



T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI  
VBY-YL-2015-0003

**BÜYÜK MENDERES DELTASINDAN AVLANAN KEFAL  
(*Leuciscus cephalus*) ve LEVREKLERDE (*Perca fluviatilis*)  
Cu, Zn ve Cd DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ ve  
METALLOTİYONİN İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Tuğçe BAYHAN

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Serap ÜNÜBOL AYPAK

AYDIN-2015

T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI  
VBY-YL-2015-0003

**BÜYÜK MENDERES DELTASINDAN AVLANAN KEFAL  
(*Leuciscus cephalus*) ve LEVREKLERDE (*Perca fluviatilis*)  
Cu, Zn ve Cd DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ ve  
METALLOTİYONİN İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Tuğçe BAYHAN

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Serap ÜNÜBOL AYPAK

AYDIN-2015

**T.C.**  
**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**  
**AYDIN**

Biyokimya Anabilim Dalı tezli yüksek lisans programı öğrencisi Tuğçe BAYHAN tarafından hazırlanan Büyük Menderes Deltasından avlanan kefal (*Leuciscus cephalus*) ve levreklerde (*Perca fluviatilis*) Cu, Zn, Cd düzeylerin belirlenmesi ve metallerin ile ilişkisinin araştırılması başlıklı tez, 14.05.2015 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

**Unvanı, Adı ve Soyadı :**

**Üniversitesi :**

**İmzası:**

Prof. Dr. Hamdi UYSAL

Ankara üniversitesi

Prof. Dr. Funda KIRAL

Adnan Menderes Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Serap ÜNÜBOL AYPAK

Adnan Menderes Üniversitesi



Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu yüksek lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla (tarih) tarihinde onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN

## ÖNSÖZ

Yirmi birinci yüzyılda dünya ülkelerinin en büyük sorunlarından biri, gelişen teknolojiye paralel olarak gün geçtikçe artan ve yaşamı olumsuz etkileyen çevre kirliliğidir. Çevre kirliliğinin artış göstermesi ile birlikte yeryüzünde yaşayan canlılar beslenme ortamlarının ve besin maddelerinin kirlenmesi nedeniyle tehlike altındadırlar. Doğaya yayılmış bulunan her türlü kirlilikte metal kalıntılarının önemli bir payı vardır. Bunlar; bitkiler, hayvanlar ve besin zinciri içinde son tüketici olan insanlar üzerinde toksik etkiler yapmaktadır. Çevre kirliliğine sebep olan ve yaşamı olumsuz etkileyen ağır metaller organizmada akut ve kronik çeşitli zehirlenme belirtileri meydana getirmektedirler. Gıdaların ağır metallerle kirlilik düzeylerinin belirlenmesi ve gerekli tedbirlerin alınması son derece önemlidir.

Metallotiyoninler, düşük moleküler ağırlıklı, sistein bakımından zengin, metal bağlayan, molekül ağırlığı 5000 kadar olan polipeptitlerdir. Metallotiyoninler ilk defa 1957 yılında at böbreğinde “kadmiyum bağlayıcı protein” olarak tanımlanmıştır. Sonradan Kagi ve ark (1974) ile Vallee (1995) tarafından saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Genellikle yüksek metal bağlayıcı ve redoks yapma yeteneğine sahiptirler. Bu proteinlerin yaşamsal rolü toksik metallerle, iz elementleri bağlamasıdır. Çinkodan yoksun beslenmelerde, enfeksiyonlarda, yangıda, toksik metal alımında, oksijen radikalleri ve stres durumlarında, bakır ve çinko gibi iz element hücre içi metabolizması ile kadmiyum ve civa gibi ağır metallerin detoksifikasyonunda MT'lerin önemli rolleri olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada Büyük Menderes Deltasından avlanan kefal (*Leuciscus cephalus*) ve levreklerin (*Perca fluviatilis*) karaciğer, kas ve solungaçlarında bakır, çinko ve kadmiyum düzeyleri ve metallotiyonin düzeyleri araştırılmıştır. Çalışmamız Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-14022 numaralı “Büyük Menderes Deltasından avlanan kefal (*Leuciscus cephalus*)ve levreklerde (*Perca fluviatilis*) Cu, Zn ve Cd düzeylerinin belirlenmesi ve metallotiyonin ile ilişkisinin araştırılması” isimli proje ile desteklenmiştir.

# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
RESİMLER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Ağır Metaller .....	2
1.2 Çalışılan Ağır Metaller.....	5
1.2.1. Bakır (Cu).....	5
1.2.2. Çinko (Zn).....	7
1.2.3. Kadmiyum (Cd).....	10
1.3. Metalloiyoninler .....	13
1.3.1. Metalloiyoninin Temel Fonksiyonları.....	14
1.3.2. Metalloiyoninin Çeşitleri.....	16
1.3.3. Metalloiyoninlerin Bazı Organlardaki Görevleri .....	17
1.3.3.1. Karaciğerde metalloiyoninler .....	17
1.3.3.2. Pankreasta metalloiyoninler .....	17
1.3.3.3. Merkezi sinir sisteminde metalloiyoninler .....	18
1.3.4. Metalloiyoninlerin Esansiyel Metallerin Homeostazisindeki Rolü.....	19
1.3.5. Metalloiyoninler ve Metal Detoksifikasyonu.....	20
1.3.6. Metalloiyoninlerin Tespit Yöntemleri.....	21
1.4. Sucul Ortamlarda Ağır Metal Kirliliği ve Sucul Canlılarda Birikimi .....	21
1.4.1. Balık Doku ve Organlarının Ağır Metallere Olan İlgisi.....	23
1.4.2. Büyük Menderes Akarsuyunun Genel Özellikleri .....	24

1.4.2.1. Büyük Menderes Akarsuyunun kirlilik durumu.....	24
1.4.3. Kefal Balığının Genel Özellikleri .....	25
1.4.4. Levrek Balığının Genel Özellikleri. ....	26
1.5. Mikrodalga Yöntemi ile Örnek Çözünürleştirme.....	26
1.6. İndüktif Olarak Eşleşmiş Plazma - Optik Emisyon Spektroskopisi (ICP-OES) .....	28
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
2.1. Gereç.....	31
2.2. Yöntem .....	31
2.2.1. Ağır Metal Analizi İçin Örneklerin Çözünürleştirilmesi.....	31
2.2.2. Stok Çözeltiler, Standart Çözeltiler ve Kalibrasyon Eğrileri Hazırlanması .....	32
2.2.2.1. Stok çözeltilerin hazırlanması .....	32
2.2.2.2. Standart çözeltilerin hazırlanması ve cihazın kalibrasyonu .....	33
2.2.3. Metalotiyonin Analizi İçin Doku Homojenizasyonu.....	36
2.2.3.1. Metalotiyonin analiz prosedürü.....	36
2.3. Hesaplamalar .....	37
2.4. İstatistiksel Değerlendirmeler.....	37
3. BULGULAR .....	38
3.1. Ağır Metal Düzeylerinin Genel Değerlendirmesi .....	38
3.1.1. Kefal Kas ve Karaciğer Dokularındaki Ağır Metal Düzeyleri .....	39
3.1.2. Levrek Kas ve Karaciğer Dokularındaki Ağır Metal Düzeyleri .....	40
3.1.3. Dokularındaki Ağır Metal Düzeylerinin Karşılaştırılması .....	41
3.1.4. Karaciğerdeki Metalotiyonin Düzeyleri .....	42
3.1.5. Ağır Metal Düzeylerinin Metalotiyonin Düzeyleriyle İlişkisi .....	43
4. TARTIŞMA.....	44
5. SONUÇ.....	52
ÖZET .....	53
SUMMARY .....	54

KAYNAKLAR.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	65
TEŞEKKÜR.....	66

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİSİ

Ca:	Kalsiyum
Cd:	Kadmiyum
Cu:	Bakır
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
Fe:	Demir
GSH:	Glutasyon
HCl:	Hidroklorik Asit
HEM:	Hem Protein Grubu
Hg:	Civa
HNO <sub>3</sub> :	Nitrik Asit
LPO:	Lipid Peroksidasyon
Mg:	Magnezyum
MT:	Metallotiyonin
NADPH:	Nikotinamid Dinükleotid Fosfat
Ni:	Nikel
Pb:	Kurşun
Ppb:	Milyarda Bir Ölçütü
Ppm:	Milyonda Bir Ölçütü
SOD:	Süperoksit Dismutaz
WHO:	Dünya Sağlık Örgütü
Zn:	Çinko
ZnCl:	Çinko Klorür



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Temel endüstrilerden atılan metal türleri .....	3
Çizelge 1.2. Sucul ortamda ve balık dokularında bazı ağır metallerin kabul edilebilir değerleri.....	22
Çizelge 1.3. ICP-OES cihazının çalışma koşulları .....	30
Çizelge 2.1. Mikrodalga fırına ait karaciğer ve kas dokusu yakma programı.....	31
Çizelge 2.2. Standart çözeltiler.....	33
Çizelge 2.3. Ağır metallerin ICP-OES analizinde yararlanılan dalga boyları ve kalibrasyonları sırasındaki % korelasyonları.....	33
Çizelge 3.1. Örneklerden elde edilen ağır metal sonuçları.....	38
Çizelge 3.2. Kas dokusundaki ağır metal düzeyleri .....	41
Çizelge 3.3. Karaciğer dokusundaki ağır metal düzeyleri.....	41

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Esansiyel elementler ile toksik olan ağır metallerin canlılar üzerindeki etkileri .....	2
Şekil 1.2. Şematik olarak ağır metallerin doğaya yayılımları .....	4
Şekil 1.3. Metalloiyonun .....	13
Şekil 1.4. Beyin dokusunda MT I-II immun-pozitif astrositler .....	19
Şekil 1.5. ICP-OES cihazının yapısı.....	29
Şekil 1.6. Atomlaşma ve uyarılmanın şematik gösterimi.....	29
Şekil 2.1. Mn için kalibrasyon grafiği .....	34
Şekil 2.2. Cu için kalibrasyon grafiği.....	34
Şekil 2.3. Zn için kalibrasyon grafiği .....	35
Şekil 2.4. Cd için kalibrasyon grafiği.....	35
Şekil 2.5. Metalloiyonun için standart grafiği .....	36
Şekil 3.1. Kefal kas dokusundaki ortalamalar .....	39
Şekil 3.2. Kefal karaciğer dokusundaki ortalamalar .....	39
Şekil 3.3. Levrek kas dokusundaki ortalamalar.....	40
Şekil 3.4. Levrek karaciğer dokusundaki ortalamalar .....	40
Şekil 3.5. Kas dokusunda ağır metal karşılaştırılması.....	41
Şekil 3.6. Karaciğer dokusunda ağır karşılaştırılması .....	42
Şekil 3.7. Balıklardaki metalloiyonun düzeyleri.....	42

## RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.1. Büyük Menderes Deltası .....	24
Resim 1.2. Kefal balığı.....	25
Resim 1.3. Levrek balığı .....	26
Resim 1.4. Mars X Press marka mikrodalga fırın .....	27
Resim 1.5. Teflon kaplar .....	27
Resim 2.1. Örneklerin Çözünürleştirilmesi .....	31

# 1. GİRİŞ

Antik çağlarda, metal cevherleri işlenmeye başlandığından bu yana metaller çevreye yayılmaya başlamışlardır. Yüzyıllar boyunca insanlar, ağır metalleri, etkilerini bilmeden tabak, çanak, takı, silah, su borusu gibi eşyalar yapmak için kullanmışlardır. Sonraki çağlarda sanayileşmeyle birlikte ağır metal içeren kömürler yakılmaya başlanmış ve bunun sonucunda endüstri bölgelerindeki ağır metal kirliliği aşırı boyutlara ulaşmıştır. Metaller, canlılar tarafından belirli bir konsantrasyonun üzerinde alındığında hücrenin metabolizmasına ve gelişimine zarar vererek toksik etki yaparlar. Bu durum ağır metaller için de geçerlidir. Bazı ağır metaller uygun konsantrasyonlarda canlı yaşamı için gerekli iken bazı ağır metallerin (Hg, As gibi) çok düşük miktarları bile zehirli hatta öldürücü olabilir (Rether 2002).

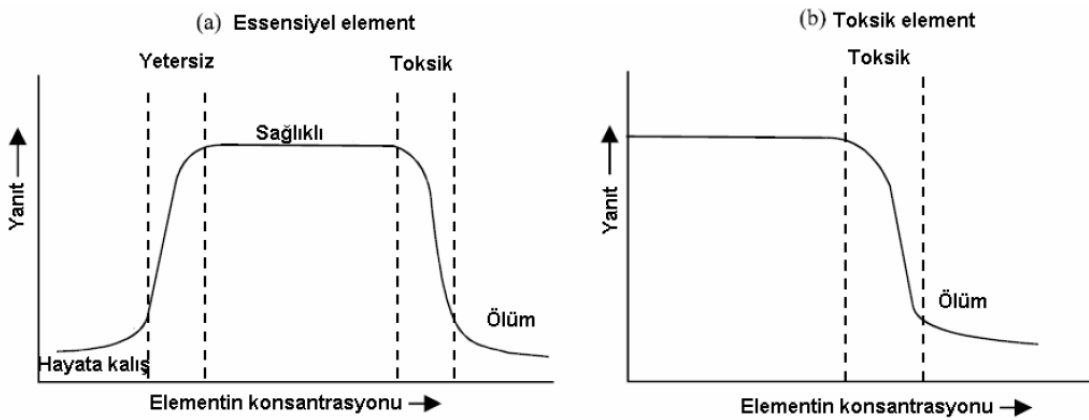
Yaşamsal fonksiyonları olan ağır metallerin canlı bünyesinde gereğinden fazla akümüle olması dokularda tahribata yol açar, organ ve dokuların görevini yapamamasına neden olur. Özellikle Cd, Hg, Pb ve Cr gibi toksik ağır metaller, besin zinciri yoluyla girdikleri canlılarda birikir ve belli konsantrasyonlarının aşılması halinde toksik etki yaparlar. Dolayısıyla ağır metal kirliliği canlılar için büyük tehlike arz eden bir sorundur. Ağır metal kirliliğinden kaynaklandığı tanımlanan ilk zehirlenmeler Japonya'da ortaya çıkmıştır (Duffus ve Howard 1996).

Ağır metaller normalde kayaların ve maden cevherlerinin yapısında bulunduğu için organizmalarda, sulara, sedimentlerde ve toprakta bulunması doğaldır (Ciminli 2005). Kayaların parçalanma, taşınma, tortulanma gibi sedimenter süreçler geçirmesi ve insan aktiviteleri sonucunda deniz ve göl diplerindeki ağır metal birikimi yıl geçtikçe artmıştır. Suda çözünür halde bulunan metaller çökerek sedimentte birikir. Özellikle nehirlerin göl ve denizlerle birleştiği geniş kısımlarda ağır metallerin birikimi daha yoğundur. Akarsuların endüstriyel ya da kentsel bölgelerden geçmesi durumunda evsel atıklardaki ve sanayi atıklarındaki ağır metaller de bu sulara karışacağından alıcı ortamlardaki birikim çok daha fazla olabilir (Katalay ve ark 2005). Ağır metaller suda kolayca çözünebildikleri için, su organizmaları tarafından çok kolay bir şekilde alınabilmekte ve canlı proteinlerine çok kuvvetli bir şekilde bağlanabilmektedirler. Ağır metaller, sucul canlıların bünyelerinde az miktarda bulunsalar bile, giderek artan oranlarda birikerek zehir etkisi yapacak düzeylere ulaşabilmektedirler. Bu birikim sonucunda sucul ortamda yaşayan canlılar

ölebilir, hatta metallerle kontamine olmuş su ürünlerini tüketen insanların da yaşamı tehlikeye girebilir. Biyolojik döngünün bir halkasını oluşturan ve önemli bir protein kaynağı olarak tüketilen balıklarda giderek artan ağır metal birikimi hem balıklarda toksik etki yapmakta hem de insan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir (Rether 2002).

### 1.1. Ağır Metaller

Yoğunluğu  $5 \text{ g/cm}^3$  'ten fazla olan element metallere, genel olarak "ağır metaller" adı verilir. Biyolojik proseslere katılma derecelerine göre yaşamsal ve yaşamsal olmayan ağır metaller olarak iki grupta sınıflandırılırlar. Yaşamsal olanların organizma yapısında belirli bir konsantrasyonda bulunmaları gerekir ve bu metaller biyolojik reaksiyonlara katıldıklarından, besinler yoluyla düzenli olarak alınmaları zorunludur. Örneğin bakır, hayvanlarda ve insanlarda kırmızı kan hücrelerinin, birçok oksidasyon ve redüksiyon prosesinin vazgeçilmez parçasıdır (Bigersson ve ark 1988). Yaşamsal olmayan ağır metaller ise, çok düşük konsantrasyonda bile sağlık problemlerine yol açmaktadır. Buna en iyi örnek kükürtlü enzimlere bağlanan cıvadır (Duffus ve Howard 1996). Bazı sistemlerde ağır metallerin etki mekanizması konsantrasyona bağlı olarak değişir. Bu tür organizmalarda metallerin konsantrasyonu dikkate alınmalıdır. Şekil 1.1'de ağır metallerin vücut sıvısındaki konsantrasyonuna bağlı olarak oluşturduğu etkiler şematik olarak verilmiştir. Ağır metaller, konsantrasyon sınırını aştıkları zaman toksik etki gösterirler. Ayrıca canlı türüne ve metal iyonunun yapısına (çözünürlük değeri, kimyasal yapısı, redoks ve kompleks oluşturma yeteneği), vücuda alınış şekline, çevrede bulunma sıklığına, lokal pH'ya bağlı olarak da etki gösterirler (Uğuner 2008).



Şekil 1.1. Esansiyel ile toksik elementlerin canlılar üzerindeki etkileri (Uğuner 2008).

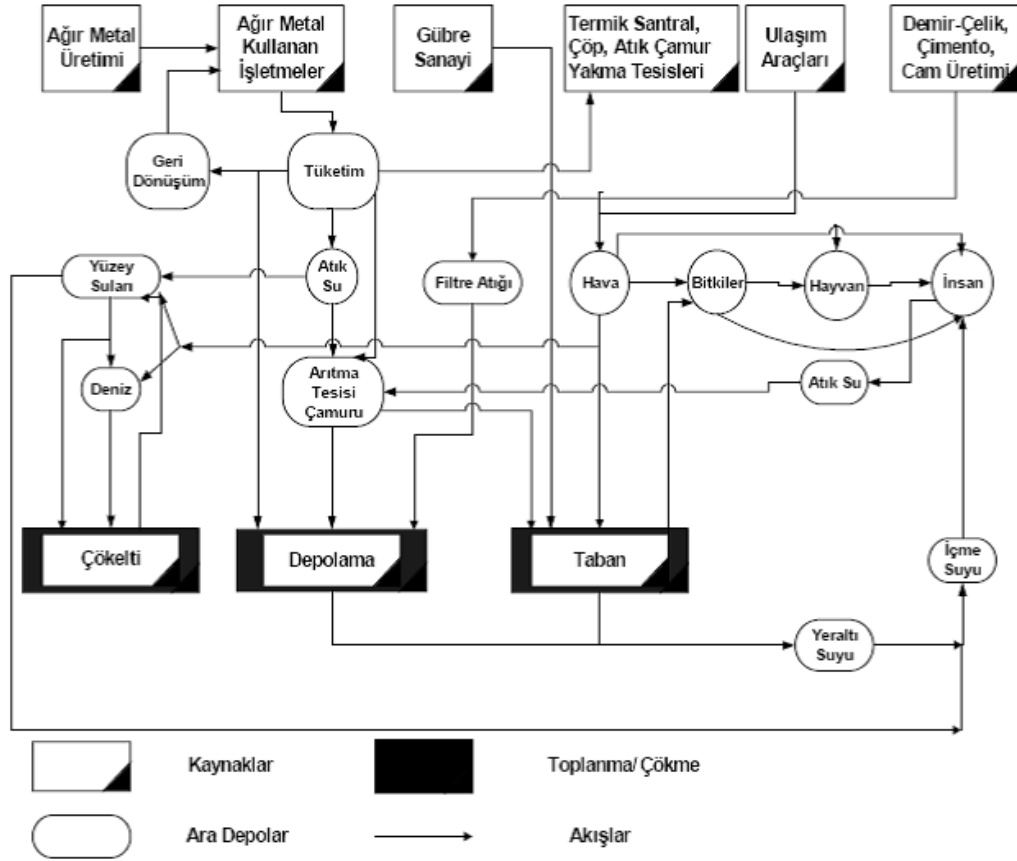
İnsanların tükettiği doğal gıdaların yapısı, endüstrinin gelişmesi ile gün geçtikçe bozulmaktadır. Toprağın, havanın ve suyun kirlenmesine bağlı olarak bitkisel ve hayvansal gıdaların da bileşimi değişmektedir. Gıda maddelerine bulaşan toksik maddeler içinde insan sağlığını en fazla tehdit eden ve zararlı olarak bilinen grup, ağır metallerdir (Vercruyse 1984). Endüstriyel atıklar veya asit yağmurları toprağı ve toprağın bileşiminde bulunan ağır metalleri çözer. Çözünen bu ağır metallerin ırmak, göl ve yeraltı sularına ulaşmasıyla da ağır metaller su kaynaklarına geçmiş olur. Sulara taşınan ağır metaller aşırı derecede seyrelmiş olurlar ve kısmen karbonat, sülfat, sülfür olarak katı bileşik oluşturmak sureti ile su tabanına çöker ve bu bölgede zenginleşirler. Sediment tabakasının adsorpsiyon kapasitesi sınırlı olduğundan dolayı da suların ağır metal konsantrasyonu sürekli olarak yükselmektedir. Ağır metallerin ekolojik sistemdeki yayılımlarına bakıldığında, insandan kaynaklanan yayılımın doğal yayılımdan daha fazla olduğu görülmektedir. Kullanıma bağlı kirlenmenin yanı sıra kazalar sonucunda çevreye yayılım da önemli miktarlara ulaşmaktadır. Bir yılda, insan faaliyetleri sonucunda atmosfere dağılan ağır metal miktarları, doğal çevrimlerde atılan ağır metal miktarlarından 3-19 kat daha fazladır (Rether 2002).

Ağır metallerin çevreye yayılımındaki en önemli endüstriyel faaliyetler çimento üretimi, demir çelik sanayi, termik santraller, cam üretimi ve çöp yakma tesisleridir. Çizelge 1.1.'de temel endüstrilerden atılan metal türleri genel olarak gösterilmiştir.

**Çizelge 1.1.** Temel endüstrilerden atılan metal türleri (Rether 2002).

<b>Endüstri</b>	<b><u>Cd</u></b>	<b><u>Cr</u></b>	<b><u>Cu</u></b>	<b><u>Hg</u></b>	<b><u>Pb</u></b>	<b><u>Ni</u></b>	<b><u>Sn</u></b>	<b><u>Zn</u></b>
Kağıt Endüstrisi	-	+	+	+	+	+	-	-
Petrokimya	+	+	-	+	+	-	+	+
Klor-Alkali Üretimi	+	+	-	+	+	-	+	+
Demir-Çelik Sanayi	+	+	+	+	+	+	+	+
Enerji Üretimi (Termik)	+	+	+	+	+	+	+	+

Toksik element bulaşmaları çok çeşitli kaynaklardan olmaktadır. Kirlenici kaynaklardan doğaya yayılan toksik metaller bitkilere geçmekte, buradan da gıda yoluyla hayvanlara ve insanlara geçerek bünyelerinde birikim yapmaktadır. Endüstri ve teknolojinin gelişmesine paralel olarak gerekli önlemler alınmazsa bu çember içerisinde dolaşan metal miktarının giderek artacağı belirtilmektedir (Ekşi 1981). Şekil 1.2.'de farklı sektörlerden biyosfere ağır metal yayılımı şematik olarak verilmiştir.



Şekil 1.2. Şematik olarak ağır metallerin doğaya yayılımları (Rether 2002).

## 1.2. Çalışılan Ağır Metaller

### 1.2.1. Bakır (Cu)

Bakır, periyodik cetvelde 1 B grubunda yer alan, 63,5 g/mol atom ağırlığına sahip bir geçiş elementidir. Toprakta, suda ve az miktarda havada bulunan bakır kırmızı renklidir (Keen ve ark 2003). Çok iyi derecede elektrik ve ısı iletkenliğine sahip olan, aşınmaya ve korozyona karşı dirençli, aynı zamanda çekilebilme ve dövülebilme özellikleri olan bir metaldir. Bu özelliklerinden dolayı endüstri ve sanayide çok geniş kullanım alanı bulmuştur. Ayrıca bakır alaşımları çok çeşitli olup endüstride çok değişik amaçlarla (otomotiv, basınçlı sistemler, borular, vanalar, elektrik santralleri ve elektrik, elektronik vd.) kullanılmaktadır (Anonymous 1998, Kartal 2004).

Doğada genellikle sülfürlü ve oksitli kompleksler halinde bulunan bakır, genel kimyasal özelliklerinden dolayı doğaya havayla yayılır. Sanayinin yoğun olduğu bölgelerde havadaki bakır konsantrasyonu yüksek iken uzaklaştıkça azalır. Bakır aynı zamanda suda çözünerek de geniş bir alana dağılabilir (Kartal 2004).

Bakır insanlar ve hayvanlar için esansiyel bir iz elementtir ve yüksek düzeylerde canlılar için toksik etki göstermektedir (Heath 1995, Sağlamtimur ve ark 2004). Önemli bir metalloenzim bileşeni olan bakır, sitokrom oksidaz, lizil oksidaz, monoamin oksidaz, askorbik asit oksidaz, superoksit dismutaz enzimlerinin prostetik grubudur. Omurgalıların kan plazmasında bulunan seruloplazmin, karaciğerde bulunan hepatokuprein, beyinde bulunan serebrokuprein ve artropodlarda solunum pigmenti, bakır içeren proteinlerdir (George 1991).

Bağırsaklardan emilimi gerçekleşen bakır, portal venler yardımı ile karaciğere taşınır. Karaciğer bakır için hem depolanma hem de diğer organlara dağılma yeridir (Linder ve ark 1998, Turnlund 1998). Vücuttaki bakır düzeyi duodonal absorpsiyon ve safra atılımı ile düzenlenir. Homeostatik aralıkta olduğu sürece, sağlıklı yetişkinlerde denge sağlamak amacıyla duodondan bakır alımı azaltılırken safradan atım artırılır (Turnlund 1998, Harvey ve ark 2003, Araya ve ark 2003). Böylece vücutta bakırın aşırı birikmesi önlenmiş olur. Vücuttaki bakır seviyesinin belirlenmesinde plazmadaki total bakır miktarı ve kuproenzimler dikkate alınır. Plazmadaki bakırın % 95'i serüloplazmine, geri kalan kısmı ise albümin ve di-histidin komplekslerine bağlı durumdadır (Harris ve Gitlin 1996, Danzeisen ve ark 2007).



Bakır hemoglobin sentezi için gereklidir ve demirin intestinal kanaldan emilmesine yardım eder. Bakır eksikliğinde hipokrom mikrositer anemi meydana gelir. Bakır eksikliği az karşılaşılan bir durum olup özellikle anemi ve deri bulgularıyla ortaya çıkmaktadır. Yapılan çalışmalar orak hücre anemisi nedeniyle çinko takviyesi yapılan bireylerde, hipokupremi ve hiposeruloplazminemi oluştuğunu göstermiştir. Bu durum bakır ilavesi ile kolayca düzelmektedir (O'Dell 1995, Keen ve ark 1998, Prasad ve ark 1998). Özellikle gebelik döneminde, bakır eksikliğinin önemli etkileri ortaya çıkmaktadır. Örneğin, fetüs beyninde malformasyonlara, kalp ve kan damarlarının gelişiminde bozukluğa sebep olabilir (Mieden ve ark 1986, Hawk ve ark 1998, Keen ve ark 2003). Bunlara ek olarak, düşük bakır seviyesi, gelişim esnasında kemikte yapısal bozukluklara ve daha sonraki dönemlerde de osteoporoz oluşumuna sebep olabilir (Eaton-Evans ve ark 1996). Aynı zamanda, bakır eksikliği; kollajen stabilizasyonunda ve melanin sentezinde bozukluklara neden olabilir (Tomita ve ark 1992, Petris ve ark 2000).

Beyin ve karaciğer, bakır birikimi açısından olası hedef dokulardır. Bakırın aşırı birikmesi, çevresel oksidatif strese sebep olur. Şeker hastası olan veya herhangi bir karaciğer rahatsızlığı olan bireylerde karaciğerdeki bakır seviyesi yüksek bulunmuştur (Chen ve Failla 1988). Genetik hastalıklar da bakırın akümülyasyonunda rol oynar. Bakır ATPaz ATP-7B genindeki mutasyonun neden olduğu Wilson hastalığı, otozomal resesif bir bozukluktur. Bakırın atılımından sorumlu olan bakır pompası ATP-7B'dir. Bu mekanizma bozulduğundan Wilson hastalarında toksik seviyede bakır birikimi meydana gelir (Cox ve Moore 2002). Wilson hastalığı olan bireylerde karaciğer nakli ile bakır metabolizmasının kısa sürede normale döndürülmesi sonucu karaciğerin, bakırın atılım mekanizmalarının gerçekleşme yeri olduğu ve bakır dengesini düzenlediği sonucuna varılmıştır (Gollan ve Gollan 1998).

Akut bakır zehirlenmesi seyrek olarak gözlenir. Genelde yiyecek ve içeceklerle kazayla bakır ihtiva eden maddelerin karışmasıyla, yiyecek ve içeceklerin bakır içeren kaplarda saklanması ile ya da bakır tuzlarının yutulması ile zehirlenme gerçekleşir. Akut bakır zehirlenmesinde tükürük salgısı artışı görülür. Sindirim sistemi mukozasının tahriş olmasından dolayı mide ağrıları, kusma, bulantı ve ishal gibi belirtiler görülür. Yüksek miktarda emilen bakır, beyin ve karaciğerde depolanarak önemli zararlara neden olabilir. Ayrıca alınan doza bağlı olarak koma ve ölüm de görülebilir (Kartal 2004, Sağlık Bakanlığı 2007).

RDA (Recommended Dietary Allowance)'nın belirlediği günlük bakır alımı 0,9 mg; üst sınır ise 10 mg'dır. Gebelik dönemindeki kadınların günlük bakır ihtiyacı ise 1,3 mg olarak belirlenmiştir. WHO (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından belirlenen içme suyunda izin verilen bakır miktarı 2 mg/l'dir. Ancak içme suyunun sertliği ve pH'sı da sudaki bakırın absorpsiyonunda etkili olduğundan bu sınır bazı Avrupa ülkelerinde 1 mg/l'ye indirilmiştir (Pizarro ve ark 1999, WHO 2005).

Su kaynaklı alınan bakırın besin kaynaklı alınan bakırdan daha toksik olduğu bildirilmiştir. Bakır, hücre membranlarından  $Cu^{+2}$  veya  $Cu^{+}$  iyonu şeklinde geçmektedir ve bu yüklü iyonlar membran potansiyelindeki değişikliklerden etkilenmektedir. Yüksek derişimlerdeki bakır, balıklar için toksik özellik göstermekte ve besin alımında azalma, iyon kaybı, büyümede gerilik, solunum hasarı, solungaç ve böbrek dokularında histolojik değişiklikler ve ölüme neden olabilmektedir (Mc Geer ve ark 2000, Handy ve ark 2002). Ayrıca sucul organizmalarda  $Na^{+}$  dengesinde bozukluklara ve indirgenmiş plazma osmolaritesi ile düşük  $Na^{+}$  ve  $Cl$  derişimlerine neden olması da bu metalin osmoregülatör olarak kabul edilmesine yol açmıştır (Stagg ve Shuttleworth 1982). Bu etkinin genellikle bakır birikimine bağlı solungaçlardaki yapısal ve fonksiyonel hasarla ilişkili olduğu kabul edilmektedir (Li ve ark 1998). Atlı ve Canlı (2007), bakıra maruz kalan *O. niloticus* 'un solungaçdaki  $Na^{+}/K^{+}$  ATPaz aktivitesini önemli ölçüde inhibe ettiğini, alkalin fosfataz aktivitesini ise arttırdığını bildirmişlerdir.

### 1.2.2. Çinko (Zn)

Çinko periyodik cetvelde 2 B grubunda yer alan, 65 g/mol atom ağırlığına sahip bir geçiş metalidir. Bileşik halinde bulunmayan çinko, mavimsi-beyaz renkte ve parlaktır. Çinkonun 2 elektron verme eğilimi sulu çözeltilerinde +2 katyonu formunda bulunmasına sebep olur. Çinkonun diğer bir önemli kimyasal özelliği ise azot, oksijen ve sülfür gibi elektronegatif ligandlar ile koordine bağlar kurabilmesidir (Bettger ve O'Dell 1981).

Çinko endüstriyel bir ürün olarak kullanılması sebebiyle doğada, özellikle de sanayi atıklarının aşırı olduğu yerlerde yaygın olarak bulunur. Çinko bu bölgelerden yeraltı sularına ve içme sularına karışır (Bunker ve ark 1984, Thomas ve ark 1988). Ayrıca metal kaplarda saklanan içeceklerin yapısında da çinko bulunmaktadır. Havadaki çinko seviyesi ise oldukça düşük ve kararlı olup, genellikle oranı  $2 \mu g/m^3$ 'ü geçmez (WHO 2005). Çinko çoğunlukla gıdalarla vücuda alınır. Gıdalardaki çinko seviyesi, pişirme esnasında farklı gıda maddeleri ile etkileşim sonucunda değişiklik gösterebilmektedir (Bunker ve ark 1984,

Thomas ve ark 1988). Besin yoluyla alınan çinkonun önemi, ilk olarak hayvan deneyleri ile gösterilmiştir (O'Dell ve Savage 1960, Oberleas ve ark 1962). Vücuttaki çinkonun dağılımı, besin yolu ile alınan çinko seviyesine ve kalitesine bağlıdır (Bunker ve ark 1984, Thomas ve ark 1988).

Yetişkin bir bireyde günlük çinko alımı yaklaşık 10 mg'dır. En yüksek yoğunlukta et, balık, midye gibi hayvansal gıdalarda bulunur ve biyoyararlılığı daha fazladır. Bitkisel besinlerde ve hububatta (mısır, mercimek, buğday gibi) çinko seviyesi yüksek olsa da fosfat bileşikleri, fitat ve oksalatlar çinkoyu bağlayarak absorpsiyonu olumsuz yönde etkiler. Genelde tahıla dayalı beslenen ve hayvansal besinlerini az tüketen bireylerde çinko eksikliği sağlık problemlerine neden olabilir (Berg ve Shi 1996).

Çinko, protein sentezi, nükleik asit metabolizması, hücre bölünmesi, hücre gelişimi gibi biyolojik fonksiyonlarda ve hücresel bütünlüğünün sağlanmasında kritik rol üstlenir. Çinko, proteinlerin yapısal elementi olduğundan ve DNA sentezi ile hücre bölünmesine katıldığından hücre gelişimini doğrudan etkilerken dolaylı olarak da büyüme hormonu fonksiyonlarını ve büyüme faktörlerini düzenleyerek etki gösterir (MacDonald 2000). Aynı zamanda birçok protein ve enzim için katalitik veya yapısal role sahiptir (Maret 2005).

Çinko yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarında inert bir molekül olmasına rağmen, önemli antioksidan özellikler taşır (Stehbens 2003, Prasad ve ark 2004). En önemli antioksidan özelliği; protein sülfidril gruplarını oksidatif hasardan korumak ve bakır, demir gibi redoks reaksiyonlarına katılan geçiş metallerinin korunmasını sağlamaktır (Powell 2000, Prasad ve ark 2004). Metalloprotein sentezinin uyarılması ve Cu/Zn-SOD enziminin stabilizasyonu, çinkonun uzun süreli antioksidan etkilileri arasındadır (Andrews 2001). Çinkonun gösterdiği diğer antioksidan etkiler arasında hücre zarı yapısının stabilizasyonu, hücre proliferasyonunun uyarılması ve apoptozise karşı koruma yer almaktadır. NADPH oksidaz enzimi plazma membranına bağlıdır ve NADPH'ı elektron verici olarak kullanarak, oksijenden süperoksit ( $O_2^-$ ) üretimini katalizler. Çinko, NADPH oksidazın inhibisyonuna sebep olarak da antioksidan etkileri gösterir (Prasad ve ark 2004). Çinko aynı zamanda gelişim kofaktörü ve önemli bir bağışıklık düzenleyicidir. Hücre koruyucu ve anti-inflamatuvar görevleri olan antiapoptotik bir metaldir (Zalewski ve ark 2005).

Aminoasitler, yağ asitleri ve glikoz intestinal kanaldan çinko emilimini kolaylaştıran maddelerdir. Demir ve bakır, çinko ile yarışan metallerdir. Çinkonun demir

metabolizması ile etkileşimi, yalnızca çinkonun toksik dozlarında gerçekleşmektedir. Toksik dozlardaki çinko karaciğerin demir seviyesini düşürmektedir (Halsted ve ark 1997). Çinkonun büyük kısmı duodenumdan (% 60) olmak üzere ince bağırsak boyunca emilir (Saner ve ark 1990, Halsted ve ark 1997).

Çinko, karaciğerin metabolizmasında önemli bir rol oynar (Krebs ve Hambidge 2001). Serum çinko seviyesi tüm vücuttaki çinkonun küçük bir yüzdesini (% 0,1) yansıtır. Büyük kısım kas, kemik, karaciğer ve böbrek dokusunda toplanmıştır (King 2001). Vücuda alınan çinkonun % 70'i feçes ile atılır. İdrar ve ter ile de bir miktar çinko atılımı gerçekleşmektedir. Sıcak iklimlerde ter yoluyla atılım daha fazla olabilir (Saner ve ark 1990). İdrardaki çinko düzeyi aynı zamanda kas katabolizmasının bir göstergesidir (Spencer 1996, Halsted ve ark 1997). Gıdalar ile alınan çinko miktarı azaldığında saç, cilt ve iskelet kaslarındaki çinko düzeyi değişmezken; plazma, karaciğer ve testislerdeki çinko düzeyi düşer. Çinko havuzları hızlı, yavaş ve çok yavaş olmak üzere 3 farklı düzeyde çinko değişimi yapar (King ve ark 2000). Karaciğer, hızlı çinko değişimi yapabilen bir dokudur (Krebs ve Hambidge 2001). Çinko havuzu plazma ve karaciğerdir. İnce bağırsaktan absorbe edilen çinko portal dolaşıma katılarak karaciğere ulaşır (Halsted 1997). Karaciğerdeki küçük çinko havuzu, Zn eksikliği durumlarında özel rezerv rolünü üstlenir. Çinko karaciğerden vücuda dağılırken glukokortikoidler, bakteriyel endotoksinler ve sitokinler, plazma çinko düzeyini aşağı çeker. Çinkonun intraselüler metabolizması, çinko alımında ve taşınmasında gerekli olan proteinler yardımıyla düzenlenir. Çinko, metalloproteinin gibi metalloproteinlere bağlanması sonucunda intraselüler bölmelere dağılır. Deri ve saçta bulunan çinko sistemik metabolizmaya hiçbir zaman katılmazken, kas ve kemikteki çinko doku katabolizmasının arttığı durumlarda sistemik metabolizmaya katılabilir (Maret 2003).

Çinko homeostazında; bakır, selenyum ve demir gibi iz elementler etkilidir. Serbest bakır fazlasıyla toksik olduğu için proteinlere bağlanır (Shim ve Leah Haris 2003). Bakır, albümin, serüloplazmin, Cu/Zn-SOD ve metalloproteinin benzeri proteinlerle etkileşim halindedir (Thiele 2003, Shim ve Leah Haris 2003). Çinko, bakır absorpsiyonunu engeller ve bağlanma bölgelerinde bakır ile yarışır. Bunun yanı sıra, kalsiyumun detoksifikasyonunda da rol oynar (Hatano ve ark 2000).

Aşırı çinko alımına bağlı zehirlenmeler yaygın değildir. Çinko metali ve birçok bileşiği diğer ağır metallerle karşılaştırıldığında düşük zehirlilik etkisi gösterirler. Çinko tuzlarının toksikliği çinkodan ziyade yapısında bulunduğu bileşiğin anyonik kısmının

toksiklik özelliğine bağlıdır. Örneğin; çinko kromatın ( $ZnCrO_4$ ) yüksek zehirleyici ve kanserojen özelliği  $Zn^{+2}$  yüzünden değil anyonik  $CrO_4-2$  bileşeni sebebiyledir (Vural 1993, Kartal 2004).

Balıkta letal çinko düzeyleri yapılan çalışmalara göre çeşitlilik göstermekle birlikte, bu çeşitliliğin suyun sertliğinin bir fonksiyonu olarak gözlemlendiği belirtilmiştir (Akahori ve ark 1999). Birçok organizma için gerekli bir element olan çinkonun, subletal derişimlerinde balıkta büyümeyi inhibe ettiği, yüzme hareketlerini, davranış ve kan kimyasını değiştirdiği ve doğurganlık ile osmoregülatör kapasiteyi bozduğu bildirilmiştir. Çinkonun, kadmiyum gibi kalsiyum ile yarıştığı belirtilmiştir. Bu durumun da hipokalsemi ve balık ölümlerine neden olduğu gösterilmiştir (Rogers ve ark 2003).

Çinko maruziyetinde, *Tilapia zilli* 'de serum asit fosfataz ve karaciğer alkale fosfataz düzeylerinde azalma görüldüğü belirtilmiştir (Heath 1995). Artan çinko derişiminin *Cyprinus carpio* ' nun eritrositlerinde katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerinde azalmaya, hücre içi glukoz düzeyinde önemli değişikliklere neden olduğu ve ayrıca kırmızı kan hücrelerinde taşıma sistemlerini ve dolayısıyla membran geçirgenliğini artırarak hemolizlerine neden olduğu belirtilmiştir (Akahori ve ark 1999).

### **1.2.3. Kadmiyum (Cd)**

Kadmiyum periyodik cetvelde 2 B grubunda yer alan, 112,4 g/mol atom ağırlığına sahip bir geçiş elementidir. (Elinder 1985, Larc 1993). Saf kadmiyum yumuşak, gümüş beyazı renkte bir metaldir. Kadmiyum, çevrede genellikle saf metal olarak bulunmak yerine, kadmiyumoksit ( $CdO$ ), kadmiyumklorür ( $CdCl_2$ ), kadmiyumsülfat ( $CdSO_4$ ), kadmiyumsülfid ( $Cd(SO_3)_2$ ) gibi oksijen, klor veya sülfür bileşikleri halinde bulunur. Kadmiyum, 10-30 yıl arasında değişen uzun yarılanma ömrü ve vücuttaki tüm organlara dağılması nedeniyle toksisitesi yüksek olan bir elementtir (Jarup ve ark 1998).

Kadmiyumun endüstriyel alandaki kullanımı beş kategoride toplanabilir, en fazla nikel-kadmiyum pillerinin ve aktif elektrot maddelerinin yapımında, plastik, seramik ve cam pigmentlerinde, polivinilklorürün (PVC) ısı ve ısıya karşı dayanıklılaştırılmasında, çelik ve bazı demir içermeyen metallerin kaplanmasında, çeşitli alaşımlarda kullanılmaktadır (Elinder 1985, Thornton 1992, Larc 1993, USGS 1997).

Kadmiyum, lağım atığından toprağa geçtiği gibi, gübrelerle birlikte toprağa ve bitkilere geçmektedir (Jarup ve ark 1998, Wittman ve Hu 2002). Çevresel kadmiyumun temel kaynağı; tahıl ürünleri ve sebzeler gibi lifli besinlerdir. Tarımda kullanılan çinko-

sülfat içerikli gübrelerde de kadmiyum kontaminasyonları tespit edilmektedir (Satarug ve ark 2003). Topraktaki kadmiyumun vücuda girişi yeşil yapraklı sebzeler, meyveler ve patates tüketimi ile olmaktadır (Satarug ve Moore 2004). İnsanda yan etki ve kanser riski oluşturmayacak kadmiyum düzeyi 0,2 µg/kg/gün olarak belirlenmiştir (Nordberg ve ark 1985, WHO 1985).

Kadmiyum öncelikle plazmada albümine bağlanır, sonra metalotiyonine bağlanarak karaciğere girer ve kan dolaşımına katılır. Metalotiyonine bağlanmış kadmiyum renal glomerüller tarafından süzülür ve proksimal tübül hücreleri tarafından yeniden absorbe edilir (Foulkes 1980). Aynı zamanda kemik, pankreas, böbreküstü bezleri ve plasentada akümüle olur. Vücutta biriken kadmiyumun % 50'si karaciğer ve böbrekte toplanır (Pope ve Rall 1995). Kadmiyumun neden olduğu başlıca patolojiler renal hasar ve kemik kaybıdır. Böbrekteki kadmiyum konsantrasyonundaki artış osteoporozu da beraberinde getirir (Jarup ve ark 1998).

Vücuda alınan toplam kadmiyumun % 10-50'si solunum yoluyla, % 5'i sindirim yoluyla olmaktadır. Kadmiyum ve tuzlarının uçuculukları az olduğundan havada asılı ince parçacıklar halinde bulunurlar. Bu parçacıkların bir kısmı solunum yolları ve akciğerlerde tutulur, inhalasyon yoluyla vücuda alınır ve solunum havasıyla dışarı verilir. Küçük parçacıklar alveollere nüfuz etme eğilimindeyken, büyük parçacıklar (çapı 10 pm'den büyük olanlar) üst solunum yollarında birikme eğilimindedir (Jarup ve ark 1998). Bağırsaklarda kadmiyum absorpsiyonu normal koşullarda düşüktür. Ancak diyet ile vücuda alınan kalsiyum, protein, çinko, demir ve bakır miktarı azaldıkça kadmiyumun bağırsaklardan emilimi artar (Fox 1988). Örneğin, normalde % 5 olan bağırsak absorpsiyonu demir eksikliği nedeniyle % 20'lere kadar çıkabilir (Nordberg ve ark 1985). Serum ferritin düzeyi 12 µg/l'den az olan bireylerde kadmiyumun indüklediği böbrek lezyon riski daha fazladır (Jarup ve ark 1998).

Kadmiyumun toksisite mekanizması tam olarak anlaşılmamakla birlikte, bazı hücrel etkiler ortaya konmuştur. Kadmiyum maruziyetine uğramış toplumların % 50-60'lık kesiminde kromozomal hasar olduğu gösterilmiştir (Fowler 1978). Vücutta bulunan düşük düzeylerdeki kadmiyumun hücrel solunumu % 75 oranında, oksidatif fosforilasyonu ise neredeyse tamamen inhibe ettiği bildirilmiştir (Nordberg ve ark 1985). Kadmiyum toksikokinetiğinin en önemli özelliklerinden biri molekül başına yedi kadmiyum atomu bağlayabilen metalotiyoninlerle etkileşimidir. Çoğu dokudaki metalotiyonin sentezi, kadmiyum, çinko ve diğer metallere maruziyetle ve beslenme

eksikliği, egzersiz, hipotermi ve inflamasyon gibi stres faktörleriyle indüklenir (Waalkes ve Goering 1990).

Gıdalarla yüksek düzeylerde kadmiyum alınması akut toksikasyona neden olur. Kronik kadmiyum maruziyeti sonucu oluşan doku hasarında oksidatif stres ve tiyol tüketiminin de etkisi vardır. Kadmiyum dokulardaki sülfidril gruplarına bağlanarak, lipid peroksidasyona ve glutasyon tüketimine neden olur. Bunun sonucunda da hücrel hasar oluşur (Ercal ve ark 2001). Kadmiyum glutatyona yüksek afinite duyar ve safra ile elimine olabilen glutasyon kompleksleri oluşturur. Kadmiyum aynı zamanda katalaz, mangan süperoksit dismutaz ve bakır çinko süperoksit dismutaz (Cu/Zn-SOD) gibi antioksidan enzimleri de inhibe eder (Casalino ve ark 2002).

Kadmiyumun serbest radikal üretebilme kapasitesi nedeniyle inflamasyon, nükleik asit oksidasyonu ve DNA onarım mekanizmalarında değişiklikler meydana gelir. DNA onarım mekanizmalarının bozulması sonucu hücre ölümü gerçekleşir. Kadmiyumun indüklediği kanser olgularında mutajenik değişiklikler meydana gelmektedir (Fowler 1978, Dong ve ark 1998).

Sucul organizmalar için esansiyel olmayan kadmiyum, devam eden antropojenik ve endüstriyel aktivitelere bağlı olarak doğal ortamda düzeyleri gitikçe artan, oldukça toksik bir elementtir. Tatlı sularda, kadmiyum 0.1 µg/l'den küçük derişimlerinde bulunurken, insan kaynaklı atıkların karışabildiği su ortamlarında ise bu değer birkaç µg/l veya daha yüksek düzeylere çıkabilmektedir (USEPA 2001, Garcia Santos ve ark 2006).

Parçalanamayan bir kirletici olan kadmiyumun yüzyıllardır trofik düzeylerini değiştirdiği ve özellikle tatlı su balıklarına yüksek toksisite gösterdiği belirtilmiştir (Waalkes ve Goering 1990). WHO (2005) tarafından verilen bilgilere göre tatlı su organizmaları üzerinde geniş çaplı ekolojik ve fizyolojik etkilere sahiptir. Kısa süreli kadmiyum maruziyeti sonrasında sucul canlılarda hemotolojik etkiler, kadmiyum homeostazisinde bozulmalar, iyonların düzenlenmesinde görev alan böbrek, solungaç ve bağırsak dokularında histolojik ve morfolojik değişiklikler, hücre dışı sıvılarda iyon derişiminde değişiklikler ve osmoregülatör kapasitede derişimler gözlenebilmektedir. Ayrıca kadmiyum maruziyetinin karaciğer, beyin, sinir sistemi, böbrek, dalak ve kemikte patolojik lezyonlara neden olduğu bilinmektedir (Garcia Santos ve ark 2006).

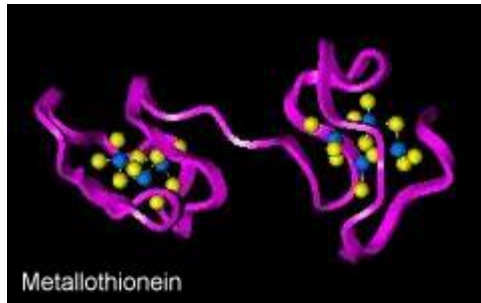
Balıklarda kadmiyum maruziyeti sonrasında büyümede gerilik, solungaçlarda kadmiyum alımında inhibisyon ve karaciğer fonksiyonlarında değişiklik

gözlenebilmektedir. Balıklar önemli bir besin kaynağı ve ekosistem bileşeni olduğundan, kadmiyumun balıklardaki biyokimyasal ve fizyolojik etkilerin değerlendirilmesi önemlidir (Almeida ve ark 2002). Kadmiyum balıkta yavaş bir şekilde birikim göstermekle birlikte, böbrek ve karaciğer en önemli hedef organlardır. Kadmiyum balıkta çeşitli enzim sistemlerini etkileyerek, bağışıklık sistemi, nörotransmisyon, transepitelyal taşınma, oksidazlar gibi temel mekanizmaları bozabilmektedir. Bu tür etkiler kadmiyumun kısa süreli maruziyetlerinde önemli olduğundan, enzimler kadmiyum toksisitesinde güvenilir belirteçler olarak kullanılabilir. Ayrıca, iyon taşınmasında görev alan enzimleri inhibe ederek solungaçlarda iyon geçirgenliğinde artışa neden olmaktadır (Silvestre ve ark, 2005).

Hipokalseminin, su veya besin yoluyla kadmiyum maruziyeti sonrasında balıkta kadmiyum toksisitesinin temel mekanizması olduğu bildirilmiştir (Foulkes 1980, George 1991). Kadmiyumun düşük ve yüksek konsantrasyonlarda çeşitli balık türlerinde anemiye neden olduğu belirtilmiştir (Heath 1995). Sucul ortamlarda kadmiyum düzeylerinin belirlenmesi ve kadmiyumun zararlı etkilerinin saptanmasında yeni yöntemlerin geliştirilmesi oldukça önem kazanmaktadır (Almeida ve ark 2001).

### 1.3. Metalloproteinler

Metalloproteinler (MT), sülfürden zengin, asidik pH'da metal bağlama yetenekleri artabilen, enzimatik olmayan, Zn, Cu ve Cd gibi geçiş metallerine affiniteli, hücre içi metal şelatlayıcılardır. Küçük molekül ağırlıklı (6000-7000 Da), sisteince zengin proteinlerdir. Özellikle Zn bağlayıcısı olarak bilinirler. Spektroskopisinde tetrahedral-tiyolat kompleksleri ve metal-tiyolat gruplarından oluşmuşlardır (Şekil 1.3.) (Kagi ve ark 1974).



Şekil 1.3. Metalloprotein (Coyle ve ark 2002).



Metallotiyoninler (MT) ilk defa 1957’de at böbreğinde “kadmiyum bağlayıcı protein” olarak tanımlanmıştır (Margoshes ve Vallee 1957). Sonradan Kagi ve ark (1974) ile Vallee (1995) tarafından saflaştırılarak karakterize edilmiştir. MT’lerin hayvanlarda, bitkilerde, bakterilerde ve mantarlarda değişik formları mevcuttur. Günümüzde MT’lerin biyokimyasal ve moleküler özellikleri ile vücuttaki birikimi hakkında birçok bilgi bulunmaktadır. Ancak keşfinden bu yana uzun yıllar geçmiş olmasına rağmen, biyolojik yönü hala tam olarak bilinmemektedir (Miles ve ark 2000). Genellikle yüksek metal bağlama ve redoks yapma yeteneklerine sahiptirler. Bu proteinlerin yaşamsal rolü, toksik metallerle iz elementleri bağlamasıdır. Çinkodan yoksun beslenmelerde, enfeksiyonlarda, yangıda, toksik metal alımında ve stres durumlarında, Cu ve Zn gibi iz element homeostazisinde ve Cd, Hg gibi ağır metallerin detoksifikasyonunda MT’lerin önemli rolleri olduğu belirlenmiştir (Coyle ve ark 2002).

### **1.3.1. Metallotiyoninin Temel Fonksiyonları**

Metallotiyoninler, metal iyonlarını diğer proteinlere transfer ederek metallo şaperon olarak davranırlar. Esansiyel iz elementlerden çinko ve bakırın serbest iyon derişimini kontrol ederler. Depo ve stok görevleri vardır. Ağır metallerin detoksifikasyon ajanı olarak hareket ederler. Serbest radikal süpürücüsüdürler (Swiergosz 2001).

Bakır, molibden, çinko gibi esansiyel metaller ile kadmiyum, civa, kurşun gibi esansiyel olmayan elementlerin organ, doku ve hücrelerde aşırı miktarda birikmesi toksikasyona sebep olmaktadır. Bu toksikasyonun önlenmesinde, translokasyon ve transkripsiyon aşamalarında MT’ler devreye girmektedir (Dameron 1998). Bunun sonucu olarak da Zn ve Cu regüle edilmekte, Cd, Hg ve Pb gibi ağır metaller zararsız hale getirilmektedir (Brüwer ve ark 2001). Çinko canlılar için esansiyel olan iz elementlerin başında gelir. Protein sentezi, karbonhidrat ve enerji metabolizması, DNA ve RNA sentezi gibi önemli fonksiyonlara katılan çinko; birçok enzimin, metallotiyoninlerin ve bazı hormonların biyolojik fonksiyonları için esansiyel niteliktedir. Özellikle Cd gibi ağır metallerin toksik etkilerine karşı engelleyici etkileri bulunan çinko, metallotiyoninler için de primer indükleyici bir elementtir (Horky ve ark 2002).

Hızlı üreyen hücrelerin hem çekirdeklerinde, hem de sitoplazmasında MT artışı olmaktadır. MT’lerin çekirdekte artmasının sebebi henüz bilinmemekle birlikte oksidatif zararlardan DNA’yı koruyabilecek ya da bağlayacağı Zn molekülleriyle transkripsiyon faktörlerini ve kritik öneme sahip enzimleri regüle edebileceği

bildirilmektedir (Coyle ve ark 2002). MT'lerin hücre proliferasyonunu kolaylaştırdığı, göğüs kanserlerinde arttığı ve apoptozisin kontrolünde de görev aldığı bildirilmektedir (Bay ve ark 2006). Lösemili çocukların periferal kanında, insanlarda karaciğer tümörlerinde ve laringeal hiperplastik lezyonlarda MT miktarının artışı apoptotik hücrelerde azalmaya neden olurken, MT miktarının azalmasıyla hücrelerdeki apoptozisin artışı arasında bir doğru orantının bulunduğu bildirilmektedir (Coyle ve ark 2002). Enfeksiyonlarda, yaralanmalarda ve yangısal olaylarda uyarılan MT'ler sitokrom C aracılığıyla caspas 3 aktivasyonunu inhibe ederek apoptozisi azaltmaktadır (Beyersmann 2002). Farelerde CCl<sub>4</sub>, parasetamol, kemoterapi, UV ışınların zararlarına karşı MT'nin antioksidan özelliğe sahip olduğu (Ebert ve ark 2000), bu protein artışının göğüs kanserinin prognostik teşhisinde önemli kriterlerden olduğu da bildirilmektedir (Bay ve ark 2006). MT sentezini uyaran metaller organlarda farklı reaksiyonlar oluşturmaktadır. Kadmiyum karaciğerde; çinko ise pankreasta MT sentezinin artmasına neden olmaktadır. İnterleukinler, hidrojen peroksit, glukokortikoidler, glukagon, kateşolaminler, TNF- $\alpha$ , gamma interferonlar ve yangısal faktörler MT sentezinin artmasında direkt etkili olurken Fe ve dekstran türevleri etkilerini indirekt olarak gösterirler (Sato ve Kondoh 2002).

Metallotiyoninin ve glutatyon, toksik etkili ağır metalleri bağlayarak, enzim gibi molekül ağırlığı yüksek bileşiklere bağlanmasını engelleyen, toksisiteyi düşürücü, molekül ağırlığı düşük proteinlerdir. Yılan balığının (*Anguilla anguilla*) karaciğer hücrelerindeki bakır birikiminin MT gen transkripsiyonunu arttırdığı belirlenmiştir (Mocchegiani ve ark 1997).

MT'lerin ana fonksiyonunun; esansiyel metallerin homeostazisini sağlamak, I ve II grup ağır metallerin detoksifikasyonunda rol alarak hücreleri ve organları metallerin toksik etkilerinden korumak (Webb 1987, Tomita 2000), yüksek oranda tiyol içeriğinden dolayı serbest radikal süpürücüsü olarak görev almak olduğu bilinmektedir (Sanz ve ark 2003). Ayrıca, hücre yenilenmesi, karsinojenik ve apoptotik mekanizmalarda da rol aldıklarını düşündüren veriler bulunmaktadır (Bay ve ark 2006). Metallotiyoninlerin sentezi glukokortikoidler, sitokinler, interferon, tümör nekroz faktörü ve vitamin D<sub>3</sub> gibi endojen faktörler yanında (Minami ve ark 2002) inflamatuvar etkenler tarafından da indüklenebilmektedir. İdrarda metallotiyonin düzeyinin artması metal maruziyetinin göstergesi olarak düşünülür. Ancak metallotiyoninlerin karsinojenik prosese katılmaları nedeniyle tümörlerin gelişmesi veya hücre proliferasyonu ile ilgili biyogösterge olarak kullanılabilme olasılıkları ise tartışılmakta olan bir konudur (Mitropoulos ve ark 2005).

MT'ler türler arasında oldukça benzer sekans yapısına sahiptir. MT'ler çoğunluğu lisin, serin ve arjinin olmak üzere 20 sistein rezidüsünden oluşmuş olup bu rezidülerin metal bağlamakta rolleri olduğu düşünülmektedir. Lisinler, MT'lerin detoksifikasyonda ve proteinin konformasyonel bütünlüğünün sağlanmasında aktivite gösterirler. Serinlerin ise metal bağlayıcı ligandların stabilitesinde rolleri olduğu düşünülmektedir (Emoto ve ark 1996).

### **1.3.2. Metalloitiyoninin Çeşitleri**

Metalloitiyoninler, MT-1, MT-2, MT-3 ve MT-4 olmak üzere dört çeşitten oluşmaktadır. MT-1 ve MT-2'ler hemen hemen her dokuda bulunmaktadır (Dameron 1998). Mekanizmalarının depolama, kataliz, detoksifikasyon ve immün sistemin regülasyonu olduğu düşünülmektedir (Webb 1987). MT'lerin memelilerde 15 farklı tipi bulunmaktadır. Bu farklılık sistein moleküllerinin biyokimyasal yerleşimine bağlı olarak oluşur ve her bir tip MT değişik metalleri bağlama yeteneğine sahiptir. MT'lerin 18 farklı metale karşı affiniteleri olmakla birlikte Cu, Cd, Zn, Pb, Ag'u daha fazla bağlayabilmektedirler (Coyle ve ark 2002).

MT'ler 4 divalanan metal bağlayabilen (C terminal) zincirler ile 3 divalanan metal bağlayan (N-terminal) zincirlere sahiptir (Pauwels ve ark 1994). Zincirler Cd, Zn ve Cu gibi elementleri daha hızlı bağlayabilirken daha yavaş olarak diğer elementlerin bağlanmalarında da görev almaktadırlar (Bay ve ark 2006, El Ghazi ve ark 2006).

Metalloitiyoninler vücutta pankreas, bağırsak, böbrek ve karaciğerde çok yoğun olarak bulunmaktadır. Pankreastaki MT miktarı % 100 kabul edildiğinde karaciğer, ince bağırsak ve böbreklerde sırasıyla % 42, % 30 ve % 16 oranlarında bulunmaktadır (Swiergosz 2001). Genel olarak MT'lerin fizikokimyasal özellikleri aynı olmakla birlikte biyolojik fonksiyonları farklılık göstermektedir. MT-1 metallerin detoksifikasyonunda etkili iken, MT-2 daha çok hücre metabolizması üzerinde etkilidir. MT-1 ve MT-2 en çok pankreas, karaciğer, bağırsak ve böbreklerde olmak üzere vücutta birçok organda geniş dağılım göstermektedir. MT-1'in MT-2'ye göre birçok organda daha fazla bulunduğu da bildirilmektedir (Nishimura ve ark 2000). Başlıca beyinde yer alan ve sinir sistemi için özelleşmiş olan MT-3; testis, prostat, epididimis, dil, ovaryum, mide ve kalp gibi dokularda az da olsa bulunmaktadır. MT-3; MT-1 ve MT-2'den 7 aminoasit daha fazladır, ancak ağır metallerle karşı bağlanma hızı daha yavaştır. MT-4; dil ve deri gibi organlarda, çok katlı yassı epitelin stratum korneum katmanında ve maternal decidualarda

bulunmaktadır (Coyle ve ark 2002). MT-3'ün beyin dokusunda büyüme önleyici faktör (GIF) olarak adlandırıldığı ve bu proteinin nöronal bozukluklarda (Alzheimer hastalığı gibi) % 30 azalarak nöronal büyümeyi inhibe ettiği bildirilmektedir (Davis ve Cousins 2000).

### **1.3.3. Metalloproteinlerin Bazı Organlardaki Görevleri**

#### **1.3.3.1. Karaciğerde metalloproteinler**

Ağır metalleri ve iz elementleri detoksifiye eden karaciğer, MT'lerin en fazla bulunduğu organlardan biridir. Karaciğerin savunma sisteminde antioksidanlar, glutatyonlar ve tokoferoller rol oynamaktadır. MT'ler karaciğer epitel hücrelerinin korunmasında önemli bir rol oynar (Vallee 1995).

Karaciğerdeki MT sentezi metallerin sayısı ile ilişkili olduğu kadar stres, hormon ve sitokinlerin oranına da bağlıdır (Zhou ve ark 2002). MT oranlarının değişmesiyle karaciğerdeki karbonhidrat metabolizması da değişmektedir. Glukagon, IL-1, cAMP ve kemik iliği, plazma ve çinko düzeyinin artması, karaciğer MT miktarının artmasına neden olmaktadır. Karaciğerde kadmiyuma bağlı olarak interlobuler ven ve portal ven etrafında MT sentezinin arttığı da bildirilmektedir (Solis ve ark 2000). Hepatik MT'ler değişik türlerde farklı oranlardadır. İnsan, keçi, köpek, kedi ve domuzlarda 400-700 µg/g; maymun, sığır ve koyunda 200 µg/g; tavşan ve rodentlerde 2-10 µg/g civarında MT bulunmaktadır. MT'ler prooksidan-antioksidan oranındaki değişiklikler sonucu ortaya çıkan oksidanların etkilerini ortadan kaldırarak lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve oksidatif stres sonucu ortaya çıkacak fonksiyon bozukluklarını inhibe etmektedir (Vallee 1995). Karaciğerde biriken bakır bütün lizozomal enzimleri inhibe ederek, karaciğerdeki bakır oranının yükselmesine ve Wilson hastalığının ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Hahn ve ark 2001).

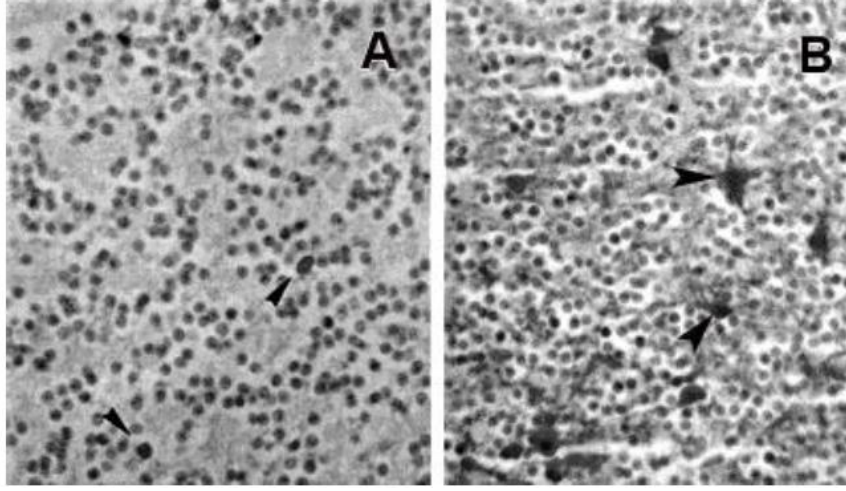
#### **1.3.3.2. Pankreasta metalloproteinler**

Pankreas ve safra salgılarında çok miktarda MT bulunmaktadır. Ekzokrin ve endokrin pankreasta üretilen metalloproteinler çinkoya bağlı halde bulunurlar (Nishimura ve ark 2000). Pankreastaki beta hücrelerinin çok miktarda çinko içermesi insülin hormonunun salgılanmasını, biyosentezinin gerçekleşmesini ve depolanmasını sağlamaktadır. Aşırı çinko alımında pankreas adacıklarında MT üretimi artarak beta hücrelerindeki fonksiyon bozukluklarının engellenmesi sağlanmaktadır (Kim ve ark 2000).

Fazla çinko alımında metalloiyonlar çinkonun toksik etkilerine karşı pankreası koruyabilmektedir. Ancak normalde nöronlarda bulunan MT-3'lerin pankreasta artması durumunda pankreatik nekrozis oluşur. Pankreasın endokrin neoplazmalarında, glukonomalarda, insülinomalarda, pankreatik polipeptidomalarda çinko ile metalloiyon arasında bir zincirin olduğu bildirilmektedir (Swiergosz 2001). Genetik olarak diyabete predispose rodentlerde çinko alımlarının ekzokrin ve endokrin pankreasta bulunan MT'leri artırarak hidroksil zararlarına ve dokudaki yaralanmalara karşı koruyucu etki gösterebileceği bildirilmektedir. Çinko viral ve bakteriyel hastalıklar sırasında da beta hücrelerindeki MT'ler ile bir bağ yaparak oksijen serbest radikallerin zararlarına karşı bu hücrelerin korunmasını sağlamaktadır (Tomita 2000).

### **1.3.3.3. Merkezi sinir sisteminde metalloiyonlar**

Merkezi sinir sisteminde bulunan MT'lerin beyin için spesifik formu MT-3'tür. MT-1, MT-2 ve MT-3 merkezi sinir sisteminin genel olarak aynı bölgelerinde bulunmalarına karşı hücrel dağılımları farklılık göstermektedir (Zhou ve ark 2002). MT-1 ve MT-2 hipotalamus, hipokampus ve serebral kortekste, koroid pleksüs epitelinde, piamater ve astrositlerde, ependimal hücrelerde, damarlar etrafında ve periventrikuler alanlarda bulunurlar. Buralara yerleşen metalloiyonlar metallerle karşı bariyer fonksiyonlarını yerine getirmektedir (Horky ve ark 2002). Astrositlerde, nöronlarda ve vasküler endotel hücrelerinde MT konsantrasyonunun artması motor faaliyetlerinin artmasına neden olmaktadır (Hidalgo ve ark 2006). Metalloiyonlar beyinde myelinin önemli koruyucularıdır. Rejeneratif faktör olması nedeniyle anjiyogeneziste ve yaralanmalarda beyin neuro rejenerasyonunda görev almaktadır (Güven 1999). Alzheimer hastalığına neden olan oksijen serbest radikallerin, hidroksil radikallerinin neden olduğu hücre zarında meydana gelen yıkımlar MT'ler tarafından önlenmektedir. Son yıllarda çalışmalarla MT-3'ün bazı merkezi sinir sistemi hastalıklarında arttığı (epilepside ve Alzheimer hastalığında), bazılarında ise azaldığı (down sendromu, parkinson hastalığı) bu nedenle henüz fonksiyonlarının tartışmalı olduğu bildirilmesine rağmen MT-3 beyin dokusunda büyümeyi önleyici faktör (GIF) olarak adlandırılmaktadır. Bu proteinin nöronal bozukluklarda % 30 azalarak nöronal büyümeyi inhibe ettiği (Jin ve ark 2002), MT-1 ve MT-2'nin astrositiozis ve mikroglioziste miktarının arttığı, ancak MT-3'ün herhangi bir değişikliğe uğramadığı da vurgulanmaktadır (şekil 1.4.) (Kim ve ark 2000).



**Şekil 1.4.** Beyin dokusunda MT-1 ve MT-2 (ok başları). A: Kontrol grubu, B: Alzheimer hastalıklı grup (West ve ark 1990).

#### **1.3.4. Metalloproteinlerin Esansiyel Metallerin Homeostazisindeki Rollerini**

MT'lerin, Zn, Cu ve Fe gibi esansiyel metallerin homeostazisinde rollerini olduğu düşünülmektedir. Metalloproteinlerin tüm fonksiyonları tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen, insan ve hayvanlar ile yapılan çalışmalarda beslenme ile çinko alımının MT ekspresyonu ile pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (Fleet ve ark 1988). Zn ve Cu gibi esansiyel metaller MT'ye bağlanmakta, hücre ve dokuların bu metallerle ihtiyaçları olduğunda, MT ile birlikte ihtiyaç duyulan hücrelere giderek serbest bırakılmaktadırlar. Böylelikle metalloproteinler tarafından hem bu metaller arasındaki denge sağlanmış, hem de ihtiyaç duyulan yerlere transfer gerçekleşmiş olur. Metalloproteinler ve Glutasyon S transferazlar (GSH); serbest radikallerinin veya lipid peroksidlerin neden olduğu oksidatif strese karşı hücreyi koruyan, hepatositlerde fazla bulunan ve sülfidril grubunca zengin proteinlerdir. Bu proteinlerin her ikisi de zengin sistein gruplarından dolayı metal bağlama yeteneğindedirler (Horky ve ark 2002).

Çinko-Tiyonin, çinko ve bakır metabolizmasında işlev yapmaktadır. Bu görüş deneysel çalışmalarda desteklenmiştir. Çinko-tiyonin, çinkonun yüksek ortam derişimlerinin etkisinde vücudu çinko toksisitesine karşı korumakta ve çinko için bir kaynak oluşturmaktadır (Jin ve ark 2002).

Bakır-Tiyonin, hücreler yüksek konsantrasyonlarda bakıra maruz kaldıklarında etkin bir antioksidan fonksiyon gösterir. Zn tarafından indüklenen MT hücre içinde bulunan bakırı bağlama kapasitesine sahiptir ve bakırın redoks döngüye girme yolundaki aktivitesini durdurur. Yapılan çalışmalarda bakır-tiyoninin fetusun bakır gereksinimini

karşılmak için bir depo olarak işlev yaptığı belirlenmiştir. Araştırmacılar bakır-tiyoninin kolayca oksitlenip redüklenbildiğini ve bakır-sülfür içerikli bu proteinin mitokondrilerdeki elektron transportunda anahtar rol oynadığını ileri sürmüşlerdir. Maya ile yapılan çalışmalarda bakır-tiyoninin derişimindeki artışın sitokrom C miktarındaki azalmayla aynı anda meydana geldiği belirlenmiştir. Bu bulgulara göre bakır-tiyonin belirli ortam şartlarında sitokrom C oksidazın işlevini üstlendiği sonucu çıkarılabilir (El Ghazi ve ark 2006).

### **1.3.5. Metalloiyoninler ve Metal Detoksifikasyonu**

Metalloiyoninler ağır metal detoksifikasyonunda önemli yere sahiplerdir (Heguy ve ark 1986). Çeşitli metallere maruziyetten sonra, böbrek, karaciğer ve bağırsak gibi organlarda metalloiyonin sentezinin arttığı ve biriktikleri saptanmıştır. Metalloiyoninler doğrudan metal tutucu olduklarından hücreye zarar vermelerini engellemektedirler. Metalloiyoninler ağır metalleri sadece metal bağlama kapasiteleri ile değil aynı zamanda hücreleri oksidatif hasardan koruyarak da detoksifiye ederler (Hidalgo ve ark 2006). MT'lerin metal detoksifikasyonları, maruz kalınan hücrenin tipine, metalin özelliğine ve metalin konsantrasyonuna göre değişmektedir. Yapılan çalışmalarda, düşük miktarlardaki Cd maruziyetinin bile MT ekspresyonunu anlamlı bir şekilde artırdığı gösterilmiştir (Kim ve ark 2000). Genel olarak; kısa dönemli metal maruziyetlerinde yükselen MT sentezi ile metal detoksifiye edilebilmekte ancak uzun süreli kronik maruziyette, Cd-MT formunun karaciğerden böbreklere taşınarak nefrotoksik etkiye neden olduğu düşünülmektedir (Kagi 1991).

Kadmiyum-Tiyonin, metalloiyoninin sentezini de indüklediğinden, dokularda yaşla beraber MT düzeyini arttırmaktadır. Dokularda biriken kadmiyumun büyük bölümü MT tarafından bağlandığı için oluşturabileceği toksisite riski de azalacaktır. Ancak özellikle böbreklerde MT sentez hızını aşan, aşırı miktarda Cd akümülyasyonu sonucunda, renal tübüler disfonksiyonlar ortaya çıkmaktadır. Kadmiyum önce karaciğer tarafından alınır ve burada Glutatyon S transferazlara bağlanarak, safra yolu ile atılımı sağlanır. Ancak ortamda fazla miktarda Cd bulunduğunda glutatyonlar tükenir. Ortamda bulunan Cd, metalloiyoninlere bağlanarak plazmaya geçer ve bir kısmı idrarla atılır, atılmayanlar ise böbrek hücrelerine taşınır. Böbrek lizozomlarında metalloiyoninler parçalanır ve Cd serbest kalarak, yeniden sentezlenmiş olan başka bir metalloiyonine bağlanır. Ancak, serbest kalan Cd'a, hücrelerin MT sentez kapasitesi yetişemediğinde, kadmiyumun toksik

etkisi tölere edilemeyerek, böbreklerde hasara yol açabilmektedir (Park ve ark 2001). Genel olarak, bazal düzeyde metalotiyonin sentezinin metal toksisitesine karşı koruma sağlayabildiği, MT ekspresyonundaki azalmanın kanser için genel bir risk faktörü oluşturabileceği saptanmıştır (Kim ve ark 2000).

### **1.3.6. Metalotiyoninlerin Tespit Yöntemleri**

Metalotiyoninlerin tespitinde bu proteini içeren hücreler belirlenebilir. MT'ler dokularda gümüş doyurma ve Cd-hemoglobin affinite ölçüm metodları ile tespit edilebilmektedir. Ayrıca, iyon değiştirme kromatografisi, yüksek performanslı likid kromatografisi (HPLC), ELISA, kapillar zone elektroforez (CZE), atomik absorpsiyon spektrometre (AAS), kütle spektrometre (MS) ya da UV absorpsiyon yöntemleriyle de tespit edilmektedirler (Güven 1999).

### **1.4. Sucul Ortamlardaki Ağır Metal Kirliliği ve Ağır Metallerin Sucul Canlılarda Birikimi**

Çevre kirliliğini artıran ve ekolojik dengenin bozulmasında önemli rol oynayan endüstri kuruluşlarının başında, atık sularında ağır metal içeren kuruluşlar gelmektedir. Metal kirliliği içeren atık suların başlıca kaynakları arasında, maden işletmeleri, metal endüstrileri ve diğer metal kaplama endüstrileri, kurşun batarya, seramik, matbaacılık, fotoğrafçılık, tekstil, elektrik-elektronik, kimya, boya ve otomotiv endüstrileri bulunmaktadır (Şengül 1991, Sağlam ve Cihangir 1995). İlgili endüstri kuruluşları, üretim süreçleri gereği, çeşitli ağır metalleri kullanmakta ve atıklarında civa, çinko, kobalt, bakır, demir, kurşun, krom, arsenik ve gümüş gibi metal iyonlarını ihtiva etmektedir. Etkili bir arıtım yapılmaması durumunda bu tür atıkların göl, nehir, deniz, okyanus gibi alıcı ortamlara deşarj edilmesi, suda yaşayan ve bu suyu kullanan canlı sistemleri ve çevre için tehlike oluşturmaktadır. Ayrıca, arıtım sistemlerinde parçalanamayan bu metal iyonlarının, çok küçük miktarları bile toksik etki yapmaktadır. Bu durum biyolojik arıtım sürecini olumsuz etkilemektedir (Şengül 1991).

Ağır metaller sularda ayırışamadıklarından veya zor ayırışıklarından organizmaların dokularında büyük konsantrasyonlarda birikir. Emilmeyen ağır metaller ise boşaltım sırasında vücuttan atılır. Boşaltım işlemi bunun için yeterli değilse, toksik ağır metaller karaciğer, böbrek ve değişik organ ve dokularda depolanır (Ağacasulu 2007). Bazı akuatik türler, sabit konsantrasyonlardaki bakır ve çinko gibi esansiyel metallerin seviyelerini düzenleyebilmektedir. Fakat bu düzenleme daha yüksek metal konsantrasyonlarında



bozulmakta ve ağır metal birikimi olmaktadır. Vücuttaki metal düzenlenmesi, metal alım oranına paralel olarak atılım oranındaki artış ile sağlanmaktadır. Kadmiyum ve civa gibi esansiyel olmayan ağır metallerin vücuttaki konsantrasyonları ise genellikle düzenlenememekte ve dolayısıyla birikme sudaki ağır metal konsantrasyonu ile orantılı olmaktadır. Bununla birlikte, bir metalin organizmadaki konsantrasyonu, o organizmanın metali biriktirme oranına bağlıdır (Ünlü ve Gümüş 1993).

Ağır metaller, solungaç, deri ve besin yolu ile sucul canlılara geçer (Bat ve ark 1999). Sudaki ağır metallerin balıklara geçişi özellikle geniş bir yüzey alanına sahip olan solungaçlar aracılığı ile olur (Göksu ve ark 2003). Balıklar, sudaki oksijeni solungaçlarla alırken suda çözülmüş veya askıda bulunan maddeleri de alır. Ağır metaller yiyecekler yolu ile direkt olarak alınabilir (Bat ve ark 1999). Ağız yoluyla vücuda giren toksik maddelerin absorpsiyonunun en fazla olduğu yer ince bağırsaklardır. Sindirim kanalından absorbe olan toksik maddeler, kan dolaşımı ile tüm vücuda dağılır. Deri, toksik maddelerle her zaman temas halindedir. Ancak deri ağır metallerle karşı fazla geçirgen olmadığı için bu yolla zehirlenme çok daha az görülür (Karadede ve Ünlü ve Gümüş 1993). Vücuda alınan metaller taşıyıcı proteinlere bağlı bir şekilde kan yolu ile doku ve organlara taşınmaktadır. Balık vücudundaki ağır metaller, deri, solungaçlar ve boşaltım yoluyla atılabilir, belirli bir limitin üzerindeki maruziyetlerde ise bazı dokularda depolanırlar. Dokulardaki metal bağlayıcı proteinlere bağlanarak buralarda yüksek derişimlere ulaşırlar (Karadede ve Ünlü ve Gümüş 1993). Çizelge 1.2.'de su ve balıklarda kabul edilebilir ağır metal konsantrasyonları verilmiştir.

**Çizelge 1.2.** Sucul ortamda ve balık dokularında bazı ağır metallerin kabul edilebilir değerleri (Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı 2002).

<b>AĞIR METALLER</b>	<b>Balıktaki kabul edilebilir değerler (mg/kg)</b>	<b>Suda kabul edilebilir değerler (mg/l)</b>
<b>Hg</b>	<b>0.50</b>	<b>0.004</b>
<b>Cd</b>	<b>0.10</b>	<b>0.01</b>
<b>Pb</b>	<b>1.00</b>	<b>0.10</b>
<b>Cu</b>	<b>20.00</b>	<b>0.01</b>
<b>Zn</b>	<b>50.00</b>	<b>0.003</b>
<b>Ni</b>	<b>0.30</b>	<b>0.30</b>
<b>Cr</b>	<b>4.10</b>	<b>0.11</b>
<b>Fe</b>	<b>410</b>	<b>0.70</b>
<b>Se</b>	<b>-</b>	<b>0.05</b>

#### 1.4.1. Balık Doku ve Organlarının Ağır Metallere Olan İlgisi

Farklı balık türlerinin organlarındaki metal dağılımı farklı olmaktadır. Belirli organ veya dokudaki metal düzeyi hem metale hem de türe göre değişir. Protein gibi organik bileşiklerin metalleri karaciğerde bağlayabilmesi metallerin büyük bir kısmının karaciğerde depolanmasına neden olur. Birçok farklı balık türünde karaciğerde sentezlenen metalotiyonin gibi spesifik depolama proteinleri bulunur. Balıklar üzerinde yapılan araştırmalar metal birikiminde karaciğerin çok önemli ve belirleyici bir organ olduğunu ortaya koymuştur. Yılan balıklarında bakır ve çinko, karaciğerde metalotiyonine bağlandığı için birikimin en fazla bu organda olduğu görülmüştür. Karaciğerde özellikle bakır, nikel, kobalt, çinko ve demir birikimi yüksek düzeylerde olmaktadır. Alabalıklar üzerinde yapılan araştırmalarda karaciğerdeki bakır düzeyinin kaslardakinden çok daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Karaciğerin bakırı, kastan daha fazla biriktirmesinin nedeni balıkların karaciğerindeki metalotiyoninin bakırı bağlamasıdır. Buna karşın kurşun, karaciğerde metalotiyoninin oluşmasına neden olmadığı ve metalotiyonine bağlanmadığı için karaciğerdeki düzeyi düşük bulunmuştur. Hemen hemen tüm balıklarda karaciğerdeki bakır düzeyi diğer organlardan daha yüksektir. Bu da karaciğerin bakır toksisitesi için belirleyici bir organ olduğunu göstermektedir. Balıkların karaciğer hücrelerinin mitokondrileri metalleri bağlama yeteneğindedir. Özellikle bakır ve çinko karaciğerin mitokondrilerine güçlü bir şekilde bağlanırlar. Karaciğerde bakırın fazla birikmesinin diğer bir nedeni de solungaçlardaki bakırın sürekli karaciğere taşınmasıdır. Solungaçlarda metal alımının kontrol edilebilmesi ve metallerin bu organla atılabilmesi nedeniyle metal birikimi karaciğere oranla daha düşük düzeyde olmaktadır. Alabalıkların solungaçlarındaki bakır birikiminin karaciğerdeki bakır birikimi ile karşılaştırıldığında düşük olduğu saptanmıştır. Yılan balıkları Cd 'a maruz bırakıldığında solungaçlarda yüksek düzeyde Cd biriktiği gözlenmiştir. Bunun nedeni Cd'un özellikle solungaçlarda metalotiyoninlere bağlanmasıdır. Buna karşın diğer metaller solungaçlarda bu tip proteinlerin sentezine etki etmediği için solungaçlardaki birikimleri de az olmaktadır. Böbreklerin ağır metallere affinitesi yüksek olup, genel olarak tüm metallerin bu organlarda birikim düzeyi yüksektir. Bakır ve kadmiyumun böbrek ve karaciğere olan toksisiteleri, kas ve diğer organlara oranla daha fazladır. Böbrekler metabolik aktiviteleri fazla olan organlar olduğundan ağır metallerin büyük bir kısmı burada birikmektedir (Uğuner 2008).

### 1.4.2. Büyük Menderes Akarsuyunun Genel Özellikleri

Büyük Menderes Akarsuyu, Büyük Menderes Havzasını besleyen ana su kaynağı olup yaklaşık 584 km uzunluğundadır. (Resim 1.1.) Akarsu, Dinar'ın kuzey-doğusundaki Kireçtaşı mağaralarında yer alan karstik kökenli kaynaktan doğmaktadır. Sandıklı Ovası'nı çeviren yüksek dağlardan inen derelerin birleşmesiyle oluşan ikincil kol ile birleşerek, Çivril Ovası'nda Büyük Menderes adını almaktadır. Akarsu, Banaz Çayı ile Adıgüzel Barajı'nda birleşmektedir. Daha sonra, Çürüksu, Dandalas Çayı, Akçay ve Çine Çayı ile birleşmekte ve Bafa Gölü'nün batısından Ege Denizi'ne dökülmektedir. Akarsuyun akışı mevsimlere göre büyük değişiklik göstermekte, özellikle yan derelerin kurumması ile debisi büyük oranda azalmaktadır. Bu nedenle kurak dönemlerde yeterli suyu sağlayabilmek için Işıklı Gölü, Adıgüzel ve Kemer barajlarından yararlanılmaktadır (Durdu ve ark 2012).



**Resim 1.1.** Büyük Menderes Deltası (Anonim 2015).

#### 1.4.2.1. Büyük Menderes Akarsuyunun kirlilik durumu

Büyük Menderes Akarsuyu ve yan kolları, çevresindeki yerleşim birimlerinde ve sanayi tesislerinde oluşan atıklar için bir alıcı ortam oluşturmaktadır. Bu durum yakın zamana kadar ciddi bir sorun oluşturmamıştır. Fakat 1980'li yılların başından itibaren, kentsel nüfus artışı ile birlikte sanayi ve bazı altyapı yatırımlarındaki artış, Büyük Menderes Akarsuyundaki kirliliğin artmasına neden olmuştur. Büyük Menderes Havzasındaki su kirliliği, Dinar endüstriyel ve evsel atıksularının hiçbir arıtma işlemine tabi tutulmadan Büyük Menderes Akarsuyuna deşarjı ile başlamaktadır. Dinar'dan sonra

Uşak ve Ulubey çevresinde bulunan deri sanayi atıksuları ile tekstil ve şeker fabrikası atıksuları, Banaz çayının bir kolu olan Dokuzsele Çayı'na boşaltılmaktadır. Denizli endüstriyel ve evsel atıksuları da hem Çürüksu'nun hem de boşaldığı Büyük Menderes Akarsuyunun kirlenmesindeki en önemli etkenlerdendir. Bunların dışında, Sarayköy'deki tekstil fabrikası ve diğer sanayi tesislerinin atıksuları da Büyük Menderes Akarsuyunda kirliliğe neden olmaktadır. Karacasu çevresinde kurulan deri sanayi işletmelerinin atıksuları için arıtma tesisi kurulmuş olmakla birlikte, arıtma tesisinin sağlıklı çalıştırılmaması ve atıksuların zaman zaman arıtılmadan Büyük Menderes Akarsuyunun yan kolu olan Dandalaz Çayı'na verilmesiyle Büyük Menderes Akarsuyunun kalitesi daha da bozulmaktadır. Büyük Menderes Akarsuyunda kirlilik yaratan diğer kaynaklar ise jeotermal santraller ile ılıcalardır. Her iki kaynak da Büyük Menderes Akarsuyunda genel tuzluluğa ve bor kirliliğine neden olmaktadır (Durdu ve ark 2012).

### 1.4.3. Kefal Balığının Genel Özellikleri

Kefal balıkları tropik ve ılıman bölgelerde az tuzlu ve tatlı sularda yaşayabilen türlerdir. Bu balıklar ısı, oksijen, tuzluluk gibi ekolojik faktörlere çok toleranslıdır. Tuzluluğu % 60 olan lagünler ile tatlı sularda yaşayabilmektedir. Sıcaklığı 3 °C'den 35 °C'ye kadar değişen sulara uyum sağlarlar. Besinlerini eklem bacaklılar, kurtlar, yumuşakçalar, çürümekte olan organik maddeler ve bitkisel organizmalar oluşturur. Denizlere üreme göçü yapan (katadrom) balıklardır (Uğuner 2008).

Kefal balığı türleri birbirlerine çok benzer. Vücutları genellikle torpil şeklinde olmakla birlikte yanlardan hafif yassılaştırmıştır. Vücudu parlak renkli pullarla örtülüdür. Vücut pulları sırttan yassılaştırmış olan baş ve burun üzerinde biraz daha küçük olmak üzere devam eder. Burun kısmı küt yapılıdır. Sırtta 2 adet yüzgeç taşırlar. Kuyruk yüzgeci çataldır. Büyükçe hava kesesi vardır. Omur sayıları 24-26 arasındadır. (Resim 1.2.) Ömürleri 14-15 yıldır (MEGEP 2006).



**Resim 1.2.** Kefal balığı (MEGEP 2006).

#### 1.4.4. Levrek Balığının Genel Özellikleri

Levrek balıkları, tüm Akdeniz'den, İngiltere'nin kuzey sahillerine ve Kanarya Adaları'na kadar yayılım gösterir. Deniz çayırının bulunduğu kumlu, çamurlu-sığ biyotoplarda, sıcaklığa ve tuzluluğa karşı gösterdiği toleransı ile nehir ağızlarında ve lagüner bölgelerde yaşayan bir littoral bölge balığıdır. Havaaların soğuması ile birlikte kışlamak için derin sulara göç ederler. Tuzluluk değişimlerine karşı dayanıklı olup, % 3 tuzluluktan % 50 tuzluluğa kadar yayılım gösterir. Etçil bir tür olan levrek balıkları, bazen yalnız, bazen de küçük sürüler halinde dolaşırlar (Uğuner 2008).

Vücudu yanlardan hafif yassılaştırmış olan levrek balığının derisi ktenoid pullarla kaplıdır. Sikloid pullar ense ve yanaklar üzerindedir. Solungaç kapağında gri-siyah leke mevcuttur ve üzerinde sert diken ışınlar vardır. Göz kemiğinin üstünde siyah lekeler mevcuttur. Ağız geniştir, dişler damakta ve dilde bulunur. Renkleri sırt kısmında koyu gri-esmer, yanlarda gümüşü, karın bölgesinde beyazdır. Ergin bireylerin sırt kısmı lekesiz koyu renkte olurken, gençlerde bazen siyah lekeler olabilir. Ortalama 50 cm olan boyu 1 m'ye kadar uzayabilir. Ağırlığı 11-12 kg'a ulaşabilir. (Resim 1.3.) Tatlı sularda büyüyebilirler, fakat üreyemezler (MEGEP 2006).



**Resim 1.3.** Levrek balığı (MEGEP 2006).

#### 1.5. Mikrodalga Yöntemi ile Örnek Çözünürleştirme

İlk defa 1975 yılında analitik kimyada kullanılan mikrodalga tekniği ile çözünürleştirme, Abu Samra ve arkadaşları tarafından biyolojik örneklerin asitlerle hızlı bir şekilde çözünürleştirilmesini sağlamıştır. Sonra bütün örnek çeşitlerinin hazırlanmasında mikrodalga tekniği geliştirilerek yaygın olarak kullanılmıştır (Matusiewicz 1994, Tosun 2009). Resim 1.4.'de mikrodalga fırın gösterilmiştir.



**Resim 1.4.** Mars X Press marka mikrodalga fırın

Mikrodalga ile ısıtmada işlem kısa sürede tamamlanır, hazırlanan örnekteki tüm moleküller aynı anda ısınır. Çözünme sırasında organik moleküller üzerine mikrodalga ortamının kimyasal bir etkisi olmamaktadır. Burada amaç biyolojik materyalleri asitlerle hızlı olarak çözünürleştirmektir. Mikrodalgada enerji, teflon kaplar tarafından absorbe edilmediğinden enerji kaybı olmaz, enerji sadece örnek ve çözünürleştiriciler tarafından absorbe edilir. Mikrodalgada örneğin ısınması dıştan olduğu gibi içten de olabilir, bu yüzden enerji moleküler çarpışmadan ziyade polarizasyon yolu ile transfer olmaktadır. Resim 1.5.'de kullanılan teflon kaplar gösterilmiştir (Matusiewicz 1994, Tosun 2009).



**Resim 1.5.** Teflon kaplar

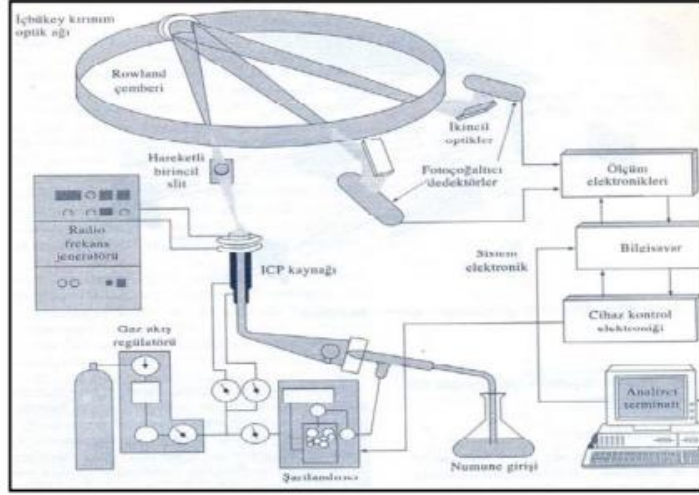
Teflon kaplar sayesinde sağlanan iç ısınma, örneği mekanik olarak uyarmakta ve örneğin dış tabakalarını bozmaktadır. Böylece asit ile örnek arasında daha iyi bir temas sağlanmaktadır (Tosun 2009).

Açık tüplerde (atmosferik basınç) ya da kapalı tüplerde (yüksek basınç) örnek hazırlanabilir. Kapalı basınç tüpleri örneğin ısınıpı arttırarak çözünürlüğe yardımcı olur. Kaynama noktasına daha çabuk ulaşılır. Bu yöntemde örnekler ve asit teflon tüplere konur ve bu teflon tüpler mikrodalgada ısıtılır. Bu yöntemde örnek miktarı çok önemlidir. Çünkü parçalama işlemi sırasında aşırı basınç oluşur. Basınç artışını önlemek için genelde 0,5-1,0 g örnek ile çalışılır. Örneklere asit veya asit karışımları eklenmesinden sonra uygun basınç ve sıcaklık koşulları uygulanarak çözünüleştirilmeleri sağlanır (Lamble ve Hill 1998).

Kapalı sistem mikrodalga yaş yakma yöntemi diğer örnek hazırlama yöntemlerine kıyasla daha az zaman gerektiren ve daha güvenli bir yöntemdir. Diğer yöntemlerde örnek hazırlamak için asit ve sıcaklığın yıkıcı etkisinden yararlanılırken, mikrodalga yönteminde buna ilave olarak basıncın etkisi de eklendiğinden örnek hazırlama süresi diğer yöntemlere göre çok daha kısadır ve parçalanma işlemi çok daha iyi gerçekleşir. Örnek berrak, tortusuz bir çözelti halini alır. Ayrıca mikrodalga yöntemi kapalı sistem olduğundan uçucu element kaybı olmaz. Tüm bu avantajlarından dolayı (süre, güvenilirlik, performans, daha az asit sarfiyatı vb.) bilimsel çalışmalarda kapalı sistem mikrodalga yaş yakma yöntemleri diğer yöntemlere göre daha çok tercih edilir hale gelmiştir (Tosun 2009).

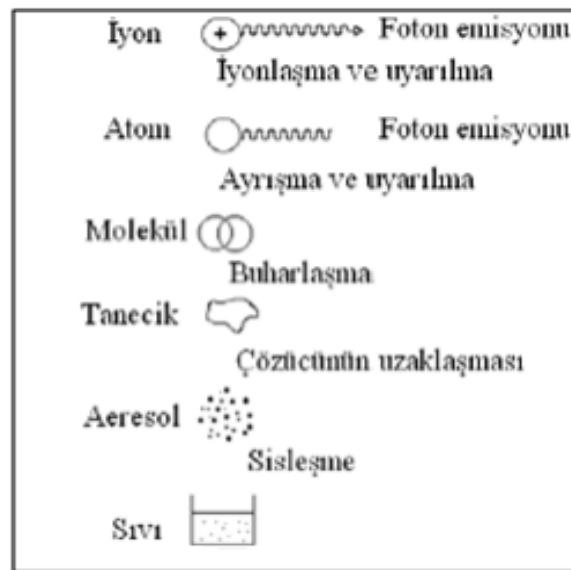
## **1.6. İndüktif Olarak Eşleşmiş Plazma-Optik Emisyon Spektroskopisi (ICP-OES)**

Cihazın çalışma prensibi, çözelti durumundaki örneğin, yüksek sıcaklıktaki plazmaya püskürtülmesiyle, gaz fazına geçen ve atomlaşan elementlerin plazmada uyarılmış duruma geçmesinden sonra yaydıkları ışını, uygun bir dedektörle ölçerek çözeltideki elementlerin miktarının belirlenmesine dayanır (Kaçar ve İnal 2008).



Şekil 1.5. ICP-OES cihazının yapısı (Daşdemir 2008)

ICP-OES cihazı atomik emisyon spektrometresinin yüksek sıcaklıktaki plazma ile donatılmasıyla geliştirilmiştir. Plazma, katyon ve elektronları içeren ve elektrik akımını ileten gaz karışımı olarak tanımlanır. ICP-OES cihazında plazmayı çoğunlukla inert bir gaz olan argon gazı oluşturur. (Şekil 1.5.) Cihaza genellikle sıvı fazda verilen numune, aerosol tanecikleri halinde yüksek sıcaklıktaki plazmaya (10000 K) gönderilir. Plazmada aerosol tanecikleri sırasıyla kurur, parçalanır, atomlaşır, iyonlaşır ve uyarılır (Şekil 1.6.). Bunun sonucunda elementler kendilerine özgü ışın yayarlar. Bu ışın şiddeti elementlerin derişimleriyle doğru orantılıdır ve bir emisyon spektrometresi ile ölçülür (Daşdemir 2008, Atakuru 2009).



Şekil 1.6. Atomlaşma ve uyarılmanın şematik gösterimi (Daşdemir 2008).



İndüktif olarak eşleşmiş plazma, iç içe geçmiş üç kuartz borudan (torch) yapılmıştır ve en geniş boru çapı 2,5 cm'dir. En dıştaki boru, 15 l/min hızla argon gazı taşır ve böylelikle plazmayı besler, korur ve soğumasını sağlayarak kuartz tüpünün erimesini önler. Ortadaki boru, organik numunelerle çalışırken yardımcı gaz olarak plazmaya 1 l/min argon gazı taşır. En içteki boru ise 0,3-1,5 l/min aralığında numuneyi plazmaya taşır (Çizelge 1.3.) (Kaçar ve İnal 2008, Atakuru 2009, Keleşoğlu 2011).

ICP cihazında monokromatör ve polikromatör olmak üzere iki spektrometre bulunmaktadır. Monokromatör, bir tane ikincil yarığa sahip olduğundan sadece bir dalga boyunda ölçüm yapılabilir. Polikromatör ise seçilen her bir analit için ikincil bir yarığa sahip olduğundan numunedeki elementler aynı anda tayin edilebilir (Daşdemir 2008, Keleşoğlu 2011). ICP-OES cihazının analiz sonuçlarının doğruluğunun, kesinliğinin ve duyarlılığının yüksek olması, düşük derişimlerde çalışma imkanı sağlaması, girişimlerin çok az olması gibi avantajları vardır (Kaçar ve İnal 2008).

ICP-OES cihazlarında numune çözeltisinin ve gazın plazmaya akışındaki düzensizlikler, optik aksamda kaymalar ve elektronik aksamlardaki düzensizlikler veya sistemin kilitlemesi gibi problemlerle karşılaşılabilir. Ayrıca kullanılan argon gazının kalitesi de çok önemlidir. Düşük kalitedeki argon gazının kullanımında plazma oluşumu zor olur veya hiç oluşmaz (Kaçar ve İnal 2008).

**Çizelge 1.3.** ICP-OES cihazının çalışma koşulları (Daşdemir 2008, Keleşoğlu 2011).

Parametreler	
Güç	1kW
Plazma gaz akışı (Ar)	15L/min
Yardımcı gaz akışı (Ar)	1,5L/min
Sisleştirici gaz akışı (Ar)	0,75L/min
RF jeneratörü	40MHz
Pompa hızı	15rpm

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Gereç

Bu çalışmada gereç olarak 15'er adet kefal (*Leuciscus cephalus*) ve levrek (*Perca fluviatilis*) balığı örnekleri kullanıldı. Çalışma, Büyük Menderes Deltasında bulunan Deringöl lagününden avlanan kefal (*Leuciscus cephalus*) ve levrek (*Perca fluviatilis*) balıklarının karaciğer ve kas dokuları ile yapıldı. Balıklar, yaz döneminde, ağustos ayında avlandı. Buz içerisinde laboratuvara getirilen örnekler numaralandırıldı, balıkların boyları (40-50 cm) ölçüldü ve ağırlıkları (1000-1500 gram) tartıldı. Çözünürleştirme işlemine kadar -18 °C'lik derin dondurucularda muhafaza edildi.

Bu çalışma için Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 23/07/2013 tarih ve 64583101/2013/051 sayılı etik kurul kararı ile onay alınmıştır.

### 2.2. Yöntem

#### 2.2.1. Ağır Metal Analizi İçin Örneklerin Çözünürleştirilmesi

Balık örneklerinin ağır metal analizi için çözünürleştirme işlemleri, Adnan Menderes Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan Mars X Press mikrodalga fırın ile yapıldı.

Yaklaşık olarak aynı yaş aralığında, avlanan balıkların karaciğer ve kas doku örnekleri alındı. Teflon tüplere 1'er gram yerleştirilen örneklerin üzerine önce 15 ml % 65'lik HNO<sub>3</sub> ilave edilip mikrodalga fırında asitle yakma işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra 2 ml % 30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edilerek yakma işlemi tekrarlandı. (Resim 2.1.) Çözündürülmüş olan bu örnekler oda sıcaklığında soğutulduktan sonra 0,45 µm Whatman filtrelerle süzülerek 25 ml'lik balon jøjeye alındı ve 25 ml çizgisine kadar deiyonize su ile tamamlanarak analize hazırlandı (Türkmen 2003, Ikem ve ark 2005). Çizelge 2.1.' de yakma programı gösterilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Mikrodalga fırına ait karaciğer ve kas dokusu yakma programı (Franson 1995).

Basamak	Max. Güç (Watt)	Zaman (dakika)	Basınç (psi) - Sıcaklık(°C)
1.	1000	20	25 psi-96 °C
2.	1000	10	25 psi-180 °C



**Resim 2.1.** Örneklerin Çözünürleştirilmesi

## **2.2.2. Stok Çözeltiler, Standart Çözeltiler ve Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması**

Dokuda bulunan ağır metallerin müsaade edilen maksimum  $\mu\text{g/l}$  değerleri dikkate alınarak, stok çözeltiler ve standart çözeltiler hazırlandı ve standart çözeltilerden yararlanılarak kalibrasyon eğrileri çizildi.

### **2.2.2.1. Stok çözeltilerin hazırlanması**

Çalışılacak olan elementleri içeren tuz veya bileşikler kullanıldı ve  $1000 \mu\text{g/l}$  stok çözeltiler aşağıdaki gibi hazırlandı.

- Bakır çözeltisi (Riedel de Haen), bakır ile hazırlanmış olup,  $1000 \mu\text{g/l}$   $0.3802 \text{ g}$   $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  saf suda çözüldü ve  $5 \text{ ml}$  derişik  $\text{HNO}_3$  eklendikten sonra saf su ile  $100 \text{ ml}$ 'ye tamamlandı (Franson 1995).
- Çinko çözeltisi (Merck), çinko ile hazırlanmış olup;  $1000 \mu\text{g/l}$   $0.4548 \text{ g}$   $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  saf suda çözüldü ve  $5 \text{ ml}$  derişik  $\text{HNO}_3$  eklendikten sonra saf su ile  $100 \text{ ml}$ 'ye tamamlandı (Franson 1995).
- Kadmiyum çözeltisi (Merck), kadmiyum ile hazırlanmış olup;  $1000 \mu\text{g/l}$   $0.1000 \text{ g}$  kadmiyum metali  $10 \text{ ml}$  derişik  $\text{HNO}_3$ 'te çözüldü ve saf su ile  $100 \text{ ml}$ ' ye tamamlandı (Franson 1995).
- Mangan çözeltisi (Merck) kontrol olarak kullanılmıştır, mangan ile hazırlanmış olup;  $1000 \mu\text{g/l}$   $0.1000 \text{ g}$  mangan metali  $10 \text{ ml}$   $\text{HCl}$  ve  $1 \text{ ml}$  derişik  $\text{HNO}_3$ 'te çözüldü ve saf su ile  $100 \text{ ml}$ 'ye tamamlandı (Franson 1995).

### 2.2.2.2. Standart çözeltilerin hazırlanması ve cihazın kalibrasyonu

Adnan Menderes Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan ICP-OES'te (Teledyne Leeman/U.S) kullanılmak üzere her bir element için 6 adet standart ve bir adet kör olmak üzere 7 adet çözelti hazırlanmıştır. Standart çözeltiler Çizelge 2.2.'de gösterildiği şekilde hazırlanmıştır. (Franson 1995).

**Çizelge 2.2.** Standart çözeltiler (Franson 1995).

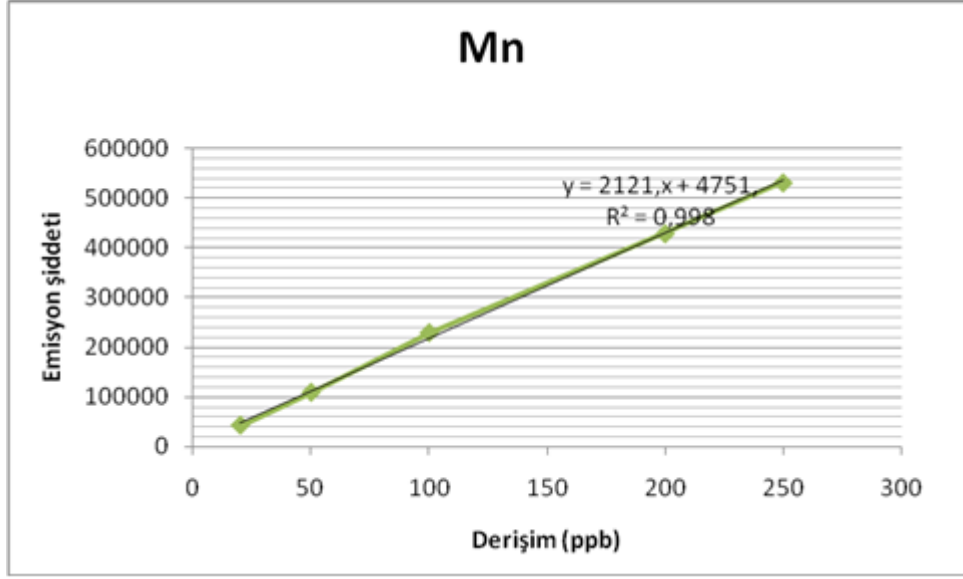
Sayı	ppb	Zn	Cd	Cu	Mn*
1	20	✓	✓	✓	✓
2	50	✓	✓	✓	✓
3	100	✓	✓	✓	✓
4	250	✓	✓	✓	✓
5	500	✓	✓	✓	✓
6	1000	✓	✓	✓	✓

\*Mangan kontrol çözeltisi olarak kullanılmıştır.

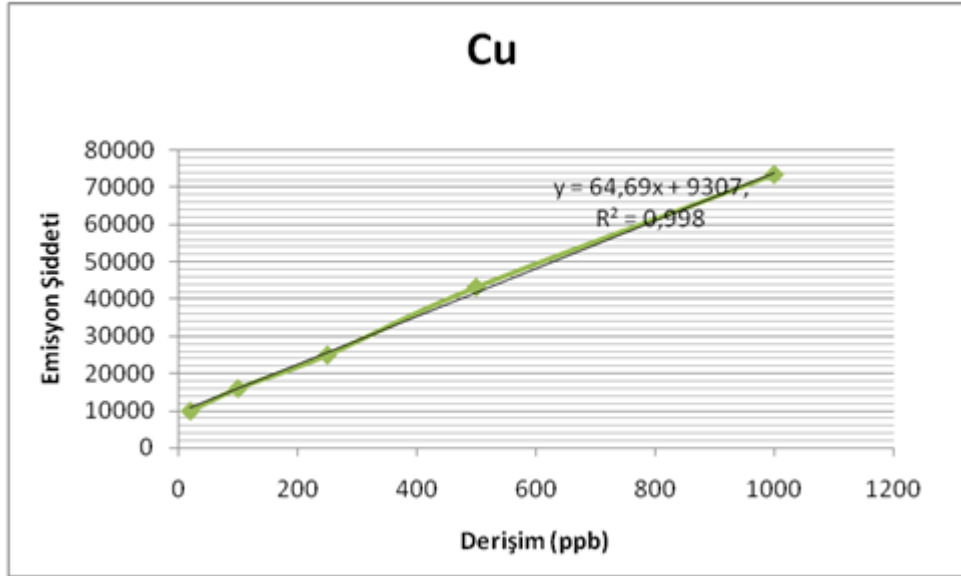
Kör ve standart çözeltiler hazırlandıktan sonra cihazın kalibrasyonu yapıldı. Kalibrasyon için öncelikle mangan çözeltisi ile kontrol sağlandı ve çalışılacak olan elementlerin dalga boyları çizelgede belirtildiği gibi cihaza işlendi. Böylece hem hazırlanan standartların içeriği hem de cihazın çalışmasında bir aksaklık olup olmadığı kontrol edildi. Elementler için çizilen kalibrasyon grafikleri, (şekil 2.1, şekil 2.2, şekil 2.3, şekil 2.4.) hazırlanmış olan standartların doğruluğunun göstergesi olarak kullanıldı (Franson 1995).

**Çizelge 2.3.** Ağır metallerin ICP-OES ile analizinde yararlanılan dalga boyları ve kalibrasyonları arasındaki % korelasyonları (Franson 1995).

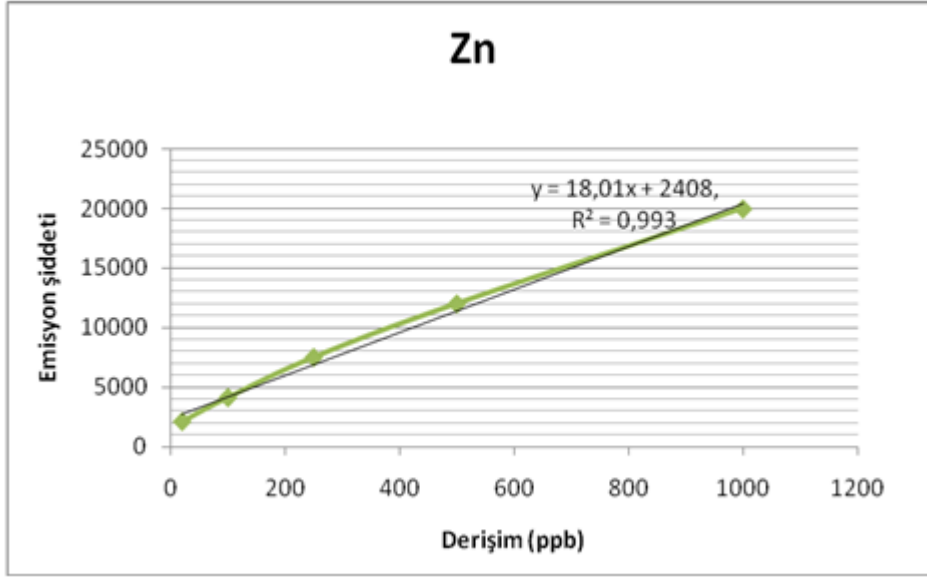
Ağır metaller	Dalga boyu	Kalibrasyon eğrisinde % korelasyon
Mn	257,610	0,9989
Zn	213,856	0,9935
Cu	324,754	0,9987
Cd	214,441	0,9991



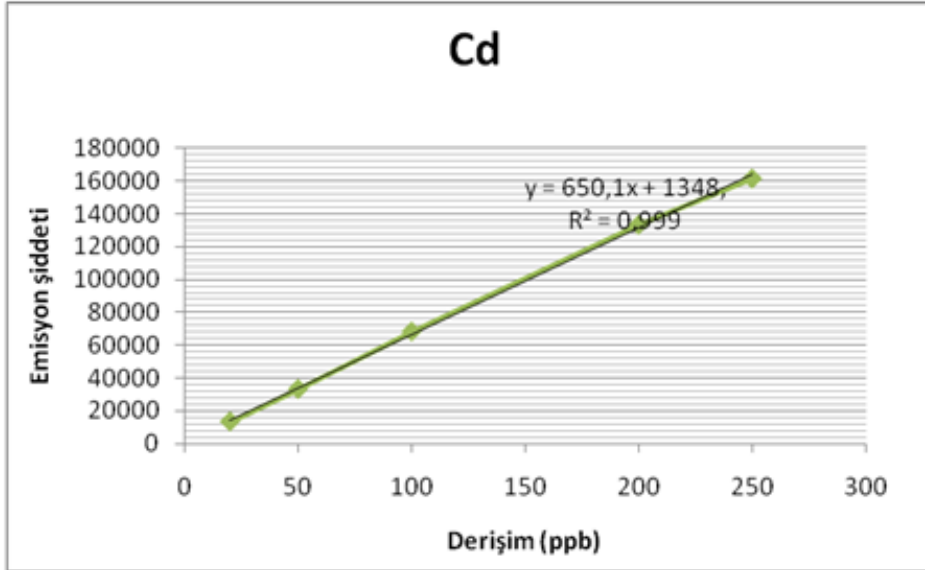
Şekil 2.1. Mn için kalibrasyon grafiği



Şekil 2.2. Cu için kalibrasyon grafiği



Şekil 2.3. Zn için kalibrasyon grafiği



Şekil 2.4. Cd için kalibrasyon grafiği

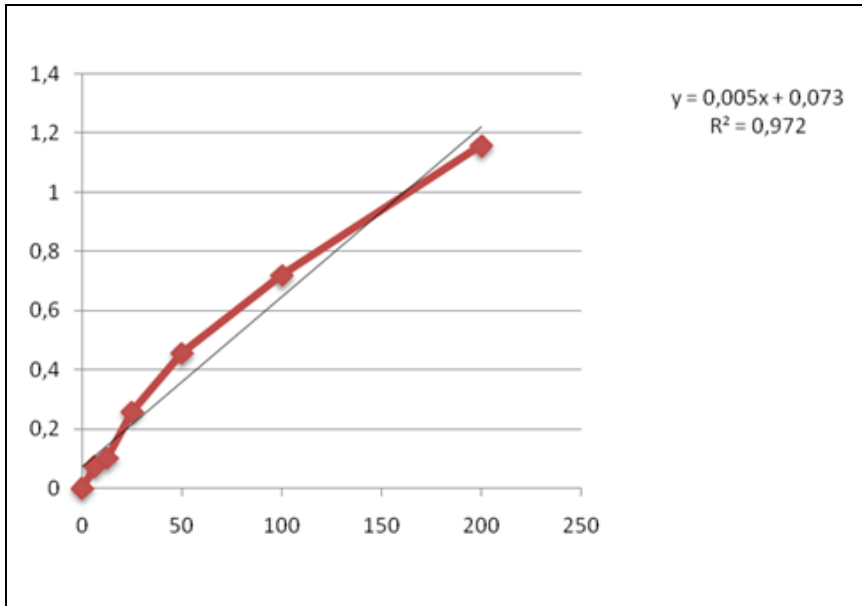
### 2.2.3. Metalloiyonin Analizi İçin Doku Homojenizatının Hazırlanması

Cam homojenizatöre alınan 0,2 gram karaciğer örneğinin üzerine 1 ml PBS ilave edilerek buz içerisinde homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi. Sonrasında örnekler 5 dk ultrasonifikasyona tabi tutuldu ve 5000 rpm de 15 dk santrifüj edildikten sonra süpernatantları alınarak MT ölçümüne geçildi (Tomita 2000, Zhou ve ark 2002).

#### 2.2.3.1. Metalloiyonin analiz prosedürü

Doku örneklerinin analizi Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında Lowry yöntemiyle spektrofotometrede protein düzeyleri tespit edildikten sonra ELISA (Ivymen system) yöntemi ile MT ölçümleri yapıldı. Ölçüm yapılmadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi.

Yıkama solüsyonu 1/20 oranında deiyonize su ile seyreltilerek kullanıma hazır hale getirildi. Blank ve 5 adet standart çözelti hazırlandı. Dokulardaki protein düzeylerine göre seyreltilmeleri yapılan örneklerimizden tüm kuyucuklara 50 µl örnek ve 100 µl HRP konjugat ilave edildi ve 1 saat süreyle 37 °C’de inkübe edildi. Kuyucuklar yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı ve emici kağıt üzerinde kurutulduktan sonra kromojen A ve B’den 50’şer µl eklenerek 15 dakika 37 °C’de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kuyucukların tümüne 50 µl durdurma çözeltisi konuldu ve oluşan renk değişimi ELISA cihazında 450 nm dalga boyunda okutularak sonuçlar kaydedildi. Sonuçlar standart grafiğe göre düzenlendi. (şekil 2.5.)



Şekil 2.5. Metalloiyonin için standart grafiği

### 2.3. Hesaplamalar

ICP-OES ile analizi yapılan doku örneklerinin ağır metal içeriği ppb, ELİSA ile analizi yapılan doku örneklerinin metalotiyonin içeriği ise ppm değeri olarak elde edildi. Eser miktardaki çözeltilerin derişimini belirtmek amacıyla ppt, ppb ve ppm kullanıldı.

$$\text{ppt} = (\text{g çözünen} / \text{kg veya litre çözelti})$$

$$\text{ppm} = (\text{mg çözünen} / \text{kg veya litre çözelti})$$

$$\text{ppb} = (\mu\text{g çözünen} / \text{kg veya litre çözelti})$$

### 2.4. İstatistiksel Değerlendirmeler

Çalışma sonunda analiz sonuçlarına ait ortalama±standart hata ( $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ ), minimum, maksimum değerler verildi. Temel istatistik değerler, gruplar arası fark ve önemlilik için SPSS (statistical Package for the Social Sciences, version 22.0) paket programıda T testi ile Man Whitney U testi kullanıldı.



### 3. BULGULAR

#### 3.1. Ağır Metal Düzeylerinin Genel Değerlendirmesi

Elde edilen sonuçların minimum, maksimum ve ortalama değerleri hesaplanarak Çizelge 3.1.'de gösterilmiştir. Çizelgede bakır, çinko ve kadmiyum düzeyleri ppb cinsinden verilmiştir; “n” birey sayısını göstermektedir.

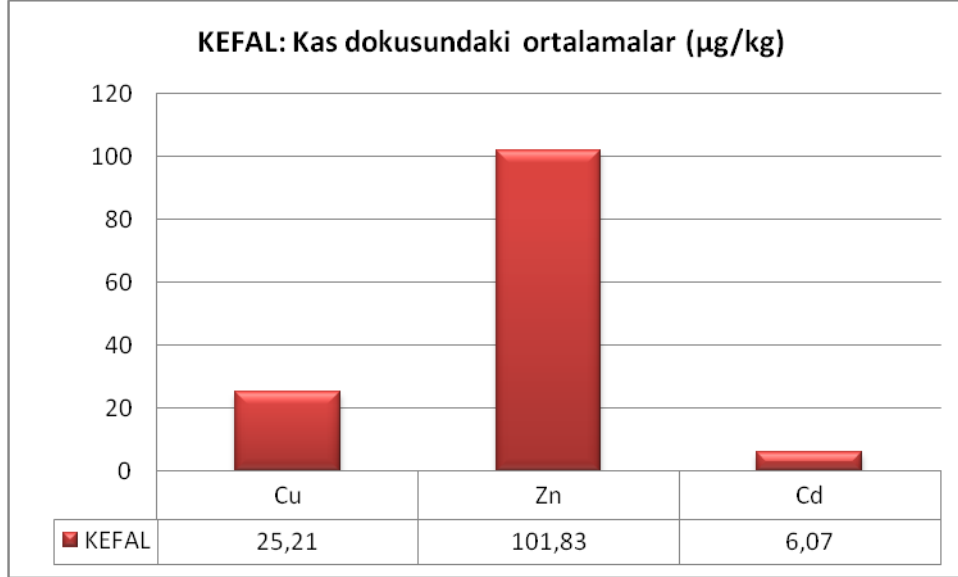
Balıklarda Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının açıkladığı kabul edilebilir değerler, bakır için 20.00 mg/kg, çinko için 50.00 mg/kg, kadmiyum için 0,10 mg/kg' dır. Sonuçlarımız bu değerler dikkate alınarak incelenmiştir.

Çizelge 3.1.Örneklerden elde edilen ağır metal sonuçları

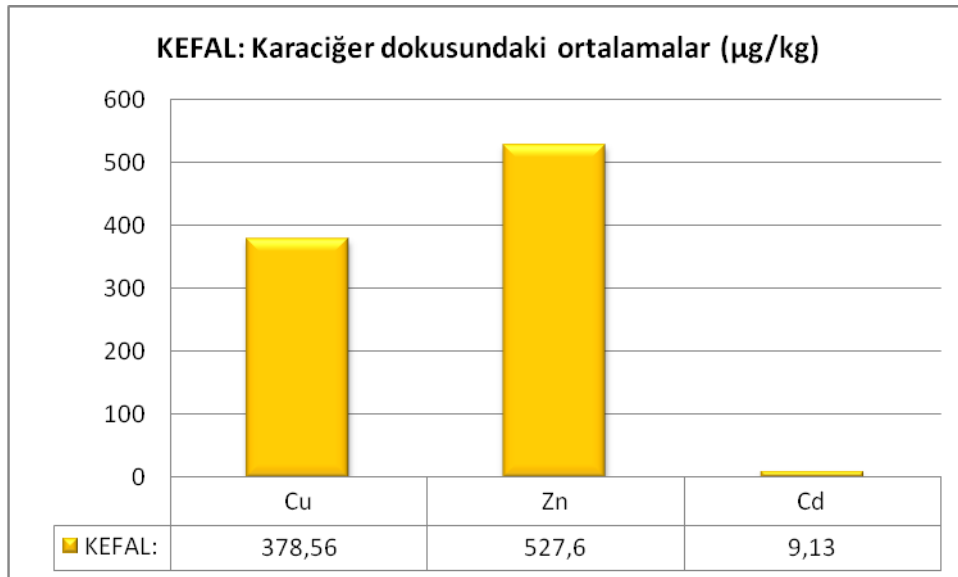
n: 15		Kefal			Levrek		
		Min değer	Max değer	Ort değer $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	Min değer	Max değer	Ort değer $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$
Cu (µg/kg)	Kas	8,73	50,81	25,21±3,20	4,74	43,24	25,40±2,98
	Karaciğer	133,95	862,84	378,56±57,70	798,93	7492,07	3485,20±543,80
Zn (µg/kg)	Kas	16,93	211,55	101,83±14,76	23,35	216,98	71,08±12,96
	Karaciğer	176,12	1464,85	527,60±91,46	131,20	975,46	550,10±71,59
Cd (µg/kg)	Kas	1,24	12,47	6,07±0,90	2,07	19,63	9,43±1,26
	Karaciğer	3,43	15,09	9,13±0,94	2,82	17,03	8,22±1,21

### 3.1.1. Kefal Kas ve Karaciğer Dokularındaki Ağır Metal Düzeyleri

Kefal kas ve karaciğer örnekleri için alınan ortalama değerler şekil 3.1. ve şekil 3.2. 'da karşılaştırılmalı olarak gösterilmiştir.



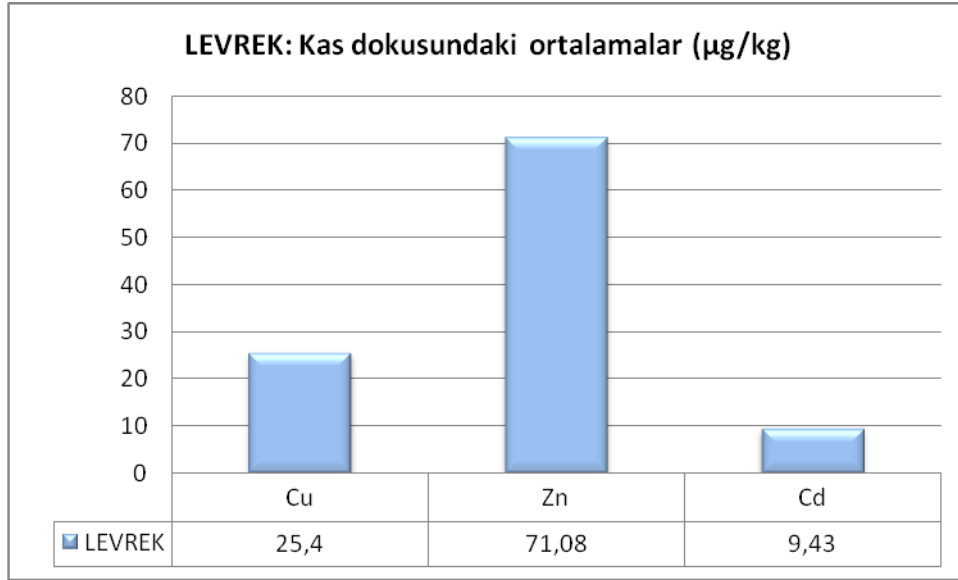
Şekil 3.1. Kefal kas dokusundaki ortalamalar



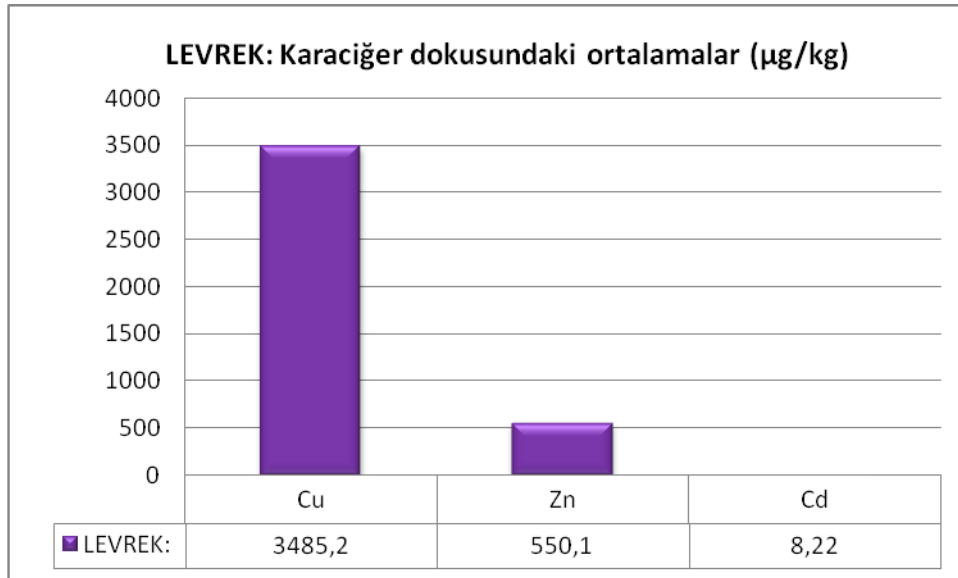
Şekil 3.2. Kefal karaciğer dokusundaki ortalamalar

### 3.1.2. Levrek Kas ve Karaciğer Dokularındaki Ağır Metal Düzeyleri

Levrek kas ve karaciğer örnekleri için alınan ortalama değerler şekil 3.3.ve şekil 3.4. 'de karşılaştırılmalı olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Levrek kas dokusundaki ortalamalar



Şekil 3.4. Levrek karaciğer dokusundaki ortalamalar

### 3.1.3. Dokulardaki Ağır Metal Düzeylerinin Karşılaştırılması

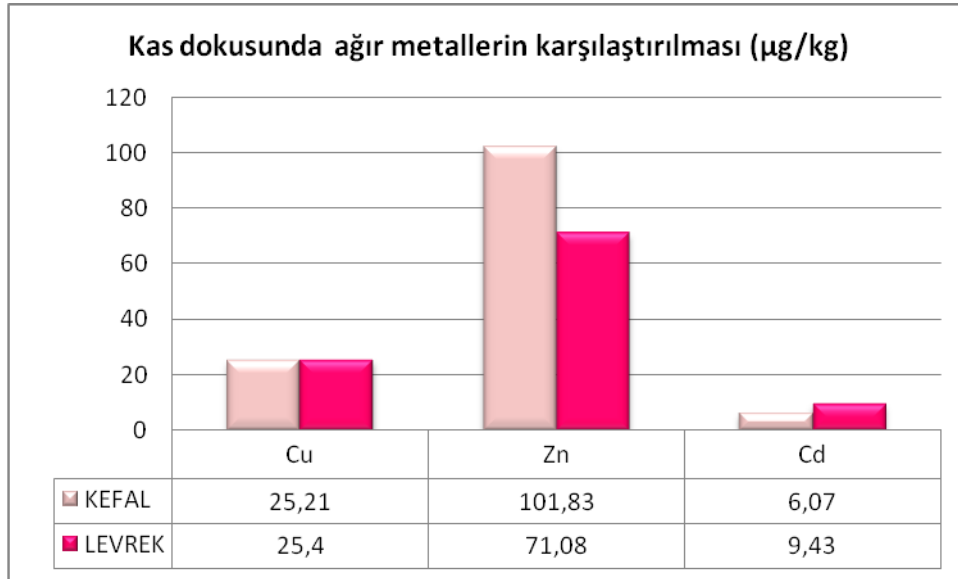
Kas dokusundaki ağır metal düzeyleri Çizelge 3.2. ve Çizelge 3.3.'te gösterilmiştir. “n” birey sayısını göstermektedir.

Çizelge 3.2. Kas dokusundaki ağır metal düzeyleri

Kas (µg/kg)	N	Levrek	Kefal	Önemlilik
		$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	
Cu	15	25,40±2,98	25,21±3,20	ÖD
Cd	15	9,43±1,26	6,07±0,90	ÖD
Zn	15	71,08±12,96	101,83±14,76	ÖD

ÖD: Önemli Değil  $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ : (Aritmetik ortalama ± Standart hata)

Çalışılan kas ve karaciğer örnekleri için sonuçlar şekil 3.5. ve şekil 3.6.'de karşılaştırılmalı olarak gösterilmiştir.

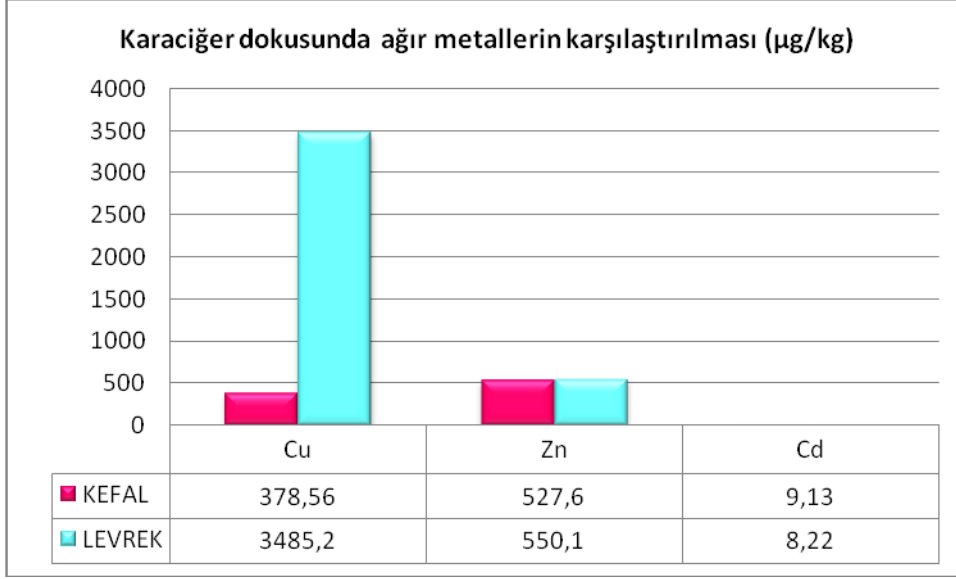


Şekil 3.5. Kas dokusunda ağır metallerin karşılaştırılması

Çizelge 3.3. Karaciğer dokusundaki ağır metal düzeyleri

Karaciğer (µg/kg)	N	Levrek	Kefal	Önemlilik
		$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	
Cu	15	3485,20±543,80	378,56±57,70	***
Cd	15	8,22±1,21	9,13±0,94	ÖD
Zn	15	550,10±71,59	527,60±91,46	ÖD

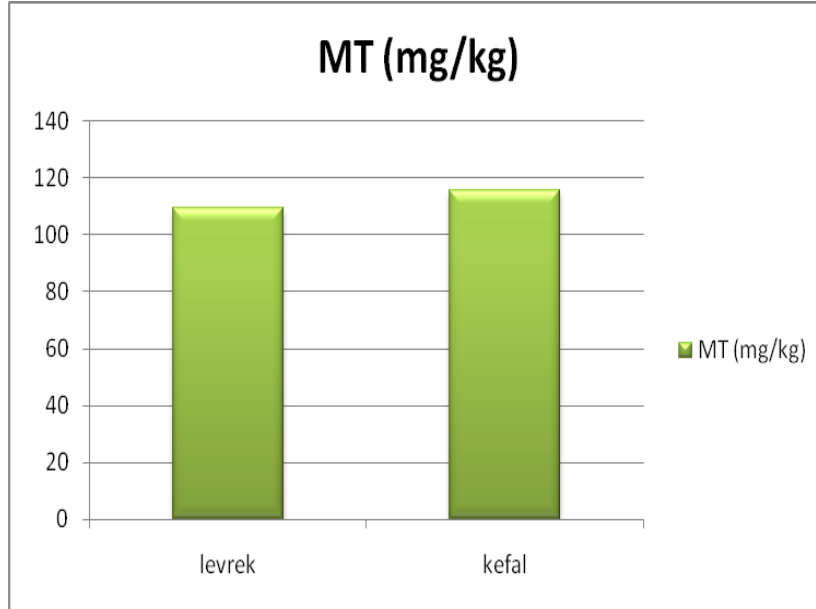
\*\*\*p<0,001 ÖD: Önemli Değil  $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ : (Aritmetik ortalama ± Standart hata)



**Şekil 3.6.** Karaciğer dokusunda ağır metallerin karşılaştırılması

### 3.1.4. Karaciğerdeki Metallotiyonin Düzeyleri

Karaciğerdeki MT düzeyleri levrek karaciğerinde 109,44 mg/kg kefal karaciğerinde 115,62 mg/kg şeklinde olup, şekil 3.7'de gösterilmiştir.



**Şekil 3.7.** Balıklardaki metallotiyonin düzeyleri

### **3.1.5. Ağır Metal Düzeylerinin Metallotiyonin Düzeyleriyle İlişkisi**

Gıda Tarım ve Sağlık Bakanlığının belirlediği balıklarda kabul edilebilir sınırlar göz önüne alınarak yapılan değerlendirmede ağır metal seviyeleri çok düşük olduğu için metallotiyonin düzeyleri ile ağır metal düzeyleri arasında istatistiki olarak anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır ve bir önemlilik olmadığı görülmüştür.

## 4. TARTIŞMA

Ağır metaller, canlılar tarafından belirli bir konsantrasyonun üzerinde alındığında hücrenin metabolizmasına ve gelişimine zarar vererek toksik etki yaparlar. Çeşitli kaynaklardan ortaya çıkabilmeleri, çevre koşullarına dayanıklı olmaları ve kolaylıkla besin zincirine girerek canlılarda artan yoğunluklarda birikebilmeleri nedeni ile diğer kimyasal kirleticiler arasında ilk sırada yer alırlar (Çalışkan 2005). Çinko, bakır, kadmiyum gibi ağır metallerin, elektrik, kağıt, boya, plastik, metal kaplama ve cam sanayi gibi çeşitli endüstri alanlarında kullanımı, tarımda verimi arttırmak amacı ile yaygın olarak kullanılan pestisit ve yapay gübrelerin bileşimine girmeleri, bu metallerin su ortamındaki derişimlerini arttırır (Brüwer ve ark 2001). Bu birikimin sonucu olarak sucul ortamda yaşayan canlılar üzerinde kısa ya da uzun vadede ortaya çıkabilen zararlı etkiler meydana gelir (Karadede 1997). Son yıllardaki hızlı nüfus artışı ve hızlı endüstrileşmenin sonucu olarak, özellikle sucul ortamlardaki toksik ağır metal seviyesinin arttığını gösteren çalışmalar vardır. Bu nedenle Büyük Menderes Deltası'ndaki kirliliğin araştırılması büyük önem taşımaktadır. Kirleticilerin bir bölümünü oluşturan ağır metaller, metal bileşikleri ve çeşitli mineraller; göller, nehirler, körfez ve okyanuslar ile bunların sedimentlerinde geniş birikim gösterirler. Bu birikim sonucunda sularda yaşayan balıklar ve diğer canlıların bünyesinde yoğunlaşan bu elementler eşik dozlarını aştıklarında, ciddi hastalıklara hatta ölümlere sebep olabilirler. Aynı şekilde ağır metalle kirlenmiş balıkların insanlar tarafından tüketilmesi durumunda ciddi sağlık problemleriyle karşı karşıya kalınmaktadır (Kayhan 2006).

Birçok ülkede ve Türkiye'nin değişik illerinde ağır metal düzeylerinin araştırılmasına yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır (Gatlin ve Wilson 1986, Ünsal ve Yemenicioğlu 1992, Öztürk ve Bat 1995, Brown ve Balls 1997, Kocaman 1999, Wong ve Chu 2001, Mormede ve ark 2001, Demirak ve ark 2005, Dural ve Göksu 2006, Yabanlı ve ark 2013).

Gatlin ve Wilson (1986), Nil çipurasının (*Tilapia nilotica*) dalak, beyin ve kas dokularında üç ayrı deney grubu oluşturmuştur. 1. gruba bakır 1,0 ppm/l, 2. gruba çinko 10,0 ppm/l, ve 3. gruba bakır-çinko 1,0-10,0 ppm/l verilmiş ve 60 günün sonunda deneylerde bakır, çinko ve bakır-çinko derişimlerinde ölümler gözlenmiştir. Çalışmada, en yüksek bakır ve çinko birikimleri dalakta olurken, bu iki metalin en düşük birikimlerinin ise beyinde olduğu tespit edilmiştir.

Ünsal ve Yemenicioğlu (1992), Orta ve Doğu Karadeniz' de ekonomik önemi olan bazı deniz ürünlerinde ağır metallerin belirlenmesine yönelik yaptıkları çalışmayla, Karadeniz'in kirlilik düzeyini ortaya koymaya çalışmışlardır. 1991 yılında ODTÜ ve Tarım ve Köy işleri Bakanlığı işbirliğinde yürütülen bu çalışmada, bölgede oldukça bol avlanan ve ekonomik öneme sahip pelajik türlerden, hamsi (*Engraulis encrasicolus*) ve istavrit (*Trachurus sp.*) ile demersal olan mezgitte (*Merlangius merlangus*) civa, bakır ve kurşun düzeylerini araştırmışlar, haziran ve ekim aylarında analiz edilen organizmalarda civa düzeylerinin arttığını, bakır düzeylerinin ise azaldığını gözlemişlerdir. Kurşun düzeylerinin, yaz aylarında en yüksek seviyeye ulaştığı, sonbahar ve kış aylarında azaldığı ifade edilmiştir. Örnekleme bölgelerine göre metal düzeyleri incelendiğinde, bakır düzeylerinin Doğu Karadeniz'in doğusuna gidildikçe arttığı, Samsun ve Hopa'da yüksek olduğu, kurşun düzeylerinin ise batıda, özellikle Sinop'ta yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Öztürk ve Bat (1995), mevsimsel sulama ve içme için önemli bir su kaynağı olan Kızılırmak nehrindeki Altinkaya barajında, bazı ağır metalleri (Cd, Cr, Cu, Fe, Ni ve Pb ) su, sediment ve aynalı sazanın (*Cypnnus carpio*) dokularında incelemişlerdir. Elde edilen su örneklerinde Fe ortalaması, uluslararası su kalite yönergesinin bildirdiği değerden daha yüksek olup, sedimentte Fe, Ni, Cu, Cr, Pb ve Cd değerleri maksimum düzeylerde bulunmuştur. Aynalı sazan, kas ve bağırsağında Fe > Cu > Pb > Ni > Cr > Cd; solungaç, kas ve karaciğerde Fe > Cu > Ni > Pb > Cr > Cd; hava kesesinde Fe > Cu > Ni > Pb > Cd > Cr şeklinde ifade edilmiştir. Balıklarda Cr, Pb, Cd, Ni düzeyleri uluslararası kuruluşlar tarafından kabul edilebilir limitleri aşmıştır.

Brown ve Balls (1997), Ege Denizindeki ekonomik balık türlerinden sultan balığı (*Mullus barbatus*), berlam (*Merluccius merluccius*), kupes (*Boops boops*) türlerindeki ağır metallerin (Cu, Zn, Cd, Pb) kas, solungaç, karaciğer ve gonadlardaki düzeylerini araştırmışlar ve bu ağır metallerin en fazla karaciğerde, en az kaslarda bulunduğunu bildirmişlerdir. Tür farklılığı açısından ele alındığında; kupes balığının organlarında daha çok metal birikimi olduğunu, bentik ve pelajik balık türlerinin dokularındaki çinko düzeylerinin benzer değerlerde, bakır düzeylerinin ise, pelajik balıklarda daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Kocaman (1999), Marmara Denizindeki farklı istasyonlarda avlanan demersal balıklarında bakır ve çinko düzeylerini araştırmış; Bakır düzeylerini, berlamda (*Merluccius merluccius*) 0,012–0,112 µg/g; mezgitte (*Merlangius merlangus*) 0,043–0,172 µg/g; öksüzde (*Trigla lyra*) 0,071–0,192 µg/g; barbunyada (*Mullus barbatus*) 0,038–0,098 µg/g



olarak tespit etmiş ve tüm örneklerde belirlenen bakır miktarının kabul edilebilir limitlerin altında yer aldığını ifade etmiştir. Çinko düzeylerini, berlamda (*Merluccius merluccius*) 0,498-0,96 µg/g; mezgitte (*Merlangius merlangus*) 1,008-2,148 µg/g; öksüzde (*Trigla lyra*) 1,024-1,536 µg/g; barbunyada (*Mullus barbatus*) 0,497-0,861 µg/g olarak tespit etmiş ve tüm örneklerde Zn miktarlarının da kabul edilebilir limitlerin altında olduğunu belirtmiş, organlarda belirlenen birikim düzeyine göre ise, Cu' ın en fazla karaciğerde, sonra kasta ve son olarak solungaçta bulunduğu, Zn' nun ise; en fazla solungaçta, sonra karaciğerde ve son olarak kasta bulunduğunu bildirmiştir.

Wong ve Chu (2001), Hong Kong'daki deniz kültür alanlarından topladıkları hamur balığı (*Epinephalus areolatus*), kırmızı imparator (*Lutjanus russelli*), çipura (*Sparus aurata*) dokularında, Cu ve Zn düzeylerini incelemişlerdir. Bakırın en fazla karaciğerde (4,94-44,1 mg/kg), daha sonra solungaçlarda (0,85-4,84 mg/kg) ve son olarak kaslarda (0,77-1,41 mg/kg) bulunduğunu, Zn'nun ise, yine en çok karaciğerde (59,5-174 mg/kg), daha sonra solungaçlarda (71,5-116 mg/kg) ve en az olarak kaslarda (20,8-68,3 mg/kg) bulunduğunu bildirmişler. Bu düzeylerin kabul edilebilir limitlerin altında olduğunu belirtip, sağlık açısından herhangi bir risk taşımadığını ifade etmişlerdir.

Mormede ve arkadaşları (2001), İskoçya'nın batısında bulunan Rockail Boğazı'ndaki demersal balık türlerinden, fare balığı (*Nezumia aequalis*), kuzey atlantik balığı (*Lepidion eques*), yuvarlak ışın balığı (*Raja fyllae*) dokularında, Cu ve Zn düzeylerini araştırmışlar; Cu'nun en fazla karaciğerde (1,92-3,07 mg/kg), sonra solungaçlarda (0,47-0,93 mg/kg) ve son olarak kaslarda (0,17-0,33 mg/kg) biriktiğini belirtmişlerdir. Zn'nun ise en fazla karaciğerde (15,05-17,97 mg/kg), sonra solungaçlarda (12,89-29,88 mg/kg) ve son olarak kaslarda (2,62-5,53 mg/kg) bulunduğunu bildirmişlerdir. Raja türleri gibi bentik türlerde, dokulardaki metal birikiminde zaman zaman artış görüldüğünü belirtmişler ve bu durumu, solungaçların sediment ile doğrudan temasta oluşuyla açıklamışlardır.

Demirak ve arkadaşları (2005), Dipsiz Çayının Yatağan Termik Santrali etkisindeki bir alanında yaptıkları çalışmada, ak balığın (*L. Cephalus*) kas ve solungaç dokularındaki Cd, Cr, Cu, Pb ve Zn metallerinin birikimini incelemişler ve Zn, Cd, Pb ve Cr metallerinin solungaçta, Cu'ın ise kas dokusunda daha yüksek düzeyde olduğunu bildirmişlerdir. Bulunan bu değerlerden Cu ve Cd'un yasal limitlerin altında, Cr, Pb ve Zn'nun yasal limitlerin üzerinde olduğunu ifade etmişlerdir. Cu ve Zn metallerinin kastaki ve

sedimentteki düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon bulunurken, diğer metallerin kas, solungaç ve sedimetteki birikimleri arasında korelasyon bulunamamıştır.

Dural ve Göksu (2006), Tuzla lagününden, 2000-2001 yılları arasında, çipura (*Sparus aurata*), avrupa deniz levreği (*Dicentrarchus labrax*) ve dubar (*Mugil cephalus*) türlerinden 200 balık örneği toplamışlar ve kas, solungaç, karaciğer ve gonatlarında Cd, Pb, Zn ve Fe düzeylerini incelemişlerdir. Ağır metal ortalamasının; en çok çipuranın kaslarında bulunduğu ve bu metallerden Cd ve Zn'nun baharda, Fe, Cu ve Pb'un kışın arttığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada Zn, Cd ve Pb düzeylerinin bazı mevsimlerde kasta kabul edilebilir limitlerin üzerine çıktığı görülmüştür. Çinkonun Avrupa deniz levreği ve dubar dokularında bahar mevsiminde, çipura dokularında ise kış mevsiminde tolere edilebilir limitlerin üzerine çıktığını bildirmişlerdir.

Yabanlı ve arkadaşları (2013), Bafa Gölü'nden elde ettikleri levreklerin (*dicentrarchus labrax*) kas dokularında Al, Cr, Ni, Cu, As, Cd, Hg ve Pb düzeylerini araştırmışlardır. Ağır metallerin kas dokudaki düzeylerinin  $Al > Cu > As > Pb > Hg > Cd > Cr > Ni$  şeklinde olduğu bildirilmiştir. En yüksek bakır ortalaması 0.61 mg/kg, krom ortalaması 0.04 mg/kg, nikel ortalaması 0.02 mg/kg, arsenik ortalaması 0.24 mg/kg, kadmiyum ortalaması 0.05 mg/kg, civa ortalaması 0.08 mg/kg, kurşun ortalaması 0.30 mg/kg, alüminyum ortalaması 2.58 mg/kg olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular ışığında her üç dokuda da en fazla biriken ağır metalin, bakır, en az biriken ağır metalin ise civa olduğunu bildirmişlerdir. Balık kas dokularının analizinden elde edilen ortalama yoğunlukların, sınır değerlerde olan kadmiyum hariç tutulursa, halk sağlığı açısından bir risk oluşturmadığını belirtmişlerdir.

Büyük Menderes Deltasından avlanan kefal (*Leuciscus cephalus*) ve levrek (*Perca fluviatilis*) örnekleriyle yaptığımız bu çalışmada, balıkların yenilebilir kısımlarında (kas), karaciğere nazaran daha düşük metal düzeyleri tespit edilmiştir. Kefal karaciğerindeki ağır metal düzeyleri  $Zn > Cu > Cd$ , levrek karaciğerindeki ağır metal düzeyleri  $Cu > Zn > Cd$ , şeklindedir Her iki balığın kas dokusundaki ağır metal düzeyleri de  $Zn > Cu > Cd$  şeklindedir. En yüksek bakır ortalamasının ( $378,56 \pm 57,7 \mu\text{g/kg}$ ) levrek karaciğerinde olduğu görülmüştür. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının açıkladığı balıkta kabul edilebilir bakır değeri 20.00 mg/kg olup bu değerler dikkate alındığında kefal ve levrek dokularındaki Cu değerinin kabul edilebilir değerin çok altında olduğu anlaşılmıştır.

Kefal ve levreklerde karaciğer dokusunda kas dokusuna nazaran daha fazla çinko birikimi görülmüş olup, en yüksek çinko ortalamasının ( $527,60 \pm 91,46 \mu\text{g/kg}$ ) kefal karaciğerinde olduğu görülmüştür. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının açıkladığı balıkta kabul edilebilir çinko değeri  $50,00 \text{ mg/kg}$  olup bu değerler dikkate alındığında kefal ve levrek dokularındaki Zn kabul edilebilir değerin çok altında olduğu anlaşılmıştır.

Karaciğer ve kas dokularındaki kadmiyum düzeyleri birbirlerine çok yakın olup, en yüksek kadmiyum ortalamasının ( $6,07 \pm 0,90 \mu\text{g/kg}$ ) levrek kas dokusunda olduğu görülmüştür. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının açıkladığı balıkta kabul edilebilir kadmiyum değeri  $0,10 \text{ mg/kg}$  olup, bu değerler dikkate alındığında kefal ve levrek dokularındaki Cd değerinin kabul edilebilir değerin çok altında olduğu anlaşılmıştır.

Analiz sonuçlarımız değerlendirildiğinde, incelediğimiz tüm ağır metallerin kasa göre karaciğerde daha yüksek düzeyde olduğu görülmüştür. Bu sonuç, Kocaman (1999), Wong ve Chu (2001), Mormede ve arkadaşlarının (2001), Brown ve Balls (1997), Öztürk ve Bat'ın (1995), Dural ve Göksu'nun (2006), Yabancı ve arkadaşlarının (2013) çalışmalarıyla uyumludur.

Kefal ve levreklerin karaciğer ve kas dokularındaki bakır, çinko ve kadmiyum düzeylerinin güvenli sınırlar içerisinde olması, Kocaman'ın (1999), Wong ve Chu (2001), Mormede ve arkadaşlarının (2001), Brown ve Balls (1997), Ünsal ve Yemencioğlu'nun (1992), Öztürk ve Bat'ın (1995), Yabancı ve arkadaşlarının (2013) çalışmalarıyla uyumludur. Dural ve Göksu (2006) ise çalışmalarında, bazı dönemlerde metallerin belirtilen limitleri aştığını bildirmişlerdir. Demirak ve arkadaşları (2005) ise bakır ve kadmiyumu güvenli sınırlarda, çinkoyu ise yüksek bulmuşlardır.

Metallotiyoninlerin metal bağlama özelliklerinin saptanması ile birlikte ağır metal detoksifikasyonunda da potansiyel rolleri olabileceği düşünülmüş ve bu düşünce, yapılan birçok *invivo* ve *invitro* çalışma ile desteklenmiştir. Çeşitli metallere maruziyetten sonra, böbrek, karaciğer ve barsak gibi organlarda MT sentezinin arttığı ve bu organlarda MT birikiminin olduğu saptanmıştır. MT'ler doğrudan metal tutucu olduklarından, metallerin hücre içerisinde serbest halde dolaşarak hücreye zarar vermelerini engellemektedir. Metallotiyoninler ağır metalleri sadece metal bağlama kapasiteleri ile değil aynı zamanda hücreleri oksidatif hasardan koruyarak da detoksifiye ederler. MT'lerin metal detoksifikasyonları, maruz kalınan hücrenin tipine, metalin özelliğine ve metalin konsantrasyonuna göre değişmektedir (Kagı 1991, Vallee 1995).

Birçok ülkede ve Türkiye'nin değişik bölgelerinde, metallothionein proteininin araştırılmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır (Hogstrand ve ark 1989, Gürel 2001, Van Campenhout ve ark 2003, Kalay ve Erdem 2003, Bervoets ve ark 2013). Ancak doğal MT birikimi ölçümünün balık dokusunda yapıldığı çalışmalar çok sınırlıdır.

Hogstrand ve arkadaşları (1989), İsveç'te ard arda iki yıl Eylül ayında, 4 örnekleme sitesinden 8'er adet levrek (*Perca fluviatilis*) balığı yakalayıp, bu balıkları akvaryum ortamında orta düzeyde bakır, çinko ve kadmiyuma maruz bırakarak metal bağlanmasında metallothionein proteininin rolünü araştırmışlardır. Karaciğer dokusunda kadmiyum düzeyi düşük görülmüş ve kadmiyum ile metallothionein düzeyi arasında bir ilişki kurulamamıştır. Karaciğerdeki bakır ve çinko düzeyleri ile metallothionein düzeyleri arasında pozitif korelasyon görülmüştür. MT ve metal düzeyleri arasındaki ilişkinin her iki yılda benzer olduğu belirtilmiş, metallothionein proteininin, karaciğerde metal bağlanmasından sorumlu olduğu sonucuna varılmıştır.

Gürel (2001), kadmiyum ve bakıra maruz bırakılan sıçanların karaciğer, böbrek, akciğer, kalp ve beyin dokularındaki Cd, Cu ve metallothionein düzeylerini ve apoptoz oranlarını araştırmışlardır. Bu amaçla, dişi Sprague-Dawley sıçanlarından oluşan ve her biri sekiz hayvan içeren dokuz grup oluşturulmuştur. İçme suyu ile dört grup kadmiyuma (B;30 ppm 30 gün, C;30 ppm 60 gün, D;120 ppm 30 gün, E;120 ppm 60 gün), dört grup bakıra (F;100 ppm 30 gün, G;100 ppm 60 gün, H;400 ppm 30gün, I;400 ppm 60 gün) maruz bırakılmıştır. Kontrol grubuna ise normal içme suyu verilmiştir. Cd'a maruz bırakılan grupların karaciğer, böbrek, akciğer ve kalp dokularındaki Cd ve MT düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı artışlar belirlenmiştir. Karaciğer ve akciğer dokularındaki apoptoz oranlarında ise kontrol grubuna göre anlamlı azalmalar saptamıştır. Cu'a maruz bırakılan grupların karaciğer, böbrek ve akciğer dokularındaki Cu düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı artışlar belirlenmiştir. Karaciğer ve böbrek dokularındaki MT düzeylerinde de kontrole göre anlamlı artışlar saptanırken, sadece karaciğer dokularındaki apoptoz oranlarında anlamlı azalmalar görülmüştür. Sonuç olarak, kadmiyum ve bakıra maruz bırakılan sıçanların karaciğer ve akciğer dokularındaki metal artışına, MT artışı ve apoptoz oranlarındaki azalmanın eşlik ettiği gözlenmiştir. Ayrıca bu süreçte, metalin verilmiş dozunun ve süresinin çok önemli olduğu bildirilmiştir.

Van Campenhout ve arkadaşları (2003), Belçika'da 10 örnekleme sitesinden 10'er adet kaya balığı avlamışlar, sucul ortamdaki metal kontaminasyonunu belirlemek için

farklı dokularındaki (solungaç, kas, karaciğer) kadmiyum, çinko ve metallothiyonin düzeylerini araştırmışlardır. Karaciğer dokusunda Cd, Zn ile metallothiyonin düzeyleri arasında pozitif korelasyon, solungaç dokusundaki Cd, Zn ile metallothiyonin düzeyleri arasında negatif korelasyon görülmüştür. Böbrek dokusunda ise Cd, Zn ile metallothiyonin düzeyleri arasında bir ilişki kurulamamıştır. MT düzeylerinin böbrek ve solungaca kıyasla daha çok karaciğerde ölçülmesi gerektiğini vurgulamışlardır.

Kalay ve Erdem (2003), Nil çipurasının (*Tilapia nilotica*) farklı dokularındaki kadmiyum düzeylerini incelemişler, karaciğer, böbrek dokularındaki kadmiyumun, total protein derişimine etkisini araştırmışlardır. Solungaç, karaciğer ve böbrek dokularında kadmiyumun yüksek düzeyde olduğunu bildirmişler, bu toksik ağır metalin öncelikle karaciğer dokusunda, daha sonra böbrek dokusunda yoğunlaştığını ifade etmişlerdir. Karaciğer ve böbrek dokularında, kadmiyum düzeyi ile total protein düzeyi arasında pozitif korelasyon görülmüştür. Metabolik olarak aktif olan karaciğer ve böbrek dokularında, total protein derişiminin artmasını, kadmiyum düzeyine bağlı olarak bu dokularda artış gösteren MT proteinine bağlamışlardır.

Bervoets ve arkadaşları (2013), Belçika'nın Flanders bölgesindeki Scheldt Nehrinde, dere kaya balığı (*Gudgeon*), kızılkanat (*Rutilus rutilus*) ve levrek (*Perca fluviatilis*) balıklarının bir referans site boyunca 6 örnekleme ile elde etmişlerdir. Sitelerden her tür için 10 balık alınmış, üç tatlı su balığının karaciğerindeki kadmiyum, bakır ve çinko düzeyleri ve metallothiyonin indüksiyonu araştırılmıştır. Tüm Cd ve Zn değerlerinin ulusal sınırları aştığı, levrek karaciğer Cd ve Zn düzeylerinin, diğer balıkların karaciğer Cd ve Zn düzeylerinden yüksek olduğu görülmüştür. Karaciğerdeki Cu düzeylerinin ise düşük olduğu belirtilmiştir. En yüksek MT değerlerinin kayabalığında, en düşük MT değerinin levrekte olduğu bildirilmiştir. Levreklerde görülen yüksek Cd ve Zn düzeylerine rağmen gözlenen düşük MT değerleri levreklerin detoksifikasyon kapasitelerinin düşük olduğunu göstermektedir. Böylece levreğin metal kirliliğine duyarlılığının daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır. MT seviyeleri ile hepatik çinko düzeyleri arasında pozitif korelasyon görülmüştür.

Büyük Menderes Deltasından avlanan kefal (*Leuciscus cephalus*) ve levrek (*Perca fluviatilis*) balıklarının karaciğer dokularında yaptığımız MT analizlerinde, levrek karaciğerinde MT düzeyinin kefal karaciğerindeki MT düzeyine yakın bir değerde olduğu görülmüştür. Kefal karaciğerindeki metallothiyonin düzeyi  $115,62 \pm 571,51$  mg/kg, levrek

karaciğerindeki metallerin düzeyi  $109,44 \pm 159,54$  mg/kg'dır. Bu değerler, kefal ve levrek karaciğerinde bulunan Cu, Cd, Zn değerleriyle karşılaştırıldığında bir önemlilik görülmemiştir. Balıklarımızın karaciğerindeki ağır metal düzeyleri, izin verilen limitlerden çok daha düşük olduğu için metallerin değerlerinde ağır metallerle ilişkili bir değişiklik olmadığı düşünülmektedir. MT düzeylerinin birbirine yakın olması kefal ve levreklerin detoksifikasyon kapasitelerinin benzer olduğuna işaret etmektedir.

## 5. SONUÇ

Akuatik ortamlar doğal ve antropojenik kaynaklı kirleticilerin son uğrak yerleri olduğundan, bu ortamlardaki ağır metal birikimi biyolojik yaşamı tehdit etmektedir. Balıklar çevreleriyle sürekli ilişki halinde yaşadıklarından, fizyolojik ve kimyasal değişikliklere oldukça duyarlıdırlar. Su ekosistemlerinin önemli bir canlı grubu olan balıklar, insanlar için değerli bir besin kaynağıdır. Yapılan bu çalışmayla, sıklıkla tüketilen iki farklı balığın karaciğer ve kas dokularındaki bakır, çinko ve kadmiyum düzeyleri araştırılmış, ayrıca ağır metallerin toksik etkilerini azaltan metallothionein proteininin karaciğerdeki düzeyleri belirlenmiştir.

İki balığın ağır metal düzeyleri karşılaştırıldığında kefal ve levrek kas dokusundaki ortalama ağır metal düzeyleri benzerlik gösterirken, levrek karaciğer dokusundaki ağır metal düzeyleri, kefal karaciğerine göre daha yüksek bulunmuştur. En yüksek bakır düzeyleri levrek karaciğerinde, en yüksek çinko düzeyleri kefal karaciğerinde ölçülmüştür. Her iki balığın karaciğer ve kas dokusundaki kadmiyum düzeyleri birbirine yakın değerdedir. Kefal ve levreklerin karaciğer ve kas dokularındaki bakır, çinko ve kadmiyum düzeylerinin kabul edilebilir sınırların çok altında olduğu gözlenmiştir.

Genel olarak ağır metaller, MT proteininin başlıca sentez yeri olan karaciğer dokusunda daha fazla görülmüştür. Ağır metal birikimi ile artış gösteren metallothioneinler, kefal ve levreklerin karaciğer dokularında incelenmiş ve her iki balıkta benzer değerlerde bulunmuştur. Balıklarda tolere edilebilir sınırlar göz önüne alınarak yapılan değerlendirmede ağır metal seviyeleri çok düşük olduğu için metallothionein düzeyleri ile ağır metal düzeyleri arasında istatistiki olarak anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır.

Balıklarda bakır, çinko ve kadmiyum düzeylerinin düşük olması son derece sevindiricidir. Bu metaller açısından Büyük Menderes Akarsuyu'ndan kaynaklanmış olabilecek önemli bir kontaminasyonun olmadığı anlaşılmıştır. Ancak sonraki dönemlerde yapılacak analizlerde, farklı sonuçlarla karşılaşılacağı göz önünde bulundurulmalıdır. Örneğin, suya ya da toprağa karışacak tehlikeli bir sanayi atığı, kısa ya da uzun vadede ciddi tehlikelere neden olabilir. Bu açıdan bakıldığında ilgili bakanlıkların konuya gereken hassasiyeti göstermesi, sanayinin ve endüstrileşmenin yoğun olduğu bölgelerde sıklıkla gerekli kontrollerin yapılması gerekmektedir. Özellikle dip balıklarda MT düzeylerinin araştırılması değişik balık türlerinin detoksifikasyon kapasitelerinin karşılaştırılması açısından yararlı olacaktır.

## ÖZET

**Büyük Menderes Deltasından avlanan kefal (*Leuciscus cephalus*) ve levreklerde (*Perca fluviatilis*) Cu, Zn ve Cd düzeylerinin belirlenmesi ve metallotiyonin ile ilişkisinin araştırılması**

Çalışmamızda, Büyük Menderes Deltasından avlanan 15'şer adet kefal ve levreğin karaciğer ve kas doku örnekleri mikrodalga fırında çözünürleştirilmiş ve ICP-OES ile Cu, Zn ve Cd analizleri yapılmıştır. Balıkların karaciğer dokularındaki metallotiyonin düzeyleri ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. Bu iki balığın yenilebilir kısımlarında (kas), karaciğere göre daha düşük metal düzeyleri tespit edilmiştir. Kefal karaciğerindeki ortalama ağır metal düzeyleri; bakır için  $378,56 \pm 57,7$  µg/kg, çinko için  $527,60 \pm 91,46$  µg/kg, kadmiyum için  $9,13 \pm 0,94$  µg/kg, levrek karaciğerindeki ağır metal düzeyleri ise; bakır için  $3485,20 \pm 543,80$  µg/kg, çinko için  $550,10 \pm 71,59$  µg/kg, kadmiyum için  $8,22 \pm 1,21$  µg/kg'dır. Kefal kasındaki ağır metal düzeyleri; bakır için  $25,21 \pm 3,20$  µg/kg, çinko için  $101,83 \pm 14,76$  µg/kg, kadmiyum için  $6,07 \pm 0,90$  µg/kg, levrek kasındaki ağır metal düzeyleri ise; bakır için  $25,40 \pm 2,98$  µg/kg çinko için  $71,07 \pm 12,96$  µg/kg, kadmiyum için  $9,43 \pm 1,26$  µg/kg'dır. Elde edilen sonuçlar; literatür verileri ve Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının açıklamış olduğu tolere edilebilir sınırlar göz önüne alınarak değerlendirildiğinde Büyük Menderes Deltasından avlan kefal ve levreklerde sağlık açısından tehlike oluşturacak bir ağır metal kontaminasyonun olmadığı anlaşılmıştır. Kefal karaciğerindeki metallotiyonin düzeyi  $115,62 \pm 571,51$  mg/kg, levrek karaciğerindeki metallotiyonin düzeyi  $109,44 \pm 159,54$  mg/kg'dır. Dokulardaki ağır metal ve metallotiyonin düzeyleri arasında istatistiksel olarak bir önemlilik olmadığı görülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** Kefal, levrek, Cu, Zn, Cd, Büyük Menderes, metallotiyonin



## SUMMARY

### **Determination of Cu, Zn and Cd concentrations of mullet (*Leuciscus cephalus*) and perchs (*Perca fluviatilis*) hunted in Büyük Menderes Delta and investigation of their relationship with metallothionein**

In our study, liver and muscle samples of 15 pieces mullet and perchs fish hunted from Büyük Menderes Delta were solubilised in the microwave and Cu, Zn, Cd analyzes were performed by ICP-OES. Metallothionein levels in fish liver tissues were determined by ELISA method. Lower metal levels were determined in the edible partes (muscle) of these two fishes in comparison to the liver. The average heavy metal concentrations in mullet liver were  $378,56 \pm 57,7$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  for Cu,  $527,60 \pm 91,46$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  for Zn and  $9,13 \pm 0,94$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  for Cd. On the other hand heavy metal concentrations in the perch liver were  $3485,20 \pm 543,80$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  for Cu,  $550,10 \pm 71,59$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  for Zn and  $8,22 \pm 1,21$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  for Cd. The average heavy metal concentrations in mullet muscle were  $25,21 \pm 3,20$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  for Cu,  $101,83 \pm 14,76$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  for Zn and  $6,07 \pm 0,90$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  for Cd. On the other hand heavy metal concentrations in the perch muscle were  $25,40 \pm 2,98$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  for Cu,  $71,07 \pm 12,96$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  for Zn and  $9,43 \pm 1,26$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  for Cd. Obtained results compared with the literature and the Turkish Food Health Organisation announced that there is no risk on the tolerable limits of the heavy metal contamination for mullet and perchs hunted from Büyük Menderes Delta. Metallothionein concentrations in the liver were  $115,62 \pm 571,51$   $\text{mg}/\text{kg}$  and  $109,44 \pm 159,54$   $\text{mg}/\text{kg}$  in mullet and perchs respectively. There was not a statistical significance between the levels of heavy metals and metallothionein concentrations in tissues.

**Keywords:** Mullet, perch, Cu, Zn, Cd, Büyük Menderes, metallothionein

## KAYNAKLAR

- Ağacasulu Ö, Sakarya Nehri Çeltikçe Çayı'nda yaşayan *Capoeta Tinca* (Heckel,1843)'nın dokularında ağır metal birikiminin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gazi Üniversitesi, Ankara. 2007; s: 43.
- Almeida JA, Dınız YS, Marques SFG, Faine LA, Ribas BO, Burneiko RC, Novelli ELB. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environment International*, 2002; 27: 673-679.
- Andrews GK. Cellular zinc sensors: MTF-1 regulation of gene expression. *Biomet*, 2001; 14: 223-237.
- Anonim, Büyük Menderes Deltası <http://www.manzara.gen.tr/en-yeniler/buyuk-menderes-nehri-5605.html>. Erişim tarihi: 03 Şubat 2015
- Anonymous. The expert panel report of the national cholesterol education program expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. *Archives of Internal Medicine*, 1998; 148: 36-69.
- Akahori A, Gabryelak T, Jowiak Z, Gondko R. Zinc-induced damage to carp (*Cyprinus carpio*) erythrocytes in vitro. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1999; 47(1): 89-98.
- Araya M, Olivares M, Pizarro F, Gonzalez M, Speisky H, Uauy R. Copper exposure and potential biomarkers of copper metabolism. *Biometal*, 2003; 16(1): 199-204.
- Atakuru İ. Emet ve Hisarcık bölgesi sularında arsenik ve bor tayini. Yüksek Lisans Tezi. Dumlupınar Üniversitesi Kimya Bölümü, Kütahya. 2009.
- Atlı G, Canlı M. Natural occurrence of metallothionein-like proteins in the liver of fish *Oreochromis niloticus* and effects of cadmium, lead, copper, zinc, and iron exposures on their profiles. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2003; 70: 619-627.
- Bat L, Gündoğdu A, Öztürk M. Ağır metaller, Süleyman Demirel Üniversitesi. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi, 1999; 6: 166-175.
- Bay BH, Jin R, Huang J, Tan PH. Metallothionein as a prognostic biomarker in breast cancer. *Experimental Biology and Medicine*, 2006; 231: 1516-1521.
- Berg JM, Shi Y. The Galvanization of biology: A growing appreciation for the roles of zinc. *Science*, 1996; 271: 1081-1085.
- Bervoets L, Knapen D, De Jonge M, Van Campenhout K, Blust R. Differential hepatic metal and metallothionein levels in three feral fish species along a metal pollution gradient. *Plos One*. 2013; p. 8-3.
- Bettger WJ, O'dell BL. A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes. *Life Sciences*. 1981; 28: 14-25
- Beyersmann D. Homeostasis and cellular functions of zinc, *Mat.-Wiss. U. Werkstofftech.* 2002; 33: 764-769.
- Bjergsson B, Sterner O, Zimerson E, Cheime und Gesundheit. Eine verständliche Einführung in die Toxikologie. Verlagsgesellschaft, 1988; 264: 55-88.

Brown FM, Balls PW, Trace metals in fish and shell fish from Scottish waters, Scottish Fishries Reseach Report. 1997; 60: 30.

Brüwer M, Schmid KW, Metz KA, Krieglstein CF, Senninger N, Schürmann G. Increased Expression of metallothionein in inflammatory bowel disease, *Inflammation Research*, 2001; 50: 289–293.

Bunker VW, Hinks LJ, Lawson MS, Clayton BE. Assessment of zinc and copper status of healthy elderly people using metabolic balance studies and measurement of leukocyte concentrations. 1984; 40: 1096-1102.

Casalino E, Calzaretti G, Sblano C, Landriscina C. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology*, 2002; 179: 37-50.

Chen ML, Failla ML. Metallothionein metabolism in the liver and kidney of the streptozotocin-diabetic. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1988; 90: 439–445.

Ciminli CS. Gölbaşı Gölü'nde su ve bazı organizmalarda ağır metal birikimi, Yüksek lisans tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Ana Bilim Dalı, Hatay, Türkiye. 2005.

Cox DW, Moore SD. Copper transporting P-type ATPases and human disease. *J. Bioenerg Biomembran*, 2002; 34: 333–338.

Coyle P, Philcoxa JC, Careya LC, Rofea AM. Metallothionein: the multipurpose protein cmls, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2002; 59: 627–647.

Çalışkan E. Asi Nehri'nde su, sediment ve Karabalık (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822)'ta ağır metal birikiminin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, T.C. Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı, 2005; s. 64.

Dameron CT, Harrison MD. Mechanisms For Protection Against Copper Toxicity. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1998; 67(5):1091–97

Danzeisen R, Araya M, Harrison B, Keen C, Solioz M, Thiele D, Mcardle HJ. How reliable and robust are current biomarkers for copper status. 2007; 98(4): 676-683.

Daşdemir F. Şimşir bitkisinin hava kirliliğine sebep olan eser element takibinde bioizleyici olarak kullanılabilirliğinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Kimya Bölümü, Ankara. 2008.

Davis SR, Cousins RJ. Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function. 2000; 130: 1085–1088.

Demirak A, Yılmaz F, Tuna AL, Özdemir N. Heavy metals in water, sediment and tissues of *Leuciscus cephalus* from a stream in southwestern Turkey. *Chemosphere*, 2005; s. 1-7.

Dong W, Simeonova PP, Gallucci R. Toxic metals stimulate inflammatory cytokines in hepatocytes through oxidative stress mechanisms. 1998; 151: 359-366.

Duffus JH, Howard GJ, Worth, *Fundamental toxicology for chemists*. Cambridge royal society of chemistry information services, 1996.

Dural M, Göksu MZL. Investigation of heavy metal levels in economically important fish species captured from the Tuzla lagoon. *Food Chemistry*, 2006; p. 5-7.

Durdu ÖF, Karataş BS, Tunali SP, Büyük Menderes Nehri su kirlilik envanteri. Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat fakültesi, Tarımsal Yapılar ve Sulama Bölümü, Aydın.2012

- Foulkes EC. Some determinants of intestinal cadmium transport in the rat. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*. 1980; 3: 471-481.
- Eaton-Evans J, McIlrath EM, Jackson WE, McCartney H, Strain JJ. Copper supplementation and the maintenance of bone mineral density in middle-aged women. 1996; p. 87-94.
- Ebert MPA, Gu Nther T, Hoffmann J, Yu J, Miehlke S, Schulz HU, Roessner A, Korc M, Malfertheiner P. Expression of Metallothionein I $\alpha$  In Intestinalmetaplasia, Dysplasia, and Gastric Cancer, *Cancer Research*, 2000; 60: 1995-2001.
- Ekşi A. Bazı toksik metal iyonlarının gıdalara bulaşma kaynakları, *Bilim ve Teknik*. 1981; 168: 35-39
- El Ghazi, Martin BL, Armitage IM. Metallothionein-3 is a component of a multiprotein complex in the Mouse, 2006.
- Elinder CG, Cadmium Uses, occurrence and intake In Friberg L, Elinder CG, Kjellstrom T, Cadmium and health, a toxicological and epidemiological appraisal. vol 1. exposure, dose, and metabolism. *Effects and Response*. 1985; p. 23 64.
- Emoto T, Kurasaki M, Oikawa S, Suzuki-Kurasaki M, Okabe M, Yamasaki F, Kojima Y. Roles of the conserved serines of metallothionein in cadmium binding. *Biochemical Genetics*, 1996; 34: 239-251.
- Ercal N, Gurer OH, Aykın BN. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2001; 1: 529-539.
- Fleet JC, Qureshi MA, Dietert RR, McCormick CC. Tissue- Specific accumulation of metallothionein in chickens as influenced by the route of zinc. *Journal of Nutrition*, 1988; 118: 176-182.
- Fowler BA. General subcellular effects of lead, mercury, cadmium, and arsenic. *Environ. Health Perspect* 1978; 22: 37-41.
- Fox S. Nutritional factors that may influence bioavailability of cadmium. *Journal of Environmental Quality*. 1988; 17: 175-180.
- Franson MAH. Standard methods for the examination of water and wastewater 19th edition, american public health association, Washington. 1995.
- Garcia-Santos S, Fontainhas-Fernandes A, Wilson JM. Cadmium tolerance in the nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following acute exposure: assessment of some ionoregulatory parameters. *Environment Toxicology*. 2006; 21: 33-46.
- Gatlin D, Wilson RP. Dietary Cu requirement of fingerling channel catfish, *Aquaculture*, 1986; 54: 277-285.
- George Sg. Cell biochemistry and transmembrane transport of some metals and their compounds in the environment, New York, 1991; s. 511-521.
- Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. Su Ürünleri Kanunu ve Su Ürünleri Yönetmeliği. Ankara, 2002; S. 63-78.
- Gollan JL, Gollan TJ. Wilson disease in 1998: genetic, diagnostic and therapeutic aspects. *Journal of Hepatology*. 1998; 28: 28-36.

- Göksu MZL, Çevik F, Fındık Ö, Sarıhan E. Seyhan baraj gölü'ndeki aynalı sazın ve sudak'larda Fe, Zn, Cd düzeylerinin belirlenmesi. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 2003; 20: 69–74.
- Gürel Z. Investigation of relationship apoptosis and metallothionein in tissues of rat which to cadmium and copper. Doktora Tezi. 2001.
- Güven K. *Biyokimyasal ve Moleküler Toksikoloji*. Dicle Üniversitesi Basımevi Diyarbakır I.Baskı, 1999.
- Hahn SH, Yoo OJ, Gahl WA. Effect of metal ions on the stability of metallothionein in the degradation by cellular fractions in vitro experimental and molecular medicine, 2001; 33: 32–36.
- Halsted JA, Smith JC, Irwin MIA. Conspectus of Research on Zinc Requirements of man. *Journal of Nutrition*. 1997; 104(3): 345-378.
- Handy RD, Eddy FB, Baines H. Sodium-Dependent Copper Uptake Across Epithelia: A Review Of Rationale With Experimental Evidence From Gill and Intestine. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2002; 1566: 104-115.
- Harris ZL, Gitlin JD. Genetic and molecular basis for copper toxicity. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1996; 63(5): 836-841.
- Harvey LJ, Majsak-Newman G, Dainty JR, Lewis DJ, Langford NJ, Crews HM, Fairweather-Tait SJ. Adaptive responses in men fed low and high-copper diets. *British Journal of Pharmacology*. 2003; 90(1): 161-8.
- Hatano R, Ebara M, Fukuda H, Yoshikawa M, Sugiura N, Kondo F, Yukawa M, Saisho H. Accumulation of copper in the liver and hepatic injury in chronic hepatitis C. *J. Gastroenterol. Hepatol*. 2000; 15: 786–791.
- Hawk SN, Uriu-Hare JY, Daston GP, Jankowski MA, Kwikuribe C, Rucker RB, Keen CL. Rat embryos cultured under copper-deficient conditions develop abnormally and are characterized by an impaired oxidant defense system. *Teratology*. 1998; 57: 310–320.
- Heath AG. *Water pollution and fish physiology*. virginia polytechnic institute and state university, Virginia. 1995.
- Heguy A, West A, Richards RI, Karin M. Structure and tissue-specific expression of the human metallothionein IB gene. *Molecular Cell Biology*. 1986; 6: 2149-2157.
- Hidalgo J, Penkowa M, Espejo C, Carrasco J, Quintana A, Molinero A, Florit S, Giralt M. Expression of metallothionein-I, -II, and -III in alzheimer disease and animal models of neuroinflammation. *Experimental Biology and Medicine*. 2006; 231: 1450–1458.
- Hogstrand C, Lithner G, Haux C. Relationship between metallothionein, copper and zinc in perch (*Perca fluviatilis*) environmentally exposed to heavy-metals. *Marine Environmental Research*. 1989; 28: 179–182.
- Hooper PL, Visconti L, Garry PJ, Johnson GE. Zinc lowers high density-lipoprotein-cholesterol levels. 1980; p. 244
- Horky D, Lauschova I, Illek J, Pechova A, Sindelar M. Distribution of exogenous heavy metals in the hepatocytes of calves: a morphometric study microscopy research and technique, 2002; 56: 451–453.

- Ikem A, Egiebor NO. Assessment of trace elements in canned fishes (mackerel, tuna, salmon, sardines and herrings) marketed in georgia and alabama. United States Of America. 2005; 18: 771-787,
- Jarup L, Berglund M, Elinder CG, Nordberg G, Vahter M. Health effects of cadmium exposure a review of the literature and a risk estimate. Scandinavian Journal of Work, Environment ve Health.1998; 24: 1-51.
- Jin R, Chow VT, Tan PH, Dheen ST, Duan W, Bay BH. Metallothionein 2a expression is associated with cell proliferation in breast cancer. Carcinogenesis. 2002; 23: 81-86
- Kaçar B, İnal A. Bitki analizleri, Nobel yayını, Ankara. 2008; 1: 892.
- Kağı JH, Himmelhoch SR, Whanger PD, Bethune JL, Vallee BL. Equine hepatic and renal metallothioneins. Purification, molecular weight, amino acid composition, and metal content. The Journal of Biological Chemistry. 1974; 249: 3537-3542.
- Kağı JH. Overview of metallothionein. Methods in Enzymology. 1991; 205: 613-626.
- Kalay M, Erdem C. Tilapia nilotica' da Kadmiyum birikiminin total protein düzeyine etkisi, The Turkish Journal of Veterinary ve Animal Sciences. 2003; 27: 1367-1374
- Karadede H, Ünlü E. Concentrations of some heavy metals in water, sediment and fish species from the Atatürk Dam Lake (Euphrates)-Turkey, Chemosphere, 2000; 41: 1371-1376.
- Karadede H. Atatürk Baraj Gölü'nde su, sediment ve balık türlerinde ağır metal birikiminin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı. Diyarbakır. 1997; s. 72.
- Kargın E, Erdem C. Bakır-çinko etkileşiminde Tilapia nilotica (L.)'nın karaciğer, solungaç ve kas dokularındaki metal birikimi, The Turkish Journal of Zoology. 1992; 16: 343-348.
- Kartal A. Diyabetli hastalarda planlı eğitim programının sağlık inancına ve diyabet yönetimine etkisinin incelenmesi. Doktora tezi. Ege Üniversitesi. İzmir. 2006; s. 134.
- Katalay S, Parlak H, Arslan ÖÇ, Ege Denizi'nde yaşayan kaya balıklarının karaciğer dokusunda dazı ağır metallerin birikimi, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi. 2005; 22: 385-388.
- Kayhan FE. Su Ürünlerinde kadmiyumun biyobirikimi ve toksisitesi. Ege Üniversitesi Su Ürünleri dergisi. 2006; 23: 215-220.
- Keen CL, Golub MS, Gershwin ME, Lonnerdal B, Hurley LS. Studies of Marginal Zinc Deprivation in Rhesus monkeys; III Use of Liver Biopsy in the assessment of Zinc Status. The American Journal of Clinical Nutrition. 1998; 47: 1041-1045.
- Keen CL, Hanna LA, Lanoue L, Uriu-Adams, JY, Rucker RB, Clegg MS. Developmental consequences of trace mineral deficiencies in rodents: acute and long-term effects. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 2003; 1133: 1477-1480.
- Keleşoğlu T. Trabzon ve yöresinde üretilen/tüketilen tereyağlarında bazı elementlerin atomik absorpsiyon spektrometri (AAS) ve indüktif eşleşmiş plazma-optik emisyon spektrometri (ICP-OES) ile tayinleri. Yüksek Lisans Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü. Trabzon. 2011.
- Kim BJ, Kim YH, Kim S, Kim JW, Koh JY, Oh SH, Lee MK, Kim KW, Lee MS. Zinc as a paracrine effector in pancreatic islet cell death, Diabetes 2000; 49: 367-372.

- King JC, Shames DM, Woodhouse LR. Zinc homeostasis in humans. *Journal of Nutrition*, 2000; 130: 1360–1366.
- King JC. Effect of acute zinc depletion on zinc homeostasis and plasma zinc kinetics in men. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2001; 74: 116–124.
- Kocaman I. Marmara Denizi demersal balıklarında ağır metal kirliliği, Yüksek Lisans Tezi, Ü. Deniz Bil ve Islet. Enst, Kim. Osinog. A.D. İstanbul, 1999; s. 25.
- Kojima Y, Berger C, Vallee BL, Kagi JHR. Amino acid sequence of equine renal metallothionein-1B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1976; 73: 3413-3417.
- Krebs NE, Hambidge M. Zinc metabolism and homeostasis: the application of tracer techniques to human zinc physiology. *Biometals*. 2001; 14: 397–412.
- Lamble KJ, Hill SJ. Microwave digestion procedures for environmental matrices *Analyst* 1998; 123: 103–133.
- Larc A. Cadmium and certain cadmium compounds. In *Iarc monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry. Iarc monographs, Vol. 58. Lyon, France. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer* 1993; 119-146: 210-236.
- Li J, Quabius ES, Wenswlaar Bonga SE, Flik G, Lock RAC. Effects of water-borne copper on branchial chloride cells and Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> Atpase activities in mozambique Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Aquatic Toxicology*. 1998; 43: 1–11.
- Linder MC, Wooten L, Cerveza P, Cotton S, Shulze R, Lomeli N. Copper transport. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1998; 67: 965–971.
- Macdonald RS. The role of zinc in growth and cell proliferation. *Journal of Nutrition*. 2000; 130: 1500–1508.
- Maret W. Cellular zinc and redox states converge in the metallothionein/thionein pair. 2003; 133: 1460–1462.
- Maret W. Zinc coordination environments in proteins determine zinc functions. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2005; 19: 7–12
- Margoshes M, Vallee BL. A cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of the American Chemical Society*. 1957; 79: 813-4814.
- Matusiewicz H. Development of a high pressure / temperature focused microwave heated teflon bomb for sample preparation analytical chemistry 1994; 66: 751–755.
- MEGEP, Meslekî eğitim ve öğretim sisteminin güçlendirilmesi projesi denizcilik balıklar, Ankara. 2006.
- Mc Geer JC, Szebedinszky C, McDonald DG, Wood CM. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd Or Zn in rainbow trout. 1: iono-regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquatic Toxicology*, 2000; 50: 231–243.
- Mieden GD, Keen CL, Hurley LS, Klein NW. Effects of whole rat embryos cultured on serum from zinc- and copperdeficient rats. 1986; 116: 2424–2431.
- Miles AT, Hawksworth G, Beattie JH, Rodilla V. Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2000; 35(1): 35–70.

- Mitropoulos D, Kyroudi-Voulgari A, Theocharis S, Serafetinides E, Moraitis E, Zervas A, Kittas C. Prognostic significance of metallothionein expression in renal cell carcinoma. *World Journal of Surgical Oncology*. 2005; 3(1): 5.
- Minami T, Kubo K, Ichida S. Determination of metallothionein-1 / metallothionein-2 ratios in the mouse liver and pancreas by capillary zone electrophoresis using a polyacrylamidecoated capillary at neutral ph. *journal of chromatography b* 2002; 779: 211–219.
- Mocchegiani E, Bertoni FC, Marcellini F, Malavolta M. Brain, aging and neuro degeneration: role of zinc ion availability. *Progress in Neurobiology*. 2005; 75: 367–390.
- Mormede S, Davies I. Trace elements in deep-water fish sp. from the Rockall Trough, *Fisherles Research* 2001; 51: 197-206.
- Nishimura N, Reeve VE, Nishimura H, Satoh M, Tohyama C. Cutaneous metallothionein induction by ultraviolet b irradiation in interleukin-6 null mice. *j invest dermatol*. 2000; 114: 343–348.
- Nordberg GF, Kjellstrom T, Norberg M. Kinetics and metabolism. In: Friberg L, Elinder CG, Kjellstrom T, Cadmium and health: A toxicological and epidemiological appraisal, vol 1: exposure dose and metabolism. Boca Raton: 1985; 103-178.
- O'dell BL. Bioavailability of and interaction among trace elements. in trace element in nutrition in children New York. 1995; 41-119.
- Oberleas D, Muhrer ME, O'dell BL. Effects of phytic acid on zinc availability and parakeratosis in swine. 1962; 21: 57-61.
- O'dell BL, Savage JE. Effect of phytic acid on zinc availability. *Proc. Soc. Experimental Biology and Medicine* 1960; 103: 304-306.
- Öztürk M, Bat L. Altınkaya Barajı'nda yasayan *C. carpio* türünün çeşitli organ ve dokularındaki bazı ağır metallerin birikimi, 2. Ulusal Ekonomi ve Çevre Kongresi Bildiri. Ankara. 1995; 651-657.
- Park JD, Liu Y, Klaassen CD. protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals. *Toxicology*. 2001; 163: 93–100.
- Pauwels M, Van Weyenbergh J, Soumillion A, Proost P, De Ley M. Induction by zinc of specific metallothionein isoforms in human monocytes. *European Journal of Biochemistry*. 1994; 220: 105-110.
- Petris MJ, Strausak D, Mercer JF. The Menkes copper transporter is required for the activation of tyrosinase. *Human Molecular Genetics*. 2000; 9: 2845–2851.
- Pizarro F, Olivares M, Gidi V, Araya M. The gastrointestinal tract and acute effects of copper in drinking water and beverages. *Reviews on Environmental Health*. 1999; 14(4): 231-8.
- Pope A, Rall DP. *Environmental Medicine. Integrating a Missing Element into Medical Education*. Washington, DC, National Academy Press 1995; 230-231.
- Powell SR. The antioxidant properties of zinc. *Reviews on Environmental Health*. 2000; 130: 1447–1454.
- Prasad AS, Bao B, Beck FW, Kucuk O, Sarkar FH. Antioxidant effect of zinc in humans. *Free Radical Biology & Medicine*. 2004; 37: 1182–1190.



- Prasad AS, Brewer GJ, Shoomaker EB, Rabbani P. hypocupremia induced by zinc therapy in adults. 1998; 240(20): 2166-2168.
- Rether A. Entwicklung und charakterisierung wasserlöslicher benzoylthioharnstoff-funktionalisierter polymere zur selektiven abtrennung von schwermetallionen aus abwässern und prozesslösungen, Doktora Tezi, Münih Teknik Üniveristesi, München, Almanya. 2002.
- Rogers JT, Richards JG, Wood CM. Ionoregulatory disruption as the acute toxic mechanism for lead in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology*, 2003; 64: 215-234.
- Sağlam N, Cihangir N. Ağır metallerin biyolojik süreçlerle biyosorbsiyonu çalışmaları, Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi 1995; 11: 157-161.
- Sağlamtimur B, Cicik B and Erdem C. Kısa süreli bakırkadmiyum etkileşiminde tatlısu çipurası (*Oreochromis niloticus* 1758)'nın karaciğer, böbrek, solungaç ve kas dokularındaki kadmiyum birikimi. *Ekoloji*. 2004; 14(53): 33-38.
- Sağlık Bakanlığı. Birinci Basamağa Yönelik Zehirlenmeler Tanı ve Tedavi Rehberleri, <http://www.hm.saglik.gov.tr/pdf/kitaplar/200704271622380.zehirlenmerhaberleri.pdf>. 2007. Erişim tarihi: 12 Mart 2015.
- Saner G, Neyz O, Ertugrul T. *Pediatric 1, Mineraller*. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi; 1990; p.369-376.
- Sanz V, Andón B, Barbosa J. Characterization of metallothionein isoforms from rabbit liver by liquid chromatography coupled to electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Journal of Chromatography* 2003; 796: 379–393.
- Satarug S, Baker JR, Urbenjapol S, Haswell-Elkins M, Reilly PE, Williams DJ, Moore MR. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicol* 2003; 137: 65-83.
- Satarug S, Moore MR. Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Journal of Chromatography*. 2004; 112(10): 1099–1103.
- Sato M, Kondoh M. Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. *Tohoku*. 2002; 96: 9-22.
- Shim H, Leah Harris Z. Genetic defects in copper metabolism. 2003; 33: 1527–1531.
- Silvestre F, Trausch G, Devos P. Hyper-osmoregulatory capacity of the chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) exposed to cadmium; acclimation during chronic exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2005; 140: 29–37
- Solis-Heredia MJ, Quintanilla-Vega B, Sierra- Santoyo A, Hernandez jm, brambila e, cebrian me, albores a. chromium increases pancreatic metallothionein in the rat. *Toxicology* 2000; 142: 111–117.
- Spencer H, Osis D, Kramer L, Norr SC. İntake, excretion. retention of zinc in man. in prasad as trace elements in human health and disease. New York Academic 1996; 1: 345-359.
- Stagg RM, Shuttleworth TJ. The effects of copper on ionic regulation by the gills of the seawater-adapted flounder *Journal of comparative physiology*, 1982; 149: 83-90.
- Stehbens W. Oxidative stress, toxic hepatitis, and antioxidants with particular emphasis on zinc. *Experimental and Molecular Pathology*. 2003; 75: 265–276.

- Swiergosz R. Cadmium distribution and toxicity in tissues of small rodents. *microscopy research and technique* 2001; 55: 208–222.
- Şengül F. Endüstriyel atık suların özellikleri ve arıtılması, Dokuz Eylül Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Basımevi Ünitesi İzmir. 1991; s.365.
- Thiele DJ. Integrating trace element metabolism from cell to the whole organism. 2003; 133: 1579–1580.
- Thomas AJ, Bunker VW, Hinks U, Sodha N, Mullee MA, Clayton BE. Energy, protein zinc and copper status of twenty-one elderly in patients: analyzed dietary intake and biochemical indices. 1988; 59: 181-194.
- Thornton I. Sources and pathways of cadmium in the environment. IARC Scientific Publications.1 1992; 118: 149-162.
- Tomita T Metallothionein in pancreatic endocrine neoplasms. *Modern Pathology*.2000; 13: 389–395.
- Tomita Y, Kondo Y, Ito S, Hara M, Yoshimura T, Igarashi H, Tagami H. Menkes' disease: report of a case and determination of eumelanin and pheomelanin in hypopigmented hair. *Dermatol*. 1992; 185: 66–68.
- Tosun E. Hastalık tedavisinde kullanılan bazı meyve ve sebzelerin dokularında eser element ve mineral tayini, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Malatya 2009.
- Turnlund JR. Human whole-body copper metabolism. *Modern Pathology*. 1998; 67: 960-964.
- Türkmen A. İskenderun Körfezi'nde deniz suyu, askıdaki katı madde, sediment ve dikenli taş istiridyesi'nde (*Spondylus Spinosus Schreibers, 1793*) oluşan ağır metal birikimi üzerine araştırma, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi. Erzurum, 2003.
- Uğuner. Essensiyel elementler ile toksik olan ağır metallerin canlılar üzerindeki etkileri. Toksikoloji Ders Notları. Trakya Üniversitesi. 2008.
- USEPA. Update of ambient water quality criteria for cadmium. United States Environmental Protection Agency (USEPA). Washington, 2001; 822: 01–001.
- USGS. Minerals yearbook cadmium. U. S. Geological Survey, Reston, Virginia. 1997.
- Ünlü E, Gümgüm B. Concentrations of copper and zinc in fish and sediments from the Tigris river in Turkey, 1993; 26(11): 2055-2061.
- Ünsal M, Yemenicioğlu S. Orta ve Doğu Karadeniz ' de ekonomik önemi olan bazı deniz organizmalarında ağır metallerin belirlenmesi, Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü Müdürlüğü Projesi. Samsun. 1992; s.178.
- Vallee BL. The function of metallothionein. *Neurochem* 1995; 27: 23-33.
- Van Campenhout K, Bervoets L, Blust R. Metallothionein concentrations in natural populations of gudgeon (*Gobio gobio*): relationship with metal concentrations in tissues and environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2003; 22: 1548–1555.
- Vercruyse A, Techniques and instrumentation in analytical chemistry, volume 4. evaluation of analytical methods in biological systems, Part B: Hazardous Metals in Human Toxicology. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers. 1984.

- Vural H. Ağır metal iyonlarının gıdalarda oluşturduğu kirlilikler, *Ekoloji Dergisi* 1993; 8: 3-8.
- Waalkes MP, Goering PL. Metallothionein and other cadmium-binding proteins: Recent developments. *Chemistry Toxicol* 1990; 3: 281-288.
- Webb M. Toxicological significance of metallothionein. *experientia*. Elsevier Science Publishers. 1987; 52: 109-134.
- West AK, Stallings R, Hildebrand CE, Chiu R, Karim M, Richards RI. Human Metallothionein genes: structure of the functional locus at genomics. 1990; 8: 513-518.
- WHO. Air quality guidelines. 2nd edition. Geneva, Switzerland: World Health Organization. [http://www.euro.who.int/air/Activities/20050104\\_1](http://www.euro.who.int/air/Activities/20050104_1). Erişim tarihi: 15 February 2005.
- WHO. Expert Committee: Smoking control strategies in developing countries. Technical report series 695. WHO. Geneva 1985.
- Wittman R, Hu H. Cadmium exposure and nephropathy in a 28 year old female metals worker. *Environ. Health Perspect.* 2002; 110: 1261-1266.
- Wong CK, Chu LM, Heavy metal concentrations in marine fishes collected from fish culture sites in Hong Kong, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2001; 40: 60-69.
- Yabanlı M, Coşkun Y, Öz B, Yozukmaz A, Sel F, Öndeş S. Determination of the content of heavy metal in the lake water and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) obtained from Bafa Lake and evaluation in terms of public health. 2013.
- Zalewski PD, Truong Tran AQ, Grosser D, Jayaram L, Murgia C, Ruffin RE. Zinc metabolism in airway epithelium and airway inflammation: basic mechanisms and clinical targets. 2005; 105: 127-149.
- Zhou Z, Sun X, Kang YJ. Metallothionein protection against alcoholic liver injury through inhibition of oxidative stres. 2002; 227: 214-222.

## ÖZGEÇMİŞ

29.09.1988 tarihinde Malatya’da doğan Tuğçe Bayhan ilk ve orta öğrenimini İnönü İlköğretim Okulu’nda lise öğrenimini Dicle Kolejinde tamamladı. 2006 yılında Balıkesir Üniversitesi Necatibey Eğitim Fakültesi Biyoloji öğretmenliğini kazandı ve 2011 yılında mezun oldu. 2012 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Veteriner) Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başladı.

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca desteğini her zaman hissettiğim, maddi ve manevi hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, bilgisi ve birikimiyle bana yol gösteren çok kıymetli danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Serap ÜNÜBOL AYPAK'a çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri, Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK'e, Anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Funda KIRAL'a, Prof. Dr. Pınar Alkım ULUTAŞ'a, Araş. Gör. Gamze Sevri EKREN'e, doktora öğrencisi Aslıhan İNCİ'ye, Parazitoloji Anabilim dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Süleyman AYPAK'a, Zootekni Anabilim dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Erbay BARDAKÇIOĞLU'na ve Arş. Gör. Mehmet KAYA'ya teşekkürlerimi sunarım.

ICP-OES kullanımında, stokların ve standartların hazırlanmasında bana yol gösteren Adnan Menderes Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde görev yapan Araş. Gör. Dr. Gülşen GÜVEN'e ve Kimyager Neslihan KARACA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın planlanması ve balıkların avlanması sürecinde bilgi ve tecrübesiyle bize yardımcı olan Kemal MENDERES'e teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmam esnasında teşvik, ilgi, sabır ve desteklerini esirgemeyen Barış Nuri OKTAV'a ve varlıklarıyla bana hep destek olan aileme sonsuz teşekkür ederim.