeo* 'un karaciğerindeki Malindialdehit konsantrasyonu

Örnek No	OD	Konsantrasyon (nmole/dak/ml)	nmole/mg protein	nmole/g Karaciğer	nmole/100g organizma
1	0.043	27.80	1.264	278.00	368
2	0.117	59.90	1.711	599.00	882
3	0.07	39.50	2.821	395.00	854
4	0.257	120.70	3.018	1,207.00	1868
5	0.083	45.20	1.458	452.00	856
6	0.06	35.20	1.408	352.00	522
7	0.083	45.20	1.256	452.00	799
8	0.058	34.30	1.039	343.00	690
9	0.154	75.97	3.453	759.70	1409
10	0.54	243.50	4.594	2,435.00	3479
11	1.26	555.90	9.422	5,559.00	10552
<b>Ortalama</b> <b>± SE</b>		<b>116.7</b> <b>± 47.8</b>	<b>2.86</b> <b>± 0.7</b>	<b>1166.52</b> <b>± 478</b>	<b>2025</b> <b>± 892</b>

Tablo 7. Mersin Limanından yakalanan *Oedolechilius labeo* 'un karaciğerindeki Süperoksit dismutaz aktivitesi

Örnek No	OD/3	%inhibisyon µmole/dak/ml	Aktivite U/ml	U/g Karaciğer	U/mg protein	U/100g Organizma
1	0.011	77.551	3.24	32.4	0.147	42.88
2	0.012	75.5102	2.88	28.8	0.082	42.40
3	0.011	77.551	3.24	32.4	0.231	70.02
4	0.016	67.3469	1.91	19.1	0.048	29.56
5	0.013	73.4694	2.57	25.7	0.083	48.70
6	0.004	91.8367	6.92	69.2	0.277	102.68
7	0.013	73.4694	2.57	25.7	0.071	45.45
8	0.017	65.3061	1.70	17.0	0.052	34.20
9	0.012	75.5102	2.88	18.8	0.131	34.87
10	0.013	73.4694	2.57	25.7	0.048	36.71
11	0.014	71.4286	2.29	22.9	0.039	43.47
<b>Ortalama ± SE</b>			<b>2.89 ± 0.4</b>	<b>28.88 ± 4.3</b>	<b>0.110 ± 0.02</b>	<b>48.27 ± 6.3</b>

OD: Optical density

U: µmol/ml

Tablo 8. *O. labeo* 'un G-6-PD, GSH-P, GSH-R and SOD'aktivitesi ve GSH, MDA konsantrasyonunun Spearman Rank korelasyonu ile istatistiksel ifadesi

	G-6-PD	GSH-P	GSH-R	GSH	MDA	SOD
G-6-PD	1.00					
GSH-P	0.61*	1.00				
GSH-R	-0.23	-0.49	1.00			
GSH	-0.05	-0.14	-0.17	1.00		
MDA	0.41	0.28	-0.31	0.06	1.00	
SOD	0.00	0.25	0.43	0.05	-0.42	1.00

\* P<0.05

\*\* P<0.01

Tablo 9. Mersin Limanından yakalanan *Lisa ramada* 'nın sex, boy ağırlık, karaciğer ağırlığı ve protein miktarı

Örnek No	Sex	Boy (cm)	Ağırlık (g)	Karaciğer ağırlığı (g)	Doku homojenatı (g/ml)	Protein (mg/ml)
1	F	39.0	462.0	7.8	10	29
2	F	40.0	547.4	8.4	10	32
3	F	35.0	387.0	7.0	10	34
4	F	41.0	633.9	7.6	10	40
5	F	36.0	424.0	7.8	10	37
6	F	35.5	364.8	6.5	10	23
7	F	42.0	676.4	12.2	10	54
8	F	37.0	487.0	9.0	10	55
9	F	44.0	694.0	11.5	10	54
10	F	39.5	530.6	9.6	10	42
11	F	43.0	590.3	11.0	10	33
12	F	41.0	647.6	5.3	10	32
13	F	38.0	519.9	9.8	10	27
14	M	35.0	330.0	6.5	10	16
15	M	36.0	410.2	5.3	10	21
<b>Ortalama ± SE</b>		<b>38.8 ± 0.8</b>	<b>513.7 ± 30.3</b>	<b>8.4 ± 0.5</b>		<b>35.3 ± 3.1</b>

Tablo 10.Mersin Limanından yakalanan *Lisa ramada* 'nın karaciğerindeki Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi (U= $\mu$ mol/dak/ml)

Örnek No	OD/5	Aktivite U	U/mg Protein	U/g Karaciğer	U/100g Organizma
1	0.014	0.34	0.01	3.38	5.70
2	0.047	1.13	0.04	11.33	17.39
3	0.042	1.01	0.03	10.13	18.32
4	0.106	2.56	0.06	25.56	30.65
5	0.033	0.80	0.02	7.96	14.64
6	0.047	1.13	0.05	11.33	20.20
7	0.036	0.87	0.02	8.68	15.66
8	0.105	2.53	0.05	25.32	46.80
9	0.08	1.93	0.04	19.29	31.97
10	0.078	1.88	0.04	18.81	34.03
11	0.103	2.48	0.08	24.84	49.96
12	0.087	2.10	0.07	20.98	17.17
13	0.054	1.30	0.05	13.02	24.55
14	0.038	0.92	0.06	9.16	18.05
15	0.067	1.62	0.08	16.16	20.88
<b>Ortalama</b>		<b>1.51</b>	<b>0.05</b>	<b>15.1</b>	<b>24.4</b>
<b>± SE</b>		<b>± 0.2</b>	<b>± 0.005</b>	<b>± 1.8</b>	<b>± 3.2</b>

Tablo 11. Mersin Limanından yakalanan *Lisa ramada*'nın karaciğerindeki Glutatyon peroksidaz aktivitesi (U= $\mu$ mol/dak/ml)

Örnek No	OD/5	Aktivite U	U/mg Protein	U/g Karaciğer	U/100g Organizma
1	0.283	4.55	0.16	45.50	76.82
2	0.247	3.97	0.12	39.71	60.94
3	0.21	3.38	0.14	33.76	61.07
4	0.282	4.53	0.11	45.34	54.36
5	0.295	4.74	0.12	47.43	87.25
6	0.197	3.17	0.14	31.67	56.43
7	0.332	5.34	0.10	53.38	96.27
8	0.337	5.42	0.10	54.18	100.13
9	0.283	4.55	0.08	45.50	75.39
10	0.282	4.53	0.11	45.34	82.03
11	0.387	6.22	0.19	62.22	50.92
12	0.258	4.15	0.15	41.48	78.19
13	0.388	6.24	0.19	62.38	116.24
14	0.354	5.69	0.36	56.91	112.10
15	0.226	3.63	0.17	36.33	46.95
<b>Ortalama</b> <b><math>\pm</math> SE</b>		<b>4.67</b> <b><math>\pm</math> 0.17</b>	<b>0.15</b> <b><math>\pm</math> 0.02</b>	<b>46.7</b> <b><math>\pm</math> 2.5</b>	<b>77.0</b> <b><math>\pm</math> 5.7</b>

OD: Optical densite

U:  $\mu$ mol/ml

Tablo 12. Mersin Limanından yakalanan *Lisa ramada* 'nın karaciğerindeki Glutasyon redüktaz aktivitesi (U= $\mu$ mol/dak./ml)

Örnek No	OD/2.5	Aktivite $\mu$ mole/ml	nmole/dak /mg Protein	U/g Karaciğer	U/100g Organizma
1	0.166	0.27	9.3	2.7	4.6
2	0.192	0.31	9.7	3.1	4.8
3	0.154	0.25	7.4	2.5	4.5
4	0.122	0.20	5	2.0	2.4
5	0.122	0.20	5.4	2.0	3.7
6	0.158	0.25	10.9	2.5	4.5
7	0.174	0.28	5.2	2.8	5.1
8	0.137	0.22	4	2.2	4.1
9	0.132	0.21	3.9	2.1	3.5
10	0.131	0.21	5	2.1	3.8
11	0.147	0.24	7.3	2.4	4.5
12	0.137	0.22	6.9	2.2	1.8
13	0.142	0.23	8.5	2.3	4.3
14	0.16	0.26	16.3	2.6	5.1
15	0.196	0.32	15.2	3.2	4.1
<b>Ortalama <math>\pm</math> SE</b>		<b>0.24 <math>\pm</math> 0.001</b>	<b>8.0 <math>\pm</math> 1.0</b>	<b>2.4 <math>\pm</math> 0.1</b>	<b>4.1 <math>\pm</math> 0.2</b>

Tablo 13.Mersin Limanından yakalanan *Lisa ramada* 'nın karaciğerindeki Glutasyon aktivitesi (U=  $\mu\text{mol/dak/ml}$ )

Örnek No	OD	Konsantrasyon U	nmole/mg Protein	U/g Karaciğer	U/100g Organizma
1	0.079	0.015	0.50	0.145	0.25
2	0.157	0.029	0.90	0.289	0.44
3	0.079	0.015	0.61	0.289	0.52
4	0.074	0.014	0.34	0.289	0.35
5	0.044	0.008	0.21	0.289	0.53
6	0.114	0.021	0.91	0.210	0.37
7	0.072	0.013	0.25	0.132	0.24
8	0.103	0.019	0.34	0.189	0.35
9	0.129	0.024	0.44	0.237	0.39
10	0.118	0.022	0.52	0.217	0.39
11	0.103	0.019	0.57	0.189	0.16
12	0.063	0.012	0.43	0.116	0.22
13	0.107	0.020	0.60	0.197	0.37
14	0.035	0.006	0.40	0.064	0.13
15	0.064	0.012	0.53	0.118	0.15
Ortalama $\pm$ SE		0.02 $\pm$ 0.001	0.5 $\pm$ 0.05	0.2 $\pm$ 0.02	0.32 $\pm$ 0.03

Tablo 14. Mersin Limanından yakalanan *Lisa ramada* 'nın karaciğerindeki Malindialdehit aktivitesi (U=  $\mu\text{mol/dak/ml}$ )

Örnek No.	OD	Konsantrasyon U	nmole/mg Protein	nmole/g Liver	nmole/100g Animal
1	0.047	29.50	1.017	295.00	4.98
2	0.047	29.50	0.922	295.00	4.53
3	0.099	52.10	2.171	521.00	9.42
4	0.222	105.50	2.638	1,055.00	12.65
5	0.027	20.90	0.550	209.00	3.84
6	0.066	37.80	1.643	378.00	6.74
7	0.468	212.20	3.930	2,122.00	38.27
8	0.092	49.10	0.893	491.00	9.07
9	0.38	174.00	3.222	1,740.00	28.83
10	0.152	75.10	1.788	751.00	13.59
11	0.078	42.99	1.303	429.90	3.52
12	0.019	17.40	0.644	174.00	3.28
13	0.088	47.30	1.433	473.00	8.81
14	0.053	32.10	2.006	321.00	6.32
15	0.368	168.80	7.673	1,688.00	21.81
Ortalama $\pm$ SE		72.95 $\pm$ 16.2	2.12 $\pm$ 0.5	729.5 $\pm$ 161.7	11.71 $\pm$ 2.7



Tablo 15. Mersin Limanından yakalanan *Lisa ramada* 'nın karaciğerindeki Süperoksit dismutaz aktivitesi (U=  $\mu\text{mol/dak/ml}$ )

Örnek No.	OD/3	% inhibisyon U	Aktivite U/ml	U/g Karaciğer	U/mg Protein	U/100g Organizma
1	0.011	77.6	3.16	31.6	0.109	53.43
2	0.014	71.4	2.34	23.4	0.073	35.91
3	0.015	69.4	2.09	20.9	0.061	37.80
4	0.021	57.1	1.07	10.7	0.027	12.87
5	0.009	81.6	4.17	41.7	0.113	76.71
6	0.011	77.6	3.16	31.6	0.137	56.30
7	0.005	89.8	6.17	61.7	0.114	111.28
8	0.019	61.2	1.34	13.4	0.024	24.76
9	0.015	69.4	2.09	20.9	0.039	34.63
10	0.013	73.5	2.63	26.3	0.063	47.58
11	0.016	67.3	1.91	19.1	0.058	38.42
12	0.016	67.3	1.91	19.1	0.060	15.63
13	0.013	73.5	2.57	25.7	0.095	36.00
14	0.011	77.6	3.16	31.6	0.198	62.24
15	0.016	67.3	1.91	19.1	0.091	24.68
<b>Ortalama <math>\pm</math> SE</b>			<b>2.46 <math>\pm</math> 0.4</b>	<b>24.56 <math>\pm</math> 3.6</b>	<b>0.084 <math>\pm</math> 0.01</b>	<b>44.55 <math>\pm</math> 6.5</b>

Tablo 16. *Lisa ramada* da ölçülen enzim aktivitelerine uygulanan istatistiksel analiz (Spearman rank korelasyonu)

	G-6-PD	GSH-P	GSH-R	GSH	MDA	SOD
G-6-PD	1.00					
GSH-P	0.03	1.00				
GSH-R	-0.45	-0.19	1.00			
GSH	0.26	-0.13	-0.05	1.00		
MDA	0.28	-0.00	0.01	0.17	1.00	
SOD	-0.87**	0.12	0.24	-0.10	-0.19	1.00
*P<0.05		** P<0.01				

Tablo 17. ODTÜ-DBE Limanından yakalanan kefal balığının sex, boy, ağırlık, karaciğer ağırlığı ve protein miktarı

Örnek No.	Sex	Boy (cm)	Ağırlık (g)	Karaciğer ağırlığı (g)	Doku homojenatı (g/ml)	Protein (mg/ml)
1	M	35.0	347.6	4.0	10	19.1
2	M	36.0	414.6	4.4	10	19.9
3	M	30.0	212.7	3.4	10	28.8
4	M	30.0	223.9	1.9	10	16.3
5	M	32.0	268.0	2.7	10	31.2
6	M	40.0	677.5	9.0	10	23.2
7	M	41.0	698.6	8.1	10	19.5
8	M	34.0	383.6	3.9	10	16.9
9	M	31.0	289.6	2.8	10	16.8
10	F	27.5	186.0	1.5	10	20.4
11	M	25.5	152.2	1.0	10	21.8
12	F	31.5	239.7	2.3	10	27.9
13	M	27.5	188.9	2.0	10	26.5
14	M	25.5	164.6	2.9	10	24.9
15	F	30.0	193.9	2.3	10	36.2
16	M	26.5	162.7	1.7	10	18.1
<b>Ortalama</b>		<b>31.4</b>	<b>300.3</b>	<b>3.3</b>		<b>23.0</b>
<b>± SE</b>		<b>± 1.2</b>	<b>± 42.7</b>	<b>± 0.6</b>		<b>± 1.5</b>

Tablo 18. ODTÜ-DBE Limanından yakalanan *Mugil sp.* in karaciğerindeki Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi (U= $\mu$ mole/dak/ml)

Örnek No	OD/5	Aktivite U	U/mg Protein	U/g Karaciğer	U/100g Organizma
1	0.086	1.38	0.07	13.83	15.91
2	0.127	2.04	0.10	20.42	21.67
3	0.069	1.11	0.04	11.09	17.73
4	0.099	1.60	0.10	15.92	13.65
5	0.085	1.37	0.04	13.67	13.72
6	0.05	0.80	0.03	8.04	10.68
7	0.053	0.85	0.04	8.52	9.88
8	0.055	0.88	0.05	8.84	8.99
9	0.08	1.29	0.08	12.9	12.44
10	0.044	0.70	0.03	7.07	5.71
11	0.056	0.90	0.04	9.00	5.92
12	0.065	1.04	0.04	10.5	10.03
3	0.081	1.30	0.05	13.0	13.79
14	0.064	1.03	0.04	10.3	18.25
15	0.079	1.27	0.04	12.7	15.07
16	0.074	1.19	0.07	11.9	12.43
<b>mean</b>		<b>1.2</b>	<b>0.05</b>	<b>11.7</b>	<b>12.9</b>
<b>± SE</b>		<b>± 0.08</b>	<b>± 0.005</b>	<b>± 0.9</b>	<b>± 1.1</b>

Tablo 19. ODTÜ-DBE Limanından yakalanan *Mugil sp.* in karaciğerindeki Glutasyon peroksidaz dehidrogenaz aktivitesi (U= $\mu$ mole/dak/ml)

Örnek No	OD/5	Aktivite U	nmole/mg protein	U/g Karaciğer	U/100g Organizma
1	0.027	0.43	22.5	4.34	5.0
2	0.042	0.68	34.2	6.75	7.2
3	0.056	0.90	31.3	9.00	14.4
4	0.051	0.82	50.3	8.20	7.0
5	0.033	0.53	17.0	5.31	5.3
6	0.021	0.34	14.7	3.38	4.5
7	0.018	0.29	14.9	2.89	3.4
8	0.025	0.40	23.7	4.02	4.1
9	0.012	0.19	11.3	1.93	1.9
10	0.021	0.34	16.7	3.38	2.7
11	0.018	0.29	13.3	2.89	1.9
12	0.007	0.11	3.9	1.13	1.1
13	0.016	0.26	9.8	2.57	2.7
14	0.023	0.37	14.9	3.70	6.5
15	0.019	0.31	8.6	3.05	3.6
16	0.037	0.60	33.1	5.95	6.2
<b>Ortalama ± SE</b>		<b>0.43 ± 0.05</b>	<b>20.0 ± 3.0</b>	<b>4.3 ± 0.6</b>	<b>4.8 ± 0.8</b>

OD: Optical density

U:  $\mu$ mol/ml

Tablo 20. ODTÜ-DBE Limanından yakalanan *Mugil sp.*in karaciğerindeki Glutasyon reduktaz aktivitesi (U= $\mu$ mole/dak/ml)

Örnek No	OD/5	Aktivite U	nmole/mg protein	U/g Karaciğer	U/100g Organizma
1	0.064	0.103	5.4	1.03	1.18
2	0.012	0.019	1.0	0.19	0.20
3	0.065	0.105	3.6	1.05	1.67
4	0.061	0.098	6.0	0.98	0.84
5	0.057	0.092	2.9	0.92	0.92
6	0.065	0.105	4.5	1.05	1.39
7	0.076	0.122	6.3	1.22	1.42
8	0.083	0.133	7.9	1.33	1.36
9	0.082	0.132	7.8	1.32	1.27
10	0.083	0.133	6.5	1.33	1.08
11	0.108	0.174	8.0	1.74	1.14
12	0.126	0.203	7.3	2.03	1.94
13	0.131	0.211	7.9	2.11	2.23
14	0.078	0.125	5.0	1.25	2.22
15	0.115	0.185	5.1	1.85	2.19
16	0.125	0.201	11.1	2.01	2.10
<b>Ortalama ±SE</b>		<b>0.13 ±0.01</b>	<b>6.0 ±0.6</b>	<b>1.3 ±0.1</b>	<b>1.4 ±0.2</b>

Tablo 21. ODTÜ-DBE Limanından yakalanan *Mugil sp.* in karaciğerindeki Glutasyon aktivitesi (U=nmole/dak/ml)

Örnek No	OD/5	Konsantrasyon		U/g Karaciğer	U/100g Organizma
		U	U/mg protein		
1	0.022	4.0	0.21	40	46.0
2	0.032	5.9	0.30	59	62.6
3	0.015	2.8	0.10	28	44.8
4	0.052	9.6	0.59	96	82.3
5	0.077	14.2	0.45	142	142.5
6	0.028	5.1	0.22	51	67.7
7	0.096	17.6	0.90	176	204.1
8	0.093	17.1	1.01	171	173.9
9	0.039	7.2	0.43	72	69.6
10	0.052	9.6	0.47	96	77.4
11	0.116	21.3	0.98	213	139.9
12	0.046	8.5	0.30	85	81.6
13	0.044	8.1	0.31	81	85.8
14	0.06	11.0	0.44	110	193.8
15	0.047	8.6	0.24	86	102.0
16	0.038	7.0	0.39	70	61.4
<b>Ortalama</b>		<b>9.9</b>	<b>0.46</b>	<b>98.5</b>	<b>102.2</b>
<b>± SE</b>		<b>± 1.3</b>	<b>± 0.07</b>	<b>± 13</b>	<b>± 13</b>

Tablo 22. ODTÜ-DBE Limanından yakalanan *Mugil sp.* in karaciğerindeki Malindialdehit aktivitesi (U=nmole/dak/ml)

Ornek No	OD/5	Konsantrasyon U	U/mg protein	U/g Karaciğer	U/100g Organizma
1	0.02	17.8	0.93	178.0	204.8
2	0.02	17.8	0.89	178.0	188.9
3	0.235	111.1	3.86	1,111.0	1,775.9
4	0.017	16.5	1.01	165.0	141.5
5	0.017	16.5	0.53	165.0	165.6
6	0.027	20.9	0.90	209.0	277.6
7	0.023	19.1	0.98	191.0	221.5
8	0.052	31.7	1.88	317.0	322.3
9	0.04	26.5	1.58	265.0	256.2
10	0.039	26.1	1.28	261.0	210.5
11	0.007	12.2	0.56	122.0	80.2
12	0.018	16.9	0.61	169.0	162.2
13	0.028	21.3	0.80	213.0	225.5
14	0.017	16.5	0.66	165.0	292.7
15	0.159	78.1	2.16	781.0	926.4
16	0.017	16.5	0.91	165.0	172.4
<b>Ortalama ±SE</b>		<b>29.1 ± 6.7</b>	<b>1.2 ± 0.2</b>	<b>290.9 ± 66.8</b>	<b>351.5 ± 106.1</b>

Tablo 23. ODTÜ-DBE Limanından yakalanan *Mugil sp.* in karaciğerindeki Süperoksit dismutaz aktivitesi (U= $\mu$ mole/dak/ml)

Örnek No	OD/5	% inhibisyon	Aktivite U/ml	U/g Karaciğer	U/mg protein	U/100 g Organizma
1	0.007	82.1	4.17	41.7	0.21	47.99
2	0.016	58.9	1.12	11.2	0.056	11.89
3	0.005	87.2	5.37	53.7	0.19	85.84
4	0.008	79.5	3.63	36.3	0.22	31.13
5	0.012	69.2	2.09	20.9	0.067	20.99
6	0.008	79.5	3.63	36.3	0.17	48.22
7	0.005	87.2	5.37	53.7	0.28	62.26
8	0.007	82.1	4.17	41.7	0.25	42.40
9	0.006	84.7	4.79	47.9	0.29	46.31
10	0.005	87.2	5.37	53.7	0.26	43.31
11	0.006	84.7	4.79	47.9	0.22	31.47
12	0.009	76.9	3.09	30.9	0.11	29.65
13	0.008	79.5	3.63	36.3	0.14	38.43
14	0.007	82.1	4.17	41.7	0.17	73.98
15	0.006	84.6	4.79	47.9	0.13	56.82
16	0.007	82.1	4.17	41.7	0.23	43.57
<b>Ortalama</b> <b>± SE</b>			<b>4.02</b> <b>± 0.3</b>	<b>40.2</b> <b>± 3.0</b>	<b>0.19</b> <b>± 0.02</b>	<b>44.64</b> <b>± 4.7</b>

OD: Optical density

U:  $\mu$ mol/ml

Tablo 24. ODTÜ-DBE 'den yakalanan *Mugil sp* için yapılan Spearman rank korelasyonu.

	G-6-PD	GSH-P	GSH-R	GSH	MDA	SOD
G-6-PD	1.00					
GSH-P	0.47*	1.00				
GSH-R	-0.45*	-0.64**	1.00			
GSH	-0.44*	-0.29	-0.17	1.00		
MDA	-0.29	-0.11	-0.13	-0.33	1.00	
SOD	-0.54*	-0.15	0.24	0.15	0.43*	1.00

\*P<0.05                      \*\*P<0.01



Tablo 25. Mersin ve ODTÜ-DBE limanlarından yakalanan kefal balıklarında ölçülen enzim aktivitelerinin karşılaştırılması

U/mg protein	Mersin Limanı		ODTÜ-DBE Limanı
	<i>O. labeo</i>	<i>L. ramada</i>	<i>Mugil sp.</i>
<b>G-6-PD</b>	0.03±0.006	0.05±0.005	0.05±0.005
<b>GSH-P</b>	0.15±0.03	0.15±0.02	0.02±0.003
<b>GSH-R*</b>	10.0±2.0	8.0±1.0	6.0±0.6
<b>GSH*</b>	0.21±0.04	0.5±0.05	0.46±0.07
<b>MDA*</b>	2.86±0.7	2.12±0.5	1.2±0.2
<b>SOD</b>	0.11±0.02	0.084±0.01	0.19±0.02

\*: GSH-R, GSH ve MDA için nmole/mg protein üzeinden verilmiştir.

Tablo 26. Yomra, Mersin ve ODTÜ-DBE limalarından alınan deniz suyu ve kefal karaciğerinde ölçülen PAH miktarı ( $\mu\text{g/L}$  su için;  $\mu\text{g/g}$  kuru ağırlık karaciğer için)

İstasyonlar	Deniz suyu	Karaciğer $\pm\text{SE}$
Yomra Limanı	1.12	55.7 $\pm$ 16.6
ODTÜ-DBE Limanı	0.20	9.3 $\pm$ 1.2
Mersin Limanı	1.1	37.1 $\pm$ 7.6

Tablo 27. Kefal balığı karaciğerindeki PAH konsantrasyonu

Balık Türleri	Yakalanan Liman	n	Konsantrasyon ( $\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık) mean $\pm$ SE
Kefal balığı	ODTÜ-DBE	13	9.3 $\pm$ 1.2
Kefal balığı	Mersin	10	37.1 $\pm$ 7.6
Kefal balığı	Yomra	7	55.7 $\pm$ 16.6

Tablo 28. Mersin Limanı kefal balıklarının sex, boy, somatic karaciğer index, ağırlık ve kan ve karaciğerde aromatic DNA-eklemeleri konsantrasyonu

Örnek No.	Sex	Boy (cm)	Ağırlık (g)	Karaciğer ağırlığı (g)	SLI	Kan	Karaciğer (adduct/10 <sup>8</sup> nucleotides)
<i>L. ramada</i>	F	39.0	462.0	7.8	1.69	14.5	18.3
2	F	41.0	633.9	7.6	1.2	6.3	11.4
3	F	39.5	530.6	9.6	1.81	6.3	250.8
4	F	37.0	487.0	9.0	1.85	30.3	320.1
5	F	40.0	547.4	8.4	1.53	22.1	175.3
6	F	44.0	694.0	11.5	1.66	8.6	223.9
7	F	41.0	647.6	5.3	0.82	10.7	285.6
8	F	38.0	519.9	9.8	1.88	11.2	-
9	F	43.0	590.3	11.0	1.86	-	289.1
10	F	42.0	676.4	12.2	1.8	-	227.8
11	F	35.0	387.0	7.0	1.81	-	186.7
12	M	35.0	330.0	6.5	1.97	-	175.4
13	F	36.0	424.0	7.8	1.84	-	298.3
14	F	35.5	364.8	6.5	1.78	-	197.3
15	M	36.0	410.2	5.3	1.29	-	-
Ortalama ±SE		38.8 ± 0.8	513.7 ± 30.3	8.4 ± 0.6	1.7 ± 0.08	13.8 ± 3.0	204.6 ± 26.9
<i>O. labeo</i>	M	30.0	348.0	7.0	2.01	-	269.5
2	F	31.0	356.3	7.7	2.16	-	482.1
3	M	35.0	420.0	6.0	1.43	-	27.4
4	M	32.0	410.9	7.8	1.9	-	51.0
5	F	33.0	444.8	6.6	1.48	-	37.8
6	M	29.0	285.0	5.4	1.89	-	53.9
7	M	31.0	339.7	6.3	1.85	-	12.8
8	M	32.0	377.8	5.0	1.32	-	40.0
9	M	30.0	311.0	5.5	1.77	-	-
10	M	27.0	252.0	3.9	1.55	-	-
11	F	26.0	244.5	3.6	1.47	-	-
12	F	30.0	285.8	8.3	2.9	-	-
Ortalama ± SE		30.5 ± 0.7	339.7 ± 19.0	6.1 ± 0.4	1.8 ± 0.12	-	121.8 ± 59.1

M: Erkek; F: Dişi; J: Genç

SLI: Somatik karaciğer indeksi

LW: Karaciğer ağırlığı

Kan: Kandaki aromatik DNA-eklemeleri konsantrasyonu

Karaciğer: Karaciğerdeki aromatik DNA-eklemeleri konsantrasyonu

Tablo 29. Mersin Limanından yakalan kefal balıklarına uygulanan spearman rank korelasyonu

	L	W	LW	SLI	BA	LA
L	1.00					
W	0.94 <sup>***</sup>	1.00				
LW	0.64 <sup>***</sup>	0.65 <sup>**</sup>	1.00			
SLI	-0.27	-0.31	0.42 <sup>*</sup>	1.00		
BA	0.61 <sup>***</sup>	0.63 <sup>**</sup>	0.43 <sup>*</sup>	-0.22	1.00	
LA	0.40 <sup>*</sup>	0.41 <sup>*</sup>	0.42 <sup>*</sup>	0.29	0.13	1.00

\* P<0.05                      \*\*P<0.01

L: Boy

W: Ağırlık

LW: Karaciğer ağırlığı

SLI: Somatik karaciğer indeksi

BA: Kandaki aromatic DNA eklemeleri konsantrasyonu  
(adduct/10<sup>8</sup>nucleotides)

LA: Karaciğerdeki aromatic DNA eklemeleri konsantrasyonu  
(adduct/10<sup>8</sup>nucleotides)

r<sub>s</sub> = Rank korelasyon sabitinde kritik değer

Tablo 30. ODTÜ-DBE limanından yakalanan balıkların sex, boy, ağırlık, karaciğer ağırlığı ve somatik karaciğer indeksi (SLI)

Örnek No	Sex	Boy (cm)	Ağırlık (g)	LW (g)	SLI	Butanol ekstraksiyon	Nuclease-PI Zenginleştirilmesi
						Karaciğer adduct/ $10^8$ nucleotides	Karaciğer
1	M	35.0	437.6	4.0	0.91	19.9	3.89
2	M	36.0	414.6	4.4	1.06	15.5	1.83
3	M	30.0	212.7	1.7	0.80	50.3	1.80
4	M	30.0	223.9	1.92	0.86	6.1	0.97
5	M	32.0	268.0	2.69	1.0	2.8	1.63
6	M	40.0	677.5	9.0	1.33	7.8	3.95
7	M	41.0	698.6	8.1	1.16	4.3	2.77
8	M	34.0	383.6	3.9	1.02	4.3	8.23
9	M	31.0	289.6	2.8	0.97	3.5	2.40
10	F	27.5	186.0	1.5	0.81	12.1	5.88
11	M	25.5	152.2	0.94	0.62	--	--
12	F	31.5	239.7	2.3	0.96	--	--
13	M	27.5	188.9	2.1	1.11	--	--
14	M	25.5	164.6	2.1	1.28	--	--
15	M	26.5	162.7	2.3	1.41	--	--
Ortalama ± SE		31.5 ± 1.3	313.3 ± 45.8	3.32 ± 0.6	1.01 ± 0.1	12.7 ± 4.6	3.3 ± 0.7

LW: Karaciğer ağırlığı

SLI: Somatik karaciğer indeksi

F: Dişi; M: Erkek

Kan: Kandaki aromatik DNA-eklemeleri konsantrasyonu

Karaciğer: Karaciğerdeki aromatik DNA-eklemeleri konsantrasyonu

Tablo 31. ODTÜ-DBE limanından yakalanan balıkların sex, boy, ağırlık, karaciğer ağırlığı ve somatik karaciğer indeksi (SLI)

Tür	Sex	Boy (cm)	Ağırlık (g)	LW (g)	SLI
<i>Lisa aurata</i>	M	27.0	140.5	4.72	3.36
2	F	29.3	214.5	4.69	2.19
3	F	29.0	202.0	4.69	2.32
4	M	27.0	167.0	4.75	2.84
5	M	30.3	213.0	4.72	2.22
6	F	27.0	169.8	4.72	2.78
7	F	30.0	213.4	4.69	2.2
8	F	28.0	162.0	4.70	2.9
9	M	26.0	133.0	4.72	3.55
<i>Oedolechilus labeo</i>	M	28.0	190.6	4.75	2.49
2	M	29.0	208.0	4.72	2.27
3	F	28.5	193.5	4.72	2.44
Ortalama ± SE		28.3 ± 0.38	183.9 ± 8.3	4.7 ± 0.6	2.6 ± 0.14

LW: Karaciğer ağırlığı  
F: Dişi; M: Erkek

SLI: Somatik karaciğer indeksi

Tablo 32. ODTÜ-DBE limanından yakalanan kefal balıklarının kan ve karaciğerinde ölçülen aromatik DNA-eklemelerinin

Örnek No.	Kan (adduct/10 <sup>8</sup> nucleotides)				Karaciğer (adduct/10 <sup>8</sup> nucleotides)			
	Spot a	Spot b	DZ	Total	Spot a	Spot b	DZ	Total
<i>L. ramada</i>	4.5	3.6	4.7	12.8	4	4.3	27.9	36.2
2	4.2	4.3	2.2	10.7	--	--	16.0	16.0
3	3.5	3.4	4.7	11.6	1.9	4.4	21.9	28.2
4	1.7	1.9	7.7	11.3	3.7	4.4	29.0	37.1
5	1.6	1.9	2.7	6.3	1.4	2.5	13.9	17.8
<i>O. labeo</i>	1.9	2.3	3.1	7.4	2.0	2.9	28.1	33.0
mean ± SE	3.0 ± 0.5	3.4 ± 0.7	4.2 ± 0.8	10.0 ± 1.0	2.6 ± 0.5	3.7 ± 0.4	22.8 ± 2.7	29 ± 4.9

DZ: Diagonal zon

Spot: nokta

Kan: Kandaki aromatik DNA-eklemelerinin konsantrasyonu

Karaciğer: Karaciğerdeki aromatik DNA-eklemelerinin konsantrasyonu

Tablo 33. Yomra Limanından yakalanan *Mugil saliens*'in sex, boy, ağırlık, karaciğer ağırlığı, somatik karaciğer indeksi (SLI) dağılımı

Örnek No	Sex	Boy (cm)	Ağırlık (g)	Karaciğer Ağırlığı (g)	SLI
1	M	29.0	206.7	3.43	1.66
2	M	24.6	134.4	2.35	1.75
3	J	27.5	179.2	2.66	1.48
4	F	29.8	231.9	3.27	1.41
5	F	28.5	218.2	4.40	2.02
6	M	22.5	106.5	1.80	1.69
7	--	27.5	186.1	2.56	1.38
8	J	23.5	118.2	2.59	2.19
9	J	23.0	104.3	2.27	2.18
10	J	21.8	80.4	0.90	1.12
11	--	24.0	114.9	2.05	1.78
12	J	21.5	87.1	1.31	1.5
13	--	25.5	149.9	2.68	1.79
14	M	24.3	124.3	1.72	1.38
mean	-	25.2	145.9	2.4	1.67
± SE		± 0.7	± 13.4	± 0.2	± 0.8

F: Dişi; M: Erkek; J: Genç

--: Belirsiz

SLI: Somatik karaciğer indeksi

Tablo 34: Yomra Limanından yakalanan kefal balıklarının kan ve karaciğerinde ölçülen aromatic DNA-eklemeleri

Örnek No	Kan				Karaciğer			
	(adduct/10 <sup>6</sup> nucleotides)							
	Spot a	Spot b	DZ	Total	Spot a	Spot b	DZ	Total
1	2.3	4.5	10.5	17.3	1.9	2.0	6.8	10.7
2	4.9	2.7	9.7	17.3	1.45	-	16.5	18.0
3	1.9	2.1	11.7	15.7	0.99	2.8	8.8	12.6
4	2.0	1.8	5.7	9.5	4.7	4.5	12.7	21.9
5	3.8	1.9	10.4	16.1	2.86	3.43	21.8	28.1
6	3.7	4.7	7.9	16.3	1.77	1.93	9.23	12.9
7	3.7	3.4	5.8	12.9	1.65	2.2	10.3	14.2
8	3.8	2.5	7.7	14.0	--	--	10.2	10.2
9	2.4	4.9	18.5	25.8	2.9	3.6	16.2	22.7
10	2.5	2.0	14.8	19.3	2.59	--	34.9	37.5
11	3.4	2.5	16.3	22.2	2.44	3.6	23.1	29.1
12	4	4.6	19.9	28.5	--	3.92	22.7	26.6
13	--	--	--	--	--	--	9.18	9.2
Mean	2.7	3.1	11.6	21.2	2.3	3.1	15.6	19.5
± S.E.	± 0.7	± 0.3	± 1.4	± 3.1	± 0.3	± 0.3	± 2.2	± 2.5

DZ: Diagonal zon

Spot: nokta

Kan: Kandaki aromatic DNA-eklemelerinin konsantrasyonu

Karaciğer: Karaciğerdeki aromatic DNA-eklemelerinin konsantrasyonu



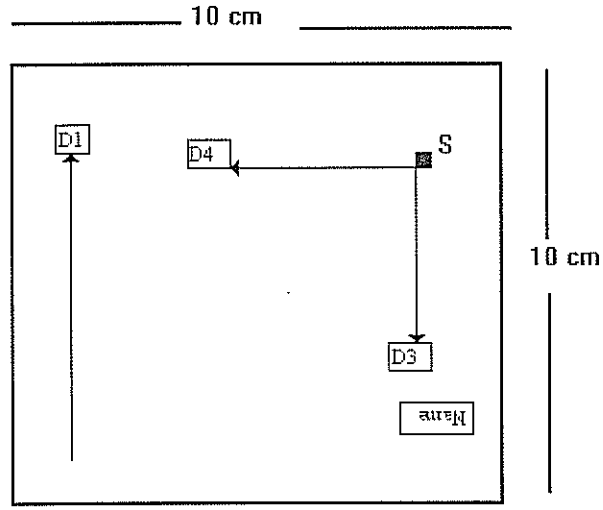
Tablo 35: Akdeniz ve Karadenizden seçilen limanlarda yakalanan kefal balığının kan ve karaciğerinde ölçülen aromatik DNA eklemeleri

Tür	Örnekleme yeri	Kan	Karaciğer	PAH	
		adduct/10 <sup>8</sup> nucleotides		karaciğer (µg/g dry wt.)	Deniz suyu (µg/l)
<i>Mugil sp.</i>	ODTÜ-DBE	10.0±1.0	29.0±4.9	9.3±1.2	0.2
<i>L. ramada</i>	Mersin	13.8±3.0	204.6±26.9	37.1±7.6	1.1
<i>O. labeo</i>		-	121.8±59.1		
<i>Mugil sp.</i>	Sea	21.2±3.1	19.5±2.5	55.7±16.6	--

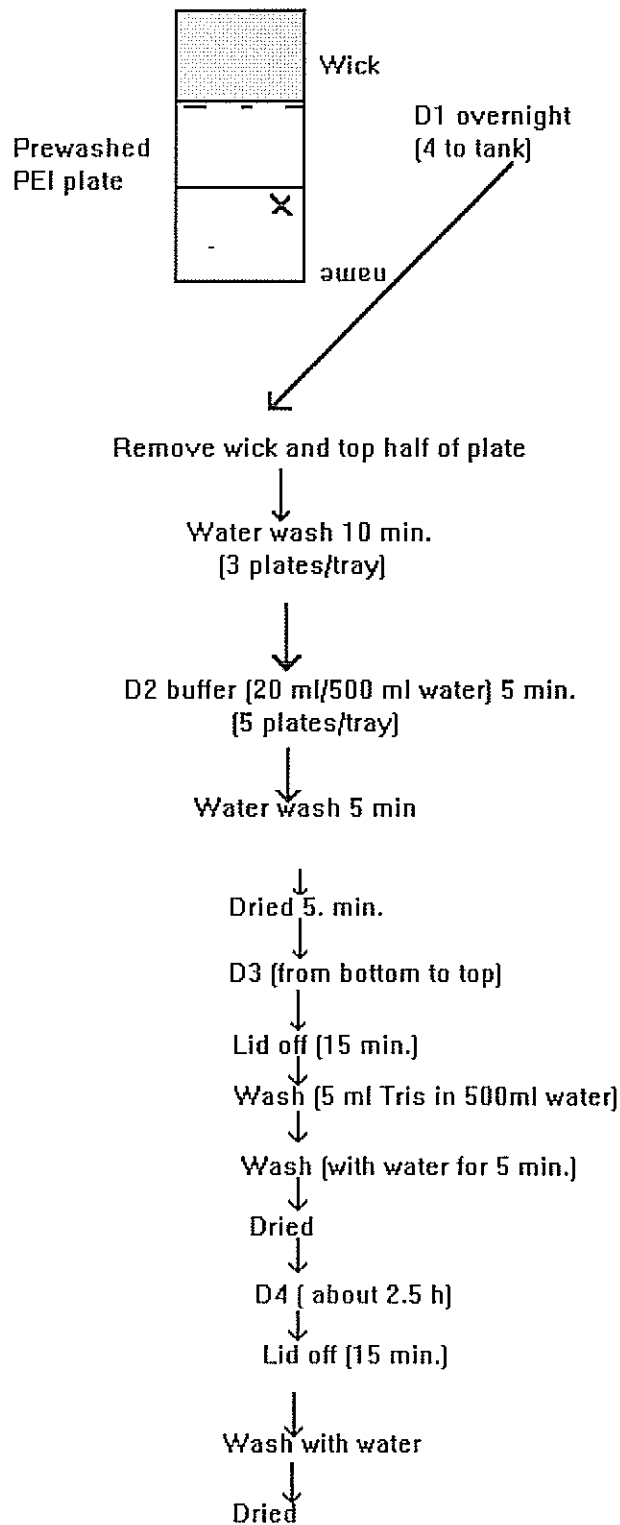
Tablo 36: Bütanol ekstraksiyon ve nükleas P1 zenginleştirilmesi arasındaki farkın farklı balık türlerindeki çalışmalarla ortaya konması

Türler	1995	Nuclease-P1		Butanol extraction	
		Kan	Karaciğer	Kan	Karaciğer
Pisi		0.87±0.18	4.69±1.41	3.3±0.95	4.7±1.4
ODTÜ-DBE " <i>mugil sp.</i> "		--	3.3±0.7	--	12.7±4.6
Mezgit		1.0±0.19	2.67±0.62	4.4±1.4	4.3±1.6
	1996				
Barbun		4.17±1.0	12.2±3.0	14.7±2.5	23.5±2.3
Kefal		4.6±0.6	23.9±3.1	21.2±3.1	19.5±2.5
Pisi		7.1±0.9	--	33.7±2.1	12.9±2.6
Mezgit		-	9.5±1.8	14.4±2.1	12.9±2.6

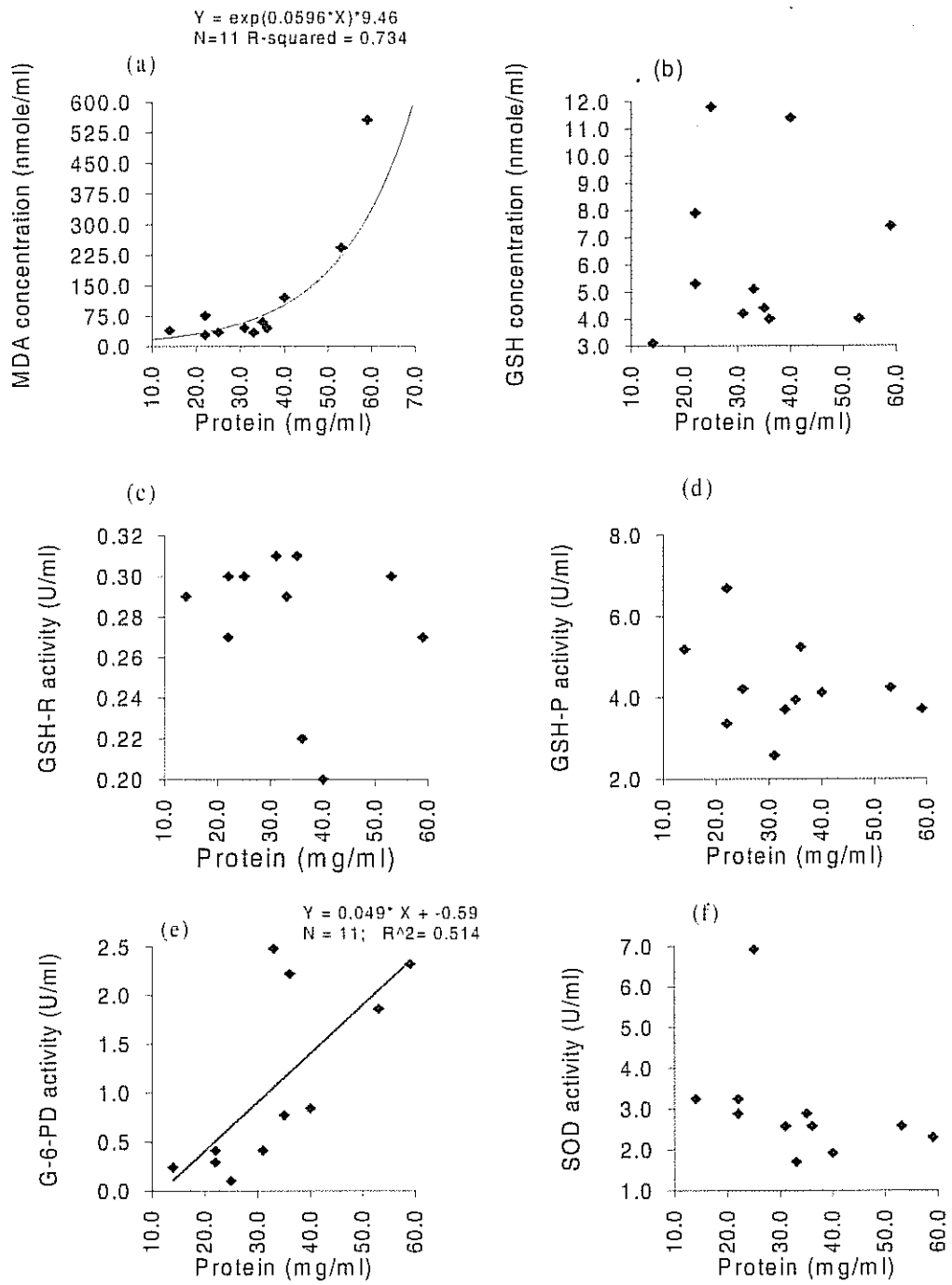
## ŞEKİLLER



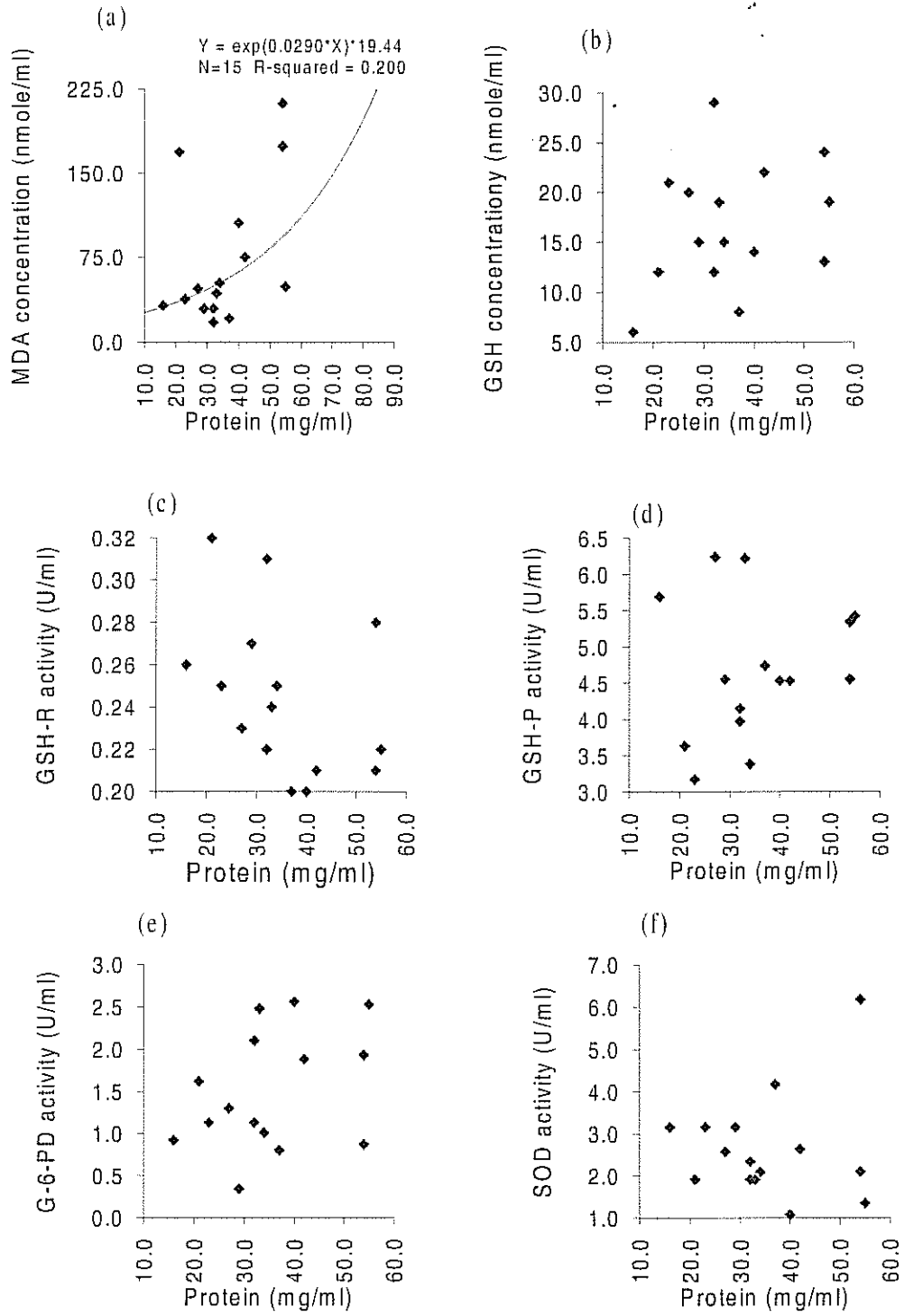
Şekil 1. İnce tabaka (TL) plakası üzerinde çokyönlü kromatografin yönleri (Gupta 1984'ten adapte edilmiştir)



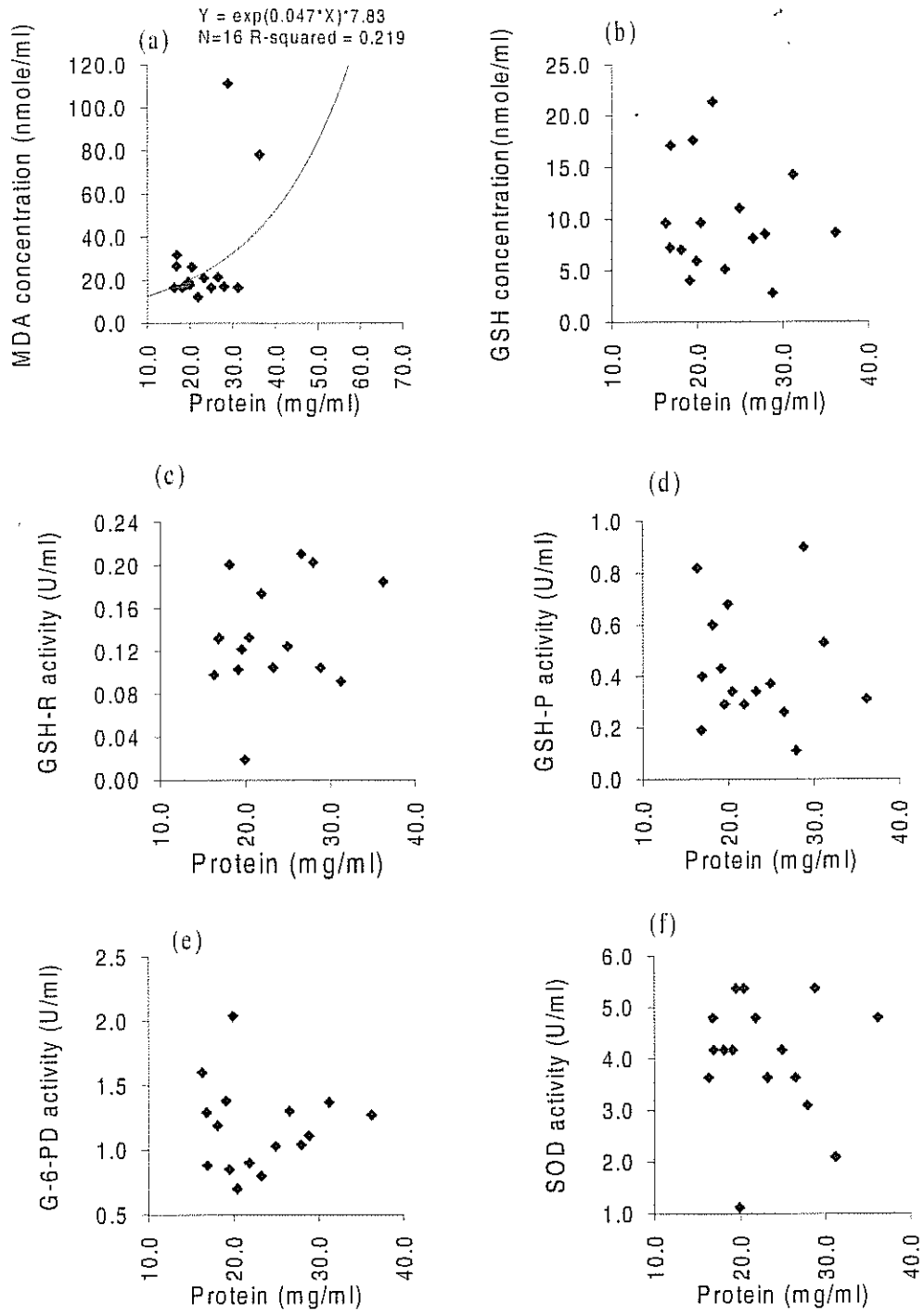
Şekil 2. İnce tabaka kromatografisi (Gupta 1984'dan adapte edilmiştir)



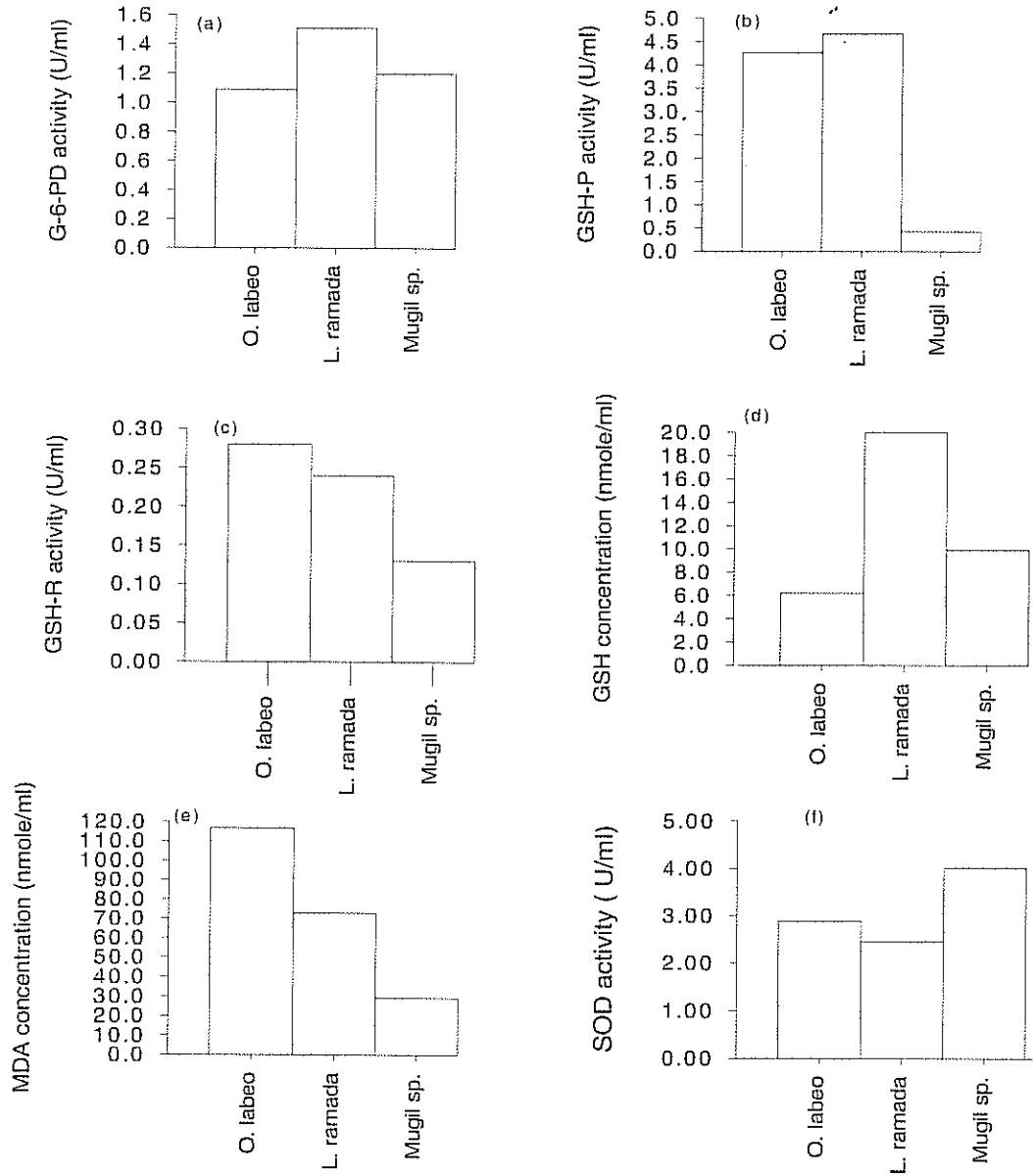
Şekil 3. *O. labeo*'nun enzim sonuçları (protein'e göre hesaplanmış)



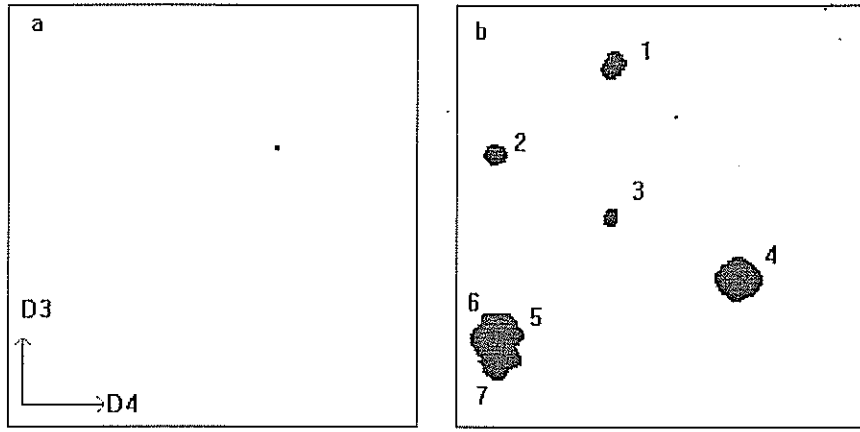
Şekil 4. *L. ramada*' da ölçülen enzimlerin Lineer regresyon analiz sonuçları



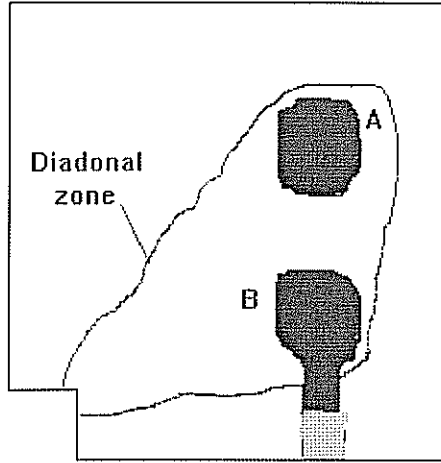
Şekil 5. Protein miktarına karşı MDA, SOD, GSH-R, GSH, G-6-PD ve GSH-P 'in Lineer regresyon analizi



Şekil 6. G-6-PD, GSH-P- GSH-R, GSH, SOD ve MDA konsantrasyonlarının üç farklı kefal grubu için karşılaştırılması

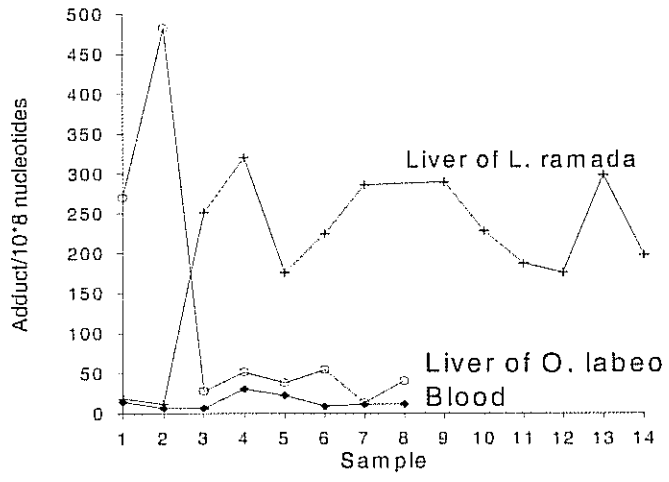


Şekil 7. Aromatik DNA eklemelerinin otoradyografteki görüntüsü (Gupta, 1993'den alındı) a. Blank solvent, b. Benzo(a)pyrene



Şekil 8. İnce tabaka kromatografisinde belirlenen iki spot (nokta)





Şekil 9. Mersin Limanındaki iki dominant kefal türünde ölçülen aromatik DNA eklemeleri

## YDABÇAG-190 PROJESİNDEN ÇIKAN YAYINLAR

1. Telli-Karakoç, F., A. Hewer, D.H. Phillips, A.F. Gaines ve G. Yüregir, 1997. Biomarkers of marine pollution observed in species of mullet living in two eastern Mediterranean harbours. *Biomarkers*, 2, 303-309 .
2. Yılmaz, K., A. Yılmaz, S. Yemenicioğlu, M. Sur, İ. Salihoğlu, Z. Karabulut, F. Telli-Karakoç, E. Hatipoğlu, A.F. Gaines, 1998. Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in the Eastern Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin*. 36, 11, 922-925.
3. Telli-Karakoç, F., A. Tuli, A.F. Gaines, D.H. Phillips ve M. Ünsal, 1998. Adduct distributions in piscine DNA: South-eastern Black Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 36, 6, 696-704.
4. Telli-Karakoç, F., A.F. Gaines, A. Hewer, D. Phillips, 2001. Differences between blood and liver aromatic DNA adduct formation. *Environmental International*. 26, 143-148.