



## Investigation of Hemoglobin Protein Differences in Some Carp Species Compatible with Different Environmental Conditions by Electrophoretic Techniques

Alper Zöngür<sup>1,a,\*</sup>, Naci Değerli<sup>2,b</sup>

<sup>1</sup>Gemerek Vocational School Sivas, Cumhuriyet University, 58840 Gemerek/Sivas, Turkey

<sup>2</sup>Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Science, Cumhuriyet University, 58140 Sivas, Turkey

\*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 30/11/2021 Accepted : 21/02/2022</p> <p><b>Keywords:</b> Isohemoglobin Fish Cyprinidae Cathodic/anodic ratio Electrophoresis</p>	<p>Six different temperate zone species of Cyprinidae family members, which are adapted to different harsh environmental conditions, were analyzed versus cold-acclimated Salmonid. Hemoglobin diversity in the studied species was investigated with a modified form of isoelectric pH: 3.5-10 ampholite system. 6 isohemoglobin bands were observed for cold-acclimated <i>Oncorhynchus mykiss</i> 8 isohemoglobin were observed for <i>Chalcalburnus tarichi</i> 9 for <i>Cyprinion macrostomus</i> and Sarkisla (Sivas) <i>Cyprinus carpio</i>, 11 <i>Garra rufa</i> and finally 12 for Todurge (Sivas) <i>Cyprinus carpio</i>. Cathodic/anodic ratios were found equal to 1 for control and the fish adapted to available conditions. However, these ratios were found below 1 when environmental conditions were changed for fish, which are adapted to these poorly oxygenated conditions. Different environmentally adapted fish species are representing various isohemoglobins bands pattern. The species used as a control group in this study shown the lower isohemoglobin bands form. On the other hand, different forms of temperate climate <i>Cyprinidae</i> family member are produced isohemoglobins bands pattern, and the number of these band were higher than control group, depending on different adaptation conditions. The majority of these protein bands were anodic and it can be said that fish are producing anodic hemoglobin protein, when environmental conditions was changed to poorly oxygenated milieu.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 10(3): 411-418, 2022

## Farklı Çevresel Koşullara Uyumlu Bazı Sazan Türlerinde Hemoglobin Proteini Farklılıklarının Elektroforetik Tekniklerle Araştırılması

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 30/11/2021 Kabul : 21/02/2022</p> <p><b>Anahtar Kelimeler:</b> İzohemoglobin Balık Cyprinidae Katodik/anodik oran Elektroforez</p>	<p>Cyprinidae ailesinin farklı çevresel koşullara uyum sağlamış altı farklı ılıman kuşak türleri, kontrol olarak soğuk-iklim uyumlu Salmonid örneğine karşı incelendi. İncelenen türlerdeki hemoglobin (Hb) çeşitliliği, farklılaştırılmış izoelektrik pH: 3,5-10 amfolit sistem ile incelendi. Soğuk-uyumlu <i>Oncorhynchus mykiss</i> için 6 izohemoglobin bandı gözlemlendi. <i>Chalcalburnus tarichi</i> için 8, <i>Cyprinion macrostomus</i> ve Şarkisla <i>Cyprinus carpio</i> için 9, <i>Garra rufa</i> için 11 ve son olarak Tödürge gölü örneği <i>C. carpio</i> için 12 bant elde edildi. Kontrol grubu ve elverişli koşullara uyumlu balıklar için katodik/anodik oran 1'e eşit iken, bu oran oksijen içeriği düşük koşullara uyum sağlamış olan balıklar için 1'den düşük bulunmuştur. Farklı çevresel koşullara uyum sağlamış balık türleri değişik izohemoglobin bant modelleri sergilemektedir. Çalışmada kontrol olarak kullanılan tür en düşük izohemoglobin bant modeli sergilemiştir. Diğer yandan, Cyprinidae ailesinin farklı ılıman iklim formlarının üyeleri, çevresel farklılığa bağlı olarak, çok farklı izohemoglobin modelleri üretmiştir. Bu proteinler ağırlıklı olarak anodik olup, son olarak çevresel koşullarda oksijen içeriği azaldığında balıkların anodik hemoglobin protein ürettiği tespit edilmiştir.</p>

<sup>a</sup> [alperzongur@gmail.com](mailto:alperzongur@gmail.com)

<sup>b</sup> <https://orcid.org/0000-0003-4946-3199> | [ndegerli@cumhuriyet.edu.tr](mailto:ndegerli@cumhuriyet.edu.tr)

<sup>c</sup> <https://orcid.org/0000-0003-0737-7014>



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

## Giriş

Hemoglobin (Hb) molekülü birçok düşük organizasyonlu canlılar ve temelde omurgalı canlı grupları olmak üzere, tüm dokulara oksijen taşıyan "Hem" grubuna bağlı demir elementi içeren bir proteindir. Ayrıca Hb genleri olan  $\alpha$  ve  $\beta$  globin genleri çevresel faktörlerden etkilenmeye devam ederek gen aileleri içerisinde bulunan ifade edilen ve ifade edilemeyen birçok geni meydana getirmiştir (Wittenberg ve ark., 2002; Vinogradov ve ark., 2006). Polipeptid zincirlerini kodlayan bu genlerdeki çeşitli mutasyonlar sonucunda Hb varyantları meydana gelmiştir. Ayrıca, bu genlerin ekzon bölgesindeki veya bu bölge dışındaki nokta mutasyonlar, insersiyonlar ve delesyonlar gibi çeşitli genetik mekanizmalar Hb varyantlarının oluşumuna yol açmaktadır. Benzer şekilde, homolog olmayan krossing-over sonucu oluşan bazı varyantlar ise normal uzunlukta hibrit (melez) polipeptid zincirleri içermektedir (Huisman, 1993; Baysal ve ark., 1995).

Günümüzde yaklaşık olarak 890 civarında Hb varyantı tanımlanmıştır. Bu varyantlar;  $\alpha$  zincir varyantları,  $\beta$  zincir varyantları,  $\gamma$  zincir varyantları ve  $\delta$  zincir varyantlarıdır. Bu varyantlardan bazıları klinik olarak önemli değildir. Bazıları ise, polimerizasyon, yüksek veya düşük  $O_2$  afinitesi ve kararsızlık gibi etkenlerden oluşan varyantlardır (Hardison ve ark., 2002). Yaygın olarak görülen yapısal Hb varyantları; Hb S, Hb C, Hb E ve Hb D'dir. Bu varyantların hepsi  $\beta$  globin zincir varyantlarıdır (Ingram, 1956).

Vertebrata (omurgalı) hemoglobinleri kırmızı hücre ya da eritrosit hücrelerinde bulunur ve çekirdekli veya çekirdeksiz olabilir. Balıkların çoğunda, eritrositler oval şeklinde çekirdekli, memelilerdekinden daha büyük ve sayıları 800 bin ile 3,5 milyon/mm<sup>3</sup> arasındadır. Ayrıca, farklı balık türlerinde de izohemoglobinlere yaygın bir biçimde rastlanmaktadır. Bazı araştırmacılar, izohemoglobinlerin varlığının adaptasyon amaçlı olduğunu savunmaktadırlar. Zira bunlar birçok fizyolojik talepler ve çevresel oksijen kirliliği durumlarında oksijen taşıma rolünü üstlenmektedir (Brittain, 2005).

Bu çalışmada Van Gölü, Sivas Kangal Balıklı Kaplıcaları Topardıç Dere'si, Sivas Tödürge Gölü ve Sivas Şarkışla ilçesi sınırlarında bulunan küçük bir gölden farklı çevresel koşullara uyum sağlamış Cyprinidae familyasına ait cins gruplarındaki bireylerin Hb molekülleri arasında fark olup olmadığına bakılması hedeflenmiştir. Bu alanlardaki suların özellikleri birbirlerinden farklılık göstermektedir. Van Gölü, Türkiye'nin en büyük gölüdür. Suları yüksek derecede sodalı ve tuzludur. Bu su yapısı göle bir "soda gölü" özelliği kazandırmaktadır. Göl suyunun pH değeri 9,5 civarındadır. Tuzluluğu ise %0,19-0,22 arasındadır (Yiğit ve ark., 2017). Denizlere göre daha fazla potasyum ve lityum içerir. Göl suyundaki karbonat ve bikarbonat iyonları toplam klorür iyonundan fazla olup deniz suyuyla karşılaştırıldığında karbonat iyonları 100 kat fazladır. Sülfat yoğunluğu ve fosfat iyonu denizlerle karşılaştırıldığında oldukça yüksektir. Suyun kimyasal içeriği şu şekildedir; sodyum 7747 mg/L, potasyum 508 mg/L, magnezyum 94,8 mg/L, kalsiyum 5-10 mg/L (%42), klor 5450 mg/L, karbonat 3331 mg/L (%34), sülfat 2344 mg/L (%16), bikarbonat 2191 mg/L, fosfat 0,52 mg/L, çözünmüş oksijen 10,94 mg/L'dir (Degens ve ark., 1978;

Çiftçi ve ark., 2008). Göle dökülen akarsuların kimyasal özellikleri geçtikleri arazinin yapısına bağlı olarak değişmektedir. Akarsularda sodyum en önemli katyon olup, bunun bir kısmı bikarbonat ile dengelenerek Van Gölü'nün bir soda gölüne dönüşmesinde ana rolü oynamaktadır. Bu sebeple göldeki biyolojik çeşitlilik oldukça sınırlıdır. Gölün bu ekstrem su kalitesinde yaşamaya alışmış endemik tek balık türü *Chalcalburnus tarichi* (inci kefalı) dir (Degens ve ark., 1978).

Sivas Şarkışla Gölüne ait fazla bilgi bulunmamaktadır. Ancak, *Cyprinus carpio* örnekleri alınırken suyun özelliği ve pH değeri hakkında bilgiler edinilmiştir. Göl sazlıklaşmaya başlamış oksijen miktarı azalmış ve balıklaşmış bir haldedir. Çalışmamızda ise suyun pH değeri 6-7 arasında belirlenmiştir.

Sivas Kangal Balıklı Kaplıcaları, izotermal olup yıl boyunca sıcaklığı yaklaşık (ort.) 35°C, berrak, kokusuz, aktığı yerde hiçbir çökelti bırakmamaktadır. pH'sı 7,2 olan ve içerisindeki suyun litresinde 1 g bulunan selenyum bu kaplıcaları dünyada eşi olmayan bir alan haline getirmiştir. Çalışmamızda, Topardıç Deresi'nden *Garra rufa* ve *Cyprinion macrostomus* örnekleri alınmıştır.

Sivas Tödürge Gölü, Türkiye'nin en büyük karstik çöküntü gölüdür (Atiker,1993). Suyu alkali özelliklerde olmakla birlikte pH'sının yıllık ortalaması 8,2 civarındadır. Bu gölden *Cyprinus carpio* örnekleri alınmıştır. Suyun diğer özellikleri; fosfat 46,7 µg/L, nitrat 0,56 mg/L, sülfat 311 mg/L, kalsiyum 489 mg/L, sıcaklık ortalama olarak ilkbahar aylarında 15-19°C, yaz aylarında 23-26°C, sonbahar aylarında 13-15°C, kış aylarında 4-10°C arasındadır (Sıvacı ve ark., 2007).

Sivas Tecer Dağ'ı pınar kaynağından *Oncorhynchus mykiss* örnekleri toplanmıştır. Yapılan pH ölçümlerinde pH 7,2-7,5 olarak bulunmuştur. Benzer şekilde, suyun diğer özellikleri; sıcaklık 10,1°C, katyon miktarları Na<sup>+</sup> 0,2 meq/L, K<sup>+</sup> 0,005 meq/L, Ca<sup>++</sup> 1,5 meq/L, Mg<sup>++</sup> 0,9 meq/L, anyon miktarları HCO<sub>3</sub> 1,9 meq/L, Cl 0,26 meq/L, SO<sub>4</sub><sup>-</sup> 0,39 meq/L olarak belirlenmiştir (Ekemen, 2001).

## Materyal ve Yöntem

### Örneklerin Toplanması

Bu çalışmada 5 farklı istasyon seçilmiştir; Tödürge Gölü'nden 17 adet *Cyprinus carpio*, Van Gölü'nden 13 adet *Chalcalburnus tarichi* (inci kefalı), Şarkışla ilçe sınırlarında bulunan gölden 12 adet *Cyprinus carpio*, Kangal balıklı kaplıcasından 10 adet *Cyprinus macrostomus* (beni balığı) ve 10 adet *Garra rufa* (yağlı balık) örneği toplanmıştır. Kontrol grubu olarak ise Sivas Tecer Dağı su pınarından 10 adet *Oncorhynchus mykiss* balığı toplanmıştır. Tüm balık gruplarına ait toplam 72 örnek toplanmış ve balıkların solungaç bölgesi kesilerek daha önce laboratuvar koşullarında hazırlanan (antikoagülant) 0.1M EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) çözeltisiyle birlikte enjektör vasıtasıyla kanları alınıp steril (EDTA'lı) tüplerde saklanmıştır. Tüpler soğuk ortam olarak termos ile muhafaza edilerek laboratuvara getirilip -20°C olan dolapta saklanmıştır. Balık örnekleri; Balık Kepçesi, dip oltası ve serpmeye yardımıyla toplanmıştır.

### **Kandan Hemoglobin İzolasyonu (Hemolizat Hazırlanması)**

Kan hücreleri plazma içinde bulunurlar. Kanın bir antikoagülant ile pıhtılaşması engellendikten sonra kanı santrifüj edersek üstte kalan sarımtırak sıvı plazmayı oluşturur. Çöktürme işleminden sonra tüpün alt kısmında hücre tabakaları görülür. Ağırlıkları nedeni ile alyuvarlar en alttadır ve en fazla olan hücre tabakasıdır. Bunun üzerinde ince beyaz bir tabaka halinde akyuvar tabakası görülür. Ayrıca çok miktarda kan ile çalışıldığında en üstte inci taneleri gibi trombositlere de rastlanılabilir. Bu üst katmanlar dikkatlice pipet yardımıyla alınmış ve uzaklaştırılmıştır. Bu şekilde, balık kanlarından hemoglobin proteini saflaştırılmıştır.

### **Çalışma Solüsyonları**

#### **Solüsyon A**

29,2 g Akrilamid, 0,8 g Bis-akrilamid üzerine hacim 100 mL oluncaya kadar distile su eklendi.

#### **Elektroforez Tamponları**

Üst tampon 20 mM sodyum hidroksit (NaOH), Alt tampon 10 mM fosforik asit olacak şekilde jeller yüklenince hazırlandı.

#### **Coomassie Blue Boyama Solüsyonu**

1 g coomassie blue R-2501 boyası üzerine; 450 mL metanol, 100 mL glasiyel asetik asit, 450 mL distile su eklendi ve Whatman No.1 kâğıdı ile süzülerek kapaklı siyah şişede bekletildi.

#### **Coomassie Berraklaştırma Solüsyonu**

100 mL metanol, 100 mL glasiyel asetik asit, 800 ml distile su ile hazırlandı.

%10 trikloroasetik asit, 10 mM potasyum klorür, %10 amonyum persülfat çözeltileri hazırlandı.

### **Tüplü Jel Sistemi ile İzoelektrik Odaklama**

İzoelektrik odaklama (IEF) jel elektroforez tekniği proteinleri yüklü amfolit varlığında (pH 3,5–10) net yüklerine göre ayırma prensibine dayalı çalışır. Proteinler, yapısında bulunan amino asitlerin yüklerine göre izoelektrik pH'da toplanır ve disk görüntüsü oluşturur. Bu gerekli olan ayırışmayı sağlamak için pH'sı farklı asidik ve bazik özellik gösteren iki farklı tampon kullanılır. IEF sistemi proteinlerin ayrıştırılmasında en etkili ve kesin sonuçları vermesi bakımından tercih edilir. Verimli bir ayırışma için yüksek Volt verebilen güç kaynaklarının kullanılması gerekir.

Bollag ve ark.'nın, (1996) "Protein Methots" adlı kitabında belirtilen IEF protokolü modifiye edilerek uygulanmıştır. Ayrıca çözünürlüğü düşük olan proteinlerin çözünürlüğünü artırmak, protein alt ünitelerini tümünden denatüre ederek alt ünitelerine ayırmak ve net yükünü artırmak için deneysel ortama protokolde belirtildiği gibi 6–8 M arasında üre ilave edilmiştir.

### **Jellerin Hazırlanması**

Jellerin hazırlanmasında, 5,4 mL distile su, 2,0 mL solüsyon A, 48 µl amfolit çözeltisi (pH: 3,5–10), 6 g üre (moleküler saflıkta), 25 µl %10 amonyum persülfat, 20 µl TEMED (N, N, N', N'- Tetrametiletilediamin) kullanıldı.

Cam tüpler aplikatörüne yerleştirildikten sonra konulacak olan üre miktarı ısıtılmış distile su içerisinde çözündürülerek üzerine solüsyon A, amfolit çözeltisi ve klasik örnek yüklemesinden farklı olarak hemoglobin

örneği direk olarak jel karışımının içerisine yukarıda verilen oranlarda konulmuştur. Bu karışım enjektör ile aplikatöre monte edilerek birleşik kap modeliyle applike edildi ve 15 dakika polimerleşme için bekletildi. Hafif polimerize olan tüpler elektroforez tank kabinine monte edilerek üst tampon tüpler içerisine gömülecek şekilde ilave edildi. Tüplerin üst kısmında kalan hava boşluğu ise üstte konulan tampon çözeltisi pipet ile alınarak tüplerin içerisine enjekte edilerek giderildi. Cihaz güç kaynağına bağlanarak ilk bir saat 300V 15 mA ve diğer 2,5 saat ise 500 V 5–8 mA olacak şekilde örnekler 40°C sıcaklıkta sirkülasyon soğutmalı banyo eşliğinde 3,5–4 saat yürütüldü.

### **Jellerin Boyanması**

Jeller boyama kaplarına dikkatlice çıkarıldı. Hazırlanmış olan coomassie blue R-250 boyama solüsyonu jeller içerisine tamamen gömülecek şekilde dökülerek 15-30 dk. (jellerin kalınlığına göre) bekletildi. Daha sonra bantların görünür hale gelebilmesi için bir gece jeller berraklaştırma solüsyonunda bekletildi.

### **Verilerin Değerlendirilmesi**

IEF yöntemi ile bulunan bant profil mesafeleri pH metre çizelgesine göre belirlendi (Katsuhiko, 1973). pH metre çizelgesi şu şekilde hazırlandı. Kullanılan amfolit çözeltisinin pH aralığına göre (3,5–10) her bir pH artışı 1 cm olacak şekilde 6,5 cm'lik cetvel oluşturuldu. Bu 6,5 cm'lik cetvel ile 10 cm'lik resimlerin aynı noktalarda olması için cetvel 10 cm olacak şekilde Microsoft Word belgesinde büyütüldü. Cetvel aralıkları oranı yoluyla da belirlenebilir, ancak oranı ile bulunan rakamlardaki bindelik ve yüzdelik oynamalar pH metrenin yaklaşık 0,5 cm sapmasına neden olmaktadır. Ayrıca, jellerin resimleri çekilirken tam olarak bir araya getirilmesinde ufak pozisyon kaymaları oluşabilmektedir.

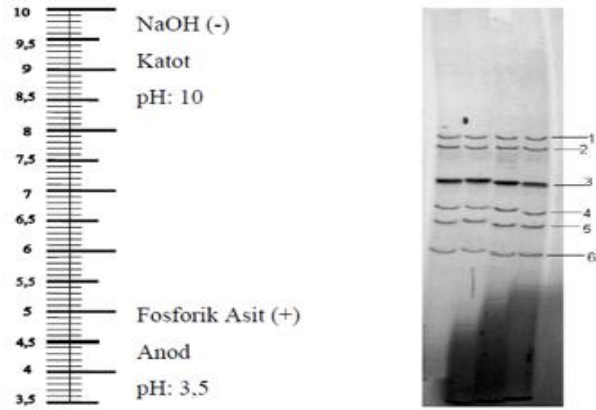
IEF yöntemi ile elde edilen jellerin boyanması sırasında ilk basamak olan KCl'de bekletme işleminden sonra çözeltinin pH'sı ölçülmüş ve pH: 7–8 arasında bulunmuştur. Verilerin değerlendirilmesinde bant profillerine numaralar verilmiş ve bu numaralara göre pH çizelgeleri oluşturulmuştur.

### **Bulgular ve Tartışma**

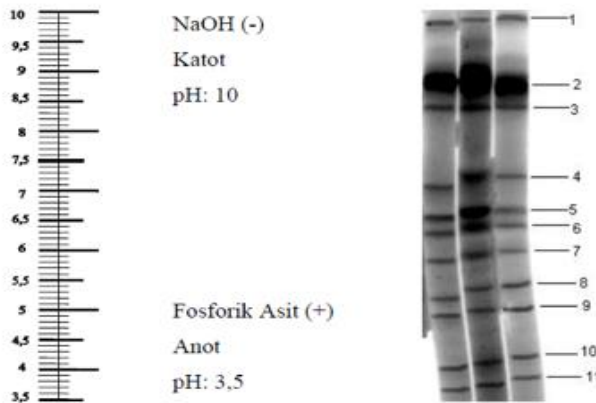
Sivas Tecer Dağ'ı yetiştirme çiftliğinden alınan *Oncorhynchus mykiss* bireyleri birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Kaynakta yapılan pH ölçümünde suyun pH'sı 7,2- 7,5 arasında bulunmuştur. Ayrıca suyun yüksek oksijen miktarına sahip olduğu bilinmektedir (Şekil 1). *Oncorhynchus mykiss* türünün farklı bireyleri arasında yapılan Hb bant profillerinin karşılaştırılması ile tür içinde Hb bant farklılığının olmadığı ve aynı pH noktasında odaklandığı belirlenmiştir. Buna göre anot ve katodik alanlarda proteinlerin eşit sayıda dağılım gözlenmiştir. 3. protein bandının baskın (majör) Hb, 1–2 ile 4–5 ile kendi aralarında daha özdeş (izo) Hb olduğu görülmüştür (Çizelge 1).

Sivas Kangal Balıklı Kaplıcası'ndan alınan *Garra rufa* (yağlı balık) bireyleri birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Balıklı Kaplıca suyunda yapılan pH ölçümünde suyun pH' sı 7,2 bulunmuştur. Ayrıca bu suyun yüksek selenyum miktarına sahip olduğu ve sıcaklığının 35°C olduğu

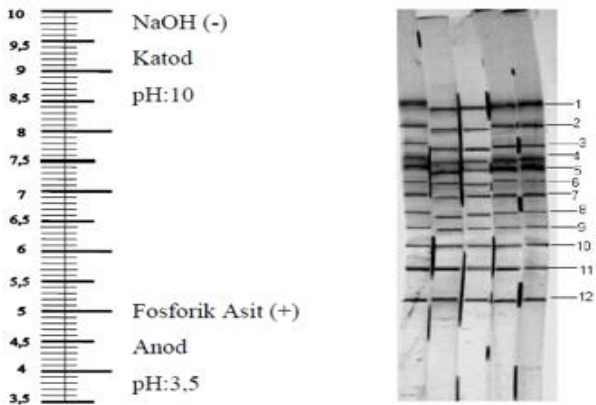
bilinmektedir (Şekil 2). *Garra rufa* türünün farklı bireyleri arasında yapılan Hb bant profillerinin karşılaştırılması ile bireylerin arasında bir bant farklılığının olmadığı ve aynı pH noktasına sahip olduğu belirlenmiştir. pH'ya göre protein dağılımlarına bakıldığında ise: 7 bandın asidik, 4 bandın ise alkali alanda olmak üzere 11 bant olduğu gözlenmiştir (Çizelge 2).



Şekil 1. *Oncorhynchus mykiss* örneklerinin Hb bant profillerinin IEF yöntemi ile belirlenip karşılaştırılması.  
Figure 1. Determination and comparison of Hb band profiles of *Oncorhynchus mykiss* samples by IEF method.



Şekil 2. *Garra rufa* (yağlı balık) örneklerinin Hb bant profillerinin IEF yöntemi ile belirlenip karşılaştırılması.  
Figure 2. Determination and comparison of Hb band profiles of *Garra rufa* samples by IEF method.



Şekil 3. Tödürge *C. carpio* örneklerinin Hb bant profillerinin IEF yöntemi ile belirlenip karşılaştırılması.  
Figure 3. Determination and comparison of Hb band profiles of *C. carpio* (Tödürge) samples by IEF method.

Sivas Tödürge Gölü'nden alınan *C. carpio* bireyleri birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Tödürge Gölü'nün suyunda yapılan pH ölçümünde suyun pH' s 8,6 civarlarında bulunmuştur. Ayrıca bu suyun alkali olduğu bilinmektedir (Şekil 3). Tödürge *C. carpio* türünün farklı bireyleri arasında Hb bant lokasyonlarında bir farklılık olmadığı belirlenmiştir. Gözlemlenen 12 bandın 7'sinin alkali, 5'inin ise asidik lokasyonda olduğu görülmüştür (Çizelge 3).

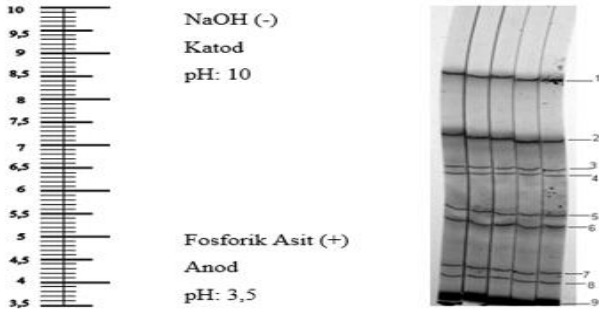
Sivas Şarkışla ilçesinde bulunan sazlık olan büyük su birikintisinden alınan *C. carpio* bireyleri birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Suda yapılan pH ölçümünde suyun pH' s 6,8- 7,0 olarak bulunmuştur. Ayrıca bu suyun çok kirli balçıklaşmış ve sazluklarla kaplı olduğu belirlenmiştir (Şekil 4). Şarkışla *C. carpio* türünün farklı bireylerinin Hb bant profillerinin aynı pH noktasına sahip olduğu belirlenmiştir. 7 bandın asidik, kalan 2 bandın ise bazik alanda yerleşik olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4).

Van Gölü'nden alınan *Chalcalburnus tarichi* bireyleri birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Suda yapılan pH ölçümünde suyun pH' s 9,8 olarak bulunmuştur. Ayrıca bu suyun yüksek miktarda sodalı olduğu da bilinmektedir (Şekil 5). *Chalcalburnus tarichi* türünün farklı bireyleri arasında Hb bant profillerinin karşılaştırılması yapılmış ve 5 bandın asidik, 3 bandın ise bazik alanda yer aldığı tespit edilmiştir (Çizelge 5).

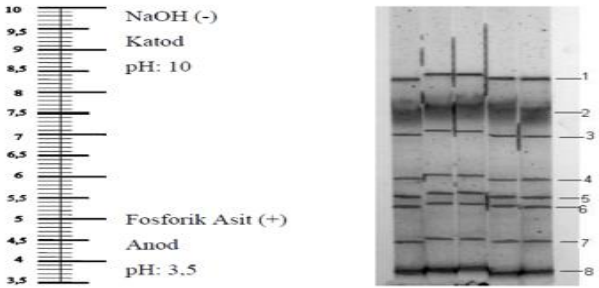
Sivas Kangal Balıklı Kaplıcası'ndan alınan *Cyprinion macrostomus* (beni balığı) bireyleri birbirleri ile karşılaştırılmıştır (Şekil 6). *Cyprinion macrostomus* türünün farklı bireyleri arasında yapılan Hb bant profillerinin karşılaştırılması ile bantların benzer pH noktasında odaklandığı görülmüştür. 6 bant asidik, 3 bant ise bazik alanda tespit edilmiştir (Çizelge 6).

IEF yöntemi ile bulunan tüm bant profilleri Şekil 7'de gösterilmiştir. *O. mykiss* örneğinde bulunan 6 Hb bandı, *G. rufa* örneğinde bulunan 11 Hb bandı, Tödürge *C. carpio* örneğinde bulunan 12 Hb bandı, Şarkışla *C. carpio* örneğinde bulunan 9 Hb bandı, *C. tarichi* örneğinde bulunan 8 Hb bandı, *C. macrostomus* örneğinde bulunan 9 Hb bandı karşılaştırılmıştır. Ayrıca tüm Hb bantlarının odaklanma (pH) noktaları belirlenmiştir. Yapılan belirlemelerde, 7,2 pH'da odaklanan Hb bandının tüm bireylerde ortak olduğu ortaya çıkmıştır. Göze çarpan diğer bulgular ise pH 8,5'in dört türde (Şarkışla *C. carpio*, Tödürge *C. carpio*, *G. rufa* ve *C. tarichi*) ortaklaşa paylaşıldığı, pH: 6,5'in yine dört türde (*O. mykiss*, Şarkışla ve Tödürge *C. carpio*, *G. rufa*) paylaşılma olduğu, pH: 5,6'nın ise yine dört türde (*C. macrostomus*, Şarkışla ve Tödürge *C. carpio*, *C. tarichi*) paylaşıldığı gözlenmiştir. Onun dışında Şekil 7'e bakıldığında bazı türler arasında üçlü ortak protein bantları ve ikili ortak protein bantları olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde, bazı bantların ise türün kendisine özgü olduğu tespit edilmiştir (Şekil 7).

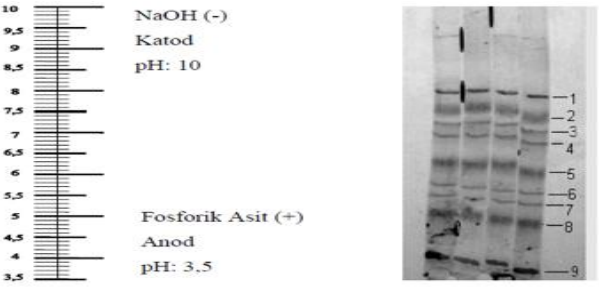
Hemoglobinler, proteinlerin yapı/fonksiyon ilişkisi ile ilgili bilgilerimizin derinliğinin anlaşılmasını sağlayan "Protein Dünyasının Fahri Enzimi" dir (Jensen ve ark., 1998). Özellikle hemoglobin gen ve protein ailesi olarak, *beta* globin gen varyasyonu moleküler bir saat olarak etkin biçimde kullanılmaktadır (Aguileta, 2006). Benzer şekilde balıkların yaşam süreci boyunca uyumsuz olma özelliklerinin kazanılmasında izohemoglobin formları oldukça önemlidir. Çünkü değişken ısı, yani bulunduğu çevresel koşulların sıcaklık ve diğer etkilerine doğrudan maruz kalan balıkların, bu koşullara karşı sergiledikleri uyumsuz özelliklerin en başında Hb proteininde gözlenen varyasyon, ilk göze çarpan biyokimyasal özelliklerin başında gelmektedir.



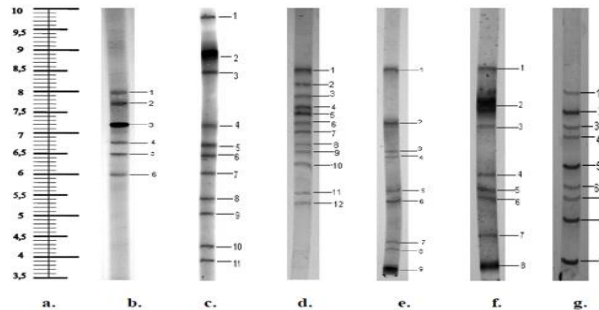
Şekil 4. Şarkışla *C. carpio* örneklerinin Hb bant profillerinin IEF yöntemi ile belirlenip karşılaştırılması.  
Figure 4. Determination and comparison of Hb band profiles of *C. carpio* (Şarkışla) samples by IEF method.



Şekil 5. *Chalcalburnus tarichi* örneklerinin Hb bant profillerinin IEF yöntemi ile belirlenip karşılaştırılması.  
Figure 5. Determination and comparison of Hb band profiles of *Chalcalburnus tarichi* samples by IEF method.



Şekil 6. *Cyprinion macrostomus* örneklerinin Hb bant profillerinin IEF yöntemi ile belirlenip karşılaştırılması.  
Figure 6. Determination and comparison of Hb band profiles of *Cyprinion macrostomus* samples by IEF method.



Şekil 7. IEF yöntemi ile bulunan Hb bant profillerinin tüm türlerde karşılaştırılması (a. pH skalası, b. *O. mykiss*, c. *G. rufa*, d. Tödürge *C. carpio*, e. Şarkışla *C. carpio*, f. *C. tarichi*, g. *C. macrostomus*).  
Figure 7. Comparison of Hb band profiles found by IEF method in all species (a. pH scale, b. *O. mykiss*, c. *G. rufa*, d. Tödürge *C. carpio*, e. Şarkışla *C. carpio*, f. *C. tarichi*, g. *C. macrostomus*).

Çevresel faktörlere bağlı olarak gen ailesi tarafından oluşturulan bu kadar önemli bir biyokimyasal süreçle ilgili yapılan çalışmalar ve kaynaklar bizce yeterli bulunmamaktadır (Hashimoto ve Matsuura, 1960).

Omurgalı ve balık hemoglobini en detaylı araştırılanlar arasındadır. Fakat balık hemoglobini daha çok Antarktik bölgelerde yaşayan balık grubu üzerinde yoğunlaşmaktadır (Jensen ve ark., 1998). Görünen o ki, değişken ısılı genomların çevresel etkilere maruz kaldığında sergilemiş oldukları uyumsal metabolik düzenlemeler, Antarktik alanlar hariç tutulduğunda, balık gruplarında henüz beklenen düzeyde çalışmalarda yer bulamamıştır. Antartik balıklarda özellikle bir işlevsel proteinin genetik olarak belirlenmesine bağlı olarak, Hb proteininin ilgili genoma bağlı bulunduğu çevreye uyum sağlamada, çevrenin nasıl bir seçim baskısı ortaya koyduğunu anlamak açısından önemlidir.

Farklı çevresel koşullara uyum sağlamada hemoglobin proteininin, çalışılan grupların yakınlığına rağmen oldukça farklı protein modelleri içerdiği görülmektedir. Bu farklılık seçilen türlerin yaşam koşullarında gözlenen farklılıklar kadar, değişken ısılı olan balık türlerinin, yaşadıkları koşula bağlı olarak uyumsal fenotipik etkiler ortaya çıkarabilmesi ile mümkün olmaktadır. Yani hemoglobin geninde gözlenen varyasyonun, protein varyasyonu ile sonuçlanan uyumsal değişimle sonuçlanmış olmasından kaynaklanmaktadır. Her ne kadar henüz çalışmaya konu olan balık örneklerinin detaylı olarak gen yapısı çalışılmamış olmasına karşın, protein varyasyonunun teorik temelde gen varyasyonu ile birlikte işlemesi gerektiğinden, globin gen çeşitliliğinin bu türlerde, Antarktik Notothenioid türlerin aksine daha çok artmış olabileceğini düşünmek çok da fazla uzak olasılık gözükmemektedir.

İzohemoglobinlerin artması ve azalması balık türlerinin yetiştiği ve adapte olduğu çevresel koşullara bağlı olarak değişiklikler göstermektedir. Bu konuyla ilgili yapılan birtakım araştırmalar, Antarktika'nın soğuk sularında yaşamakta olan balık türleri için Hb moleküllerinin azaldığını, ılıman ve sıcak sularda yaşayan balık türleri için ise Hb moleküllerinin arttığını işaret etmektedir. Bu artış ve azalışların oksijen miktarı, suyun pH değeri, sıcaklığı ve kirliliği ile bağlantılı olduğunu söylemek tartışmaya açık olmakla birlikte, mümkün gözükmemektedir (Weber, 2000). Soğuk sulara doğru gidildikçe bu adaptasyonun etkisi ileri düzeyde olacak şekilde kritik değişiklikler göstermektedir. Bununla ilgili yapılan bir çalışmada, Notothenioidlerin Cannichthyidae familyası üyelerinin Hb moleküllerini tamamen kaybettiği ve yerine oksijen alımını sağlayacak antifiriz gibi plazma glikoproteinleri içerdiği saptanmıştır (Di Prisco ve ark., 1988). Bu tür formlarda metabolizmada gözlenen azalmalar kadar, suyun kalitesinde gözlenen ileri düzeydeki artışlar (temizlik, oksijen içeriğindeki artış vs.) böylesi bir uyumun ortaya çıkmasında belirleyici rol oynamaktadır.

Temelde aynı türün farklı populasyon bireyleri kendi içinde topluca karşılaştırıldığı uygulamalarda hiçbir birey diğerinden ayrı durmamaktadır. Diğer çalışılan kontrol ve gruplarda ise şu sonuçlar elde edilmiştir. Dış grup olarak seçilen *O. mykiss* türü ılıman iklim kuşağında yaşamakta olan balık türleri arasında su kalitesi açısından oldukça yüksektir ve bu türün hemoglobin bant modelleri çalışılan türler arasında en az sayıdadır (Şekil 1). *Oncorhynchus*

*mykiss* türlerinde 6 farklı izoelektrik noktaya sahip izohemoglobin bantı görülmüştür. Türün farklı bireylerinin bant sayılarında bir farklılık olmadığı ve çevresel koşullara uyum sağlayabilmek için aynı özellikte izohemoglobine sahip olduğu görülmüştür (Şekil 1). Bu bantlardan %50'sinin (3 tanesinin) katodik-bazik, %50'sinin (3 tanesinin) anodik-asidik olduğu saptanmıştır. Bazik ve asidik izohemoglobin miktarları oranlandığı zaman oranın 1 olduğu görülmüştür. Bulunan bu orana göre bireylerin çevresel koşullardan ne kadar etkilendiği ortaya çıkarılmaktadır. Genelde alabalık türleri su kalitesi açısından en iyi koşulları tercih ettiğinden, alınan sonuçlara bakıldığında bu türün bireylerinin bulunduğu bölgeye uyum sağlama bakımından daha az izohemoglobin formuna sahip olduğunu ortaya çıkmaktadır. Sivas Tecer Dağı pınarından alınan *Oncorhynchus mykiss* örneklerinin çevresel koşulları göz önünde bulundurulduğunda, karşılaştırma yapılan diğer gruplar arasında en az oranla etkilendiği bunun nedeninin ise suyun içerisinde bulunan yüksek oksijen miktarı, suyun temizliği ve pH'sı olduğu düşünülmüştür.

*G. rufa* türünün farklı bireyleri birbirleri ile karşılaştırıldığında 11 izohemoglobin bant profili görülmüştür. Türün bireyleri arasında yapılan bant değerlendirmelerinde bir farklılık olmadığı belirlenmiştir (Şekil 2). Bantlardan %36,36'sının (4 tanesinin) katodik-bazik pH'da, %63,63'ünün (7 tanesinin) anodik-asidik pH'ya sahip olduğu saptanmıştır. Bazik ve asidik pH' da bulunan bantlar birbirleri ile oranlandıkları zaman oranın 0,571 olduğu bulunmuştur. Bu sonuca göre *G. rufa* 'nın yaşadığı ortama ve su kalitesine bağlı olarak asidik amino asit içeriğince zengin izohemoglobin oranında belirgin bir artış vardır. Bu balığın yaşadığı suyun en önemli kimyasal özelliği suyun her dönem sıcak olmasıdır. Buda suda çözünen oksijen miktarını azalttığından, oksijen alabilme konusunda artan izohemoglobin içeriği mantıklı gözükmektedir.

Aynı çevresel ortamda uyumlu olan *C. macrostomus* türünün farklı bireylerinde yapılan karşılaştırmada, 9 farklı izoelektrik noktaya sahip izohemoglobin protein bant görüntüsü elde edilmiştir. Değerlendirmelerde türün farklı bireyleri arasında bir bant farklılığı görülmemiştir (Şekil 6). Bulunan bantların, %33,33'ünün (3 tanesinin) katodik-bazik, %66,66'sının (6 tanesinin) anodik-asidik pH'ya sahip olduğu hesaplanmıştır. Bu hesaplama göre bazik ve asidik izohemoglobinler oranlandığı zaman oranın 0,5 olduğu ortaya çıkmıştır.

Sivas Kangal Balıklı Kaplıcaları Topardıç Deresi'nden alınan *G. rufa* ve *C. macrostomus* türlerinde yapılan incelemelerde, iki grubunda bazik ve asidik izohemoglobinleri oranlandığı zaman 0,5 değeri elde edilmiştir. Bu değer aynı olmasının sebebi iki şekilde yorumlanmıştır. Her ne kadar aynı çevresel koşullarda yaşıyor olsalar da iki farklı genus türlerinin buldukları ortama farklı şekilde uyum sağladıkları gözlenmektedir. Çünkü *G. rufa* 11, *C. macrostomus* ise 9 izohemoglobin sentezlemektedir. İkinci yaklaşım ise, protein sayısı farklı olsa da katodik ve anodik proteinlerde gözlenen yaklaşık 0.5'lik değer aynı çevresel koşuldun oksijen alabilme konusunda yeterli olduğudur. Bunun aynı etkiye ve kısıtlamaya maruz kalmanın bir sonucu olduğu düşünülmektedir.

Çizelge 1. *Oncorhynchus mykiss* türünün farklı bireylerinin Hb bant ve pH noktaları

Table 1. Hb band and pH points of different individuals of *Oncorhynchus mykiss*

Hb	1	2	3	4	5	6
pH	8,0	7,7	7,2	6,7	6,5	6,0

Çizelge 2. *Garra rufa* (yağlı balık) türünün farklı bireylerinin Hb bant ve pH noktaları.

Table 2. Hb band and pH points of different individuals of *Garra rufa*

Hb	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
pH	9,8	8,7	8,5	7,2	6,7	6,5	6,0	5,4	5,1	4,3	3,9

Çizelge 3. Tödürge *C. carpio* türünün farklı bireylerinin Hb bant ve pH noktaları.

Table 3. Hb band and pH points of different individuals of *C. carpio* (Tödürge)

Hb	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
pH	8,5	8,2	7,9	7,6	7,4	7,2	7,0	6,7	6,5	6,3	5,6	5,3

Çizelge 4. Şarkışla *C. carpio* türünün farklı bireylerinin Hb bant ve pH noktaları.

Table 4. Hb band and pH points of different individuals of *C. carpio* (Şarkışla)

Hb	1	2	3	4	5	6	7	8	9
pH	8,5	7,2	6,5	6,4	5,6	5,3	4,3	4,2	3,7

Çizelge 5. *Chalcalburnus tarichi* türünün farklı bireylerinin Hb bant ve pH noktaları.

Table 5. Hb band and pH points of different individuals of *Chalcalburnus tarichi*

Hb	1	2	3	4	5	6	7	8
pH	8,5	7,5	7,2	6,0	5,6	5,4	4,5	3,7

Çizelge 6. *C. macrostomus* (beni balığı) türünün farklı bireylerinin Hb bant ve pH noktaları.

Table 6. Hb band and pH points of different individuals of *C. macrostomus*

Hb	1	2	3	4	5	6	7	8	9
pH	8,0	7,5	7,2	6,9	6,2	5,6	5,4	4,9	3,9

Tödürge Gölü'nde yaşayan *C. carpio* türünün farklı bireylerinde yapılan karşılaştırmada 12 farklı izoelektrik noktaya sahip izohemoglobin protein bantı elde edilmiştir. Değerlendirmelerde türün farklı bireyleri arasında bir bant farklılığı görülmemiştir (Şekil 3). Bulunan bantların, %50'sinin (6 tanesinin) katodik-bazik, %41,6'sının (5 tanesinin) anodik-asidik ve %8,33'ünün (1 tanesinin) nötr pH'da odaklanmış olduğu hesaplanmıştır. Bu hesaplama göre bazik ve asidik Hb bant miktarları yüzdesi oranlandığı zaman oranın 1,2 olduğu ortaya çıkmıştır.

Şarkışla su gölcüğünde yaşayan *C. carpio* türünün farklı bireylerinde yapılan karşılaştırmada 9 farklı izoelektrik noktaya sahip izohemoglobin protein bant görüntüsü elde edilmiştir. Türün farklı bireylerinde yapılan incelemelerde bulunan Hb bantlarında bir farklılık görülmemiştir (Şekil 4). Bulunan bantların, %22,22'sinin (2 tanesinin) katodik-bazik, %77,7'sinin (7 tanesinin) anodik-asidik pH'da odaklanmış olduğu hesaplanmıştır. Bu hesaplama göre bazik ve asidik Hb bant miktarları

yüzdesi oranlandığı zaman oranın 0,285 olduğu ortaya çıkmıştır.

Bu aynı türün su oksijen kalitesi açısından farklı olduğu bilinen farklı ortama uyumlu bu iki popülasyonda, bulunduğu çevreye uyum sağlamada tür içi belirgin bir kimyasal farklılaşma sergilenmektedir. Bu, farklılaşan sayıda izohemoglobinin üretiminde gözlemlendiği kadar, amino asit kompozisyonu açısından da farklılık sergilemektedir. Çünkü Şarkışla *C. carpio* popülasyonunda, Tödürge popülasyonuna göre belirgin bir anodik-asidik amino asit içeriğinde artış gözlenmektedir. Aksine Tödürge Göl popülasyonu daha çok nötral denge yönündedir. Bu açıdan bu türün farklı iki popülasyonunun çevresel koşulda gözlenen dramatik değişikliğe vermiş olduğu tepkinin temelinde, hemoglobin proteininin kimyasal farklılaşma yatmaktadır. Zira Şarkışla popülasyonu oldukça yoğun kirli bir sızlıkta yaşamaktadır. Bu oksijen kalitesinin ve pH'nın nötral değeri altında ve hafif asidik yönünde olmasına bağlı olarak, popülasyon bireyleri anodik-asidik amino asit içeriğini artırmaktadır. Tödürge Göl popülasyonu ise alkali bir suda yaşıyor olması nedeniyle burada ise katodik-bazik yönde göreceli olarak bir artış göze çarpmaktadır. Burada pH'daki göreceli olarak düşüşün oksijen çözünürlüğünde belirgin bir azalış meydana getiriyor olması, balıkların anodik-asidik amino asit içeriğini artırma yönünde uyum gücü geliştirmelerinde, bizi Seçim Ajanı olarak iş gördüğünü söylemine yönlendirmektedir. Zira *G. rufa* ile *C. macrostomus*'ta elde edilen 0,5 değeri ile bunlardaki pH'nın yaklaşık olarak nötral değere yakın olması bu beyanımızı destekler niteliktedir. Bunun oksijen bağlamaktan çok, dokulara ulaştığında, oksijeni dolaşımdan hücreye aktarmada fizyolojik bir uyumsal tepkinin sonucu olduğu bilinmekte ve söylenmektedir (Weber, 2007).

*C. tarichi* türünün farklı bireylerinde yapılan karşılaştırmada 8 farklı izoelektrik noktaya sahip izohemoglobin protein bantı elde edilmiştir. Türün farklı bireylerinde yapılan incelemelerde bulunan Hb bantlarında bir farklılık görülmemiştir (Şekil 5). Bulunan bantların, %37,5'unun (3 tanesinin) bazik, %62,5'unun (5 tanesinin) asidik pH'da odaklandığı hesaplanmıştır. Bu hesaplama göre bazik ve asidik izohemoglobinler oranlandığı zaman oranın 0,6 olduğu ortaya çıkmıştır.

Burada elde edilen sonuç, yukarıdaki çıkarımlarla az da olsa çelişiyor gözükse de artan alkali oranı ile oksijen çözünürlüğü, asidik pH'ya göre daha az etkilemesi beklenir (çünkü alkali ortam çözünen CO<sub>2</sub> yi daha hızlı etkisizleştirerek, moleküler oksijen çözünürlüğüne ortam sunacak, asidik pH ise daha çok CO<sub>2</sub> içerdiğinden, oksijen çözünürlüğünü azaltacaktır). Burada asıl nedenin çözünen oksijen miktarı ve bunun Bohr Etkisi, Root Etkisi ile İyonik Fosfat etkisi denilen ayırışmaya sunduğu katkıdır. Birazdan tartışılacağı gibi etkiler bununla da sınırlı değildir. Genel bir sonuca gitmek gerekirse, balık türleri çevresel olarak maruz kaldıkları aşırı koşullara, genel anlamıyla anodik-asidik amino asit kompozisyonu ile yanıt vermektedir.

Bulunan oranlara göre; *O. mykiss* kontrol grubu olarak seçilmiş olmasına bakıldığında diğer türlerin çevresel koşullarına kıyasla daha iyi bir ortamda uyumlu olduğundan katodik ve anodik Hb bantlarının miktarlarının birbirlerine olan oranının (C/A=1) eşit olduğu belirlenmiştir. Bu değere en yakın duran Tödürge *C. carpio* popülasyonudur (C/A=1.2). Bu popülasyon su pH kalitesi açısından alkali durmakta ve diğer iyonik özellikleri karstik

göl kökeni nedeniyle bazı farklılıklar sunmakta, fakat oksijen çözünürlüğü daha iyi durumda bulunmaktadır. Bu açıdan izohemoglobinin sayısı ve kimyasal özellikleri açısından *O. mykiss*'in vermiş olduğu çevresel tepkilere benzer tepkiler sunmaktadır. *G. rufa*, *C. macrostomus*, *C. tarichi* ve Şarkışla *C. carpio* türlerinin katodik ve anodik Hb bant miktarlarının birbirlerine benzer olan oransal düzenlemeye sahip olması, bu türlerin çevresel kısıtlamalara maruz kaldığını açıkça ortaya koymaktadır. Bu dört türde C/A oranı 0-1 arasında değişiklik göstermektedir. Dört türde gözlenen söz konusu çevresel kısıtlama şüphesiz ki oksijen çözünürlüğündeki düşüştür. Şarkışla *C. carpio* türünde ise bu oranın 0.285'e düşmesi, çevresel koşulları zor olan bu türün en fazla etkilendiğini göstermiştir. Topluca bakıldığında oksijen çözünürlüğü açısından katodik/anodik dengelin 1'e yaklaşması, yük dağılımı açısından dengeli bir hemoglobin yapısı oluşumu ortaya koymakta. Tödürge Göl'ündeki *C. carpio* popülasyonu ise alkali özelliğine karşın halen oksijen içeriğindeki yüksekliğe bağlı olarak C/A dengesi 1'e yakın durmasına yol açmaktadır. Diğer türlerde sıcaklık veya görece olarak pH'daki düşüşler ve diğer gerekçeler oksijen çözünürlüğünü düşürdüğünde ise, türler veya bazen popülasyonlar buna asidik amino asit içeriğini artıran bir hemoglobin yapısı (C/A<1'e) ile uyumsal özellik sergilemektedir. Aynı zamanda bu uyumsal özellik değişen izohemoglobin sayısında da farklılık sergilemektedir.

İnsan ve diğer memelilerin temel bir Hb bileşeni içermelerinin aksine, balık ve diğer düşük omurgalı formlarında çoklu hemoglobinlerin varlığı kabul edilmiş bir olgu olarak sunulmaktadır. Balıkların hemoglobin çeşitliliği (aynı bireyde farklı veya aynı gelişimsel biyolojisine bağlı olarak meydana gelen farklı "izohemoglobinler") ve hemoglobin polimorfizmi (aynı türün genetik olarak farklı nesillerin farklı "allohemoglobinleri") içerdiği öteden beri bilinmektedir. Bu çeşitlilik ya genetik-ilişkili heterojenite (gen aktivitesindeki varyasyon) veya genetik olmayan heterojenite (*in vivo* veya *in vitro* kimyasal modifikasyon) sonucu oluşabilmektedir (Weber ve ark., 2001).

Sonuç olarak, ekolojik koşulları açısından oldukça sınırlayıcı özelliklere sahip farklı çevresel koşullara uyumlu olan farklı ve aynı türlerin, yaşam koşulları açısından daha elverişli olan türlere göre hemoglobin proteininde bir varyasyon olduğu göze çarpmaktadır. Balık türlerinde farklılaşan çevre koşullarına bağlı olarak anodik protein içeriği artarken C/A oranında genel olarak bir azalma olmaktadır. Çevresel kısıtlayıcı ne olursa olsun, azalan oksijen miktarı buradaki en belirgin seçim ajanı olarak iş görmektedir. İlgili varyasyonunun protein düzeyde gözlenmesinde kullandığımız izoelektrik yöntemi oldukça etkin sonuçlar sunmaktadır. Çalışma her ne kadar protein saflaştırması ve protein dizi analizleri gibi ilave teknikleri gerektirse de bu haliyle de farklı çevresel koşullara uyumlu türlerin hemoglobin varyasyonunu saptamada yeterli gözükmektedir.

## Teşekkürler

Bu makale Alper Zöngür'ün yüksek lisans çalışmasından çıkartılmıştır. Yazar, CÜBAP (Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri) Destekleme Birimi tarafından, F-240 No'lu proje adıyla maddi destek sağlamıştır. Çalışmamıza maddi destek sağlayan CÜBAP Birimine teşekkür ederiz.

## Kaynaklar

- Aguileta G, Bielawski JP, Yang Z. 2006. Evolutionary rate variation among vertebrate  $\beta$  globin genes: Implications for dating gene family duplication events. *Gene*, 380(1): 21-29.
- Atiker M. 1993. Yukarı Kızılırmak Boyundaki Jips Kartısı Gölleri ve Kızılırmak Kanyonu. *Bilim Teknik*, Ağustos, Ankara.
- Baysal E, Kleanthous M, Bozkurt G, Kyrii A, Kalogirou E, Angastiniotis M, Huisman THJ. 1995.  $\alpha$ -Thalassaemia in the population of Cyprus. *British journal of haematology*, 89(3): 496-499.
- Bollag DM, Edelstein SJ, Rozycki MD. 1996. Protein's methods (No. 547.96 BOL).
- Brittain T. 2005. Root effect hemoglobins. *Journal of inorganic biochemistry*, 99(1): 120-129.
- Çiftçi Y, Işık MA, Alkeveli T, Yeşilova Ç. 2008. Van Gölü havzasının çevre jeolojisi. *Jeoloji Mühendisliği Dergisi*, 32(2): 45-77.
- Degens ET, Stoffers P, Golubic S. 1978. 14. Varve Chronology: Estimated Rates of Sedimentation in The Black Sea Deep Basin.
- Di Prisco G, Giardina B, D'Avino R, Condò SG, Bellelli A, Brunori M. 1988. Antarctic fish hemoglobin: an outline of the molecular structure and oxygen binding properties—II. Oxygen binding properties. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 90(3): 585-591.
- Ekemen T, Kaçaroğlu F, Kavak KŞ. 2006. Tecer Dağının (Sivas) karst hidrojeolojisi incelemesi. *Yerbilimleri*, 27(2): 109-125.
- Hardison RC, Chui DH, Giardine B, Riemer C, Patrinos GP, Anagnou N, Wajcman H. 2002. HbVar: a relational database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations at the globin gene server. *Human mutation*, 19(3): 225-233.
- Hashimoto K, Matsuura F. 1960. Multiple hemoglobins in fish. II. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*, 26: 354-360.
- Huisman TH. 1993. 1 The structure and function of normal and abnormal haemoglobins. *Baillière's clinical haematology*, 6(1): 1-30.
- Ingram VM. 1956. A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle cell anemia hemoglobin. *Nature*, 178(4537): 792-794.
- Jensen FB, Fago A, Weber RE. 1998. Hemoglobin structure and function. *Fish physiology*, 17, 1-40.
- Sıvacı ER, Dere Ş, Kılınc S. 2007. Tödürge Gölünün (Sivas) Epilitik Diatom Florasının Mevsimsel Değişimi. *Su Ürünleri Dergisi*, 24(1): 45-50.
- Vinogradov SN, Hoogewijs D, Bailly X, Arredondo-Peter R, Gough J, Dewilde S, Vanfleteren JR. 2006. A phylogenomic profile of globins. *BMC Evolutionary Biology*, 6(1): 1-17.
- Weber RE, Vinogradov SN. 2001. Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations. *Physiological reviews*.
- Weber RE. 2000. Adaptations for oxygen transport: lessons from fish hemoglobins. In *Hemoglobin function in vertebrates* (pp. 23-37). Springer, Milano.
- Weber RE. 2007. High-altitude adaptations in vertebrate hemoglobins. *Respiratory physiology and neurobiology*, 158(2-3): 132-142.
- Wittenberg JB, Bolognesi M, Wittenberg BA, Guertin M. 2002. Truncated hemoglobins: a new family of hemoglobins widely distributed in bacteria, unicellular eukaryotes, and plants. *Journal of Biological Chemistry*, 277(2): 871-874.
- Yiğit A, İrak ZT, Öztürk D, Öztürk E, Alpaslan D, Şahan T, Aktaş N. 2017. Van Gölü Suyunun İyon Karakterizasyonu ile Su Kalitesinin Belirlenmesi. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 7(4): 169-179.