ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Gülüzar ATLI

BAKIR, ÇİNKO, KADMİYUM, KROM ve GÜMÜŞÜN *Oreochromis niloticus*'un SOLUNGAÇ ve BÖBREK DOKUSUNDAKİ Na^{+}/K^{+}-ATPaz, Ca^{+2}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz ile KAS DOKUSUNDAKİ Ca^{+2}-ATPaz ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2009

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAKIR, ÇİNKO, KADMİYUM, KROM ve GÜMÜŞÜN *Oreochromis niloticus*'un SOLUNGAÇ ve BÖBREK DOKUSUNDAKİ Na^{+}/K^{+}-ATPaz, Ca^{+2}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz ile KAS DOKUSUNDAKİ Ca^{+2}-ATPaz ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Gülüzar ATLI

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez ..../...../..... Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.

İmza:.....	İmza:.....	İmza:.....
Prof. Dr. Mustafa CANLI	Prof. Dr. Seyhan TÜKEL	Doç. Dr. Yakup KASKA
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

İmza:……..	İmza:……
Yrd. Doç. Dr. Ramazan BİLGİN	Yrd. Doç. Dr. Mehmet SULANÇ
ÜYE	ÜYE

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FEF2003D14

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ
DOKTORA TEZİ

BAKIR, ÇİNKO, KADMİYUM, KROM ve GÜMÜŞÜN *Oreochromis niloticus*'un SOLUNGAÇ ve BÖBREK DOKUSUNDAKİ Na^+/K^+-ATPaz, Ca^{+2}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz ile KAS DOKUSUNDAKİ Ca^{+2}-ATPaz ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Gülüzar ATLI

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman: Prof. Dr. Mustafa CANLI
Yıl: 2009, **Sayfa:** 206
Jüri : Prof. Dr. Mustafa CANLI
Prof. Dr. Seyhan TÜKEL
Doç. Dr. Yakup KASKA
Yard. Doç. Dr. Mehmet SULANÇ
Yard**.** Doç. Dr. Ramazan BİLGİN

Tatlısu balığı *Oreochromis niloticus* farklı derişimlerdeki (0, 0,1, 0,5, 1,0, 1,5 µg/mL) Cu^{+2}, Cd^{+2}, Cr^{+6}, Ag^+ and Zn^{+2}'nin 96 saat süreyle ve 0.05 µg/mL derişimindeki aynı metallerin farklı sürelerle (0, 5, 10, 20, 30 gün) etkisine ayrı ayrı bırakılmıştır. Deney süreleri sonunda solungaç, böbrek ve kas dokularında Na^+/K^+-ATPaz, Mg^{+2}-ATPaz, Toplam-ATPaz, Ca^{+2}-ATPaz enzim aktiviteleri ile toplam protein, metal ve iyon düzeyleri (Na^+, K^+, Ca^{+2}, Mg^{+2}) ölçülmüştür.

Kronik uygulamalarda Ag^+ hariç hiçbir metal 30 günlük sürede letal etki göstermemiştir. Ag^+ etkisinde kalan balıkların tamamı 16. gün sonunda ölmüştür. Akut ve kronik uygulamalar ile in vivo ve in vitro koşullarda metaller Na^+/K^+-ATPaz ile Ca^{+2}-ATPaz aktivitesini azaltırken, Toplam-ATPaz ile Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinde azalış yanında artışa da neden olmuştur. Etki süreleri sonunda dokularda genellikle metal birikimi olurken, Ag^+ ve Cr^{+6} düzeyleri saptama sınırlarının altında gözlenmiştir. Toplam protein düzeyleri ise doku, metal, derişim ve etki süresine bağlı olarak artma veya azalma göstermiştir. Metal etkisi sonrasında Na^+ ve K^+ düzeyinde genel azalma, Mg^{+2} ve Ca^{+2} düzeylerindeki artış gözlenmiştir. Metal etkisinde en çok etkilenen Na^+, en az etkilenen ise Mg^{+2} olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Metal, *Oreochromis niloticus*, ATPaz, İyon

ABSTRACT
PhD THESIS

EFFECTS of COPPER, ZINC, CADMIUM, CHROMIUM and SILVER on the Na^+/K^+-ATPase, Ca^{2+}-ATPase and Mg^{2+}-ATPase in GILL, KIDNEY and Ca^{2+}-ATPase ENZYME ACTIVITIES in MUSCLE TISSUE of *Oreochromis niloticus*

Gülüzar ATLI

DEPARTMENT OF BIOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa CANLI
Year: 2009, **Page:** 206
Jury: Prof. Dr. Mustafa CANLI
Prof. Dr. Seyhan TÜKEL
Assoc. Prof. Dr. Yakup KASKA
Asist. Prof. Dr. Mehmet SULANÇ
Asist. Prof. Dr. Ramazan BİLGİN

Freshwater fish *Oreochromis niloticus* were individually exposed to different concentrations (0, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 µg/mL) of Cu^{2+}, Cd^{2+}, Cr^{6+}, Ag^+ and Zn^{2+} for 96 hours and 0.05 µg/mL concentration of same metals for different period of time (0, 5, 10, 20, 30 days). Following each period, Na^+/K^+-ATPase, Mg^{2+}-ATPase, Total-ATPase, Ca^{2+}-ATPase activities, total protein, metal and ion levels were measured in gill, kidney and muscle.

Except Ag^+, none of the metals killed fish within 30 days. Silver killed all fish within 16 days. While metal exposures generally decreased tissue Na^+/K^+-ATPase and Ca^{2+}-ATPase activities, they increased Total-ATPase and Mg^{2+}-ATPase activities beside their decreases after in vivo/in vitro acute and chronic durations. Metals accumulated in the tissues except Ag^+ and Cr^{6+} due to their low levels below the detection limits and total protein levels enhanced or declined depending upon the tissue, metal, concentration and exposure duration. Na^+ and K^+ levels generally decreased, whereas Mg^{2+} and Ca^{2+} levels increased. Na^+ was the most affected ion and Mg^{2+} was the least affected ion after metal exposure.

Keywords: Metal, *Oreochromis niloticus*, ATPase, Ion

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve Doktora eğitimim süresince fikir ve görüşleriyle desteğini eksik etmeyen ve yol gösterici olan danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa CANLI'ya teşekkürlerimi sunarım. Bu süreçte çalışmalarımda bana yol gösteren ikinci tez danışmanım Sayın Prof. Dr Seyhan TÜKEL'e ve Yard. Doç. Dr. Ramazan BİLGİN ile Yard. Doç. Dr. Mehmet SULANÇ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Bu süre içerisinde dostluğu ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan değerli arkadaşım Tüzin AYTEKİN YÜZEREROĞLU ve diğer bölüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca her anlamda beni destekleyen ve yanımda olan sevgili annem Nermin ATLI ve babam Ünal ATLI'ya sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ..... I
ABSTRACT..... II
TEŞEKKÜR..... III
İÇİNDEKİLER..... IV
ÇİZELGELER DİZİNİ..... X
ŞEKİLLER DİZİNİ..... XI
1. GİRİŞ..... 1
1.1. Kadmiyum..... 7
1.2. Bakır..... 9
1.3. Çinko..... 11
1.4. Krom..... 12
1.5. Gümüş..... 13
1.6. Adenozin Trifosfataz (ATPaz) Enzimleri..... 15
1.7. İyonlar..... 22
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR..... 28
3. MATERYAL ve YÖNTEM..... 35
3.1. Materyal..... 35
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler..... 35
3.1.1.1. Metaller ve Asitler..... 35
3.1.1.2. ATPaz Aktivite Ölçümünde Kullanılan Kimyasallar..... 35
3.1.1.3. Protein Analizinde Kullanılan Kimyasallar..... 36
3.1.2. Kullanılan Aletler..... 36
3.2. Yöntem..... 36
3.2.1. Doku Homojenatlarının Hazırlanışı..... 37
3.2.2.ATPaz Enzimlerinin Karakterizasyonu ve Aktivitelerinin Ölçümü.. 38
3.2.3. İnorganik Fosfat Tayini 40
3.2.4. Toplam Protein Analizi..... 41
3.2.5. ATPaz Aktivitesinin Hesaplanması..... 44

3.2.6. Metal ve İyon Analizi…… 45
3.2.7. Metal Derişiminin Hesaplanması…….. 45
3.2.8. İyon derişiminin Hesaplanması…… 49
3.2.9. İstatistik……..51
4. BULGULAR ve TARTIŞMA..... 52
4.1. Bulgular..... 52
4.1.1. ATPaz Karakterizasyonu……..... 52
4.1.2. Akut Uygulama……..…..... 65
4.1.2.1. *İn vivo* ATPaz Aktivitesi…….... 65
4.1.2.1.(1). Kadmiyum……..... 65
4.1.2.1.(2). Bakır……..... 66
4.1.2.1.(3). Çinko……..... 67
4.1.2.1.(4). Krom……..... 68
4.1.2.1.(5). Gümüş…… 69
4.1.2.2. Toplam Protein Düzeyi…….. 74
4.1.2.2.(1). Kadmiyum……..... 74
4.1.2.2.(2). Bakır…….. 75
4.1.2.2.(3). Çinko……..... 75
4.1.2.2.(4). Krom……..... 76
4.1.2.2.(5). Gümüş…… 76
4.1.2.3. Toplam Metal Düzeyi…… 78
4.1.2.3.(1). Kadmiyum……..... 78
4.1.2.3.(2). Bakır…….. 79
4.1.2.3.(3). Çinko……..... 79
4.1.2.3.(4).Krom……... 80
4.1.2.3.(5). Gümüş…… 80
4.1.2.4.Toplam İyon Düzeyi…… 82
4.1.2.4.(1). Sodyum İyon Düzeyi…… 82
4.1.2.4.(1.).(a). Kadmiyum……... 82
4.1.2.4.(1.).(b). Bakır…… 82
4.1.2.4.(1.).(c). Çinko…….. 83

4.1.2.4.(1.).(d). Krom……... 83
4.1.2.4.(1.).(e). Gümüş…… 84
4.1.2.4.(2). Potasyum İyon Düzeyi…….…..... 86
4.1.2.4.(2.).(a). Kadmiyum……..…..... 86
4.1.2.4.(2.).(b). Bakır…… 86
4.1.2.4.(2.).(c). Çinko……... 87
4.1.2.4.(2.).(d). Krom……... 87
4.1.2.4.(2.).(e). Gümüş…… 87
4.1.2.4.(3). Magnezyum İyon Düzeyi……..... 90
4.1.2.4.(3.).(a). Kadmiyum……... 90
4.1.2.4.(3.).(b). Bakır…… 90
4.1.2.4.(3.).(c). Çinko……... 90
4.1.2.4.(3.).(d). Krom……... 91
4.1.2.4.(3.).(e). Gümüş…… 91
4.1.2.4.(4). Kalsiyum İyon Düzeyi…….…..... 93
4.1.2.4.(4.).(a). Kadmiyum……... 93
4.1.2.4.(4.).(b). Bakır…… 93
4.1.2.4.(4.).(c). Çinko……... 94
4.1.2.4.(4.).(d). Krom……... 94
4.1.2.4.(4.).(e). Gümüş…… 94
4.1.2.5. *İn vitro* ATPaz Aktivitesi……... 97
4.1.2.5.(1). Kadmiyum…… 97
4.1.2.5.(2). Bakır……..... 98
4.1.2.5.(3). Çinko……..... 98
4.1.2.5.(4). Krom……..99
4.1.2.5.(5). Gümüş……100
4.1.3. Kronik Uygulama ……..….....105
4.1.3.1. *İn vivo* ATPaz Aktivitesi……... 105
4.1.3.1.(1). Kadmiyum……..... 105
4.1.3.1.(2). Bakır……..... 106
4.1.3.1.(3). Çinko……..... 107

4.1.3.1.(4). Krom……..... 108
4.1.3.1.(5). Gümüş…… 109
4.1.3.2. Toplam Protein Düzeyi…….. 115
4.1.3.2.(1). Kadmiyum……..... 115
4.1.3.2.(2). Bakır…….. 116
4.1.3.2.(3). Çinko……..... 116
4.1.3.2.(4). Krom……..... 117
4.1.3.2.(5). Gümüş…… 117
4.1.3.3. Toplam Metal Düzeyi…… 119
4.1.3.3.(1). Kadmiyum……..... 119
4.1.3.3.(2). Bakır…….. 120
4.1.3.3.(3). Çinko……..... 120
4.1.3.3.(4).Krom……... 121
4.1.3.3.(5). Gümüş…… 121
4.1.3.4. Toplam İyon Düzeyi……... 123
4.1.3.4.(1). Sodyum İyon Düzeyi……. 123
4.1.3.4.(1.).(a). Kadmiyum……... 123
4.1.3.4.(1.).(b). Bakır…… 123
4.1.3.4.(1.).(c). Çinko……... 124
4.1.3.4.(1.).(d). Krom……... 124
4.1.3.4.(1.).(e). Gümüş…… 125
4.1.3.4.(2). Potasyum İyon Düzeyi……..... 127
4.1.3.4.(2.).(a). Kadmiyum……..…..... 127
4.1.3.4.(2.).(b). Bakır…… 127
4.1.3.4.(2.).(c). Çinko……... 128
4.1.3.4.(2.).(d). Krom……... 128
4.1.3.4.(2.).(e). Gümüş…… 129
4.1.3.4.(3). Magnezyum İyon Düzeyi……..... 131
4.1.3.4.(3.).(a). Kadmiyum……... 131
4.1.3.4.(3.).(b). Bakır…… 131
4.1.3.4.(3.).(c). Çinko……... 132

4.1.3.4.(3.).(d). Krom……... 132
4.1.3.4.(3.).(e). Gümüş…… 132
4.1.3.4.(4). Kalsiyum İyon Düzeyi…….…..... 135
4.1.3.4.(4.).(a). Kadmiyum……... 135
4.1.3.4.(4.).(b). Bakır…… 135
4.1.3.4.(4.).(c). Çinko……... 136
4.1.3.4.(4.).(d). Krom……... 136
4.1.3.4.(4.).(e). Gümüş…… 136
4.2. Tartışma..... 139
4.2.1. ATPaz Karakterizasyonu …….. 139
4.2.2. *İn vivo* ATPaz Aktivitesi (Akut Uygulama)…….. 143
4.2.2.1. Kadmiyum…….....147
4.2.2.2. Bakır…… 148
4.2.2.3. Çinko……... 150
4.2.2.4. Krom……... 151
4.2.2.5. Gümüş…… 152
4.2.3. *İn vitro* ATPaz Aktivitesi …… 154
4.2.4. *İn vivo* ATPaz Aktivitesi (Kronik Dönem)…… 157
4.2.4.1. Kadmiyum…….....158
4.2.4.2. Bakır…… 160
4.2.4.3. Çinko……... 163
4.2.4.4. Krom……... 165
4.2.4.5. Gümüş…… 166
4.2.5. Toplam Metal Düzeyi…… 167
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER..... 174
5.1. Sonuçlar..... 174
5.2. Öneriler..... 175
KAYNAKLAR..... 176
ÖZGEÇMİŞ..... 199
EKLER…… 200

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 3.1. Dokularda ATPaz enzimi karakterizasyonunda kullanılan inkübasyon ortamı değerleri ve inkübasyon ortamındaki iyonların derişimleri ……...38

Çizelge 3.2. Dokularda en yüksek ATPaz enzim aktivitesinin ölçüldüğü ortam koşulları ve inkübasyon ortamındaki iyonların son iyon derişimleri..... 39

Çizelge 3.3. Metal standartları ile absorbansları arasındaki regresyon eşitlikleri... 47

Çizelge 3.4. İyon standartları ile absorbansları arasındaki regresyon eşitlikleri…. 49

Çizelge 4.1. Akut metal etkisinde kalan *O. niloticus* dokularındaki toplam metal düzeyleri (µg/g k.a.)…..……..81

Çizelge 4.2. Akut metal etkisinde kalan *O. niloticus* dokularındaki toplam Na^{+} düzeyleri (mg/g k.a.)……..... 85

Çizelge 4.3. Akut metal etkisinde kalan *O. niloticus* dokularındaki toplam K^{+} düzeyleri (mg/g k.a.)…… 89

Çizelge 4.4. Akut metal etkisinde kalan *O. niloticus* dokularındaki toplam Mg^{+2} düzeyleri (mg/g k.a.)…….. 92

Çizelge 4.5. Akut metal etkisinde kalan *O. niloticus* dokularındaki toplam Ca^{+2} düzeyleri (mg/g k.a.)……..... 96

Çizelge 4.6. Kronik metal etkisinde kalan *O. niloticus* dokularındaki toplam metal düzeyleri (µg/g k.a.)……..122

Çizelge 4.7. Kronik metal etkisinde kalan *O. niloticus* dokularındaki toplam Na^{+} düzeyleri (mg/g k.a.)…… 126

Çizelge 4.8. Kronik metal etkisinde kalan *O. niloticus* dokularındaki toplam K^{+} düzeyleri (mg/g k.a.)…… 130

Çizelge 4.9. Kronik metal etkisinde kalan *O. niloticus* dokularındaki toplam Mg^{+2} düzeyleri (mg/g k.a.)……..... 134

Çizelge 4.10. Kronik metal etkisinde kalan *O. niloticus* dokularındaki toplam Ca^{+2} düzeyleri (mg/g k.a.)……..... 138

Çizelge 4.11. Bazı balık türlerinde farklı dokulardaki Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi ortam koşulları……... 140

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. Omurgalı ve omurgasızlarda eser metallerin organizmaya girdikten sonra izleyeceği olası yolları gösteren şekil.....5

Şekil 1.2. Organizmalarda abiyotik parametrelerle antropojenik kirlilik arasındaki ilişkinin çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik tepkileri etkilemesine ait örnekler.....6

Şekil 1.3. Na^+/K^+-ATPaz tarafından Na^+ ve K^+ iyonlarının taşınma mekanizmalarına ait şematik şekil…….....17

Şekil 1.4. Sarkoplazmik retikulum Ca^{+2}-ATPaz enzimine ait yapısal şekil……21

Şekil 3.1. Fosfat derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki……..41

Şekil 3.2. Sığır albumininden hazırlanan standart derişimler ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki……..... 43

Şekil 3.3. Metal derişimleri ve absorbansları arasındaki doğrusal ilişki.....46

Şekil 3.4. İyon derişimleri ve absorbansları arasındaki doğrusal ilişki.....50

Şekil 4.1. a. *O. niloticus*'un solungaç dokusunda 0,003-3,0 mM Ouabain derişimlerinde % Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi……. 52

Şekil 4.1. b. *O. niloticus*'un solungaç dokusunda 60-100 mM NaCl derişimlerinde % ATPaz aktivitesi……..... 53

Şekil 4.1. c. *O. niloticus*'un solungaç dokusunda 10-50 mM KCl derişimlerinde % ATPaz aktivitesi……..... 53

Şekil 4.1. d. *O. niloticus*'un solungaç dokusunda 1-6 mM $MgCl_2$ derişimlerinde % ATPaz aktivitesi……..... 54

Şekil 4.1. e. *O. niloticus*'un solungaç dokusunda 10-50 mM Tris derişimlerinde % ATPaz aktivitesi……..... 54

Şekil 4.1. f. *O. niloticus*'un solungaç dokusunda 1-6 mM ATP derişimlerinde % ATPaz aktivitesi……..... 55

Şekil 4.1. g. *O. niloticus*'un solungaç dokusunda 6,4-8,7 pH aralığında % ATPaz aktivitesi……..... 55

Şekil 4.1. h. *O. niloticus*'un solungaç dokusunda 5-60 ^oC sıcaklık aralığında % ATPaz aktivitesi……..... 56

Şekil 4.2. a. *O. niloticus*'un böbrek dokusunda 0,003-3,0 mM Ouabain derişimlerinde % Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi…… 57
Şekil 4.1. b. *O. niloticus*'un böbrek dokusunda 60-100 mM NaCl derişimlerinde % ATPaz aktivitesi……..... 57
Şekil 4.1. c. *O. niloticus*'un böbrek dokusunda 10-50 mM KCl derişimlerinde % ATPaz aktivitesi……..... 58
Şekil 4.1. d. *O. niloticus*'un böbrek dokusunda 1-6 mM $MgCl_2$ derişimlerinde % ATPaz aktivitesi……..... 58
Şekil 4.1. e. *O. niloticus*'un böbrek dokusunda 10-50 mM Tris derişimlerinde % ATPaz aktivitesi……..... 59
Şekil 4.1. f. *O. niloticus*'un böbrek dokusunda 1-6 mM ATP derişimlerinde % ATPaz aktivitesi……..... 59
Şekil 4.1. g. *O. niloticus*'un böbrek dokusunda 6,4-8,7 pH aralığında % ATPaz aktivitesi……..... 60
Şekil 4.1. h. *O. niloticus*'un böbrek dokusunda 5-60 ^{o}C sıcaklık aralığında % ATPaz aktivitesi……..... 60
Şekil 4.3. a. *O. niloticus* dokularında 0,1-2,0 mM $CaCl_2$ derişimlerinde % Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi…….. 61
Şekil 4.3. b. *O. niloticus* dokularında 0,1-2,0 mM EGTA derişimlerinde % Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi…….. 62
Şekil 4.3. c. *O. niloticus* dokularında 1-6 mM $MgCl_2$ derişimlerinde % Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi…….. 62
Şekil 4.3. d. *O. niloticus* dokularında 10-60 mM Tris derişimlerinde % Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi…….. 63
Şekil 4.3. e. *O. niloticus* dokularında 1-6 mM ATP derişimlerinde % Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi…….. 63
Şekil 4.3. f. *O. niloticus* dokularında 6,4-8,7 pH aralığında % Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi…….. 64
Şekil 4.3. g. *O. niloticus* dokularında 5-60 ^{o}C sıcaklık aralığında % Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi…….. 64
Şekil 4.4. a. Metallerin farklı derişimlerinin 96 saatlik etkileri sonunda

O. niloticus'un solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi……... 70
Şekil 4.4. b. Metallerin farklı derişimlerinin 96 saatlik etkileri sonunda
O. niloticus'un böbrek dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi……..... 70
Şekil 4.5. a. Metallerin farklı derişimlerinin 96 saatlik etkileri sonunda
O. niloticus'un solungaç dokusunda Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi…….. 71
Şekil 4.5. b. Metallerin farklı derişimlerinin 96 saatlik etkileri sonunda
O. niloticus'un böbrek dokusunda Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi……..... 71
Şekil 4.6. a. Metallerin farklı derişimlerinin 96 saatlik etkileri sonunda
O. niloticus'un solungaç dokusunda Toplam-ATPaz aktivitesi…….. 72
Şekil 4.6. b. Metallerin farklı derişimlerinin 96 saatlik etkileri sonunda
O. niloticus'un böbrek dokusunda Toplam-ATPaz aktivitesi……..... 72
Şekil 4.7. a. Metallerin farklı derişimlerinin 96 saatlik etkileri sonunda
O. niloticus'un solungaç dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi……... 73
Şekil 4.7. b. Metallerin farklı derişimlerinin 96 saatlik etkileri sonunda
O. niloticus'un böbrek dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi…….. 73
Şekil 4.7. c. Metallerin farklı derişimlerinin 96 saatlik etkileri sonunda
O. niloticus'un kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi…… 74
Şekil 4.8. a. Metallerin farklı derişimlerinin 96 saatlik etkileri sonunda
O. niloticus'un solungaç dokusunda toplam protein düzeyi……77
Şekil 4.8. b. Metallerin farklı derişimlerinin 96 saatlik etkileri sonunda
O. niloticus'un böbrek dokusunda toplam protein düzeyi……...77
Şekil 4.8. c. Metallerin farklı derişimlerinin 96 saatlik etkileri sonunda
O. niloticus'un kas dokusunda toplam protein düzeyi…….78
Şekil 4.9. a. Metallerin farklı derişimlerinin *in vitro* etkileri sonunda
O. niloticus'un solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi……... 101
Şekil 4.9. b. Metallerin farklı derişimlerinin *in vitro* etkileri sonunda
O. niloticus'un böbrek dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi…….. 101
Şekil 4.10. a. Metallerin farklı derişimlerinin *in vitro* etkileri sonunda
O. niloticus'un solungaç dokusunda Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi…… 102
Şekil 4.10. b. Metallerin farklı derişimlerinin *in vitro* etkileri sonunda
O. niloticus'un böbrek dokusunda Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi……..... 102

Şekil 4.11. a. Metallerin farklı derişimlerinin *in vitro* etkileri sonunda *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Toplam-ATPaz aktivitesi…….. 103
Şekil 4.11. b. Metallerin farklı derişimlerinin *in vitro* etkileri sonunda *O. niloticus*'un böbrek dokusunda Toplam-ATPaz aktivitesi……..... 103
Şekil 4.12. Metallerin farklı derişimlerinin *in vitro* etkileri sonunda *O. niloticus*'un kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi…… 104
Şekil 4.13. a. 0,05 µg/mL metal etkisinde farklı sürelerde *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi……. 111
Şekil 4.13. b. 0,05 µg/mL metal etkisinde farklı sürelerde *O. niloticus*'un böbrek dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi……. 111
Şekil 4.14. a. 0,05 µg/mL metal etkisinde farklı sürelerde *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi…… 112
Şekil 4.14. b. 0,05 µg/mL metal etkisinde farklı sürelerde *O. niloticus*'un böbrek dokusunda Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi…….. 112
Şekil 4.15. a. 0,05 µg/mL metal etkisinde farklı sürelerde *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Toplam-ATPaz aktivitesi……... 113
Şekil 4.15. b. 0,05 µg/mL metal etkisinde farklı sürelerde *O. niloticus*'un böbrek dokusunda Toplam-ATPaz aktivitesi……..... 113
Şekil 4.16. a. 0,05 µg/mL metal etkisinde farklı sürelerde *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi…… 114
Şekil 4.16. b. 0,05 µg/mL metal etkisinde farklı sürelerde *O. niloticus*'un böbrek dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi……..... 114
Şekil 4.16. c. 0,05 µg/mL metal etkisinde farklı sürelerde *O. niloticus*'un kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi……..... 115
Şekil 4.17. a. 0,05 µg/mL metal etkisinde farklı sürelerde *O. niloticus*'un solungaç dokusunda toplam protein düzeyi……118
Şekil 4.17. b. 0,05 µg/mL metal etkisinde farklı sürelerde *O. niloticus*'un böbrek dokusunda toplam protein düzeyi……118
Şekil 4.17. c. 0,05 µg/mL metal etkisinde farklı sürelerde *O. niloticus*'un kas dokusunda toplam protein düzeyi…… 119

1. GİRİŞ

İnsan kaynaklı molekül veya enerjinin doğrudan ya da dolaylı girişimi sonucu oluşan kirlilik canlı organizmalar ve hatta insanlar için zararlı etkilere yol açabilmektedir. Günümüzde araştırıcılar suyun paradoksal rolünü yaşam kaynağı ve kirleticilerin eliminasyonu için bir döngü olarak tanımlamaktadırlar. Bu paradoks, doğa ile teknoloji arasındaki çelişki ile artış gösteren günümüzdeki çevresel krizin bir parçası olarak düşünülmektedir. Sucul ortamlar, insanoğlunun yol açtığı çeşitli aktiviteler sonuncu ksenobiyotikler tarafından artan düzeylerde etkilenmektedir. Bunlardan metaller ve pestisitler gibi bazıları oldukça zararlı etkiler göstermekte ve bu etkileri biyolojik birikimleri ile artış gösterebilmektedir (De la Torre ve ark., 2000). Endüstri, ziraat ve madencilikte yaygın olarak kullanılan ve ekolojik tehlike oluşturan bakır, civa, kurşun, kadmiyum vb. ağır metalleri içeren çeşitli kimyasalların kullanımlarındaki artışın çevreyi kirlettiği bilinmektedir. Atmosferik depozisyon, atıklar, aerosol presipitasyonu ve yağmurların yıkayıcı etkisi ve diğer kaynaklar aracılığı ile çevreye yayılan ağır metallerin çoğu için son durak olması nedeniyle sucul ortamlar hassas olarak kontrol edilmesi gereken biyotoplardır.

Yapılan birçok çalışma ile ağır metallerin yüksek derişimlerde sucul organizmalar için letal olduğu gösterilmiştir (Eisler ve Hennekey, 1977; Mance, 1987; Canlı, 1995). Sucul bir organizma için letal doz, hem metale hem de organizmaya bağlıdır. Metallerin organizmalara gösterdikleri toksik etkilerin kimyasal yapıları ile doğrudan ilişkili olduğu ve toksik olanlarının biyolojik olarak parçalanma özelliği göstermediklerinden ekosistemde uzun süre kalabildikleri bilinmektedir (Tagliari ve ark., 2004). Metaller, sadece önemli bir ekosistem bileşeni olmayan aynı zamanda besin kaynağı olarak kullanılan balıklarda fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmaların bütünlüğünü bozabilmektedir (Hogstrand ve ark., 1999; Basha ve Rani, 2003). Balıklarda akut etkenlere karşı gösterilen doğal fizyolojik reaksiyon canlının en önemli fonksiyonlarından biridir (Lappivaara ve Marttinen, 2005). Bazı metaller redoks-aktif özelliğinde olup toksik etkilerinin neden olduğu biyokimyasal tepkilere ek olarak oksidatif strese neden olabilmektedir. Metallerin neden olduğu oksidatif hasarın sonucunda ATPaz enzimlerinin

inhibisyonu ile ilişkili osmoregülatör hasar, metallothionein fonksiyonu ve metal bağlamasında değişiklikler ile doku elektrolit kaybı ve bunlarla ilişkili hücre zarlarında lipit peroksidasyonu gözlenebilmektedir (Canlı ve Stagg, 1996; Wong ve Wong, 2000; Ribeiro ve ark., 2002; Dautremepuits ve ark., 2004; Atlı ve Canlı, 2007).

Su ortamında kirleticilerin bulunması, bu maddelerin çeşitli enzimlerin aktivitelerinde ve esansiyel metallerin içeriklerindeki değişimlerle birçok fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikleri meydana getirdiğinden balıklar için çok önemli bir sorun oluşturmaktadır (Ariyoshi ve ark., 1990). Kadmiyum ve civa gibi toksik ağır metallerin yüksek derişimlerinin balıklarda büyümede gecikmeye ve deformasyona neden olmalarından dolayı bu metallerin sucul habitatlarda yaygın olarak bulunması önemli bir çevresel endişe uyandırmaktadır (Zafarullah ve ark., 1990). Diğer sucul organizmalarda olduğu gibi balıklar da metal toksisitesine karşı hassaslardır. Bu hassasiyet, türden türe çeşitlilik gösterdiği gibi suyun yapısı ile de doğrudan ilişkilidir.

Balıklar ortamdaki ağır metali besin, su ve vücut yüzeyinden absorbsiyon yoluyla, en çok da solungaçlar aracılığıyla almaktadır (Simkiss ve Taylor, 1989; Viarengo, 1989). Balıkta akut etki sonucu en fazla hasar gören organın solungaç olduğu düşünülmektedir (Olsvik ve ark., 2001). Balıklarda solungaç gaz alış verişi, asit baz dengesi, iyon (Na^{+}, Cl^{-} ve Ca^{+2}) taşınması ve azotlu atıkların atımında görev alan çok fonksiyonlu bir organdır. Solungaçlar sekonder lamellerin bulunduğu bir çift primer filament içeren 4 çift solungaç yayından oluşmuştur. Filament ve lameller, kan damarları ile desteklenen klorid hücreler ve mukus hücreleri gibi epitelyal hücreleri içermektedir. Böylece solungaç epitelyumu iyon taşınması ve gaz alış verişini kolaylaştırmak için dış ortamla etkileşecek geniş bir yüzey alanı sağlar. Buna karşılık yüksek damarlı yapıya sahip olması nedeniyle epitelyum aynı zamanda toksik maddeler için birincil hedef olmaktadır (Watson ve Benson, 1987; Wong ve Wong, 2000; Garcia-Santos ve ark., 2006). Solungaçlar elektrokimyasal gradiente karşı gerçekleştirilen, deniz suyundan pasif olarak giren fazla miktardaki NaCl'nin atılmasında ve de tatlı sularda bunun tersi olarak ortamdan NaCl alımından sorumlu temel osmoregülatör organdır. Solungaç epitel hücrelerinde bulunan, hem tatlı su

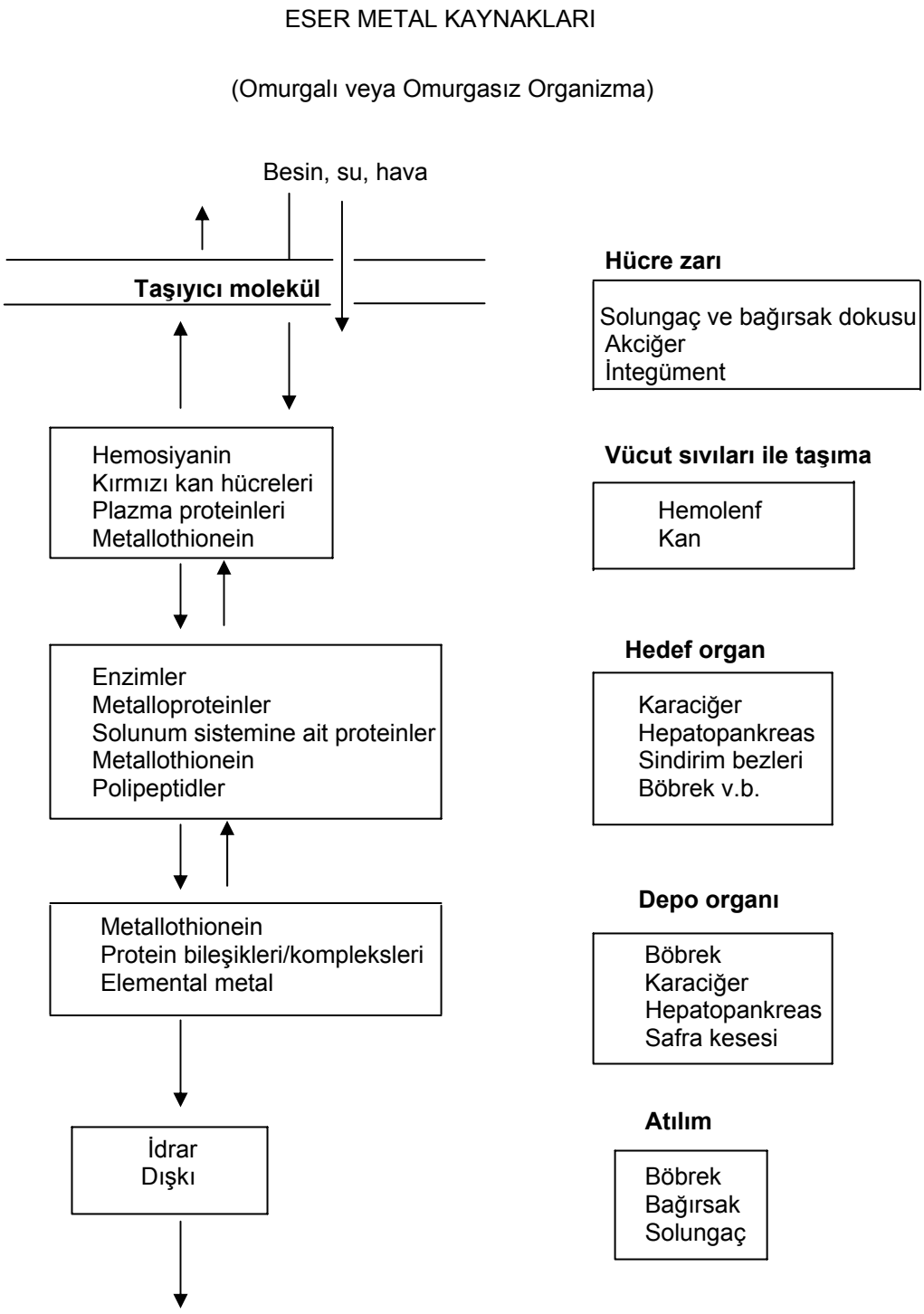
hem de deniz balıklarında aktif elektrolit taşınmasında görevli Na^{+}/K^{+}-ATPaz enzimi de osmotik düzenin sağlanmasında önemli role sahiptir (Canlı ve Stagg, 1996; Ay ve ark., 1999). Tatlı su balıklarında Cu^{+2} ve Zn^{+2} gibi gerekli metallerin solungaç epitellerinden aktif taşıma ile alındığı ve Cu^{+2}'nin Na^{+} kanalı, Zn^{+2}'nin de Ca^{+2} kanalı yoluyla solungaç epitelyum hücrelerine geçtiği belirtilmiştir (Wood ve ark., 2002). Balık, metal birikiminden kaçınmak için ilk savunma mekanizması olarak metalleri bağlayan ve organizmanın dışında tutan mukus salgılamaktadır (Handy ve Eddy, 1990; Olsvik ve ark., 2001). Karaciğer, dalak ve böbrek ise, su veya diyet kaynaklı uzun süreli metal etkisinde zarar gören organlardır (Spry ve Wiener, 1991; Olsvik ve ark., 2001).

Bir organizma tarafından alınan ağır metallerin toksik etkileri, atılım, metabolik, depolama ve detoksifikasyon mekanizmalarının alınım hızına yetişemedikleri durumda ortaya çıkmaktadır (Heath, 1987; Ay ve ark., 1999). Bu kapasite cinsiyet, tür, populasyon ve her bir birey arasında çeşitlilik gösterebildiği gibi organizmanın gelişim safhasına da bağlı olabilmektedir (Heath, 1987; Canlı, 1996). Sıcaklık, gün uzunluğu, besin ve tuzluluk gibi çevresel şartlar alınım, biyotransformasyon ve eliminasyon mekanizmalarının kinetikleri üzerinde önemli etkilere sahiptir (Baykan ve ark., 2007).

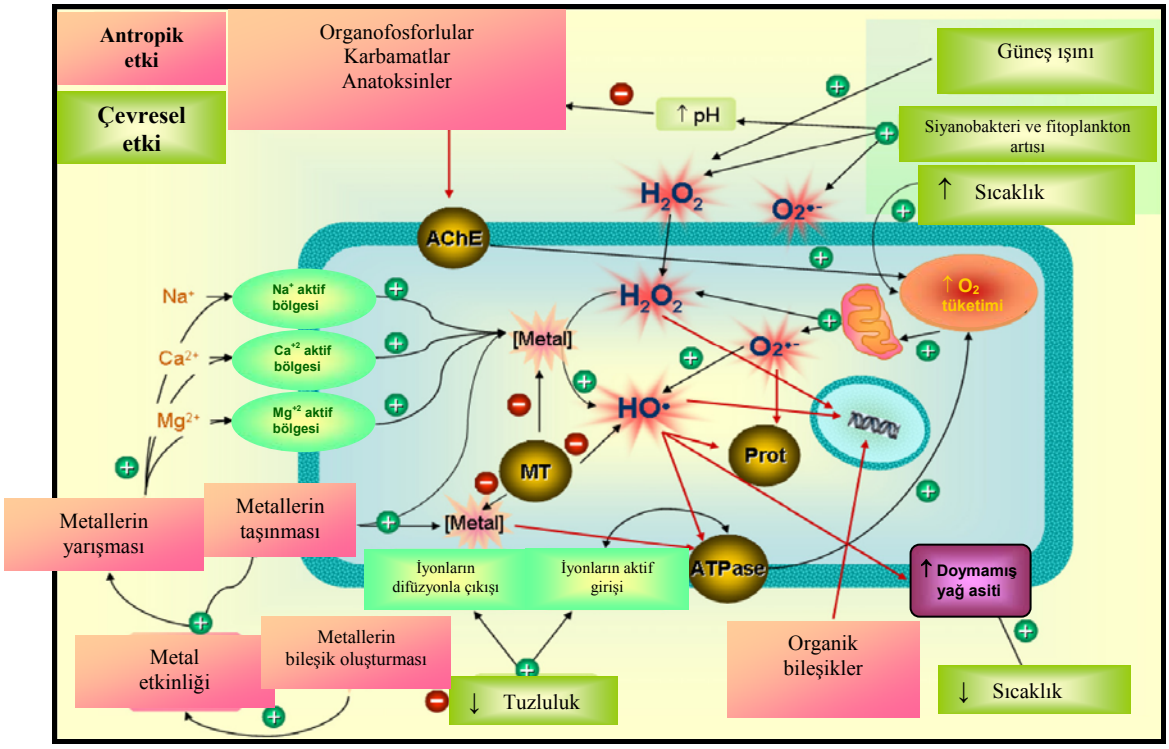
Kirlilik ve biyojeokimyasal mekanizmalarla eser metallerin artan derişimlerinin etkisinde kalan sucul organizmalar için civa, kadmiyum, kurşun ve gümüş gibi bazı ağır metallerin gerekli olduğuna ilişkin herhangi bir kanıt bulunamamaktadır. Metaller vücutta biriktirildikleri zaman, metabolik yollar bu metalleri besin değerlerine veya toksik özelliklerine dayanarak elimine etmekte, alıkoymakta ya da bu metallerden faydalanabilmektedir (Engel ve Brouwer, 1984). Eser metaller ya bulundukları sucul ortamdan, ya da besin ile organizmaya girebilirler. Alınım yolları eser metallerin alınım miktarını ve dokulara dağılımını da etkileyebilmektedir (Engel, 1983; Engel ve Brouwer, 1984). Dolaşım sistemi tarafından emilimlerinin ardından metaller normal metabolizmada kullanıldıkları, atıldıkları veya alı kondukları organlara taşınmaktadırlar (Engel ve Brouwer, 1984; Brouwer ve ark., 1986). Bunun yanında Cu^{+2}, Zn^{+2}, Fe^{+2}, Co^{+2}, Se^{+4} ve Mn^{+2} gibi geçiş metalleri, biyolojik fonksiyonlarda görev alan proteinlerin integral bileşenlerini

oluşturduklarından birçok organizma için gereklidirler. Bu elementlerin önemleri, geniş aralıkta koordinasyon geometrisi ve redoks durumları oluşturarak birçok hücresel yapıyla etkileşmeleri ve hücresel solunum, oksijen taşınması, protein stabilitesi, serbest radikallerin yakalanması, DNA transkripsiyonu ve birçok hücresel enzim fonksiyonu gibi önemli roller üstlenmelerinden ileri gelmektedir. Buna karşılık bu metaller yüksek düzeylerde, biyolojik olarak duyarlı moleküllere bağlanarak veya tehlikeli serbest radikaller oluşturarak toksik özellik göstermektedirler. Organizmalar için absorbsiyon ile atılımın dengede tutularak metal homeostazisinin düzenlenmesi oldukça önemlidir (Bury ve ark., 2003).

Eser metaller fazla miktarda alındıklarında, alıkonma ve atılım mekanizmaları ile bunların diğer biyolojik öneme sahip moleküllerle etkileşimleri önlenmektedir (Engel ve Brouwer, 1984). Çevreden alınan metaller genellikle proteinlere bağlanarak kan yoluyla, depo bölgelerine veya transformasyon yada depolama için karaciğere taşınmaktadır. Karaciğer tarafından transforme edilen metaller burada depolanmakta veya safraya gönderilmekte yada böbrekler tarafından atılmak üzere kana geri dönmektedir (Şekil 1.1.). Bir şekilde kontrol edilemeyen metaller, imidazol, karboksil ve özellikle sülfidril grubu içeren proteinler üzerinde çeşitli bölgelere bağlanabilmekte ve bunun sonucunda düzenleyici fonksiyonların kaybına yol açabilecek konformasyonel değişikliklere neden olmaktadır (Heath, 1987). Metaller değişik kirleticiler arasında en çok çalışılan gruptur ve genel olarak metallerin birikimi ile büyüme, beslenme ve üreme sistemlerine etkileri ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (Santos ve ark., 2000; Bianchini ve ark., 2005). Tuzluluk metal toksisitesini ve sonuçta su ortamından alınımını etkilemektedir (Monserrat ve ark., 2007). Metallerin toksik etkileri denizlere göre tatlı sularda daha fazla olmaktadır. Bu farklılığın su kimyası ve metallerin birikim yollarıyla ilişkili olduğu belirtilmiştir (Bianchini ve ark., 2004). Metal birikimi, organizmanın bulunduğu ortam ve çevreyle ilişkili yüzeyleri arasındaki metal alım oranı tarafından belirlenir ve sucul organizmalar için bu biyolojik bariyerler su kaynaklı olanlar için solungaçlar, besin kaynaklı olanlar için ise bağırsaklardır. Aynı zamanda metal formu, spesifikliği ve ligantlarla bileşik oluşturma potansiyeli gibi dış etkenler birikim oranını etkilemektedir (Andres ve ark., 2002; Atlı ve Canlı, 2008a) (Şekil 1.2.).



Şekil 1.1. Omurgalı ve omurgasızlarda eser metallerin organizmaya girdikten sonra izleyeceği olası yolları gösteren şekil (Engel ve Brouwer, 1984).



Şekil 1.2. Organizmalarda abiyotik parametrelerle antropojenik kirlilik arasındaki ilişkinin çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik tepkileri etkilemesine ait örnekler. Siyah okların belirttikleri (+) ve (-) semboller, biyotik ve abiyotik çeşitliliğin biyokimyasal, fizyolojik veya çevresel faktörlere etkisini göstermektedir. Kırmızı oklar ise hedef moleküller üzerinde kirletici veya diğer kimyasal türlerin zararlı etkilerini belirtmektedir (Monserrat ve ark., 2007).

Sucul organizmalar, akut metal kontaminasyonunun daha az sıklıkla etkisinde kalırken, genellikle uzun süreli ve düşük düzeydeki derişimlerinin etkisinde kalırlar. Kronik ve akut stres farklı ekolojik şartları belirtmektedir ve organizmalar bu şartlara özel moleküler, biyokimyasal, fizyolojik veya morfolojik tepkilerle dayanmaktadır. Bu anlamda kronik stresin genellikle letal toksik madde derişimine artan dirençlilik olarak tanımlanan olası uyum mekanizmalarını indüklediği bilinmektedir (Silvestre ve ark., 2005).

Su kaynaklı metal etkileri sırasında birincil hedef olan solungaçlarda aktif iyon alımının bozulduğu ve iyonik homeostazisinin zarar gördüğü belirtilmektedir. İyon düzenlenmesindeki hasar, tüm vücut kompozisyonunu da yansıtmaktadır (Pelgrom ve ark., 1995). Watson ve Benson (1987), solungaç epitellerini geçen Cd^{+2}'nin solungaç hasarının ve balık ölümlerinin temel nedeni olduğunu belirtmiştir.

Metabolik bakımdan aktif olan karaciğer, dalak ve böbrek dokularının birikimde öncelik göstermesi, ağır metallerin metabolizmayı etkilemesi ve bu organların metal detoksifikasyonu ile yakından ilişkili olmalarından ileri gelmektedir (Sarkar ve ark., 1989). Bununla birlikte balıklarda kas dokusu besin zinciri yoluyla insanlar tarafından da çok tüketildiğinden, sucul ekosistemlerde Hg^{+2} gibi metal kirliliğinin belirlenmesinde duyarlı ve seçici bir özellik göstermektedir (Heath, 1987; Szefer ve ark., 2003). Balıklarda kas dokusu metal birikimi bakımından etkin bir doku olmamasına karşın balığın besin olarak tüketilebilir kısmını oluşturması ve insan sağlığını yakından ilgilendirmesi nedeniyle kas dokusundaki metal birikiminin incelendiği çok sayıda araştırma bulunmaktadır (De Conto Cinier ve ark., 1998; Canlı ve Atlı, 2003; Atlı ve Canlı, 2008a). Bununla ilgili olarak *Tilapia nilotica* (Erdem, 1990) ve *Oncorhynchus mykiss*'de (Melgar ve ark., 1997) Cd^{+2}'nin kas dokusundaki birikiminin çok düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir. Canlı ve Atlı (2003), Karataş'tan alınan farklı boy ve ağırlıktaki balık türlerinde Cd^{+2}, Cr^{+6}, Cu^{+2}, Fe^{+2}, Pb^{+2}, Zn^{+2} derişimlerini ölçtükleri çalışmalarında, metal derişimlerinin en yüksek karaciğer dokusunda en düşük ise kas dokusunda olduğunu belirtmişlerdir. Benzer şekilde Cd^{+2}, Cu^{+2}, Zn^{+2} ve Pb^{+2} etkisinde 14 gün süreyle kalan *O. niloticus* dokularında ölçülen metal birikimi sonuçlarına göre; Cd^{+2}, Cu^{+2} ve Zn^{+2}, birikimlerini en yüksek düzeyde sırasıyla karaciğer, solungaç ve kas dokusunda gösterirken, Pb^{+2} ise en yüksek düzeyde solungaçta birikmiş ve bunu karaciğer izlemiştir (Atlı ve Canlı, 2008a).

Sucul organizmalarda metal birikiminin incelenmesi, metallere karşı duyarlılığı yüksek türlerin belirlenmesinin yanı sıra organizmada meydana gelen yapısal ve işlevsel bozuklukların belirlenmesi bakımından da önem taşımaktadır (Canlı ve Atlı, 2003; Kayhan, 2006).

1.1. Kadmiyum

Kadmiyum sucul organizmalar için esansiyel olmayan bir metal olup, devam eden antropojenik ve endüstriyel aktivitelere (kömür üretimi, madensel atıklar, çinko rafinerisi, demir ve çelik ürünleri, pestisit ürünleri) bağlı olarak doğal ortamda

düzeyleri gitikçe artan oldukça toksik bir elementtir. Tatlı sularda, Cd^{+2} 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 Cd^{+2}'nin yüzyıllardır trofik düzeylerini değiştirdiği ve özellikle tatlı su balıklarına yüksek toksisite gösterdiği belirtilmiştir. WHO (1992) tarafından verilen bilgilere göre tatlı su organizmaları üzerinde geniş çaplı ekolojik ve fizyolojik etkilere sahiptir. Kısa süreli Cd^{+2} etkisi sonrasında sucul canlılarda hemotolojik etkiler, Ca^{+2} homeostazisinde bozulmalar, iyonların düzenlenmesinde görev alan böbrek, solungaç ve bağırsak dokularında histolojik ve morfolojik değişiklikler, hücre dışı sıvılarda iyon derişiminde değişiklikler ve osmoregülatör kapasitede değişimler gözlenebilmektedir (Garcia-Santos ve ark., 2006). Cd^{+2}, toksik etki göstermesi, çevrede yaygın dağılımı ve düşük düzeylerde bile organizmalarda yan etkilere yol açması nedeniyle çevre çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir metaldir. Ayrıca Cd^{+2} etkisinin karaciğer, beyin, sinir sistemi, böbrek, dalak ve kemikte patolojik lezyonlara neden olduğu bilinmektedir. Balıklarda Cd^{+2} etkisi sonrasında büyümede gerilik, solungaçlarda Ca^{+2} alımında inhibisyon ve karaciğer fonksiyonlarında değişiklik gözlenebilmektedir. Balıklar önemli bir besin kaynağı ve ekosistem bileşeni olduğundan, Cd^{+2}'nin balıklardaki biyokimyasal ve fizyolojik etkilerin değerlendirilmesi önemlidir (Almeida ve ark., 2002).

Cd^{+2} balıkta yavaş bir şekilde birikim göstermekle birlikte, karaciğer ve böbrek en önemli hedef organlardır. Cd^{+2} balıkta çeşitli enzim sistemlerini etkileyerek, nörotransmisyon, transepitelyal taşınma, bağışıklık sistemi, oksidazlar gibi temel fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmaları bozabilmektedir. Bu tür etkiler Cd^{+2}'nin kısa süreli etkilerinde önemli olduğundan, enzimler Cd^{+2} toksisitesinde güvenilir belirteçler olarak kullanılabilmektedir. Bununla birlikte Cd^{+2}, Na^{+}/K^{+}-ATPaz gibi solungaçlarda iyon taşınmasında görev alan enzimleri inhibe ederek solungaçlarda iyon geçirgenliğinde artışa neden olmaktadır (De la Torre ve ark., 2000; Silvestre ve ark., 2005).

Cd^{+2} alınımı daha çok yüksek affiniteli Ca^{+2} kanallarıyla gerçekleşmektedir. Solungaç filament yapısının Cd^{+2} etkisinde değiştiği gözlenmiştir (Torreblanca ve

ark., 1989). Hipokalseminin, su veya besin yoluyla Cd^{+2} etkisi sonrasında balıkta Cd^{+2} toksisitesinin temel mekanizması olduğu bildirilmiştir. Cd^{+2} ile indüklenen Ca^{+2} homeostazisinin bozulması ile gözlenen hipokalsemiyi telafi etmek adına Ca^{+2}'nin kemikten ayrılmasının, kemik hasarının temel nedeni olduğu düşünülmektedir. Cd^{+2} etkisi ile azalan Ca^{+2} akışı, bazolateral Ca^{+2}-ATPazların inhibisyonu ile açıklanabilmektedir (Foulkes, 1980; George, 1991). Bu inhibisyon, hücre içi Ca^{+2} artışı ile ve hücre yüzeyinden Ca^{+2} girişinin engellenmesi ile ve sonunda hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır. Cd^{+2}'nin düşük ve yüksek konsantrasyonlarda çeşitli balık türlerinde anemiye neden olduğu belirtilmiştir (Larsson ve ark., 1985; Heath, 1995). Cd^{+2}'nin karbohidrat metabolizması üzerindeki etkisi, pankreasta insülin oluşturan hücrelerde hasara yol açmasıyla ortaya çıkmaktadır. Cd^{+2}'nin laktat dehidrogenaz aktivitesi ve kan glukoz seviyesini etkilediği gözlenmiştir (Heath, 1995). Cd^{+2}'nin hücrelerdeki enzim havuzlarından Zn^{+2} ve Cu^{+2} ile yer değiştirerek bakır ve çinko homeostasisini bozduğu belirtilmiştir (Bay ve ark., 1990). Cd^{+2} bağırsaktan absorbe edilerek depo bölgelerine öncelikle karaciğere taşınmaktadır. Karaciğerde Cd^{+2} metallothioneine bağlanmakta ve bu kompleks böbreklere taşınmaktadır.

Sucul ortamlarda Cd^{+2} düzeylerinin belirlenmesi ve erken safhada Cd^{+2}'nin zararlı etkilerinin saptanmasında yeni yöntemlerin geliştirilmesi oldukça önem kazanmaktadır (Almeida ve ark., 2001).

1.2. Bakır

Önemli bir metalloenzim bileşeni olan Cu^{+2} lizil oksidaz, askorbik asit oksidaz, sitokrom oksidaz, monoamin oksidaz, superoksit dismutaz enzimlerinin prostetik grubudur ve dolayısıyla tüm ökaryotik hücrelerin solunumları için gerekli bir elementtir. Omurgalıların kan plazmasında bulunan seruloplazmin, beyinde bulunan serebrokuprein, karaciğerde hepatokuprein ve arthropodlarda solunum pigmenti olan hemosiyanin bakır içeren proteinlerdir (George, 1991). Cu^{+2}'nin gösterdiği redoks özellik, hücresel solunum, serbest radikal savunması ve hücresel demir metabolizması için gereklidir (Gagnon ve ark., 2006). Buna karşılık elektrik

endüstrisi, alaşım, kimyasal katalizör, boya, algisit ve ahşap koruyucu yapımı gibi çeşitli alanlarda kullanılan Cu^{+2}, yüksek düzeylerde canlılar için toksik etki göstermektedir (Heath, 1987; Sağlamtimur ve ark., 2004).

Balık hücrelerine Na^{+}'ya duyarlı yollar aracılığıyla giren Cu^{+2}, mide ve bağırsak çeperinden kan plazmasına geçer ve plazma içerisinde albumin ve aminoasitlerle zayıf bağ yaparak karaciğere ve böbreklere taşınır. Karaciğerde metallothioneinlere bağlanarak depo edilen bakır, seruloplazmin aracılığıyla diğer dokulara taşınır (Cousins, 1985; Viarengo, 1989). Tatlı su balıklarında Cu^{+2}'nin toksik etkisinin gözlendiği birincil bölgenin solungaçlar olduğu belirtilirken karaciğer, solungaç ve bağırsakların Cu^{+2} birikimini düzenleyen organlar olduğu bilinmektedir (Kamunde ve ark., 2002; Gagnon ve ark., 2006).

Cu^{+2} etkisi sırasında su kaynaklı Cu^{+2} etkisinin besin kaynaklı Cu^{+2} etkisinden daha toksik olduğu bildirilmiştir. Cu^{+2}, hücre membranlarından Cu^{+2} veya Cu^{+} iyonu şeklinde geçmektedir ve bu yüklü iyonlar membran potansiyelindeki değişikliklerden etkilenmektedir. Yüksek derişimlerdeki Cu^{+2}, balıklar için toksik özellik göstermekte ve besin alımında azalma, büyümede gerilik, iyon kaybı, solunum hasarı, solungaç ve böbrek dokularında histolojik değişiklikler ve ölüme neden olabilmektedir (McGeer ve ark., 2000; Handy ve ark., 2002). Bununla birlikte sucul organizmalarda Na^{+} dengesinde bozukluklara, indirgenmiş plazma osmolaritesi ile düşük Na^{+} ve Cl^{-} derişimlerine neden olması da bu metalin osmoregülatör toksikant olarak kabul edilmesine yol açmıştır (Stagg ve Shuttleworth, 1982). Bu etkinin, solungaç epitelyumunun bazolateral membranında bulunan Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin inhibisyonuna bağlı olarak solungaç düzeyinde iyon alımının azalması ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu etkinin genellikle Cu^{+2} birikimine bağlı solungaçlardaki yapısal ve fonksiyonel hasarla ilişkili olduğu kabul edilmektedir (Li ve ark., 1998).

Atlı ve Canlı (2007), Cu^{+2} etkisinde kalan *O. niloticus*'un solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin önemli ölçüde inhibe olduğunu, buna karşılık alkalen fosfataz aktivitesinin ise artış gösterdiğini bulmuşlardır.

1.3. Çinko

Büyüme, hücre bölünmesi, metabolizma, bağışıklık, üreme gibi çeşitli fizyolojik mekanizmalar için gerekli divalent geçiş elementi olan Zn^{+2}'nin, en önemli biyokimyasal rollerinden biri de oksidoredüktaz, transferaz, hidrolaz, liyaz, izomeraz ve ligazları içeren 300'den fazla enzim aktivitesine olan etkisidir (Olsson ve ark., 1989). Ohnesorge ve Wilhelm (1991), Zn^{+2} içeren enzimlerin tüm türlerde genetik materyalin replikasyonu, transkripsiyonu ve translasyonunda görev aldığını vurgulamıştır. Zn^{+2}, doğrudan kataliz reaksiyonlarında görev alarak transformasyona uğrayan substrat ile etkileşebilmekte veya protein konformasyonunun stabilizasyonunda gerekli olabilmektedir. Bununla birlikte Zn^{+2} kemik oluşumu, hücreler arası bağışıklık ve doku gelişiminde fonksiyon görmektedir. Zn^{+2} alımı homeostatik olarak kontrol edilmekte ve özel taşıyıcı sistemler tarafından düzenlenmektedir. Zn^{+2} iyonları eritrositlere pasif taşıma ile girebilmekte ve aynı zamanda amino asitlerle bileşik oluşturarak veya Zn^{+2}/Ca^{+2} antiportu ile taşınabilmektedir. Balık kanında toplam Zn^{+2} derişiminin 0.013-1.15 mM değerleri arasında değiştiği; Zn^{+2}'nin yaklaşık % 99'unun protein bağlayıcı bileşik olarak gözlendiği, bunların yaklaşık % 5'inin zayıf olarak albumine ve % 15'inin de kuvvetli bir şekilde α_2-makroglobuline bağlı olduğu belirtilmiştir. Zn^{+2}'nin % 1'i ise düşük moleküler ağırlıklı hücre bileşiklerine bağlanmaktadır. Zn^{+2} toksik olmayan ajan olarak kabul edilmesine kaşın, yüksek düzeylerde çeşitli hasarlara neden olabilmektedir. Balıkta letal Zn^{+2} düzeyleri yapılan çalışmalara göre çeşitlilik göstermekle birlikte, bu çeşitliliğin suyun sertliğinin bir fonksiyonu olarak gözlendiği belirtilmiştir (Akahori ve ark., 1999).

Birçok organizma için gerekli bir element olan Zn^{+2}'nin, subletal derişimlerinde balıkta büyümeyi inhibe ettiği, yüzme hareketlerini, davranış ve kan kimyasını değiştirdiği ve doğurganlık ile osmoregülatör kapasiteyi bozduğu belirtilmiştir (Watson ve Beamish, 1981). Zn^{+2}'nin, Cd^{+2} gibi Ca^{+2} alımında görev gören Ca^{+2} bağlayan bölgelerde doğrudan Ca^{+2} ile yarıştığı belirtilmiştir. Bu durumun da hipokalsemi ve balık ölümlerine neden olduğu gösterilmiştir (Rogers ve ark., 2003). Zn^{+2} etkisinde *Tilapia zillii*'de serum asit fosfataz ve karaciğer alkalen

fosfataz düzeylerinde azalma görüldüğü belirtilmiştir (Hilmy ve ark., 1988; Heath, 1995). Artan Zn^{+2} derişiminin *Cyprinus carpio* L. 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).

Zn^{+2} birikiminin gözlendiği önemli dokular solungaç ve bağırsaklardır. Doğal sularda Zn^{+2} emiliminin en önemli yolu bağırsaklardır buna karşın, su kaynaklı Zn^{+2} düzeyi arttıkça solungaçlar daha fazla önem kazanmaktadır. Hücresel Zn^{+2} alımı ve metabolizmasında metallothioneinlerin rolüne ek olarak glutathion da Zn^{+2} alımında görev görmekte ve hücre içi serbest Zn^{+2} düzeylerini düzenlemektedir. Histidin ve sistein gibi amino asitlerin Zn^{+2} ile şelat oluşturması, Zn^{+2} dağılımını değiştirebilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda Ca^{+2}'nin solungaçlarda Zn^{+2} alımını inhibe ettiği görülmüştür (Spry ve Wood, 1989; Hogstrand ve ark., 1999).

1.4. Krom

Endüstriyel yolla ortama salınan krom kirliliğinin en önemli kaynaklarından biri yeryüzü ve yeraltındaki kirliliğinden sorumlu krom tabaklama endüstrisidir. Kromun balıklardaki toksik etkilerinden biri de balıklardaki bağışıklık sistemine olan etkisidir. O'Neill (1981), Cr^{+6}'nın viral mücadelede balığın humoral bağışıklık cevabını baskıladığını göstermiştir. Metalle indüklenen bağışıklık değişiklikleri, metallerin doğrudan biyolojik aktif moleküllerin tersiyer yapılarına bağlanmaları veya dolaylı olarak balıkta kortikosteroid düzeylerini değiştirmeleri sonucu gözlenmektedir. Yer kabuğunda yaygın olarak bulunan bir element olan krom, +2'den +6'ya kadar çeşitli formlarda bulunmakla birlikte bu metalin biyolojik olarak önemli olan ve doğada en stabil formları Cr^{+3} ve Cr^{+6}'dır. Trivalent Cr gerekli bir eser elementken, hekzavalent Cr esansiyel olmayan, toksik ve kanserojen özellikte olup, alerjik reaksiyonlara, dermatite, sindirim kanalı, karaciğer ve böbrek hasarına yol açmaktadır. Cr^{+6}'nın sulu çözeltilerdeki dominant formu olan iyon kromat $(CrO_4)^{-2}$, spesifik anyon kanalları aracılığıyla hücre zarlarından hızla girerek

intraselüler olarak trivalent forma (Cr^{+3}) indirgenmektedir (Tagliari ve ark., 2004). Bununla birlikte Cr^{+6}, antikor üretiminden sorumlu lenfositlere yüksek düzeyde toksik etki göstermekte ve buna bağlı olarak antikor cevabın baskılanmasına yol açmaktadır. Cr^{+6}'nın, Cr^{+3} ile karşılaştırıldığında daha toksik olması biyolojik olarak aktif Cr^{+6}'nın daha hızlı alımından kaynaklanmaktadır. Cr^{+6} ayrıca DNA yapısında çeşitli lezyonlara neden olabilmektedir (Arunkumar ve ark., 2000). Boge ve ark. (1989), alkalen fosfataz ve Na^+/K^+-ATPaz aktivitelerinin Cr^{+6} toksisitesinde gösterdikleri duyarlılıktan dolayı önemli belirteçler olarak kullanılabileceğini belirtmiştir. Cr^{+6}'nın glukoz toleransı, hiperglisemi, glikozuri ve hipoglisemiye neden olarak karbohidrat metabolizmasını etkilediği bildirilmiştir (Pan ve ark., 2003). Atlı ve ark. (2006) Cr^{+6}'nın farklı derişimlerinin *in vitro* etkisinde kalan *O. niloticus* dokularında katalaz aktivitesinin inhibe olduğunu, *in vivo* Cr^{+6} etkisinde ise karaciğer dokusundaki artışa karşın böbrek, solungaç ve bağırsak katalaz aktivitesinde ise azalış olduğunu gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte *C. carpio*'da Cr^{+6}'nın hematokrit düzeyinde bir etkisinin olmadığı, serum glukoz ve kolesterol düzeylerini ise önemli ölçüde artırdığı bildirilmiştir (Canlı, 1995).

1.5. Gümüş

Evsel, zirai, madencilik ve endüstriyel yollardan özellikle de uzun süredir fotoğraf endüstrisinden doğaya salınan Ag^+'nın sucul organizmaları etkilediği bilinmektedir. Çeşitli kimyasal formlarda karışabilen Ag^+'nın serbest iyon formu ise çoğu durumda oldukça düşük düzeyde bulunmaktadır (Morgan ve ark., 1997).

Su kaynaklı Ag^+ etkisi sırasında, Ag^+ yüzey aktif toksikantı gibi davranarak birincil etkisini solungaç epiteli üzerinde göstermektedir. Ag^+, Na^+ ile aynı yoldan Na^+ kanalı aracılığıyla solungaç hücrelerine girmektedir (Wood, 2001; Morgan ve ark., 2004). Yapılan çok sayıda çalışma $AgNO_3$'ün tatlı su balıklarında son derece toksik olduğunu göstermiştir (Morgan ve ark., 1997; Zhou ve ark., 2005). Gümüşün, hızla iyonik Ag^+'ya disosiye olan $AgNO_3$ formunda, organik madde içeriği düşük olan tatlı sularda 96 saatlik LC50 değeri 6.5-13 µg/L düzeyinde belirlenmiş ve metaller arasında tatlı su balıkları için akut olarak en toksik etki gösterenlerden biri

olduğu belirtilmiştir (Davies ve ark., 1978; Hogstrand ve ark., 1996). $AgNO_3$'ün toksisitesi serbest Ag^+ iyonunun varlığına bağlanmaktadır ve Al^{+3}, Cd^{+2}, Cu^{+2}, Hg^{+2} ve Zn^{+2}'den daha toksik olduğu belirtilmiştir (Wood ve ark., 1996).

İn vivo ve *in vitro* çalışmalar sonucu, Ag^+'nın temel toksik etkisinin, iyon mekanizmasında bozulmalar olduğu belirtilmiştir (Wood ve ark., 1996; Pedroso ve ark., 2007). Ag^+ toksisitesi için, bir tatlı su balığı olan alabalıkta solungaç epitelyumunun bazolateral zarında yer alan Na^+/K^+-ATPaz enziminin kilit bir hedef olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir (Morgan ve ark., 1997; McGeer ve Wood, 1998). Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde Ag^+ etkisi sonucu gözlenen inhibisyon, solungaçlardan aktif Na^+ ve Cl^- alınımını azaltarak organizmadan iyon kaybına ve bazı durumlarda ölüme neden olmaktadır. Alabalıkta 10 µg/L $AgNO_3$ etkisinde Na^+ girişinde % 40 azalış ile plazma Na^+ ve Cl^- düzeyinde azalma gözlenmiştir. Bununla birlikte plazma hacminde azalış ile hematokrit ve plazma protein derişiminde artışa neden olması, Ag^+'nın solungaçlardan Na^+ ve Cl^- alımında görevli mekanizmaları etkilediği ve sıvı hacmi ve kan değerlerini değiştirerek ölüme neden olduğunu göstermiştir (Morgan ve ark., 1997; Hogstrand ve Wood, 1998). Atlı ve ark. (2006), *Oreochromis niloticus*'un karaciğer katalaz aktivitesinde Ag^+ etkisinde kalma sonucu % 44'lük bir azalma olduğunu fakat buna karşın diğer ağır metallerin enzim aktivitesini artırdığını göstermişlerdir.

Akut Ag^+ etkisi sonrası başlangıçta gözlenen apikal Na^+ kanalı inhibisyonu ve en sonunda gözlenen solungaç Na^+/K^+-ATPaz inhibisyonu, solungaçlardan düşük Na^+ alımı, iyonoregülatör hasar ve canlıda gözlenen ölümlere karşılık; kronik Ag^+ etkisine ait çalışmalar daha az olmakla birlikte, olası toksisite mekanizmaları arasında iyonoregülatör bozukluklar sayılabilmektedir (Bianchini ve Wood, 2002). Bununla birlikte Öner ve ark. (2008), Ag^+ etkisinde *O. niloticus*'un serum glukoz, toplam protein, trigliserit, kolesterol ve üre düzeylerinin arttığını, Na^+ ve Cl^- düzeylerinin düştüğünü kaydetmişlerdir.

1.6. Adenozin Trifosfataz (ATPaz) Enzimleri

Singer ve Nicolson'un sıvı mozaik hücre zar modelinin temel özelliği, fosfolipit tabakası ile intrinsik zar proteinlerinin birbirleriyle oldukça sıkı ilişkide olmasıdır. Zar proteinleri iyon taşınması, lipit biyosentezi ve oksidatif fosforilasyon gibi hücre zarının birçok biyolojik aktivitesinden sorumlu olduğu için bu özelliklere çalışmalarda önem verilmektedir. Bu enzimlerin onları çevreleyen tabaka tarafından nasıl etkilendiğini anlamak, hücrede işleyen mekanizmaları daha fazla araştırma gerekliliğini getirmiştir. Zar enzimleri ve zar proteinleri arasındaki ilişkilerin, zardaki fizyolojik ve kimyasal değişikliklere neden olan sıcaklık veya diğer etkenlere duyarlı olduğu belirtilmiştir.

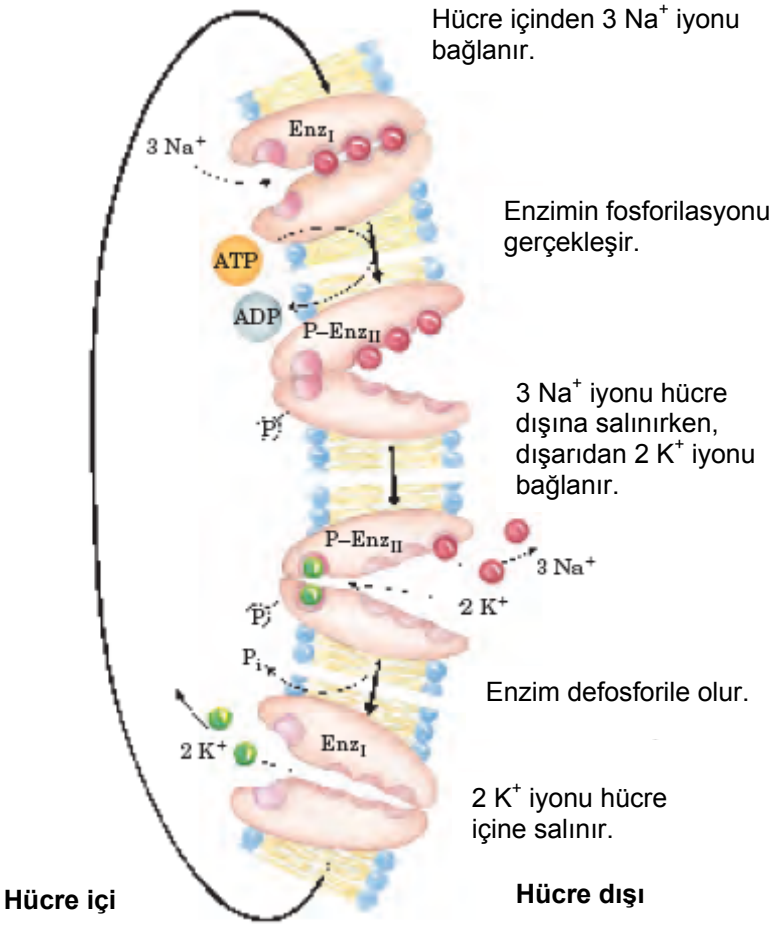
Metaller, moleküler yapı ve enzimlerin fonksiyonel gruplarının etkinliğine bağlı olarak enzim sistemlerine bağlanabilmektedir. Enzim molekülü üzerindeki aktif bölgelere metallerin bağlanması, enzim aktivitelerinde inhibisyon veya uyarılma ile sonuçlanmaktadır (Watson ve Beamish, 1981).

Adenozin trifosfataz (ATPaz) enzimleri hücre içi fonksiyonlarda önemli rol oynayan ve toksisitede duyarlı belirteç olan bir grup enzimdir. Membrana bağlı enzimler olan ve dokulardaki iyon hareketleri, osmotik basınç, membran geçirgenliği ve yüksek enerjili metabolik transformasyonların kontrolünde önemli görevlere sahip olan ATPaz enzimlerinin yüksek elektronegatif özellik göstermeleri nedeniyle geçiş metallerine hassas olduğu belirtilmiştir (Riedel ve Christensen, 1979; Watson ve Beamish, 1981; Thaker ve ark., 1996). Bununla birlikte ATPaz'ların tuzluluk, sıcaklık gibi çeşitli faktörler tarafından da etkilendiği kanıtlanmıştır (Inman ve Lockwood, 1977; Diaz ve ark., 1998). İyi bilinen membrana bağlı ATPaz'lar, Na^{+}/K^{+}-ATPaz, Ca^{+2}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz'dır. ATPaz'ların çevresel kirleticiler tarafından osmoregülatör hasardan önce gerçekleşen inhibisyonu, ATPaz'ların iyonik ve osmoregülatör sistemlerdeki bozuklukların erken uyarılmasındaki kullanımlarını işaret etmektedir (Stagg ve ark., 1992; Sancho ve ark., 2003). Kemikli balıkların solungaçlarında elektrolitlerin aktif taşınmalarında görev alan solungaç ATPaz enzimlerinin metal etkisine farklı tepkiler verdiği belirtilmiştir (Watson ve Benson, 1987; Atlı ve Canlı, 2007).

Na^+/K^+-ATPaz dışında diğer ATPaz'lardan Mg^{+2}-ATPaz, Na^+/NH_4-ATPaz ve Ca^{+2}-ATPaz, farklı türlerdeki balıkların solungaçlarında çalışılmış ve iyon düzenleyici rolleri vurgulanmıştır (Watson ve Beamish, 1980). Bu enzim aktivitelerinin Cr^{+6}, Cu^{+2}, Pb^{+2}, Hg^{+2} ve Zn^{+2} gibi metaller tarafından etkilendiği belirtilmiştir (Shephard ve Simkiss, 1978; Watson ve Beamish, 1980). Genel olarak *in vitro* metal etkileri ATPaz aktivitesinde azalışa neden olurken, *in vivo* etkiler ise çok açık olmamakla birlikte metallerin doğrudan etkilerine bağlı olduğu kadar, enzimlerin miktar ve turn over (geri dönüşüm) oranlarındaki telafi edici değişikliklere neden olan homeostatik mekanizmalarla da ilişkili olabilmektedir. Bu bilgiler ışığında ATPazlar gibi osmoregülatör enzimler üzerinde metallerin inhibitör etkileri sucul organizmalarda yararlı belirteçler olarak kullanılabilmektedir (Monserrat ve ark., 2007).

Skou (1957) tarafından bulunan membrana bağlı Na^+/K^+-ATPaz enzimi, 3:2 oranında hücre içi Na^+'yı hücre dışı K^+ ile değiştirir (Şekil 1.3). Bu ATP bağımlı elektriksel değişim hücre içini polarize ederek apikal membrandan Na^+ girişi için elektrokimyasal gradient oluşturur. Apikal membrandan Na^+ girişinin, Na^+-proton değiştiricisi veya proton pompası ile birlikte olan Na^+ kanalı yoluyla proton veya amonyak değişimi için gerçekleştiği görülmektedir. Protonların proton pompası aracılığıyla apikal membrandan atılması, apikal Na^+ kanalından Na^+ girişini sağlayan elektokimyasal gradienti oluşturur (Grosell ve ark., 2002; Handy ve ark., 2002).

Na^+/K^+-ATPaz ile ilgili yapısal ve fonksiyonel ilişkilerin incelendiği çalışmalar, solungaç epitelyumunun taşıma sistemlerinde ve dolayısıyla hücresel homeostazisinin dengelenmesinde görevli Na^+/K^+-ATPaz enzimleri açısından zengin olduğunu göstermiştir. İmmunositokimyasal çalışmalar ise Na^+ iyonlarının atılması ve K^+ iyonlarının hücre içine alınmasında görevli Na^+/K^+-ATPaz enziminin kemikli balıkların solungaç epitellerinde çoğunlukla mitokondrice zengin hücrelerde yer aldığını göstermiştir.



Şekil 1.3. Na^+/K^+-ATPaz tarafından Na^+ ve K^+ iyonlarının taşınma mekanizmalarına ait şematik şekil (Nelson ve Cox, 2002).

Na^+/K^+-ATPaz enzimi, P tipi ATPaz grubunda olup heterodimerik integral membran proteinidir ve enzim $(\alpha\beta)_2$ protein bileşiği olup katalitik α alt ünitesi yaklaşık 100 kDa moleküler ağırlığında, daha küçük olan glikozitlenmiş β alt ünitesi ise 55 kDa moleküler ağırlığındadır. Enzimin dokuya özgü farklı izoformlarının ekspresyonlarının çeşitli fizyolojik fonksiyonlarla ilişkili olarak gerçekleştiği belirtilmektedir. Birçok kemikli balık türleri, tuzluluk değişikliklerine bağlı olarak Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde uyumsal değişiklikler göstermektedir. Kardiyak glikoziti olan ouabain Na^+ ve K^+ taşınmasını katalizleyen Na^+/K^+-ATPaz enzimini inhibe etmektedir (Periyasamy ve ark., 1983).

İyon akışının düzenlenmesi, iyonik ve osmotik homeostazisin dengelenmesi ile ilişkilidir. Sucul organizmalar dikkate alındığında Na^+/K^+-ATPaz'ın iyon düzenlenmesinde yaşamsal bir öneme sahip olduğu bilinmektedir ve Na^+/K^+-ATPaz aktivitesindeki olası değişikliklerin doğal stres kaynaklarında olduğu gibi çeşitli çevresel kirleticilere tepki olarak geliştiği gözlenmiştir. Na^+/K^+-ATPaz enzimlerinin büyük bir bölümünün kemikli balıkların solungaç epitelyumunda klorit hücrelerde yerleştiği ve metallerin solungaç ATPaz aktiviteleri üzerinde farklı tepkileri olduğu belirtilmiştir (Watson ve Benson, 1987; Canlı ve Stagg, 1996; Atlı ve Canlı, 2007). Kemikli balıkların solungaç hücreleri tuz ve amonyak homeostazisinin dengelenmesinde görev alan mekanizmalarla ilişkili enzimleri içermektedir. Na^+/K^+-ATPaz, balıklarda solungaç hücrelerinin bazolateral membranında bulunan sodyum iyonlarının solungaçlardan taşınmasında önemli görev üstlenen kilit enzimdir (Alam ve Frankel, 2006). Balıktan amonyak atılmasında pasif difüzyon, ATPaz enzim aktiviteleri ve taşıyıcılar önem taşımaktadırlar ve bu mekanizmalar arasında Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi balıktaki amonyak için sudan Na^+ iyonunun değişimini içermektedir.

Osmoregülasyon, dış ortamın osmolaritesine (tuzluluk) rağmen hücre dışı sıvılardaki osmotik derişimlerin aktif olarak düzenlenmesidir ve su ortamındaki canlılar için gerekli bir fizyolojik adaptasyondur. Osmoregülasyonda önemli görevi olan enzimlerden biri olan Na^+/K^+-ATPaz, solungaç ve bağırsak gibi tuz taşınmasının gerçekleştiği dokularda yüksek düzeylerde bulunmaktadır ve transepitelyal tuz hareketleri için gerekli iyonik ve elektriksel gradienti düzenlemektedir. McGeer ve Wood (1998), akut metal toksisitesinin kilit mekanizmasının solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin inhibisyonu ile ilişkili osmoregülatör hasar olduğunu bildirmiştir. Cu^{+2}, Ag^+, Cd^{+2}, Zn^{+2} ve Hg^{+2} tatlı su ve deniz balıklarında Na^+/K^+-ATPaz inhibisyonu ile bağlantlı osmoregülasyonda bozulmalara neden olan metaller arasındadır (Bianchini ve Wood, 2003; Bianchini ve ark., 2004, 2005).

Li ve ark. (1998), Na^+/K^+-ATPaz enziminin doğrudan klorit hücre yoğunluğu ile ilişkili olduğunu belirtmiştir. Cu^{+2} etkisinde kalan balıklar, iyonik homeostaziyi dengelemek için solungaç iyon alım mekanizmasını onarma ve detoksifikasyon

amaçlı biyokimyasal ve fizyolojik sistemleri aktive ederler. Örnek olarak, Cu^{+2} etkisindeki çeşitli tatlı su balıklarında klorit hücrelerinin artışı gözlenmiştir ve klorit hücre sayısındaki artış genellikle Ca^{+2} ve Na^{+} iyon dengesini tehdit eden ajanları telafi etmek amacıyla gözlenmektedir. Na^{+}/K^{+}-ATPaz, genel olarak klorit hücreler veya mitokondrice zengin hücreler olarak bilinen ve epitelin yaklaşık % 10'unundan daha düşük kısmını oluşturan özel epitelyal iyonositlerde bol miktarda bulunmaktadır (Garcia-Santos ve ark., 2006).

İyonik gradienti düzenleyen membrana bağlı enzimler olan Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Ca^{+2}-ATPaz, birçok temel ve özel hücresel fonksiyonlardaki önemlerinden dolayı değişen hücresel ve fizyolojik uyarılara uyum sağlamalıdır. Bu enzim aktiviteleri özellikle kortizol gibi birtakım hormonlar tarafından düzenlenmektedir (Sunny ve Oommen, 2001).

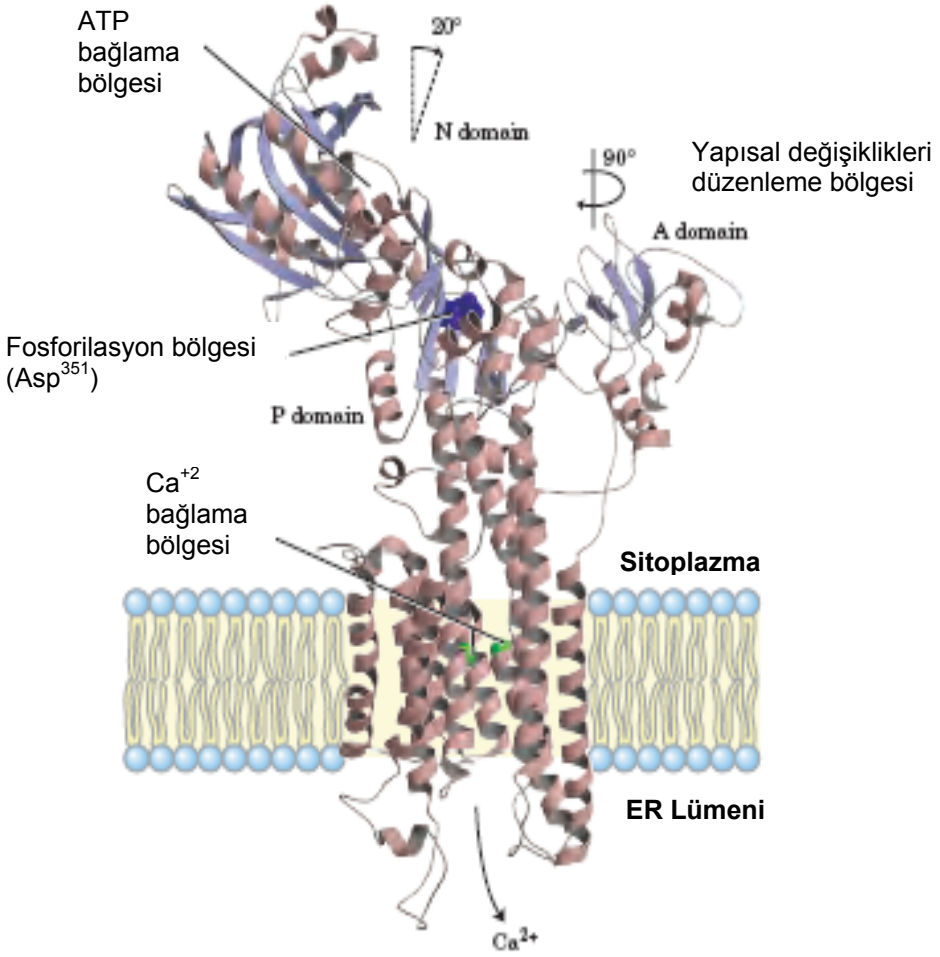
Yapılan birçok araştırma Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin sucul organizmalarda metallerin hem *in vivo* hem de *in vitro* etkilerine duyarlı olduğunu göstermiştir (Watson ve Beamish, 1981; Stagg ve Shuttleworth, 1982; Canlı ve Stagg, 1996, Atlı ve Canlı, 2007). *İn vitro* metal etkileri genel olarak Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinde azalışa neden olurken, *in vivo* etkilerin bu kadar açık olmamakla birlikte, olası telafi mekanizmaları enzim kaybını gidermek için homeostatik mekanizmalarda yer alabilmektedir. Buna karşılık balığın *in vivo* etkisi sonrasındaki etkilerin her zaman *in vitro* etkileri ile tutarlılık göstermediği bildirilmiştir (Watson ve Benson, 1987; Stagg ve ark., 1992). Enzim inhibisyonunun osmoregülatör sistemde bozulmalardan önce gelişmesi, Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin iyonik ve osmoregülatör sistemlerde hasarı indükleyen kirleticilerin belirlenmesinde erken uyarıcı olduğuna işaret etmektedir (Stagg ve ark., 1992). Bu nedenle, ilk metal etkilerinin gözlendiği yer olması nedeniyle solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi duyarlı bir belirteç olarak kullanılabilmektedir (Ay ve ark., 1999). Atlı ve Canlı (2007), farklı derişimlerdeki Cd^{+2}, Cu^{+2}, Zn^{+2} ve Pb^{+2} etkisinde kalan *O. niloticus*'un solungaç ve bağırsak dokularında Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin azalmasına karşın, yüksek Pb^{+2} derişimi etkisinde solungaç enzim aktivitesinde artış olduğunu gözlemlemişlerdir.

Mg^{+2}-ATPaz enzimi, solungaç epitelyumundan hücre membran bütünlüğü, solungaç geçirgenliğinin stabilizasyonu için gerekli olan Mg^{+2}'nin taşınmasında

görev görmektedir. Bununla birlikte Mg^{+2}-ATPaz enziminin oksidatif fosforilasyon ve iyon taşınmasında önemli bir rol üstlendiği belirtilmiştir (Parvez ve ark., 2006). Mg^{+2} ve Ca^{+2} iyonlarının hücre dışı ortamdaki yokluğu solungaç geçirgenliğinde azalmalara neden olmaktadır (Watson ve Beamish, 1980, 1981). Mg^{+2}-ATPaz oligomisine duyarlı olan ve olmayan olarak sınıflandırıldığında; bunlardan oligomisine duyarlı olanın solunum mekanizmasında görev alan mitokondriyal Mg^{+2}-ATPaz, oligomisine duyarlı olmayanın ise daha çok endoplazmik retikulumda bulunan Mg^{+2}-ATPaz olduğu düşünülmektedir (Canlı ve Stagg, 1996).

Metal varlığında solungaç ATPaz aktiviteleri inhibe olabilmekte veya uyarılabilmektedir (Watson ve Beamish, 1980; Watson ve Benson, 1987; Alves ve Wood, 2006). Kuhnert ve ark. (1976), *in vivo* Cr^{+6} etkisindeki alabalık *Salmo gairdneri*'nin solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinde inhibisyon gözlerken, Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinde inhibisyon gözlememişlerdir. Bunun dışında Zn^{+2}'nin alabalığın solungaç dokusunda *in vitro* Mg^{+2}-ATPaz, Ca^{+2}-ATPaz ve Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitelerinde inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir (Watson ve Beamish, 1980).

Sarkoplazmik retikulum tübüllerinde lokalize olan Ca^{+2}-ATPaz, hücre membranının stabilizasyonu için gerekli olan Ca^{+2}'nin nM düzeylerinde aktive olabilmekte ve ATP hidrolizinden açığa çıkan enerjiyi kullanarak sitoplazmadan Ca^{+2}'nin uzaklaştırılmasında ve böylece düşük hücresel Ca^{+2} içeriğinin korunmasında görev almaktadır (Watson ve Beamish, 1981; Saxena ve ark., 2000) (Şekil 1.4.). Ca^{+2}-ATPaz, Ca^{+2} metabolizmasındaki önemi ve yapısındaki fonksiyonel -SH gruplarına bağlı olarak ağır metal etkisinde inhibe olması ile kirlilik çalışmalarında büyük önem kazanmaktadır (Shephard ve Simkiss, 1978; Wong ve Wong, 2000).



Şekil 1.4. Sarkoplazmik retikulum Ca^{+2}-ATPaz enzmine ait yapısal şekil (Nelson ve Cox, 2002).

Yapılan çeşitli araştırmalar sonucunda balıkların Ca^{+2}'yi sudan absorpladıkları gösterilmiştir ve tatlı su balıklarında genel olarak emilimin bağırsaktan çok epidermal yolla olduğu ve balıkta Ca^{+2} metabolizmasının düzenlenmesinde Ca^{+2}-ATPazın önemli görevlere sahip olduğu belirtilmektedir. Metal iyonlarının etkilerine açık olan solungaçlarda metallerin Ca^{+2}-ATPaz enzimleri üzerinden etkilerini araştırmak bu anlamda önem kazanmaktadır (Shephard ve Simkiss, 1978). Solungaçlar dışında Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin yüksek olduğu diğer bir doku kalp dokusudur ve kalp sarkolemmasında buna bağlı olarak büyük oranda Ca^{+2} depolanmaktadır (Bansal ve ark., 1985). Sarkoplazmik retikulumda Ca^{+2}-

ATPaz, kas kasılmasında önemli rol oynayan bir intrinsik zar enzimidir. Enzim, Ca^{+2} iyonlarının sitosolden sarkoplazmik retikuluma taşınmasında görev görerek kasın gevşemesine neden olmaktadır. Bununla birlikte Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin zar lipit ortamından etkilendiği bilinmektedir (Watson ve Beamish, 1981; Saxena ve ark., 2000; Godiksen ve Jessen, 2002).

Böbrek dokusunda Cd^{+2}, Ca^{+2}'nin reabsorbsiyonunda görevli Ca^{+2}-ATPaz'ın inhibisyonuna neden olarak Ca^{+2} düzenlenmesinde hasarlara yol açmaktadır. Hücreler arası Ca^{+2} alınımının inhibisyonuna ek olarak, hücre hasarının neden olduğu Ca^{+2} homeostazisindeki bozulmalar sonucu hücrelerin geçirgenliğinde de artış olabilmektedir (Berntssen ve ark., 2003). Cd^{+2}, lantanyuma duyarlı Ca^{+2} kanalları yoluyla solungaçlardan girerek bazolateral Ca^{+2} taşınmasında inhibisyona neden olmaktadır. Bazolateral Ca^{+2} taşınmasının yüksek ilgili Ca^{+2}-ATPaz'a bağlı olduğu gösterilmiş buna karşın, enzimin yüksek oranda Cd^{+2}'ye duyarlı olduğu gösterilmiştir (Flik ve ark., 1985; Verbost ve ark., 1988). Çoğunlukla klorit hücrelerde bulunan Ca^{+2}-ATPaz'ın inhibisyon bölgesinin Ca^{+2} bağlayan bölge olduğu ve klorit hücrelerin Cd^{+2} toksisitesi için birincil hedef olduğu belirtilmiştir. Solungaçlardan Ca^{+2} alınım oranının klorit hücrelerin fraksiyonel alanı ile doğru orantılı olduğu da bildirilmiştir (Perry ve ark., 1992; Wong ve Wong, 2000). Bununla birlikte Atlı ve Canlı (2007), *O. niloticus*'da kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin Cd^{+2}, Zn^{+2} ve Pb^{+2}'nin 14 günlük etkisi sonunda azalış gösterdiğini kaydetmişlerdir.

1.7. İyonlar

İyonların hücre zar yüzeyine adsorpsiyon mekanizmaları birçok faktör tarafından etkilenmektedir: 1. Ortamdaki serbest iyon derişimi, 2. Epitelyal yüzey üzerinde iyon bağlayan ligant sayısı ve tipi, 3. İyon alım oranı ve bununla ilişkili yüzey ligant değişimi, 4. Hücre zarının dış yüzeyinde hareketsiz tabaka oluşumu (Handy ve ark., 2002).

Osmolit düzeyindeki artış, serum Na^+ ve Cl^- derişimlerindeki artışa bağlı gelişmektedir. Tek değerlikli serum iyon derişimleri, fazla miktarda Na^+/K^+-ATPaz enzimlerine sahip klorit hücreler sayesinde iyonik osmotik dengeyi sağlayan

solungaç dokusu ile düzenlenmektedir (Guynn ve ark., 2002). Epitelden Na^+ absorbsiyonu, iyon kanalları veya protein taşıyıcı (kolaylaştırılmış difüzyon) ile dış ortamdan hücre içerisine difüzyonunu kapsamaktadır. Na^+'nın hücreden kana geçişi ise elektokimyasal gradiente karşı bazolateral Na^+ pompası Na^+/K^+-ATPaz enzimi tarafından yürütülmektedir (Handy ve ark. 2002).

İn vitro aktivite çalışmaları yılan balığı, alabalık, çupra gibi balıklarda solungaç Na^+/K^+-ATPaz enziminin iyonik güce duyarlı olduğunu göstermiştir. Tatlı su çuprasının solungaç homojenatında Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin reaksiyon ortamında artan Na^+ ve K^+ derişimi ile yükseldiği belirtilmiştir (Lin ve Lee, 2005).

Tatlı sularda mitokondri bakımından zengin hücrelere sahip solungaçlar sıkı bir epitelyuma sahip olup Na^+ ve Cl^-'nin aktif alımlarından sorumludur. Avella ve Bornancin (1989), Na^+'nın epitelyum hücrelere apikal olarak yerleşmiş vaskuler tip H^+-ATPaz'ların görev yaptığı Na^+ kanallarından girdiğini belirtmiştir. Cl^- alımının ise HCO_3^- değişimi ile yapıldığı düşünülmektedir. Osmotik derişim, hücre hacmine olduğu kadar iyonik derişimlerin düzenlenmesine de bağlıdır (Watson ve Beamish, 1980). Serum osmolalite düzeyindeki azalış, osmoregülatör dokularda Na^+/K^+-ATPaz aktivitesindeki artış ile ilişkilendirilmiştir (Guynn ve ark., 2002).

Na^+/K^+-ATPaz enzimi çeşitli tatlı su ve deniz balıklarında solungaç ve böbrek gibi osmoregülatör dokularda yoğun bir şekilde çalışılmıştır. Na^+/K^+-ATPaz, sindirim kanalından besin ve elektrolit emiliminde önemli olan hücresel Na^+ ve K^+ gradientinin düzenlenmesinde yaşamsal bir rol üstlenmektedir (Diaz ve ark., 1998).

Hücre membranı bütünlüğü, solungaç geçirgenliğinin stabilizasyonu için gerekli olan divalent metal katyonları Mg^{+2} ve Ca^{+2} iyonlarıdır ve bu iyonların hücre dışı ortamdaki yokluğu solungaç geçirgenliğinde azalmalara neden olmaktadır (Watson ve Beamish, 1980, 1981). Kemikli balıklarda, Ca^{+2}'nin büyük bir oranı kemikler dışında deri ve iskelette depolanmıştır (Berntssen ve ark., 2003).

Tatlı su balıkları Ca^{+2} homeostazisini ATP bağımlı bazolateral Ca^{+2} pompası ve Na^+/Ca^{+2} değişimi ile aktif olarak bağırsaktan ve solungaçtan Ca^{+2} absorpsiyonu ile düzenlemektedir. Na^+/Ca^{+2} değişimi ise Na^+ gradientine bağlı Na^+/K^+-ATPaz ile sağlanmaktadır. Ca^{+2}-ATPaz ve Na^+/K^+-ATPaz enzimlerinin doğrudan inhibisyonu, balıkta Cd^{+2} ile indüklenen Ca^{+2} homeostazisindeki bozulmalara bağlı önemli

biyokimyasal reaksiyonlar olarak gözlenmektedir. Kalp kasında, hücre dışı sıvılarından Ca^{+2} akışı ile sarkoplazmik retikulumdan Ca^{+2} salınır. Bu Ca^{+2} kaynaklarının birlikteki etkileri hücre içi Ca^{+2} derişimlerinde artışa ve sonuçta kasılmaya neden olmaktadır. Gevşeme Ca^{+2} derişimlerinin azalışı ile gerçekleşmektedir ve bunun için Ca^{+2}'nin sarkoplazmik retikulum tarafından tekrar alınarak hücreden uzaklaştırılması, Ca^{+2}-ATPaz veya Na^{+}/Ca^{+2} değişimi ile sağlanmaktadır (Choi ve Eisner, 1999).

Sucul ortamlar metal kirliliğinin araştırılması amacıyla sıklıkla gözlenmesine karşın, sudaki metal düzeylerinin belirlenmesi özellikle subletal metal etkilerinde kirlilik düzeyi hakkında tek başına yeterli bilgi sağlamamaktadır. Bu amaçla metal kirliliğinin daha iyi değerlendirilmesi, su organizmalarının dokularında bazı fizyolojik parametrelerin kullanımını da gerektirmektedir. Akuatik toksikolojide biyokimyasal belirteç kullanımı eser metallerin toksisitesini belirlemede oldukça yaygındır. Bazı araştırıcılar metale duyarlı belirteçlerin metallothionein uyarılmasını, Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Ca^{+2}-ATPaz inhibisyonu ve elektrolit düzeyindeki değişiklikleri içerdiğini belirtmişlerdir. Bu belirteçler, kullanıldığında organizmaların toksik metallerin etkisinde kalıp kalmadığını ve metallerin biyolojik yan etkilere neden olan ajanlar olup olmadığını belirlemede yardımcı olabilmektedir (Bouskilla ve ark., 2006; De la Torre ve ark., 2000). Solungaç ATPaz aktiviteleri, bu enzimlerin dış ortamla doğrudan ilişkili ve metal etkilerinin hedefi olmalarından dolayı metal kirliliğinin belirlenmesinde duyarlı belirteçler olarak kullanılabilir (Canlı ve Stagg, 1996; Wang ve ark., 2002).

Sucul ekosistemlerde kimyasalların biyolojik etkileri sadece geleneksel olarak akut toksisite testlerine ait veriler bazında değerlendirilirse, bu veriler subletal etkilerin yol açtığı zararların tanımlanmasında yetersiz kalabilir. Günümüzde sucul organizmaların kimyasallarla indüklenen biyokimya ve fizyolojilerindeki değişiklikler, çevre sağlığının değerlendirilmesinde belirleyici araçlar olarak kullanılabilmektedir. Biyokimyasal değişiklikler ise kimyasalların sucul ekosistemlere olan etkilerini gözlemlemede hızlı ve hassas sonuçlar sağladığından çevre sağlığı için etkili belirteçler olarak düşünülmektedir.

Fizikokimyasal analizlere dayanan tatlı su kirliliği ile ilgili klasik çalışmalara ek olarak, su toksisitesinin tanımlanması için yeni yaklaşım ve araçları belirleme çalışmaları yapılmaktadır. Doku ve vücut sıvılarında kimyasal maddelerin analizi, toksik metabolitler, enzim aktiviteleri ve diğer biyokimyasal değişkenler biyolojik sistemlerle toksin etkileşimlerini belirlemede sıklıkla kullanılmaktadır. Toksisite biyoindikatörleri olarak bilinen kimyasal derişimlerindeki değişikliklerin kirletici etkileri ile risk analizi değerlendirilmesi arasındaki ilişkiyi tanımladığı belirtilmektedir. Vücut sıvılarında, hücre ve dokularda yapılan ölçümlerde belirteç kullanımı biyokimyasal veya hücresel olarak kirletici varlığını göstermektedir ve biyokimyasal veya fizyolojik tepkilerle birlikte bunlara bağlı üreme, beslenme ve davranış parametreleri gibi ekolojik etkileşimlerin de oldukça önemli olduğu belirtilmektedir. Biyokimyasal ve fizyolojik düzeydeki ölçümler, çeşitli toksik bileşiklerin varlığını özgün ve hızlı bir biçimde saptayarak zararlı etkilerin yüksek organizasyon seviyelerine ulaşımından önce, değişimin erken tanımlanmasında önem kazanmaktadır. Toksik maddeye özgü belirteçlerden olan metallothioneinler metallerin varlığını göstermede yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Hogstrand ve Haux, 1989; Dang ve ark., 2000). Çeşitli kirleticiler prooksidan ve antioksidan derişimleri arasındaki dengeyi değiştirebildiğinden sucul organizmalarda oksidatif stres (DNA hasarı, protein oksidasyonu, lipit peroksidasyonu) veya antioksidan tepkiler duyarlı belirteçler olarak uygulanmaktadır. Bu belirteçler kirleticilerin bulunduğu etki altındaki alanları karakterize etmek amacıyla arazi çalışmalarında da başarılı şekilde kullanılmaktadır. Sucul ortamlarda bulunan kirleticilerin toksisiteleri tuzluluk, pH ve sıcaklık gibi suyun fiziko-kimyasal özelliklerine göre değişiklik gösterebilmektedir. Buna bağlı olarak, biyolojik belirteçlerin çeşitli toksik moleküllere gösterdikleri tepkileri değerlendirirken abiyotik faktörlerin etkilerini de göz önünde bulundurmak gerekmektedir (Monserrat ve ark., 2007).

Yaklaşık 500 milyon yıldır evrimleşen balıklar, omurgalıların en eski, yaygın ve çeşitli sınıfını oluşturmaktadır (Zafarullah ve ark., 1990). Evrim sürecindeki önemli konumları, çeşitli habitatlara adapte olmaları, insanlar için önemli bir besin kaynağı oluşturmaları nedeniyle balıklar biyolojinin çeşitli disiplinlerinin dikkatini

çekmiştir. Balıklar omurgalılar arasında metalleri hem sudan hem de besin yoluyla almaları açısından önemlidir (Bury ve ark., 2003).

Balıklar, suda çözünmüş farklı ksenobiyotikleri aktif veya pasif mekanizmalarla aldıkları ve biriktirdiklerinden, ortamlarına salınan kirleticilerin saptanması ve belgelenmesinde kullanılabilmektedirler. Günümüzde balığın çevresel strese tepki olarak gösterdiği fizyolojik mekanizmaların anlaşılmasına gösterilen ilgi giderek artmaktadır. Belirteç kullanımı ile çevresel kimyasallara karşı biyolojik tepkilerin çalışılması, biyolojik sistemlerde kirleticilerin çevresel düzeylerinin belirlenmesi ve daha önemlisi özel durumlarda çevre kalitesinin değerlendirilmesinde anlamlıdır (Sancho ve ark., 2003).

Balıklar, sucul ekosistemlerin durumunu ve toksikolojik olarak gelişen patolojiyi değerlendirmede yaygın olarak kullanılan faydalı bir deneysel model oluşturmaktadır. Nil çuprası *Oreochromis niloticus*, elde edilişi, kültürü, laboratuarda çalışılması ve toksikolojik araştırmalarda kirleticilere olan olası uyumların çalışılmasındaki kolaylıklar nedeniyle iyi bir biyolojik model olarak tanımlanan en önemli balık gruplarından birine ait bir türdür (Almeida ve ark., 2002; Garcia-Santos ve ark., 2006). Bununla birlikte Tilapia (tatlı su çuprası), tatlı sudan deniz suyuna kadar oldukça geniş tuzluluk değerlerinde yaşayabilen bir örihalin balık türüdür (Sardella ve ark., 2004; Kamal ve Mair, 2005). Kolayca üreyebilmesi ve beslenme problemi olmaması nedeniyle önemli bir kültür balığı olan *O. niloticus*, çevresel kirliliğe ve hastalıklara karşı da oldukça dirençlidir (Sarıhan ve Toral, 1982; Canlı ve Erdem, 1994). Bundan önce yapılan çalışmalarda Cu^{+2} ve Cd^{+2}'ye olan dirençliliği gösterilmiştir (Erdem, 1990; Canlı ve Erdem, 1994). Buna karşılık, ağır metal toksisitesine dirençlilik bu balığın besin kaynağı olarak kullanılmasında istenilen bir özellik değildir, çünkü toksik metallerle kontamine olmuş balıkları tüketen insanlar metal birikiminde hedef olabilmektedir.

Bu çalışmada; Bir kültür balığı olan *Oreochromis niloticus*'un önemli osmoregülatör ve ATPaz enzimlerine özgü dokuları olan solungaç, böbrek ve kaslarında a) Na^{+}/K^{+}-ATPaz, Ca^{+2}-ATPaz, Mg^{+2}-ATPaz ve Toplam ATPaz enzimlerinin karakterizasyonunu yapmak, b) Akut uygulamada esansiyel metallerden bakır (Cu^{+2}) ve çinko (Zn^{+2}) ile esansiyel olmayan metallerden kadmiyum (Cd^{+2}),

gümüş (Ag^{+}) ve kromun (Cr^{+6}) farklı derişimlerinin (0,1, 0,5, 1,0 ve 1,5 µg/mL) ATPaz'lar üzerine olan *in vivo* etkilerini, c) Kronik uygulamada 0,05 µg/mL derişimindeki bu metallerin farklı süreler sonunda (0, 5, 10 ve 30 gün), aynı ATPaz'lar üzerine olan *in vivo* etkilerini, c) Metallerin 0,1-1,5 µg/mL aralığındaki derişimlerinin ATPaz'lar üzerindeki *in vitro* etkilerini, d) Aynı zamanda bu dokulardaki toplam metal (Ag^{+}, Cr^{+6}, Cu^{+2}, Cd^{+2} ve Zn^{+2}), iyon (Na^{+}, K^{+}, Mg^{+2}, Ca^{+2}) ve protein düzeylerini belirlemek amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Kuhnert ve ark. (1976), Cr^{+6}'nın Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktivitesine etkisini gözlemek amacıyla *S. gairdneri*'yi 2,5 mg Cr^{+6}/L etkisine 48 saat süreyle bırakmış, bağırsak ve solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin inhibe olduğunu buna karşın, Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin ise etkilenmediğini kaydetmişlerdir.

Shephard ve Simkiss (1978), tatlı su balığı *Rutilus rutilus*'un solungacında Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin 2 mM Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarının etkisinde en yüksek oranda aktive olurken, Na^{+}, K^{+} iyonları veya ouabain tarafından etkilenmediğini göstermişlerdir. Araştırıcılar ayrıca 10 µM derişiminin altındaki Cu^{+2}, Pb^{+2}, Zn^{+2} ve Hg^{+2}'nin *in vitro* etkilerinde enzimin inhibe olduğunu, 0,2 µM derişiminin altındaki *in vivo* Cu^{+2} etkisinde ise solungaç Ca^{+2}-ATPaz enzim ünitelerinde artış olduğunu kaydetmişlerdir.

Watson ve Beamish (1981), *S. gairdneri*'nin solungaç dokusunu 15 dakika süreyle 11 ^{o}C ve 37 ^{o}C'de *in vitro* Zn^{+2} (1-100 mg/L) etkisinde bırakmış ve Zn^{+2}'nin Na/NH_4-ATPaz, Na^{+}/K^{+}-ATPaz, Mg^{+2}-ATPaz ve Ca^{+2}-ATPaz aktivitesini inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Enzimler arasında Zn^{+2} inhibisyonuna en duyarlı olanının Na/NH_4-ATPaz olduğunu bunu Na^{+}/K^{+}-ATPaz'ın izlediğini, Mg^{+2}-ATPaz ve Ca^{+2}-ATPaz'ın ise en az inhibe olan enzimler olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte 37 ^{o}C'de elde edilen verilerin 11 ^{o}C'dekilere paralel olduğunu sadece 15, 50 ve 100 mg Zn^{+2}/L etkisinde Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin uyarıldığını gözlemlemişler ve sıcaklığın da enzim aktivitesini etkilediğini vurgulamışlardır.

Stagg ve Shuttleworth (1982), deniz suyuna uyumu sağlanmış *Platichthys flesus* L.'nin solungaç homojenatında *in vitro* Cu^{+2} (10 µmol/L) uygulaması sonucunda ölçülen Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin inhibe olduğunu gözlemişlerdir. Cu^{+2}'nin (200 µg/L) 42 günlük etkisi sonrasında da ouabain ile işaretleme tekniği sonucunda enzim aktivitesinin inhibe olduğunu, yalnız bu tepkinin enzimin Cu^{+2}'ye duyarlılığının azalması ve enzim düzeylerinin kontrolden farklılık göstermemesi ile sonuçlandığını göstermişlerdir. Böylece araştırıcılar, kirletici etkilerini araştırmada enzim aktivitelerinin ölçülmesi kadar enzim ünitelerinin sayısının da önemli olduğunu vurgulamışlardır.

Bansal ve ark. (1985), tatlı su balığı *Saccobranchus fossilis*'in solungaç ve kalp dokularında Ca^{+2}-ATPaz karakterizasyonu sonucu elde ettikleri verilere göre enzimin solungaçlarda 3 mM Ca^{+2} ve 3 mM ATP, kalpte ise 3 mM Ca^{+2} ve 1 mM ATP derişimlerinde optimum aktivite gösterdiğini ve Mg^{+2} iyonunun enzim aktivitesinin uyarılmasında eşit düzeyde etkili olduğunu bildirmişlerdir. *İn vitro* metal etkilerinde ise Ca^{+2}-ATPaz'ın inhibe olduğu ve metaller arasında Hg^{+2}'nin toksisitesinin en yüksek olduğu ve bunu sırasıyla Pb^{+2}, Mn^{+2} ve Cd^{+2}'nin izlediğini belirtmişlerdir. Buna karşılık enzimin her iki dokuda da bazı Cd^{+2} ve Mn^{+2} derişimlerinde uyarıldığını göstermişlerdir.

Lauren ve McDonald (1987), gökkuşağı alabalığı *S. gairdneri*'de 28 günlük 55 µg Cu^{+2}/L etkisi sonrasında gözledikleri Cu^{+2} birikiminin yanında solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin 24 saat içerisinde % 33 inhibe olduğunu buna karşın, 14 günden başlayarak mikrozomal proteindeki artış sonucunda toplam Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin normal düzeye yaklaştığını bildirmişlerdir.

Ventrella ve ark. (1990), *Sparus auratus* L. ile yaptıkları karakterizasyon çalışması sonucunda solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz'ın 0,001 M ouabain derişiminde inhibe olduğunu ve en uygun ortam şartlarının ise 160 mM Na^{+}, 20 mM K^{+}, 5 mM Mg^{+2}, 5 mM ATP ve pH 7,0 olduğunu bulmuşlardır.

Pelgrom ve ark. (1995), *O. mossambicus*'un Cu^{+2} (50, 100 ve 200 µg/L) ve Cd^{+2} (20, 35 ve 70 µg/L) ile bunların birlikte etkilerinin plazma ve tüm vücut Na^{+}, Ca^{+2} ve Cl^{-} düzeylerini değiştirerek, metal derişimi ve iyon tipine bağlı olarak azalış veya artış gösterdiklerini belirtmişlerdir.

Morgan ve ark. (1997), *O. mykiss* ile yaptıkları çalışmada 2 ve 10 µg/L derişimlerindeki Ag^{+}'nın 75 saat süreli etkisinin sonunda solungaçlardan Na^{+} ve Cl^{-} iyon kaybının, plazma Na^{+} ve Cl^{-} düzeylerinde azalmanın gözlendiğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin % 85 düzeyinde azalış gösterdiğini ve sonuçta iyon taşınmasında görev alan ATPaz enzimlerinin inhibisyonu sonucunda solungaçlarda iyon düzenlenmesinin zarar görmesinin Ag^{+} toksisitesinin temel mekanizması olduğu vurgulanmıştır.

Li ve ark. (1998), 28 günlük 3,2 mM Cu^{+2} etkisinde *O. niloticus*'un solungaç dokusunda yapısal değişikliklerle birlikte klorit hücre sayısında kontrole göre

farklılıklar gözlemişlerdir. Bu çalışma, solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi ve plazma Na^+ düzeyinin Cd^{+2} etki süresi ile azalış gösterdiğini ve Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi ile solungaç Cu^{+2} içeriği arasında ters bir bağıntı olmasının bu enzimin Cu^{+2} inhibisyonuna oldukça duyarlı olduğunu göstermiştir.

Akahori ve ark. (1999), *C. carpio* L.'nin *in vitro* 0,1, 0,5 ve 1,0 mM derişimlerindeki Zn^{+2}'nin 20 saat süreyle etkisinde bırakılan eritrositlerinde Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin ve thiol grup içeriklerinin etkilenmediğini göstermiş ve Zn^{+2}'nin daha yüksek düzeylerde toksik etki gösterebileceğini belirtmiştir.

Ay ve ark. (1999), Cu^{+2} ve Pb^{+2} (0,5-4,0 mg/L) etkisinde 14 gün sonunda *Tilapia zillii*'nin kas, solungaç ve karaciğer dokularında Cu^{+2} ve Pb^{+2}'nin birikim gösterdiğini, kas dokusunda Cu^{+2} düzeyinin kontrole göre farklı olmadığını bildirmiştir. Solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin hem Cu^{+2} hem de Pb^{+2} etkisinde etkiye bağlı inhibisyon gösterdiği kaydedilmiştir.

De la Torre ve ark. (2000), 14 günlük 1,6 mg Cd^{+2}/L etkisine ve sonrasında Cd^{+2} içermeyen suda 19 gün süreyle bırakılmalarının ardından sazan *Cyprinus carpio*'nun solungaç ATPaz aktivitelerini ölçmüşlerdir. Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin etki sonunda % 30 inhibe olduğu, Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin ise % 70 artış gösterdiği gözlenmiş, Cd^{+2} içermeyen suda 19 gün kaldıktan sonra Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin kontrol düzeyine yaklaştığı belirtilmiştir. Subletal Cd^{+2} etkisinin sazanda osmotik ve iyonik dengeyi sağlayan solungaç enzimlerini önemli ölçüde etkileyerek strese neden olduğu bildirilmiştir.

Lionetto ve ark. (2000), yılan balığı *A. anguilla*'nın solungaç ve bağırsak homojenatlarında *in vitro* Cd^{+2} etkisinde Na^+/K^+-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktivitelerini incelemişlerdir. Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin Cd^{+2}'nin etkisinde inhibe olduğu ve solungaç dokusunun bağırsak dokusunda göre Cd^{+2} etkisine daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. Buna karşılık, Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin *in vitro* Cd^{+2} etkisinde her iki dokuda da değişiklik göstermediği gözlenmiş ve *in vitro* metal etkilerinin sucul canlılarda *in vivo* Cd^{+2} etkisini anlamada yararlı olabileceği belirtilmiştir.

McGeer ve ark. (2000), *O. mykiss*'i Cd^{+2} (3 mg/L), Cu^{+2} (75 mg/L) ve Zn^{+2}'nin (250 mg/L) 100 günlük etkisine bırakmış ve bu süre sonunda metallerin balıklarda büyüme, iyon dengesi ve Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi üzerindeki etkilerine

bakmışlardır. Balıklarda büyümenin etkilenmediğini, solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin Cu^{+2} etkisinde artış gösterdiğini ve Na^+ ile Ca^{+2} dengesinin tüm vücutta 2 gün içerisinde bozulduğunu belirtmişlerdir. Ca^{+2} iyon kaybının Cd^{+2} etkisinde daha uzun süreli olduğu ve fizyolojik tepkilerin Cu^{+2} etkisinde metabolik gereksinimle ilişkili mekanizmaları içerdiği, kronik Cd^{+2} etkisinin ise uzun süreli metabolik gereksinimle ilişkili olmadığı gösterilmiştir.

Wong ve Wong (2000), Cd^{+2}'nin 40, 80 ve 160 ppb derişimlerinin 3 ve 7 günlük etkileri sonunda *O. mossambicus*'un solungaç dokusunda Cd^{+2} birikiminin arttığını, Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin ise Cd^{+2} birikimi ile ters orantılı olarak azalış gösterdiğini bildirmişlerdir.

Webb ve ark. (2001), yüksek derişimlerdeki (250-650 µg/L) Ag^+'nın akut süreç (48-72 sa.) ve düşük derişimlerdeki (1,5-50 µg/L) Ag^+'nın kronik süreç (21 gün) sonundaki etkisini farklı tuzluluktaki (18-30 ppt) ortamlarda üç farklı deniz balığında (*Oligocottus maculosus*, *Porichthys notatus*, *Oncorhynchus mykiss*) denemişlerdir. Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde etki süresi ve metal derişimine, tuzluluk düzeyine, doku tipi ve balık türüne bağlı olarak azalış ve artış gözlemlemişlerdir. Araştırıcılar, inhibitör ve telafi mekanizmaları arasındaki dengesel farklılıklara bağlı olarak metal etkilerinin değişiklik göstermesine karşın, kronik Ag^+ etkisinin Na^+/K^+-ATPaz aktivitesini önemli düzeyde değiştirdiğini ve solungaç dokusunun önemli bir hedef organ olduğunu kaydetmişlerdir.

Atlı ve Canlı (2003), 10 gün süreyle 1 ppm Cd^{+2}, Cu^{+2}, Zn^{+2}, Pb^{+2} ve Fe^{+2} etkilerinde bıraktıkları *O. niloticus*'un karaciğer homojenatının Sephadex G-75 ile dolu kolondan yürütülmesiyle elde edilen metallothionein benzeri proteinlere karşılık gelen düşük molekül ağırlıklı protein fraksiyonunda kontrol grubuna göre Cd^{+2} düzeyinin arttığını gözlemişlerdir. Aynı zamanda karaciğerde ölçülen toplam metal düzeyi sonuçlarına göre metal etkilerinde bu metallerin artış gösterdiği belirtilmiştir.

Berntssen ve ark. (2003), Atlantik somon balığı *Salmo salar* L.'nin besin yoluyla 0,5-250 mg/kg derişimindeki Cd^{+2} etkisinde kalması sonucunda Cd^{+2} birikiminin en yüksek oranda bağırsak dokusunda ve daha sonra böbrek ve solungaç dokusunda gözlendiğini belirtmiş ve bu dokularda özellikle yüksek dozdaki Cd^{+2} etkisinde Na^+/K^+-ATPaz ve Ca^{+2}-ATPaz aktivitelerinin azaldığını göstermişlerdir.

Sancho ve ark. (2003), yılan balığı *Anguilla anguilla*'nın 0,22 mg/L derişimindeki tiyobenkarbın 96 saatlik etkisi ve herbisit bulunmayan ortamda 196 saat sonrasında solungaç ve kas dokularında Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktivitelerini ölçmüşlerdir. Solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin 2 ile 12 saatlik herbisit etkisinde inhibe olarak en düşük düzeyde gözlendiği, Mg^{+2}-ATPaz ve Toplam-ATPaz aktivitelerinin ise ilk saatlerin sonunda azaldığı, kas dokusunda da benzer şekilde ATPaz aktivitelerinin düştüğü belirtilmiştir. Herbisit olmayan ortamdaki ATPaz aktivitelerinin artmasına karşın, kontrole göre farklılık göstermeye devam ettiği belirtilmiş ve tiyobenkarbın iyonik mekanizma üzerinde önemli etkilere sahip olduğu gösterilmiştir.

Grosell ve ark. (2004), bir deniz balığı olan *Opsanus beta*'da 12,8 ve 55,2 µM Cu^{+2}'nin 30 günlük etkisi sonrasında metal birikimi ve Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesine bakmışlardır. Buna göre, solungaç dokusunda bağırsak dokusuna göre daha hızlı Cu^{+2} birikimi gözlenmiştir. Bununla birlikte, Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinde solungaç ve böbrek dokusundaki Cu^{+2} birikimine karşın inhibisyon gözlenmemiştir.

Morgan ve ark. (2004), gökkuşağı alabalığı *Oncorhynchus mykiss* ile yaptıkları çalışmada, balıkları 24 saat süreyle 1,92 µg Ag^{+}/L etkisinde bırakmışlar ve sonrasında solungaç Ag^{+} birikimi ve Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesini ölçmüşlerdir. Ag^{+} etkisi sonrasında solungaç Ag^{+} düzeyi hızla artmış ve 3 saat sonunda en yüksek düzeyine ulaşarak tekrar azalışa geçmiştir. Buna karşın, solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin 5 saat sonuna kadar inhibe olmaması, Ag^{+} hareketinin fizyolojik olarak düzenlenmesi ve Ag^{+} birikimi ile ilişkilendirilirken, Na^{+}/K^{+}-ATPaz inhibisyonuna bağlı mekanizmalardan bağımsız olduğu yorumu yapılmıştır.

Bury (2005), alabalık *O. mykiss*'i 21 gün süreyle 8,3 nM Ag^{+} etkisinde bıraktığı çalışmasında solungaç, böbrek ve karaciğer dokularında Na^{+} iyon kaybından söz etmiş ve ayrıca Ag^{+}'nın solungaç ve böbrek dokusunda 7. günün sonunda önemli düzeyde birikim gösterdiğini ve 21. günün sonunda ise aynı düzeyde kaldığını belirtmiştir.

Monteiro ve ark. (2005), 3, 7, 14 ve 21 gün süreyle 40 ve 400 µg/mL Cu^{+2} etkisinde bırakılan tatlı su çuprası *Oreochromis niloticus*'un solungaç dokusunda Cu^{+2} birikimi ve Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi ile plazma Na^{+}, Cl^{-}, osmolalite, protein,

glukoz ve kortizol düzeylerini belirlemişlerdir. Deney sonunda solungaç Cu^{+2} birikiminin Cu^{+2} derişimi ve etki süreleri ile doğrusal olarak arttığı kaydedilmiş buna karşın, Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin 3 günlük etki sonrasında inhibe olduğu ve dokulardaki Cu^{+2} düzeyi ile ters orantılı olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte plazma Na^{+}, protein ve osmolalite değerleri Cu^{+2} etkisiyle düşüş gösterirken, glukoz ve kortizol düzeyleri artmıştır. Bu çalışma ile aynı zamanda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin uzun süreli metal etkilerinde iyon plazma düzeylerine göre daha hızlı tepki verdiği vurgulanmıştır.

Blanchard ve Grosell (2006), *Fundulus heteroclitus*'u 0, 5, 11, 22 ve 28 ppt tuzluluk düzeylerinde Cu^{+2}'nin 30 ve 150 µg/L derişimlerinin 30 gün süreyle etkisinde bırakmışlar ve yüksek derişimli Cu^{+2} etkisinde Na^{+} düzeyinin vücutta düşüş gösterdiğini, solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin ise azaldığını kaydetmişlerdir. Araştırıcılar fizyolojik bulguların, Cu^{+2} toksisitesinde tuzluluğa bağlı değişikliklerin açıklanmasında önemli olduğunu belirtmişlerdir.

Garcia-Santos ve ark. (2006), *O. niloticus* ile yaptıkları çalışmada bu türün yüksek derişimdeki Cd^{+2} düzeylerine dayanıklı olduğunu ve 96 saatlik en yüksek LD50 değerlerine (14,8 mg Cd^{+2}/L) sahip tatlı su türlerinden biri olduğunu vurgulamışlardır. Bu çalışmada balıklar 5 ve 25 mg Cd^{+2}/L etkisine 24, 48 ve 96 saat süreyle bırakılmış ve deney sonunda plazma Na^{+} düzeyi değişiklik göstermezken, Ca^{+2} düzeyi uygulanan doza bağlı olmaksızın 96 saat sonunda azalmış ve solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi ise değişiklik göstermemiştir.

Atlı ve Canlı (2007), *O. niloticus* ile yaptıkları çalışmada 5, 10 ve 20 µM derişimlerindeki Cu^{+2}, Cd^{+2}, Zn^{+2} ve Pb^{+2}'nin 14 günlük etkileri sonunda karaciğerde katalaz, alkalen fosfataz gibi bazı enzimlerle solungaç ve bağırsak dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz, kas dokusunda ise Ca^{+2}-ATPaz aktivitesini ölçmüşlerdir. Çalışılan tüm enzimlerin metaller tarafından etkilendiği belirtilirken, Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin bütün metal etkilerinde inhibe olduğu yalnızca solungaçta 20 µM Pb^{+2} etkisinde artış gösterdiği, kas Ca^{+2}-ATPaz enziminin ise Cu^{+2} dışındaki diğer metal etkilerinde inhibe olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda araştırıcılar enzim tepkilerinin metal tipi ve derişimlerine bağlı olarak değişiklik gösterdiğini ve

enzimatik tepkilerin ekotoksikoloji alanında sucul ortamlardaki metal kirliliğine duyarlı belirteçler olarak kullanılabileceğini vurgulamışlardır.

De la Torre ve ark. (2007), Reconquista nehrinden (Arjantin) yakaladıkları kemikli bir balık olan *Cnesterodon decemmaculatus* ile yaptıkları çalışmada Na^+/K^+-ATPaz'ın da içerisinde bulunduğu bazı biyokimyasal parametreleri ölçerek sucul ekosistemlerdeki kirleticilerin subletal etkilerini belirlemeye çalışmışlar ve Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin bunlar arasında kirleticilere oldukça duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Araştırıcılar, elde ettikleri bulgulara dayanarak, kirleticilerin çevresel etkilerini değerlendirmede uygun türlerin yanı sıra uygun biyokimyasal parametrelerle çalışmanın önemini vurgulamıştır.

Hoyle ve ark. (2007), besin yoluyla 30 gün süreyle Cu^{+2} (1500 mg Cu^{+2}/kg k.a.) etkisinde bırakılan kedibalığı *Clarias gariepinus*'un bağırsak, karaciğer ve solungaç dokularında Cu^{+2} içeriğinin bu sürenin sonunda sırasıyla 20, 5 ve 4 kat arttığını ve doku Na^+, K^+ düzeyi ile Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde az miktarda değişiklik olduğunu belirtmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

3.1.1.1. Metaller ve Asitler

Bakır klorür dihidrat ($CuCl_2.2H_2O$, Merck)
Potasyum kromat (K_2CrO_4, Merck)
Kadmiyum klorür monohidrat ($CdCl_2.H_2O$, Merck)
Çinko klorür ($ZnCl_2$, Merck)
Gümüş nitrat ($AgNO_3$, Merck)
Trisodyum sitrat dihidrat ($C_6H_5Na_3O_7.2H_2O$, Merck)
Nitrik asit (HNO_3 % 65, Merck)
Perklorik asit ($HClO_4$ % 60, Merck)

3.1.1.2. ATPaz Aktivite Ölçümünde Kullanılan Kimyasallar

Trizma-Base (Tris [hidroksimetil]aminometan; $C_4H_{11}NO_3$, Sigma)
Sukroz (α-D-Glukopiranozil β-D-fruktofuranosid; $C_{12}H_{22}O_{11}$, Sigma)
EDTA (Etilendiamintetraasetikasit, Merck)
Sodyum klorür (NaCl, Merck)
Potasyum klorür (KCl, Merck)
Magnezyum klorür ($MgCl_2.6H_2O$, Merck)
Kalsiyum klorür ($CaCl_2$, Merck)
EGTA [Etilen glikol-bis (2-aminoetil eter)-N,N,N′,N′-tetraasetikasit, Sigma]
Polioksietilen 10 Lauril eter (Sigma)
Amonyum molibdat [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$, Merck]
Sülfirik asit (H_2SO_4 % 98, Merck)
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4, Merck)

Disodyum Adenozin trifosfat (Na_2ATP, Sigma)
Ouabain ($C_{29}H_{44}O_{12}$, Sigma)

3.1.1.3. Protein Analizinde Kullanılan Kimyasallar

Sodyum karbonat (Na_2CO_3, Fluka)
Sodyum hidroksit (NaOH, Merck)
Potasyum sodyum tartarat tetrahidrat ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$, Merck)
Bakır(II) sulfat pentahidrat ($CuSO_4.5H_2O$, Merck)
Folin Ciocalteu Fenol Ayıracı (Sigma)
Sığır Serum Albumini (Sigma)

3.1.2. Kullanılan Aletler

Spektrofotometre: Cecil 5000 series
Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi: Perkin Elmer 3100-SpectrAA 220 FS
Derin dondurucu (- 80 ^oC): Revco Ultima II
Hassas Terazi: Sartorius Analytic A 200S
Santrifüj: Hettich Universal 30RF
Homojenizatör: Janke & Kunkel Ultra Turrax T25
Su Banyosu: nüve BM 101
pH metre: Hanna HI 8314 membran pH metre
Manyetik Karıştırıcı: Janke & Kunkel IKAMAG RH

3.2. Yöntem

Deneylerde kullanılmak üzere Ç.Ü. Su Ürünleri Fakültesi balık yetiştirme havuzlarından alınan *Oreochromis niloticus*, sıcaklığın 20±1 ^0C olduğu ve 12 saat aydınlatma periyodunun uygulandığı laboratuar ortamında 40 x 40 x 100 cm ölçülerindeki 100 L çeşme suyu içeren akvaryumlarda yaklaşık 4 ay süreyle yeni koşullara adapte olmaya bırakıldı. Akvaryumlardaki oksijen miktarı 5,8 ± 0,97 mg/L,

pH 8,2 ± 0,19, toplam sertlik 307,2 ± 20,4 µg $CaCO_3$/mL, alkalinite ise 142 ± 11,8 µg $CaCO_3$/mL olarak ölçüldü. Balıklara günde bir defa olmak üzere ağırlıklarının % 2-3'ü kadar hazır balık yemi (Pınar Sazan Yavru yemi, İzmir) verildi. Kullanılan balık yemindeki mikro elementlerin miktarları sırasıyla 70 mg Zn/kg, 25 mg Mn/kg, 25 mg Mg/kg, 2 mg Fe/kg, 0,7 mg I/kg, 1 mg Cu/kg, 0,2 mg Co/kg, 0,03 mg Se/kg; makro elementlerin miktarları ise en az % 2-en çok % 2,5 Ca, en az % 0,2-en çok % 1 Na, en az % 1 P ve yem içeriğindeki ham protein ise en az % 40'dır. Akvaryum suları 2 günde bir olmak üzere dinlendirildi ve çeşme suyu kullanılarak değiştirildi.

Akut uygulamalarda balıklar 6 adet olacak şekilde 33x33x40 cm boyutlarındaki akvaryumlarda gümüş ($AgNO_3$), kadmiyum ($CdCl_2.H_2O$), krom (K_2CrO_4), bakır ($CuCl_2.2H_2O$) ve çinkonun ($ZnCl_2$) 0,1, 0,5, 1,0 ve 1,5 µg/mL derişimlerinin 96 saat; kronik uygulamalarda ise balıklar 8 adet olacak şekilde 0,05 µg/mL derişimindeki aynı metallerin 0, 5, 10, 20 ve 30 gün süreyle etkisinde bırakıldı. Metallerin akvaryum tabanına çökmesini önlemek amacıyla trisodyum sitrat dihidrat ($C_6H_5Na_3O_7.2H_2O$) kullanıldı. Deney sırasında akvaryumların cam yüzeylerine tutunma, akvaryum suyunun buharlaşması gibi nedenlerle akvaryumlardaki metal derişimleri değişeceğinden akvaryum suları 2 günde bir taze hazırlanan stok çözeltilerden yapılan seyreltmelerle değiştirildi ve metallerin balık yemine yapışmasını önlemek amacıyla su değişiminden 1 saat kadar önce yem verildi. *İn vitro* metal etkilerinde ise doku homojenatları kadmiyum, bakır, çinko, krom ve gümüşün 0,1, 0,5, 1,0 ve 1,5 µg/mL derişimlerinin 20 dk süreyle etkisinde bırakıldı.

3.2.1. Doku Homojenatlarının Hazırlanışı

Deney süreleri sonunda balıklar akvaryumlardan alındıktan sonra spinal yapılarak öldürüldü. Kurutma kağıdıyla kurulanan balıkların boyları en yakın cm ve ağırlıkları en yakın g cinsinden ölçüldü. Balıkların ortalama boy (15,7±1,21 cm) ve ağırlıklarının (61,5±12,8 g) farklı deney grupları arasında istatistiksel olarak bir ayırım göstermediği gözlendi ($P>0,05$). Steril aletler kullanılarak solungaç, böbrek ve kas dokuları alındı ve homojenize edilinceye kadar -80 ^{0}C'de saklandı. Dokular

250 mM Sukroz, 20 mM Trizma-Baz, 1 mM EDTA (pH 7,8) içeren homojenizasyon tamponu ile (1/10, w/v) 9500 rpm'de birkaç dk süreyle buz üstünde homojenize edildi. Ependorf tüplerine aktarılan homojenatlar 13,000 g'de 20 dk (4 ^{o}C) santrifüj edildi ve elde edilen supernatantlar enzim analizlerinde ve protein tayininde kullanılmak üzere ependorf tüplerine aktarılarak buz üzerinde saklandı.

3.2.2. ATPaz Enzimlerinin Karakterizasyonu ve Aktivitelerinin Ölçümü

Konuyla ilgili yapılan çalışmalar dikkate alınarak (Pelgrom ve ark., 1995; Ay ve ark., 1999; Wong ve Wong, 2000; Sunny ve Oommen, 2001; Guynn ve ark., 2002), ATPaz enziminin optimum koşullarını belirlemek için kullanılan iyon derişimleri ve parametre değerleri Çizelge 3.1.'de gösterildi. Elde edilen veriler ise bulgular kısmında grafikler üzerinde gösterildi (Şekil 4.1-2. A-H, 4.3. A-G).

Çizelge 3.1. Dokularda ATPaz enzimi karakterizasyonunda kullanılan inkübasyon ortamı değerleri ve inkübasyon ortamındaki iyonların derişimleri.

İnkübasyon ortamı	**İnkübasyon Ortamı Derişim ve Değerleri**	
	Toplam-, Mg^{+2}-, Na^{+}/K^{+}-ATPaz	**Ca^{+2}-ATPaz**
Ouabain (mM)	0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0	-
NaCl (mM)	60, 80, 100, 120, 140	-
KCl (mM)	10, 20, 30, 40, 50	-
$MgCl_2$ (mM)	1, 2, 3, 4, 5, 6	1, 2, 3, 4, 5, 6
Tris (mM)	10, 20, 30, 40, 50	10, 20, 30, 40, 50
pH	6,4, 6,8, 7,0, 7,4, 7,7, 8,0, 8,7	6,4, 6,8, 7,0, 7,4, 7,7, 8,0, 8,7
ATP (mM)	1, 2, 3, 4, 5, 6	1, 2, 3, 4, 5, 6
$CaCl_2$ (mM)	-	0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0
EGTA (mM)	-	0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0

ATPaz enzimlerinin karakterizasyonu sonucunda en yüksek enzim aktivitelerinin gözlendiği inkübasyon ortamındaki son iyon derişimleri ve parametre değerleri Çizelge 3.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Dokularda en yüksek ATPaz enzim aktivitesinin ölçüldüğü ortam koşulları ve inkübasyon ortamındaki iyonların son iyon derişimleri.

	Toplam-ATPaz (- Ouabain)	**Mg^{+2}-ATPaz (+ Ouabain)**	**Ca^{+2}-ATPaz**
Ouabain (mM)	-	1	-
NaCl (mM)	100	100	-
KCl (mM)	20	20	-
$MgCl_2$ (mM)	4	4	4
$CaCl_2$ (mM)	-	-	1
EGTA (mM)	-	-	1
Tris (mM)	40	40	40
ATP (mM)	3	3	3
pH	7,7	7,7	7,7
^oC	37	37-40	37

Enzim aktivitelerinin saptanması için karakterizasyon çalışmasında üç, diğer analizlerde iki tekrarlı olmak üzere her tüpe son iyon derişimleri Çizelge 3.2'de verilen 870 µL inkübasyon ortamı ve 30 µL örnek kondu ve sıcak su banyosunda 37 ^0C'de 5 dk inkübe edildi. Reaksiyon, tüplerin üzerlerine 100 µL 3 mM Na_2ATP konmasıyla başlatıldı. Reaksiyon, 30 dk inkübasyon süresinin ardından tüplere konan 500 µL soğuk saf su (+4 ^oC) ile sonlandırıldı. Tüm bileşenler dışında ATP içermeyen tüpler ATP körü, sadece örnek içermeyen tüpler ise Örnek körü olarak kullanıldı. Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi, Toplam-ATPaz (ouabain içermeyen) aktivitesinden Mg^{+2}-ATPaz (Ouabain içeren) aktivitesinin çıkarılması ile hesaplandı. Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ise $CaCl_2$ varlığında ve yokluğunda ölçülen enzim aktiviteleri arasındaki

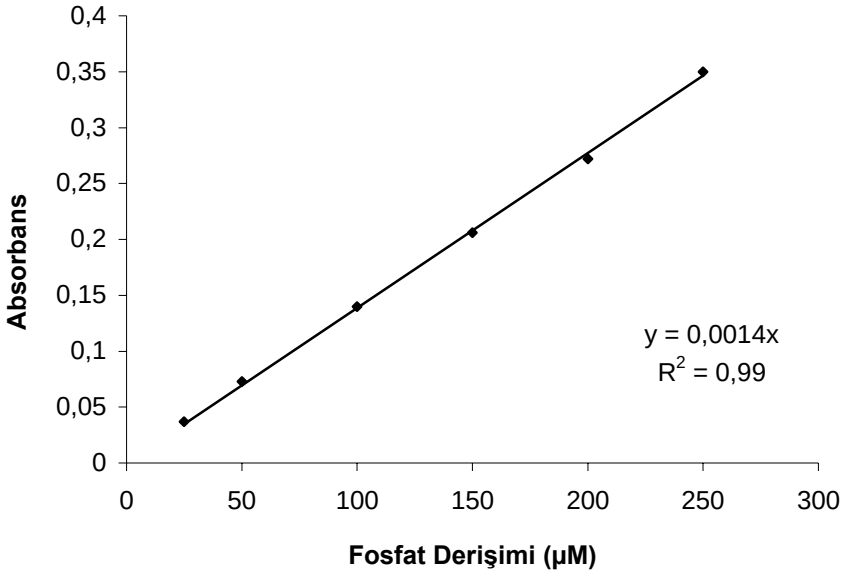
farka dayanarak hesaplandı. Enzim aktiviteleri, µmol Pi/mg prot./sa. cinsinden verildi.

3.2.3. İnorganik Fosfat Tayini

İnorganik fosfat tayini, ATP'den açığa çıkan Pi'nin Polioksietilen 10 Lauril eter ile fosfomolibdatın oluşturduğu sarı renkli bileşiğin absorbansının 390 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Atkinson ve ark., 1973).

1. % 5 Polioksietilen 10 Lauril eter: 5 g Polioksietilen eter tartılarak saf su ile çözüldü ve 100 ml'ye tamamlandı. Kullanılmadan önce oluşan bulanıklığın giderilmesi için 37 ^{0}C'de 30-40 dk bekletildi.
2. % 2 Molibdik asit: 2 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ tartılarak 1,8 M H_2SO_4 çözeltisinde çözüldü.
3. Ana ayıraç: 10 mL % 5 Polioksietilen eter, 25 mL % 2 Molibdik asit ve 65 mL saf su karıştırılarak hazırlandı.

1,5 mL örnek üzerine 3 mL ana ayıraçtan konarak oda sıcaklığında 10 dk kompleks oluşumu için bekletildi ve daha sonra 390 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Sonuçlar 25, 50, 100, 150, 200, 250 µM KH_2PO_4 çözeltisinden hazırlanarak elde edilen standart eğri üzerinden değerlendirildi (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Fosfat derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki.

3.2.4. Toplam Protein Analizi

Lowry metodu (Lowry ve ark., 1951) ile doku homojenatlarında protein analizi yapıldı.

Prensip:

Proteinlerin alkali bakır sülfat ilavesiyle, fosfotungstik asit ile mavi renkli kompleks oluşturması temeline dayanır. Oluşan bu renkli bileşiğin ise spektrofotometrede 750 nm dalga boyunda absorbansı ölçülerek kantitatif olarak protein miktarı belirlenir. Proteinlerin çoğunda tirozin veya triptofan veya her iki aminoasit eşit oranlarda bulunmaktadır. Bu aminoasitler, fosfotungstik-fosfo molibdik asidi (Folin-Ciocalteu) redükleyerek mavi renk verirler. Bu yöntem ile, proteinler önce alkali ortamda bakır iyonu ile reaksiyona girerek bakır-protein kompleksini oluşturur, daha sonra ortama Folin-Ciocalteu çözeltisi eklendiğinde bakır-protein kompleksi, tirozin ve triptofan kökleriyle birleşir.

Ayıraçlar:

1- Ayıraç A: % 2 Na_2CO_3 (0,1 N NaOH içinde). 2 g Na_2CO_3 tartılarak 0,1 N NaOH içinde çözünmesi sağlandı.

2- Ayıraç B_1: % 1 $CuSO_4$. $5H_2O$. 1 g $CuSO_4.5H_2O$ tartılıp, 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.

3- Ayıraç B_2: % 2 Na-K-Tartarat. 2 g Na-K-Tartarat tartılıp 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.

4- Ayıraç C: 50 hacim ayıraç A + 1 hacim eşit oranda karıştırılan ayıraç B_1 ve B_2.

5. Folin-Ciocalteu Çözeltisi: Kullanılırken 1'e 1,5 oranında saf su ile seyreltildi.

6. Standart Çözelti: 1 mL'de 1 mg (1000 µg/mL) sığır serum albumini olacak şekilde stok sığır serum albumini çözeltisi hazırlandı ve bundan yapılan uygun seyreltmelerle 100-200-400-600-800-1000 µg/mL olacak şekilde standart çözeltiler hazırlandı.

Deney tüplerine hazırlanan standart çözeltilerden ve örneklerden 0,3 mL konularak üzerlerine 3 mL ayıraç C eklendi ve karıştırılarak 15 dk oda sıcaklığında bekletildi. Bu süre sonunda her tüpe 0,3 mL Folin-Ciocalteu konarak tüpler iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında 30 dk bekletildi.

Deneyin Yapılışı:

- Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Standart 1 = 100 µg : 0,1 mL stok sığır serum albumini + 0,9 mL distile su

Standart 2 = 200 µg : 0,2 mL stok sığır serum albumini + 0,8 mL distile su

Standart 3 = 400 µg : 0,4 mL stok sığır serum albumini + 0,6 mL distile su

Standart 4 = 600 µg : 0,6 mL stok sığır serum albumini + 0,4 mL distile su

Standart 5 = 800 µg : 0,8 mL stok sığır serum albumini + 0,2 mL distile su

Standart 6 = 1000 µg : 1,0 mL stok sığır serum albumini

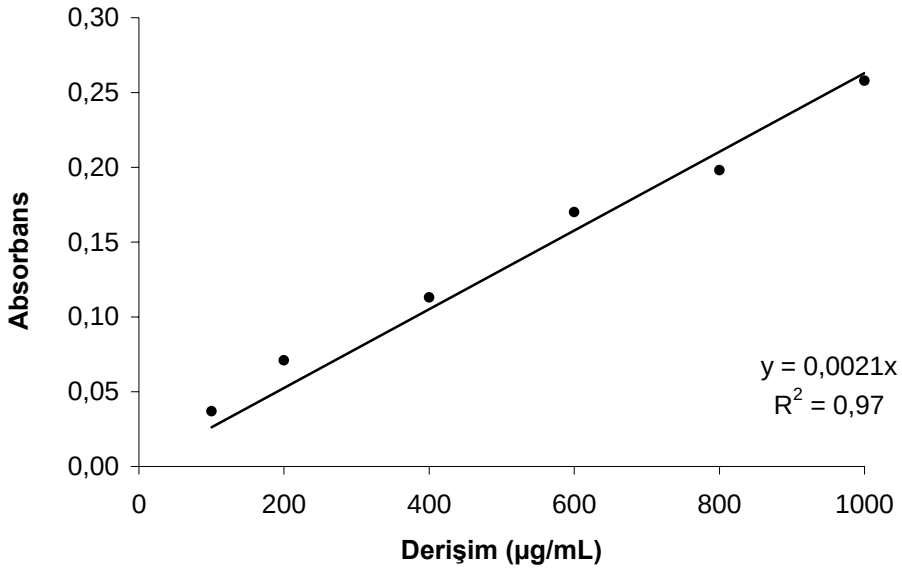
	Kör	Doku homojenatı	Standart
Örnek (mL)	-	0,03	0,3
Saf su (mL)	0,3	0,27	-
Ayıraç C (mL)	3,0	3,0	3,0

Karıştırılarak 15 dk oda sıcaklığında beklenir.

Folin-Ciocalteu (mL)	0,3	0,3	0,3

Karıştırılarak 15 dk oda sıcaklığında beklenir.

Bu sürenin sonunda oluşan mavi renkli kompleks, 750 nm dalga boyunda su körüne karşı okundu. *O. niloticus* dokularında toplam protein düzeyini belirlemek için stok serum sığır serum albumini çözeltisinden uygun seyreltmeler yapılarak 100, 200, 400, 600, 800, 1000 µg/mL olacak şekilde hazırlanan standart derişimlerine karşılık gelen absorbans değerleri aracılığıyla çizilen standart eğride regresyon eşitliği y = 0,0021x olarak bulundu (Şekil 3.2.). Burada y absorbans değerini, x ise derişimi göstermektedir.



Şekil 3.2. Sığır albumininden hazırlanan standart derişimler ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki.

Buna göre 0,1 µg/mL Cd^{+2} etkisinde 1 nolu *O. niloticus*'un solungacında 96 saat sonunda toplam protein düzeyi:

y = 0,0021x
Absorbans: y = 0,658

$$\text{Derişim (x)} = \frac{0,658}{0,0021}$$

Derişim = 0,313 mg/mL

Doku homojenatı ve doku tamponla 10'ar mL'ye seyreltildiği için

Derişim = 0,313 x 10 x 10

Derişim = 31,3 mg prot./ g yaş ağırlık (y.a.)

Aynı regresyon eşitliği kullanılarak Cu^{+2}, Zn^{+2}, Cr^{+6} ve Ag^{+} etkisindeki deney grubunda ve kontrol grubunda iki tekrarlı olmak üzere toplam protein düzeyleri hesaplandı.

3.2.5. ATPaz Aktivitesinin Hesaplanması

$$\text{ATPaz aktivitesi} = \frac{\text{OD}/0,0014^{*} \text{ x } 4,5 \text{ (mL)}}{1000 \text{ x } 0,03 \text{ (mL)} \text{ x } 0,5 \text{ (sa.)} \text{ x mg prot./mL}}$$

= µmol Pi/mg prot./sa.

* = İnorganik fosfat regresyon eşitliği (y = 0,0014x)

0,1 µg/mL Cd^{+2} etkisinde 1 nolu *O. niloticus*'un solungacında 96 saat sonunda Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi:

Absorbans: y = 0,064

$$Na^+/K^+\text{-ATPaz aktivitesi} = \frac{0,064/0,0014 \text{ x } 4,5 \text{ (mL)}}{1000 \text{ x } 0,03 \text{ (mL) x } 0,5 \text{ (sa.) x } 3,13 \text{ mg prot./mL}}$$

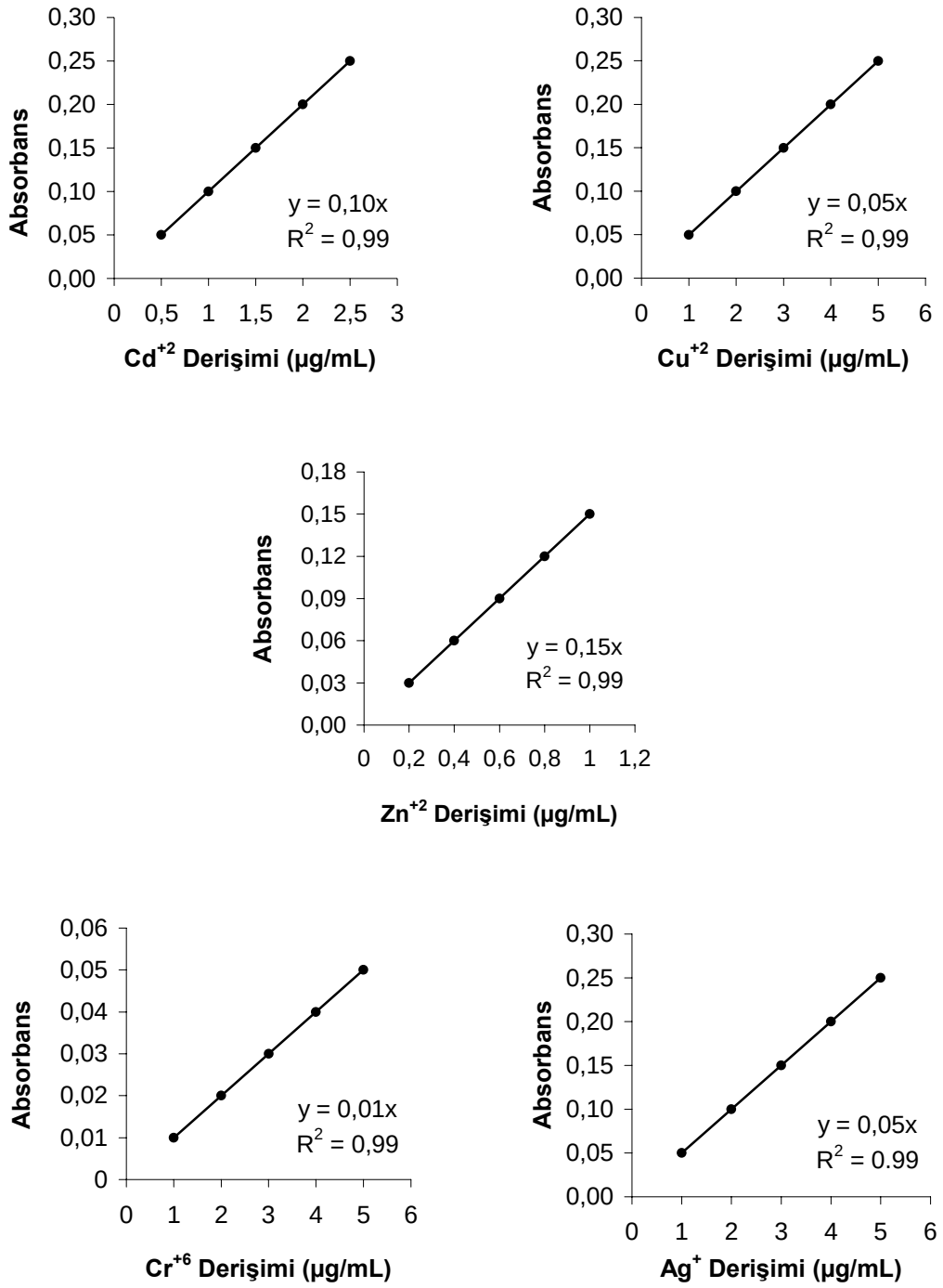
Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi = 4,38 µmol Pi/mg prot./sa.

3.2.6. Metal ve İyon Analizi

Toplam metal analizi için dokular 105 ^{0}C'de 5 gün süreyle sabit ağırlığa ulaşana kadar kurumaya bırakıldı. Bu süre sonunda dokular, kuru ağırlıkları saptandıktan sonra üzerlerine 2 mL perklorik asit ve 4 mL nitrik asit ilavesiyle 100 ^{0}C'de 4,5 saat süreyle çeker ocaklı ortamda yakıldı. Örneklerin tamamı homojen olarak yakıldıktan sonra plastik tüplere alınarak 10 mL'ye distile su ile seyreltildi ve atomik absorbsiyon spektrofotometresinde (Perkin Elmer AS 3100- SpectrAA 220 FS) okundu. Cd^{+2}, Cu^{+2}, Zn^{+2}, Cr^{+6} ve Ag^+ için saptama sınırları ile dalga boyları sırasıyla 0,001, 0,002, 0,002, 0,003 ve 0,002 µg/mL ile 228,8, 324,7, 213,9, 357,9 ve 328,1 nm'dir. Na^+, K^+, Mg^{+2} ve Ca^{+2} için ise saptama sınırları ile dalga boyları sırasıyla 2,0, 15,0, 0,0001 ve 0,002 µg/mL ile 330,3, 404,4, 285,2 ve 422,7 nm'dir. Atomik absorbsiyon spektrofotometresinin ve ölçümlerin doğruluğu referans materyal (TORT 1 istakoz hepatopankreası, National Research Council, Canada) kullanılarak kontrol edildi ve ortalama ile standart hatasının % 10 aralığında olduğu belirlendi.

3.2.7. Metal Derişiminin Hesaplanması

Cd^{+2}, Cu^{+2}, Zn^{+2}, Cr^{+6} ve Ag^+ etkisinde kalan deney gruplarında ve kontrol gruplarında, metal standartları ile absorbansları arasındaki doğrusal ilişkiyi gösteren standart grafikler (Şekil 3.3.) kullanılarak metal birikim düzeyleri belirlendi.



Şekil 3.3. Metal derişimleri ve absorbansları arasındaki doğrusal ilişki.

Cd^{+2} etkisinde kalan örneklerde, Cd^{+2} birikimini belirlemek için stok çözeltiden uygun seyreltmelerle hazırlanan 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 5,0 ppm derişimlerindeki Cd^{+2} standartlarının absorbans değerleri ile y = 0,10x regresyon eşitliği elde edildi. Denklemdeki y absorbansı, x ise kadmiyum derişimini göstermektedir (Şekil 3.3.).

Toplam metal düzeyleri belirlenirken, regresyon eşitlikleri kullanılarak hesaplamalar yapıldı (Çizelge 3.3.).

Çizelge 3.3. Metal standartları ile absorbansları arasındaki regresyon eşitlikleri.

Metal	**Derişim (µg/mL)**	**Regresyon eşitliği**
Cd^{+2}	0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5	y = 0,10x
Cu^{+2}	1, 2, 3, 4, 5	y = 0,05x
Zn^{+2}	0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0	y = 0,15x
Cr^{+6}	1, 2, 3, 4, 5	y = 0,01x
Ag^{+}	1, 2, 3, 4, 5	y = 0,05x

0,1 µg/mL Cd^{+2} etkisinde 1 nolu *Oreochromis niloticus*'un solungacında 96 saat sonunda Cd^{+2} derişimi:

y = 0,10x

Absorbans: y = 0,055

$$\text{Derişim (x)} = \frac{0,055}{0,10}$$

Derişim = 0,55 µg/mL Cd^{+2}

Doku asitle yakıldıktan sonra 10 mL'ye tamamlandığı için

Derişim = 0,55 x 10

Derişim = 5,5 µg Cd^{+2}

Cd^{+2} etkisindeki deney grubunda solungaç dokusunun kuru ağırlığı 0,4193 g olarak tespit edildi. Buna göre 1 g dokudaki Cd^{+2} derişimi:

$$\text{Derişim} = \frac{5,5}{0,4193}$$

Derişim = 13,12 µg Cd^{+2}/g kuru ağırlık (k.a.)

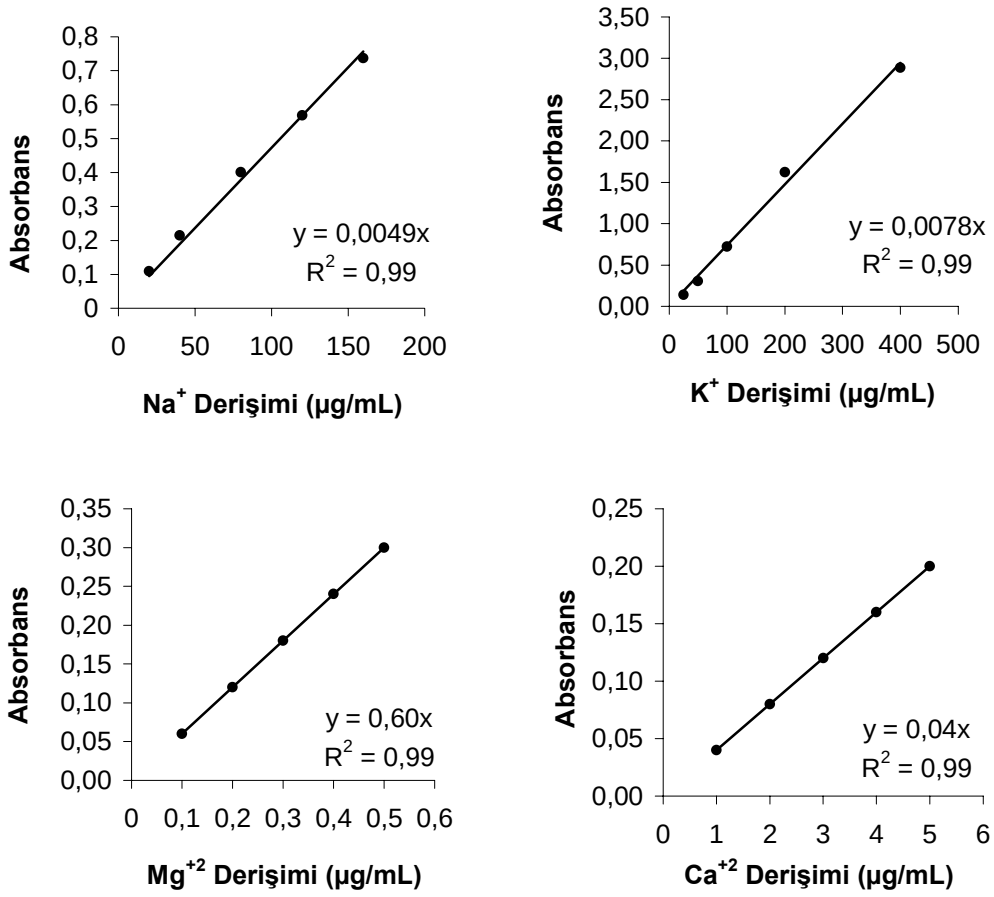
Toplam metal düzeyi diğer Cu^{+2}, Zn^{+2}, Cr^{+6} ve Ag^{+} etkisinde kalan deney grupları ve kontrol grupları için de aynı şekilde hesaplandı.

3.2.8. İyon Derişiminin Hesaplanması

Toplam iyon düzeyleri, kontrol ve metal etkisinde kalan gruplarda Na^{+}, K^{+}, Mg^{+2} ve Ca^{+2} standartları ile absorbans değerleri arasındaki ilişkileri gösteren standart eğriler (Şekil 3.4.) kullanılarak hesaplandı ve bu değerler Çizelge 3.4'de gösterildi.

Çizelge 3.4. İyon standartları ile absorbansları arasındaki regresyon eşitlikleri.

İyon	Derişim (µg/mL)	Regresyon eşitliği
Na^{+}	20, 40, 80, 120, 160	y = 0,0049x
K^{+}	25, 50, 100, 200, 400	y = 0,0078x
Mg^{+2}	0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5	y = 0,60x
Ca^{+2}	1, 2, 3, 4, 5	y = 0,04x



Şekil 3.4. İyon derişimleri ve absorbansları arasındaki doğrusal ilişki.

0,1 µg/mL Cd^{+2} etkisinde 1 nolu *Oreochromis niloticus*'un solungacında 96 saat sonunda Na^{+} derişimi:

y = 0,0049x

Absorbans: y = 0,778

$$\text{Derişim (x)} = \frac{0,778}{0,0049}$$

Derişim = 158,78 µg/mL Na^{+}

Doku asitle yakıldıktan sonra 10 mL'ye seyreltildiği için

Derişim = 158,78 x 10

Derişim = 1,588 mg Na^{+}

Cd^{+2} etkisindeki deney grubunda solungaç dokusunun kuru ağırlığı 0,4193 g olarak ölçüldü. Buna göre 1 g dokudaki Na^{+} derişimi:

$$\text{Derişim} = \frac{1,588}{0,4193}$$

Derişim = 3,79 mg Na^{+}/g k.a.

Toplam iyon düzeyi diğer Cu^{+2}, Zn^{+2}, Cr^{+6} ve Ag^{+} etkisinde kalan deney grupları ve kontrol grupları için de aynı şekilde hesaplandı.

3.2.9. İstatistik

Bu çalışmadaki istatistiksel analizler, SPSS yardımıyla "Regresyon Analizi" ve "One-way ANOVA" kullanılarak yapıldı. Kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel bir ayırım gözlendiğinde ($P<0.05$), hangi grup veya grupların farklı olduğu post-hoc testlerinden Duncan-test kullanılarak belirlendi. Grafik çizimleri ise Microsoft Excel programı kullanılarak çizildi.

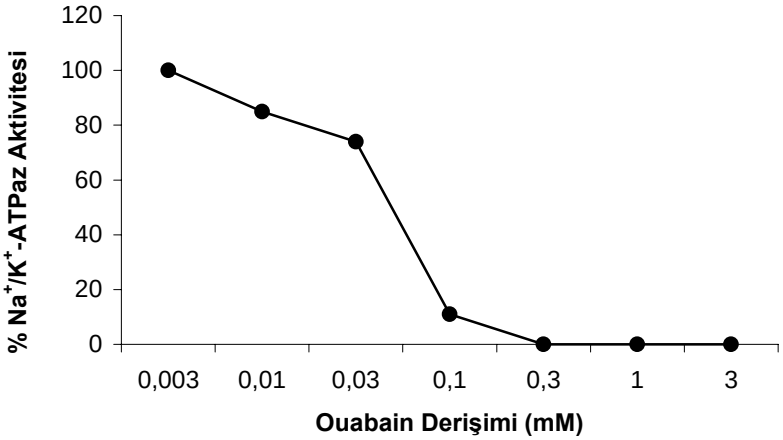
4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Bulgular

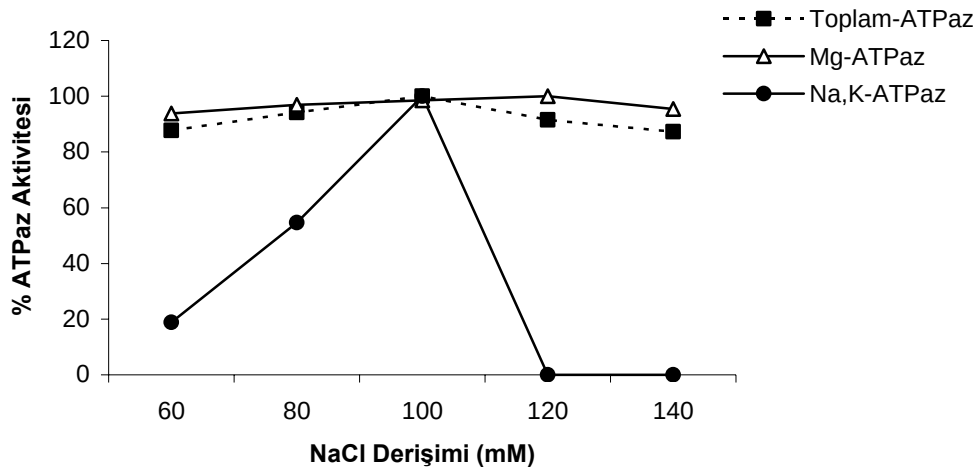
4.1.1. ATPaz Karakterizasyonu

O. niloticus'un solungaç, böbrek ve kas dokularında ATPaz aktivitelerinin belirlenmesinden önce, reaksiyonun gerçekleştiği inkübasyon ortamında bulunan iyon ve bileşiklerin farklı derişimleri denendi ve ATPaz enzimlerinin en yüksek aktivite gösterdiği derişimlerle çalışıldı.

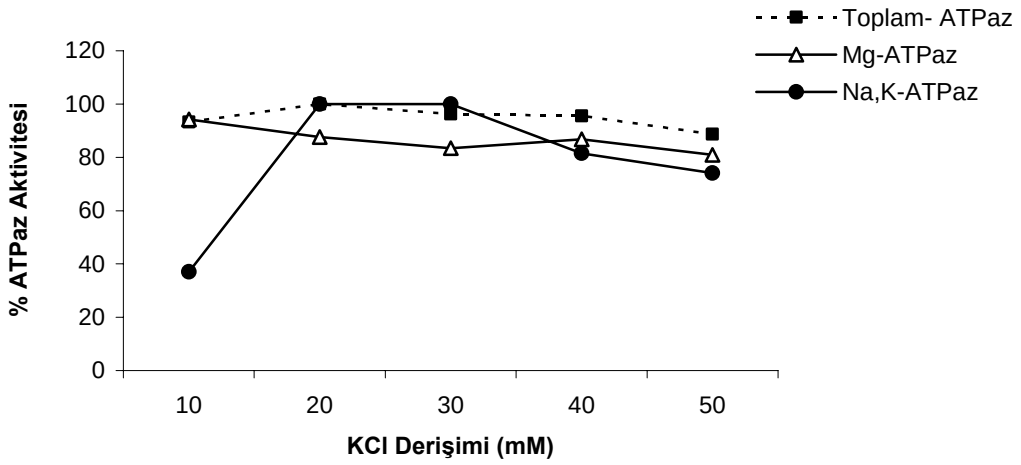
Elde edilen verilere göre, solungaç dokusunda 0,003-3,0 mM ouabain derişimlerine karşılık ölçülen Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi 1,0 mM ouabain derişiminde %100 inhibe oldu (Şekil 4.1. a). Toplam-ATPaz, Mg^{+2}-ATPaz ve Na^+/K^+-ATPaz'ın 60-140 mM Na^+, 10-50 mM K^+, 1-6 mM Mg^{+2}, 10-50 mM Tris ve 1-6 mM ATP derişimlerine karşılık en yüksek aktiviteleri sırasıyla 100 mM Na^+, 20 mM K^+, 4 mM Mg^{+2}, 40 mM Tris ve 3 mM ATP' de gözlendi (Şekil 4.1 b.-f.). ATPaz enzimleri en yüksek aktiviteye 6,4-8,7 pH ve 5-60 ^oC aralığında 7,7 pH ve 37 ^oC'de ulaştı (Şekil 4.1. g., h.).



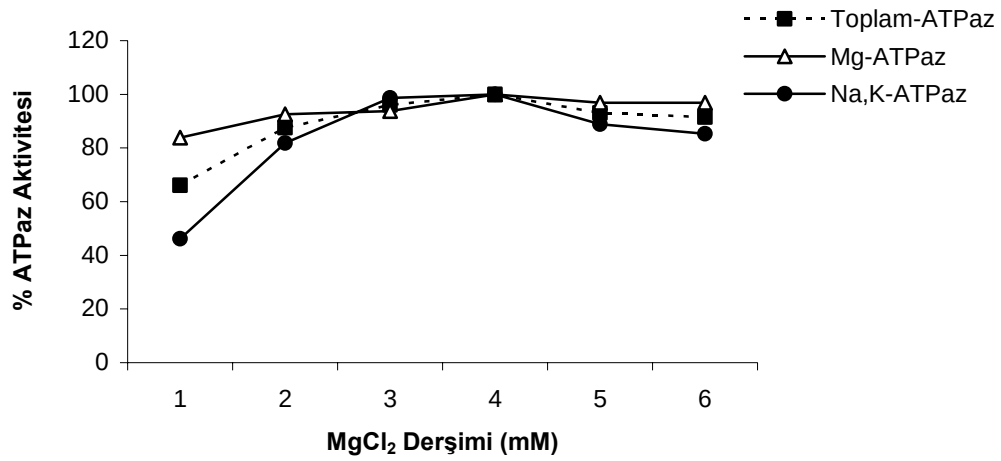
Şekil 4.1. a. *O. niloticus*'un solungaç dokusunda 0,003-3,0 mM Ouabain derişimlerinde % Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi.



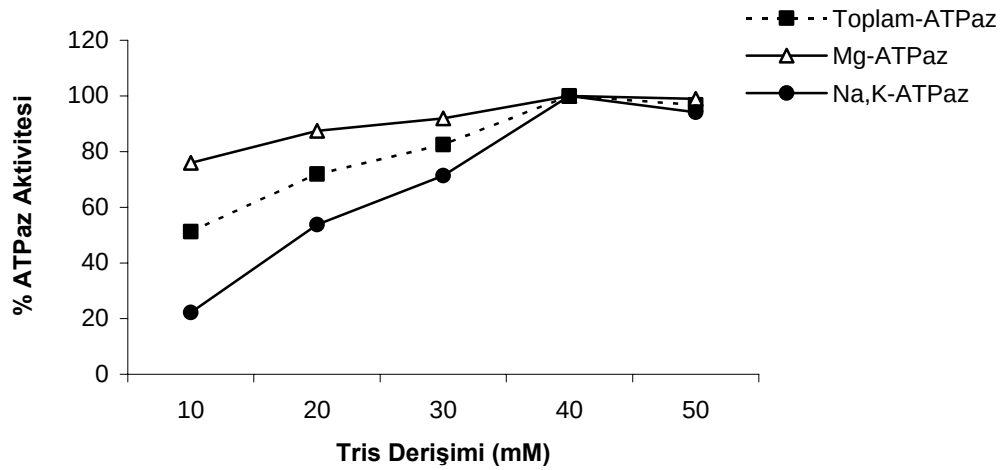
Şekil 4.1. b. *O. niloticus*'un solungaç dokusunda 60-100 mM NaCl derişimlerinde % ATPaz aktivitesi.



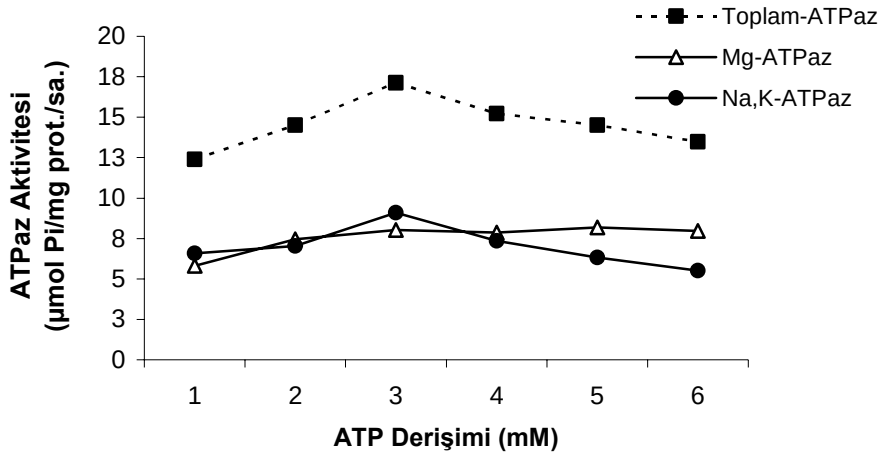
Şekil 4.1. c. *O. niloticus*'un solungaç dokusunda 10-50 mM KCl derişimlerinde % ATPaz aktivitesi.



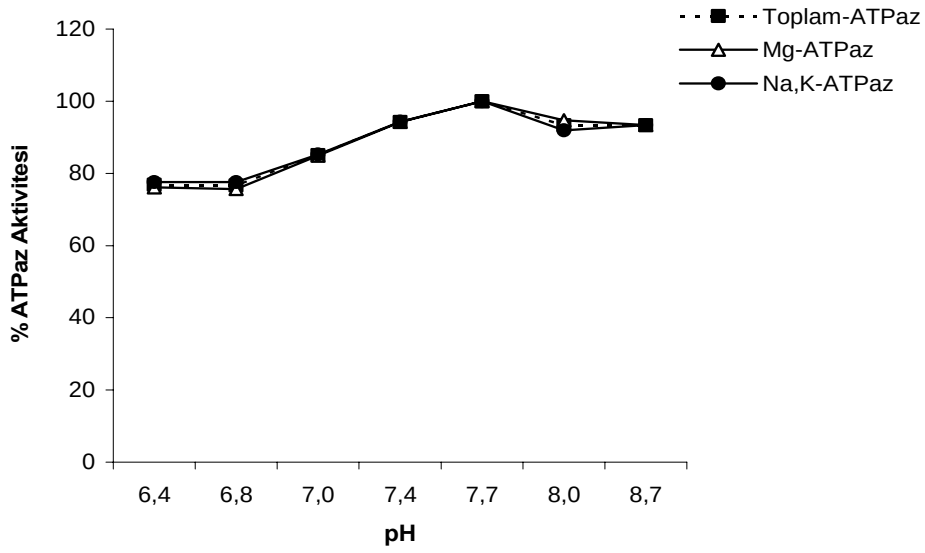
Şekil 4.1. d. *O. niloticus*'un solungaç dokusunda 1-6 mM $MgCl_2$ derişimlerinde % ATPaz aktivitesi.



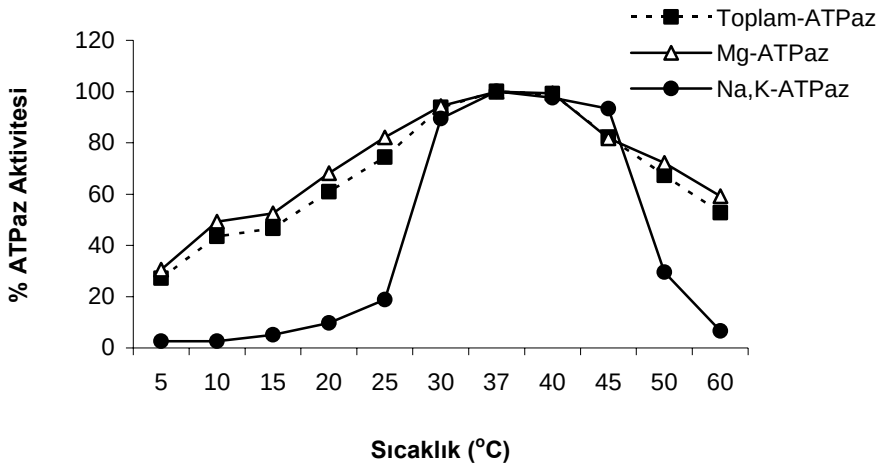
Şekil 4.1. e. *O. niloticus*'un solungaç dokusunda 10-50 mM Tris derişimlerinde % ATPaz aktivitesi.



Şekil 4.1. f. *O. niloticus*'un solungaç dokusunda 1-6 mM ATP derişimlerinde % ATPaz aktivitesi.

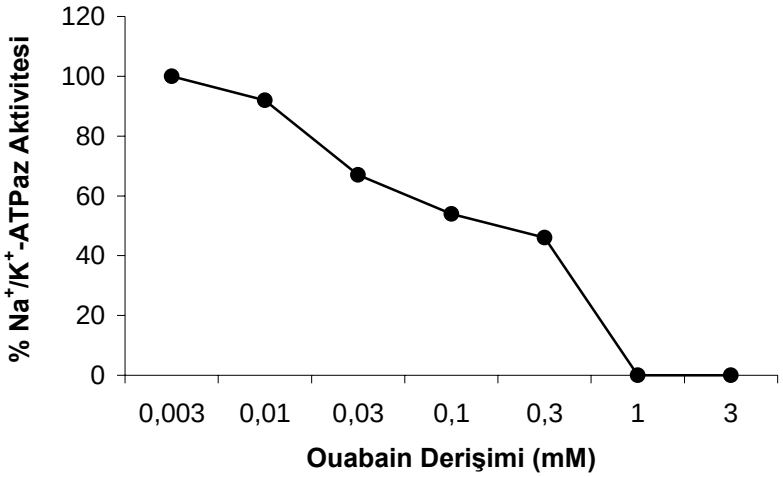


Şekil 4.1. g. *O. niloticus*'un solungaç dokusunda 6,4-8,7 pH aralığında % ATPaz aktivitesi.

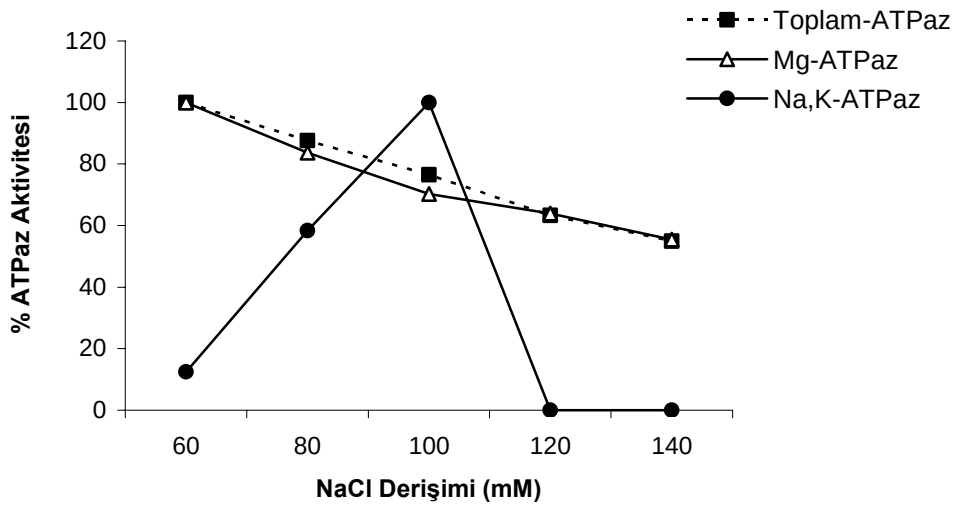


Şekil 4.1. h. *O. niloticus*'un solungaç dokusunda 5-60 °C sıcaklık aralığında % ATPaz aktivitesi.

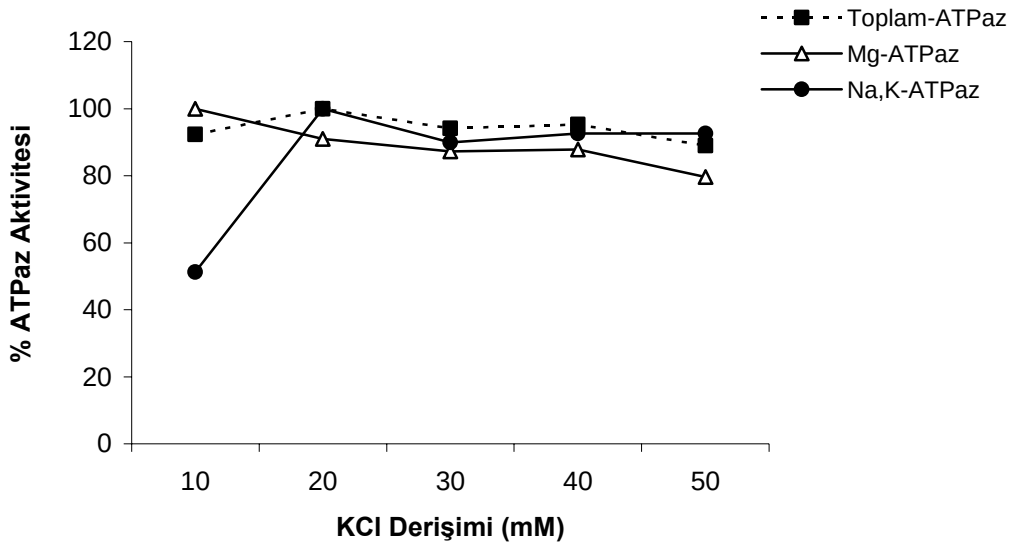
Böbrek dokusundaki karakterizasyon bulguları ise solungaç dokusundaki değerlerle uygunluk göstermektedir. Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin 0,003-3,0 mM derişim aralığındaki ouabain düzeylerinden 1,0 mM ouabain varlığında % 100 inhibe olduğu gözlendi (Şekil 4.2. a). En yüksek ATPaz aktiviteleri 60-140 mM Na^+, 10-50 mM K^+, 1-6 mM Mg^{+2}, 10-50 mM Tris ve 1-6 mM ATP derişimlerinde sırasıyla 100 mM Na^+, 20 mM K^+, 4 mM Mg^{+2}, 40 mM Tris ve 3 mM ATP derişimlerinde gözlendi (Şekil 4.2. b.-e.). Bununla birlikte inkübasyon ortamında 6,4-8,7 pH ve 5-60 °C sıcaklık aralıklarında ölçülen en yüksek ATPaz aktiviteleri 7,7 pH ve 37-40 °C'de gözlendi (Şekil 4.2. f.,g.).



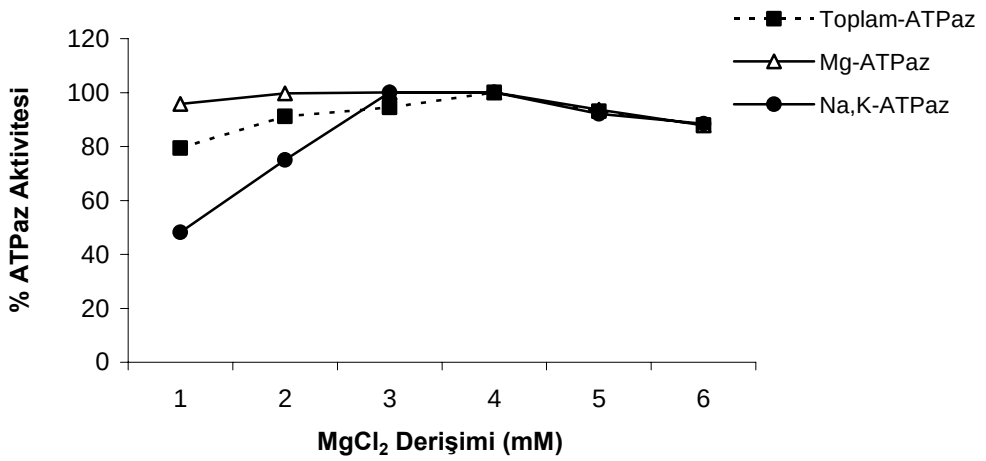
Şekil 4.2. a. *O. niloticus*'un böbrek dokusunda 0,003-3,0 mM Ouabain derişimlerinde % Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi.



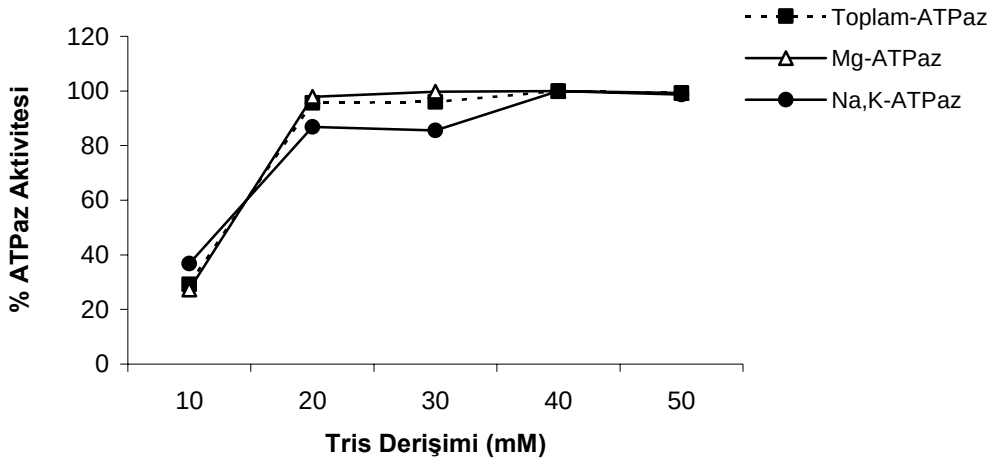
Şekil 4.2. b. *O. niloticus*'un böbrek dokusunda 60-100 mM NaCl derişimlerinde % ATPaz aktivitesi.



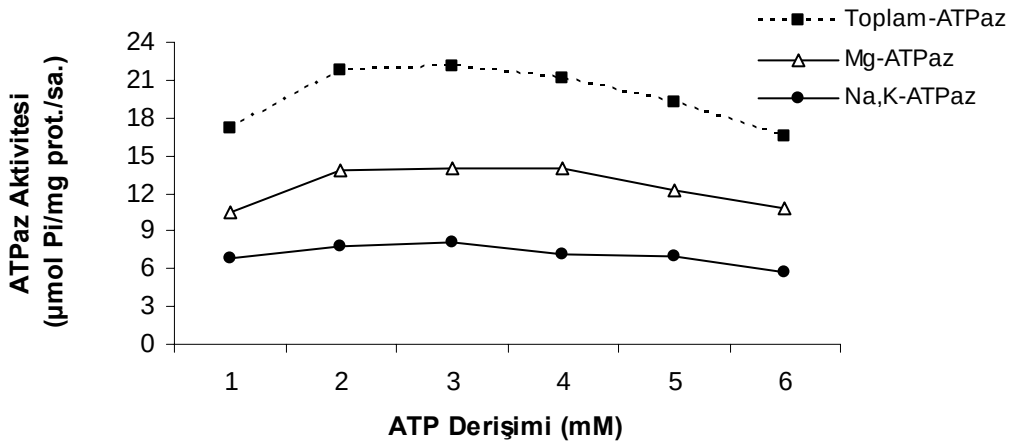
Şekil 4.2. c. *O. niloticus*'un böbrek dokusunda 10-50 mM KCl derişimlerinde % ATPaz aktivitesi.



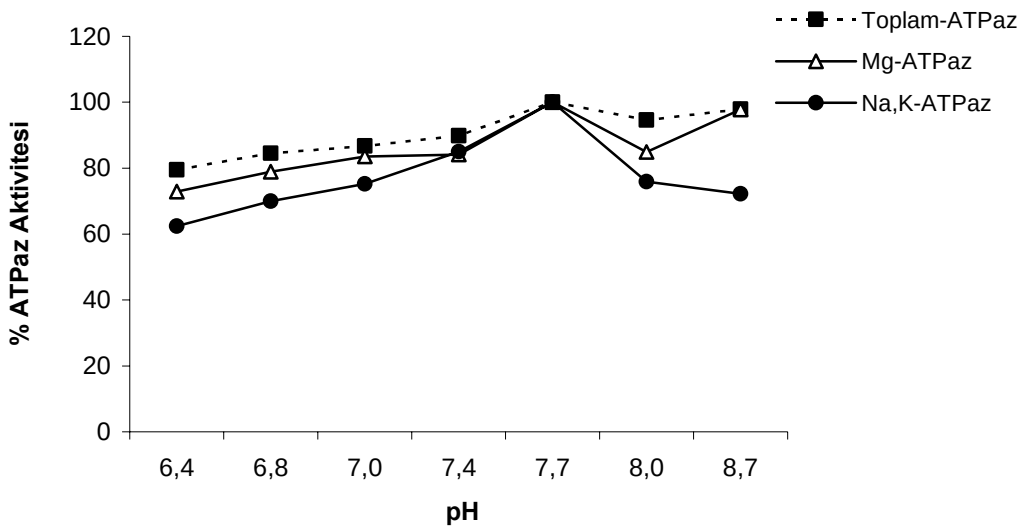
Şekil 4.2. d. *O. niloticus*'un böbrek dokusunda 1-6 mM $MgCl_2$ derişimlerinde % ATPaz aktivitesi.



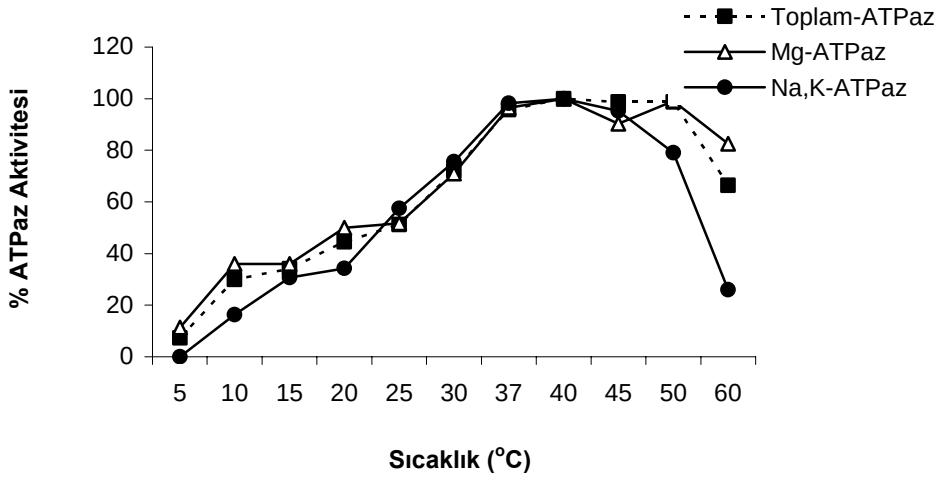
Şekil 4.2. e. *O. niloticus*'un böbrek dokusunda 10-50 mM Tris derişimlerinde % ATPaz aktivitesi.



Şekil 4.2. f. *O. niloticus*'un böbrek dokusunda 1-6 mM ATP derişimlerinde % ATPaz aktivitesi.

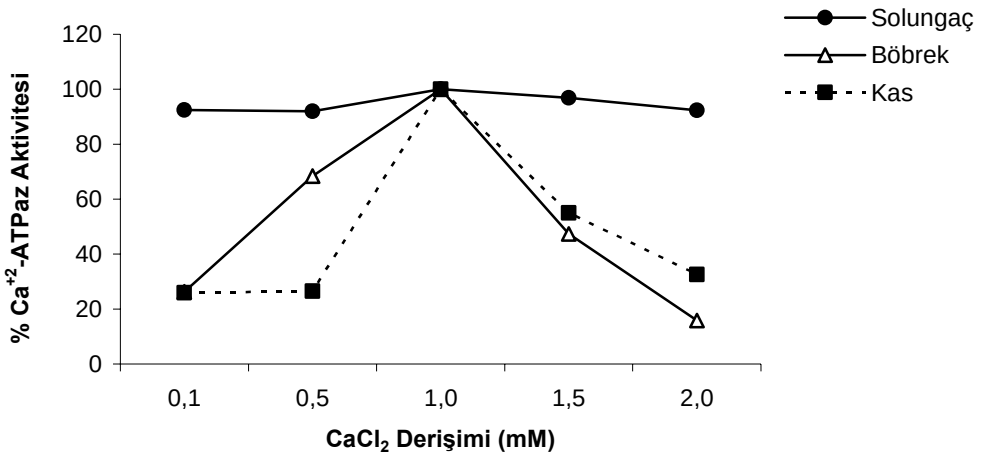


Şekil 4.2. g. *O. niloticus*'un böbrek dokusunda 6,4-8,7 pH aralığında % ATPaz aktivitesi.

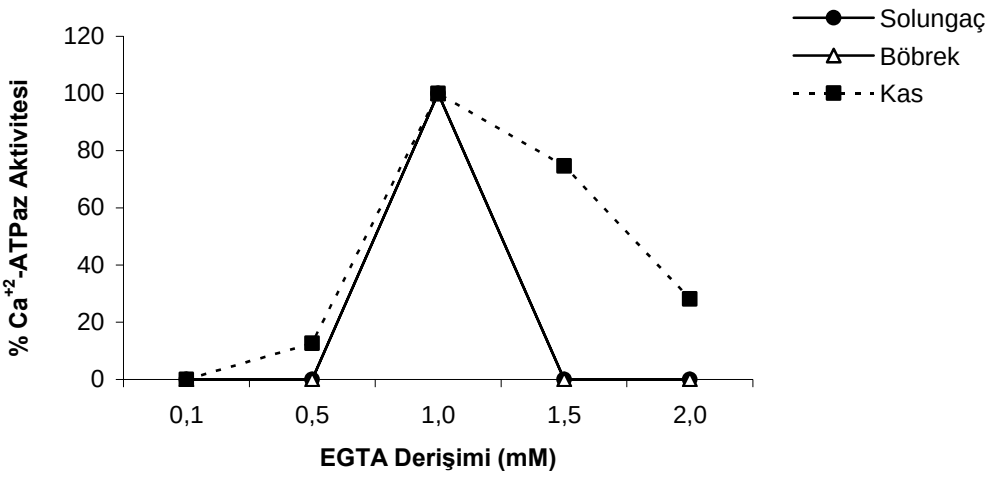


Şekil 4.2. h. *O. niloticus*'un böbrek dokusunda 5-60 ^{o}C sıcaklık aralığında % ATPaz aktivitesi.

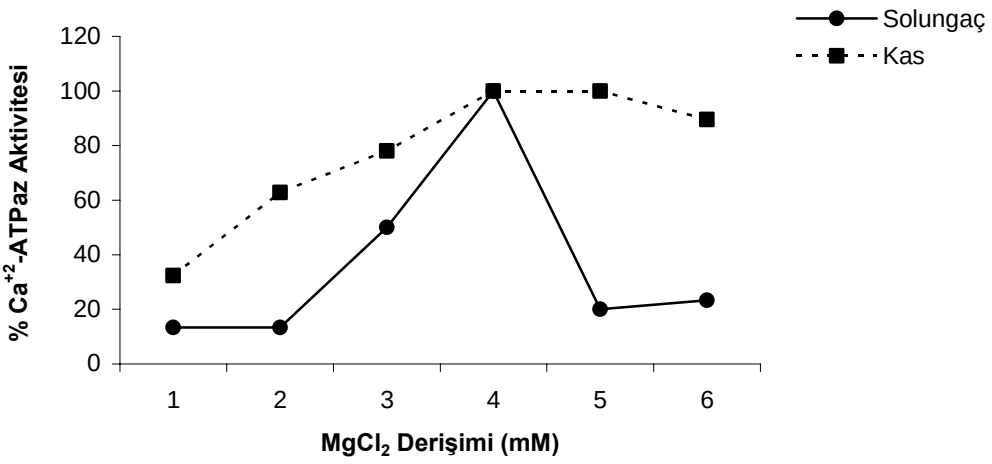
Solungaç, böbrek ve kas dokularında ölçülen Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin de en yüksek aktivite gösterdiği koşullar saptandı. Solungaç, böbrek ve kas dokusunda enzim 0,1-2,0 mM Ca^{+2} ve EGTA derişimlerinde en yüksek aktivitesini 1,0 mM Ca^{+2} ve EGTA derişimlerinde gösterdi (Şekil 4.3. a., b.). En yüksek Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi 1-6 mM Mg^{+2}, 10-50 mM Tris ve 1-6 mM ATP derişimine karşılık 4 mM Mg^{+2}, 40 mM Tris ve 3 mM ATP derişiminde ölçüldü (Şekil 4.3. c-e). Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi en yüksek düzeyde 6,4-8,7 pH ve 5-60 ^{o}C sıcaklık aralığında pH 7,7 ve 37 ^{o}C'de ölçüldü (Şekil 4.3. f., g.). Diğer inkübasyon ortamı parametreleri böbrek dokusunda enzim aktivitesinin düşük olması nedeniyle çalışılamamış, buna karşılık solungaç ve kas dokusunda aynı Ca^{+2} ve EGTA derişimlerinde en yüksek aktivite göstermesinden dolayı bu dokularda elde edilen veriler böbrek dokusu için de kullanılmıştır.



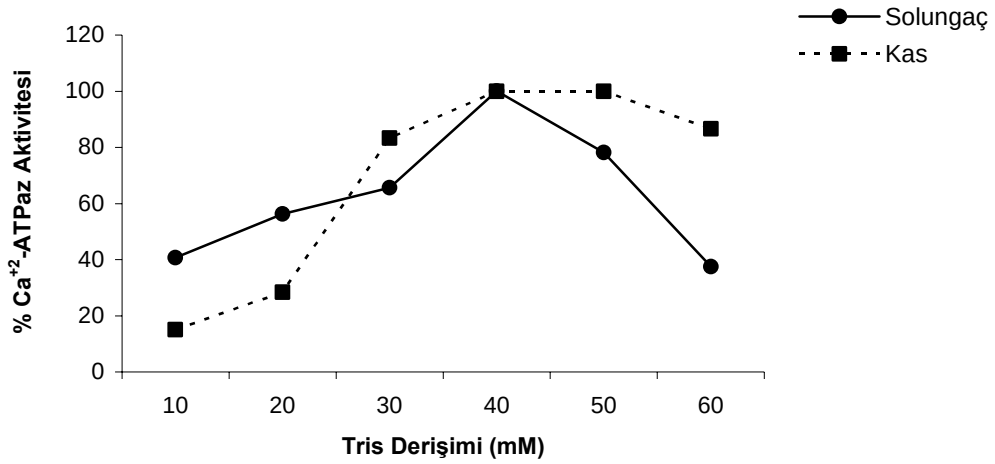
Şekil 4.3. a. *O. niloticus* dokularında 0,1-2,0 mM $CaCl_2$ derişimlerinde % Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi.



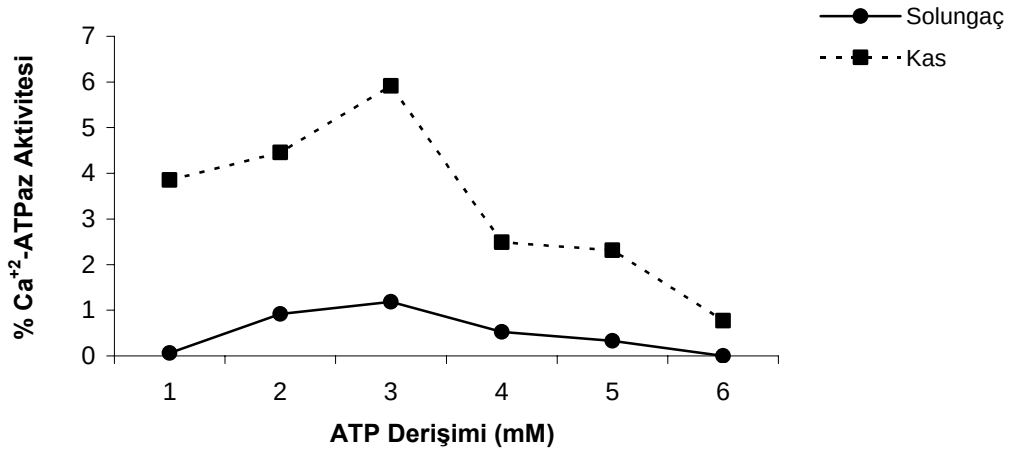
Şekil 4.3. b. *O. niloticus* dokularında 0,1-2,0 mM EGTA derişimlerinde % Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi.



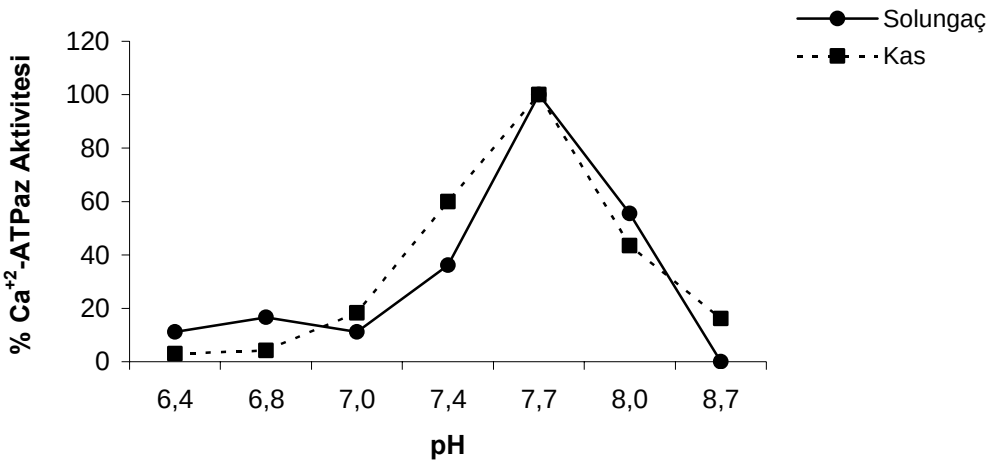
Şekil 4.3. c. *O. niloticus* dokularında 1-6 mM $MgCl_2$ derişimlerinde % Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi.



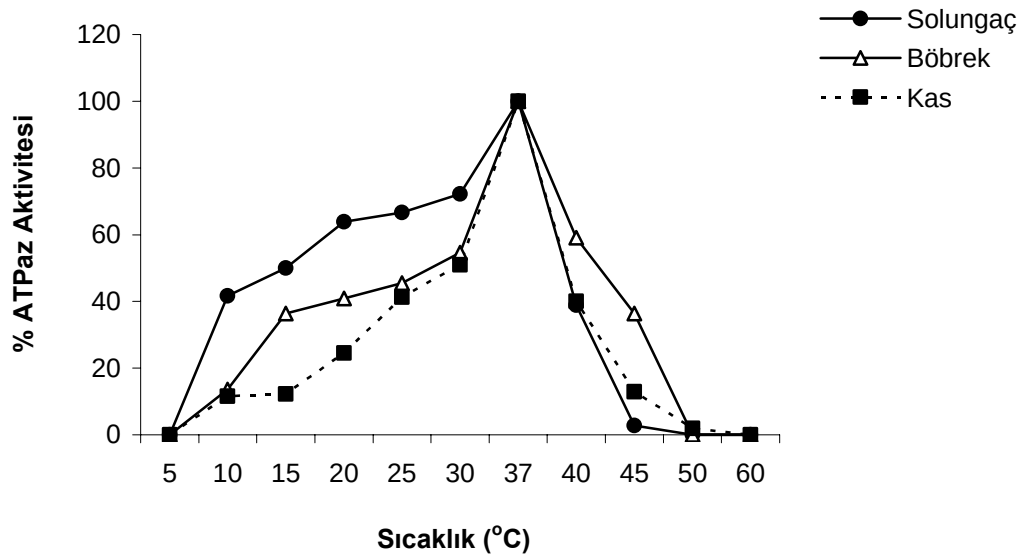
Şekil 4.3. d. *O. niloticus* dokularında 10-60 mM Tris derişimlerinde % Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi.



Şekil 4.3. e. *O. niloticus* dokularında 1-6 mM ATP derişimlerinde % Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi.



Şekil 4.3. f. *O. niloticus* dokularında 6,4-8,7 pH aralığında % Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi.



Şekil 4.3. g. *O. niloticus* dokularında 5-60 ^{o}C sıcaklık aralığında % Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi.

4.1.2. Akut Uygulama

4.1.2.1. *İn vivo* ATPaz Aktivitesi

O. niloticus, Cd^{+2}, Cu^{+2}, Zn^{+2}, Cr^{+6} ve Ag^{+}'nın 0,1, 0,5, 1,0 ve 1,5 µg/mL derişimleri etkisine 96 saat süre ile bırakıldı ve bu süreler sonunda solungaç, böbrek ve kas dokusunda ATPaz aktiviteleri ölçüldü. Elde edilen veriler, kontrol grubu balıklarda solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin 2,94±0,26 µmol Pi/mg prot./sa., Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin 5,93±0,71 µmol Pi/mg prot./sa., Toplam-ATPaz aktivitesinin 8,71±0,75 µmol Pi/mg prot./sa. ve Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin ise 0,98±0,15 µmol Pi/mg prot./sa. düzeyinde olduğunu gösterdi (Şekil 4.4.-4.7. a.). Böbrek dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi 2,99±0,30 µmol Pi/mg prot./sa., Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi 3,30±0,43 µmol Pi/mg prot./sa., Toplam-ATPaz aktivitesi 5,06±0,63 µmol Pi/mg prot./sa. ve Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi 0,97±0,09 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçüldü (Şekil 4.4.-4.7. b.). Kas dokusunda sadece Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ölçülmüş olup enzim aktivite değeri 3,90±0,72 µmol Pi/mg prot./sa. olarak belirlendi (Şekil 4.7. c.).

Akut metal etkilerinde ölçülen ATPaz aktivitelerinin % değerleri EK-1'de ayrıca verilmiştir.

4.1.2.1.(1). Kadmiyum

Solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz'ın, Cd^{+2} etkisinde % 33 ile % 89 azaldığı ve en düşük aktivitesinin 1,0 µg Cd^{+2}/mL etkisinde gözlendiği belirlendi ($P<0,001$) (0,31±0,12 µmol Pi/mg prot./sa.) (Şekil 4.4. a.). Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 27 ile % 52 oranlarında artış göstermesine karşın, kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı bir ayırım göstermemiştir ($P>0,05$) (Şekil 4.5. a.). Toplam-ATPaz aktivitesi yaklaşık % 10 oranında hem artış hem de azalış göstermesine karşın anlamlı bir değişiklik göstermemiştir ($P>0,05$) (Şekil 4.6. a.). Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 51 ile % 92 oranlarında azalış gösterirken, en düşük düzeyini 0,1 µg Cd^{+2}/mL etkisinde gösterdi (0,08±0,05 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,001$) (Şekil 4.7. a.).

Böbrek dokusunda, Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin % 19 ile % 63 oranında azaldığı gözlendi ve en düşük enzim aktivitesi 1,5 µg Cd^{+2}/mL etkisinde ölçüldü (1,12±0,21 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,01$) (Şekil 4.4. b.). Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 32 ile % 69 oranında artış göstermesine karşın, anlamlı bir değişiklik göstermemiştir ($P>0,05$) (Şekil 4.5. b.). Toplam-ATPaz aktivitesi de aynı şekilde derişim düzeyleri ile orantılı olarak % 5'den % 32'ye varan artış oranlarına karşılık kontrol ile karşılaştırıldığında değişiklik göstermemiştir ($P>0,05$) (Şekil 4.6. b.). Buna karşılık Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin, uygulanan tüm derişimler için azaldığı gözlenirken, azalış oranlarının % 48 ile % 84 oranlarında değiştiği belirlendi. En düşük enzim aktivitesi 1,0 µg Cd^{+2}/mL etkisinde ölçüldü (0,15±0,05 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,001$) (Şekil 4.7. b.).

Kas dokusunda ise, Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi % 71 ile % 96 oranında azalırken, en düşük enzim aktivitesi 1,0 µg Cd^{+2}/mL etkisinde gözlendi (0,24±0,07 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,01$) (Şekil 4.7. c.).

4.1.2.1.(2). Bakır

Solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi Cu^{+2} etkisinde % 25 ile % 71 oranında azalırken en yüksek derişimde en düşük düzeyde gözlendi (0,85±0,15 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,001$) (Şekil 4.4. a.). Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin ise % 1 ile % 12 arasında gözlenen azalış oranlarına karşın kontrol değerlerine göre bir değişiklik göstermediği bulunmuştur ($P>0,05$) (Şekil 4.5. a.). Toplam-ATPaz aktivitesi de benzer şekilde % 8 ile % 25 azalış oranlarına karşın anlamlı bir ayırım göstermemiştir ($P>0,05$) (Şekil 4.6. a.). Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin % 88 ile % 95 oranlarında azalış gösterdiği ve en düşük enzim aktivitesinin 1,0 µg Cu^{+2}/mL etkisinde gözlendiği görüldü (0,05±0,03 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,001$) (Şekil 4.7. a.).

Böbrek Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi, Cu^{+2} derişimlerine bağlı olarak hem artış hem de azalış gösterirken, 0,5 µg Cu^{+2}/mL etkisinde % 91 azaldı (0,28±0,02 µmol Pi/mg prot./sa.). Buna karşılık diğer derişimlerin etkisinde enzim aktivitesinin % 10 ile % 86 oranlarında artış gösterdiği ve en yüksek düzeyini 1,0 µg Cu^{+2}/mL etkisinde

gösterdiği gözlendi (5,57±0,61 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.4. b.). Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin ise % 7 ile % 69 oranlarında artış gösterdiği ve en yüksek düzeyinin 0,5 µg Cu^{+2}/mL etkisinde olduğu belirlendi (5,58±0,46 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,05) (Şekil 4.5. b.). Toplam-ATPaz, % 40 ile % 63 oranında artarak en yüksek aktivitesini 1,5 µg Cu^{+2}/mL etkisinde gösterdi (8,25±0,46 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,05) (Şekil 4.6. b.). Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 72 ile % 94 azalış oranlarında gözlenirken, en düşük düzeyde 0,5 µg Cu^{+2}/mL derişiminde ölçüldü (0,06±0,02 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.7. b.).

Kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi, % 1 ile % 71 oranında azalırken, en düşük düzeyini en yüksek derişim etkisinde gösterdi (1,10±0,33 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,01) (Şekil 4.7. c.).

4.1.2.1.(3). Çinko

Solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz'ın Zn^{+2} derişimlerinde % 39 ile % 67 azaldığı ve en düşük aktivitesinin en yüksek derişim etkisinde gözlendiği belirlendi (0,97±0,25 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.4. a.). Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi de % 59 ile % 76 arasında değişen azalış oranları ile en düşük aktivitesini 0,1 µg Zn^{+2}/mL derişiminde gösterdi (1,42±0,10 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.5. a.). Toplam-ATPaz aktivitesi de Zn^{+2}'nin tüm derişimleri için % 55 ile % 68 oranlarında azalırken, en düşük enzim aktivitesi en düşük Zn^{+2} derişiminde gözlendi (2,82±0,18 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.6. a.). Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin ise % 68 ile % 82 oranlarında azaldığı ve en düşük düzeyinin en yüksek Zn^{+2} derişiminde ölçüldüğü kaydedildi (0,18±0,06 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.7. a.).

Böbrek Na^{+}/K^{+}-ATPaz Zn^{+2} etkisinde % 15 ile % 49 oranlarında azalırken, en düşük aktivite 0,1 µg Zn^{+2}/mL derişiminde ölçüldü (1,54±0,28 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,01) (Şekil 4.4. b.). Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin de, % 15 ile % 50 oranlarında azaldığı ve en düşük düzeyinin 0,5 µg Zn^{+2}/mL etkisinde gözlendiği kaydedildi (1,65±0,21 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,05) (Şekil 4.5. b.). Toplam-ATPaz aktivitesi ise % 15 ile % 51 oranlarında azalışa karşın, en yüksek derişimde ise % 21 artış

gösterdi. Enzim aktivitesi en düşük değerde 0,1 µg Zn^{+2}/mL etkisinde ölçüldü (2,48±0,64 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,05) (Şekil 4.6. b.). Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ise Zn^{+2} etkisinde % 42 ile % 86 arasında değişen oranlarında azalırken, en düşük enzim aktivitesi 0,5 µg Zn^{+2}/mL etkisinde gözlendi (0,14±0,07 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.7. b.).

Kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi % 78 ile % 96 oranlarında azalırken, en düşük enzim aktivitesi 1,0 µg Zn^{+2}/mL etkisinde gözlendi (0,14±0.07 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.7. c.).

4.1.2.1.(4). Krom

Solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi, Cr^{+6} etkisinde % 4 ile % 30 azalırken, kontrole göre anlamlı bir ayırım göstermemiştir (P>0,05) (Şekil 4.4. a.). Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 48 ile % 61 oranlarında azalırken, en düşük enzim aktivitesi 1,5 µg Cr^{+6}/mL etkisinde gözlendi (2,34±0,34 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,01) (Şekil 4.5. a.). Toplam-ATPaz aktivitesi de benzer şekilde % 41 ile % 45 oranlarında azalırken, en düşük enzim aktivitesini farklı olarak 1,0 µg Cr^{+6}/mL etkisinde gösterdi (4,77±0,29 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,01) (Şekil 4.6. a.). Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 84 ile % 95 oranlarında azalırken, en düşük düzeyi en yüksek Cr^{+6} derişiminde ölçüldü (0,05±0,03 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.7. a.).

Böbrek dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi, % 6 ile % 44 oranlarında artış göstermesine karşın kontrole göre anlamlı bir ayırım göstermemiştir (P>0,05) (Şekil 4.4. b.). Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi de % 31 ile % 54 oranlarında azalış göstermesine karşın anlamlı bir ayırım göstermemiştir (P>0,05) (Şekil 4.5. b.). Toplam-ATPaz aktivitesi de % 22 ile % 40 artış göstermesine karşın anlamlı bulunmamıştır (P>0,05) (Şekil 4.6. b.). Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 78 ile % 94 oranlarında azalışla en düşük düzeyini en düşük Cr^{+6} derişiminde gösterdi (0,14±0,05 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.7. b.).

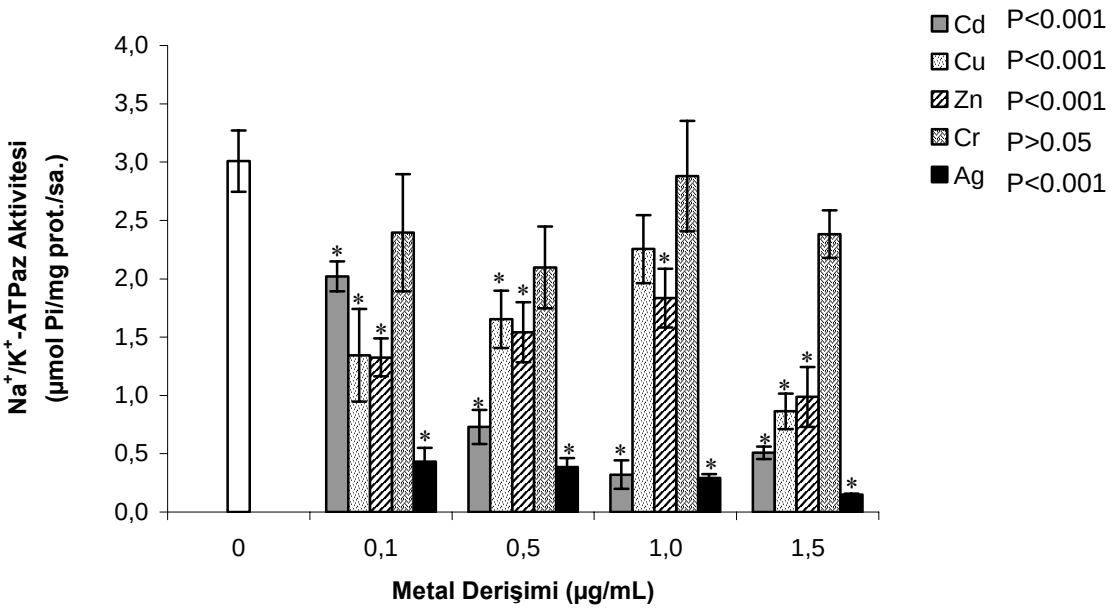
Kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi, % 42 ile % 179 oranlarında artarken, en yüksek aktivitesini 0,5 µg Cr^{+6}/mL etkisinde gösterdi (10,7±1,07 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.7. c.).

4.1.2.1.(5). Gümüş

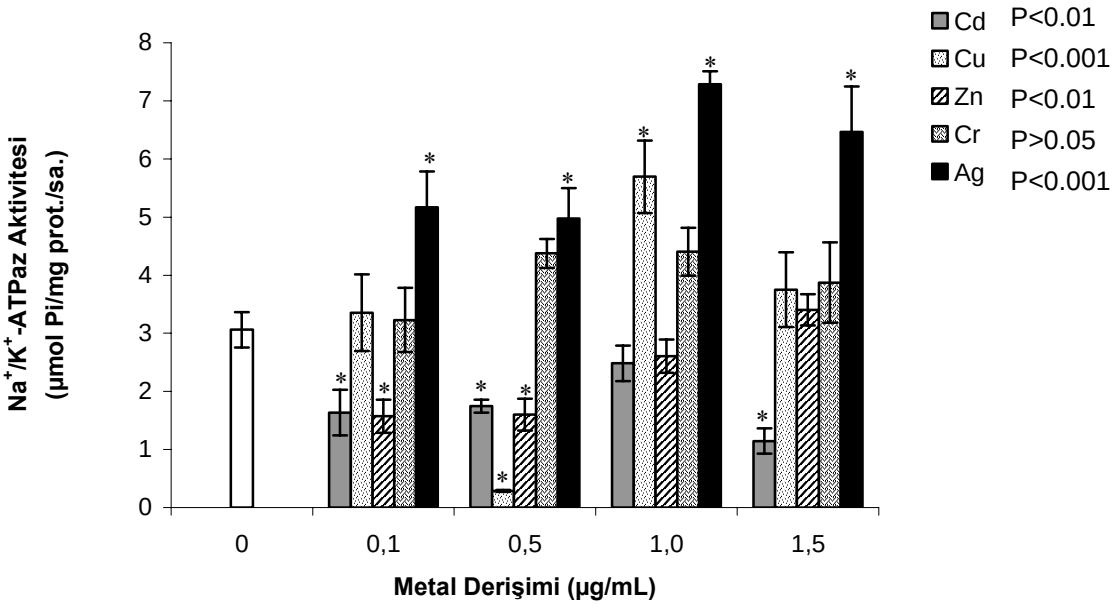
Solungaç dokusunda Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi, Ag^+ etkisinde % 86 ile % 95 oranlarında azalırken en düşük enzim aktivitesi en yüksek Ag^+ derişiminde gözlendi (0,15±0,01 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,001$) (Şekil 4.4. a.). Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi, benzer şekilde uygulanan derişim düzeyleri arttıkça azalış gösterirken, bu oranlar % 62 ile % 74 düzeylerinde belirlendi ve en düşük enzim aktivitesi 1,5 µg Ag^+/mL etkisinde gözlendi (1,51±0,19 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,001$) (Şekil 4.5. a.). Toplam-ATPaz aktivitesi % 69 ile % 81 oranlarında azalırken, en düşük düzeyi en yüksek derişim etkisinde gözlendi (1,64±0,27 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,001$) (Şekil 4.6. a.). Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin de benzer şekilde % 71 ile % 87 oranlarında azaldığı ve en düşük düzeyinin 1,5 µg Ag^+/mL etkisinde gözlendiği kaydedildi (0,13±0,08 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,01$) (Şekil 4.7. a.).

Böbrek Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin solungaç dokusundan farklı olarak Ag^+ etkisinde % 63 ile % 138 oranlarında arttığı ve en yüksek aktiviteyi 1,0 µg Ag^+/mL etkisinde gösterdiği belirlendi (7,13±0,22 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,001$) (Şekil 4.4. b.). Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 27 ile % 48 arasında azalış göstermesine karşın, kontrole göre anlamlı bir ayırım göstermemiştir ($P>0,05$) (Şekil 4.5. b.). Toplam-ATPaz aktivitesi % 24 ile % 76 oranlarında artarken, en yüksek aktiviteyi 1,0 µg Ag^+/mL etkisinde gösterdi (8,91±0,91 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,01$) (Şekil 4.6. b.). Buna karşılık, Ca^{+2}-ATPaz'ın Ag^+ etkisinde % 79 ile % 91 oranlarında azalış gösterdiği ve en düşük aktivitesinin 1,0 µg Ag^+/mL gözlendiği kaydedildi (0,09±0,06 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,001$) (Şekil 4.7. b.).

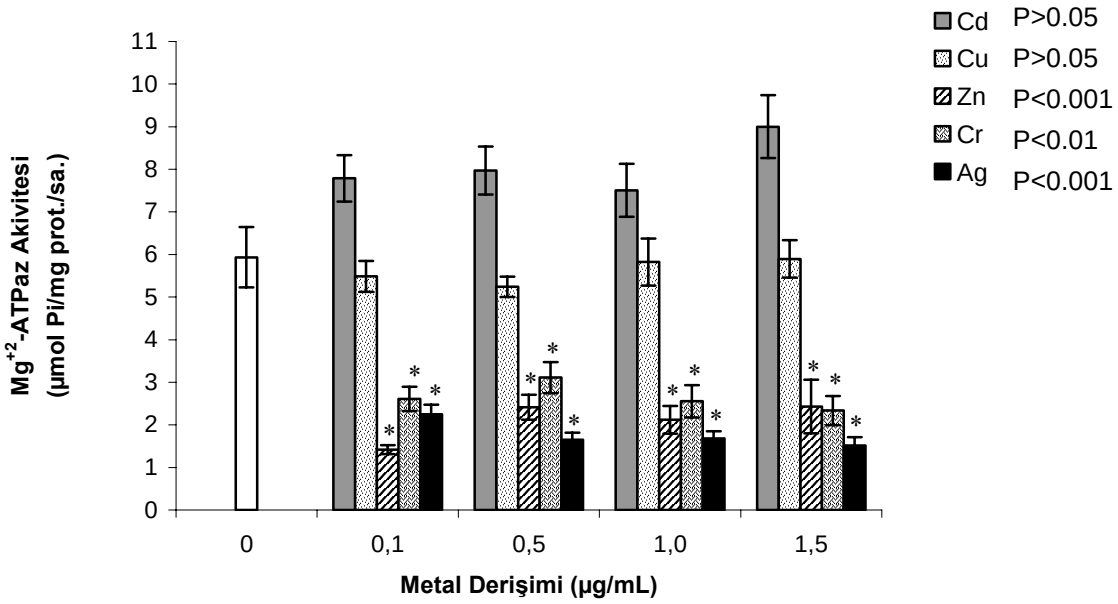
Kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi, % 33 ile % 82 oranlarında azalırken, en düşük düzeyde en yüksek derişim etkisinde ölçüldü (0,67±0,31 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,05$) (Şekil 4.7. c.).



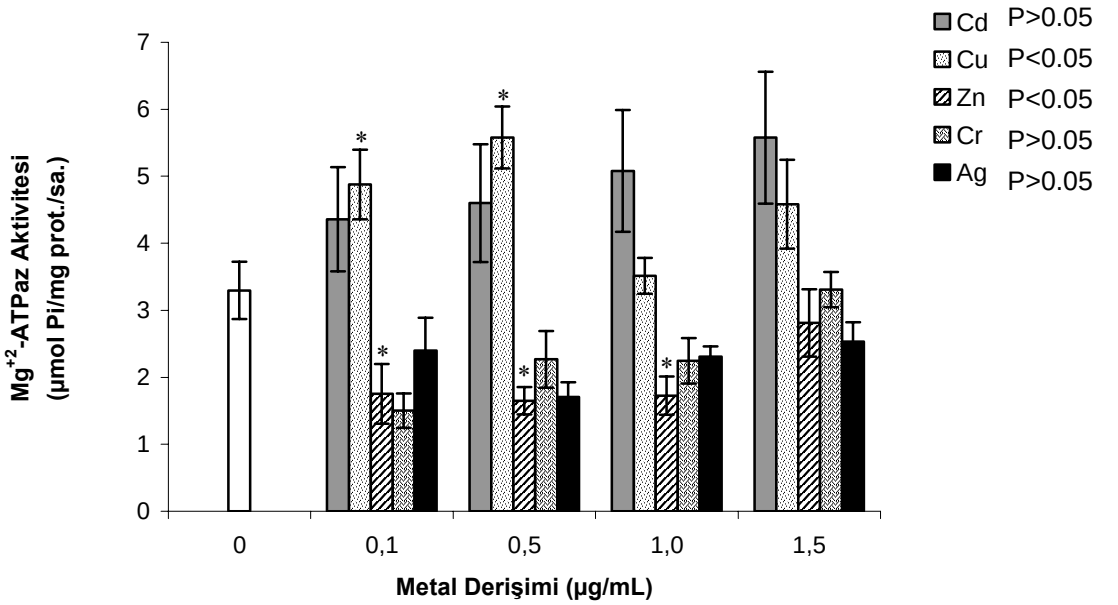
Şekil 4.4. a. Metallerin farklı derişimlerinin 96 saatlik etkileri sonunda *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi.



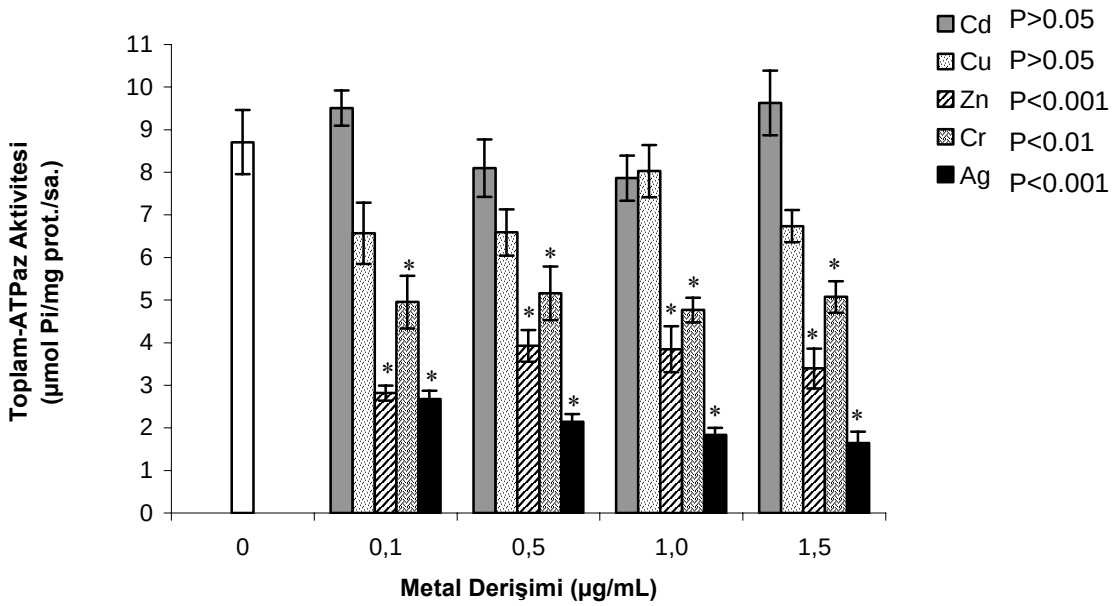
Şekil 4.4. b. Metallerin farklı derişimlerinin 96 saatlik etkileri sonunda *O. niloticus*'un böbrek dokusunda Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi.



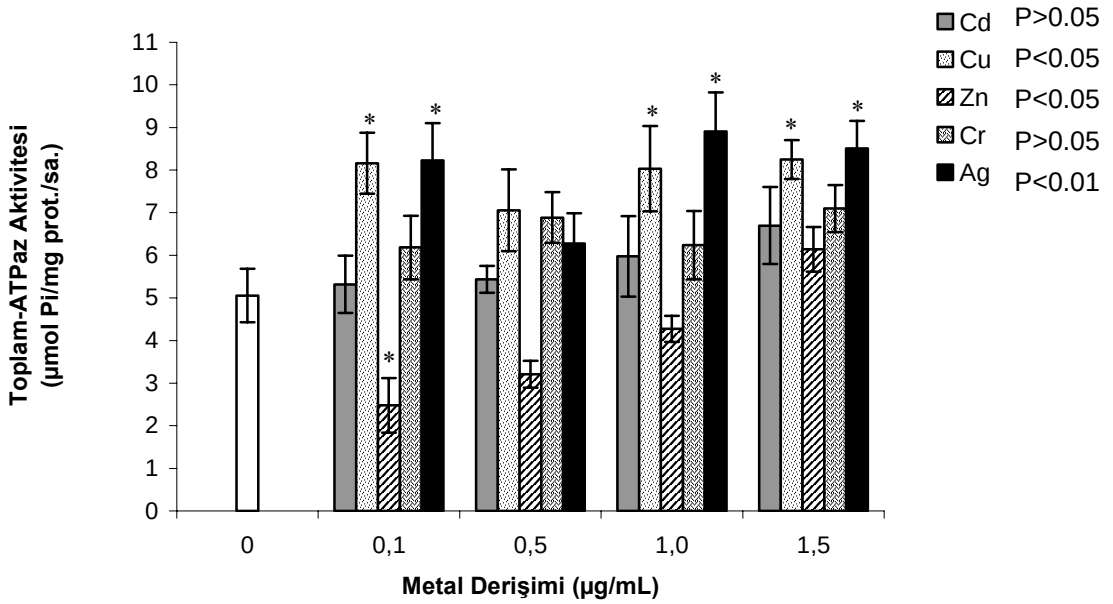
Şekil 4.5. a. Metallerin farklı derişimlerinin 96 saatlik etkileri sonunda *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi.



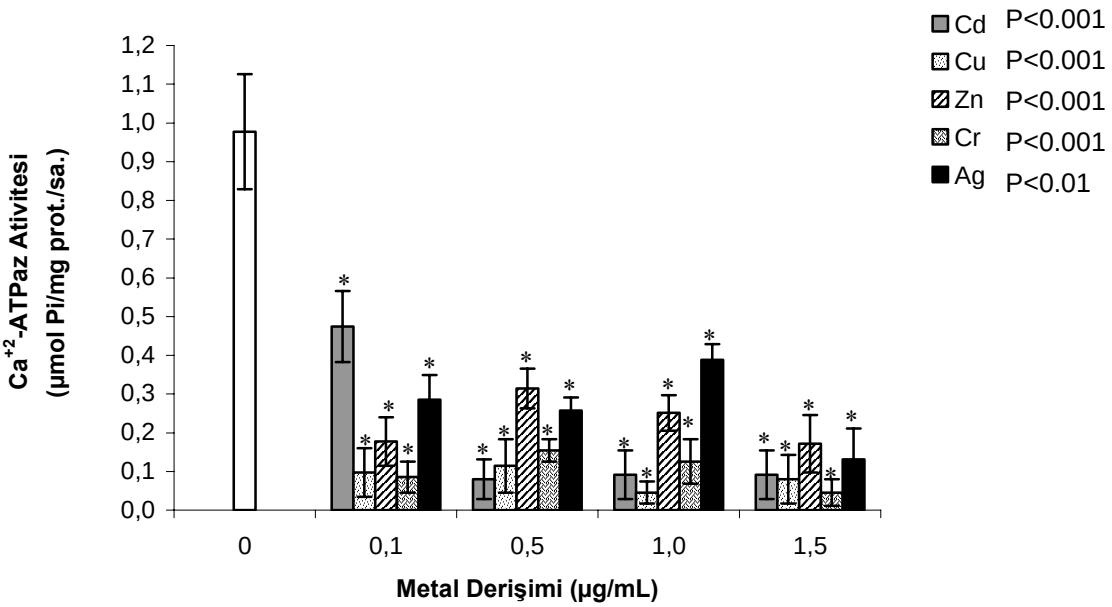
Şekil 4.5. b. Metallerin farklı derişimlerinin 96 saatlik etkileri sonunda *O. niloticus*'un böbrek dokusunda Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi.



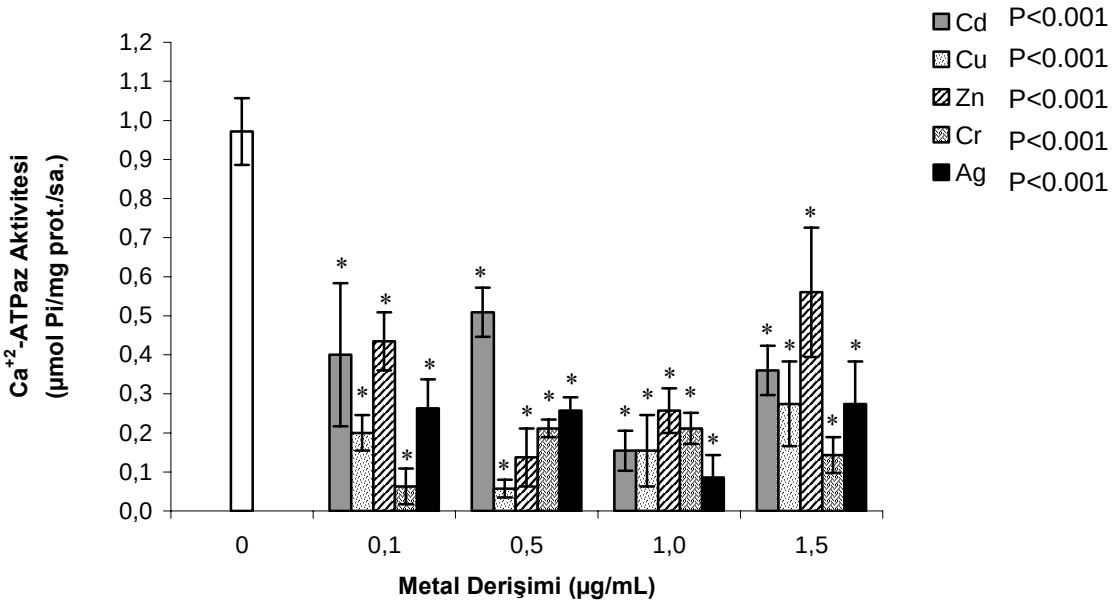
Şekil 4.6. a. Metallerin farklı derişimlerinin 96 saatlik etkileri sonunda *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Toplam-ATPaz aktivitesi.



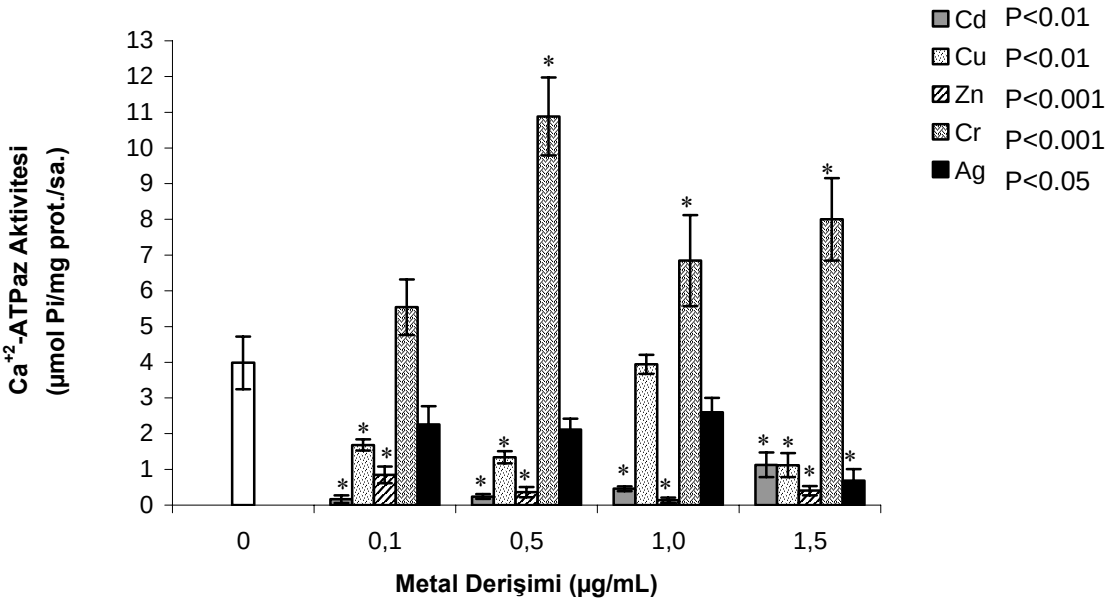
Şekil 4.6. b. Metallerin farklı derişimlerinin 96 saatlik etkileri sonunda *O. niloticus*'un böbrek dokusunda Toplam-ATPaz aktivitesi.



Şekil 4.7. a. Metallerin farklı derişimlerinin 96 saatlik etkileri sonunda *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi.



Şekil 4.7. b. Metallerin farklı derişimlerinin 96 saatlik etkileri sonunda *O. niloticus*'un böbrek dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi.



Şekil 4.7. c. Metallerin farklı derişimlerinin 96 saatlik etkileri sonunda *O. niloticus*'un kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi.

4.1.2.2. Toplam Protein Düzeyi

Cd^{+2}, Cu^{+2}, Zn^{+2}, Cr^{+6} ve Ag^{+}'nın 0,1, 0,5, 1,0 ve 1,5 µg/mL derişimlerine 96 saat süre ile bırakılan *O. niloticus* dokularında toplam protein düzeyleri ölçüldü. Analiz sonuçlarına göre kontrol grubu solungaç, böbrek ve kas dokusu toplam protein düzeyleri sırasıyla 28,1±0,8, 51,9±2,2 ve 22,2±0,7 mg prot./g y.a. olarak ölçüldü (Şekil 4.8. a-c.).

Akut metal etkilerinde ölçülen toplam protein düzeyleri % değerleri EK-2'de ayrıca verilmiştir.

4.1.2.2.(1) Kadmiyum

Solungaç dokusunda toplam protein düzeyi Cd^{+2} etkisinde % 4 ile % 12 oranında artış göstermesine karşın kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir ayırım göstermemiştir (P>0,05) (Şekil 4.8. a.).

Böbrek dokusu toplam protein düzeyi ise % 16 ile % 23 azalmasına karşın anlamlı bir değişiklik göstermemiştir (P>0,05) (Şekil 4.8. b.).

Kas dokusu toplam protein düzeyi % 12 ile % 27 artarken, en yüksek düzeyde 0,1 µg Cd^{+2}/mL etkisinde gözlendi (28,2±0,7 mg prot./g y.a.) (P<0,001) (Şekil 4.8. c.).

4.1.2.2.(2) Bakır

Solungaç dokusunda Cu^{+2}'nin toplam protein düzeyini kontrole göre önemli düzeyde azalttığı gözlendi. Buna göre % 8 ile % 32 oranında azalarak en düşük düzeyde 0,1 µg Cu^{+2}/mL etkisinde ölçüldü (19,0±2,0 mg prot./g y.a.) (P<0,001) (Şekil 4.8. a.).

Böbrek dokusu toplam protein düzeyi de solungaç dokusuna benzer şekilde Cu^{+2} etkisinde önemli düzeyde azalış gösterdi. Toplam protein düzeyi % 63 ile % 70 oranlarında azalışla en düşük düzeyde 0,5 µg Cu^{+2}/mL etkisinde gözlendi (15,6±2,0 mg prot./g y.a.) (P<0,001) (Şekil 4.8. b.).

Kas dokusunda da % 25 ile % 44 oranlarında azalış gösteren toplam protein düzeyi en yüksek Cu^{+2} derişiminde en düşük düzeyde ölçüldü (12,6±2,0 mg prot./g y.a.) (P<0,001) (Şekil 4.8. c.).

4.1.2.2.(3). Çinko

Solungaç dokusunda toplam protein düzeyi Zn^{+2} etkisinde % 3 ile % 8 oranlarında azalış göstermesine karşın, kontrole göre bir değişiklik göstermemiştir (P>0,05) (Şekil 4.8. a.).

Böbrek dokusu toplam protein düzeyinin % 3 ile % 9 artış oranlarına karşın, Zn^{+2}'nin tüm derişimleri için kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bir ayırım göstermediği gözlenmiştir (P>0,05) (Şekil 4.8. b.).

Kas dokusu toplam protein düzeyi % 1 ile % 8 azalışa karşın kontrole göre herhangi bir ayırım göstermemiştir (P>0,05) (Şekil 4.8. c.).

4.1.2.2.(4). Krom

Solungaç dokusu toplam protein düzeyi, Cr^{+6} etkisinde % 1 ile % 7 azalış göstermesine karşın, kontrol ile karşılaştırıldığında önemli bir ayırım göstermemiştir ($P>0,05$) (Şekil 4.8. a.).

Böbrek dokusunda da benzer şekilde % 3 ile % 17 arasında değişen artış veya azalış oranlarına karşın, Cr^{+6}'nın denenen tüm derişimleri toplam protein düzeyinde etkili olmamıştır ($P>0,05$) (Şekil 4.8. b.).

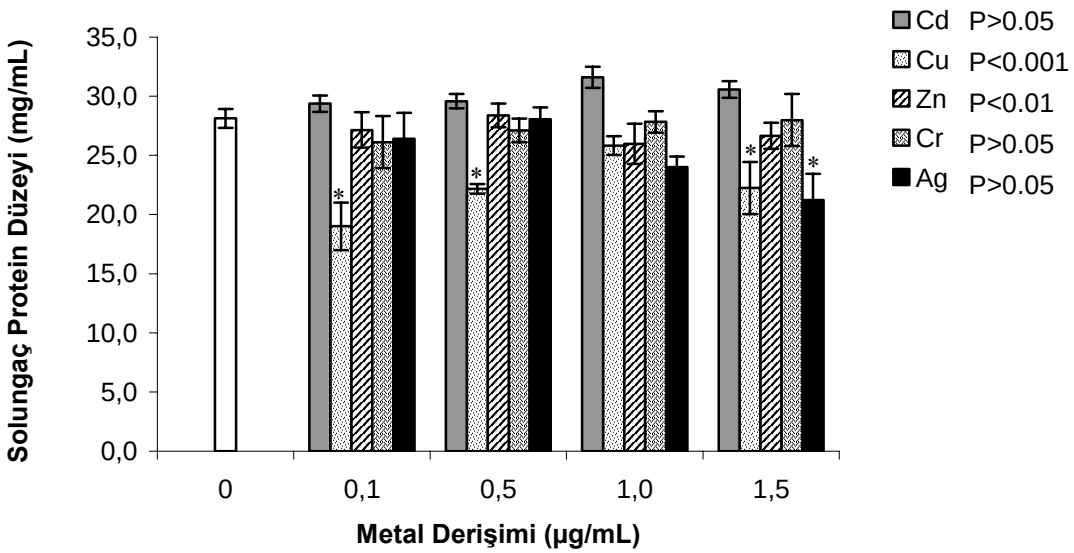
Kas dokusunda ise böbrek dokusuna benzer şekilde % 2 ile % 7 arasında değişen oranlarda azalış veya artış gösteren toplam protein düzeyi kontrol ile karşılaştırıldığında herhangi bir ayırım göstermemiştir ($P>0,05$) (Şekil 4.8. c.).

4.1.2.2.(5). Gümüş

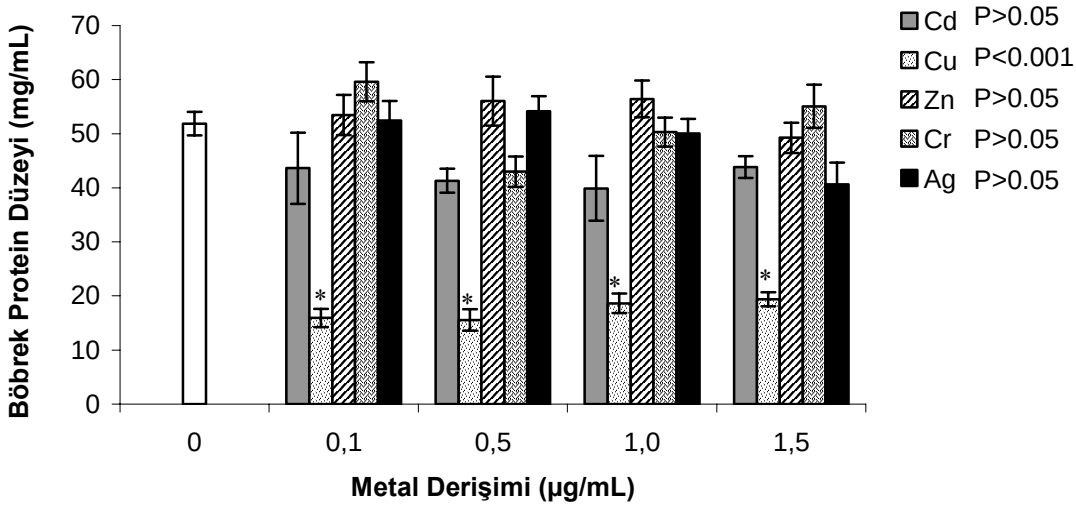
Solungaç dokusunda toplam protein düzeyi % 6 ile % 24 oranlarında azalış gösterirken en düşük düzeyde en yüksek Ag^{+} derişiminde gözlendi (21,2±2,2 mg prot./g y.a.) ($P<0,01$) (Şekil 4.8. a.).

Böbrek dokusu toplam protein düzeyi % 1 ile % 22 oranlarında azalış veya artış göstermesine karşın, tüm Ag^{+} derişimlerinin etkisinde kontrole göre bir farklılık göstermemiştir ($P>0,05$) (Şekil 4.8. b.).

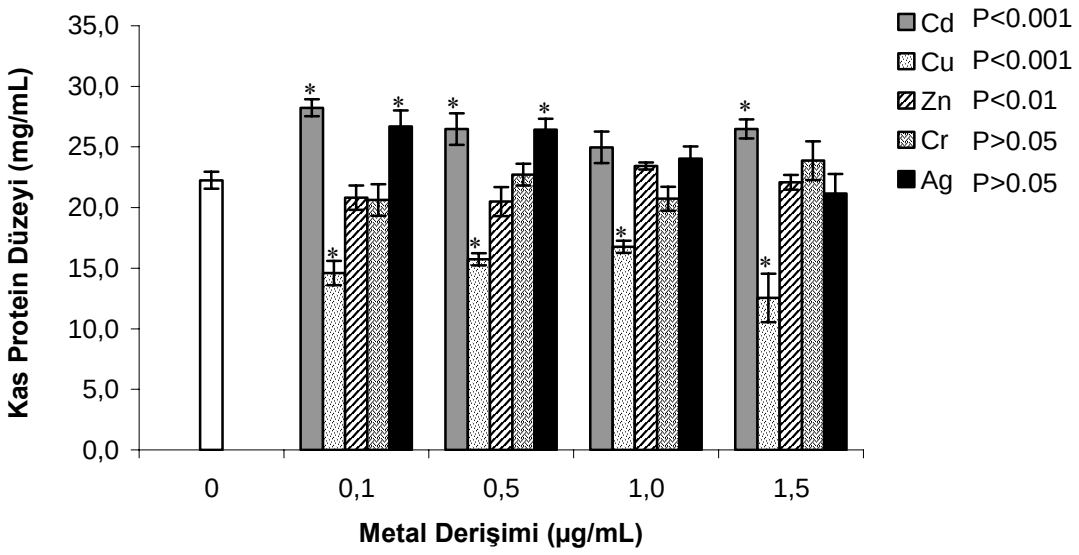
Kas dokusunda ise toplam protein düzeyi % 5 ile % 20 oranlarında artış veya azalış gösterirken, en yüksek düzeyinin en düşük Ag^{+} derişimi etkisinde gözlendiği belirlendi (26,7±1,3 mg prot./g y.a.) ($P<0,01$) (Şekil 4.8. c.).



Şekil 4.8. a. Metallerin farklı derişimlerinin 96 saatlik etkileri sonunda *O. niloticus*'un solungaç dokusunda toplam protein düzeyi.



Şekil 4.8. b. Metallerin farklı derişimlerinin 96 saatlik etkileri sonunda *O. niloticus*'un böbrek dokusunda toplam protein düzeyi.



Şekil 4.8. c. Metallerin farklı derişimlerinin 96 saatlik etkileri sonunda *O. niloticus*'un kas dokusunda toplam protein düzeyi.

4.1.2.3. Toplam Metal Düzeyi

4.1.2.3.(1). Kadmiyum

Solungaç dokusunda kontrol grubu Cd^{+2} düzeyi (1,26±0,12 µg/g k.a.) ile karşılaştırıldığında, 0,1, 0,5, 1,0 ve 1,5 µg/mL derişimleri etkisinde Cd^{+2} birikimi gözlendi ($P<0,001$). Buna göre toplam Cd^{+2} düzeyleri 6,20±0,15 ile 19,9±3,78 µg/g k.a. değerleri arasında belirlenirken, en yüksek düzeyde 1,5 µg Cd^{+2}/mL etkisinde gözlendi (Çizelge 4.1.).

Böbrek dokusunda kontrol grubu balıklarda Cd^{+2} düzeyi saptama sınırlarının altında belirlenirken (D.L.<0,001), buna karşılık derişim düzeyleri arttıkça Cd^{+2} birikiminde artış gözlendi ($P<0,001$). Buna göre Cd^{+2} düzeyleri derişime bağlı olarak 22,8±8,9 ile 97,3±15,3 µg/g k.a. düzeyleri arasında belirlendi (Çizelge 4.1.).

Kas dokusunda da böbrek dokusunda olduğu gibi kontrol grubunda Cd^{+2} düzeyi belirlenememiştir (D.L.<0,001). Buna karşılık Cd^{+2} etkisinde, 0,66±0,23 µg/g

k.a. ile 3,74±1,69 µg/g k.a. arasında belirlenen Cd^{+2}, en yüksek düzeyde 0,1 µg Cd^{+2}/mL etkisinde ölçüldü (P<0,001) (Çizelge 4.1.).

4.1.2.3.(2). Bakır

Solungaç dokusunda kontrol grubunda Cu^{+2} düzeyi 3,35±0,32 µg/ g k.a. olarak belirlenirken, 4,20±0,01 ile 10,3±1,13 µg/g k.a. düzeyleri arasında ölçülen Cu^{+2}'nin en yüksek düzeyi en yüksek derişim etkisinde gözlendi (P<0,001) (Çizelge 4.1.).

Böbrek dokusunda kontrol grubu balıklarda Cu^{+2} düzeyi saptama sınırları altında belirlenmiştir (D.L.<0,002). Bununla birlikte başlangıç Cu^{+2} derişimlerinde birikim gözlenmemiş (D.L.<0,002), 1,0 ve 1,5 µg Cu^{+2}/mL etkisinde ise 20,6±20,6 µg/g k.a. ve 9,40±9,40 µg/g k.a. olarak ölçülen Cu^{+2} düzeyleri yüksek standart hataları nedeniyle kontrol Cu^{+2} düzeylerinden bir ayırım göstermemiştir (P>0,05) (Çizelge 4.1.).

Kas dokusunda da kontrol grubu balıklarda Cu^{+2} düzeyi saptama sınırlarının altında bulunmuştur (D.L.<0,002). Cu^{+2} birikiminin en yüksek düzeyde ölçüldüğü (1,4±0,7 µg/g k.a.) (P<0,001) 1,0 µg/mL Cu^{+2} derişimi etkisi dışında diğer derişimlerin etkisinde Cu^{+2} düzeyi belirlenememiştir (D.L.<0,002) (Çizelge 4.1.).

4.1.2.3.(4). Çinko

Solungaç dokusunda Zn^{+2} düzeyi kontrol grubunda 69,2±1,74 µg/g k.a. olarak ölçülürken, 1,0 ve 1,5 µg Zn^{+2}/mL derişimlerinde Zn^{+2} birikimi artarak 84,2±6,76 µg/g k.a. ve 91,1±6,28 µg/g k.a. olarak ölçüldü (P<0,01) (Çizelge 4.1.).

Böbrek dokusunda ise kontrol grubunda Zn^{+2} düzeyi 157,2±15,5 µg/g k.a. olarak ölçülürken, Zn^{+2} etkisinde 160,6±75,7 ile 270,9±31,7 µg/g k.a. olarak ölçülen Zn^{+2} düzeyleri kontrole göre bir ayırım göstermemiştir (P>0,05) (Çizelge 4.1.).

Kas dokusunda kontrol grubu Zn^{+2} düzeyi 32,1±0,83 µg/g k.a. olarak belirlenirken, 36,3±4,95 ile 46,1±9,35 µg/g k.a. olarak ölçülen Zn^{+2} düzeyi en yüksek değerini 0,5 µg Zn^{+2}/mL etkisinde gösterdi (P<0,05) (Çizelge 4.1.).

4.1.2.3.(4). Krom

Solungaç dokusunda kontrol grubu ile 0,5 µg Cr^{+6}/mL etkisinde Cr^{+6} düzeyi saptama sınırının altında (D.L.<0,003) gözlenmiştir. Buna karşılık yüksek derişimlerde Cr^{+6} birikimi artarak 4,26±2,14 µg/g k.a. ve 5,13±2,57 µg/g k.a. olarak belirlendi (P<0,001) (Çizelge 4.1.).

Böbrek ve kas dokusunda kontrol grubu ile Cr^{+6} etkisinde kalan gruplarda Cr^{+6} düzeyi saptama sınırının altında olduğundan (D.L.<0,003) belirlenememiştir (Çizelge 4.1.).

4.1.2.3.(5). Gümüş

Solungaç dokusunda Ag^{+} düzeyi kontrol grubu için saptama sınırının altında gözlenmiştir (D.L.<0,002). Buna karşılık 2,21±0,35 ile 2,84±0,74 µg/g k.a. olarak ölçülen Ag^{+} birikiminin en yüksek düzeyinin 1,5 µg Ag^{+}/mL etkisinde olduğu gözlendi (P<0,001) (Çizelge 4.1.).

Böbrek ve kas dokusunda kontrol ve Ag^{+} etkisindeki gruplarda Ag^{+} düzeyi saptama sınırlarının altında bulunmuştur (D.L.<0,002) (Çizelge 4.1.).

Akut metal etkilerinde ölçülen toplam metal düzeyleri % değerleri EK-3'de ayrıca verilmiştir.

Çizelge 4.1. Akut metal etkisinde kalan *O. niloticus* dokularındaki toplam metal düzeyleri (µg/g k.a.). Veriler Aritmetik ortalama±Standart hata olarak verilmiştir (Kontrol grup, N=21; Metal etkisinde kalan grup, N=3; *: İstatistiksel olarak farklı grupları göstermektedir).

Metal	Derişim (µg/mL)	Solungaç	Böbrek	Kas
Cd^{+2}	**0,0**	1,26±0,12	<0,001	<0,001
	0,1	14,1±1,08*	22,8±8,90*	3,74±1,69*
	0,5	6,20±0,15*	45,1±22,5*	2,04±0,36*
	1,0	8,56±0,81*	49,7±9,10*	2,33±0,40*
	1,5	19,9±3,78*	97,3±15,3*	0,66±0,23
		P<0,001	P<0,001	P<0,001
Cu^{+2}	**0,0**	3,35±0,32	<0,002	<0,002
	0,1	4,20±0,01	<0,002	<0,002
	0,5	8,88±1,13*	<0,002	<0,002
	1,0	7,68±0,25*	20,6±20,6	1,40±0,70*
	1,5	10,3±1,13*	9,40±9,40	<0,002
		P<0,001	P>0,05	P<0,001
Zn^{+2}	**0,0**	69,2±1,74	157,2±15,5	32,1±0,83
	0,1	69,9±5,20	160,6±75,7	41,9±8,57
	0,5	79,6±6,15	146,7±4,84	46,1±9,35*
	1,0	84,2±6,76*	193,2±0,46	36,3±4,95
	1,5	91,1±6,28*	270,9±31,7	44,5±3,86
		P<0,01	P>0,05	P<0,05
Cr^{+6}	**0,0**	<0,003	<0,003	<0,003
	0,1	2,0±2,0	<0,003	<0,003
	0,5	<0,003	<0,003	<0,003
	1,0	4,26±2,14*	<0,003	<0,003
	1,5	5,13±2,57*	<0,003	<0,003
		P<0,001		
Ag^{+}	**0,0**	<0,002	<0,002	<0,002
	0,1	2,21±0,35*	<0,002	<0,002
	0,5	2,48±0,55*	<0,002	<0,002
	1,0	2,24±0,23*	<0,002	<0,002
	1,5	2,84±0,74*	<0,002	<0,002
		P<0,001		

4.1.2.4 Toplam İyon Düzeyi

4.1.2.4.(1). Sodyum İyon Düzeyi

Kontrol grubu balıklarda solungaç dokusunda Na^+ iyon düzeyi, 7,01±0,31 mg/g k.a., böbrek dokusunda 14,0±0,65 mg/g k.a. ve kas dokusunda 4,18±0,13 mg/g k.a. olarak ölçüldü (Çizelge 4.2.).

Akut metal etkilerinde ölçülen toplam iyon düzeyleri % değerleri EK-4'de ayrıca verilmiştir.

4.1.2.4.(1).(a). Kadmiyum

Solungaç dokusunda Cd^{+2} etkisinde 4,39±0,32 ile 7,39±0,43 mg/g k.a. arasındaki değerlerde gözlenen Na^+'nın en düşük düzeyi 0,1 µg Cd^{+2}/mL etkisinde gözlendi ($P<0,01$) (Çizelge 4.2.).

Böbrek dokusunda 11,9±0,75 ile 7,57±0,71 mg/g k.a. değerleri arasında gözlenen Na^+'nın artan derişim etkilerinde azalış göstererek en düşük düzeyinin en yüksek derişim etkisinde gözlendiği kaydedildi ($P<0,001$) (Çizelge 4.2.).

Kas dokusunda ise 2,91±0,09 ile 4,20±0,35 mg/g k.a. aralığında belirlenen Na^+ düzeyi 1,0 ve 1,5 µg Cd^{+2}/mL derişimlerinde önemli bir azalış göstererek en düşük düzeyini en yüksek Cd^{+2} derişiminde gösterdi ($P<0,01$) (Çizelge 4.2.).

4.1.2.4.(1).(b). Bakır

Solungaç dokusunda Cu^{+2} etkisinde, 1,95±0,01 ile 6,74±2,56 değerleri arasında ölçülen Na^+'nın en düşük düzeyi 0,1 µg Cu^{+2}/mL derişiminde gözlendi ($P<0,01$) (Çizelge 4.2.).

Böbrek dokusunda ise Na^+ düzeyleri 14,6±1,12 ile 8,08±1,36 mg/g k.a. değerleri arasında ölçüldü. En düşük Na^+ düzeyi ise 1,5 µg Cu^{+2}/mL etkisinde gözlendi ($P<0,01$) (Çizelge 4.2.).

Kas dokusunda uygulanan tüm Cu^{+2} derişimlerinde 1,07±0,77 ile 2,83±0,21 mg/g k.a. değerleri arasında ölçülen Na^{+} düzeyi azalış gösterirken, en düşük düzeyini 0,5 µg Cu^{+2}/mL etkisinde gösterdi (P<0,001) (Çizelge 4.2.).

4.1.2.4.(1).(c). Çinko

Solungaç dokusu Na^{+} düzeyleri, Zn^{+2} etkisinde herhangi bir değişiklik göstermezken (P>0,05), 5,61±0,59 ile 6,90±0,83 mg/g k.a. değerleri arasında ölçüldü (Çizelge 4.2.).

Böbrek dokusunda ise en düşük Zn^{+2} derişimi etkisinde 11,6±0,96 mg/g k.a. olarak ölçülen Na^{+} düzeyi kontrole göre farklı bulunmazken, 0,5 µg Zn^{+2}/mL etkisinde azalarak en düşük düzeyde gözlendi (4,20±0,62 mg/g k.a.) (P<0,001) (Çizelge 4.2.).

Kas dokusunda ise 2,62±0,31 ile 1,79±0,16 mg/g k.a. aralığında ölçülen Na^{+}'nın en düşük düzeyi en yüksek Zn^{+2} derişimi etkisinde gözlendi (P<0,001) (Çizelge 4.2.).

4.1.2.4.(1).(d).Krom

Solungaç dokusu Na^{+} düzeyleri Cr^{+6} etkisinde 4,44±0,30 ile 5,50±0,61 mg/g k.a. aralığında gözlenirken, en düşük düzeyde 0,1 µg Cr^{+6}/mL derişiminde gözlendi (P<0,01) (Çizelge 4.2.).

Böbrek dokusunda ise Cr^{+6}'nın denenen tüm derişimleri sonrasında Na^{+} düzeylerinde azalış gözlendi ve 5,87±0,18 ile 7,43±1,87 mg/g k.a. aralığındaki Na^{+} düzeyleri en düşük değerde 0,1 µg Cr^{+6}/mL derişiminde ölçüldü (P<0,001) (Çizelge 4.2.).

Kas dokusu da böbrek dokusunda olduğu gibi Cr^{+6}'nın tüm derişimleri için kontrole göre azalış gösterdi (P<0,001). Buna göre 2,76±0,30 ile 2,27±0,03 mg/g k.a. aralığında ölçülen Na^{+}'nın en düşük düzeyi en yüksek Cr^{+6} derişiminde gözlendi (Çizelge 4.2.).

4.1.2.4.(1).(e).Gümüş

Solungaç dokusunda tüm Ag^+ derişimlerinde Na^+ düzeyinin azaldığı kaydedildi. Buna göre 3,67±0,34 ile 5,55±0,41 mg/g k.a. değerleri arasındaki Na^+'nın en düşük düzeyi 1,0 µg Ag^+/mL etkisinde belirlendi ($P<0,01$) (Çizelge 4.2.).

Böbrek dokusunda Ag^+'nın denenen tüm derişimleri sonrasında Na^+ düzeyinin azaldığı gözlendi ($P<0,001$). Na^+ düzeyleri 5,15±0,41 ile 3,86±0,58 mg/g k.a. olarak belirlenirken, en düşük düzeyde 1,5 µg Ag^+/mL etkisinde ölçüldü (Çizelge 4.2.).

Kas dokusunda da 2,09±0,23 ve 2,28±0,14 mg/g k.a. aralığındaki Na^+'nın en düşük düzeyi, 1,0 µg Ag^+/mL etkisinde gözlendi ($P<0,001$) (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. Akut metal etkisinde kalan *O. niloticus* dokularındaki toplam Na^{+} düzeyleri (mg/g k.a.). Veriler Aritmetik ortalama±Standart hata olarak verilmiştir (Kontrol grup, N=21; Metal etkisinde kalan grup, N=3; *: İstatistiksel olarak farklı grupları göstermektedir).

Metal	Derişim (µg/mL)	Solungaç	Böbrek	Kas
Cd^{+2}	**0,0**	7,01±0,31	14,0±0,65	4,18±0,13
	0,1	4,39±0,32*	11,9±0,75	4,20±0,35
	0,5	4,93±0,28*	8,66±0,88*	3,80±0,42
	1,0	7,39±0,43	7,99±0,53*	3,10±0,54*
	1,5	5,77±0,60	7,57±0,71*	2,91±0,09*
		P<0,01	P<0,001	P<0,01
Cu^{+2}	**0,0**	7,01±0,31	14,0±0,65	4,18±0,13
	0,1	1,95±0,01*	14,6±1,12	2,69±0,01*
	0,5	6,74±2,56	13,8±1,50	1,07±0,77*
	1,0	4,68±0,22*	8,22±0,57*	2,83±0,21*
	1,5	5,44±0,51	8,08±1,36*	2,50±0,10*
		P<0,01	P<0,01	P<0,001
Zn^{+2}	**0,0**	7,01±0,31	14,0±0,65	4,18±0,13
	0,1	5,61±0,59	11,6±0,96	2,62±0,31*
	0,5	6,90±0,83	4,20±0,62*	2,39±0,09*
	1,0	6,48±0,87	4,56±1,42*	2,31±0,19*
	1,5	6,02±0,64	4,82±0,83*	1,79±0,16*
		P>0,05	P<0,001	P<0,001
Cr^{+6}	**0,0**	7,01±0,31	14,0±0,65	4,18±0,13
	0,1	4,44±0,30*	5,87±0,18*	2,76±0,30*
	0,5	4,92±0,14*	6,30±0,61*	2,72±0,21*
	1,0	5,50±0,61	7,43±1,87*	2,67±0,17*
	1,5	5,42±0,52	6,04±0,17*	2,27±0,03*
		P<0,01	P<0,001	P<0,001
Ag^{+}	**0,0**	7,01±0,31	14,0±0,65	4,18±0,13
	0,1	4,40±0,81*	5,15±0,41*	2,11±0,27*
	0,5	4,74±0,52*	4,82±0,28*	2,25±0,19*
	1,0	3,67±0,34*	4,89±0,73*	2,09±0,23*
	1,5	5,55±0,41	3,86±0,58*	2,28±0,14*
		P<0,01	P<0,001	P<0,001

4.1.2.4.(2). Potasyum İyon Düzeyi

Kontrol grubu solungaç dokusunda K^+ iyon düzeyi 4,57±0,14 mg/g k.a., böbrek dokusunda 10,9±0,80 mg/g k.a. ve kas dokusunda 8,83±0,55 mg/g k.a. olarak gözlendi (Çizelge 4.3.).

4.1.2.4.(2).(a). Kadmiyum

Solungaç dokusunda 3,03±0,21 ile 4,18±0,11 mg/g k.a. arasındaki K^+'nın en düşük düzeyi 0,1 µg Cd^{+2}/mL derişiminde ölçüldü ($P<0,01$) (Çizelge 4.3.).

Böbrek dokusunda ise kontrol grubuna göre herhangi bir ayırım göstermeyen K^+ düzeyleri, 7,84±0,22 ile 10,4±0,70 mg/g k.a. aralığında ölçüldü ($P>0,05$) (Çizelge 4.3.).

Kas dokusunda da K^+ düzeyi, Cd^{+2} derişimlerinden etkilenmezken, 4,85±0,72 ile 9,93±5,44 mg/g k.a. aralığında belirlendi ($P>0,05$) (Çizelge 4.3.).

4.1.2.4.(2).(b). Bakır

Solungaç K^+ düzeyi azalarak 1,66±0,01 ile 4,29±2,24 mg/g k.a. arasında ölçülürken, en düşük düzeyini 0,1 µg Cu^{+2}/mL etkisinde gösterdi ($P<0,001$) (Çizelge 4.3.).

Böbrek dokusu K^+ düzeyi ise 9,16±0,74 ile 11,9±0,73 mg/g k.a. arasında belirlenmiş ve kontrol düzeylerinden farklı bulunmamıştır ($P>0,05$) (Çizelge 4.3.).

Kas dokusunda K^+ düzeyi azalarak 10,9±0,01 ile 4,07±0,43 mg/g k.a. aralığında ölçülürken en düşük düzeyini 1,0 µg Cu^{+2}/mL etkisinde gösterdi ($P<0,01$) (Çizelge 4.3.).

4.1.2.4.(2).(c). Çinko

Solungaç dokusu K^+ düzeyinin Zn^{+2} etkisinde azalarak 3,67±0,20 ile 4,0±0,04 mg/g k.a. aralığında ölçüldüğü ve en düşük K^+ düzeyinin 0,1 µg Zn^{+2}/mL etkisinde gözlendiği kaydedildi (P<0,05) (Çizelge 4.3.).

Böbrek dokusu K^+ düzeyinin, Zn^{+2} etkisinde 6,99±0,40 ile 8,19±0,52 mg/g k.a. aralığında ölçüldüğü ve kontrol ile karşılaştırıldığında bir ayırım göstermediği gözlenmiştir (P>0,05) (Çizelge 4.3.).

Kas dokusunda ise K^+ düzeyinin azaldığı ve 6,69±0,09 ile 2,66±0,54 mg/g k.a. aralığında ölçüldüğü kaydedildi. Buna göre K^+ düzeyi 1,0 µg Zn^{+2}/mL etkisinde en düşük düzeyde belirlendi (P<0,01) (Çizelge 4.3.).

4.1.2.4.(2).(d). Krom

Solungaç dokusunda 3,16±0,18 ile 4,61±0,01 mg/g k.a. aralığında ölçülen K^+ düzeyi kontrol grubu değerlerine göre azalış göstererek, en düşük düzeyde 0,1 µg Cr^{+6}/mL derişiminde gözlendi (P<0,05) (Çizelge 4.3.).

Böbrek K^+ düzeyleri 6,10±0,18 ile 7,49±1,04 mg/g k.a. aralığında belirlendi ve en düşük düzeyinin 1,0 µg Cr^{+6}/mL etkisinde olduğu gözlendi (P<0,05) (Çizelge 4.3.).

Kas dokusunda 6,70±0,01 ile 5,09±0,27 mg/g k.a. aralığında ölçülen K^+'nın en düşük düzeyinin en yüksek Cr^{+6} derişiminde gözlendiği belirlendi (P<0,05) (Çizelge 4.3.).

4.1.2.4.(2).(e). Gümüş

Solungaç K^+ düzeyinin, Ag^+ derişimleri arttıkça azalış göstererek 3,40±0,27 ile 1,95±1,20 mg/g k.a. olarak ölçüldü. En düşük düzeyi ise en yüksek Ag^+ derişiminde kaydedildi (P<0,001) (Çizelge 4.3.).

Böbrek dokusunda ise Ag^+ etkisinde 6,10±0,18 ve 6,50±0,45 mg/g k.a. aralığında ölçülen K^+'nın en düşük düzeyi 0,1 µg Ag^+/mL etkisinde gözlendi ($P<0,001$) (Çizelge 4.3.).

Kas K^+ düzeyinin ise Ag^+ etkisinde bir değişiklik göstermemiş ve 7,93±1,17 ile 9,62±0,38 mg/g k.a. aralığında ölçülmüştür ($P>0,05$) (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. Akut metal etkisinde kalan *O. niloticus* dokularındaki toplam K^+ düzeyleri (mg/g k.a.). Veriler Aritmetik ortalama±Standart hata olarak verilmiştir (Kontrol grup, N=21; Metal etkisinde kalan grup, N=3; *: İstatistiksel olarak farklı grupları göstermektedir).

Metal	Derişim (µg/mL)	Solungaç	Böbrek	Kas
Cd^{+2}	**0,0**	4,57±0,14	10,9±0,80	8,83±0,55
	0,1	3,03±0,21*	10,4±0,70	5,90±1,29
	0,5	3,25±0,49*	7,84±0,22	6,21±1,25
	1,0	4,18±0,11	8,21±0,79	9,93±5,44
	1,5	3,82±0,25*	8,28±0,51	4,85±0,72
		P<0,01	P>0,05	P>0,05
Cu^{+2}	**0,0**	4,57±0,14	10,9±0,80	8,83±0,55
	0,1	1,66±0,01*	11,9±0,73	10,9±0,01
	0,5	4,29±1,24	11,7±2,06	5,25±0,57*
	1,0	3,33±0,18*	9,16±0,74	4,07±0,43*
	1,5	3,56±0,26*	10,3±1,56	4,96±0,20*
		P<0,001	P>0,05	P<0,01
Zn^{+2}	**0,0**	4,57±0,14	10,9±0,80	8,83±0,55
	0,1	3,67±0,20*	7,16±0,46	6,69±0,09
	0,5	4,00±0,04	7,76±0,65	4,18±2,8*
	1,0	3,87±0,38	6,99±0,40	2,66±0,54*
	1,5	3,71±0,20*	8,19±0,52	5,33±0,93*
		P<0,05	P>0,05	P<0,01
Cr^{+6}	**0,0**	4,57±0,14	10,9±0,80	8,83±0,55
	0,1	3,16±0,18*	6,10±0,18	6,70±0,01
	0,5	3,68±0,03*	7,49±1,04	6,19±1,03
	1,0	3,99±0,23	5,45±1,32*	5,34±1,52
	1,5	4,61±0,01	6,23±0,56*	5,09±0,27*
		P<0,05	P<0,05	P<0,05
Ag^{+}	**0,0**	4,57±0,14	10,9±0,80	8,83±0,55
	0,1	3,40±0,27*	6,10±0,18*	7,93±1,17
	0,5	3,09±0,21*	6,50±0,45*	9,62±0,38
	1,0	2,76±0,18*	6,38±0,56*	9,25±0,54
	1,5	1,95±1,20*	6,41±0,38*	9,07±0,34
		P<0,001	P<0,01	P>0,05

4.1.2.4.(3). Magnezyum İyon Düzeyi

Mg^{+2} iyon düzeyi kontrol grubu solungaç, böbrek ve kas dokularında sırasıyla 1,13±0,07, 1,09±0,05 ve 1,54±0,06 mg/g k.a. olarak ölçüldü (Çizelge 4.4.).

4.1.2.4.(3).(a). Kadmiyum

Solungaç Mg^{+2} düzeyleri Cd^{+2} etkisinde 1,14±0,12 ile 1,63±0,27 mg/g k.a. aralığında ölçülürken, en yüksek düzeyi en yüksek Cd^{+2} derişiminde gözlendi ($P<0,05$) (Çizelge 4.4.).

Böbrek dokusunda ise artan Cd^{+2} etkisinde 1,12±0,01 ile 1,47±0,22 mg/g k.a. aralığında ölçülen Mg^{+2} düzeyi kontrole göre bir ayırım göstermemiştir ($P>0,05$) (Çizelge 4.4.).

Kas Mg^{+2} düzeyleri de Cd^{+2} derişimlerinden etkilenmemiş ve 1,55±0,07 ile 2,11±0,41 mg/g k.a. aralığında ölçülmüştür ($P>0,05$) (Çizelge 4.4.).

4.1.2.4.(3).(b). Bakır

Solungaç dokusunda Mg^{+2} düzeyini Cu^{+2} derişimleri etkilememiş ($P>0,05$) ve 1,68±0,25 ile 0,85±0,09 mg/g k.a. aralığında ölçülmüştür (Çizelge 4.4.).

Böbrek Mg^{+2} düzeyi ise 0,83±0,01 ile 2,12±0,73 mg/g k.a. aralığında ölçülürken, en yüksek düzeyi 0,1 µg Cu^{+2}/mL etkisinde belirlendi ($P<0,01$) (Çizelge 4.4.).

Kas dokusunda ise 1,14±1,14 ile 1,34±0,06 mg/g k.a. aralığında ölçülen Mg^{+2} düzeyi kontrol ile karşılaştırıldığında herhangi bir ayırım göstermemiştir ($P>0,05$) (Çizelge 4.4.).

4.1.2.4.(3).(c). Çinko

Solungaç dokusu Mg^{+2} düzeyleri Zn^{+2} etkisinde değişmemiş ve 1,20±0,11 ile 1,59±0,10 mg/g k.a. aralığında ölçülmüştür ($P>0,05$) (Çizelge 4.4.).

Böbrek dokusunda ise benzer şekilde 1,11±0,35 ile 1,46±0,51 mg/g k.a. aralığında ölçülen Mg^{+2} düzeyleri kontrole göre bir ayırım göstermemiştir (P>0,05) (Çizelge 4.4.).

Kas Mg^{+2} düzeyinin ise 1,44±0,15 ile 0,86±0,05 mg/g k.a. aralığında ölçüldüğü ve en düşük düzeyini en yüksek Zn^{+2} derişiminde gösterdiği kaydedildi (P<0,01) (Çizelge 4.4.).

4.1.2.4.(3).(d). Krom

Solungaç Mg^{+2} düzeyleri Cr^{+6} etkisinde denenen tüm derişimler sonunda değişiklik göstermemiş ve 1,27±0,08 ile 1,54±0,19 mg/g k.a. aralığında ölçülmüştür (P>0,05) (Çizelge 4.4.).

Böbrek dokusunda ise 0,91±0,13 ile 1,56±0,22 mg/g k.a. aralığında ölçülen Mg^{+2}'nin en yüksek düzeyi 0,5 µg Cr^{+6}/mL etkisinde gözlendi (P<0,05) (Çizelge 4.4.).

Kas dokusunda Mg^{+2} düzeyi ise Cr^{+6} etkisinde herhangi bir ayırım göstermemiş ve 1,52±0,13 ile 1,63±0,10 mg/g k.a. aralığında belirlenmiştir (P>0,05) (Çizelge 4.4.).

4.1.2.4.(3).(e). Gümüş

Solungaç dokusunda 1,16±0,13 ile 1,49±0,23 mg/g k.a. aralığında ölçülen Mg^{+2} düzeyleri Ag^{+} etkisinde kontrole göre bir ayırım göstermemiştir (P>0,05) (Çizelge 4.4.).

Böbrek dokusunda ise 0,91±0,10 ile 1,60±0,18 mg/g k.a. aralığındaki Mg^{+2} düzeylerinin derişime bağlı artış gösterdiği ve en yüksek düzeyinin 1,5 µg Ag^{+}/mL etkisinde gözlendiği kaydedildi (P<0,01) (Çizelge 4.4.).

Kas dokusu Mg^{+2} düzeyi de solungaç dokusunda olduğu gibi Ag^{+} etkisinde kontrol düzeylerine göre bir ayırım göstermemiş, 1,66±0,12 ile 1,83±0,14 mg/g k.a. olarak ölçülmüştür (P>0,05) (Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.4. Akut metal etkisinde kalan *O. niloticus* dokularındaki toplam Mg^{+2} düzeyleri (mg/g k.a.). Veriler Aritmetik ortalama±Standart hata olarak verilmiştir (Kontrol grup, N=21; Metal etkisinde kalan grup, N=3; *: İstatistiksel olarak farklı grupları göstermektedir).

Metal	Derişim (µg/mL)	Solungaç	Böbrek	Kas
Cd^{+2}	**0,0**	1,13±0,07	1,09±0,05	1,54±0,06
	0,1	1,14±0,12	1,12±0,01	1,73±0,21
	0,5	1,36±0,05	1,31±0,14	1,79±0,14
	1,0	1,54±0,09*	1,31±0,15	2,11±0,41
	1,5	1,63±0,27*	1,47±0,22	1,55±0,07
		P<0,05	P>0,05	P>0,05
Cu^{+2}	**0,0**	1,13±0,07	1,09±0,05	1,54±0,06
	0,1	0,99±0,01	2,12±0,73*	1,14±1,14
	0,5	1,68±0,25	1,25±0,11	1,34±0,06
	1,0	0,85±0,09	0,90±0,13	1,22±0,11
	1,5	0,93±0,26	0,83±0,01	1,16±0,11
		P>0,05	P<0,01	P>0,05
Zn^{+2}	**0,0**	1,13±0,07	1,09±0,05	1,54±0,06
	0,1	1,26±0,23	1,33±0,01	1,44±0,15
	0,5	1,31±0,07	1,11±0,35	1,39±0,11
	1,0	1,59±0,10	1,46±0,51	0,90±0,12*
	1,5	1,20±0,11	1,22±0,13	0,86±0,05*
		P>0,05	P>0,05	P<0,01
Cr^{+6}	**0,0**	1,13±0,07	1,09±0,05	1,54±0,06
	0,1	1,33±0,14	0,94±0,01	1,52±0,13
	0,5	1,27±0,08	1,56±0,22*	1,52±0,23
	1,0	1,46±0,04	0,91±0,13	1,53±0,08
	1,5	1,54±0,19	0,99±0,01	1,63±0,10
		P>0,05	P<0,05	P>0,05
Ag^{+}	**0,0**	1,13±0,07	1,09±0,05	1,54±0,06
	0,1	1,16±0,13	0,91±0,10	1,83±0,14
	0,5	1,23±0,06	1,44±0,25*	1,77±0,14
	1,0	1,18±0,09	1,51±0,23*	1,66±0,12
	1,5	1,49±0,23	1,60±0,18*	1,79±0,21
		P>0,05	P<0,01	P>0,05

4.1.2.4.(4). Kalsiyum İyon Düzeyi

Kontrol grubu Ca^{+2} düzeyleri, solungaç dokusunda 42,8±1,54 mg/g k.a., böbrek dokusunda 0,52±0,05 mg/g k.a., kas dokusunda ise 0,39±0,04 mg/g k.a. olarak ölçüldü (Çizelge 4.5.).

4.1.2.4.(4).(a). Kadmiyum

Solungaç dokusunda Ca^{+2} düzeyi 43,1±2,21 ile 62,6±4,04 mg/g k.a. aralığında belirlenirken, en yüksek düzeyi 1,0 µg Cd^{+2}/mL etkisinde gözlendi (P<0,001) (Çizelge 4.5.).

Böbrek Ca^{+2} düzeyleri de 0,94±0,03 ile 1,94±0,38 mg/g k.a. aralığında ölçüldü ve en yüksek düzeyde 1,0 µg Cd^{+2}/mL etkisinde gözlendi (P<0,001) (Çizelge 4.5.).

Kas dokusunda ise 40,9±0,98 ile 7,71±0,72 mg/g k.a. aralığında ölçülen Ca^{+}'nin en yüksek düzeyi en düşük Cd^{+2} derişimi etkisinde gözlendi (P<0,001) (Çizelge 4.5.).

4.1.2.4.(4).(b).Bakır

Solungaç dokusu Ca^{+2} düzeyi, 41,2±3,07 ile 76,0±14,4 mg/g k.a. aralığında ölçülürken, en yüksek düzeyde 0,5 µg Cu^{+2}/mL etkisinde gözlendi (P<0,001) (Çizelge 4.5.).

Böbrek dokusunda da 0,62±0,17 ile 2,41±0,49 mg/g k.a. aralığında ölçülen Ca^{+2}'nin en yüksek düzeyi en düşük Cu^{+2} derişiminde gözlendi (P<0,001) (Çizelge 4.5.).

Kas dokusunda ise Ca^{+2} düzeyi, 0,24±0,01 ile 9,53±1,63 mg/g k.a. aralığında ölçüldü ve en yüksek düzeyde 0,5 µg Cu^{+2}/mL etkisinde belirlendi (P<0,001) (Çizelge 4.5.).

4.1.2.4.(4).(c).Çinko

Solungaç dokusunda 50,5±4,94 ile 54,5±6,36 mg/g k.a. aralığında ölçülen Ca^{+2} düzeyi kontrole göre artış gösterirken, en yüksek düzeyini 0,5 µg Zn^{+2}/mL etkisinde gösterdi (P<0,05) (Çizelge 4.5.).

Böbrek Ca^{+2} düzeyi ise 0,48±0,05 ile 1,38±0,44 mg/g k.a. aralığında ölçülerek, en yüksek düzeyi 1,0 µg Zn^{+2}/mL etkisinde gözlendi (P<0,01) (Çizelge 4.5.).

Kas dokusunda ise 0,29±0,07 ile 5,54±2,61 mg/g k.a. aralığında ölçülen Ca^{+2}'nin en yüksek düzeyi 1,0 µg Zn^{+2}/mL etkisinde gözlendi (P<0,001) (Çizelge 4.5.).

4.1.2.4.(4).(d).Krom

Solungaç dokusunda Ca^{+2} düzeyi, 44,2±2,78 ile 56,6±3,95 mg/g k.a. aralığında belirlenirken, en yüksek düzeyi 1,0 µg Cr^{+6}/mL etkisinde gözlendi (P<0,05) (Çizelge 4.5.).

Böbrek Ca^{+2} düzeyi 0,57±0,11 ile 1,62±0,09 mg/g k.a. aralığında ölçülürken, en yüksek düzeyi 0,5 µg Cr^{+6}/mL etkisinde gözlendi (P<0,001) (Çizelge 4.5.).

Kas dokusunda ise Cr^{+6} derişimleri, 0,18±0,07 ile 0,48±0,19 mg/g k.a. aralığında ölçülen Ca^{+2} düzeyinde herhangi bir etkiye neden olmamıştır (P>0,05) (Çizelge 4.5.).

4.1.2.4.(4).(e).Gümüş

Solungaç dokusu Ca^{+2} düzeyi 39,9±1,35 ile 54,7±9,74 mg/g k.a. aralığında ölçülmüş ve kontrole göre herhangi bir ayırım göstermemiştir (P>0,05) (Çizelge 4.5.).

Böbrek dokusunda ise 0,68±0,14 ile 1,05±0,29 mg/g k.a. aralığında ölçülen Ca^{+2}2nin en yüksek düzeyi 0,5 µg Ag^{+}/mL etkisinde gözlendi (P<0,01) (Çizelge 4.5.).

Kas dokusunda ise solungaç dokusunda olduğu gibi Ag^{+} etkisinde Ca^{+2} düzeyleri herhangi bir ayırım göstermemiş ve 0,27±0,02 ile 0,70±0,35 mg/g k.a. aralığında ölçülmüştür (P>0,05) (Çizelge 4.5.).

Çizelge 4.5. Akut metal etkisinde kalan *O. niloticus* dokularındaki toplam Ca^{+2} düzeyleri (mg/g k.a.). Veriler Aritmetik ortalama±Standart hata olarak verilmiştir (Kontrol grup, N=21; Metal etkisinde kalan grup, N=3; *: İstatistiksel olarak farklı grupları göstermektedir).

Metal	Derişim (µg/mL)	Solungaç	Böbrek	Kas
Cd^{+2}	**0,0**	42,8±1,54	0,52±0,05	0,39±0,04
	0,1	43,1±2,21	0,94±0,03	40,9±0,98*
	0,5	46,9±1,15	1,02±0,20	29,2±6,30*
	1,0	62,6±4,04*	1,94±0,38*	7,81±4,46*
	1,5	55,6±3,86*	1,14±0,47*	7,71±0,72*
		P<0,001	P<0,001	P<0,001
Cu^{+2}	**0,0**	42,8±1,54	0,52±0,05	0,39±0,04
	0,1	42,8±0,01	2,41±0,49*	0,24±0,01
	0,5	76,0±14,4*	1,28±0,65*	9,53±1,63*
	1,0	41,2±3,07	0,62±0,17	0,33±0,09
	1,5	58,1±7,05*	1,14±0,19	0,54±0,01
		P<0,001	P<0,001	P<0,001
Zn^{+2}	**0,0**	42,8±1,54	0,52±0,05	0,39±0,04
	0,1	50,5±4,94	0,62±0,07	0,29±0,07
	0,5	54,5±6,36*	0,48±0,05	0,73±0,50
	1,0	54,3±7,08*	1,38±0,44*	5,54±2,61*
	1,5	54,1±4,75*	0,53±0,13	0,88±0,08
		P<0,05	P<0,01	P<0,001
Cr^{+6}	**0,0**	42,8±1,54	0,52±0,05	0,39±0,04
	0,1	44,2±2,78	0,95±0,15*	0,39±0,04
	0,5	49,1±3,49	1,62±0,10*	0,32±0,04
	1,0	56,6±3,95*	0,57±0,11	0,48±0,19
	1,5	52,9±4,66*	0,63±0,09	0,18±0,07
		P<0,05	P<0,001	P>0,05
Ag^{+}	**0,0**	42,8±1,54	0,52±0,05	0,39±0,04
	0,1	42,3±2,97	0,68±0,14	0,70±0,35
	0,5	45,3±6,49	1,05±0,29*	0,29±0,01
	1,0	39,9±1,35	0,94±0,22*	0,27±0,02
	1,5	54,7±9,74	0,98±0,06*	0,27±0,02
		P>0,05	P<0,01	P>0,05

4.1.2.5. *İn vitro* ATPaz Aktivitesi

O. niloticus'un solungaç, böbrek ve kas dokusu homojenatları, Cd^{+2}, Cu^{+2}, Zn^{+2}, Cr^{+6} ve Ag^{+}'nın 0,1, 0,5, 1,0 ve 1,5 µg/mL derişimlerinin *in vitro* etkisine bırakıldı ve bu süreler sonunda ATPaz aktiviteleri ölçüldü. Elde edilen bulgular, solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin 3,19±0,17 µmol Pi/mg prot./sa., Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin 11,6±0,28 µmol Pi/mg prot./sa. ve Toplam-ATPaz aktivitesinin 14,8±0,29 µmol Pi/mg prot./sa. düzeyinde olduğunu gösterdi. Böbrek dokusu Na^{+}/K^{+}-ATPaz, Mg^{+2}-ATPaz ve Toplam-ATPaz aktiviteleri sırasıyla 0,99±0,07 µmol Pi/mg prot./sa., 6,38±0,11 µmol Pi/mg prot./sa. ve 7,37±0,10 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçüldü. Kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ise 7,10±1,15 µmol Pi/mg prot./sa. olarak gözlendi.

İn vitro metal etkilerinde ölçülen ATPaz aktivitelerinin % değerleri EK-5'de ayrıca verilmiştir.

4.1.2.5.(1). Kadmiyum

Solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin *in vitro* Cd^{+2} etkisinde derişim düzeyleri arttıkça inhibe olduğu gözlendi. Enzim aktivitesinin Cd^{+2} derişimlerinde % 34 ile % 79 oranlarında azalış gösterdiği ve en düşük düzeyinin 1,0 µg Cd^{+2}/mL etkisinde olduğu gözlendi (0,67±0,03 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,001$) (Şekil 4.9. a.). Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 9 ile % 22 artış oranlarına sahip olup, en yüksek düzeyi 0,5 µg Cd^{+2}/mL etkisinde gözlendi (14,2±0,05 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,001$) (Şekil 4.10. a.). Toplam-ATPaz aktivitesi ise % 1 ile % 5 azalış veya atış oranlarına karşın kontrol değerlerinden farklı gözlenmemiştir ($P>0,05$) (Şekil 4.11. a.).

Böbrek dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi, % 12 ile % 100 oranlarında azalarak en yüksek Cd^{+2} derişiminde tamamen inhibe oldu ($P<0,001$) (Şekil 4.9. b.). Buna karşılık, Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin Cd^{+2} derişimleri arttıkça % 17 ile % 21 oranlarında artarak en yüksek düzeyini 1,0 µg Cd^{+2}/mL etkisinde gösterdiği belirlendi (7,75±0,08 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,001$) (Şekil 4.10. b.). Toplam-

ATPaz aktivitesinin % 1 ile % 14 artış oranları ile en yüksek düzeyi en düşük Cd^{+2} derişiminde gözlendi (8,40±0,06 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.11. b.).

Kas dokusu Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin, Cd^{+2}'nin artan derişimlerine bağlı olarak % 76 ile % 92 oranlarında azaldığı ve en düşük düzeyde en yüksek Cd^{+2} derişiminde gözlendiği kaydedildi (0,59±0,35 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,01) (Şekil 4.12.).

4.1.2.5.(2). Bakır

Solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi, Cu^{+2} etkisinde % 50 ile % 100 oranlarında derişime bağlı azalış göstererek 1,5 µg Cu^{+2}/mL etkisinde tamamen inhibe oldu (P<0,001) (Şekil 4.9. a.). Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi % 1 ile % 6 oranlarında azalış göstermesine karşın, kontrole göre herhangi bir ayırım göstermemiştir (P>0,05) (Şekil 4.10. a.). Toplam-ATPaz aktivitesinin ise Cu^{+2} derişimi arttıkça % 16 ile % 24 oranlarında azalış gösterdiği ve en düşük düzeyde en yüksek Cu^{+2} derişiminde gözlendiği kaydedildi (11,2±0,01 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.11. a.).

Böbrek Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin, % 22 ile % 100 oranlarında azalış gösterirken başlangıç derişimi dışındaki diğer derişimlerin etkisinde tamamen inhibe olduğu gözlendi (P<0,001) (Şekil 4.9. b.). Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi, % 1 ile % 42 oranlarında artış göstererek en yüksek düzeyde 1,5 µg Cu^{+2}/mL etkisinde gözlendi (9,07±0,32 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.10. b.). Toplam-ATPaz ise % 4 ile % 29 azalarak ve en düşük aktivitesi 1,0 µg Cu^{+2}/mL etkisinde belirlendi (5,23±0,06 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.11. b.).

Kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi % 92 ile % 99 azalış oranları ile en düşük düzeyde 1,5 µg Cu^{+2}/mL etkisinde gözlendi (0,08±0,08 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,01) (Şekil 4.12.)

4.1.2.5.(3). Çinko

Solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi Zn^{+2} etkisinde % 15 ile % 40 oranlarında azalarak, en düşük düzeyde 1,0 µg Zn^{+2}/mL etkisinde gözlendi (1,91±0,32 µmol

Pi/mg prot./sa.) (P<0,05) (Şekil 4.9. a.). Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi % 19 ile % 33 oranında artarak en yüksek düzeyde 1,5 µg Zn^{+2}/mL etkisinde gözlendi (15,5±0,12 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.10. a.). Toplam-ATPaz aktivitesi ise % 6 ile % 22 oranında artış göstererek, en yüksek düzeyde 0,5 µg Zn^{+2}/mL etkisinde gözlendi (17,8±0,18 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.11. a.).

Böbrek dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi Zn^{+2} etkisinde % 70 ile % 81 oranında azalarak en düşük düzeyini 0,1 µg Zn^{+2}/mL etkisinde gösterdi (0,21±0,02 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.9. b.). Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 9 ile % 22 oranında artarak en yüksek düzeyde en düşük Zn^{+2} etkisinde ölçüldü (7,78±0,24 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.10. b.). Toplam-ATPaz aktivitesi farklı olarak % 2 ile % 6 oranlarında hem azalış hem artış göstermesine karşın kontrol enzim aktivitesinden herhangi bir ayırım göstermemiştir (P>0,05) (Şekil 4.11. b.).

Kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi % 40 ile % 93 arasında azalış gösterirken, en düşük düzeyde en yüksek Zn^{+2} derişiminde ölçüldü (0,50±0,25 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,01) (Şekil 4.12.).

4.1.2.5.(4). Krom

Solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi Cr^{+6} etkisinde % 19 ile % 67 azalarak, en düşük düzeyde 1,5 µg Cr^{+6}/mL etkisinde gözlendi (1,05±0,17 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.9. a.). Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi % 2 ile % 8 artış göstermesine karşın kontrol ile karşılaştırıldığında herhangi bir ayırım göstermemiştir (P>0,05) (Şekil 4.10. a.). Toplam-ATPaz aktivitesi ise denenen Cr^{+6} derişimleri etkisinde, % 1 ile % 10 oranlarındaki azalış göstermesine karşın, kontrole göre herhangi bir ayırım göstermemiştir (P>0,05).

Böbrek Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin Cr^{+6}'nın başlangıç derişimlerinde % 9 ve % 13 artış, yüksek derişimlerde ise % 59 ve % 73 oranında azalış gösterdiği ve 1,0 µg Cr^{+6}/mL etkisinde en düşük düzeyde gözlendiği kaydedildi (0,27±0,14 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.9. b.). Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi % 2 ile % 13 oranında artarak en yüksek düzeyde 1,0 µg Cr^{+6}/mL etkisinde ölçüldü (7,20±0,03 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,05) (Şekil 4.10. b.). Toplam-ATPaz aktivitesi ise % 1 ile

% 7 artış veya azalış oranlarına karşın, herhangi bir farklılık göstermemiştir (P>0,05) (Şekil 4.11 b.).

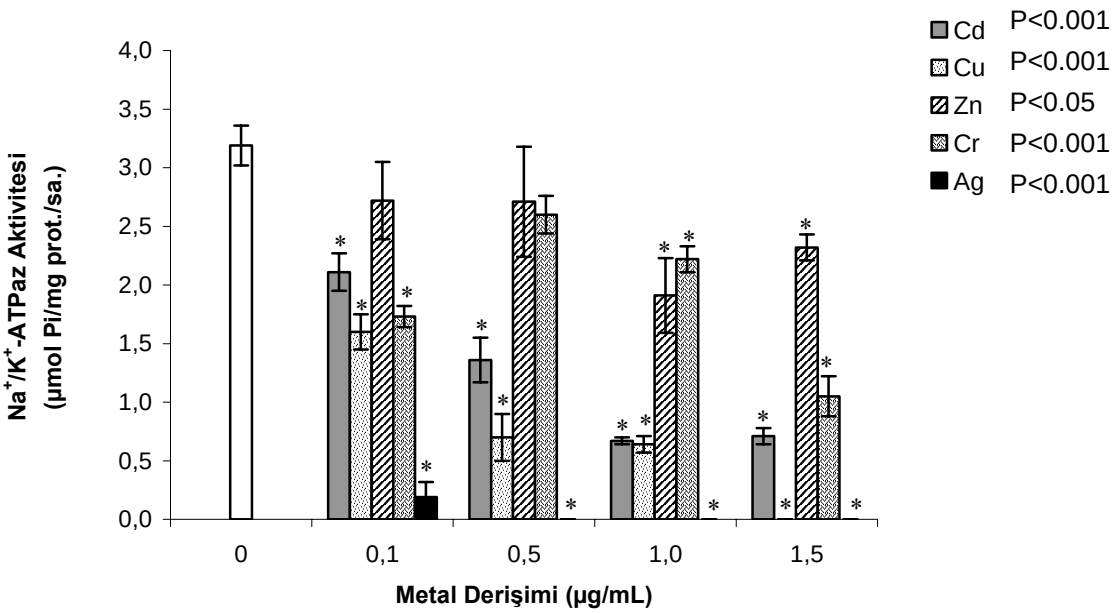
Kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi % 88 ile % 94 azalış oranlarıyla en düşük aktivitesini en yüksek Cr^{+6} derişiminde gösterdi (0,42±0,40 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,01) (Şekil 4.12.).

4.1.2.5.(5). Gümüş

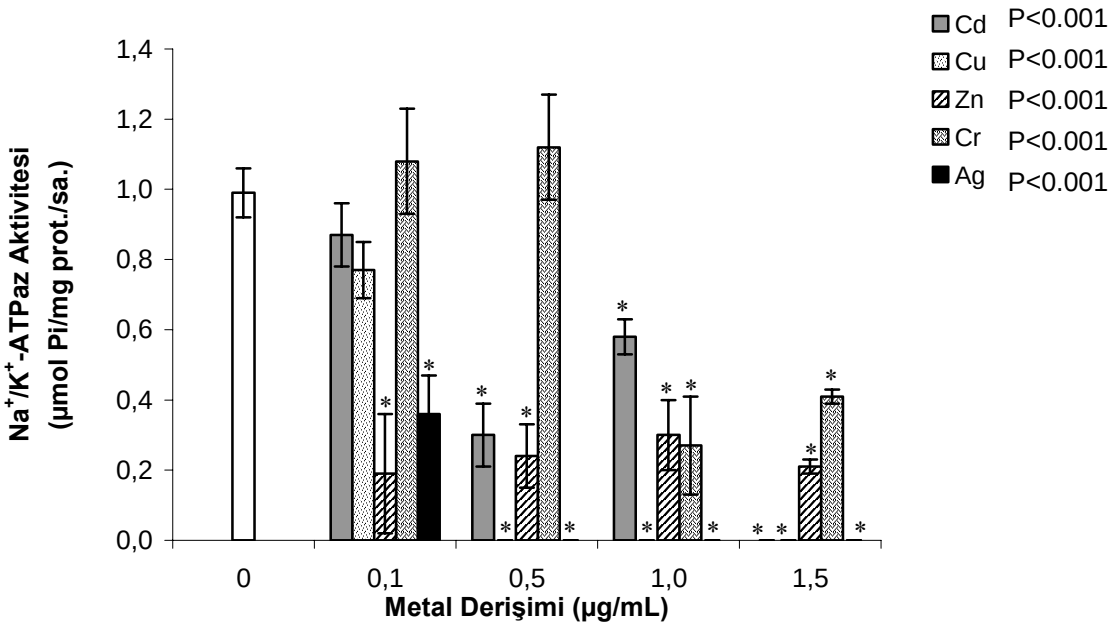
Solungaç dokusunda Ag^{+} etkisinde Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin % 94 ile % 100 azalış gösterdiği ve 0,5-1,5 µg Ag^{+}/mL etkisinde tamamen inhibe olduğu gözlendi (P<0,001) (Şekil 4.9. a.). Buna karşılık Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi % 10 ile % 20 oranında azalarak, en düşük düzeyde 0,5 µg Ag^{+}/mL etkisinde ölçüldü (9,35±0,57 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.10. a.). Toplam-ATPaz aktivitesinin % 31 ile % 42 oranlarında azaldığı ve en düşük düzeyde 1,5 µg Ag^{+}/mL etkisinde gözlendiği kaydedildi (8,56±0,23 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.11. a.).

Böbrek Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi de solungaç dokusunda olduğu gibi Ag^{+} etkisinde % 64 ile % 100 oranlarında azalarak 0,1 µg Ag^{+}/mL dışındaki derişimlerde tamamen inhibe oldu (P<0,001) (Şekil 4.9. b.). Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin en düşük Ag^{+} derişiminde % 5 azalış, diğer derişimlerde ise % 6 ile % 20 artış oranlarına sahip olduğu ve 1,0 µg Ag^{+}/mL etkisinde en yüksek düzeyde ölçüldüğü kaydedildi (7,66±0,11 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,01) (Şekil 4.10. b.). Toplam-ATPaz aktivitesi % 13 ile % 36 azalış oranları ile en düşük düzeyi en yüksek Ag^{+} derişimi etkisinde gösterdi (4,73±0,27 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.11. b.).

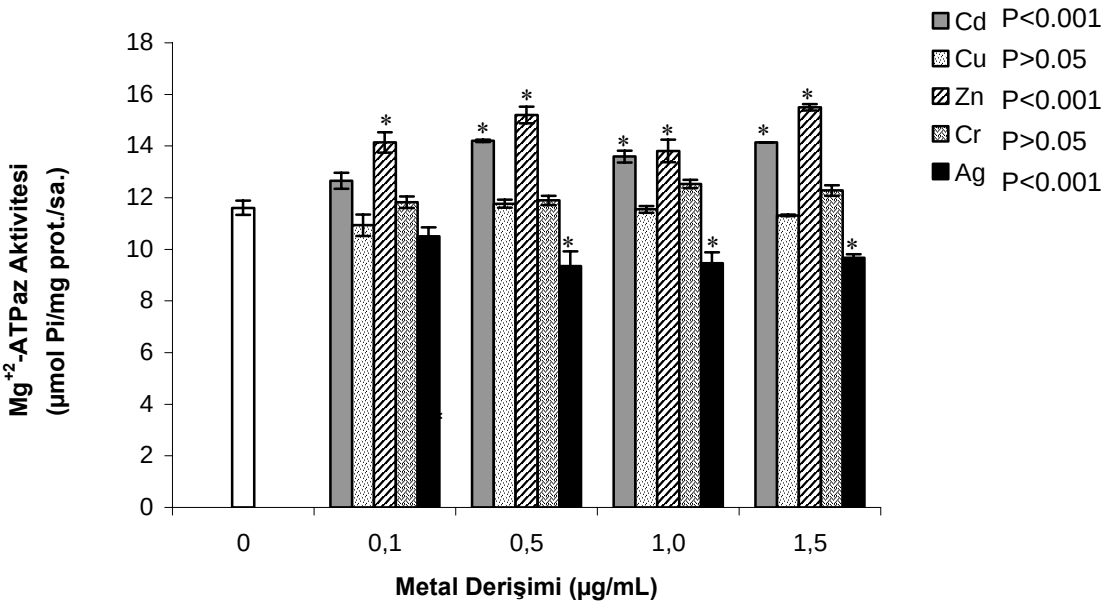
Kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin % 82 ile % 100 azalış gösterdiği ve en yüksek Ag^{+} derişiminde tamamen inhibe olduğu gözlendi (P<0,01) (Şekil 4.12.).



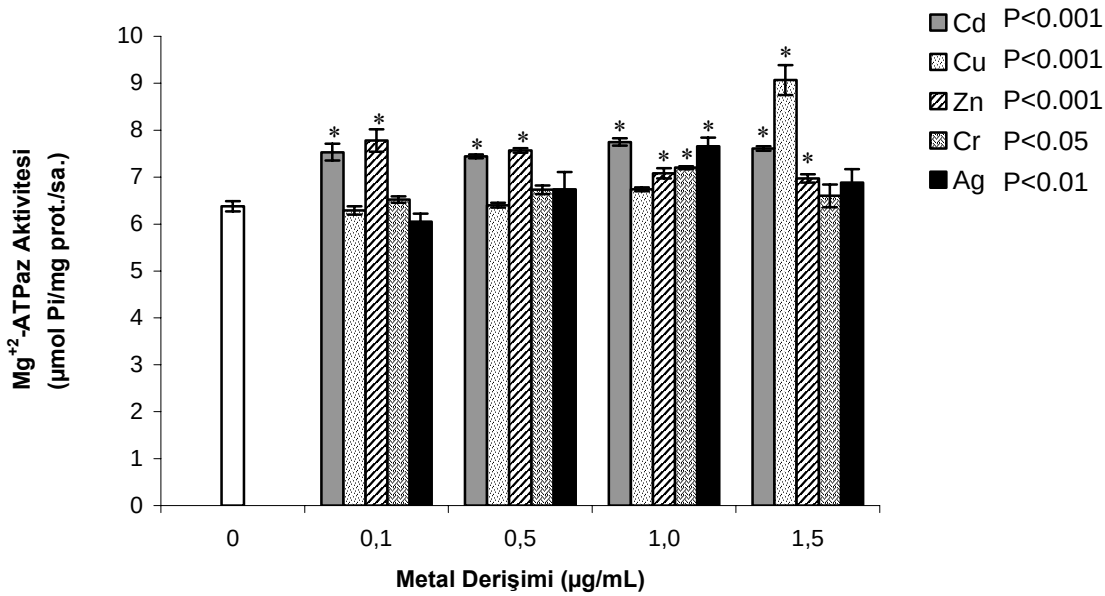
Şekil 4.9. a. Metallerin farklı derişimlerinin *in vitro* etkileri sonunda *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi.



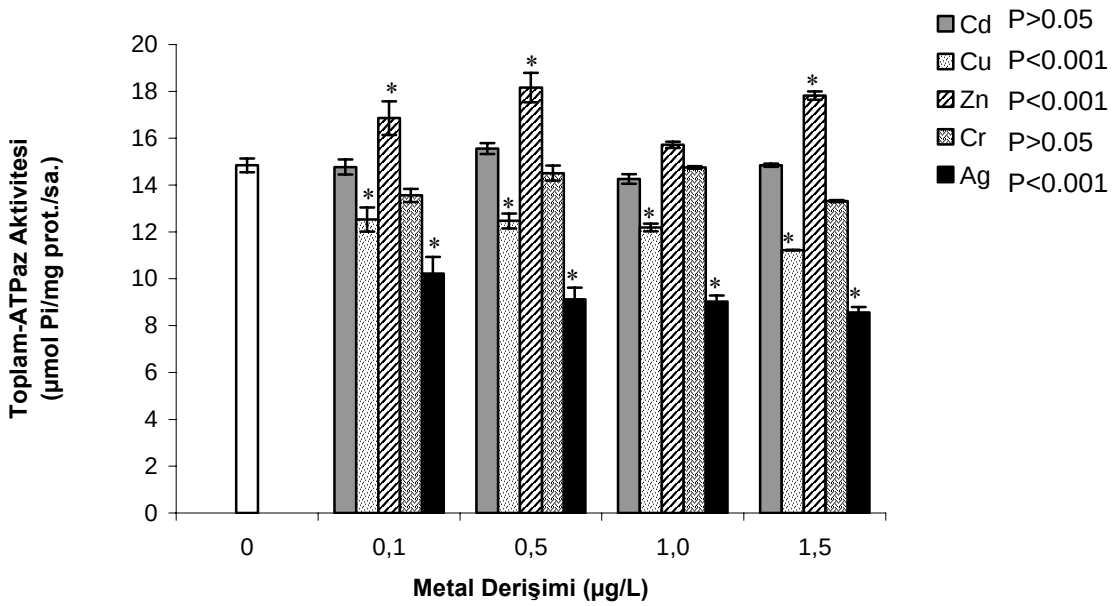
Şekil 4.9. b. Metallerin farklı derişimlerinin *in vitro* etkileri sonunda *O. niloticus*'un böbrek dokusunda Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi.



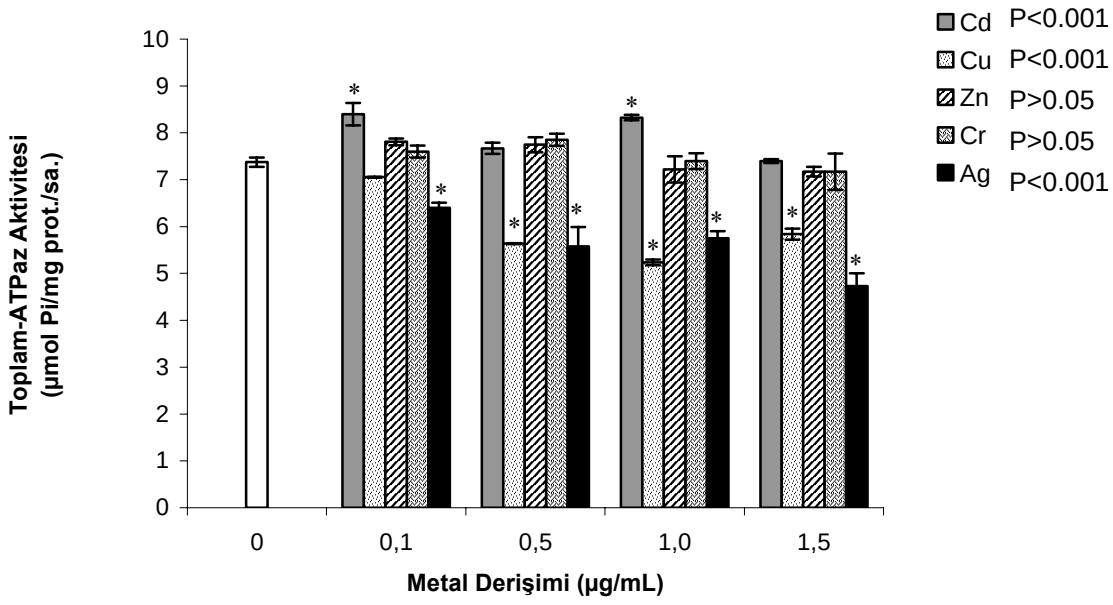
Şekil 4.10. a. Metallerin farklı derişimlerinin *in vitro* etkileri sonunda *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi.



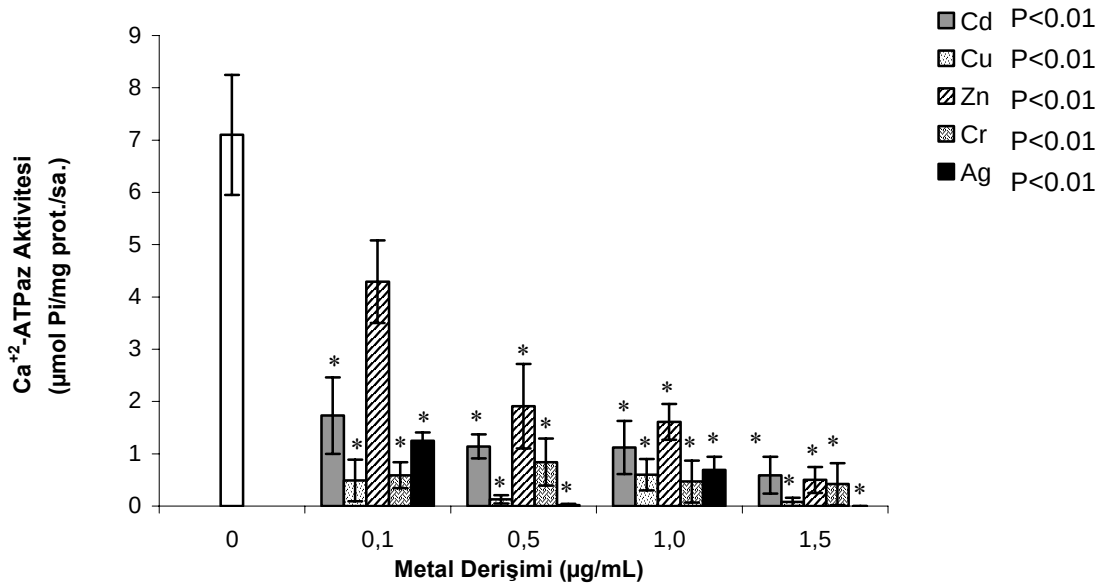
Şekil 4.10. b. Metallerin farklı derişimlerinin *in vitro* etkileri sonunda *O. niloticus*'un böbrek dokusunda Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi.



Şekil 4.11. a. Metallerin farklı derişimlerinin *in vitro* etkileri sonunda *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Toplam-ATPaz aktivitesi.



Şekil 4.11. b. Metallerin farklı derişimlerinin *in vitro* etkileri sonunda *O. niloticus*'un böbrek dokusunda Toplam-ATPaz aktivitesi.



Şekil 4.12. Metallerin farklı derişimlerinin *in vitro* etkileri sonunda *O. niloticus*'un kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi.

4.1.3. Kronik Uygulama

4.1.3.1. *İn vivo* ATPaz Aktivitesi

Cd^{+2}, Cu^{+2}, Zn^{+2}, Cr^{+6} ve Ag^{+}'nın 0,05 µg/mL derişimlerinin 5, 10, 20 ve 30 gün süreyle etkisinde kalan *O. niloticus*'un solungaç, böbrek dokularında Na^{+}/K^{+}-ATPaz, Mg^{+2}-ATPaz, Toplam-ATPaz ve Ca^{+2}-ATPaz ile kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ölçüldü. Deney süresi boyunca Ag^{+} etkisinde kalan balıklarda ölüm gözlendiğinden kronik Ag^{+} etkisi 16. günde sonlandırıldığı için Ag^{+} sonuçları kontrol, 5, 10 ve 16. gün ile sınırlıdır. Buna göre kontrol grubu solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi 3,93±0,93 µmol Pi/mg prot. sa., Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi 17,9±0,57 µmol Pi/mg prot./sa., Toplam-ATPaz aktivitesi 22,1±0,58 µmol Pi/mg prot./sa. ve Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi 2,75±0,17 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçüldü (Şekil 4.13.-4.16. a.). Böbrek dokusunda ise kontrol grubu balıklarda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi 3,99±0,29 µmol Pi/mg prot./sa., Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi 10,6±0,59 µmol Pi/mg prot./sa., Toplam-ATPaz aktivitesi 15,4±0,67 µmol Pi/mg prot./sa. ve Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi 2,23±0,18 µmol Pi/mg prot./sa. düzeyinde belirlendi (Şekil 4.13.-4.16. b.). Kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ise 5,27±0,51 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçüldü (Şekil 4.16. c.).

Kronik metal etkilerinde ölçülen ATPaz aktivitelerinin % değerleri EK-6'da ayrıca verilmiştir.

4.1.3.1.(1). Kadmiyum

O. niloticus'un solungaç dokusunda, 0,05 µg Cd^{+2}/mL'nin 5, 10, 20 ve 30 günlük etkileri sonunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin önemli düzeyde azalış gösterdiği belirlendi ($P<0,001$). Etki süresi boyunca enzim aktivitesi % 63 ile % 88 oranlarında azalış gösterirken, en düşük düzeyde 30. gün sonunda gözlendi (0,46±0,04 µmol Pi/mg prot./sa.) (Şekil 4.13. a.). Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise kısa süreli etkilerde % 17 düzeyinde azalırken (14,8±0,43 µmol Pi/mg prot./sa.), artan sürelerde artış gösterdiği ve 30. gün sonunda % 41 düzeyinde arttığı kaydedildi

(25,2±1,11 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.14. a.). Toplam-ATPaz aktivitesinin, Cd^{+2}'nin 5, 10 ve 20 günlük etki sürelerinde % 15 ile % 32 oranlarında azaldığı ve 5. günde en düşük düzeyde olduğu kaydedildi (15,0±0,61 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.15. a.). Buna karşın 30. gün sonunda % 18 ile artış ile en yüksek düzeyde ölçüldü (26,1±1,11 µmol Pi/mg prot./sa.). Benzer şekilde Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin de ilk 20 günlük etki sonrasında % 47 ile % 67 oranlarında azalarak en düşük düzeyini 5. günün sonunda gösterdiği belirlendi (0,90±0,17 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.16. a.). Bunun birlikte 30. günün sonunda 4,06±0,53 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçülen enzim aktivitesinin % 48 artış gösterdiği gözlendi.

Böbrek dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz, Cd^{+2}'nin tüm etki sürelerinde % 42 ile % 71 oranlarında azalırken en düşük aktivitesi 20. gün sonunda 1,16±0,44 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçüldü (P<0,001) (Şekil 4.13. b.). Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin, metalin denenen tüm etki sürelerinde % 35 ile % 101 oranlarında artış gösterdiği (P<0,001) ve en yüksek aktivitesini % 101 artış ile 10. gün sonunda gösterdiği belirlendi (21,4±2,21 µmol Pi/mg prot./sa.) (Şekil 4.14. b.). Toplam-ATPaz, 10-30 günlük etki sonrasında % 25 ile % 52 oranlarında artarken (P<0,001), en yüksek aktiviteyi 20 günlük Cd^{+2} etkisi sonrasında gösterdi (23,4±1,81 µmol Pi/mg prot./sa.) (Şekil 4.15. b.). Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ise bu dokuda tüm süreler için % 75 ile % 100 oranlarında azalış gösterirken (P<0,001), en düşük düzeyde 5. gün sonunda ölçüldü (Şekil 4.16. b.).

Kas dokusunda ise Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin Cd^{+2} etkisinde 5. günden başlayarak 20. güne kadar % 49 ile % 84 oranlarında giderek azalış gösterdiği (P<0,001) ve en düşük aktivite düzeyinin 20. gün sonunda ölçüldüğü kaydedildi (0,84±0,17 µmol Pi/mg prot./sa.) (Şekil 4.16. c.).

4.1.3.1.(2). Bakır

Solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi etki süreleri sonunda % 52 ile % 89 oranlarında azaldı (P<0,001) (Şekil 4.13. a.). Enzim aktivitesi en düşük düzeyini 20. gün sonunda gösterdi (0,45±0,13 µmol Pi/mg prot./sa.). Mg^{+2}-ATPaz

aktivitesi ise % 17 azalışla en düşük aktivitesini 5. gün sonunda gösterirken (14,8±0,62 µmol Pi/mg prot./sa.), 30. gün sonunda ise % 36 artışla en yüksek aktiviteye ulaştığı gözlendi (24,3±1,26 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.14. a.). Toplam-ATPaz aktivitesi 5, 10 ve 20 günlük Cu^{+2} etkisinde % 15 ile % 27 oranlarında azalarak en düşük aktivitesini 5. günün sonunda gösterdi (16,2±0,88 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.15. a.). Buna karşılık % 12 artışla en yüksek aktiviteye 30. günün sonunda ulaştığı kaydedildi (24,8±0,79 µmol Pi/mg prot./sa.). Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin ise % 12 ile % 66 oranlarında azalış gösterdiği ve en düşük düzeyde 10. gün sonunda gözlendiği belirlendi (0,94±0,15 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,01) (Şekil 4.16. a.).

Böbrek dokusunda Cu^{+2}, Na^{+}/K^{+}-ATPaz akivitesini uygulanan her süre için % 61 ile % 75 oranlarında azaltırken (P<0,001), en düşük enzim aktivitesi 20 günlük etki sonrasında gözlendi (1,0±0,16 µmol Pi/mg prot./sa.) (Şekil 4.13. b.). Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin ise tüm etki sürelerinde % 30 ile % 67 oranlarında artış gösterdiği ve en yüksek düzeyde 20. gün sonunda gözlendiği belirlendi (17,7±1,2 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.14. b.). Toplam-ATPaz aktivitesinin sadece Cu^{+2}'nin 20 günlük etki sonrası değiştiği ve % 24 artışla en yüksek düzeye ulaştığı kaydedildi (19,1±1,37 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,01) (Şekil 4.15. b.). Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin ise % 45 ile % 100 oranlarında azalış gösterdiği ve 5 günlük etki sonrası % 100 inhibe olduğu belirlendi (P<0,001) (Şekil 4.16. b.).

Kas dokusunda ise Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin, % 39 ile % 85 oranlarında azalarak en düşük düzeyinin 20. gün sonunda ölçüldüğü kaydedildi (0,77±0,09 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.16. c.).

4.1.3.1.(3). Çinko

Solungaç dokusunda Zn^{+2} etkisinde tüm süreler için Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi azalış göstermektedir (P<0,001) (Şekil 4.13. a.). Etki süresi boyunca % 54 ile % 97 oranlarında azalırken, en düşük aktivite 20. gün sonunda gözlendi (0,12±0,08 µmol Pi/mg prot./sa.). Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi % 4 ve % 24 oranında azalırken, en düşük aktivite 13,7±0,74 µmol Pi/mg prot./sa. olarak 10. gün sonunda belirlendi (P<0,01)

(Şekil 4.14. a.). Toplam-ATPaz aktivitesi % 10 ile % 39 oranında azalarak, en düşük aktiviteyi (13,6±0,84 µmol Pi/mg prot./sa.) 20. gün sonunda gösterdi (P<0,001) (Şekil 4.15. a.). Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ise 5. gün sonunda % 84 düzeyinde artışla en yüksek düzeyde gözlenirken (5,07±0,41 µmol Pi/mg prot./sa.), diğer üç etki süresinde yaklaşık olarak % 47 oranında azaldı ve en düşük düzeyde en uzun etki süresinde ölçüldü (1,44±0,07 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.16. a.).

Böbrek dokusunda Zn^{+2} etkisi, Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi üzerinde % 21 ile % 61 oranlarında olmak üzere azalış yönünde gözlenirken, en düşük aktivite 30. gün sonunda ölçüldü (1,57±0,19 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.13. b.). Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin % 3 ile % 32 oranında artış gösterdiği ve en yüksek enzim aktivitesinin 10. gün sonunda gözlendiği kaydedilmiştir (14,0±1,23 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,01) (Şekil 4.14. b.). Buna karşılık en düşük enzim aktivitesi % 22 azalışla 30. gün sonunda ölçüldü (8,28±0,39 µmol Pi/mg prot./sa.). Toplam-ATPaz aktivitesi ise % 2 ile % 34 düzeyinde azalarak, en düşük aktivitesi 30. gün sonunda belirlendi (10,1±0,50 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,01) (Şekil 4.15. b.). Bununla birlikte Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin de etki sürelerine bağlı olarak % 33 ile % 81 oranlarında giderek azaldığı kaydedildi (P<0,001) (Şekil 4.16. b.). En düşük enzim aktivitesi 30. gün sonunda ölçüldü (0,43±0,05 µmol Pi/mg prot./sa.).

Kas dokusunda ise Zn^{+2}, % 37 ile % 83 oranlarında Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinde azalışa neden olurken, en düşük aktivite 10. gün sonunda gözlendi (0,90±0,11 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.16. c.).

4.1.3.1.(4). Krom

Solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi Cr^{+6}'nın uzun süreli etkilerinde % 55 ile % 88 oranlarında azalarak, en düşük düzeyde 20. gün sonunda gözlendi (0,48±0,09 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.13. a.). Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin % 5 ile % 21 oranlarında azaldığı ve en düşük düzeyde 20. gün sonunda gözlendiği belirlendi (14,1±0,80 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,01) (Şekil 4.14. a.). Toplam-ATPaz aktivitesinin ise uygulanan tüm etki süreleri için %15 ile % 94 oranlarında azaldığı kaydedildi (P<0,001) (Şekil 4.15. a.). En düşük enzim aktivitesi ise 10 günlük etki

sonrasında gözlendi (1,25±0,65 µmol Pi/mg prot./sa.). Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi de tüm süreler için % 46 ile % 69 oranlarında azalırken (P<0,001), en düşük düzeyini 20. gün sonunda gösterdi (0,86±0,17 µmol Pi/mg prot./sa.) (Şekil 4.16. a.).

Böbrek dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin % 58 ve % 61 oranlarında azaldığı ve en düşük düzeyde 30. gün sonunda gözlendiği belirlendi (1,56±0,17 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.13. b.). Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin başlangıç sürelerinde % 73 ve % 29 oranlarında artış, daha sonraki sürelerde % 15 ve % 34 azalış gösterdiği gözlendi. En yüksek enzim aktivitesinin 5. gün sonunda ölçüldüğü belirlendi (18,3±1,38 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.14. b.). Toplam-ATPaz aktivitesinin, başlangıçta % 4 ve % 31 (20,2±1,33 µmol Pi/mg prot./sa.) arttığı, 20. ve 30. günlerin sonunda ise % 33 ve % 44 düzeyinde azaldığı ve en düşük düzeyinin en uzun etki süresi sonunda ölçüldüğü belirlendi (8,55±0,28 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.15. b.). Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ise uygulanan etki sürelerinin uzunluğuna bağlı olarak % 53 ile % 83 oranlarında azalırken (P<0,001), en düşük düzeyde 0,38±0,07 µmol Pi/mg prot./sa. değeri ile 30. gün sonunda gözlendi (Şekil 4.16. b.).

Kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi, % 9 ile % 88 oranında azalarak (P<0,001), en düşük düzeyde 20. gün sonunda ölçüldü (0,64±0,11 µmol Pi/mg prot./sa.) (Şekil 4.16. c.).

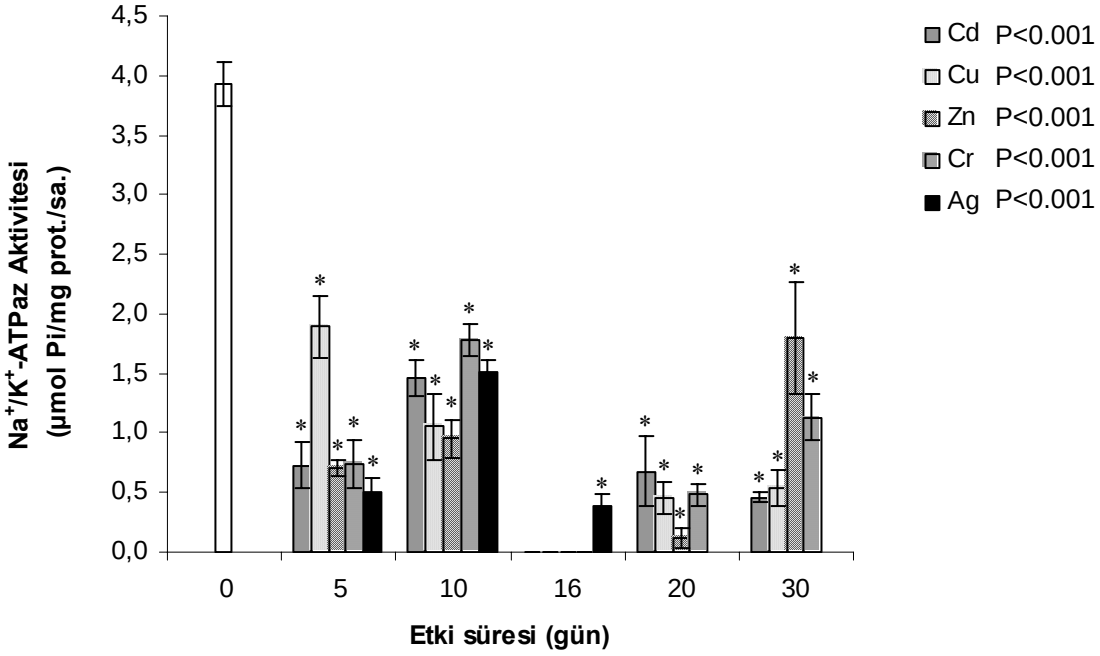
4.1.3.1.(5). Gümüş

Solungaç dokusunda Ag^{+} etkisinde Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin % 62 ile % 90 oranlarında azaldığı (P<0,001) ve en düşük düzeyinin 0,39±0,10 µmol Pi/mg prot./sa. ile 16. gün sonunda gözlendiği belirlendi (Şekil 4.13. a.). Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin 5. ve 10. gün sonunda % 1 ile % 14 arttığı ve en yüksek düzeyde 10. gün sonunda ölçüldüğü belirtildi (20,5±0,63 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.14. a.). Buna karşın, en düşük düzeyi % 63 azalışla 16. gün sonunda gözlendi (6,55±0,27 µmol Pi/mg prot./sa.). Toplam-ATPaz aktivitesi ise sadece 16. günde değişiklik göstererek % 70 azalışla en düşük düzeyde ölçüldü (6,73±0,22 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,001) (Şekil 4.15. a.). Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi etki süresine bağlı

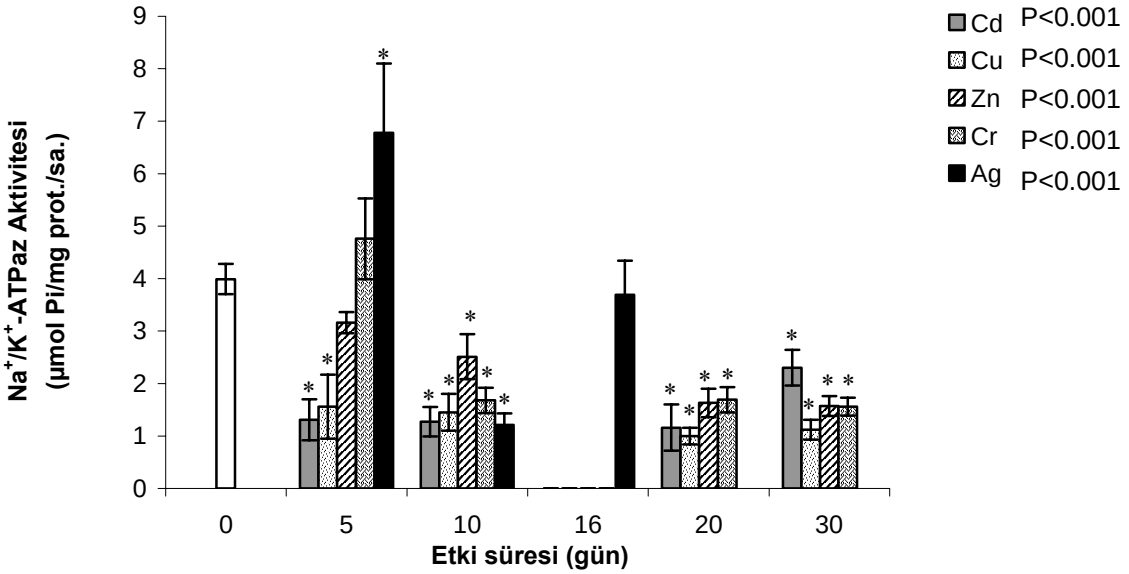
olarak % 37 ile % 88 oranlarında azalırken (P<0,001), en düşük düzeyi ise 16. gün sonunda 0,33±0,10 µmol Pi/mg prot./sa. olarak belirlendi (Şekil 4.16. a.).

Böbrek dokusunda Ag^{+} etkisini Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesini 5. günde % 70 (6,78±1,32 µmol Pi/mg prot./sa.) artırarak buna karşın, diğer sürelerde ise % 8 ile % 70 oranında azaltarak gösterdi (P<0,001) (Şekil 4.13. b.). En düşük enzim aktivitesi en uzun etki süresinde belirlendi (1,21±0,22 µmol Pi/mg prot./sa.). Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin ise % 23 ile % 38 oranlarındaki artış gösterdiği ve en yüksek düzeye 5 günlük etki sonrası ulaştığı kaydedildi (14,7±1,11 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,05) (Şekil 4.14. b.). Toplam-ATPaz aktivitesi % 6 ve % 49 oranında artarak 22,9±2,92 µmol Pi/mg prot./sa. ile en yüksek aktiviteyi 10. gün sonunda gösterdi (P<0,01) (Şekil 4.15. b.). Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin uygulanan tüm etki süreleri için % 37 ile % 74 oranlarında azalış gösterdiği (P<0,001) ve en düşük enzim aktivitesinin 16. günde 0,58±0,2 µmol Pi/mg prot./sa. olarak belirlendiği belirtildi (Şekil 4.16. b.).

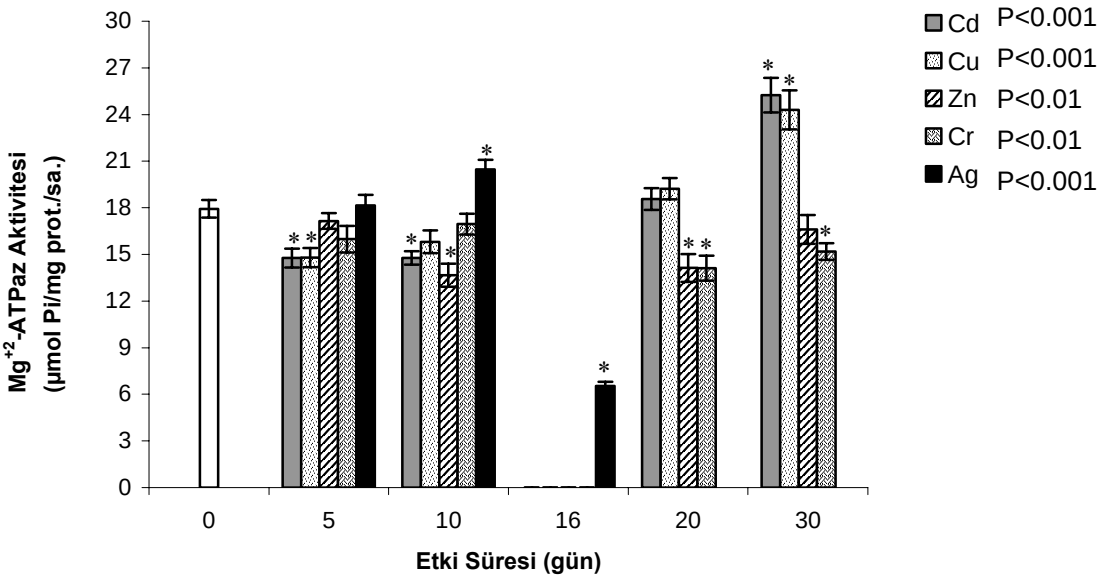
Kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin, solungaç ve böbrek dokusunda olduğu gibi, Ag^{+}'nın etki süresi arttıkça düşüş gösterdiği kaydedildi (P<0,001). Buna göre Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi % 56 ile % 87 azalışla 16. gün sonunda 0,70±0,09 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçüldü (Şekil 4.16. c.).



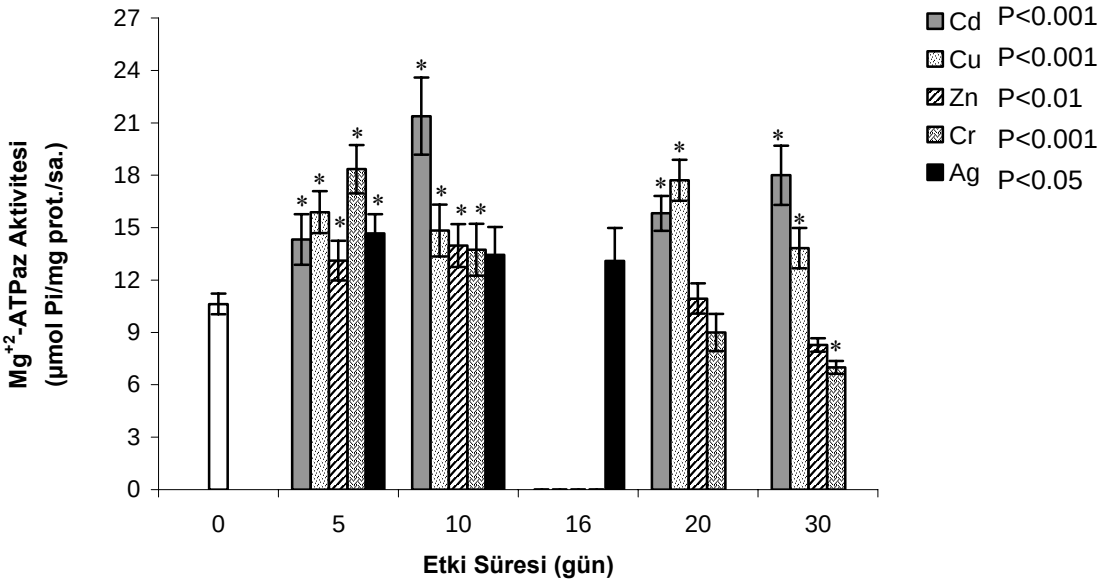
Şekil 4.13 a. 0,05 µg/mL metal etkisinde farklı sürelerde *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi.



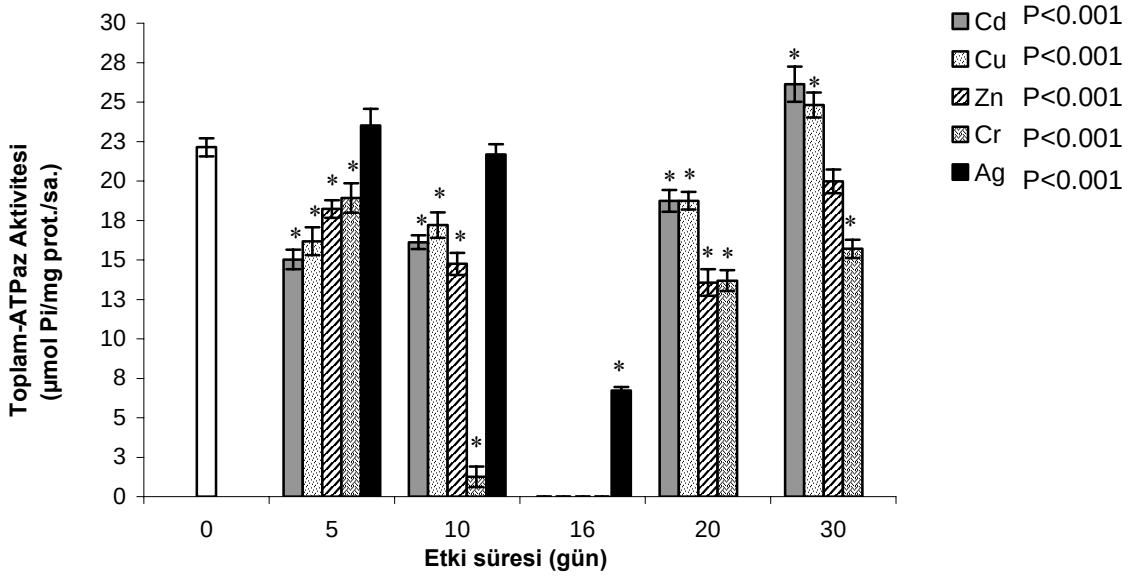
Şekil 4.13. b. 0,05 µg/mL metal etkisinde farklı sürelerde *O. niloticus*'un böbrek dokusunda Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi.



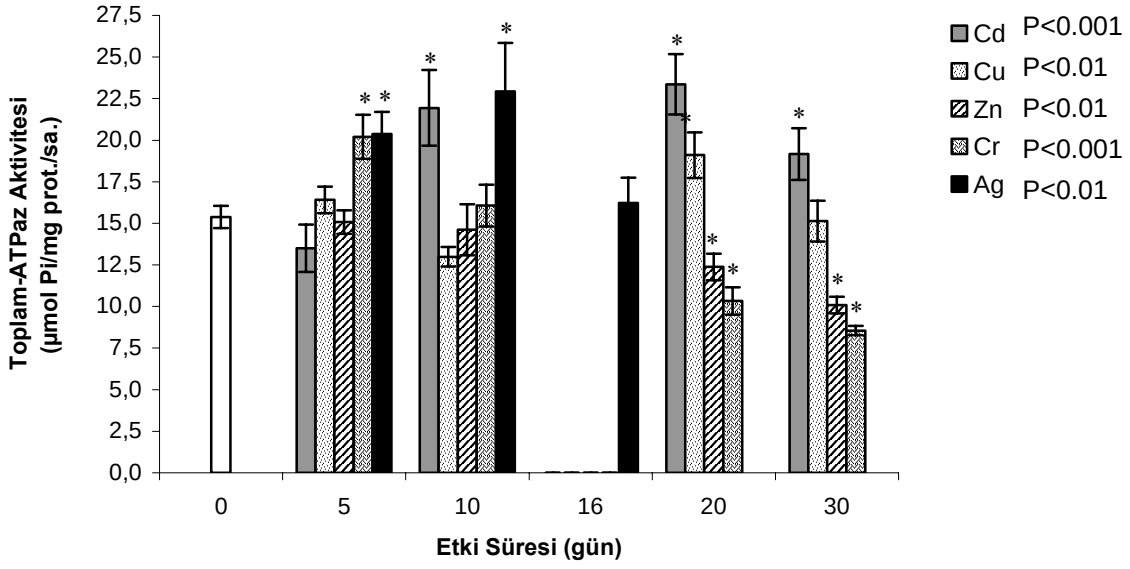
Şekil 4.14. a. 0,05 µg/mL metal etkisinde farklı sürelerde *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi.



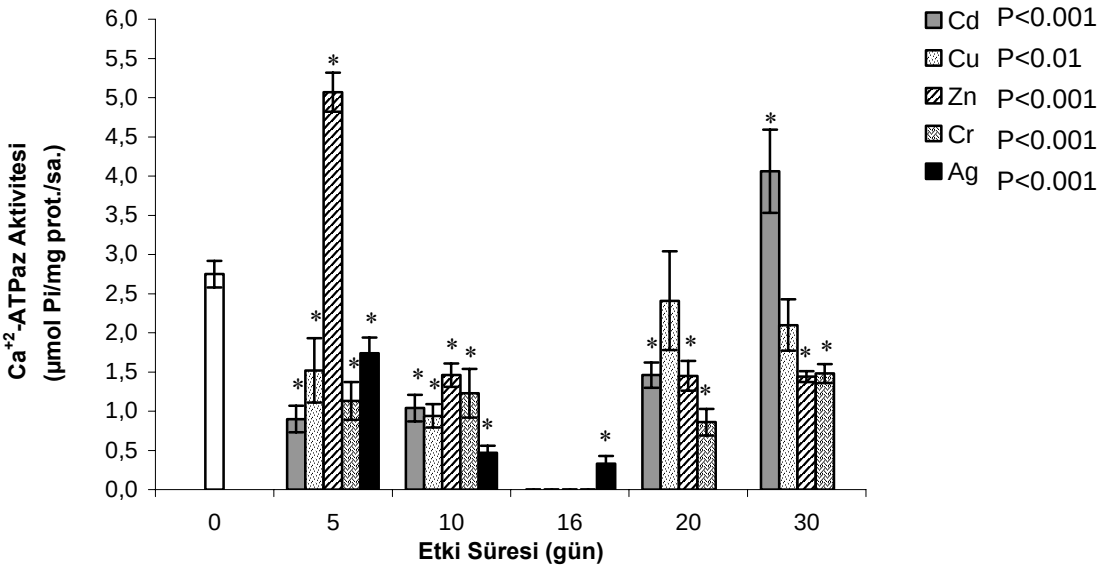
Şekil 4.14. b. 0,05 µg/mL metal etkisinde farklı sürelerde *O. niloticus*'un böbrek dokusunda Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi.



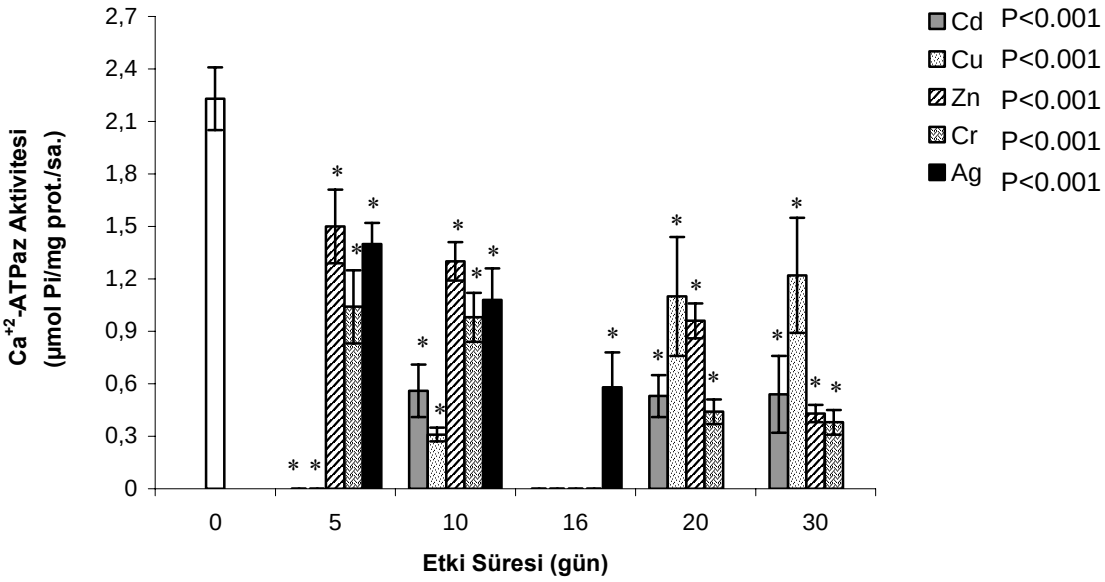
Şekil 4.15. a. 0,05 µg/mL metal etkisinde farklı sürelerde *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Toplam-ATPaz aktivitesi.



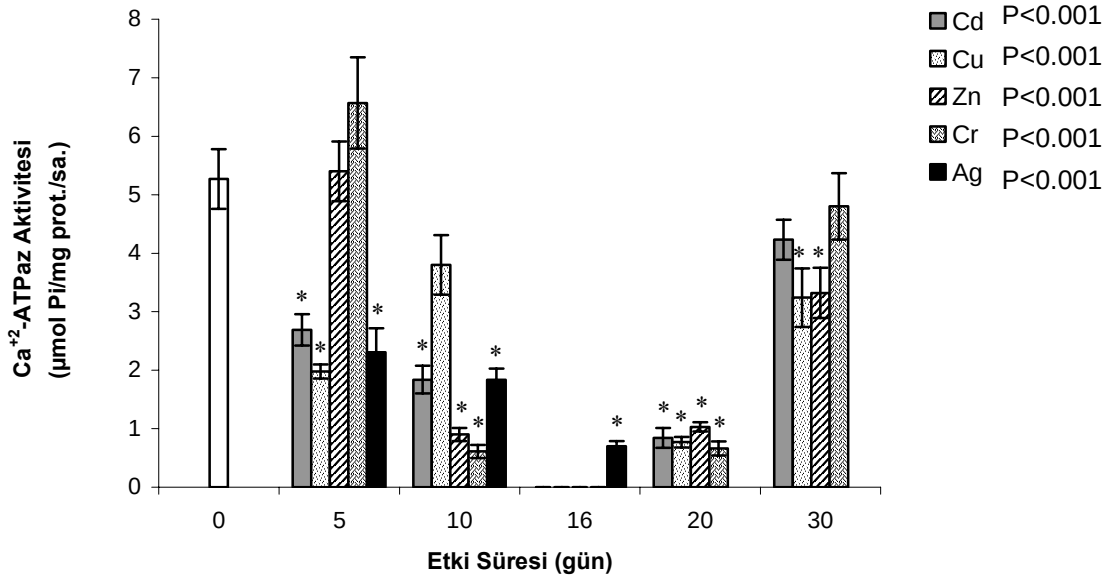
Şekil 4.15. b. 0,05 µg/mL metal etkisinde farklı sürelerde *O. niloticus*'un böbrek dokusunda Toplam-ATPaz aktivitesi.



Şekil 4.16. a. 0,05 µg/mL metal etkisinde farklı sürelerde *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi.



Şekil 4.16. b. 0,05 µg/mL metal etkisinde farklı sürelerde *O. niloticus*'un böbrek dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi.



Şekil 4.16. c. 0,05 µg/mL metal etkisinde farklı sürelerde *O. niloticus*'un kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi.

4.1.3.2. Toplam Protein Düzeyi

Cd^{+2}, Cu^{+2}, Zn^{+2}, Cr^{+6} ve Ag^{+}'nın 0,05 µg/mL derişimlerinin 0, 5, 10, 20 ve 30 gün süre ile etkisinde bırakılan *O. niloticus* dokularında toplam protein düzeyleri ölçüldü. Analiz sonuçlarına göre kontrol grubu solungaç, böbrek ve kas dokusu toplam protein düzeyleri sırasıyla 27,6±0,7, 42,3±1,4 ve 25,1±0,6 mg prot./g y.a. olarak ölçüldü (Şekil 4.17. a-c.).

Kronik metal etkilerinde ölçülen toplam protein düzeyleri % değerleri EK-2'de ayrıca verilmiştir.

4.1.3.2.(1). Kadmiyum

Solungaç dokusu toplam protein düzeyi Cd^{+2}'nin kısa süreli etkisinde artış gösterirken uzun süreli etkide azalış gösterdi ($P<0,001$) (Şekil 4.17. a.). Buna göre 5 ve 10 günlük etkilerde % 14 ve % 16 oranlarında artarak en yüksek düzeyi 10. günde

gözlendi (32,1±1,2 mg prot./g y.a.). Buna karşılık en düşük düzeyi % 17 ile 30. gün sonunda ölçüldü (22,8±0,6 mg prot./g y.a.).

Böbrek dokusunda ise % 10 ile % 25 azalış gösterdiği ve en düşük düzeyde 30. gün sonunda ölçüldüğü kaydedildi (31,7±0,7 mg prot./g y.a.) (P<0,01) (Şekil 4.17. b.).

Kas toplam protein düzeyi 5 günlük etki sonrasında % 20 artışla en yüksek düzeyde ölçülürken (30,0±0,7 mg prot./g y.a.), 30. günde ise % 19 azalışla en düşük düzeyde gözlendi (20,4±0,6 mg prot./g y.a.) (P<0,001) (Şekil 4.17. c.).

4.1.3.2.(2). Bakır

Solungaç dokusu toplam protein düzeyi Cu^{+2}'nin 5 ve 10 günlük etkilerinde % 21 ve % 17 ile artarak, en yüksek düzeyde 5. günde ölçüldü (33,3±0,5 mg prot./g y.a.) (Şekil 4.17. a.). Buna karşılık en düşük düzeyde % 15 azalışla 30. günün sonunda gözlendi (23,5±0,7) (P<0,001).

Böbrek dokusu toplam protein düzeyi 5 günlük etki sonrası % 19 ile en yüksek artışı (50,2±3,1 mg prot./g y.a.) gösterirken, en düşük düzeyi % 23 azalışla 30 günlük etki sonrası ölçüldü (32,7±1,6) (P<0,001) (Şekil 4.17. b.).

Kas dokusunda ise 5 ve 10 günlük etkilerde % 22 ve % 12 artış gözlendi ve en yüksek düzey 5. günde belirlendi (30,5±1,3 mg prot./g y.a.). En düşük düzey ise % 20 artışla 30. gün sonunda gözlendi (20,1±0,5 mg prot./g y.a.) (P<0,001) (Şekil 4.17. c.).

4.1.3.2.(3). Çinko

Solungaç toplam protein düzeyi % 1 ile % 16 oranlarında artış göstererek, en yüksek düzeye 20 günlük etki sonunda ulaştı (31,9±0,3 mg prot./g y.a.) (P<0,05) (Şekil 4.17. a.).

Böbrek toplam protein düzeyi ise % 4 ile % 13 artış veya azalış oranlarına karşın, herhangi bir istatistiksel fark göstermemiştir (P>0,05) (Şekil 4.17. b.).

Kas toplam protein düzeyinin ise % 4 ile % 18 artış gösterdiği ve en yüksek düzeyde 20. günün sonunda ölçüldüğü kaydedildi (29,5±0,8 mg prot./g y.a.) ($P<0,05$) (Şekil 4.17. c.).

4.1.3.2.(4). Krom

Solungaç toplam protein düzeyi Cr^{+6} etkisinde % 3 ile % 16 oranlarında artış gösterdi ve en yüksek düzeyde 20 günlük etki sonunda gözlendi (31,9±1,5 mg prot./g y.a.) ($P<0,05$) (Şekil 4.17. a.).

Böbrek toplam protein düzeyi başlangıçta % 3 ile % 12 oranlarında azalış göstermiş, en yüksek düzeyde % 14'lük artışla 30. gün sonunda ölçüldü (48,1±0,9 mg prot./g y.a.) ($P<0,05$) (Şekil 4.17. b.).

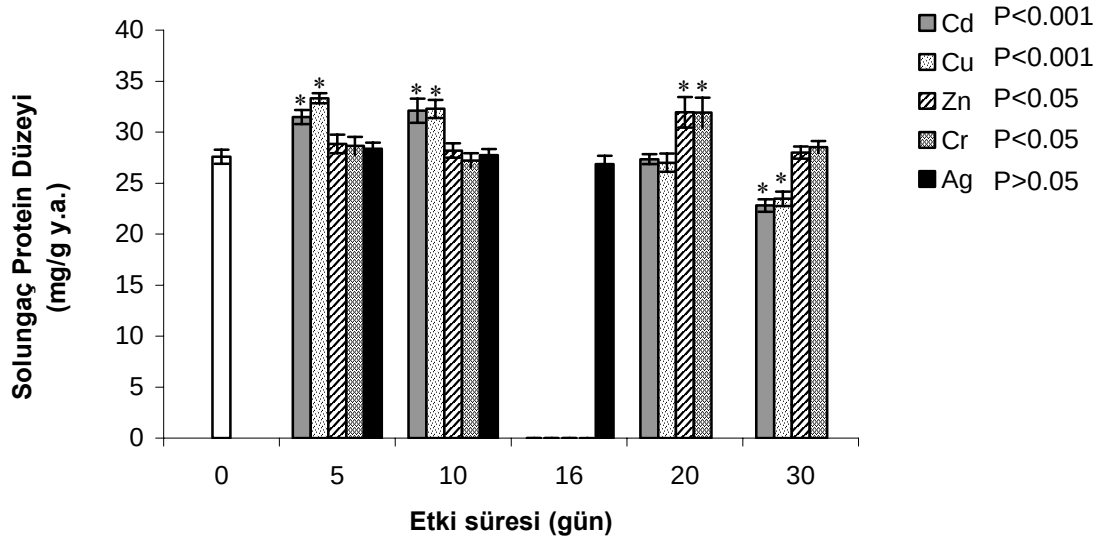
Kas dokusunda ise toplam protein düzeyi % 8 ile % 16 artış göstermiş ve en yüksek düzeyi 20 günlük etki sonrası 29,0±1,0 mg prot./g y.a. olarak ölçüldü ($P<0,01$) (Şekil 4.17. c.).

4.1.3.2.(5). Gümüş

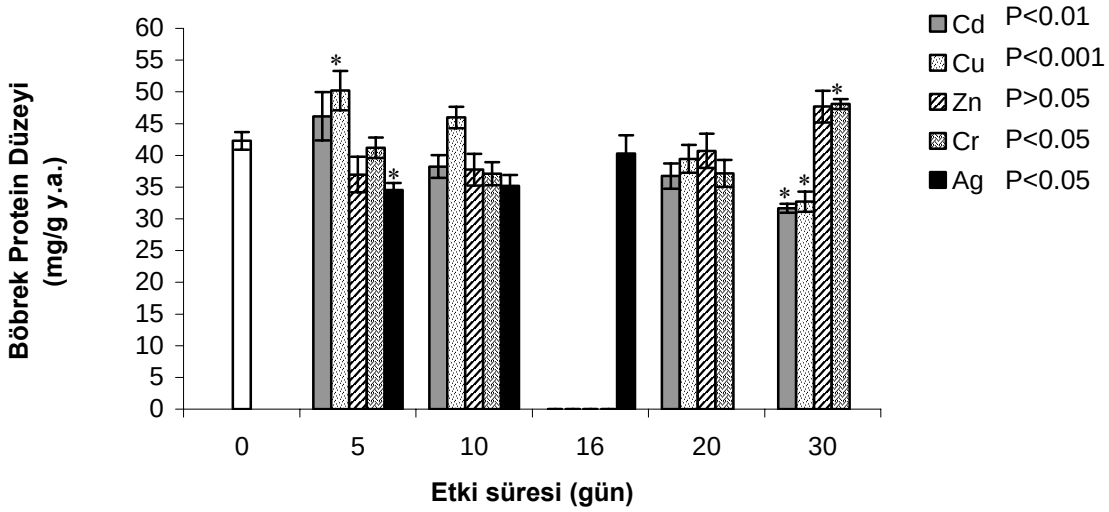
Solungaç toplam protein düzeyi Ag^{+} etkisinde % 1 ile % 3 artış veya azalış oranlarına karşın, herhangi bir istatistiksel ayırım göstermemiştir ($P>0,05$) (Şekil 4.17. a.).

Böbrek dokusunda toplam protein düzeyi ise % 5 ile % 18 oranlarında azalış gösterdi ve en düşük düzeyi 5 günlük etki sonunda 34,5±1,1 mg prot./g y.a. olarak ölçüldü ($P<0,05$) (Şekil 4.17. b.).

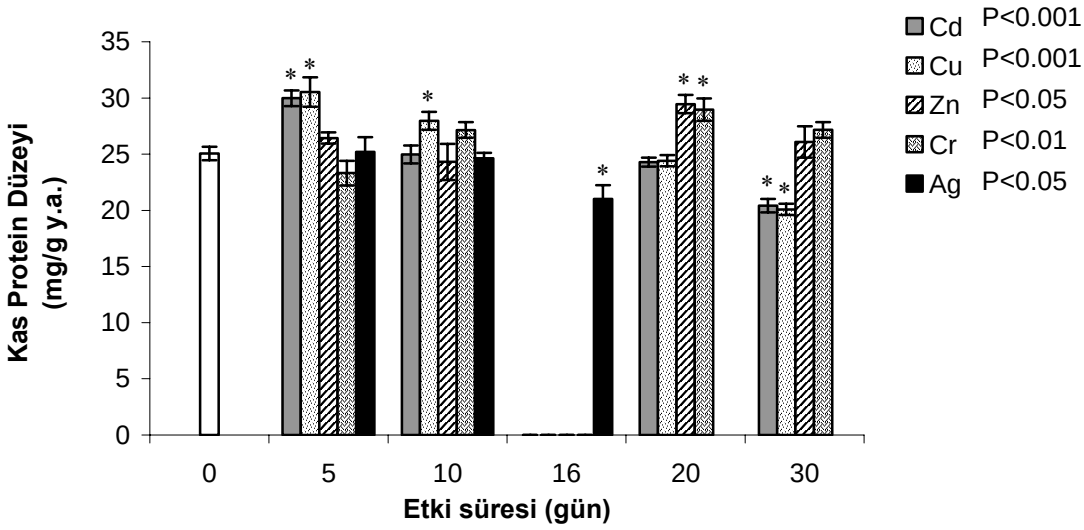
Kas dokusunda ise 5 ve 10 günlük Ag^{+} etkisi sonrasında toplam protein düzeyi değişmezken, 16. günün sonunda ise % 16 azalış gösterdi (21,0±1,2 mg prot./ g y.a.) ($P<0,05$) (Şekil 4.17. c.).



Şekil 4.17. a. 0,05 µg/mL metal etkisinde farklı sürelerde *O. niloticus*'un solungaç dokusunda toplam protein düzeyi.



Şekil 4.17. b. 0,05 µg/mL metal etkisinde farklı sürelerde *O. niloticus*'un böbrek dokusunda toplam protein düzeyi.



Şekil 4.17 c. 0,05 µg/mL metal etkisinde farklı sürelerde *O. niloticus*'un kas dokusunda toplam protein düzeyi.

4.1.3.3. Toplam Metal Düzeyi

4.1.3.3.(1). Kadmiyum

Solungaç dokusunda 0,05 µg/mL Cd^{+2} etkisinde toplam metal düzeyinin, etki süresinin uzunluğu ile orantılı olarak artış gösterdiği kaydedildi (P<0,001) (Çizelge 4.6.). Buna göre kontrol grubunda toplam Cd^{+2} düzeyi 1,26±0,12 µg/g k.a. olarak ölçülürken, 5 ile 30 günlük süreler arasında 8,59±3,24 ile 21,8±5,16 µg/g k.a. arasında ölçülen Cd^{+2}, en yüksek düzeyde 30. gün sonunda gözlendi.

Böbrek dokusunda kontrol grubu ile Cd^{+2}'nin 5 ve 10 günlük etkisinde kalan gruplarda Cd^{+2} düzeyinin belirlenemediği (D.L.<0,001) buna karşın, 20. günde 2,25±2,25 µg/g k.a. olarak belirlenen Cd^{+2} birikiminin kontrole göre istatistiksel olarak farklılık göstermediği belirlendi (Çizelge 4.6.). En yüksek Cd^{+2} düzeyinin gözlendiği 30. günün sonunda ise Cd^{+2} birikimi 14,3±2,74 µg/g k.a. olarak ölçüldü (P<0,001).

Kas dokusunda da benzer şekilde kontrol balıklarında Cd^{+2} düzeyi saptama sınırının altında belirlenirken (D.L.<0.001), tüm etki süreleri için 3,57±0,33 ile

5,14±0,69 µg/g k.a. değerleri arasında ölçülen Cd^{+2}'nin en yüksek düzeyi en uzun etki süresinde gözlendi (P<0,001) (Çizelge 4.6.).

4.1.3.3.(2). Bakır

Solungaç dokusunda 0,05 µg Cu^{+2}/mL etkisinde Cu^{+2} birikimi kontrole göre (3,35±0,32 µg/g k.a.) önemli bir artış göstermektedir (P<0,001) (Çizelge 4.6.). Buna göre süreye bağlı artış gösteren Cu^{+2} düzeyi 6,57±0,49 ile 10,2±0,47 µg/g k.a. değerleri arasında belirlenirken, en yüksek düzeyde 30. gün sonunda gözlendi.

Böbrek dokusunda Cu^{+2} düzeyi kontrol grubunda saptama sınırlarının altında (D.L.<0,002) belirlenirken, süreye bağlı olarak artış gösteren Cu^{+2} düzeyinin 41,5±9,08 µg/g k.a. ile 60,9±9,4 µg/g k.a. arasında ölçüldüğü ve en yüksek düzeyde 30. gün sonunda gözlendiği belirlendi (P<0,001) (Çizelge 4.6.).

Kas dokusunda ise böbrek dokusundakine benzer şekilde kontrol balıklarında Cu^{+2} düzeyi belirlenemezken (D.L.<0,002), tüm etki süreleri için Cu^{+2} birikimi gözlendi (P<0,001) (Çizelge 4.6.). Buna göre 1,98±1,16 ile 5,16±0,83 µg/g k.a. değerleri arasında gözlenen Cu^{+2} düzeyinin en yüksek artışı 10 günlük etki sonrasında gösterdiği belirlendi.

4.1.3.3.(3). Çinko

Solungaç dokusunda 0,05 µg Zn^{+2}/mL etkisinde kontrol ile karşılaştırıldığında (69,2±1,7 µg/g k.a.), 77,7±0,94 µg/g k.a. ile 89,1±8,23 µg/g k.a. değerleri arasında gözlenen Zn^{+2}'nin en yüksek düzeyi 10. gün sonunda gözlendi (P<0,01) (Çizelge 4.6.).

Böbrek dokusunda ise Zn^{+2} birikimi uygulanan tüm etki süreleri için kontrole göre (157,2±15,5 µg/g k.a.) artış gösterdi (P<0,01) (Çizelge 4.6.). Buna göre 230,9±23,2 µg/g k.a. ile 269,5±25,9 µg/g k.a. aralığında ölçülen Zn^{+2}, en yüksek birikimini 20. gün sonunda gösterdi.

Kas dokusunda, solungaç ve böbrek dokusundan farklı olarak 32,0±1,4 µg/g k.a. ile 35,4±2,05 µg/g k.a. olarak belirlenen Zn^{+2} düzeyleri kontrol ile

karşılaştırıldığında (32,1±0,83 µg/g k.a.) istatistiksel bir ayırım göstermemiştir (P>0,05) (Çizelge 4.6.).

4.1.3.3.(4). Krom

Solungaç, böbrek ve kas dokusunda kontrol ve 0,05 µg Cr^{+6}/mL etkisindeki gruplarda Cr^{+6} düzeyi saptama sınırlarının altında (D.L.<0,003) olduğu için belirlenememiştir (Çizelge 4.6.).

4.1.3.3.(5). Gümüş

Solungaç, böbrek ve kas dokusunda kontrol ve 0,05 µgAg^{+}/mL etkisinde kalan gruplarda tüm süreler için Ag^{+} düzeyleri saptama sınırlarının altında olduğundan (D.L.<0,002) ölçülememiştir (Çizelge 4.6.).

Kronik metal etkilerinde ölçülen toplam metal düzeyleri % değerleri EK-3'de ayrıca verilmiştir.

Çizelge 4.6. Kronik metal etkisinde kalan *O. niloticus* dokularındaki toplam metal düzeyleri (µg/g k.a.). Veriler Aritmetik ortalama±Standart hata olarak verilmiştir (Kontrol grup, N=21; Metal etkisinde kalan grup, N=4; *: İstatistiksel olarak farklı grupları göstermektedir).

Metal	Etki süresi (gün)	Solungaç	Böbrek	Kas
Cd^{+2}	**0**	1,26±0,12	<0,001	<0,001
	5	8,59±3,24*	<0,001	3,57±0,33*
	10	17,1±2,59*	<0,001	4,96±0,81*
	20	20,3±3,11*	2,25±2,25	3,78±0,38*
	30	21,8±5,16*	14,3±2,74*	5,14±0,69*
		P<0,001	P<0,001	P<0,001
Cu^{+2}	**0**	3,35±0,32	<0,002	<0,002
	5	6,57±0,49*	41,5±9,08*	3,71±0,13*
	10	8,45±0,59*	45,8±1,17*	5,16±0,83*
	20	9,60±0,30*	48,6±9,05*	2,14±1,25*
	30	10,2±0,47*	60,9±9,40*	1,98±1,16*
		P<0,001	P<0,001	P<0,001
Zn^{+2}	**0**	69,2±1,74	157,2±15,5	32,1±0,83
	5	78,1±4,08	251,5±8,16*	35,4±2,05
	10	89,1±8,23*	230,9±23,2*	33,5±1,44
	20	77,7±0,94	269,5±25,9*	33,0±1,21
	30	83,1±5,51*	261,9±31,0*	32,0±1,40
		P<0,01	P<0,01	P>0,05
Cr^{+6}	**0**	<0,003	<0,003	<0,003
	5	<0,003	<0,003	<0,003
	10	<0,003	<0,003	<0,003
	20	<0,003	<0,003	<0,003
	30	<0,003	<0,003	<0,003
Ag^{+}	**0**	<0,002	<0,002	<0,002
	5	<0,002	<0,002	<0,002
	10	<0,002	<0,002	<0,002
	20	<0,002	<0,002	<0,002
	30	<0,002	<0,002	<0,002

4.1.3.4. Toplam İyon Düzeyi

4.1.3.4.(1). Sodyum İyon Düzeyi

O. niloticus'un solungaç, böbrek ve kas dokularında kronik metal etkileri sonunda ölçülen Na^+ iyon düzeyi, solungaç dokusunda 7,01±0,31 mg/g k.a., böbrek dokusunda 14,0±0,65 mg/g k.a. ve kas dokusunda 4,18±0,13 mg/g k.a. olarak ölçüldü (Çizelge 4.7.).

Kronik metal etkilerinde ölçülen toplam iyon düzeyleri % değerleri EK-7'de ayrıca verilmiştir.

4.1.3.4.(1).(a). Kadmiyum

Solungaç dokusunda Na^+ iyon düzeyi Cd^{+2}'nin uygulanan tüm etki süreleri için kontrole göre önemli bir azalış gösterdi ($P<0,01$) (Çizelge 4.7.). Elde edilen verilere göre 4,63±0,15 mg/g k.a. ile 5,28±0,30 mg/g k.a. arasında değişen Na^+, en düşük düzeyde 10. gün sonunda gözlendi.

Böbrek dokusunda Na^+ iyon düzeyleri benzer şekilde tüm etki süreleri için kontrol grubu ile karşılaştırıldığında azalış gösterdi ($P<0,001$) (Çizelge 4.7.). Na^+ düzeyi 5,33±0,28 mg/g k.a. ile 6,29±0,30 mg/g k.a. değerleri arasında gözlenirken, en düşük değerde 5. gün sonunda ölçüldü.

Kas dokusunda ise diğer dokularda olduğu gibi tüm süreler sonunda Na^+ kontrole göre azalış gösterirken ($P<0,001$), 2,19±0,15 mg/g k.a. ile 2,63±0,20 mg/g k.a. arasında ölçülen Na^+, en düşük değerde 5. gün sonunda ölçüldü (Çizelge 4.7.).

4.1.3.4.(1).(b). Bakır

Solungaç dokusunda Na^+ düzeyi 4,63±0,11 mg/g k.a. ile 6,05±0,30 mg/ g k.a. değerleri arasında gözlenirken, kısa süreli etkilerde azalarak ($P<0,01$) en düşük düzeyde 5. günün sonunda ölçüldü (Çizelge 4.7.).

Böbrek dokusunda ise 6,13±0,47 mg/g k.a. ile 14,5±0,92 mg/g k.a. değerleri arasında ölçülen Na^+'nın en düşük düzeyi 20. gün sonunda gözlendi ($P<0,001$) (Çizelge 4.7.).

Kas dokusunda ise Na^+ düzeyi tüm etki süreleri için önemli oranda azalırken ($P<0,001$), 2,51±0,32 mg/g k.a. ile 2,87±0,31 mg/g k.a. arasında ölçülen Na^+'nın en düşük düzeyi 10. gün sonunda belirlendi (Çizelge 4.7.).

4.1.3.4.(1).(c). Çinko

Solungaç dokusunda 6,04±0,19 mg/g k.a. ile 7,46±0,76 mg/g k.a. arasında belirlenen Na^+ düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel bir ayırım göstermemiştir ($P>0,05$) (Çizelge 4.7.).

Böbrek dokusunda ise, Na^+ düzeyinin etki sürelerine bağlı olarak hem artış hem de azalış gösterdiği kaydedildi ($P<0,001$) (Çizelge 4.7.). Buna göre 7,24±0,48 mg/g k.a. ile 18,8±0,96 mg/g k.a. arasında ölçülen Na^+ düzeyi en düşük olarak 10. gün sonunda en yüksek olarak da 30. gün sonunda gözlendi.

Kas dokusunda tüm etki sürelerinde azalış gösteren Na^+ düzeyinin 2,86±0,11 mg/g k.a. ile 3,06±0,04 mg/g k.a. arasında ölçüldüğü ve en düşük düzeyin 10 ve 20 günlük etkiler sonunda gözlendiği belirlendi ($P<0,001$) (Çizelge 4.7.).

4.1.3.4.(1).(d). Krom

Solungaç dokusunda Cr^{+6} etkisinin, Na^+ düzeyinde bir değişikliğe neden olmadığı ($P>0,05$) ve Na^+ düzeyinin 5,46±0,21 mg/g k.a. ile 6,54±0,61 mg/g k.a. aralığında ölçüldüğü belirtilmiştir (Çizelge 4.7.).

Böbrek dokusunda tüm etki sürelerinde Na^+ düzeyinin azaldığı ($P<0,001$) ve 6,13±0,45 mg/g k.a. ile 7,74±0,58 mg/g k.a. arasında ölçülerek en düşük düzeyinin 5. günün sonunda gözlendiği kaydedildi (Çizelge 4.7.).

Kas dokusunda ise tüm süreler için Na^+ düzeyinde azalış gözlendi ($P<0,001$). Buna göre 2,43±0,18 mg/g k.a. ile 2,97±0,39 mg/g k.a. arasında ölçülen Na^+ düzeyinin en düşük olduğu etki süresinin 10. gün olduğu kaydedildi (Çizelge 4.7.).

4.1.3.4.(1).(e). Gümüş

Solungaç dokusunda Ag^+ etkisi sonucu 4,50±0,12 mg/g k.a. ile 5,81±0,40 mg/g k.a. aralığında ölçülen Na^+ düzeyi genel olarak azalarak ($P<0,01$) en düşük değerde 5. gün sonunda ölçüldü (Çizelge 4.7.).

Böbrek dokusunda ise Ag^+ tüm süreleri için Na^+ düzeyinde azalışa neden olurken ($P<0,001$), 8,07±0,22 mg/g k.a. ile 9,10±1,31 mg/g k.a. arasında ölçülen Na^+ düzeyi en düşük değerde 10. gün sonunda gözlendi (Çizelge 4.7.).

Kas dokusunda da Na^+ düzeyinin azalış göstererek ($P<0,001$) 2,29±0,11 mg/g k.a. ile 2,76±0,15 mg/g k.a. değerleri arasında ölçüldüğü ve en düşük düzeyini 5. gün sonunda gösterdiği kaydedildi (Çizelge 4.7.).

Çizelge 4.7. Kronik metal etkisinde kalan *O. niloticus* dokularındaki toplam Na^{+} düzeyleri (mg/g k.a.). Veriler Aritmetik ortalama±Standart hata olarak verilmiştir (Kontrol grup, N=21; Metal etkisinde kalan grup, N=4; *: İstatistiksel olarak farklı grupları göstermektedir).

Metal	Etki süresi (gün)	Solungaç	Böbrek	Kas
Cd^{+2}	**0**	7,01±0,31	14,0±0,65	4,18±0,13
	5	4,69±0,12*	5,33±0,28*	2,19±0,15*
	10	4,63±0,15*	6,29±0,30*	2,54±0,14*
	20	5,28±0,30*	5,74±0,12*	2,63±0,20*
	30	5,08±0,23*	5,90±0,39*	2,47±0,30*
		P<0,01	P<0,001	P<0,001
Cu^{+2}	**0**	7,01±0,31	14,0±0,65	4,18±0,13
	5	4,63±0,11*	8,31±1,01*	2,61±0,17*
	10	5,10±0,38*	14,5±0,92	2,51±0,32*
	20	6,05±0,30	6,13±0,47*	2,56±0,22*
	30	5,67±0,20	8,71±0,73*	2,87±0,31*
		P<0,01	P<0,001	P<0,001
Zn^{+2}	**0**	7,01±0,31	14,0±0,65	4,18±0,13
	5	6,04±0,19	7,80±0,19*	2,91±0,23*
	10	7,46±0,76	7,24±0,48*	2,86±0,14*
	20	6,23±0,12	7,96±0,91*	2,86±0,11*
	30	7,16±0,45	18,8±0,96*	3,06±0,04*
		P>0,05	P<0,001	P<0,001
Cr^{+6}	**0**	7,01±0,31	14,0±0,65	4,18±0,13
	5	5,46±0,21	6,13±0,45*	2,92±0,09*
	10	5,56±0,16	6,14±0,29*	2,43±0,18*
	20	6,54±0,61	7,74±0,58*	2,97±0,39*
	30	5,95±0,51	7,16±0,58*	2,69±0,30*
		P>0,05	P<0,001	P<0,001
Ag^{+}	**0**	7,01±0,31	14,0±0,65	4,18±0,13
	5	4,50±0,12*	8,45±0,41*	2,29±0,11*
	10	5,81±0,40	8,07±0,22*	2,76±0,15*
	16	5,27±0,41*	9,10±1,31*	2,60±0,08*
		P<0,01	P<0,001	P<0,001

4.1.3.4.(2). Potasyum İyon Düzeyi

Kontrol gruplarında solungaç dokusunda K^+ iyon düzeyi 4,57±0,14 mg/g k.a., böbrek dokusunda 10,9±0,80 mg/g k.a. ve kas dokusunda ise 8,83±0,55 mg/g k.a. olarak belirlendi (Çizelge 4.8.).

4.1.3.4.(2).(a). Kadmiyum

Solungaç dokusunda K^+ iyon düzeyinin 3,28±0,64 mg/g k.a. ile 4,20±0,23 mg/g k.a. aralığında ölçüldüğü ve başlangıç sürelerinde azalış gösterdiği kaydedildi ($P<0,01$) (Çizelge 4.8.). Buna göre en düşük K^+ düzeyi 5 günlük Cd^{+2} etkisinde gözlendi.

Böbrek dokusunda ise tüm süreler sonunda önemli oranda azalan K^+ düzeyinin ($P<0,01$) 6,50±0,36 mg/g k.a. ile 6,98±0,29 mg/g k.a. değerleri arasında ölçüldüğü ve en düşük düzeyinin en uzun etki süresi sonunda gözlendiği kaydedildi (Çizelge 4.8.).

Kas dokusunda ise farklı olarak K^+ iyon düzeyi kontrol grubu verilerine göre bir farklılık göstermemiş, 8,83±0,55 mg/g k.a. ile 9,60±0,20 mg/g k.a. arasında ölçülmüştür ($P>0,05$) (Çizelge 4.8.).

4.1.3.4.(2).(b). Bakır

Solungaç dokusunda Cu^{+2} etkisinde 3,60±0,09 mg/g k.a. ile 4,18±0,16 mg/g k.a. aralığında ölçülen K^+'nın en düşük düzeyi sadece 5. gün sonunda gözlendi ($P<0,05$) (Çizelge 4.8.).

Böbrek dokusunda 7,46±0,28 mg/g k.a. ile 10,0±0,94 mg/g k.a. değerleri arasında gözlenen K^+ düzeyi, kontrol ile karşılaştırıldığında bir ayırım göstermemiştir ($P>0,05$) (Çizelge 4.8.).

Kas dokusunda da böbrek dokusunda olduğu gibi Cu^{+2} etkisinde K^+ düzeyinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir ($P>0,05$) (Çizelge 4.8.). Bununla

birlikte K^+ iyonu 6,09±0,88 mg/g k.a. ve 9,76±0,14 mg/g k.a. düzeyleri arasında ölçüldü.

4.1.3.4.(2).(c). Çinko

Solungaç dokusunda Zn^{+2} etkisi ile K^+ iyon düzeyi 4,38±0,17 mg/g k.a. ile 5,69±0,52 mg/g k.a. değerleri arasında ölçüldü ve en düşük düzeyde 10. gün sonunda gözlendi ($P<0,05$) (Çizelge 4.8.).

Böbrek dokusunda K^+ iyon düzeyi 8,42±0,42 mg/g k.a. ile 10,1±0,49 mg/g k.a. değerleri arasında gözlenmiş ve kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı bir ayırım göstermemiştir ($P>0,05$) (Çizelge 4.8.).

Kas dokusunda da böbrek dokusunda olduğu gibi K^+ düzeyi Zn^{+2} etkisiyle bir farklılık göstermemiş ($P>0,05$), uygulanan etkisi süreleri boyunca K^+ iyonu, 9,82±0,32 mg/g k.a. ile 10,5±0,01 mg/g k.a. düzeyleri arasında ölçülmüştür (Çizelge 4.8.).

4.1.3.4.(2).(d). Krom

Solungaç dokusunda Cr^{+6}, 4,06±0,16 mg/g k.a. ile 4,62±0,34 mg/g k.a. düzeyleri arasında gözlenen K^+ iyonu üzerinde herhangi bir etki göstermemiştir ($P>0,05$) (Çizelge 4.8.).

Böbrek dokusunda da K^+ düzeyi 7,80±0,25 mg/g k.a. ile 8,20±0,27 mg/g k.a. düzeyleri arasında ölçülmüş ve kontrole ile karşılaştırıldığında herhangi bir ayırım göstermemiştir ($P>0,05$) (Çizelge 4.8.).

Kas dokusunda da diğer dokulara benzer şekilde K^+ düzeyi kontrole göre anlamlı bir değişiklik göstermemiştir ($P>0,05$) (Çizelge 4.8.). Bununla birlikte 8,57±2,11 mg/g k.a. ile 10,2±0,29 mg/g k.a. değerleri arasında ölçülmüştür.

4.1.3.4.(2).(e). Gümüş

Solungaç dokusunda Ag^+ etkisi ile azalış gösteren K^+ düzeyi ($P<0,01$) 3,46±0,06 mg/g k.a. ile 4,19±0,23 mg/g k.a. olarak ölçülerek en düşük düzeyde 5. gün sonunda gözlendi (Çizelge 4.8.).

Böbrek dokusunda ise Ag^+, 7,79±0,36 mg/g k.a. ile 10,0±1.0 mg/g k.a. değerleri arasında gözlenen K^+ düzeyine herhangi bir etki göstermemiştir ($P>0,05$) (Çizelge 4.8.).

Kas dokusunda da böbrek dokusuna benzer şekilde 7,56±1,15 mg/g k.a. ile 8,92±0,11 mg/g k.a. aralığında ölçülen K^+ iyon düzeyleri kontrol ile karşılaştırıldığında bir ayırım göstermemiştir ($P>0,05$) (Çizelge 4.8.).

Çizelge 4.8. Kronik metal etkisinde kalan *O. niloticus* dokularındaki toplam K^+ düzeyleri (mg/g k.a.). Veriler Aritmetik ortalama±Standart hata olarak verilmiştir (Kontrol grup, N=21; Metal etkisinde kalan grup, N=4; *: İstatistiksel olarak farklı grupları göstermektedir).

Metal	Etki süresi (gün)	Solungaç	Böbrek	Kas
Cd^{+2}	**0**	4,57±0,14	10,9±0,80	8,83±0,55
	5	3,28±0,64*	6,77±0,20*	8,54±0,01
	10	3,64±0,04*	6,98±0,29*	9,07±0,04
	20	4,20±0,23	6,56±0,10*	8,93±0,37
	30	3,83±0,10	6,50±0,36*	9,60±0,20
		P<0,01	P<0,01	P>0,05
Cu^{+2}	**0**	4,57±0,14	10,9±0,80	8,83±0,55
	5	3,60±0,09*	10,0±0,94	6,09±0,88
	10	4,08±0,42	8,73±0,24	9,76±0,14
	20	4,18±0,16	7,46±0,28	7,93±1,49
	30	3,95±0,16	7,78±0,43	9,64±0,17
		P<0,05	P>0,05	P>0,05
Zn^{+2}	**0**	4,57±0,14	10,9±0,80	8,83±0,55
	5	4,38±0,17	8,43±0,42	10,3±0,24
	10	5,69±0,52*	8,61±0,20	10,5±0,01
	20	4,93±0,10	9,32±0,38	9,83±0,17
	30	5,34±0,36	10,1±0,49	9,82±0,32
		P<0,05	P>0,05	P>0,05
Cr^{+6}	**0**	4,57±0,14	10,9±0,80	8,83±0,55
	5	4,06±0,16	8,17±0,61	9,72±0,14
	10	4,07±0,03	7,80±0,25	8,57±2,11
	20	4,62±0,34	8,20±0,27	10,2±1,34
	30	4,26±0,32	7,96±0,33	10,2±0,29
		P>0,05	P>0,05	P>0,05
Ag^+	**0**	4,57±0,14	10,9±0,80	8,83±0,55
	5	3,46±0,06*	7,79±0,36	7,56±1,15
	10	4,19±0,23	7,24±0,15	8,92±0,11
	16	3,83±0,28*	10,0±1,01	8,65±0,24
		P<0,01	P>0,05	P>0,05

4.1.3.4.(3). Magnezyum İyon Düzeyleri

Mg^{+2} iyon düzeyleri kontrol balıklarının solungaç dokusunda 1,13±0,07 mg/g k.a., böbrek dokusunda 1,09±0,05 mg/g k.a. ve kas dokusunda 1,54±0,06 mg/g k.a. olarak ölçüldü (Çizelge 4.9.).

4.1.3.4.(3).(a). Kadmiyum

Solungaç dokusunda Cd^{+2} etkisinde, 0,94±0,08 mg/g k.a. ile 1,13±0,10 mg/g k.a. arasında ölçülen Mg^{+2} düzeyleri, kontrol grubu değerlerine yakın gözlenmiştir (P>0,05) (Çizelge 4.9.).

Böbrek dokusunda da benzer şekilde 0,79±0,06 mg/g k.a. ile 0,89±0,02 mg/g k.a. olarak ölçülen Mg^{+2} düzeyi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında herhangi bir ayırım göstermemiştir (P>0,05) (Çizelge 4.9.).

Kas dokusunda da Cd^{+2}, etki süreleri sonrasında 1,17±0,06 mg/g k.a. ile 1,48±0,06 mg/g k.a. olarak ölçülen Mg^{+2} düzeyi üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır (P>0,05) (Çizelge 4.9.).

4.1.3.4.(3).(b). Bakır

Solungaç dokusunda Cu^{+2}'nin tüm etki süreleri için 0,84±0,11 mg/g k.a. ile 1,12±0,10 mg/g k.a. değerleri arasında gözlenen Mg^{+2} düzeyleri kontrole göre herhangi bir ayırım göstermemiştir (P>0,05) (Çizelge 4.9.).

Böbrek dokusunda ise Mg^{+2} düzeyleri 0,91±0,08 mg/g k.a. ile 2,65±1,19 mg/g k.a. değer aralığında ölçülürken, en yüksek düzeyde 10. gün sonunda gözlendi (P<0,01) (Çizelge 4.9.).

Kas dokusunda ise Mg^{+2} iyonunun 1,32±0,11 mg/g k.a. ile 1,86±0,32 mg/g k.a. değerleri arasında ölçüldüğü ve kontrole göre herhangi bir ayırım göstermediği belirlenmiştir (P>0,05) (Çizelge 4.9.).

4.1.3.4.(3).(c). Çinko

Solungaç dokusunda Mg^{+2} düzeyinin Zn^{+2}'nin uzun süreleri etkilerinde artarak 1,32±0,08 mg/g k.a. ile 1,66±0,01 mg/g k.a. düzeyleri arasında ölçüldüğü ($P<0,05$) ve en yüksek düzeye 30. gün sonunda ulaştığı belirlendi (Çizelge 4.9.).

Böbrek dokusunda ise 1,09±0,11 mg/g k.a. ile 1,45±0,22 mg/g k.a. düzeyleri arasında ölçülen Mg^{+2} iyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında herhangi bir ayırım göstermemiştir ($P>0,05$) (Çizelge 4.9.).

Kas dokusunda da böbrek dokusuna benzer şekilde kontrol grubu ile Zn^{+2} etkisindeki gruplar arasında 1,37±0,11 mg/g k.a. ile 1,97±0,19 mg/g k.a. değerleri arasında ölçülen Mg^{+2} düzeyi açısından bir farklılık gözlenmemiştir ($P>0,05$) (Çizelge 4.9.).

4.1.3.4.(3).(d). Krom

Solungaç dokusunda Mg^{+2} düzeyleri, Cr^{+6} etkisinde 1,04±0,12 mg/g k.a. ile 1,33±0,19 mg/g k.a. değerleri arasında ölçülmüş ve kontrol grubuna göre bir farklılık göstermemiştir ($P>0,05$) (Çizelge 4.9.).

Böbrek dokusunda da Cr^{+6}, Mg^{+2} düzeylerinde uygulanan etki süreleri sonunda herhangi bir değişikliğe neden olmamış ($P>0,05$) ve Mg^{+2} iyonu 0,84±0,11 mg/g k.a. ile 0,98±0,25 mg/g k.a. düzeyleri arasında gözlenmiştir (Çizelge 4.9.).

Kas dokusunda da Mg^{+2} düzeyleri kontrol ile karşılaştırıldığında herhangi bir ayırım göstermemiş ($P>0,05$) ve 1,34±0,06 mg/g k.a. ile 1,83±0,17 mg/g k.a. değerleri arasında ölçülmüştür (Çizelge 4.9.).

4.1.3.4.(3).(e). Gümüş

Solungaç dokusunda Mg^{+2} düzeyinin, Ag^{+}'nın tüm etki sürelerin için kontrole göre bir değişiklik göstermediği ($P>0,05$) ve 1,29±0,10 mg/g k.a. ile 1,52±0,06 mg/g k.a. değer aralığında ölçüldüğü belirlenmiştir (Çizelge 4.9.).

Böbrek dokusunda ise 1,04±0,15 mg/g k.a. ile 2,37±0,22 mg/g k.a. düzeyleri arasında gözlenen Mg^{+2} iyonun arttığı ve en yüksek düzeyde 16. gün sonunda ölçüldüğü belirlendi ($P<0,001$) (Çizelge 4.9.).

Kas dokusunda da en uzun süreli Ag^{+} etkisinde en yüksek düzeyde gözlenen Mg^{+2} iyonu 1,77±0,06 mg/g k.a. ile 2,37±0,17 mg/g k.a. değerleri arasında ölçüldü ($P<0,001$) (Çizelge 4.9.).

Çizelge 4.9. Kronik metal etkisinde kalan *O. niloticus* dokularındaki toplam Mg^{+2} düzeyleri (mg/g k.a.). Veriler Aritmetik ortalama±Standart hata olarak verilmiştir (Kontrol grup, N=21; Metal etkisinde kalan grup, N=4; *: İstatistiksel olarak farklı grupları göstermektedir).

Metal	Etki süresi (gün)	Solungaç	Böbrek	Kas
Cd^{+2}	**0**	1,13±0,07	1,09±0,05	1,54±0,06
	5	1,02±0,08	0,80±0,03	1,34±0,04
	10	1,09±0,09	0,89±0,06	1,30±0,06
	20	0,94±0,08	0,89±0,02	1,17±0,06
	30	1,13±0,10	0,79±0,06	1,48±0,06
		P>0,05	P>0,05	P>0,05
Cu^{+2}	**0**	1,13±0,07	1,09±0,05	1,54±0,06
	5	0,97±0,06	1,33±0,22	1,38±0,07
	10	0,99±0,13	2,65±1,19*	1,86±0,32
	20	1,12±0,10	0,91±0,08	1,32±0,11
	30	0,84±0,11	2,39±0,66*	1,53±0,13
		P>0,05	P<0,01	P>0,05
Zn^{+2}	**0**	1,13±0,07	1,09±0,05	1,54±0,06
	5	1,32±0,08	1,19±0,10	1,93±0,08
	10	1,34±0,21	1,09±0,11	1,37±0,11
	20	1,61±0,11*	1,45±0,22	1,88±0,05
	30	1,66±0,01*	1,26±0,05	1,97±0,19
		P<0,05	P>0,05	P>0,05
Cr^{+6}	**0**	1,13±0,07	1,09±0,05	1,54±0,06
	5	1,16±0,18	0,96±0,17	1,83±0,17
	10	1,33±0,19	0,98±0,25	1,34±0,06
	20	1,11±0,05	0,96±0,18	1,39±0,12
	30	1,04±0,12	0,84±0,11	1,34±0,11
		P>0,05	P>0,05	P>0,05
Ag^{+}	**0**	1,13±0,07	1,09±0,05	1,54±0,06
	5	1,29±0,10	1,04±0,15	1,87±0,24
	10	1,52±0,24	1,45±0,15*	1,77±0,06
	16	1,52±0,06	2,37±0,22*	2,37±0,17*
		P>0,05	P<0,001	P<0,001

4.1.3.4.(4). Kalsiyum İyon Düzeyleri

Kontrol grubu solungaç dokusunda Ca^{+2} düzeyi 42,8±1,54 mg/g k.a, böbrek dokusunda 0,52±0,05 mg/g k.a. ve kas dokusunda 0,39±0,04 mg/g k.a. olarak belirlendi (Çizelge 4.10.).

4.1.3.4.(4).(a). Kadmiyum

Solungaç dokusunda Cd^{+2} etkisinde, 36,5±2,58 mg/g k.a. ile 46,0±2,99 mg/g k.a. değer aralığında ölçülen Ca^{+2} düzeyi kontrol grubuna göre herhangi bir ayırım göstermemiştir ($P>0,05$) (Çizelge 4.10.).

Böbrek dokusunda da Ca^{+2} düzeyi kontrol grubundan farklı bulunmamış ($P>0,05$) ve 0,43±0,02 mg/g k.a. ile 0,58±0,03 mg/g k.a. düzeyleri arasında ölçülmüştür (Çizelge 4.10.).

Kas dokusunda Ca^{+2} düzeyinin önemli oranda artış göstererek ($P<0,001$), 0,44±0,08 mg/g k.a. ile 17,2±2,24 mg/g k.a. değerleri arasında ölçüldüğü ve en yüksek düzeyde 5 günlük Cd^{+2} etkisi sonunda gözlendiği belirlendi (Çizelge 4.10.).

4.1.3.4.(4).(b). Bakır

Solungaç dokusunda Cu^{+2} etkisinde Ca^{+2} düzeyi, 34,5±2,14 mg/g k.a. ile 44,4±1,98 mg/g k.a. değer aralığında ölçülmüş ve kontrole göre bir ayırım göstermemiştir ($P>0,05$) (Çizelge 4.10.).

Böbrek dokusunda ise 0,48±0,09 mg/g k.a. ile 1,53±0,29 mg/g k.a. düzeyleri arasında ölçülen Ca^{+2}, en yüksek düzeyde 10. gün sonunda gözlendi ($P<0,001$) (Çizelge 4.10.).

Kas dokusunda da artış gösteren Ca^{+2} düzeyinin ($P<0,001$), 0,36±0,03 mg/g k.a. ile 14,4±1,31 mg/g k.a. değer aralığında ölçülerek 5. gün sonunda en yüksek düzeye ulaştığı belirlendi (Çizelge 4.10.).

4.1.3.4.(4).(c). Çinko

Solungaç dokusunda Zn^{+2} etkisinde süreye bağlı artış gösteren ($P<0,05$) 41,4±0,95 mg/g k.a. ile 56,7±3,05 mg/g k.a. değerleri arasında ölçülen Ca^{+2}, en yüksek düzeyde 30. gün sonunda gözlendi (Çizelge 4.10.).

Böbrek dokusunda ise Zn^{+2} tüm etki süreleri için 0,37±0,02 mg/g k.a. ile 0,47±0,06 mg/g k.a. aralığında ölçülen Ca^{+2} düzeyinde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır ($P>0,05$) (Çizelge 4.10.).

Kas dokusunda da, Ca^{+2} düzeyinin kontrol ile karşılaştırıldığında herhangi bir ayırım göstermediği ($P>0,05$) ve 0,26±0,01 mg/g k.a. ile 0,37±0,03 mg/g k.a. arasında ölçüldüğü belirtilmiştir (Çizelge 4.10.).

4.1.3.4.(4).(d). Krom

Solungaç dokusunda Ca^{+2} düzeyi, Cr^{+6}'nın etkisinde 39,3±1,14 mg/g k.a. ile 46,6±4,95 mg/g k.a. değerleri arasında ölçülmüş ve kontrolden farklı olmadığı gözlenmiştir ($P>0,05$) (Çizelge 4.10.).

Böbrek dokusunda ise artış gösteren Ca^{+2} iyonunun 0,65±0,05 mg/g k.a. ile 1,88±0,38 mg/g k.a. düzeyleri arasında ölçülerek en yüksek düzeye 10. gün sonunda ulaştığı kaydedildi (Çizelge 4.10.).

Kas dokusunda ise solungaç dokusunda olduğu gibi, Ca^{+2} düzeyi kontrole göre değişiklik göstermemiş ($P>0,05$) ve 0,32±0,11 mg/g k.a. ile 0,57±0,12 mg/g k.a. arasında ölçülmüştür (Çizelge 4.10.).

4.1.3.4.(4).(e). Gümüş

Solungaç dokusunda Ag^{+} etkisinde Ca^{+2} artarak en yüksek düzeyde 16. gün sonunda gözlendi ($P<0,01$) (Çizelge 4.10.). Bununla birlikte etki süresince Ca^{+2} düzeyinin 38,9±1,95 mg/g k.a. ile 56,1±6,22 mg/g k.a. değer aralığında gözlendiği belirtildi.

Böbrek dokusunda da gibi Ca^{+2} iyonu artarak, en yüksek düzeye 16. gün sonunda ulaştı ($P<0,001$) (Çizelge 4.10.). Etki süresi boyunca da Ca^{+2} düzeyi 0,63±0,08 mg/g k.a. ile 2,12±0,26 mg/g k.a. değer aralığında gözlendi.

Kas dokusunda ise 0,42±0,03 mg/g k.a. ile 0,61±0,15 mg/g k.a. düzeyleri arasında gözlenen Ca^{+2} iyonu kontrole göre anlamlı bir ayırım göstermemiştir ($P>0,05$) (Çizelge 4.10.).

Çizelge 4.10. Kronik metal etkisinde kalan *O. niloticus* dokularındaki toplam Ca^{+2} düzeyleri (mg/g k.a.). Veriler Aritmetik ortalama±Standart Hata olarak verilmiştir (Kontrol grup, N=21; Metal etkisinde kalan grup, N=4; *: İstatistiksel olarak farklı grupları göstermektedir).

Metal	Etki süresi (gün)	Solungaç	Böbrek	Kas
Cd^{+2}	**0**	42,8±1,54	0,52±0,05	0,39±0,04
	5	45,3±4,99	0,43±0,02	17,2±2,24*
	10	42,7±1,84	0,58±0,03	4,51±1,66*
	20	46,0±2,99	0,51±0,09	10,1±3,14*
	30	36,5±2,58	0,49±0,02	0,44±0,08
		P>0,05	P>0,05	P<0,001
Cu^{+2}	**0**	42,8±1,54	0,52±0,05	0,39±0,04
	5	44,0±2,04	0,58±0,17	14,4±1,31*
	10	38,0±0,96	1,53±0,29*	0,97±0,19
	20	44,4±1,98	0,48±0,09	6,96±3,65*
	30	34,5±2,14	0,92±0,11*	0,36±0,03
		P>0,05	P<0,001	P<0,001
Zn^{+2}	**0**	42,8±1,54	0,52±0,05	0,39±0,04
	5	41,4±0,95	0,47±0,06	0,26±0,01
	10	48,0±3,72	0,41±0,02	0,37±0,03
	20	48,8±1,20	0,37±0,02	0,28±0,03
	30	56,7±3,05*	0,46±0,06	0,26±0,02
		P<0,05	P>0,05	P>0,05
Cr^{+6}	**0**	42,8±1,54	0,52±0,05	0,39±0,04
	5	46,6±4,95	0,76±0,02	0,57±0,12
	10	46,6±6,88	1,88±0,38*	0,37±0,08
	20	39,3±1,14	1,71±0,26*	0,32±0,11
	30	48,1±6,44	0,65±0,05	0,42±0,03
		P>0,05	P<0,001	P>0,05
Ag^{+}	**0**	42,8±1,54	0,52±0,05	0,39±0,04
	5	38,9±1,95	0,63±0,08	0,42±0,03
	10	53,8±5,12*	1,70±0,29*	0,51±0,09
	16	56,1±6,22*	2,12±0,26*	0,61±0,15
		P<0,01	P<0,001	P>0,05

4.2. Tartışma

4.2.1. ATPaz Karakterizasyonu

Bu bölümde *O. niloticus* dokularında ATPaz enzim aktivitelerinin metallerin *in vivo* akut ve kronik ile *in vitro* etkilerine verdikleri tepkinin değerlendirilebilmesi için enzimlerin en yüksek aktivite gösterdiği ortam koşullarının belirlendiği karakterizasyon analizlerinin yapılması amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre solungaç ve böbrek dokularında ölçülen Na^+/K^+-ATPaz, Mg^{+2}-ATPaz, Toplam-ATPaz ve Ca^{+2}-ATPaz enzim aktiviteleri en yüksek düzeylerini çok az farklılık göstermelerine karşılık genellikle aynı ortam koşullarında göstermiştir.

Karakterizasyon analizlerinin sonuçlarına göre çalışmanın daha sonraki aşamalarında kullanılan inkübasyon ortam koşulları solungaç ve böbrek dokusunda Na^+/K^+-ATPaz, Mg^{+2}-ATPaz ve Toplam-ATPaz için, 100 mM Na^+, 20 mM K^+, 4 mM Mg^{+2}, 40 mM Tris, 3 mM ATP, pH 7,7 ve 37 ^oC sıcaklık olarak belirlenmiştir. Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi için ise solungaç ve kas dokularında inkübasyon ortam koşulları pH 7,7 ve 37 ^oC olmak üzere 1 mM Ca^{+2}, 1 mM EGTA, 4 mM Mg^{+2}, 40 mM Tris ve 3 mM ATP içermektedir. Buna karşılık böbrek dokusunda Ca^{+2}-ATPaz karakterizasyon çalışmaları sonuç vermediğinden, diğer ATPaz karakterizasyonu sonuçlarının da her iki dokuda aynı olmasından yola çıkarak Ca^{+2}-ATPaz için solungaç dokusunda elde edilen veriler böbrek dokusu için de kullanılmıştır. Elde edilen karakterizasyon verilerinin Çizelge 4.11.'de gösterilen diğer çalışmalarla da uygunluk gösterdiği gözlenmiştir. *Dicentrachus labrax* L. ile yapılan çalışmada solungaç ve böbrek dokusu Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin 100 mM Na^+ ve 20-25 mM K^+ değerlerinde en yüksek aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Trigari ve ark., 1985; Diaz ve ark., 1998). Na^+/K^+ oranının genellikle 6,0'dan düşük olduğunun gösterildiği çalışmaların sonuçları bu çalışmanın sonuçları ile de uygunluk göstermektedir (Gjevre ve Naess, 1996; Guynn ve ark., 2002; Atlı ve Canlı, 2008b). Buna karşılık Diaz ve ark. (1998), *Sparus aurata* L.'nin bağırsak dokusunda Na^+/K^+-ATPaz karakterizasyon sonuçlarına göre Na^+/K^+ oranının çok yüksek (20/1) olduğunu

Çizelge 4.11. Bazı balık türlerinde farklı dokulardaki Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi ortam koşulları.

Kaynak	Balık türü (doku tipi)	Na^+ (mM)	K^+ (mM)	$Na^+:K^+$	Mg^{+2} (mM)	ATP (mM)	Mg^{+2}:ATP	Tris (mM)	pH
Giles ve Vanstone (1976)	*Onchorhynchus kisutch* (solungaç)	100	20	5:1	5	5	1:1	30	7,4
Di Costanzo ve ark. (1983)	*Onchorhynchus mykiss* (bağırsak)	100	20	5:1	2	1	2:1	50	7,4
Ventrella ve ark. (1990)	*Sparus auratus* L. (solungaç)	160	20	8:1	5	5	1:1	75	6,5
Spokas ve ak (2002)	*Pimephales promelas* (solungaç)	60	20	3:1	5	4	5:4	50	7,7
Guynn ve ark. (2002)	*Trematomous bernacchii* *Notothenia angustata* (solungaç)	100	25	4:1	5	5	1:1	50	7,4
Atlı ve Canlı (2008b)	*Onchorhynchus mykiss* (solungaç)	100	40	5:2	4	4	1:1	40	7,7
Atlı ve Canlı (2008b)	*Cyprinus carpio* (solungaç)	100	30	10:3	3	4	3:4	40	7,4

bulmuşlar ve bunun en yüksek enzim aktivitesi için yüksek oranda Na^{+}'ya ve düşük oranda K^{+}'ya duyulan gereksinimden kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Ouabainin, Na^{+}/K^{+}-ATPaz enziminin dış membran yüzeyindeki özgün bölgesine bağlanarak enzim aktivitesini inhibe ettiği bilinmektedir (Nelson ve Cox, 2002; Andres ve ark. 2002). Buna bağlı olarak Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin 1 mM ouabain derişiminde inhibe olması diğer araştırmalarda da gösterilmiştir (Ventrella ve ark.,1990; Spokas ve ark., 2002). Buna karşılık *Trematomous bernacchii* ve *Notothenia angustata* türlerinin solungaç ve *Onchorhynchus mykiss* ile *Salmo salar* L.'nin bağırsak dokusunda yapılan çalışmada ouabain derişimi sırasıyla 2 mM ve 8 µM-2 mM değerleri arasında belirlenmiştir (Gjevre ve Naess, 1996; Guynn ve ark., 2002). Buna göre ouabain derişiminin, enzimin ouabaine olan duyarlılığının sıcaklık, katyon ve lipit ortamı gibi faktörlerden etkilenmesine bağlı olarak farklılık gösterebileceği de bildirilmiştir (Diaz ve ark., 1998).

ATPaz aktiviteleri için gerekli olan Mg^{+2} ve ATP derişimleri ise tüm dokular için benzer bulunurken, 4/3 olarak belirlenen Mg^{+2}/ATP oranı ise 1,0'e yakın değeri ile diğer çalışmalarla uygunluk göstermektedir. Bu çalışmalarla, 1,0 değerindeki Mg^{+2}/ATP oranının poikilotermik canlıların çeşitli dokularında optimal bir değer olduğu bildirilmiştir (Ventrella ve ark., 1990; Diaz ve ark., 1998; Atlı ve Canlı, 2008b).

Enzim aktivitelerinin ölçümünde gerekli inkübasyon ortamındaki tampon derişimi ile pH değerinin daha önce yapılan çalışmalarda belirtilen aralıkta olduğu gözlenmiştir. Buna göre farklı tür ve dokularda çalışılan enzim aktiviteleri 30-75 mM tampon (Tris) ortamında en yüksek düzeyde gözlenmiştir (Spokas ve ark., 2002; Guynn ve ark., 2002) ve bu aralık bu çalışmanın sonuçları ile de desteklenmektedir. İnkübasyon ortam pH'sının da bu çalışmada gösterildiği gibi genellikle 7,0-7,7 aralığında olduğu yapılan daha önceki çalışmalarda da kaydedilmiştir (Gjevre ve Naess, 1996; Diaz ve ark., 1998; Atlı ve Canlı, 2008b).

Enzim aktivitesinin analizlerinde reaksiyonun gerçekleştiği ortam sıcaklığı 37 ^{o}C olarak belirlenmesine karşın, Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi daha yüksek sıcaklık değerlerinde de yüksek aktivite gösterebilmiştir. Bu sonuca benzer şekilde, Diaz ve ark. (1998) *S. salar* bağırsak Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesini 40 ^{o}C'de, geri kalan ATPaz

aktivitelerini ise 50 ^{o}C'de en yüksek düzeyde ölçmüşlerdir. Bu alanda yapılan çalışmalarda, inkübasyon süresine bağlı olarak da değişiklik gösterebilen ATPaz enzimlerinin genellikle 37 ^{o}C ve yakın değerlerde en yüksek düzeyde aktivite gösterdiği görülmüştür (Guynn ve ark., 2002; Alam ve Frankel, 2006)

Buna ek olarak Na^{+}/K^{+}-ATPaz, Mg^{+2}-ATPaz ve Toplam-ATPaz aktivitelerinin en yüksek değerlerinin gözlendiği ortam koşulları arasındaki bazı farklılıklara örnek olarak *Sparus aurata* L'nin bağırsak Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin pH 7,5'de en yüksek aktivite göstermesi, geri kalan ATPaz aktivitesinin ise pH 8,0'de en yüksek aktivite düzeyine sahip olması verilebilir (Diaz ve ark., 1998). Bunun dışında Ventrella ve ark. (1990), aynı türe ait solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesini sırasıyla 160 mM Na^{+}, 20 mM K^{+}, 5 mM Mg^{+2}, 5 mM ATP, pH 6,5 ortamında en yüksek düzeyde gözlemelerine karşılık Mg^{+2} bağımlı Na^{+}-ATPaz aktivitesini ise 75 mM Na^{+}, 2,5 mM Mg^{+2}, 1 mM ATP, pH 5,2'de en yüksek düzeyde gözlemişledir. Veillette ve Young (2004), somon *Onchorhynchus tshawytscha*'nın bağırsak dokusunda yaptıkları karakterizasyon çalışması sonucu Na^{+}/K^{+}-ATPaz'ın 7,4-8,0 pH aralığında 45 mM Na^{+}, 10 mM K^{+} ve 2,5 mM Mg^{+2} içeren inkübasyon ortamında en yüksek aktivite gösterdiğini ve 0,06 mM ouabain varlığında enzimin % 100 inhibe olduğunu göstermişlerdir. İstakoz *Nephrops norvegicus*'un solungaçlarında 100 mM Na^{+} ve 20 mM K^{+} derişiminde en yüksek aktivite göstermiş Na^{+}/K^{+}-ATPaz ile oligomisine duyarlı Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin 5 ^{o}C ve 55 ^{o}C sıcaklıklarda % 100 inhibe olurken oligomisine duyarlı olmayan Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin % 50'sinin ise 70 ^{o}C sıcaklıkta aktive olabildiği belirtilmiştir. Bununla birlikte tüm ATPaz enzimlerinin 6 mM ATP derişiminde en yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiş, 1 mM ouabain derişiminde ise Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin tamamen inhibe olduğu gözlenmiştir (Canlı ve Stagg, 1996).

Shephard ve Simkiss (1978), tatlı su balığı *Rutilus rutilus* ile yaptıkları çalışmada solungaç Ca^{+2}-ATPaz enziminin 2 mM Ca^{+2}, 2 mM Mg^{+2}, 3 mM EGTA, 20 mM Tris ve 1 mM ATP (pH 7,8) içeren inkübasyon ortamında optimum aktivite gösterdiğini, buna karşın aktivasyonunun Na^{+} veya K^{+} iyonlarına gereksinim duymadığını bildirmiştir. Buna ek olarak Bansal ve ark. (1985) bir diğer tatlı su balığı olan *Saccobranchus fossilis*'in solungaç ve kalp dokularında Ca^{+2}-ATPaz

enzimini karakterize etmişler ve en yüksek Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin solungaç dokusunda 3 mM Ca^{+2}, 3 mM ATP (pH 8,0) derişimlerinde kalp dokusunda ise 3 mM Ca^{+2} ve 1 mM ATP derişimlerinde gözlendiğini belirtmişlerdir. Antartik balığı *Adamussium colbecki*'nin kas Ca^{+2}-ATPaz karakterizasyon sonucuna göre enzim, 2 µM Ca^{+2}, 200 mM K^{+} ve pH 7,2 ortam koşulları ile yaklaşık 1 mM ATP derişiminde en yüksek aktivite düzeyine ulaşmıştır (Viarengo ve ark., 1999).

4.2.2. *İn vivo* ATPaz Aktivitesi (Akut Uygulama)

Bu çalışmanın akut döneminde, metallerin (Cd^{+2}, Cu^{+2}, $Zn^{+}2$, Cr^{+6}, Ag^{+}) artan derişimlerinin (0,1, 0,5, 1,0, 1,5 µg/mL) *O. niloticus* dokularında (solungaç, böbrek, kas) ATPaz aktiviteleri (Na^{+}/K^{+}-ATPaz, Ca^{+2}-ATPaz, Mg^{+2}-ATPaz, Toplam-ATPaz), toplam protein, metal ve iyon (Na^{+}, K^{+}, Ca^{+2}, Mg^{+2}) düzeylerine kısa süreli etkilerinin (96 saat) *in vivo* koşullarda incelenmesi amaçlanmıştır.

Elde edilen sonuçlar genel anlamda özetlenecek olunursa; kontrol enzim aktivitelerinin önceki çalışmalarda belirtilen aralıkların (1-21 µmol Pi/mg prot./sa.) içerisinde olduğu gözlenmiştir (Ventrella ve ark., 1990; Diaz ve ark., 1998). ATPaz enzim aktiviteleri akut dönem metal etkileri sonunda genellikle azalmıştır. Buna karşılık akut dönemde böbrek dokusunda Ag^{+} ve Cu^{+2} etkisinde Na^{+}/K^{+}-ATPaz, Mg^{+2}-ATPaz ve Toplam-ATPaz ile Cr^{+6} etkisinde kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinde artış kaydedilmiştir. ATPaz enzimlerinin metal tipi, derişimi ve doku tipine bağlı olarak farklılık göstermekle birlikte azalış yönünde tepki vermesi, bu alanda yapılan çalışmalarla da uygunluk göstermektedir (Ay ve ark., 1999; Morgan ve ark., 2004; Silvestre ve ark., 2005; Atlı ve Canlı, 2007). Toplam protein düzeyi ise Cu^{+2} etkisinde tüm dokularda azalırken, kas dokusunda Ag^{+} ve Cd^{+2} etkisinde artmıştır. Toplam metal düzeyleri ise solungaç dokusunda tüm metaller için derişim düzeyi ile orantılı olarak önemli düzeyde birikim gösterirken, böbrekte sadece Cd^{+2}, kas dokusunda ise Cd^{+2}, Zn^{+2} ve Cu^{+2} birikim göstermiştir. Saptama sınırlarının altında kaydedildiğinden Ag^{+} ve Cr^{+6} birikimi ise gözlenememiştir. Toplam iyon düzeyleri metal tipi, derişimi ve dokuya göre değişiklik göstermekle birlikte genellikle Ca^{+2} ile Mg^{+2} iyonları metal etkilerinde artarken, Na^{+} ile K^{+} iyonları azalış göstermiştir.

Yapılan çalışmalar günümüzde artan çevresel kirlilik sonucu metallerin toksik etkilerinin değerlendirilmesinde, iyon taşınması, hücresel sıvı hacminin düzenlenmesi, zar potansiyelinin korunması gibi kilit öneme sahip ATPaz enzimlerinin biyolojik belirteçler olarak büyük öneme sahip olduklarını vurgulamaktadırlar (Watson ve Beamish, 1981; Canlı ve Stagg, 1996; Atlı ve Canlı, 2007). Bunlardan Na^+/K^+-ATPaz, hücre içindeki 3 Na^+ iyonunu hücre dışına 2 K^+ iyonunu hücre içine taşımak için ATP molekülünden açığa çıkan enerjiye gereksinim duymaktadır. Hem deniz hem tatlı su teleostlarının özellikle solungaç, böbrek ve bağırsak gibi osmoregülatör organlara özgü bir enzim olan Na^+/K^+-ATPaz enzimi temelde hücre içi homeostazisin korunmasından sorumludur. Na^+/K^+-ATPaz, yaklaşık 100 kDa ağırlığındaki katalitik α-alt ünitesi ile 55 kDa ağırlığındaki glikozile β-alt ünitesinden oluşmuş –SH grubu bakımından zengin ve bir steroid türevi (kardiyak glikozit) ouabain tarafından inhibe olan bir enzimdir (Heath, 1987; Diaz ve ark., 1998; Ribeiro ve ark., 2002). Mg^{+2}'nin taşınmasından sorumlu Mg^{+2}-ATPaz, hücre zarının bütünlüğü ve geçirgenliğinin korunmasında diğer ATPaz enzimleri ile birlikte görev alan bir enzimdir. Mitokondriyal Mg^{+2}-ATPaz, balık ATPaz sisteminde en önemli enerji bağıntılı enzimdir ve Mg^{+2}-ATPaz inhibisyonu oksidatif fosforilasyonu etkilemektedir. Sarkoplazmik retikulum tübüllerinde lokalize olan Ca^{+2}-ATPaz, hücre zarının stabilizasyonu için gerekli olan Ca^{+2}'nin nM düzeylerinde aktive olabilmekte ve ATP hidrolizinden açığa çıkan enerjiyi kullanarak sitoplazmadan Ca^{+2}'nin uzaklaştırılmasında ve böylece düşük hücresel Ca^{+2} içeriğinin korunmasında görev almaktadır (Watson ve Beamish, 1981; Saxena ve ark., 2000). Zara bağlı enzimler olan ve dokulardaki iyon hareketleri, osmotik basınç, zar geçirgenliği üzerinde ve yüksek enerjili metabolik transformasyonların kontrolünde önemli görevlere sahip olan Adenozin trifosfataz (ATPaz) enzimlerinin yüksek elektronegatif özellik göstermeleri nedeniyle geçiş metallerine hassas olduğu belirtilmiştir (Riedel ve Christensen, 1979; Watson ve Beamish, 1981; Thaker ve ark., 1996). Bununla birlikte ATPaz'ların tuzluluk, sıcaklık gibi çeşitli faktörler tarafından da etkilendiği kanıtlanmıştır (Inman ve Lockwood, 1977; Diaz ve ark., 1998). Enzimin metallerin *in vivo* ve *in vitro* etkisine duyarlı olduğu ve ATPaz aktivitesindeki değişikliklerin, çeşitli çevresel kirleticilere cevap olarak oluştuğu

gösterilmiştir (Watson ve Benson, 1987; Canlı ve Stagg, 1996; Kamunde ve Wood, 2003). Buna ek olarak çeşitli toksikolojik ve fizyolojik etkenlerin *in vivo* ve *in vitro* metal etkilerinde farklılıklara neden olduğu bildirilmiştir (Stagg ve Shuttleworth, 1982; Pinkney ve ark., 1989; Lemaire-Gony ve ark., 1995).

Balıkların dış ortamdaki osmolariteye (tuzluluk) karşın hücre dışı sıvılardaki osmotik derişimin aktif olarak düzenleyebilme yeteneği olarak tanımlanan osmoregülasyon işlevinin gerçekleştiği solungaç, böbrek ve bağırsak dokularında su ve iyon hareketleri düzenlenmektedir (Pinkney ve ark., 1989; Pelgrom ve ark., 1995; De La Torre ve ark., 2000). Böylece sucul organizmaların su ve iyon homeostazislerini dengeleyerek değişen dış ortam koşullarına uyum sağlama yeteneklerinde (osmotik ve iyonik düzenleme) birincil öneme sahiptir. Bu bağlamda plazma Na^{+} ve Cl^{-}, yoğun miktarda bulunmakla birlikte osmotik basıncın düzenlenmesinde, K^{+}, Mg^{+2} ve Ca^{+2} ise diğer yaşamsal fonksiyon ve mekanizmalarda hücre içi ve hücre dışı sıvılarda osmotik ve iyonik regülasyonun düzenlenmesi adına önemli görevlere sahiptir (Larsson ve ark., 1985, Simkiss ve Taylor, 1989). Balıklarda solungaç dokusu solunum gazları, elektrolitler, su ve nitrojenli atıkların taşınmasının ve asit-baz dengesinin gerçekleştiği biyolojik ortamdaki tartışmasız en karmaşık epitellerden biridir. Bu karmaşık fonksiyonları yerine getirebilmek için yüzlerce filament ile binlerce lameller yapıdan oluşan bu epitel doku balığın toplam yüzey alanının yaklaşık % 50'sini oluşturmaktadır. Bu anlamda da metallerin toksik özelliklerinin gözlendiği birincil hedef organlardan biridir. Bunun dışında böbrek dokusu da metallerin depolandığı ve metal detoksifikasyon mekanizmalarının gerçekleştiği diğer önemli osmoregülatör dokulardan biridir. Kas dokusu da balıkta besin zincirinde önemli bir besin kaynağı oluşturması nedeniyle ve Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin en yüksek aktivite gösterdiği doku olması nedeniyle metal toksisite çalışmalarında önemli bir belirteç doku olarak çalışılmaktadır (Heath, 1987; De La Torre ve ark., 2007).

Metallerin hücre yüzeyine tutunmasını, ortamdaki serbest metal iyonu derişimi, epitelyal yüzeydeki ligantların sayısı ve tipi, iyon alımı ve bununla ilişkili yüzey ligantları ile yer değiştirme gibi çeşitli faktörler etkileyebilmektedir (Handy ve ark., 2002). Metallerin enzim molekülünü etkilemesi üç olası şekilde

gerçekleşebilmektedir: 1. Metallerin hedeflerinden biri proteinlerin yapısındaki –SH gruplarıdır ve bu gruplar metaller tarafından okside olmaya eğilimli olduklarından proteinlerdeki hidrojen bağları ve üç boyutlu yapılarında bozulmalar gerçekleşmektedir. Bölgeye bağlı olarak da bu etkileşimler enzim aktivitelerinde azalmaya neden olabilmektedir. 2. Karbonik anhidraz yapısındaki Zn^{+2} gibi metaller enzim molekülünün yapısına katılıyorsa diğer metaller bununla yarışabilmekte ve sonuçta fonksiyonel aktiviteyi etkileyecek üç boyutlu yapıda değişikliklere neden olabilmektedir. 3. Metaller proteinlerin yapısına şelat veya tuz oluşturmak üzere dahil olabilmektedir (Dawson, 1982; Brooks ve Mills, 2003).

Bu sonuçlar ışığında enzim aktivitesinde gerçekleşen azalışlar osmoregülasyon sistemindeki bozulmalardan veya hücre zarında oluşan yapısal hasarın sonucunda zar geçirgenliğinin değişmesinden kaynaklanabilmektedir. Bununla birlikte metallerin tek ve iki değerlikli iyonlarla yarışması veya enzim yapısındaki –SH gruplarına bağlanarak konformasyonel değişikliklere neden olması da aktivitede azalmaya neden olabilmektedir. Enzim aktivitesindeki artışlar ise bozulan düzenin tekrar onarılabilmesi için telafi mekanizmaları ile açıklanabilmektedir. De La Torre ve ark. (2007), balıkta Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin su kaynaklı kirleticilerin akut veya kronik etkileri sırasında artış veya azalış göstermesinin yanında herhangi bir değişiklik göstermeyebileceğini de belirtmiştir. Bu tepkilerin de kirleticilerin yoğun etkilerine, epitelyal taşınmanın fonksiyonel ve morfolojik bütünlüğünün bozulmasına doğrudan kirleticilerin etkisi veya dolaylı olarak endokrin sistemin hasar görmesine bağlı olarak geliştiğini vurgulamışlardır. Bu nedenle de bu enzimlerin değişen ortam koşullarına verdikleri cevabın stresin sınıflandırılmasında ve metabolik uyum düzenlemelerinin yapılmasında önem kazandığını belirtmişlerdir. Cu^{+2}, Ag^{+}, Cd^{+2}, Zn^{+2} ve Hg^{+2} gibi metallerin akut toksisitelerinin kilit mekanizmasının solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz inhibisyonu ile ilişkili osmoregülatör hasar olduğu bildirilmiştir (McGeer ve Wood, 1998; Bianchini ve ark., 2005, Monserrat ve ark., 2007).

4.2.2.1. Kadmiyum

O. niloticus'un 96 saatlik akut Cd^{+2} (5, 15, 25 µg/mL) etkisi sonrasında solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinde herhangi bir değişim gözlenmemiş, plazma Na^{+} düzeyi farklılık göstermezken plazma Ca^{+2} düzeyinin etki süresi sonunda derişime bağlı bir azalış gösterdiği belirtilmiştir (Garcia-Santos ve ark., 2006). Bu çalışmada ise aynı etki süresinde daha düşük derişimler kullanılmasına karşın Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi solungaç böbrek ve kas dokusunda önemli düzeyde azalmış, bunun yanında doku Na^{+} düzeyleri azalırken, Ca^{+2} düzeylerinin ise doza bağlı bir artış gösterdiği bulunmuştur. Balıklar homeostazi için gerekli iyonları solungaçlar aracılığıyla sudan almaktadırlar. Metal etkilerinde, organlardan iyon akışını ve solungaçlarda aktif iyon alımından sorumlu klorit hücrelerin hasar görmesini izleyen elektrolit kaybının gözlendiği gösterilmiştir (Lauren ve McDonald, 1987; Tkatcheva ve ark., 2004; Garcia-Santos ve ark., 2006). Birincil toksik etkileri arasında sayılan ve Cd^{+2}'nin Ca^{+2} iyonu ile yüksek ilgili Ca^{+2} bağlayan bölgeler için yarışarak Ca^{+2} alımını bloke ettiği ve böylece klorit hücrelerin bazolateral membranında bulunan Ca^{+2} pompasını inhibe ettiği bilinmektedir (Pelgrom ve ark., 1997). Bununla ilgili olarak yapılan analizler sonucunda tüm dokularda Cd^{+2} etkisinde gözlenen Ca^{+2}-ATPaz inhibisyonu ve Ca^{+2} iyon akışının bozulması bu durumu desteklemektedir. Metallerin dokulardaki elektrolit düzeylerine olan etkilerindeki farklılıkların balık ve metal türlerine, metal derişimleri ve suyun kimyasına bağlı olabileceği belirtilmiştir (Morgan ve ark., 1997; Rogers ve ark., 2003; Garcia-Santos ve ark., 2006).

Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar, Cd^{+2}'nin farklı türlerde Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesini inhibe ettiğini göstermiştir (Wendelaar Bonga ve Lock, 1991; Lionetto ve ark., 2000; Garcia-Santos ve ark., 2006). Tatlı su balıklarında solungaç klorit hücreleri, Ca^{+2} alımının gerçekleştiği temel bölgedir ve Ca^{+2} iyonunun su ortamından kana geçişi aktif ve pasif bileşenleri içermektedir. Sudan Ca^{+2} iyonunun klorit hücrelere girişi klorit hücre apikal membranında bulunan Ca^{+2} kanalından elektrokimyasal gradiente göre pasif mekanizmayla olmaktadır. Bazolateral membrana hareketi ise Ca^{+2} bağlayan proteinlerle gerçekleşmektedir. Kana geçişi ise

aktif taşıma ile Ca^{+2}-ATPaz tarafından olmaktadır ve Ca^{+2} alımının klorit hücre sayısıyla doğru orantılı olduğu ve klorit hücre yüzey alanındaki konformasyonel değişikliklerin Ca^{+2} alımını etkilediği belirtilmektedir (MacKenzie ve Perry, 1997). Wong ve Wong (2000)'un, 7 gün süreyle 0,04-0,16 µg Cd^{+2}/mL etkisinde kalan *O. mossambicus*'un solungaç dokusunda Cd^{+2} düzeyinde derişime bağlı bir artış gözledikleri ve solungaç Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin önemli ölçüde azalmasının gösterildiği çalışmaları bu tez çalışması ile de uygunluk göstermektedir. Solungaç hücrelerindeki klorit hücrelerinden hem Cd^{+2} hem de Ca^{+2} iyonunun taşınarak elektrokimyasal gradiente göre Ca^{+2} kanalı aracılığıyla apikal membrana pasif olarak geçtikleri bilinmektedir ve metallerin Ca^{+2}-ATPaz enzimini de içine alan bazolateral taşıma mekanizmasının inhibisyonuna neden oldukları belirtilmektedir (Rogers ve ark., 2003). Mg^{+2} düzeyi alabalıkta hücresel ve enzimatik fonksiyonların korunması için 1 mM'nin altında tutulması gerektiğinden, iyon düzeyi sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. Mg^{+2} iyonundaki artışa karşın K^{+} iyonunda bir artışın gözlenmemesi hipokalsemik tepki ile ilişkili olabilmektedir. Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarının balığa farklı yollardan girmelerine karşın her iki iyon arasında bir etkileşimin olduğu görüşü yaygındır. Örneğin düşük Mg^{+2} alımının alabalıkta Ca^{+2} düzeylerinde artışı uyardığı gösterilmiştir. Mg^{+2} iyonunun solungaç ve bağırsak dokularının apikal membranından elektrokimyasal gradiente bağlı pasif olarak hareket ettiği ve Ca^{+2} iyonunun da bu harekette rol oynadığı düşünülmektedir (Flik ve ark., 1993).

4.2.2.2. Bakır

Su ortamında metallerin epitelyal hücrelere taşınması; a. Apikal/mukozal membrana tutunma, b. Hücreye giriş, c. Hücre içi etkileşim, d. Hücreden kana geçiş aşamalarını içermektedir. Genellikle Cu^{+2}, Na^{+} ile zar yüzeylerine difüzyon için yarışmakta ve Na^{+} kanallarına bağlanabilmektedir. Genellikle Na^{+} iyonunun epitellerden emilimi dış ortamdan hücre içine Na^{+}'nın iyon kanalları veya protein taşıyıcılar (kolaylaştırılmış difüzyon) ile gerçekleşmektedir. Hücreden kana geçişi ise elektrokimyasal gradiente karşı Na^{+}/K^{+}-ATPaz enzimi tarafından sağlanmaktadır.

Cu^{+2} hücre zarlarından Cu^{+2} veya Cu^{+} formunda geçebilmekte ve zar potansiyelinde değişikliklere neden olabilmektedir, dolayısıyla Na^{+}'ya bağlı Cu^{+2} alımı Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesini değiştirmesi yönünden önem kazanmaktadır. Cu^{+2}, Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesini enzimin alt ünitelerinde bulunan tiyol gruplarına veya Mg^{+2} bağlama bölgelerine bağlanarak inhibe edebilmektedir (Handy ve ark., 2002). Yapılan çalışmalar Cu^{+2}'nin proteinlere ilgisinin yüksek olduğunu ve doku Na^{+} düzeylerinde azalışa neden olarak Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesini indirgediğini ve Na^{+}/K^{+}-ATPaz tarafından K^{+} alımını doğrudan inhibe ederek doku K^{+} düzeyini azalttığını bildirmişlerdir (Li ve ark., 1998; Handy ve ark., 2002). Bu toksisite mekanizması bu çalışmada akut Cu^{+2} etkisinde solungaç ve böbrek dokularında Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi ile birlikte doku Na^{+} ve K^{+} düzeylerindeki azalmayla gösterilmiştir.

De Boeck ve ark. (2007) köpekbalığı *Squalus acanthias*'in 72-96 saatlik 500-1500 µg Cu^{+2}/L etkisinin ardından yüksek Cu^{+2} derişimlerinde solungaç yapısındaki hasara bağlı Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin sırasıyla % 45 ve % 62 azalış gösterdiğini ve solungaç ile böbrek dokularında da derişime bağlı Cu^{+2} birikiminin gözlendiğini belirtmişlerdir. Buna karşılık, Grosell ve ark. (2003), 0,52 ve 1,73 mM Cu^{+2}'nin 7 gün süreyle kemikli bir balık türü olan *Myoxocephalus octodecemspinosus*'un solungaç ve bağırsak Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi ile plazma Na^{+}, Mg^{+2} ve Cl^{-} düzeylerini dokularda Cu^{+2} birikimine karşın değiştirmediğini belirtmişlerdir. Araştırıcılar solungaçlarda metal birikiminin, sudan net apikal metal girişi ile solungaç hücrelerinden kana net bazolateral geçiş arasındaki fark ile gerçekleştiğini söylemişlerdir. *O. mykiss* ile yapılan diğer bir çalışmada ise 2,4 mM Cu^{+2}'nin 5 günlük etkisi sonrasında klorit hücrelerinde sentezlenmesi uyarılan metallothioneinin Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesini Cu^{+2} toksisitesinden koruduğu belirtilmiştir (Dang ve ark., 2000). Elde edilen bu veri ise diğer araştırma ve bu çalışma sonuçlarında gözlenen enzim aktivitelerinde gerçekleşmeyen değişikliklerin nedenlerinden biri olabilir.

Bu konuda diğer bir tatlı su organizması olan *Gammarus pulex* ile yapılan çalışmada, 10 mg Cu^{+2}/L ve üzerindeki derişimlerde solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktivitelerinin önemli düzeyde indirgendiği fakat Mg^{+2}-ATPaz

aktivitesinin Cu^{+2} tarafından daha az etkilendiği belirtilmiş bununla birlikte plazma Na^{+} düzeyinde de düşüşün gözlendiği bildirilmiştir (Brooks ve Mills, 2003). Araştırıcıların Cu^{+2}'nin Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesine *in vivo* ve *in vitro* etkilerinin benzerlik gösterdiği yorumu bu çalışma ile de desteklenmiştir. Na^{+}/K^{+}-ATPaz'ın Mg^{+2}-ATPaz'a göre metal etkilerine daha duyarlı olması, Na^{+}/K^{+}-ATPaz'ın ekotoksikoloji alanındaki çalışmalarda biyokimyasal belirteç olarak sık kullanımını vurgulamaktadır. Buna ek olarak Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin *in vivo* ve *in vitro* metal etkilerinde değişiklik göstermediğine ait çeşitli araştırmalar da yapılmıştır (Kramer ve ark., 1986; Watson ve Benson, 1987; Lionetto ve ark., 2000).

Pelgrom ve ark. (1995), *O. mossambicus*'un iyon düzeylerine Cu^{+2} (50, 100, 200 µg/l), Cd^{+2} (20, 35, 70 µg/L) ve bu metallerin karışımlarının 6 gün süreyle etkilerini incelemiş ve plazma Na^{+}, Cl^{-} ve Ca^{+2} ile balığın tüm vücudundaki Na^{+} düzeylerinin önemli düzeyde azaldığını, Ca^{+2} düzeyinin ise yüksek derişimlerde artış gösterdiğini belirtmiştir. Vücut Na^{+} ve Ca^{+2} düzeyleri de bu çalışmada ölçülen değerlerle benzerlik göstermektedir. Cd^{+2}, Zn^{+2} ve Hg^{+2}'nin özellikle yüksek derişimlerde sülfidril gruplarına bağlanarak iskelet ve kalp Na^{+} kanallarını bloke ettiği belirtilmiştir (Morgan ve ark., 2004).

4.2.2.3. Çinko

Balık hücre içi Zn^{+2} düzeyleri dar aralıklarda tutulmaktadır ve bu düzenleme Zn^{+2}'nin hücre içi bölümlere ayrılmasını ve metallothionein gibi özgün proteinlere bağlanmasını içermektedir. Zn^{+2}, Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonları arasındaki kimyasal benzerlik, Zn^{+2} ile Mg^{+2}-ATPaz ve Ca^{+2}-ATPaz'ın aktif bölgelerindeki bağlanma yerleri için Mg^{+2} ve Ca^{+2} iyonları arasındaki yarışa neden olmaktadır. Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinde inhibisyona neden oluşu ise enzim molekülünün aktif bölgelerinde bulunan ve enzimin üç boyutlu konformasyonel yapısının korunması için gerekli –SH gruplarına bağlanması ile açıklanmaktadır. Watson ve Beamish (1980, 1981), alabalıkta Zn^{+2}'nin solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesini *in vivo* koşullarda artırırken, *in vitro* koşullarda azalttığını belirtmiştir. Yapılarındaki fonksiyonel -SH gruplarına bağlı olarak metal etkisinde inhibe olan enzimlerin aktivite ölçümleri, kirlilik

çalışmalarında büyük önem kazanmaktadır (Shephard ve Simkiss, 1978; Wong ve Wong, 2000).

Rogers ve ark. (2003), 1 mg Pb^{+2}/L etkisinde kalan *O. mykiss*'in dokularında birikim gösteren Pb^{+2}'nin en yüksek oranda solungaçlarda daha sonra sırasıyla böbrek ve karaciğerde olduğunu belirtmiş, 48 saat sonrasında plazma Ca^{+2}, Na^{+} ve Cl^{-} düzeylerinde azalmaya karşın plazma Mg^{+2} düzeyinde ise artışın olduğunu ve bu sürenin sonunda solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin % 40 oranında inhibe olduğunu bildirmişlerdir. Elde edilen sonuç da araştırıcılar tarafından akut Pb^{+2} etkisinin neden olduğu iyonoregülatör hasar ile açıklanmış ve Pb^{+2}'nin Ca^{+2} iyonu ile yarışmasının Cd^{+2} ve Zn^{+2} ile benzerlik gösterdiğine dikkat çekmişlerdir. Bununla birlikte Ag^{+} ile Cu^{+2} gibi Pb^{+2}'nin Na^{+} iyon dengesini bozması bu çalışmadaki metal etkilerinde de gözlenmiştir. Benzer şekilde Hogstrand ve ark. (1996), Zn^{+2}'nin solungaç klorit hücre membranını Ca^{+2} ile benzer yolla geçtiğini belirtirken, 100 pM serbest Zn^{+2} varlığında alabalık solungaç Ca^{+2}-ATPaz enziminin bloke olduğunu görmüşlerdir. Metal birikiminde solungaçların birincil hedef ve metal alımının gerçekleştiği organ olması, nefrotoksik etkilerin gözlendiği böbreklerin ise metaller için seçici olmaları nedeniyle önem kazandığı bilinmektedir (Heath, 1987; Canlı ve Atlı, 2003).

4.2.2.4. Krom

Alabalık *Salmo gairdneri*'nin çeşitli dokularında 2,5 mg Cr^{+6}/L'nin 48 saatlik etkisi sonrasında Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesindeki inhibisyona karşın, Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinde bir değişikliğin gözlenmediği belirtilmiştir (Kuhnert ve ark., 1976). Buna ek olarak Sancho ve ark. (2003), 0,22 mg/L derişimindeki tiyobenkarbın 96 saatlik etkisinde kalan yılan balığı *Anguilla anguilla*'nın solungaç ve kas dokularında Na^{+}/K^{+}-ATPaz, Mg^{+2}-ATPaz ve Toplam-ATPaz aktivitelerini incelemişlerdir. Sonuçta dokularda en fazla Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin etkilenmesi ile birlikte tüm ATPaz enzimlerin aktivitelerinde önemli düzeyde azalma kaydetmişlerdir. Araştırıcılar osmoregülatör hasarın oluşumundan önce ATPaz enzimlerinin erken uyarıcı belirteçler olarak kullanımlarının önemini vurguladıktan sonra solungaç

dokuda ATPaz enzimlerin daha duyarlı olmasına karşın kas dokusunda daha düşük bir inhibisyon düzeyinin gözlendiğini belirtmişlerdir. Chhaya ve ark. (1997), ağır metal ve çeşitli organik bileşikleri içeren yüksek pH'lı endüstriyel atıkların çeşitli derişimlerinin 2-6 günlük etkilerinde *Periophthalmus dipes*'in farklı dokularında ATPaz aktivitelerini incelemişlerdir. Buna göre karaciğer, beyin ve kas Na^+/K^+-ATPaz, Toplam-ATPaz, Ca^{+2}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktivitelerinde etkiye bağlı genel bir inhibisyon gözlenmesine karşın, en düşük derişimin en uzun etki süresinde çoğunlukla ve bazı yüksek derişim etkilerinde enzim aktivitelerinde artış gözlemlemişlerdir. Ca^{+2}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz inhibisyonu sonucu, farklı kimyasal nörotransmiterlerin salınımı gibi birçok fizyolojik mekanizmanın düzenli olarak görev görmesi ve kas kasılmasında önemli rolü olan Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarının alınması ve taşınmasının indirgendiği bildirilmiştir. Araştırıcılar gözlenen inhibisyonun kirleticilerin hücre zarında iyon taşıma sistemlerinde etki göstermeleri sonucuna, artışın ise gelişen uyum mekanizmalarına bağlı olabileceğini belirtmiştir. Midye *Perna viridis*'in, 1 mg Cr^{+2}/L etkisinde çeşitli dokularında Na^+/K^+-ATPaz, Ca^{+2}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktivitelerinin azaldığı ve bunun metalin membrana bağlı enzimlerin bulunduğu lipit ortamını etkilemesinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Vijayavel ve ark., 2007).

4.2.2.5. Gümüş

Onchorhynchus mykiss'in 75 saatlik 2-10 pg Ag^+/L etkisinde solungaçlardan Na^+ ve Cl^- alımı ile birlikte plazma Na^+ ve Cl^- düzeylerinde azalma ve solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde % 85 inhibisyon gözlenmiştir. Aynı zamanda *in vitro* 670 pg Ag^+/L etkisinde ise enzim aktivitesinde % 50 inhibisyonun gözlendiği ve Na^+/K^+-ATPaz'ın gösterdiği duyarlılık sonucu enzimin biyolojik etkilerin doğrudan ve hızlı saptanmasında önemli bir belirteç olarak önem kazandığı belirtilmiştir (Morgan ve ark., 1997). Morgan ve ark. (2004), alabalık *O. mykiss* ile yaptıkları çalışmada 24 saatlik 1,92 µg Ag^+/L etkisinde solungaç Ag^+ birikiminin hızla artış gösterdiğini ve Na^+ alınımı ile Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin indirgendiğini kaydetmişlerdir. Araştırıcılar su kaynaklı Ag^+'nın Na^+ kanalı aracılığıyla

solungaçlardan girerek Na^+/K^+-ATPaz aktivitesini inhibe ettiğini ve sonuçta Na^+ ve Cl^- kaybına bağlı iyon regülasyonu hasarı ile dolaşım bozukluğuna neden olarak ölümlere yol açtığını belirtmişlerdir. Elde edilen sonuçlar, Ag^+ birikimi, Na^+/K^+-ATPaz inhibisyonu ve Na^+ azalışının gözlendiği bu çalışma ile de desteklenmektedir. Rogers ve ark. (2003) tipik divalent katyonların Ca^{+2} antogonisti olmalarına karşın, Pb^{+2}'nin iyonoregülatör hasara neden olarak monovalent iyon düzeyini etkilediğini yorumlamışlardır. Araştırıcılar aynı zamanda Pb^{+2} ile Ag^+'yı Na^+/K^+-ATPaz aktivitelerine olan etkileri yönünden de karşılaştırmış ve Ag^+'nın enzimin –SH gruplarına bağlandığını, Pb^{+2}'nin ise enzimin aktif bölgesindeki karboksil grubuna bağlanıp fosforilasyon aktivitesini indirgeyerek Ag^+'ya göre daha az inhibisyona neden olduğunu belirtmişlerdir.

Akut Ag^+ toksisitesinin gösterildiği Grosell ve ark. (2000)'ın *O. mykiss* ile yaptıkları çalışmada, 3-22 mg Ag^+/L etkisinde 24 saat sonunda solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesindeki inhibisyonla birlikte Na^+ ve Cl^- alımının indirgenmesi ve Na^+ kaybının kilit mekanizmalar olduğu bildirilmiştir. Ag^+'nın tatlı su balıklarında son derece toksik olduğu, Na^+ kanalı aracılığıyla girdiği balıklarda Na^+ iyonunu taklit ederek ölümlere neden olduğuna da çalışmalarında değinilmiştir. Balıklar, kan ve doku osmolaritelerini, fazla suyu böbrek dokularından atarak ve tuz kaybını solungaçlardaki klorit hücreleri aracılığıyla sudan kana Na^+ ve Cl^- iyonlarının aktif taşınması ile gidererek düzenlemektedir (Sancho ve ark., 2003). Tatlı su organizmalarında akut Cu^{+2} ve Ag^+ toksisitelerinin benzer özellik gösterdiği ve genel olarak solungaç Na^+ ve Cl^- alımını indirgeyerek Na^+/K^+-ATPaz aktivitesini inhibe ettikleri bilinmektedir (Morgan ve ark., 1997; Grosell ve ark., 2002). Sucul organizmalarda en toksik metaller olan Ag^+ ve Cu^{+2}'nin bu çalışmada da *in vivo* ve *in vitro* etkilerinde ATPaz enzimlerinde azalış, dokulardaki birikimleri, doku Na^+ ve K^+ iyon düzeylerinde indirgenme ve Ca^{+2} ve Mg^{+2} düzeylerinde artışa neden olmaları ile benzer toksik özellik gösterdiği kanıtlanmıştır.

4.2.3. *İn vitro* ATPaz Aktivitesi

Metallerin *in vitro* etkilerinde ise solungaç ve böbrek Na^{+}/K^{+}-ATPaz ile kas Ca^{+2}-ATPaz aktiviteleri inhibe olurken, solungaç Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi Ag^{+} etkisinde inhibisyon, Cd^{+2} ve Zn^{+2} etkisinde artış, böbrek Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi tüm metal etkilerinde artış göstermiştir. Bununla birlikte Toplam-ATPaz aktivitesi solungaç dokusunda Zn^{+2}, böbrek dokusunda ise Cd^{+2} etkisinde artarken, Cu^{+2} ve Ag^{+} etkilerinde inhibe olmuştur. *İn vitro* analizler sırasında hücresel matriks homojenizasyon aşamasında büyük oranlarda seyreltildiği için metal enzim yapısından ayrılabilmekte dolayısıyla enzim aktivitesinde herhangi bir değişiklik gözlenememektedir. Bununla birlikte *in vitro* analizler metallerin moleküler düzeydeki fizyolojik mekanizmalara doğrudan etkilerinin ve *in vivo* etkilerin değerlendirilmesinde yararlı olabilmektedir (Webb ve ark., 2001).

Pimephales promelas'ın solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin *in vitro* Pb^{+2} etkisindeki beklenmeyen artışının, Ca^{+2} homeostazisindeki değişiklikleri yansıttığı ve pikomolar Pb^{+2} tarafından aktive olabilen protein kinaz C aktivasyonundan kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Spokas ve ark., 2002). Riedel ve Christensen (1979), metallerin Na^{+}/K^{+}-ATPaz (saf enzim) aktivitesine *in vitro* etkilerini gözledikleri çalışmalarında, enzimin geçiş metallerine oldukça duyarlı olduğunu ve enzim aktivitesini % 50 inhibe ettikleri düzeyler açısından değerlendiklerinde enzimin en çok Ag^{+}'ya ve ardından sırasıyla Cu^{+2} ve Cd^{+2}'ye hassas olduğunu belirtmişlerdir. Metallerin Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesine *in vitro* etkilerinin karşılaştırıldığı bu çalışmada da metal sıralaması benzer bulunmuştur. Lionetto ve ark. (2000), 0,031-3,24 µM *in vitro* Cd^{+2} etkisinin *Anguilla anguilla*'nın solungaç ve bağırsak dokularında Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktivitelerine olan etkilerini *in vivo* Cd^{+2} etkisine ışık tutması amacıyla incelemiş, Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin doza bağlı azalış göstermesine karşın, Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin değişiklik göstermediğini belirtmiştir. Bunun dışında solungaç dokusu Na^{+}/K^{+}-ATPaz enziminin bağırsak dokusuna oranla daha duyarlı olduğunu belirten araştırıcılar, metallerin ATPaz aktivitelerine olan etkilerinin dokulara göre protein konformasyonundaki, protein zar-lipit etkileşiminden kaynaklı değişiklik gösterebileceğini vurgulamışlardır. Bu *in*

vitro çalışma verilerine göre de solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi doza bağlı inhibisyon göstermiş ve 1,0 ile 1,5 µg Cd^{+2}/mL etkisinde yaklaşık % 80 inhibe olmuştur. Yapılan bu çalışmalar sonucunda metallerin neden olduğu inhibisyonun balıkta osmoregülasyon ve asit-baz dengesini bozduğu gösterilmiştir.

Metallerin (Cu^{+2}, Pb^{+2}, Zn^{+2}, Hg^{+2}) tatlı su balığı *Rutilus rutilus*'un solungaç Ca^{+2}-ATPaz aktivitesine *in vivo* ve *in vitro* etkilerinin incelendiği çalışmada, metallerin *in vitro* koşullarda 10 µM derişimlerinin altında inhibisyona neden olduğu, buna karşılık 56 günlük 0,16 µM Cu^{+2} etkisinde Ca^{+2}-ATPaz enzim ünitelerinde artış gözlendiği bildirilmiştir (Shephard ve Simkiss, 1978). Kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin 0,1-1,5 µg/mL *in vitro* metal etkilerinde önemli düzeyde inhibe olduğu bu çalışmada da gösterilmiştir. Buna ek olarak *Saccobranchus fossilis*'in kalp ve solungaç dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesine 0,5-1000 µM derişim ağırlığındaki *in vitro* metal (Mn^{+2}, Pb^{+2}, Hg^{+2}, Cd^{+2}) etkilerini araştırmışlar ve kas dokusu Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin solungaç dokusuna göre daha yüksek olduğunu belirttikten sonra enzim inhibisyonuna neden olan metaller arasında Hg^{+2}'nin en toksik olduğunu ve bunu Pb^{+2}, Mn^{+2} ve Cd^{+2}'nin izlediğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada da Ca^{+2}-ATPaz *in vitro* tüm metal etkilerinde inhibe olmuş, bunlar arasında ise Ag^{+} % 100 inhibisyona neden olmuştur. Bunun dışında araştırıcılar Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin Na^{+}/K^{+}-ATPaz gibi bulunduğu dokunun fizyolojik görevlerine göre farklı kinetik parametreler gösterdiğini bildirmişlerdir (Bansal ve ark., 1985). Bununla birlikte Stagg ve Shuttleworth (1982), *in vivo* 200 µg/L derişimindeki Cu^{+2}'nin 42 günlük ve *in vitro* 1-100 µmol/L Cu^{+2}'nin solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesine olan etkisini araştırmışlardır. Elde ettikleri sonuca göre *in vivo* Cu^{+2}, enzim aktivitesinde değişikliğe neden olmazken, *in vitro* Cu^{+2} etkisinde derişime bağlı bir inhibisyon gözlenmiş ve *in vivo* koşullarda enzim aktivitesinin değişmemesi ouabain bağlanan bölgelerin ve dolayısıyla enzim ünitelerinin Cu^{+2} etkisinde artış göstermesine bağlanmış ve Cu^{+2}'nin Na^{+}/K^{+}-ATPaz için potansiyel bir inhibitör olduğu vurgulanmıştır. Cu^{+2}'nin Na^{+}/K^{+}-ATPaz enziminin –SH gruplarına bağlanarak okside ettiklerini ve dolayısıyla enzim inhibisyonuna neden olduklarını belirtmişlerdir.

Solungaç dokusunun *in vitro* metal etkilerinde kalması sonrasında doku nekrozu ve apoptozis gibi doku hasarları da gözlenebilmektedir (Bury ve ark., 1998; Li ve ark., 1998). Akahori ve ark. (1999), 0,1-1,0 mM *in vitro* Zn^{+2} etkisinde sazan *Cyprinus carpio* L. eritrositlerinde Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinde ve tiyol grup içeriğinde bir değişiklik gözlenmediğini belirtmiştir. Buna karşılık bu araştırmada ise solungaç ve böbrek Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi *in vitro* Zn^{+2} etkisinde inhibe olmuştur. Metallerin Na^{+}/K^{+}-ATPaz enziminin ATP bağlayan bölgesinde bulunan –SH gruplarına yoğun ilgisinden dolayı buralara bağlanmaları sonucu enzim inhibisyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Akahori ve ark., 1999; Morgan ve ark., 2004; Atlı ve Canlı, 2008b). Watson ve Beamish (1980), *Salmo gairdneri*'nin *in vitro* 1,0-100 mg Zn^{+2}/L etkisinde solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin inhibe olduğunu buna karşın Mg^{+2}-ATPaz ve Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin ise gösterdikleri inhibisyona karşılık *in vitro* Zn^{+2} etkisine daha dirençli olduklarını belirtmektedir. Zn^{+2}'nin ATP hidrolizi için gerekli kofaktör veya substrat olarak görev gören divalent katyonlarla yer değiştirmesi sonucu enzim inhibisyonuna neden olabileceği belirtilmektedir. Bu tez kapsamında yürütülen *in vitro* Zn^{+2} etkisinde ise solungaç ve böbrek Na^{+}/K^{+}-ATPaz ile kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinde gözlenen inhibisyona karşın metal etkilerine daha dirençli olduğu çalışmalarla belirtilen Mg^{+2}-ATPaz (Canlı ve Stagg, 1996; De La Torre ve ark., 2000; Brooks ve Mills, 2003) aktivitesinin ise artış gösterdiği bulunmuştur. İn vitro metal etkilerinde enzim aktivitelerindeki artışın enzimin konformasyonel yapısındaki değişikliklerin enzimi ve substrat bağlama kapasitesini etkilemesi sonucu gözlenebileceğini kaydetmişlerdir (Watson ve Beamish, 1981).

Hogstrand ve ark. (1996), alabalıkta solungaç Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin Zn^{+2}'ye duyarlı olduğunu *in vitro* koşullarda yaptıkları çalışma ile göstermişlerdir. Ca^{+2} homeostazisini etkileyen metallerden Cd^{+2}'nin Zn^{+2}'ye göre daha toksik bir metal olmasına karşın, plazma Ca^{+2}-ATPaz aktivitesini Zn^{+2}'ye göre daha az düzeyde indirgediği belirtilmiştir (Verbost ve ark., 1989; Hogstrand ve ark., 1996). Buna karşılık bu çalışmada kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinde Cd^{+2}'nin 0,1-1,0 µg/mL derişimlerinde Zn^{+2}'ye göre daha fazla oranda inhibisyona neden olduğu görülmüştür.

4.2.4. *İn vivo* ATPaz Aktivitesi (Kronik Uygulama)

Bu çalışmanın kronik döneminde, metallerin (Cd^{+2}, Cu^{+2}, Zn^{+2}, Cr^{+6}, Ag^{+}) uzun süreli (0, 5, 10, 20 ve 30 gün) etkileri sonrasında *O. niloticus* dokularında akut dönemde olduğu gibi ATPaz enzim aktiviteleri, toplam protein, metal ve iyon düzeylerinin ölçülmesi amaçlanmıştır. Metallerin uzun süreli etkilerinin incelendiği bu bölümün analizleri sonucunda solungaç, böbrek ve kas dokularında metallerin etki sürelerine bağlı ATPaz aktivitelerinde genel bir azalışa karşın, özellikle Toplam-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktivitelerinde bazı metal etkilerinde süreye bağlı artışlar da kaydedilmiştir. Dokularda toplam protein düzeyi de metal tipi ve etki sürelerine bağlı artış ve azalış göstermiş, toplam metal düzeyi ise dokularda Cd^{+2}, Cu^{+2} ve Zn^{+2} birikimi yanında kas dokusunda sadece Cd^{+2} ve Cu^{+2} birikimi şeklinde gerçekleşmiştir. Metallerin toplam iyon düzeylerine uzun süreli etkilerine bakıldığında ise Ca^{+2} ve Mg^{+2} düzeylerinin artış, Na^{+} ve K^{+} düzeylerinin ise azalış yönünde tepki verdiği gözlenmiştir.

Deney süresi boyunca akut dönemde herhangi bir balık ölümü gözlenmezken, uzun süreli metal etkilerinde Ag^{+}, 16. günün sonunda balık ölümlerine neden olmuştur. Ag^{+}'nın balıklar üzerine olan toksik etkisi iyi bilinmekte olup, özellikle $AgNO_3$ formu suda çözünürlüğünün çok yüksek olmasına bağlı serbest Ag^{+} iyonu oluşturma potansiyeli nedeniyle toksisite çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır ve yapılan çalışmalar sonucunda osmoregülasyon mekanizmalarının çalışamaz duruma gelmesi balıkların ölüm nedeni olarak gösterilmektedir (Morgan ve ark., 1997; Morgan ve ark., 2004; Zhou ve ark., 2005). Hogstrand ve Wood (1998), tatlı su balıklarında Ag^{+}'nın solungaç epitelinden Na^{+} kanalı aracılığıyla girerek Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesini inhibe ettiğini ve sonuçta Na^{+} ve Cl^{-} gibi önemli plazma iyonlarındaki azalmanın ölüme neden olduğunu söylemişlerdir. Yapılan birçok çalışma sonucuna göre metaller arasında en toksik özellikte olanının Ag^{+} olduğu bunu Cu^{+2} ve Cd^{+2}'nin takip ettiği gözlenmiştir (Heath, 1987). Balıklarda ölümlere neden olan metal toksisitesi sadece metal türünden değil aynı zamanda balık türü, cinsiyet ve yaş gibi biyolojik faktörlerin yanında sıcaklık, su sertliği gibi ortamın fiziksel ve kimyasal koşullardan da etkilenebilmektedir. Balıkların metallere olan

dirençliliği üzerine çeşitli araştırmalar vardır; Örneğin Hogstrand ve Haux (1989), tropikal bir balık türü olan *Haemulon sciurus*'da 2200 µg Cd^{+2} enjeksiyonunu takip eden 8 gün içerisinde ölüm gerçekleşmediğini belirtmiştir. Buna karşın, bir alabalık türü olan *Salmo gairdneri* 0,03 mg/L Cu^{+2} ve 0,1 mg/L Cd^{+2} etkisinde kısa sürede ölmüşlerdir (Viale ve Calamari, 1984). Benzer şekilde bir sazan türü olan *Cyprinus carpio*, 7 µM Cd^{+2} etkisinde 5. günde, 2,5 µM Cd^{+2} etkisinde ise 8. günde ölmüştür (Smet ve ark., 2001). Van Dyk ve ark. (2007), *O. mossambicus*'un % 5 ve % 10 Cd^{+2} ile Zn^{+2} LC50 değerlerinin karışımının etkisinde etki süresinin % 5'inde patolojik belirtilere bağlı ölümlerin gözlendiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte 10 günlük deney süresinde 1 µg/mL Cu^{+2}, Cd^{+2}, Zn^{+2}, Fe^{+2} ve Pb^{+2} etkisinde kalan *O. niloticus*'larda 6. günde Cu^{+2} etkisindeki balıklarda gözlenen ölümler, Cu^{+2}'nin Ag^{+} ve Hg^{+2} ile birlikte metaller arasında toksisitesinin yüksek olması ile ilişkilendirilmiştir (Atlı ve Canlı, 2003). Schjolden ve ark., (2007) sazan *Carassius carassius* ile yaptıkları çalışmada 300 µg Cu^{+2}/L etkisinde 13. günden itibaren ölümlerin ve 14 günlük etki sonrasında ise plazma Na^{+} ve Cl^{-} düzeyindeki azalmayla birlikte solungaçlarda kontrol düzeylerine göre yaklaşık 14 kat oranında Cu^{+2} birikiminin gözlendiğini belirtmişlerdir. Araştırıcılar çalışma sonuçlarına göre *C. carassius*'un dirençli bir tür olmasına karşın Cu^{+2}'nin balıkta solungaç yapısında bozulma, plazma iyon düzeylerinde azalma, oksijen alımının düzenlenmesindeki bozukluklarla birlikte morfolojik ve fizyolojik değişikliklere neden olduğunu kaydetmişlerdir. Hogstrand ve ark. (1999), *Platichthys stellatus*'un 10 gün süreyle 250 µg/L derişimindeki Ag^{+} etkisinde ölmediklerini fakat 1000 µg Ag^{+}/L etkisinde ise 4. günden başlayarak ölümlerin gözlendiğini kaydetmişlerdir.

4.2.4.1. Kadmiyum

Bu çalışmada olduğu gibi, tatlı su balığı *Oreochromis* türlerinde genellikle dokulardaki Cd^{+2} birikimi ve Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinde gözlenen azalmaların, Cd^{+2}'nin Ca^{+2} iyonu ile yarışarak Ca^{+2}-ATPaz yapısındaki –SH gruplarına bağlanması ile enzimi inhibe etmesinden ve sonuçta Ca^{+2} homeostazisinin bozulmasından veya dokularda gözlenen hasardan kaynaklandığı belirtilmektedir

(Wong ve Wong, 2000; Atlı ve Canlı, 2007). Bununla birlikte Viarengo ve ark. (1993), Ca^{+2}-ATPaz inhibisyonuna neden olan metallerin toksisitelerine göre sıralandığında, sıralamanın $Hg^{+2}>Pb^{+2}>Cu^{+2}>Cd^{+2}>Zn^{+2}$ şeklinde olduğunu göstermiştir.

Dang ve ark. (2001)'ın yaptıkları araştırma sonucuna göre 0,2 ve 125 mg Cd^{+2}/kuru pellet ağırlığı etkisinde 4 ve 8 hafta sonunda plazma Cd^{+2} düzeyi artarken, plazma Ca^{+2}, Na^{+} ve Cl^{-} düzeyi ise etkilenmemiştir. Bununla birlikte solungaç epitellerinde Cd^{+2} birikimi ile birlikte metallothionein sentezinde de bir artış kaydedilmiş ve solungaçlarda metallothionein varlığının metal etkilerinde Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin korunması ve dokunun normal fonksiyonlarının devamının sağlanmasında oldukça önem kazandığı belirtilmiştir. Hollis ve ark. (2000), plazma ve tüm vücutta Ca^{+2} düzeylerine bakmışlar ve genel olarak Ca^{+2} düzeyinin 20. ve 30. günlerde azalış gösterdiğini kaydetmişlerdir. Buna karşın bu tez çalışmasında ise kronik süreçte Ca^{+2} düzeyi solungaç ve böbrek dokusunda değişiklik göstermemiş sadece kas dokusunda artmıştır. McGeer ve ark. (2000), alabalıkta Cd^{+2} etkisinde gözlenen Ca^{+2} kaybının daha uzun sürdüğünü ve kronik Cu^{+2} etkisinin sonuçta metabolik gereksinim ile ilişkili mekanizmaları içerdiğini belirtmiştir. Doğal su ortamlarında genellikle subletal düzeylerde bulunan metallerin kronik etkilerine verilen tepkiler beslenme kaybı, büyümede gerilik, iyon kaybı, solunum yetersizliği ve ölüm gibi çeşitli fizyolojik ve davranışsal değişiklikler olabilmektedir (Heath, 1987; Hogstrand ve Wood, 1996). McGeer ve ark. (2000), *O. mykiss*'de kronik metal etkileri sonrasında hasar-onarım mekanizmalarının geliştiğini, onarım fazının Cd^{+2}'ye göre Cu^{+2} ve Zn^{+2}'de daha kısa zamanda gerçekleştiğini belirtmiştir. Bu çalışmada ender de olsa, metal etkilerinde başlangıçta gözlenen iyon düzeyindeki farklılıkların deney süresi sonunda telafi mekanizmaların devreye girmesi ile kontrol düzeyine döndüğü gözlenmiştir. De La Torre ve ark. (2000), 14 gün boyunca 1,6 mg Cd^{+2}/L etkisinde bıraktıkları sazan *C. carpio*'yu daha sonra Cd^{+2} içermeyen suda 19 gün tutmuşlar ve Na^{+}/K^{+}-ATPaz'ın % 30 inhibisyonuna karşın Mg^{+2}-ATPaz'ın % 70 artış gösterdiğini kaydetmişlerdir. Balıkların metal içermeyen suya aktarılması ile Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin kontrol düzeyine yaklaştığını belirtmiş ve ATPaz enzimlerinin metallere olan duyarlılıklarına, doku ve balık türlerine göre değişiklik

gösterdiğini belirtmişlerdir. Pratap ve Wendelaar Bonga (1993), *O. mossambicus*'a besin yoluyla verilen 10 µg Cd^{+2} /L ve su kaynaklı 10 µg Cd^{+2} /L etkisini 4, 14 ve 35. günün sonunda incelemişler ve besin yoluyla alınan Cd^{+2}'nin solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesini uzun süreli etkide azalttığını kaydetmişlerdir. Buna karşın su kaynaklı Cd^{+2}'nin ise 4 ve 14. günlerin sonunda aktiviteyi düşürdüğünü, 35. günde ise kontrole göre bir fark gözlenmediğini belirtmişlerdir. Buna karşın Silvestre ve ark. (2005) yengeç *Eriocheir sinensis* ile yaptıkları çalışmada akut (1-3 gün) Cd^{+2} etkisi (0.5 mg/L) sonrasında hemolenf Na^+ ve Cl^- düzeylerinde azalışla Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin inhibe olduğu buna karşılık, kronik (30 gün) Cd^{+2} etkisinin (10-50 µg/L) ise herhangi bir değişikliğe neden olmadığını belirtmişlerdir. Kronik metal etkisinde osmoregülasyonla ilişkili uyum mekanizmalarının aktive olarak metal etkilerini engellediği yorumlanmıştır.

Toplam protein düzeyindeki azalma, karaciğer hasarına bağlı protein sentezinin zarar görmesi, emilimin indirgenmesi veya protein kaybından kaynaklanabilmektedir. *O. niloticus* ile yapılan çalışmada uzun süreli Cd^{+2} etkisine karşın serum toplam protein içeriğinde herhangi bir değişimin olmadığı gözlemlenmiştir (Öner ve ark., 2008). Buna karşılık bu çalışma ile uzun süreli Cd^{+2} ve Cu^{+2} etkisinde kalan balıklarda başlangıçta doku toplam protein düzeyinde gözlenen artışın deney süresinin sonunda azalışla sonuçlandığı gösterilmiştir.

4.2.4.2. Bakır

O. mossambicus'un 28 günlük 3,2 µM Cu^{+2} etkisinde solungaç dokusunda bulunan klorit hücre sayısı ve yapısında değişikliklerle birlikte süreye bağlı solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi ve plazma Na^+ derişiminde azalma ve buna ters orantılı olarak doku Cu^{+2} düzeyinde artış gözlenmiştir (Li ve ark., 1998). Bu araştırmanın verileri, akut *in vivo* ve *in vitro* ile kronik dönemi kapsayan bu çalışma ile de desteklenmektedir. Araştırıcılar Cu^{+2} etkisi sırasında iyonik homeostazisinin korunması, toksik etkinin giderilmesi ve iyon alımının düzenlenmesi için balıkların çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik mekanizmaları aktive ettiğini belirtirken, çalışmalarında gözlenen klorit hücre sayısındaki artışın Ca^{+2} ve Na^+ dengesini

düzenlemek adına telafi mekanizmalarının verdiği tepki olarak gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Buna karşılık Grosell ve ark. (2004), *Opsanus beta*'da 12,8 ve 55,2 μM Cu^{+2}'nin 30 günlük etkisi sonrasında solungaç, karaciğer ve böbrek dokularındaki Cu^{+2} birikimine karşılık solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde herhangi bir değişikliğin olmadığını belirtmiştir. Bu çalışmada ise daha düşük Cu^{+2} derişiminde Cu^{+2} birikimi ve Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde gözlenen azalışın çalışılan türler arasında verilen tepkilere bağlı olabileceği düşünülmüştür. Araştırıcılar metallere duyulan duyarlılık ve dokulardaki yüksek ilgili bölgelere metallerin bağlanmasındaki farklılıklardan kaynaklı metal toksisitesindeki değişikliklerin metal etkilerine gösterilen farklı tepkilere neden olabileceğini belirtmiştir. Bununla birlikte metallerin dokularda birikimi ile dağılımındaki farklılıklar ve antioksidant sistem gibi hücresel savunma mekanizmalarındaki çeşitlilik türlerin metallere olan duyarlılıklarında farklılıklara neden olmaktadır (Grosell ve ark., 2002; Taylor ve ark., 2003; Garcia-Santos ve ark., 2006). Blanchard ve Grosell (2006), *Fundulus heteroclitus*'un 30 günlük 30 ve 150 μg Cu^{+2}/L etkisinde Na^+ alımındaki indirgenmeyle ilişkili Na^+/K^+-ATPaz aktivitesindeki inhibisyonun, tüm vücut yapısında Na^+ düzeyinde azalmaya neden olduğunu belirtmiştir. Ay ve ark. (1999), 0,5-4,0 mg/L derişim aralığındaki Cu^{+2} ve Pb^{+2}'nin 14 gün süreyle *Tilapia zillii*'ye olan etkilerini inceledikleri çalışmalarında, solungaç dokusunda Cu^{+2} ve Pb^{+2} birikimi ve buna bağlı Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde inhibisyon kaydetmişlerdir. Bununla birlikte karaciğer dokusunda metallerin birikimine karşın kas dokusunda Cu^{+2} birikimi gözlenmemiştir. Araştırıcılar Na^+/K^+-ATPaz aktivitesindeki değişikliklerin balık türü, metal ve *in vivo* ile *in vitro* uygulamalarda olduğu gibi etki koşullarına bağlı olarak değişiklik gösterebileceğini belirtirken, derişime bağlı Na^+/K^+-ATPaz aktivitesindeki azalış sonucunda metallerin iyonoregülatör ve osmoregülatör mekanizmaları etkilediklerini vurgulamışlardır. Alabalık *Salmo gairdneri*'nin 55 μg Cu^{+2}/L'nin 28 günlük etkisi sonrasında solungaçlarda Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi ile solungaç, karaciğer ve kas dokularında Cu^{+2} birikimi ve toplam mikrozomal protein düzeyi ölçülmüştür. Elde edilen verilere göre Cu^{+2}'nin 24 saatlik etkisi sonrasında % 33'lük Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde görülen azalma 14. günde mikrozomal protein düzeyinde artış olması nedeniyle normal değerine ulaşmıştır.

Bununla birlikte solungaç ve karaciğerde etki süresinin başlangıcında artış gösteren Cu^{+2} birikimi daha sonra zamana bağlı olarak azalış göstermiştir, toplam mikrozomal protein düzeyinin ise etki süresince arttığı gözlenmiştir (Lauren ve McDonald, 1987). Buna karşın bu çalışmada ise hem solungaç hem de böbrek dokusunda tüm süreler için Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinde gözlenen önemli düzeydeki azalışların yanında etki süresine bağlı dokularda Cu^{+2} birikimi ve toplam protein düzeyinde ise başlangıçta artış deney süresinin sonunda ise düşüş gözlenmiştir. Bu durum da çalışmaların farklı laboratuar koşullarında yapılması ve metal tipine özgü değişik balık türlerinin verdiği tepkilerin farklı olmasından kaynaklanabilmektedir. Diğer toksik maddelerle karşılaştırıldığında Cu^{+2} toksisitesinin Hg^{+2}'den az Zn^{+2} ve Cd^{+2}'den yüksek olduğu bilinmektedir (Heath, 1987; Gagnon ve ark., 2006). Bununla birlikte osmoregülatör hasara neden olan en toksik metallerden olan Ag^{+}'nın de tatlı su balıklarında akut Cu^{+2} toksisitesi ile benzer mekanizmaya sahip olduğu (Morgan ve ark., 1997; Rogers ve ark., 2003; Bianchini ve ark., 2004), bu çalışmanın kronik döneminde elde edilen sonuçlarla da görülmektedir. McGeer ve ark., (2002) bir ay süreyle 7 mg Cu^{+2}/L etkisinde bıraktıkları *O. mykiss*'in plazma Na^{+} düzeyindeki azalışın Cu^{+2}'nin ilk etkisinin bir sonucu, Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin 29. günde artış göstermesinin ise homesotazisi düzenleme ve koruma amaçlı olduğunu belirtirken, kronik Cu^{+2} etkisinin iyon regülasyon hasarı ile ilişkili metabolik gereksinimde de artışa yol açtığını gözlemişlerdir. Bununla birlikte kronik subletal metal etkilerinde Na^{+}/K^{+}-ATPaz inhibisyonunun geçici olabileceği ve metal birikiminin bifazik yani birikim sonrası tekrar eski düzeylerine dönebileceği kaydedilmiştir (Lauren ve McDonald, 1987; McGeer ve ark., 2002). Buna karşılık bu çalışmada kronik metal etkilerinde genel ATPaz inhibisyonu ile birlikte Cu^{+2}, Cd^{+2} ve Zn^{+2} düzeyleri etki süreleri ile doğru orantılı olarak artış göstermiştir. *İn vivo* metal etkilerinde enzim inhibisyonun homeostatik düzenleme ile telafi edilmesi sonucu enzim aktivitesi normal düzeylerine dönebilmektedir. Bu durum da enzim sayısındaki ve geri dönüşüm oranındaki artışla gerçekleşebilmektedir (Ay ve ark., 1999). Monteiro ve ark. (2005), *O. niloticus*'u 40 ve 400 µg Cu^{+2}/L'nin 21 günlük etkisine bırakmışlar ve deney süresinin sonunda solungaç Cu^{+2} birikiminde zamana bağlı artışla buna ters orantılı olarak solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinde azalma gözlemlemişlerdir. Bununla

birlikte % 100 Na^+/K^+-ATPaz inhibisyonunun 3. günde gözlenmesine karşın, plazma Na^+ ve Cl^- düzeylerindeki yavaş azalışın uzun süreli etkilerde telafi mekanizmalarının devreye girmesi ile bağlantılı olabileceği bildirilmiştir. Bununla birlikte araştırıcıların besin kaynağı olarak yaygın kültürü yapılan dirençli bir tür olan *O. niloticus*'un solungaçlarında Cu^{+2} birikimine bağlı Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde gözlenen inhibisyon ve plazma iyon düzeylerindeki azalışla kanıtlanan osmoregülatör hasara bağlı olarak su kirliliğinde önemli bir belirteç olarak kullanılabileceğini yorumlamaları bizim çalışmamızın sonuçları ile de desteklenmektedir. *O. niloticus* plazmasında Cu^{+2}'nin uzun süreli etkileri sonunda protein ve Ca^{+2} düzeylerinde azalış kaydedilmiştir. Buna karşın plazma K^+ düzeylerinin Cd^{+2} ve Cu^{+2} etkisinde gösterdiği artış, özellikle solungaç ve böbrek dokularında azalan K^+ düzeyleri ile farklılık göstermektedir. Plazma iyon düzeyindeki artışa karşın aynı iyon derişiminin dokularda azalış göstermesi, metal etkisi sonrasında dokularda hücre geçirgenliği hasarına bağlı iyon kaybı ve iyonların kana geçişinden kaynaklanabilmektedir (Pelgrom ve ark., 1995).

Hoyle ve ark. (2007), kedi balığı *Clarias gariepinus*'u besin yoluyla 1500 mg/kg k.a. derişimindeki Cu^{+2}'nun 30 günlük etkisinde bırakmışlardır. Deney süresinin sonunda bağırsak, karaciğer ve solungaçlarda sırasıyla 20, 5 ve 4 katı Cu^{+2} birikimi gözlemişlerdir. Bununla birlikte Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi ve doku elektrolit düzeylerinde bozulmaların gerçekleştiğini kaydetmişlerdir. Bu çalışmada benzer şekilde solungaç dokusunda Cu^{+2} etkisinde yaklaşık üç katı birikime bağlı Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde azalmalarla birlikte doku iyon düzeylerinde bozulmalar gözlenmiştir.

4.2.4.3. Çinko

Atlı ve Canlı (2007), 14 günlük 5, 10 ve 20 µM derişimlerindeki Zn^{+2} ile birlikte Cd^{+2}, Cu^{+2} ve Pb^{+2} etkisinde kalan *O. niloticus*'un çeşitli dokularında Na^+/K^+-ATPaz ve Ca^{+2}-ATPaz'ın da dahil olduğu farklı biyokimyasal parametreleri incelemişlerdir. Buna göre solungaç ve bağırsak Na^+/K^+-ATPaz ile kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin önemli düzeyde azalış gösterdiğine ilişkin bulguları bu çalışma ile de

genellikle uygunluk göstermektedir. Sonuç olarak araştırıcılar metal tipi ve derişimlerine bağlı olarak değişiklik gösteren tepkileri ve duyarlılıkları nedeniyle ATPaz enzimlerinin çevre kirliliği çalışmalarında önemli birer belirteç olabileceklerini vurgulamışlardır. Benzer şekilde 100 günlük 3 mg Cd^{+2}/L, 75 mg Cu^{+2}/L ve 250 mg Zn^{+2}/L etkisinden sonra *O. mykiss*'de metallere göre farklı tepkiler gözlenmesinin yanında Cu^{+2} etkisinde solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinde artış ve tüm vücutta metal etkilerinde Na^{+} ve Ca^{+2} dengesinde hasar gözlenmiştir (McGeer ve ark., 2000). Lorz ve McPherson (1976), akut (6 gün) ve kronik (172 gün) Cu^{+2} ve Zn^{+2} etkisinde bıraktıkları *Onchorhynchus kisutch*'da kısa süreli 5-80 µg Cu^{+2}/L etkisinde solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin derişime bağlı azalış göstermesine karşın 100-6000 µg Zn^{+2}/L etkisinin ise pek etki göstermediğini belirtmiştir. Buna karşın uzun süreli 5-30 µg Cu^{+2}/L etkisinin akut sürece göre Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesini daha az etkilediğini belirtmişlerdir. Buna karşılık elde edilen sonuçlara göre bu çalışmada Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin hem akut hem de kronik metal etkilerinde genel bir azalış göstermesi uygulanan metal derişimlerine bağlı olabildiği gibi kronik metal etki süresi ve balık türü ile de ilişkili olabilir. Alabalık *Salmo gairdneri* ile yapılan farklı sıcaklık koşullarındaki 30 günlük *in vivo* Zn^{+2} (0,3-2,0 mg/L) etkisinde enzim aktivitesi genellikle artış göstermiştir. Araştırıcılar Zn^{+2}'nin solungaç epitel hücre membranlarında Ca^{+2} ve Mg^{+2} bağlama bölgeleri için yarışarak solungaç geçirgenliğinde artışa neden olabileceğini bildirmişlerdir. Böylece genel solungaç ATPaz aktivitesindeki değişikliklerin sonucunda solungaç geçirgenliğindeki artışa bağlı iyon kaybının gözlenebileceği belirtilmektedir. İyon derişimindeki indirgenme tekrar elektrolit emilim oranını artırmak için solungaç ATPaz aktivitelerini uyarabilmektedir (Watson ve Beamish, 1980). Kirleticilerin ATPaz aktivitelerine etkilerini gözlemek amacıyla De La Torre ve ark. (2000), *C. carpio*'yu Arjintin'in düşük kirlilik düzeyine sahip Reconquista nehrine 30 gün süreyle bırakmışlar ve sonrasında solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin % 20 azalış göstermesine karşın, Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Araştırmanın sonucunda balığın verdiği tepkilerin kirletici tipinden çok kirleticinin yoğunluğuna bağlı olduğu ve tepkilerin epitelyal taşınmanın fizyolojik ve morfolojik bütünlüğünün doğrudan etkilenmesi veya dolaylı olarak endokrin sistemin hasar

görmesi sonucu gözlendiği vurgulanmıştır. Bununla birlikte araştırıcılar Toplam-ATPaz aktivitesinde gözlenen artışın, artan ATP hidrolizi oranını desteklemek amaçlı enerji gereksinimi ve metabolizma hızındaki artışı yansıttığını belirtmişlerdir. ATPaz enzimlerinin, kirletici etkilerine verdikleri tepkilerin hücresel aktivite düzeyinde taşıdığı anlam nedeniyle çevresel gözlem programlarında toksikolojik belirteç olarak kullanımı önem taşımaktadır.

4.2.4.4. Krom

Doza ve süreye bağlı metal etkisinin gözlendiği bir çalışmada, *Periophthalmus dipes* 5, 10 ve 15 mg/L Cr^{+6} etkisine 2, 4 ve 6 gün süreyle bırakıldıktan sonra solungaç, böbrek ve bağırsak dokularında ATPaz enzim aktivitelerine bakılmıştır (Thaker ve ark., 1996). Buna göre araştırıcılar derişime ve süreye bağlı genel bir inhibisyonun gözlenmesine karşın, enzim aktivitesinin azalmasında etki süresinin daha önemli olduğuna dikkat çekmişlerdir. Bu tezin sonuçlarında da gözlendiği gibi Cr^{+6}'nın akut süreçte Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesine olan etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmazken kronik süreçte azalışa neden olmuştur. Bununla birlikte Thaker ve ark. (1996), bazı Cr^{+6} derişimlerinde enzim aktivitelerinde artış da gözlediklerini kaydetmiş, Cr^{+6}'nın dokularda osmoregülatör sistemi bozup iyon ve metabolitlerin emiliminden sorumlu aktif taşıma sistemini bloke ederek ATPaz enzim aktivitelerinde inhibisyona neden olduklarını bildirmişlerdir. Bir balık türü olan *Anabas scandens*'in 30 günlük 25 mg/L Cr^{+3} ve Cr^{+6} etkisi sonrasında böbrek ve karaciğer Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinde inhibisyon gözlenirken, Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinde başlangıçta artış daha sonra azalış görüldüğü belirtilmiştir (Venugopal ve Reddy, 1993).

Channa punctata (Bloch)'un Cr^{+6} ile birlikte Cd^{+2}, Cu^{+2}, Pb^{+2} ve Hg^{+2} gibi çok sayıda metal içeren % 1'lik kağıt fabrikası atıklarının 15, 30 ve 60 gün süreyle etkisinde kalması sonrasında gözlenen solungaç Toplam-ATPaz, Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktivitelerinde önemli düzeydeki azalmalar (Parvez ve ark., 2006), metallerin uzun süreli etkileri sonunda bu çalışmada gözlenen genel ATPaz inhibisyonu sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Buna karşın araştırıcılar, ATPaz

inhibisyonunun zamana bağlı protein azalışı ile ilişkili olmadığı görüşünü ileri sürmüşlerdir. Kirletici etkilerinin neden olduğu Na^+/K^+-ATPaz aktivitesindeki azalmanın enerji bağlantılı hasarlara yol açtığı ve sonuçta temel metabolik ve fizyolojik aktiviteleri etkilediği belirtilmiştir. Solungaç epitelinden Mg^{+2} iyonunun taşınmasından sorumlu Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi, Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi ile ilişkili olarak hücresel zar bütünlüğünün ve solungaç geçirgenliğinin korunmasından sorumludur. Metal etkilerinde Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinde gözlenen azalma enzimin oksidatif fosforilasyonda görev alması nedeniyle ATP üretiminin indirgenmesine yol açabilmektedir (Parvez ve ark., 2006).

Canlı (1995), serum protein düzeyinin 0,01 ve 0,1 mg/L derişimindeki Hg^{+2} ile 2,0 ve 20 mg/L derişimindeki Cr^{+6} ve Ni^{+2}'nin 7 gün süreyle etkisinde kalan *C. carpio*'da önemli oranda değişmediğini göstermiştir. Buna karşılık Cr^{+6}'nın daha uzun süreli etkilerinde dokulardaki toplam protein düzeylerini değiştirebileceği bu çalışma ile gösterilmiştir.

4.2.4.5. Gümüş

Ag^+ toksisitesinin gözlendiği bir tatlı su organizması olan *Daphnia magna*, 0,04 mg Ag^+/L'nin 21 gün etkisinde bırakılmış ve bu süre sonunda % 20 ölümle birlikte Na^+ alım ve Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde azalış gözlenmiştir (Bianchini ve Wood, 2002). Araştırıcılar kronik Ag^+ etkisi sonrasında % 60 Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde azalışa bağlı Na^+ kanallarının inhibisyonunun düşük Na^+ alımının nedeni olduğunu belirtmişlerdir. Ag^+'nın Na^+/K^+-ATPaz enziminin α-alt ünitesinde Mg^{+2} bağlama bölgesi ile yarışarak, ATP hidrolizini engelleyip enzimi inhibe ettiği ve böylece düşük Na^+ alımı ile iyonoregülatör sistemin bozulması ve sonuçta balık ölümlerine neden olduğu belirtilmiştir (Wood ve ark., 1999; Bianchini ve Wood, 2002). Alabalıkta kronik Ag^+ etkisi sonrasında Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde gözlenen inhibisyonun akut Ag^+ etkisi ile en azından bu anlamda örtüştüğü bildirilmiştir (Brauner ve Wood, 2002). Bu sonuç kronik ve akut Ag^+ etkisinde kalan *O. niloticus* Na^+/K^+-ATPaz aktivitelerinde görülen hasarla da desteklenmektedir. Webb ve ark. (2001), deniz balıklarında akut ve kronik Ag^+ etkilerini inceledikleri çalışmalarında,

250-650 µg Ag^{+}/L'nin *Oligocottus maculosus*'a olan akut etkisi ile 1,5-50 µg Ag^{+}/L'nin *O. maculosus*, *Porichthys notatus* ve *Onchorhynchus mykiss*'a kronik etkileri (21 gün) sonunda balıkta metabolik oranın büyük bir bölümünü oluşturan (% 20-40) Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin etki süresi ve metal derişimine bağlı olarak hem artış hem de azalış gösterdiğini kaydetmişlerdir. İnhibitör ve telafi dengeleri arasındaki farka bağlı olarak gözlenen etkilerdeki çeşitliliğe karşın, kronik Ag^{+} etkisinin her koşulda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinde değişikliğe neden olduğu gözlenmiştir. Kronik süreçte artan Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin telafi amaçlı gözlendiği, azalışın ise derişime bağlı olduğu belirtilmiştir.

Galvez ve ark. (2001), 128 gün süreyle 3.1 veya 0,05 µg Ag^{+}/g (besin yoluyla) etkisindeki *O. mykiss*'in protein düzeylerinin de değişmediğini göstermişlerdir. Buna karşın, Öner ve ark. (2008)'nın yaptıkları çalışmada, *O. niloticus* plazmasının protein düzeylerinde Ag^{+}'nın kısa süreli etkilerinde artış ile birlikte plazma Na^{+} iyon düzeylerinde gözlenen azalışın, bu çalışmadaki doku Na^{+} düzeyindeki azalışla paralellik gösterdiği belirtilmiştir.

4.2.5. Toplam Metal Düzeyi

Dokularda metal birikimlerinin erken fazda daha hızlı olmasının, dokularda metal bağlayan ligantların hızla doyuma ulaşmasından kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Wong ve Wong, 2000). *O. niloticus* dokularında akut dönemde genellikle doza, kronik dönemde ise süreye bağlı metal birikimi gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, akut dönemde solungaç dokusunda tüm metallerin birikim gösterdiğini, en yüksek derişimde yaklaşık 15 kat birikim gösteren Cd^{+2} dışında diğer metallerin yaklaşık 2-5 kat biriktiğini göstermiştir. Bununla birlikte böbrek dokusunda hem diğer dokular hem de metaller arasında yaklaşık 95 kat ile en yüksek birikim gösteren Cd^{+2} dışında, kas dokusunda Cd^{+2}, Cu^{+2} ve Zn^{+2} birikimi yaklaşık 2-4 kat oranında olmuştur. Buna karşın, kronik dönemde ise solungaç dokusunda 17 kat ile Cd^{+2} en fazla birikimi gösterirken, Cu^{+2} ve Zn^{+2} birikim düzeyleri 2-3 kat oranında gözlenmiştir. Böbrek dokusunda ise 61 kat ile Cu^{+2} en yüksek birikim düzeyine sahipken, Cd^{+2} 14 kat, Zn^{+2} de 2 kat birikim göstermiştir. Kas dokusunda

sadece Cd^{+2} ve Cu^{+2} kontrole göre 5 kat birikim göstermiştir. Metallerin (1 µg/mL Cd^{+2}, Cu^{+2}, Zn^{+2}, Pb^{+2} ve Fe^{+2}) *O. niloticus* karaciğerinde metallothinein benzeri proteinlerin doğal bulunumu üzerine olan etkilerinin incelendiği çalışmada, 10 günlük etki sonrası metal birikimine de bakılmış ve deney süresinin sonunda tüm metal düzeylerinde kontrol değerlerine göre artış olmakla birlikte yaklaşık 8 kat artışla en yüksek oranda birikim gösteren Cd^{+2}, aynı zamanda karaciğerde metallothionein benzer proteinlerin artışına da neden olmuştur (Atlı ve Canlı, 2003). Bununla birlikte aynı derişimlerde Cd^{+2}, Cu^{+2}, Zn^{+2} ve etkileşimlerinin *O. niloticus* karaciğerine olan etkilerinin incelendiği bir diğer çalışmada da metallerin tek tek veya birlikte etkilerinin birikim düzeylerinde değişikliğe neden olması ile birlikte yüksek Cd^{+2} birikiminin yanında Zn^{+2} düzeyindeki azalışın balıkta Zn^{+2} düzenlemesinin varlığına işaret ettiği bildirilmiştir (Heath,1987; Lange ve ark., 2002; Eroğlu ve ark., 2005). Eboh ve ark. (2006) Nijerya'da yaptıkları çalışmada *O. niloticus*'un solungaç, karaciğer ve kas dokusunda Cu^{+2} ve Zn^{+2} düzeyinin 0,001 mg/100 g ile 0,002 mg/100 g arasında değiştiğini, Cr^{+6} düzeyinin ise 0,0001 mg/100 g olduğunu belirtmişlerdir. Morgan ve Wood (2004), 2,5-22,5 µg Ag^{+}/L ($AgNO_3$)'nin 24 saatlik etkisi sonrasında *O. mykiss*'in solungaç dokusunda derişime bağlı Ag^{+} birikiminin yaklaşık 60-250 ng/g aralığında gözlendiğini ve Ag^{+} birikiminin solungaçlardan Na^{+} alımı ve Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinde inhibisyona neden olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada da Ag^{+} birikimi sadece akut süreçte solungaç dokusunda gözlenebilmiştir. Hollis ve ark. (2000), *O. mykiss*'i 2 µg Cd^{+2}/L'nin 30 günlük etkisinde bırakmış ve solungaç, böbrek ve karaciğerde Cd^{+2} birikiminin süreye bağlı olarak önemli düzeyde artış gösterdiğini belirtirken en yüksek Cd^{+2} düzeyinin yaklaşık 9 µg Cd^{+2}/g y.a. ile böbrekte gözlemişlerdir. Bu çalışmanın kronik sürecinde ise benzer şekilde Cd^{+2}, süreye bağlı olarak dokularda birikmiş, buna karşın en yüksek oranda solungaç dokusunda ölçülmüştür. Bununla birlikte *O. mykiss* 7 mg Cu^{+2}/L etkisinde bir ay süreyle kalmış ve etki sonrası karaciğer ve solungaçta Cu^{+2} düzeyinde artış olmasına karşın kronik Cu^{+2} toksisitelerinin değerlendirilmesinde doku metal birikiminin zayıf bir belirteç olduğu belirtilmiştir (McGeer ve ark., 2002). Bury (2005), 8.3 nM Ag^{+}'nın 21 gün süreyle etkisinde kalan *O. mykiss*'in solungaç, böbrek ve karaciğerinde Ag^{+} birikimine ve

Ag^{+}'nın Na^{+} dengesine olan etkisine bakmış ve Ag^{+} düzeyinin böbrekte 7. günde arttığını ve 21. güne kadar sabit kaldığını belirtmiştir. Bununla birlikte karaciğerin ve böbrek dokusunun Ag^{+} birikimi için depo organ olduğu bildirilmiştir. Solungaç dokusundan vücuda giren Ag^{+}'nın hızla birkaç saat içerisinde burada birikebildiği belirtilirken, 7. ve 21. günde Ag^{+} düzeyindeki düşüşün apikal Ag^{+} girişindeki indirgenmeden kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Sucul ortamda genellikle 1-100 ng/L düzeyinde gözlenen Ag^{+}'nın serbest iyonik formda (Ag^{+}) özellikle tatlı su organizmaları için oldukça toksik olduğu belirtilmiş ve solungaçlarda biriken Ag^{+}'nın metal bağlayan yüksek molekül ağırlıklı protein ve metallothioneinlerle depolanması sonucu Ag^{+} alımının engellendiği ve böylece solungaç dokusunda serbest Ag^{+}'nın düşük düzeyde tutulduğu vurgulanmıştır. Dokuda Ag^{+} birikim düzeyine bağlı olarak özellikle karaciğerde metallothionein derişiminin artması, Ag^{+} toksisitesinin engellenmesinde görev yapmaktadır (Roesijadi, 1992; Galvez ve ark., 2002). Buna karşılık bu tez çalışmasında kronik etkide Ag^{+} birikimi dokularda saptama sınırını aşmadığından gözlenememiştir. Bu çalışmayla ayrıca, Ag+ ve Cr+6 birikiminin gözlenebilmesinin bu metallerin daha yüksek ve uzun süreli etkilerine bağlı olabileceği görülmektedir.

Yapılan araştırmalar, su ortamı ile doğrudan ilişkili ince, yoğun ve büyük bir yüzey alanı oluşturan solungaç dokusunun gaz alışverişi, iyon düzenlenmesi ve metabolik atıkların atımından sorumlu bir organ olarak kirletici etkilerinde birincil hedef olduğunu ve metal birikimine bağlı histopatolojik değişikliklerle birlikte artan epitelyum geçirgenliği, aktif iyon alımı ve Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesindeki indirgenme ile ilişkili osmoregülatör hasarı gösterdiğini belirtmişlerdir (Heath, 1987; Monteiro ve ark., 2005). Solungaç epitelinin apikal membranında düşük metal derişimleri için yüksek ilgili-düşük kapasiteli bağlama bölgeleri ve yüksek metal düzeylerinde görev alan düşük ilgili-yüksek kapasiteli bağlama bölgeleri olmak üzere iki tip Cu^{+2} bağlayan bölge olduğu bildirilmiştir (Monteiro ve ark., 2005). Solungaç yüzey bağlama bölgeleri doyduğunda metal hücre içi bölümlere geçerek birikim göstermektedir başka bir deyişle dokuda metal birikimi, metallerin alınım oranları atılım oranlarını aştığında gözlenmektedir ve metal tipi, derişimi, etki süresi ile sertlik, pH, tuzluluk ve sıcaklık gibi suyun fizikokimyasal yapısından

etkilenmektedir (Heath, 1987; Canlı ve Furness, 1993; Kalay ve Canlı, 2000; Canlı ve Atlı, 2003). Metal birikiminin genel mekanizması, sırasıyla şok, onarım ve uyum olmak üzere üç fazda gerçekleşen hasar-onarım modeli ile açıklanmaktadır (McDonald ve Wood, 1993). Buna göre ilk aşama olan şok fazında gözlenen fiziksel hasar öncelikle solungaç dokusunda gözlenmektedir ve fizyolojik homeostazi hasarı ile ilişkili olan bu faz genellikle kısa sürelidir (birkaç gün). İkinci aşama olan onarım fazının fizyolojik hasarı onarmak için mitoz, artan protein sentezi gibi biyosentetik mekanizmaların artışını içermesinin yanında metallothionein gibi metal bağlayan proteinlerle, metallerin zararlı etkilerinden korunmak için iyon düzenlenmesi ile ilgili diğer sistemlerin aktive olması da bu faz içerisinde gerçekleşmektedir. Üçüncü aşama olan uyum fazı ise uzun süreli metal etkilerinde artan dirençlilik olarak tanımlanmakta ve organizmaların iç fizyolojilerinin etki öncesi durumuna dönmesi veya yeni bir denge oluşturmalarını kapsamaktadır (Lauren ve McDonald, 1987; Pelgrom ve ark., 1995; McGeer ve ark., 2000). Buna karşın bu çalışmanın uzun süreli metal etkilerinde gözlenen sonuçlar genel olarak onarım ve uyum mekanizmalarının *O. niloticus* dokularında indüklenemediğini göstermesi aynı türle çalışan Monteiro ve ark. (2005)'nın sonuçları ile de vurgulanmıştır. Metallerin 5-20 µM derişimlerinin 14 günlük etkileri sonunda dokulardaki toplam metal birikim sonuçlarına göre ise solungaçlarda Zn^{+2} dışında diğer metaller doza bağlı bir artış göstermiş buna karşın, karaciğerde sadece Cd^{+2} ve Pb^{+2} ile kas dokusunda Zn^{+2} ve Cd^{+2} en yüksek derişimlerde birikim göstermişlerdir (Atli ve Canlı, 2008a). Bu tez çalışmasında ise metal etkilerinde Ag^{+} ve Cr^{+6} dışında diğerleri süreye bağlı birikim göstermiştir, kas dokusunda ise Zn^{+2} birikim göstermemiştir. Kronik düşük derişimli metallerin toksik etkileri önemli bir küresel sorun olarak ilgi çekmekte ve etki sonrasında metaller serbest sülfidril gruplarına olan ilgilerine bağlı biyolojik aktiviteleri engellemekte, esansiyel element durumlarını etkileyerek detoksifikasyon mekanizmalarını indirgeyebilmektedir (Heath, 1987; Quig, 1998).

Özetle, *O. niloticus* dokusunda akut ve kronik metal etkileri genel olarak karşılaştırılırsa; Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Ca^{+2}-ATPaz aktivitelerinin akut ve kronik metal etkilerinde azaldığı gözlenmiştir. Buna karşın Mg^{+2}-ATPaz ve Toplam-ATPaz aktiviteleri ise akut süreçte değişiklik göstermedikleri durumlar dışında genel bir

azalış, kronik dönemde ise süreyle doğru orantılı bir artış göstermişlerdir. Buna göre Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Ca^{+2}-ATPaz enzimlerinin diğerlerine göre metal etkilerine göre daha duyarlı oldukları gözlenmiştir. Toplam protein düzeyi ise akut dönemde azalış ya da değişikliğin olmadığı yönde etki gösterirken kronik dönemde ise genelde başlangıçta artış daha sonra ise azalış yönünde etki göstermiştir. Akut metal etkilerinde derişime bağlı metal birikimi kronik dönem kıyaslandığında daha fazla gözlenmiş ve solungaç dokusunun metal birikimi yönünden incelendiğinde diğer dokulara göre daha duyarlı olduğu buna karşın metal düzeylerinin ise böbrek dokusunda daha yüksek gözlendiği belirlenmiştir. Toplam iyon düzeyleri incelendiğinde ise metallerden en çok etkilenen iyonun Na^{+} olduğu ve bunu sırasıyla Ca^{+2}, K^{+} ve Mg^{+2}'nin izlediği görülmüştür. Na^{+} düzeyinin tüm dokularda akut ve kronik metal etkilerinde benzer şekilde azalış gösterdiği, K^{+} iyonunun solungaç dokusunda benzer eğilim göstermesine karşın kas dokusunda sadece akut metal etkilerinde azalış, böbrek dokusunda ise her iki süreçte de azalış gösterdiği görülmüştür. Tüm dokularda Ca^{+2} düzeyleri en çok akut metal etkilerinde artış gösterirken kronik metal etkilerinde değişiklik göstermemiştir. Mg^{+2} iyon düzeyleri ise solungaç ve kas dokusunda pek etkilenmezken, böbrekte daha çok artış göstermiştir. Elde edilen sonuçlar enzim aktiviteleri ile diğer ölçülen parametrelerin metallere verdikleri tepkilerinin, derişim ve süresi ile metal tipi ve doku tipine bağlı olarak değiştiğini göstermiştir. Buna benzer şekilde daha önce enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmalarda görev alan parametrelerle yapılan çalışmalar bu durumu desteklemektedir (Atlı ve ark., 2006; Atlı ve Canlı, 2008a,b). Akut ve kronik metal etkisinin karşılaştırıldığı diğer bir çalışmada ise Miller ve ark. (2007), alabalık *O. mykiss*'i 96 saatlik 0-2,67 mg Se^{+2}/L ve 30 günlük 0-0,16 mg Se^{+2}/L etkisinde bırakmışlar ve akut ile kronik Se^{+2} etkisinde solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin değişmediğini gözlemlemişlerdir. Araştırıcılar enzimin metal etkisine tepki vermeme nedeninin uygulanan metal derişimi ve süresinin enzim aktivitesini uyarmada yetersiz kalması ile ilişkili olabileceği görüşüne varmışlardır.

Tatlı su kirliliği ile ilgili ortamın fizikokimyasal analizi ve sudaki toksisitenin tanımlanmasına yönelik araçların geliştirilmesi temel alınarak yapılan geleneksel çalışmaların yanında artık günümüzde doku ve vücut sıvılarında kimyasal maddeler,

toksik metabolitler, enzim aktiviteleri veya diğer biyokimyasal değişiklerin analizleri gibi toksik maddelerin biyolojik sistemleri nasıl etkilediğini gösteren belirteçlerin kullanımı önem kazanmaktadır. Molekül derişimlerinin ölçümü ile saptanan değişiklikler olarak tanımlanan toksisite belirteçleri kirletici etkisi ile risk değerlendirme mekanizmalarını birbirine bağlamaktadır. Belirteç sözcüğü ise ortamdaki biyolojik yapı ile stres etkeni arasındaki kimyasal, fiziksel veya biyolojik olabilen etkileşimi yansıtan ölçüm parametrelerini içine alan geniş bir alan için kullanılmaktadır (De La Torre ve ark., 2007).

Antropojenik aktiviteler sonucu sucul ekosisteme salınan çeşitli derişimlerdeki metabolizma için gerekli olan ve olmayan metaller, sucul organizmalarda dış görünüş ve davranışlardaki büyük değişimlerden önce ilk etkilerini doku ve hücresel düzeyde göstermektedir. Günümüzde farklı türlerde biyolojik belirteçlerle yapılan çevresel gözlemin, su kirliliğinin yol açtığı kronik etkilerin ekolojik öneminin değerlendirilmesinde ve nicel cevap sağlaması yönünden yararlı olduğu bilinmektedir (De La Torre ve ark., 2005, Monserrat ve ark., 2007; Atlı ve Canlı, 2008a). Sucul organizmalar genellikle metallerin akut etkilerinden çok düşük düzeylerinin uzun süreli etkilerine maruz kalmaktadır. Akut ve kronik stres altında sucul organizmalarda özgün moleküler, biyokimyasal, fizyolojik ve morfolojik tepkileri kapsayan farklı ekolojik değişiklikler gözlenebilmektedir. Kronik etki sırasında toksik maddeye karşı gelişen dirençliliğe bağlı olası uyum mekanizmalarının indüklendiği görülebilmektedir (McDonald ve Wood, 1993; Silvestre ve ark., 2005). Elde edilen bulgular ışığında enzim aktivitelerinde akut ve kronik metal etki mekanizmalarındaki metal tipi, derişimi ve etki süresindeki farklılıklara bağlı değişiklikler gözlenmiştir. Buna göre enzim aktivitesindeki azalışlar, metal birikimi, iyon ve protein düzeyindeki değişiklikler, enzim yapısındaki –SH gruplarına metallerin bağlanması, dokudaki yapısal farklılıklar ile bunlara bağlı gelişen iyon ve osmoregülatör sistem bozukluklarından kaynaklanabilmektedir. Bunun dışında enzim aktivitesinde özellikle kronik süreçte gözlenen artışlar ise metallothionein ve antioksidan sistemler gibi olası telafi ve onarım mekanizmalarının devreye girmesi ile açıklanabilmektedir. Bu anlamda metallerin kısa süreli yüksek derişimlerinin etkisinin değerlendirilmesi yanında

özellikle uzun süreli çevresel düzeylerine daha yakın düşük derişimdeki metallerin etkilerinin değerlendirilmesi çevresel risk değerlendirilmesinde daha fazla önem kazanmaktadır.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

1. *O. niloticus* akut uygulamada, 0,1-1,5 µg/mL derişimindeki metallerin (Cd^{+2}, Cu^{+2}, Zn^{+2}, Cr^{+6}, Ag^{+}) 96 saatlik etkisine, kronik uygulamada ise 0,05 µg/mL derişimindeki metallerin 0-30 günlük etkisine bırakılmıştır. Kronik Ag^{+} etkisinde 16. günde balık ölümleri gözlenmiştir.

2. ATPaz'ların karakterizasyonu yapılarak en yüksek enzim aktivitelerinin gözlendiği inkübasyon ortamları belirlenmiş ve analizler bu değerler kullanılarak yapılmıştır.

3. Akut ve kronik metal etkileri sonunda balıklarda solungaç, böbrek ve kas dokularında ölçülen ATPaz enzim aktiviteleri önemli oranda değişmiştir. Buna göre Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Ca^{+2}-ATPaz aktiviteleri metal tipi, derişimi, etki süresi ve doku tipine bağlı olarak genellikle azalış gösterirken, Toplam-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktiviteleri azalış yanında artış da göstermiştir.

4. Akut metal derişimlerinin ATPaz enzim aktivitelerine *in vitro* etkileri de incelenmiştir. Metallerin genellikle enzimleri inhibe ettiği, Mg^{+2}-ATPaz ve Toplam-ATPaz aktivitelerinde ise bazı metal derişimlerinde artışların olduğu kaydedilmiştir.

5. Toplam protein düzeyleri ise benzer şekilde doku ve metal tipi ile metallerin derişim ve sürelerine bağlı olarak artış ve ya azalış göstermiştir.

6. Deney süreleri sonunda dokularda metal birikimlerinin gözlendiği, akut metal etkilerinin özellikle solungaçta metal düzeylerini artırmıştır. Ag^{+} ve Cr^{+6} düzeylerinin ise saptama sınırlarının altında olduğu için belirlenemediği belirtilmiştir.

7. Toplam iyon düzeyleri de önemli ölçüde değişikliğe uğramış ve genellikle Na^{+} ile K^{+} düzeyleri azalış gösterirken, Mg^{+2} ile Ca^{+2} düzeyleri artış göstermiştir. Bununla birlikte metal etkilerinde en çok Na^{+} düzeyi etkilenmiş, buna karşın Mg^{+2} ise en az etkilenen iyon olmuştur.

5.2. Öneriler

1. Metal toksisitesinin belirlenmesinde erken uyarıcı sistemler olarak ATPaz enzimleri yanında antioksidan enzimler ve karbonik anhidrazı kapsayan diğer enzimatik sistemlerle birlikte metallothionein ve redükte glutatyon gibi enzimatik olmayan sistemlerde yer alan biyokimyasal parametreler de kullanılarak daha geniş bir yelpazede metal etkileri incelenebilir.

2. Biyokimyasal belirteçlerin kullanımı farklı balık türlerinde uygulanarak, metal toksisite mekanizmaları temelinde duyarlı ve dirençli türler arasında bir karşılaştırma yapılabilir.

3. Biyolojik molekül düzeylerinin yanında çevresel risk değerlendirmesinde yararlı olabilecek metal etkilerinin neden olduğu dokusal hasarın gözlenmesi için toksikolojik çalışmalarda doku histolojisine de yer verilebilir.

4. Laboratuar ortamında gerçekleştirilen deneylerin dışında biyokimyasal belirteç olarak kullanılan parametreler daha geniş zaman aralıklarında arazi çalışmalarına da uygulanırsa doğal ortamdaki metal etkilerini gözlemde çok daha hassas ve doğru sonuçlar elde edilebilir.

5. Sucul organizmaların metallere verdikleri tepkileri gözlemde, farklı sıcaklık koşullarının kullanımı ve ya metal etkileşimi gibi farklı uygulamalar yapılarak, bunların canlı metabolizmasına etkileri değerlendirilebilir. Bununla birlikte sucul organizmalarda besin ve su kaynaklı metal etkilerinin değerlendirilmesi de toksisite çalışmalarına önemli birer veri sağlayabilir.

KAYNAKLAR

AKAHORI, A., GABRYELAK, T., JOWIAK, Z., and GONDKO, R., 1999. Zinc-Induced Damage to Carp (*Cyprinus carpio* L.) Erythrocytes *In Vitro*. Biochemistry and Molecular Biology International, 47 (1): 89-98.

ALAM, M., and FRANKEL, T.L., 2006. Gill ATPase Activities of Silver Perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell), and Golden Perch, *Macquaria ambigua* (Richardson): Effects of Environmental Salt and Ammonia. Aquaculture, 251: 118–133.

ALMEIDA, J.A., NOVELLI, E.K.B., SILVA, M.D.P., and JUNIOR, R.A., 2001. Environmental cadmium Exposure and Metabolic Responses of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, Environmental Pollution, 114: 169-175.

ALMEIDA, J.A., DINIZ, Y.S., MARQUES, S.F.G., FAINE, L.A., RIBAS, B.O., BURNEIKO, R.C., and NOVELLI, E.L.B., 2002. The Use of The Oxidative Stres Responses as Biomarkers in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Exposed to In Vivo Cadmium Contamination. Environment International, 27: 673-679.

ALVES, L.C., and WOOD, C.M., 2006. The Chronic Effects of Dietary Lead in Freshwater Juvenile Rainbow Trout (*Onchorhynchus mykiss*) Fed Elevated Calcium Diets. Aquatic Toxicology, 78: 217-232.

ANDRES, S., LAPORTE, J.M., and MASON, R.P., 2002. Mercury Accumulation and Flux Across the Gills and the Intestine of the Blue Crab (*Callinectes sapidus*). Aquatic Toxicology, 56: 303–320.

ARIYOSHI, T., SHIIBA, S., HASEGAWA, H., and ARIZONO, K., 1990. Profile of Metal-binding Proteins and Heme Oxygenase in Red Carp Treated with Heavy Metals, Pesticides and Surfactants. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 44: 643-649.

ARUNKUMAR, R.I., RAJASEKARAN, P., and MICHAEL, R.D., 2000. Differential Effect of Chromium Compounds on the Immune response of the African Mouth Breeder *Oreochromis mossambicus* (Peters). Fish and Shellfish Immunology, 10: 667-676.

ATKINSON, A., GATEMBY, A.O., and LOWE, A.G., 1973. The Determination of Inorganic Ortophosphate in Biological Systems. Biochimica Et Biophysica Acta, 320: 195–204.

ATLI, G., and CANLI, M., 2003. 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, 70: 619-627.

ATLI, G., ALPTEKİN, Ö., TÜKEL, S., and CANLI, M., 2006. Response of Catalase Activity to Ag^{+}, Cd^{2+}, Cu^{2+}, and Zn^{2+} in Five Tissues of Freshwater Fish *Oreochromis niloticus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 143: 218-224

ATLI, G., and CANLI, M., 2007. Enzymatic Responses to Metal Exposures in a Freshwater Fish *Oreochromis niloticus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 145: 282–287.

———, 2008a. Responses of Metallothionein and Reduced Glutathione in a Freshwater Fish *Oreochromis niloticus* Following Metal Exposures. Environmental Toxicology and Pharmacology, 25: 33–38.

———, 2008b. Characterization of Branchial Na,K-ATPase from Three Freshwater Fish Species (*Oreochromis niloticus*, *Cyprinus carpio*, and *Oncorhynchus mykiss*). Turkish Journal of Zoology, 32: 299-304.

AVELLA, M., and BORNANCIN, M., 1989. A New Analysis of Ammonia and Sodium Transport through the Gills of the Freshwater Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). Journal of Experimental Biology, 142: 155-175.

AY, Ö., KALAY, M., TAMER, L., and CANLI, M., 1999. Copper and Lead Accumulation in Tissues of a Freshwater Fish *Tilapia zillii* and Its Effects on the Branchial Na,K-ATPase Activity. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 62: 160-168.

BANSAL, S.K., MURTHY, R.C., and CHANDRA, S.V., 1985. The Effects of Some Divalent Metals on Cardiac and Branchial Ca^{2+}-ATPase in a Freshwater Fish *Saccobranchus fossilis*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 9: 373-377.

BASHA, P.S., and RANI, A.U., 2003. Cadmium-induced Antioxidant Defense Mechanism in Freshwater Teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). Ecotoxicology and Environmental Safety, 56: 218–221.

BAY, S., GREENSTEIN, D., SZALAY, P., and BROWN, D., 1990. Exposure of Scorpionfish (*Scorpaena guttata*) to Cadmium: Biochemical Effects of Chronic Exposure. Aquatic Toxicology, 16: 311.

BAYKAN, U., ATLI, G., and CANLI, M., 2007. The Effects of Temperature and Metal Exposures on the Profiles of Metallothionein-like Proteins in *Oreochromis niloticus.* Environmental Toxicology and Pharmacology, 23: 33–38.

BERNTSSEN, M.H.G., WAAGBO, R., TOFTEN, H., and LUNDEBYE, A.K., 2003. Effects of Dietary Cadmium on Calcium Homeostasis, Ca Mobilization and Bone Deformaties in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Parr. Aquaculture Nutrition, 9; 175-183.

BIANCHINI, A., and WOOD, C.M., 2002. Physiological Effects of Chronic Silver Exposure in *Daphnia magna*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 133: 137–145.

BIANCHINI, A., and WOOD, C.M., 2003. Mechanism of Acute Silver Toxicity in *Daphnia magna.* Environmental Toxicology and Chemistry, 22 (6): 1361–1367.

BIANCHINI, A., MARTINS, S.E.G., and BARCAROLLI, I.F., 2004. Mechanism of Acute Copper Toxicity in Euryhaline Crustaceans: Implications for the Biotic Ligand Model. International Congress Series, 1275: 189– 194.

BIANCHINI, A., PLAYLE, R.C., WOOD, C.M., and WALSH, P.J., 2005. Mechanism of Acute Silver Toxicity in Marine Invertebrates. Aquatic Toxicology, 72: 67–82

BLANCHARD, J., and GROSELL, M., 2006. Copper Toxicity across Salinities from Freshwater to Seawater in the Euryhaline Fish *Fundulus heteroclitus*: Is Copper an Ionoregulatory Toxicant in High Salinities? Aquatic Toxicology, 80: 131–139.

BOGE, G., N'DIAYE, P., ROCHE, H., and PERES, G., 1989. Effects of Hexavalent Chromium at Non-lethal Concentrations on the Enzymology of the Intestine of *Salmo gairdneri* and *Dicentrarchus labrax* (Pisces). Journal of Physiology-Paris, 83 (2): 57-63.

BOUSKILLA, N.J., HANDY, R.D., FORD, T.E., and GALLOWAYA, T.S., 2006. Differentiating Copper and Arsenic Toxicity Using Biochemical Biomarkers in *Asellus aquaticus* and *Dreissena polymorpha*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 65: 342–349.

BRAUNER, C.J., and WOOD, C.M., 2002. Effect of Long-term Silver Exposure on Survival and Ionoregulatory Development in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Embryos and Larvae, in the Presence and Absence of Added Dissolved Organic Matter. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 133: 161–173.

BROOKS, S.J., and MILLS, C.L., 2003. The Effect of Copper on Osmoregulation in the Freshwater Amphipod *Gammarus pulex*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 135: 527–537.

BROUWER, M., WHALING, P., and ENGEL, D.W., 1986. Copper-metallothioneins in the American Lobster, *Homarus americanus*: Potential Role as Cu (I) Donors to Apohemocyanin. Environmental Health Perspectives, 65: 93-100.

BURY, N.R., JIE, L., FLIK, G., LOCK, R.A.C., and WENDELAAR BONGA, S.E., 1998. Cortisol Protects against Copper Induced Necrosis and Promotes Apoptosis in Fish Gill Chloride Cells In Vitro. Aquatic Toxicology, 40: 193-202.

BURY, N.R., WALKER, P.A, and GLOVER, C.N., 2003. Nutritive Metal Uptake in Teleost Fish. The Journal of Experimental Biology, 206: 11-23.

BURY, N.R., 2005. The Changes to Apical Silver Membrane Uptake, and Basolateral Membrane Silver Export in the Gills of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) on Exposure to Sublethal Silver Concentrations. Aquatic Toxicology, 72: 135–145.

CANLI, M., and FURNESS, R.W., 1993. Toxicity of Heavy Metals Dissolved in Sea Water and Influences of Sex and Size on Metal Accumulation and Tissue Distribution in the Norway lobster *Nephrops norvegicus*. Marine Environment Research, 36: 217–236.

CANLI, M., and ERDEM, C., 1994. Mercury Toxicity and Effects of Exposure Concentration and Period on Mercury Accumulation in Tissues of a Tropical Fish *Tilapia nilotica* (L.). Turkish Journal of Zoology, 18: 233-239.

CANLI, M., 1995. Effects of Mercury, Chromium and Nickel on Some Blood Parameters in the Carp *Cyprinus carpio*. Turkish Journal of Zoology, 19: 305-311.

———, 1996. Effects of Mercury, Chromium and Nickel on Glycogen Reserves and Protein Levels in Tissues of *Cyprinus carpio.* Turkish Journal of Zoology, 20: 161-168.

CANLI, M., and STAGG, R.M., 1996. The Effects of *İn vivo* Exposure to Cadmium, Copper, and Zinc on the Activities of Gill ATPases in the Norway Lobster *Nephrops norvegicus*. Archive of Environmental Contamination and Toxicology, 31: 491–501.

CANLI, M., and ATLI, G., 2003. The Relationships Between Heavy Metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) Levels and the Size of Six Mediterranean Fish Species. Environmental Pollution, 121: 129–136

CHHAYA, J., THAKER, J., MITTAL, R., NUZHAT, S., MANSURI, A.P., and KUNDU, R., 1997. Influence of Textile Dyeing and Printing Industry Effluent on ATPases in Liver, Brain, and Muscle of Mudskipper, *Periophthalmus dipes.* Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 58: 793-800.

CHOI, H.S., and EISNER, D.A., 1999. The Effects of Inhibition of the Sarcolemmal Ca-ATPase on Systolic Calcium Fluxes and Intracellular Calcium Concentration in Rat Ventricular Myocytes. European Journal of Physiology, 437: 966-971.

COUSINS, R.J., 1985. Absorption, Transport, and Hepatic Metabolism of Copper and Zinc: Special Reference to Metallothionein and Ceruloplasmin. Physiological Review, 65: 238-309.

DAUTREMEPUITS, C., PARIS-PALACIOS, S., BETOULLE, S., and VERNET, G., 2004. Modulation in Hepatic and Head Kidney Parameters of Carp (*Cyprinus carpio* L.) Induced by Copper and Chitosan. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 137: 325–333.

DANG, Z.C., FLIK, G., DUCOURET, B., HOGSTRAND, C., WEDELAAR BONGA, S.E., and LOCK, R.A.C., 2000. Effects of Copper on Cortisol Receptor and Metallothionein Expression in Gills of *Oncorhynchus mykiss.* Aquatic Toxicology, 51: 45–54.

DANG, Z.C., BERNTSSEN, M.H.G., LUNDEBYE, A.K., FLIK, G., WENDELAAR BONGA, S.E., and LOCK, R.A.C., 2001. Metallothionein and Cortisol Receptor Expression in Gills of Atlantic Salmon, *Salmo salar*, Exposed to Dietary Cadmium. Aquatic Toxicology, 53: 91–101.

DAUTREMEPUITS, C., PARIS-PALACIOS, S., BETOULLE, S., and VERNET, G., 2004. Modulation in Hepatic and Head Kidney Parameters of Carp (*Cyprinus carpio* L.) Induced by Copper and Chitosan. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 137: 325–333.

DAVIES, P.H, GOETTL, J.P.J.R., and SINLEY, J.R., 1978. Toxicity of Silver to Rainbow Trout (*Salmo Gairdneri*). Water Research, 2: 113-117.

DAWSON, A.P., 1982. Kinetic Properties of the Ca^{2+}-accumulation System of a Rat Liver Microsomal Fraction. Biochemical Journal, 206: 73-79.

DE BOECK, G., HATTINK, J., FRANKLIN, N.M., BUCKING, C.P. WOOD, S., WALSH, P.J., and WOOD, C.M., 2007. Copper Toxicity in the Spiny Dogfish (*Squalus acanthias*) Urea Loss Contributes to the Osmoregulatory Disturbance. Aquatic Toxicology, 84: 133-141.

DE CONTO CINIER, C., PETIT-RAMEL, M., FAURE, R., and BORTOLATO, M., 1998. Cadmium Accumulation and Metallothionein Biosynthesis in *Cyprinus carpio* Tissues. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 61: 793–799.

DE LA TORRE, F.R., SALIBIAN, A., and FERRARI, L., 2000. Biomarkers Assessment in Juvenile *Cyprinus carpio* Exposed to Waterborne Cadmium. Enviromental Pollution, 109: 277-282.

_____, 2005. Biomarkers of a Native Fish Species (*Cnesterodon decemmaculatus*) Application to the Water Toxicity Assessment of a Peri-urban Polluted River of Argentina. Chemosphere, 59: 577–583.

_____, 2007. Assessment of the Pollution Impact on Biomarkers of Effect of a Freshwater Fish. Chemosphere, 68: 1582-1590.

DI COSTANZO, A., MEISKE, J.C., PLEGGE, S.D., PETERS, T.M., and GOODRICH, R.D., 1990. Within-herd Variation in Energy Utilization for Maintenance and Gain in Beef Cows. Journal of Animal Science, 68: 2156-2165.

DIAZ, M., COZZI, S., ALMANSA, E., CASARIEGO, M., BOLANOS, A., CEJAS, J., and LORENZO, A., 1998. Characterization of Intestinal Na^{+}-K^{+}-ATPase in the Gilthead Seabream (*Sparus aurata* L.). Evidence for a Tissue-Specific Heterogeneity. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 121: 65-76.

EBOH, L., MEPBA, H.D., and EKPO, M.B., 2006. Heavy Metal Contaminants and Processing Effects on the Composition, Storage Stability and Fatty Acid Profiles of Five Common Commercially Available Fish Species in Oron Local Government, Nigeria. Food Chemistry, 97: 490–497.

EISLER, R., and HENNEKEY, R.J., 1977. Acute Toxicities of Cd^{2+}, Cr^{+6}, Hg^{2+}, Ni^{2+} and Zn^{2+} to Estuarine Macrofauna. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 6: 315-323.

ENGEL, D.W., 1983. The Intracellular Partitioning of Trace Metals in Marine Shellfish. The Science of the Total Environment, 28: 129-140.

ENGEL, D.W., and BROUWER, M., 1984. Trace Metal-binding Proteins in Marine Molluscs and Crustaceans. Marine Environmental Research, 13: 177-194.

ERDEM, C., 1990. Cadmium Accumulation in Liver, Spleen, Gill and Muscle Tissues of *Tilapia nilotica* (L.). Biyokimya Dergisi, Cilt XV, 3: 13-22.

EROĞLU, K., ATLI, G., and CANLI, M., 2005. Effects of Metal (Cd, Cu, Zn) Interactions on the Profiles of Metallothionein-like Proteins in the Nile Fish *Oreochromis niloticus*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 75: 390-399.

FLIK, G., VAN RIJS, J.H., and WENDELAAR BONGA, S.E., 1985. Evidence for High-affinity Ca^{2+}-ATPase Activity and ATP-driven Ca^{2+}-transport in Membrane Preparations of the Gill Epithelium of the Cichlid Fish *Oreochromis mossambicus*. Journal of Experimental Biology, 119: 335-347.

FLIK, G., VAN DER VELDEN, J.A., DECHERING, K.J., VERBOST, P.M., SCHOENMAKERS, T.J.M., KOLAR, Z.I., and WENDELAAR BONGA, S.E., 1993. Ca^{2+} and Mg^{2+} Transport in Gills and Gut of Tilapia, *Oreochromis mossambicus*, A Review. The Journal of Experimental Zoology, 265: 356-365.

FOULKES, E.C., 1980. Some Determinants of Intestinal Cadmium Transport in the Rat. Journal of Environmental Pathology and Toxicology, 3: 471-481.

GAGNON, A., JUMARIE, C., and HONTELA, A., 2006. Effects of Cu on Plasma Cortisol and Cortisol Secretion by Adrenocortical Cells of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology, 78: 59–65.

GALVEZ, F., HOGSTRAND, C., McGEER, J.C., and WOOD, C. M., 2001. The Physiological Effects of a Biologically Incorporated Silver Diet on Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology, 55: 95-112.

GALVEZ, F., REID, S.D., HAWKINGS, G., and GOSS, G.G., 2002. Isolation and Characterization of Mitochondria-rich Cell Types from the Gill of Freshwater Rainbow Trout. American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 282: 658-668.

GARCIA-SANTOS, S., FONTAINHAS-FERNANDES, A., and WILSON, J.M., 2006. Cadmium Tolerance in the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Following Acute Exposure: Assessment of Some Ionoregulatory Parameters. Environment Toxicology, 21: 33-46.

GEORGE, S.G., 1991. Cell Biochemistry and Transmembrane Transport of Some Metals (E. MERIAN editör). Metals and Their Compounds in the Environment, New York, s.511-521.

GJEVRE, A.G., and NAESS, L.I.M., 1996. Intestinal Na^+/K^+-ATPase Activity in Salmonids. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 115 (2): 159-168.

GILES, M.A., and VANSTONE, W.E., 1976. Changes in Ouabain-sensitive Adenosine Triphosphatase Activity in Gills of Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during Parr-smolt Transformation. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 33: 54–62.

GODIKSEN, H., and JESSEN, F., 2002. Temperature and Ca^{2+}-dependence of the Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+}-ATPase in Haddock, Salmon, Rainbow Trout and Zebra cichlid. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 133: 35–44.

GROSELL, M., HOGSTRAND, C., WOOD, C.M., and HANSEN, H.J.M., 2000. A Nose-to-nose Comparison of the Physiological Effects of Exposure to Ionic Silver Versus Silver Chloride in the European Eel (*Anguilla anguilla*) and the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology, 48: 327–342.

GROSELL, M., NIELSEN, C., and BIANCHINI, A., 2002. Sodium Turnover Rate Determines Sensitivity to Acute Copper and Silver Exposure in Freshwater Animals. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 133: 287–303.

GROSELL, M., WOOD, C.M., and WALSH, P., 2003. Copper Homeostasis and Toxicity in the Elasmobranch *Raja erinacea* and the Teleost *Myoxocephalus octodecemspinosus* during Exposure to Elevated Water-borne Copper. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 135: 179–190.

GROSELL, M., McDONALD, M.D., WALSH, P.J., and WOOD, C.M., 2004. Effects of Prolonged Copper Exposure in the Marine Gulf Toadfish (*Opsanus beta*) II: Copper Accumulation, Drinking Rate and Na^+-K^+ ATPase Activity in Osmoregulatory Tissues. Aquatic Toxicology, 68: 263-275.

GUYNN, S., DOWD, F., and PETZEL D., 2002. Characterization of Gill Na/K-ATPase Activity and Ouabain Binding in Antarctic and New Zealand Nototheniid Fishes. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 131: 363-374.

HANDY, R.D., and EDDY, F.B., 1990. The Interaction Between the Surface of Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, and Waterborne Metal Toxicants. Functional Ecology, 4: 385-392.

HANDY, R.D., EDDY, F.B., and BAINES, H., 2002. Sodium-Dependent Copper Uptake Across Epithelia: A Review of Rationale with Experimental Evidence from Gill and Intestine. Biochimica Et Biophysica Acta, 1566: 104-115.

HEATH, A.G., 1987. Water Pollution and Fish Physiology. CRC press, Florida, USA, 245s.

———, 1995. Water Pollution and Fish Physiology, 2nd edition, CRC press, New York, USA, 359s.

HILMY, A.M., ABD EL-HAMID, N.F., and GHAZALY, K.S., 1988. Variation of Zinc and Copper Levels with Sex and Size in Different Tissues of the Crab *Portunus pelagicus* (Linnaeus). Folia Morphologica, 2: 160-166.

HOGSTRAND, C., and HAUX, C., 1989. Induction of Metallothionein by Cadmium in Bluestriped Grunt (*Haemulon sciurus*). Marine Environmental Research, 28: 191-194.

HOGSTRAND, C., VERBOST, P.M., BONGA, S.E., and WOOD, C.M., 1996. Mechanisms of Zinc Uptake in Gills of Freshwater Rainbow Trout: Interplay with Calcium Transport. American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 270: R1141-R1147.

HOGSTRAND, C., and WOOD, C.M., 1996. The Physiology and Toxicology of Zinc in Fish (E.W. TAYLOR editör). The Toxicity of Silver to Marine Fish, University Press, Cambridge, s.61–84.

———, 1998. Toward a Beter Understanding of the Bioavailability, Physiology, and Toxicity of Silver in Fish: Implications for water Quality Criteria. Environmental Toxicology and Chemistry, 17: 547–561.

HOGSTRAND, C., FERGUSON, E.A., GALVEZ, F., SHAW, R., WEBB, N.A., and WOOD, C.M., 1999. Physiology of Acute Silver Toxicity in the Starry Flounder (*Platichthys Stellatus*) in Seawater. Journal of Comparative Physiology B, 169: 461-473.

HOLLIS, L., McGEER, J.C., McDONALD, D.G., and WOOD, C.M., 2000. Effects of Long Term Sublethal Cd Exposure in Rainbow Trout during Soft Water Exposure: Implications for Biotic Ligand Modelling. Aquatic Toxicology, 51: 93–105

HOYLE, I., SHAW, B.J., and HANDY, R.D., 2007. Dietary Copper Exposure in the African Walking Catfish, *Clarias gariepinus*: Transient Osmoregulatory Disturbances and Oxidative Stress. Aquatic Toxicology, 83: 62–72.

INMAN, C.B.E., and LOCKWOOD, A.P.M., 1977. Some Effects of Methylmercury and Lindane on Sodium Regulation in the Amphipod Gammarus Duebeni During Changes in the Salinity of its Medium. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 58: 67-75.

KALAY, M., and CANLI, M., 2000. Elimination of Essential (Cu, Zn) and Non-Essential (Cd, Pb) Metals from Tissues of a Freshwater Fish *Tilapia zillii*. Turkish Journal of Zoology, 24: 429-436.

KAMAL, A.H.M.M., and MAIR, G.C., 2005. Salinity Tolerance in Superior Genotypes of Tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis mossambicus* and Their Hybrids. Aquaculture, 247: 189-201.

KAMUNDE, C., CLAYTON, C., and WOOD, C.M., 2002. Waterborne vs. Dietary Copper Uptake in Rainbow Trout and the Effects of Previous Waterborne Copper Exposure. American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 283: 69-78.

KAMUNDE, C., and WOOD, C.M., 2003. The Influence of Ration Size on Copper Homeostasis during Sublethal Dietary Copper Exposure in Juvenile Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquatic Toxicology, 62: 235-254.

KAYHAN, F.E., 2006. Su Ürünlerinde Kadmiyumun Biyobirikimi ve Toksisitesi. E.U. Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 23 (1-2): 215-220.

KRAMER, H.J., GONICK, H.C., and LU, E., 1986. *İn vitro* Inhibition of Na^+-K^+-ATPase by Trace Metals: Relation to Renal and Cardiovascular Damage. Nephron 44, 329–336.

KUHNERT, P.M., KUHNERT, B.R., and STOKES, R.M., 1976. The Effect of *İn vivo* Chromium Exposure on Na/K- and Mg-ATPase Activity in Several

Tissues of the Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 15 (4): 383-390.

LANGE, A., AUSSEIL, O., and SEGNER, H., 2002. Alterations of Tissue Glutathione Levels and Metallothionein Mrna in Rainbow Trout during Single and Combined Exposure to Cadmium and Zinc. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 131: 231–243.

LAPPIVAARA, J., and MARTTINEN, S., 2005. Effects of Waterborne Iron Overload and Simulated Winter Conditions on Acute Physiological Stress Response of Whitefish, *Coregonus lavaretus*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 60: 157–168.

LARSSON, A., HAUX, C., and SJOBECK, M., 1985. Fish Physiology and Metal Pollution: Results and Experiences from Laboratory and Field Studies. Ecotoxicology and Environmental Safety, 9: 250-281.

LAUREN, D.J., and McDONALD, D.G., 1987. Acclimation to Copper by Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*: Biochemistry. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 44: 105-111.

LEMAIRE-GONY, S., LEMAIRE, P., and PULSFORD, A.L., 1995. Effects of Cadmium and Benzo(a)pyrene on the Immun System, Gill ATPase and EROD Activity of European Sea Bass *Dicentrarchus labrax*. Aquatic Toxicology, 31: 297-313.

LI, J., QUABIUS, E.S., WENSWLAAR BONGA, S.E., FLIK, G., and LOCK, R.A.C., 1998. Effects of Water-borne Copper on Branchial Chloride Cells and Na^+-K^+-ATPase Activities in Mozambique Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Aquatic Toxicology, 43: 1–11.

LIN, C.H., and LEE, T.H., 2005. Sodium or Potassium Ions Activate Different Kinetics of Gill Na,K-ATPase in Three Seawater- and Freshwater-acclimated Euryhaline Teleosts. Journal of Experimental Zoology, 303: 57-65.

LIONETTO, M.G., GIORDANO, M.E., VILELLA, S., and SCHETTINO, T., 2000. Inhibition of Eel Enzymatic Activities by Cadmium. Aquatic Toxicology, 48: 561–571.

LORZ, H.W., and McPHERSON, B., 1976. Effects of Copper or Zinc in fresh Water on the Adaptation to sea Water and ATPase Activity, and the Effects of Copper on Migratory Disposition of Coho Salmon (*Onchorhynchus kisutch*). Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 33: 2023-2030.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARRA, N.J., and RANDALL, R.J., 1951. Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent. Journal of Biological Chemistry, 193: 265-275.

MacKENZIE, W.M., and PERRY, S.F., 1997. Branchial and Renal Calcium Fluxes in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) During Metabolic Alkalosis. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 118: 637-645.

MANCE, G., 1987. Pollution Threat of Heavy Metals in Aquatic Environment. Elsevier, London, 363s.

McDONALD, D.G., and WOOD, C.M., 1993. Branchial Mechanisms of Acclimation to Metals in Freshwater Fish (J.C. RANKIN and F.B. JENSEN editör). Fish Ecophysiology, Chapman and Hall, London, s.297–332.

McGEER, J.C., and WOOD, C.M., 1998. Protective Effects of Water Cl^- on Physiological Responses to Waterborne Silver in Rainbow Trout. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 55 (11): 2447–2454.

McGEER, J.C., SZEBEDINSZKY, C., McDONALD, D.G., and WOOD, C.M., 2000. Effects of Chronic Sublethal Exposure to Waterborne Cu, Cd or Zn in Rainbow Trout. 1: Iono-regulatory Disturbance and Metabolic Costs. Aquatic Toxicology, 50: 231–243.

———, 2002. The Role of Dissolved Organic Carbon in Moderating the Bioavailability and Toxicity of Cu to Rainbow Trout during Chronic Waterborne Exposure. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 133: 147–160.

MELGAR, M.J., PEREZ, M., GARCIA, M.A., ALONSO, J., and MIQUEZ, B., 1997. The Toxic and Accumulative Effects of Short Term Exposure to Cadmium in Rainbow Trout (*Onchorhynchus mykiss*). Veterinary and Human Toxicology, 39 (2): 79-83.

MILLER, L.L., WANG, F., PALACE, V.P., and HONTELA, A., 2007. Effects of Acute and Subchronic Exposures to Waterborne Selenite on the Physiological Stress Response and Oxidative Stress Indicators in Juvenile Rainbow trout. Aquatic Toxicology, 83: 263-271.

MONSERRAT, J.M., MARTINEZ, P.E., GERACITANO, L.A., AMADO, L.L., MARTINS, C.M.G., PINHO, G.L.L., CHAVES, I.S.C., FERREIRA-CRAVO, M., VENTURA-LIMA, J., and BIANCHINI, A., 2007. Pollution Biomarkers in Estuarine Animals: Critical Review and New Perspectives. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 146: 221-234.

MONTEIRO, S.M., MANCERA, J.M., FONTAINHAS-FERNANDES, A., and SOUSAC, M., 2005. Copper Induced Alterations of Biochemical Parameters in the Gill and Plasma of *Oreochromis niloticus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 141: 375 – 383.

MORGAN, I.J., HENRY, R.P., and WOOD, C.M., 1997. The Mechanism of Acute Silver Nitrate Toxicity in Freshwater Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) is Inhibition of Gill Na^+ and Cl^- Transport. Aquatic Toxicology, 38: 145-163.

MORGAN, T.M., GROSELL, M., PLAYLE, R.C., and WOOD, C.M., 2004. The Time Course of Silver Accumulation in Rainbow Trout during Static Exposure to Silver Nitrate: Physiological Regulation or an Artifact of the Exposure Conditions? Aquatic Toxicology, 66: 55–72.

MORGAN, T.P., and WOOD, C.M., 2004. A Relationship between Gill Silver Accumulation and Acute Silver Toxicity in the Freshwater Rainbow Trout: Support for the Acute Silver Biotic Ligand Model. Environmental Toxicology and Chemistry, 23 (5): 1261-1267.

NELSON, D.L., and COX, M.M., 2002. Lehninger Principles of Biochemistry, 3rd edition, Worth publishers, New York, USA, 1119s.

OHNESORGE, F.K., and WILHELM, M., 1991. Zinc (E. MERIAN editör). Metals and Their Compounds in the Environment, New York, s.1309-1342.

OLSSON, P.E., ZAFARULLAH, M., and GEDAMU, L., 1989. A Role of Metallothionein in Zinc Regulation after Oestradiol Induction of Vitellogenin

Synthesis in Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*. Biochemical Journal, 257: 555-559.

OLSVIK, P.A., GUNDERSEN, P., ANDERSEN, R.A., and ZACHARIASSEN, K.E., 2001. Metal Accumulation and Metallothionein in Two Populations of Brown Trout, *Salmo trutta,* Exposed to Different Natural Water Environments during a Run-off Episode. Comparative Biochemistry and Physiology, Toxicology and Pharmacology, 128 (2): 189-201.

O'NEILL, J.G., 1981. The Humoral Immune Response of *Salmo trutta* L. and *Cyprinus carpio* L. Exposed to Heavy Metals. Journal of Fish Biology, 19: 297 – 306.

ÖNER, M., ATLI, G., and CANLI, M., 2008. Changes in Serum Biochemical Parameters of Freswater Fish Oreochromis niloticus Following Prolonged Metal (Ag, Cd, Cr, Cu, Zn) Exposures. Environmental Toxicology and Chemistry, 27: 360–366.

PAN, Q., LUI, S., TAN, Y.G., and BI, Y.Z., 2003. The Effect of Chromium Picolinate on Growth and Carbohydrate Utilization in Tilapia, *Oreochromis niloticus-Oreochromis aureus.* Aquaculture, 225: 421–429.

PARVEZ, S., SAYEED, I., and RAISUDDIN, S., 2006. Decreased Gill ATPase Activities in the Freshwater Fish *Channa punctata* (Bloch) Exposed to a Diluted Paper Mill Effluent. Ecotoxicology and Environmental Safety, 65: 62–66.

PEDROSO, M.S., PINHO, G.L.L., RODRIGUES, S.C., and BIANCHINI, A., 2007. Mechanism of Acute Silver Toxicity in the Euryhaline Copepod *Acartia tonsa.* Aquatic Toxicology, 82: 173–180.

PELGROM, S.M.G.J., LOCK, R.A.C., BALM, P.H.M., and WENDELAAR BONGA, S.E., 1995. Effects of Combined Waterborne Cd and Cu Exposures on Ionic Compositions and Plasma Cortisol in Tilapia, *Oreochromis mossambicus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 2: 227-235.

_____, 1997. Calcium Fluxes in Juvenile Tilapia, *Oreochromis mossambicus*,

Exposed to Sublethal Waterborne Cd, Cu or Mixtures of These Metals. Environmental Toxicology and Chemistry, 16: 770-774.

PERIYASAMY, S.M., HUANG, W.H., and ASKARI, A., 1983. Origins of the Different Sensitivities of (Na^+-K^+)-dependent Adenosinetriphosphatase Preparations to Ouabain. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 76 (3): 449-454.

PERRY, S.F., GOSS, G.G., and FENWICK, J.C., 1992. Interrelationships between Gill Chloride Cell Morphology and Calcium Uptake in Freshwater Teleosts. Fish Physiology and Biochemistry, 10: 327-337.

PINKNEY, A.E., WRIGHT, D.A., JEPSON, M.A., and TOWLE, D.W., 1989. Effects of Tributyltin Compounds on Ionic Regulation and Gill ATPase Activity in Estuarine Fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 92 (1): 125-129.

PRATAP, H.B., and WENDELAAR BONGA, S.E., 1993. Effect of Ambient and Dietary Cadmium on Pavement Cells, Chloride Cells, and Na^+/K^+-ATPase Activity in the Gills of the freshwater Telesot *Oreochromis mossambicus* at Normal and High Calcium Levels in the Ambient Water. Aquatic Toxicology, 26: 133-150.

QUIG, D., 1998. Cysteine Metabolism and Metal Toxicity. Alternative Medicine Review, 3 (4): 262-270.

RIBEIRO, M.G.L., PEDRENHO, A.R., and HASSON-VOLOCH, A., 2002. Electrocyte (Na^+–K^+)-ATPase Inhibition Induced by Zinc is Reverted by Dithiothreitol. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 34: 516–524.

RIEDEL, B., and CHRISTENSEN, G., 1979. Effect of Selected Water Toxicants and Other Chemicals upon Adenosine Triphosphatase Activity *In Vitro.* Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 23: 365-368.

ROESIJADI, G., 1992. Metallothioneins in Metal Regulation and Toxicity in Aqutaic Animals. Review. Aquatic Toxicology, 22: 81-114.

ROGERS, J.T., RICHARDS, J.G., and WOOD, C.M., 2003. Ionoregulatory Disruption as the Acute Toxic Mechanism for Lead in the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology, 64: 215-234.

SAĞLAMTİMUR, B., CİCİK, B., and ERDEM, C., 2004. Kısa Süreli Bakır-Kadmiyum Etkileiminde Tatlısu Çipurası (*Oreochromis niloticus* L. 1758)'nın Karaciğer, Böbrek, Solungaç ve Kas Dokularındaki Kadmiyum Birikimi. Ekoloji, 14 (53): 33-38.

SANCHO, E., FERNANDEZ-VEGA, C., FERRANDO, M.D., and ANDREU-MOLINER, E., 2003. Eel ATPase Activity as Biomarker of Thiobencarb Exposure. Ecotoxicology and Environmental Safety, 56: 434–441.

SANTOS, M.H.S., CUNHA, N.T., and BIANCHINI, A., 2000. Effects of Copper and Zinc on Growth, Feeding and Oxygen Consumption of *Farfantepenaeus paulensis* postlarvae (Decapoda: Penaeidae). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 247: 233–242.

SARDELLA, B.A., COOPER, J., GONZALEZ, R.J., and BRAUNER, C.J., 2004. The Effect of Temperature on Juvenile Tilapia Hybrids (*Oreochromis mossambicus* x *O. urolepis hornorum*) Exposed to Full-strength and Hypersaline Seawater. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 137: 621-629.

SARIHAN, E., and TORAL, Ö., 1982. Bir Tropikal Balık Türü Olan *Tilapia nilotica* (L.) 1758'in Çukurova Bölgesi'nde Yetiştirme Sorunları Üzerine Bir Tartışma. Tübitak 7. Bilim Kongresi (9 Eylül- 3 Ekim 1980). Veteriner ve Hayvancılık Araştırma Grubu Tebliğleri, Ankara, 33-44.

SARKAR, B., 1989. Metal-Protein Interactions in Transport, Accumulation, and Excretion of Metals. Biological Trace Element Research, 21: 137-144

SAXENA, T.B., ZACHARIASSEN, K.E., and JORGENSEN, L., 2000. Effects of Ethoxyquin on the Blood Composition of Turbot, *Scophthalmus maximus* L. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 127: 1–9.

SCHJOLDEN, J., SORENSEN, J., NILSSON; G.E., and POLEO, A.B.S., 2007. The Toxicity of Copper to Crucian Carp (*Carassius carassius*) in Soft Water. Science of the Total Environment, 384: 239-251.

SHEPHARD, K., and SIMKISS, K., 1978. The Effects of Heavy Metal Ions on Ca^{+2} ATPase Extracted from Fish Gills. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 61: 69-72.

SILVESTRE, F., TRAUSCH, G., and DEVOS, P., 2005. Hyper-osmoregulatory Capacity of the Chinese Mitten Crab (*Eriocheir sinensis*) Exposed to Cadmium; Acclimation during Chronic Exposure. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 140: 29–37.

SIMKISS, K., and TAYLOR, M.G., 1989. Metal Fluxes Across the Membranes of Aquatic Organisms. Review. Aquatic Sciences, 1 (1): 173-188.

SKOU, J.C., 1957. The Influence of Some Cations on an Adenosine Triphosphatase from Peripheral Nerves. Biochimica Et Biophysica Acta, 23: 394–401.

SMET, H.D., WACHTER, B.D., LOBINSKI, R., and BLUST, R., 2001. Dynamics of (Cd, Zn)-metallothioneins in Gills, Liver and Kidney of Common Carp *Cyprinus carpio* during Cadmium Exposure. Aquatic Toxicology, 52 (3-4): 269-281.

SPOKAS, E.G., CRIVELLONE, M.D., KEMP, F., BOGDEN, J.D., and COHEN G.M., 2002. Characterization of Sodium, Potassium, ATPase Activity in the Gills of *Pimephales promelas* (Fathead Minnow): Influence of *In Vitro* Exposure to Lead. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 69: 384–392.

SPRY, D.J., and WIENER, J.G., 1991. Metal Bioavailability and Toxicity to Fish in Low-alkalinity Lakes a Critical Review. Environmental Pollution, 71: 243-304.

SPRY, D.J., and WOOD, C.M., 1989. A Kinetic Method for the Measurement of Zinc Influx *İn vivo* the Rainbow Trout, and the Effects of Waterborne Calcium on Flux Rates. Journal of Experimental Biology, 142: 425-446.

STAGG, R.M., and SHUTTLEWORTH, T.J., 1982. The Effects of Copper on Ionic regulation by the Gills of the Seawater-Adapted Flounder (*Platichthys flesus* L.). Journal of Comparative Physiology, 149: 83-90.

STAGG, R., GOKSOYR, A., and RODGER, G., 1992. Changes in Branchial Na^{+},K^{+}-ATPase, Metallothionein and P450 1A1 in Dab *Limanda limanda* in

the German Bight: Indicators of Sediment Contamination? Marine Ecology Progress Research, 91: 105-115.

SZEFER, P., DOMAGALA-WIELOSZEWSKA, M., WARZOCHA, J., GARBACIK-WESELOWSKA, A., and CIESIELSKI, T., 2003. Distribution and Relationships of Mercury, Lead, Cadmium, Copper and Zinc in Perch (*Perca fluviatilis*) from te Pomeranian Bay and Szczecin Lagoon, Southern Baltic. Food Chemistry, 81: 73-83.

SUNNY, F., and OOMMEN, O.V., 2001. Rapid Action of Glucocorticoids on Branchial ATPase Activity in *Oreochromis mossambicus*: An *İn vivo* and *İn vitro* Study. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 130: 323-330.

TAGLIARI, K.C., VARGAS, V.M.F., ZIMIANI, K., and CECCHINI, R., 2004. Oxidative Stress Damage in the Liver of Fish and Rats Receiving an Intraperitoneal Injection of Hexavalent Chromium as Evaluated by Chemiluminescence. Environmental Toxicology and Pharmacology, 17: 149–157.

TAYLOR, L.N., WOOD, C.M., and McDONALD, D.G., 2003. An Evaluation of Sodium Loss and Gill Metal Binding Properties in Rainbow Trout and Yellow Perch to Explain Species Differences in Copper Tolerance. Environmental Toxicology and Chemistry, 22: 2159–2166.

THAKER, J., CHHAYA, J., NUZHAT, S., MITTAL, R., MANSURI, A.P., and KUNDU, R., 1996. Effects of Chromium (VI) on Some Ion-dependent ATPases in Gills, Kidney and Intestine of a Coastal Teleost *Periophthalmus dipes*. Toxicology 112: 237–244.

TKATCHEVA, V., HYVARINEN, H., KUKKONEN, J., RYZHKOV, L.P., and HOLOPAINEN, J., 2004. Toxic Effects of Mining Effluents on Fish Gills in a Subarctic Lake System in NW Russia. Ecotoxicology and Environmental Safety, 57: 278–289.

TORREBLANCA, A., RAMO, J.D., ARNAU, J.A., and DIAZ-MAYANS, J., 1989. Cadmium, Mercury, and Lead Effects on Gill Tissue of Freshwater Crayfish *Procambarus clarkii* (Girard). Biological Trace Element Research, 21: 343-347.

TRIGARI,G., BORGATTI, A.R., PAGLIARINI, A., and VENTRELLA, V., 1985. Characterization of Gill (Na^+/K^+)-ATPase in the Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 80 (1): 23-33.

USEPA, 2001. Update of Ambient Water Quality Criteria for Cadmium. EPA-822-R-01–001. United States Environmental Protection Agency (USEPA). Washington, DC, USA.

VAN DYK, J.C., PIETERSE, G.M., and VAN VUREN, J.H.J., 2007. Histological Changes in the Liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after Exposure to Cadmium and Zinc. Review. Ecotoxicology and Environmental Safety, 66: 432–440.

VEILLETTE, P.A., and YOUNG, G., 2004. Temporal Changes in Intestinal Na^+,K^+-ATPase Activity and *İn vitro* Responsiveness to Cortisol in Juvenile Chinook salmon. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 138: 297-303.

VENUGOPAL, N.B.R.K., and REDDY, S.L.N., 1993. *İn vivo* Effects of Trivalent and Hexavalent Chromium on Renal and Hepatic ATPases of a Freshwater Teleost *Anabas scandens*. Environmental Monitoring and Assessment, 28: 131-136.

VENTRELLA, V., TROMBETTI, F., PAGLIARANI, A., TRIOARI, G., and ANNA BORGATTI, R., 1990. Gill (Na^+-K^+) - and Na^+-stimulated Mg^{2+}-dependent ATPase Activities in the Gilthead Bream *(Sparus auratus* L.). Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 95 (1): 95-105.

VERBOST, P.M., FLIK, G., LOCK, R.A.C., and WENDELAAR BONGA, S.E., 1988. Cadmium Inhibits Plasma Membrane Calcium Transport. Journal of Membrane Biology, 102: 97-104.

VERBOST, P.M., FLIK, G., PANG, P.K.T., LOCK, R.A.C., and WENDELAAR BONGA, S.E., 1989. Cadmium Inhibition of the Erythrocyte Ca^{2+} Pump a Molecular Interpretation. The Journal of Biological Chemistry, 264: 5613-5615.

VIALE, G., and CALAMARI, D., 1984. Immune Response in Rainbow Trout *Salmo gairdneri* After Long-term Treatment with Low Levels of Cr, Cd and Cu. Environmental Pollution, 35: 247-257.

VIARENGO, A., 1989. Heavy Metals in Marine Invertebrates. Mechanism of Regulation and Toxicity at the Cellular Level. Aquatic Sciences, 1 (2): 295-317.

VIARENGO, A., MANCINELLI, G., PERTICA, M., FABBRI, R., and ORUNESU, M., 1993. Effects of Heavy Metals on the Ca^{2+}-ATPase Activity Present in Gill Cell Plasma-membrane of Mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam.). Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 106 (3): 655-660.

VIARENGO, A., MANCINELLI, G., BURLANDO, B., PANFOLİ, I., and MARCHI, B., 1999. The SR Ca^{2+}-ATPase of the Antarctic Scallop *Adamussium colbecki*; Cold Adaptation and Heavy Metal Effects. Polar Biology, 21: 369-375.

VIJAYAVEL, K., GOPALAKRISHNAN, S., and BALASUBRAMANIAN, M.P., 2007. Sublethal Effect of Silver and Chromium in the Green Mussel *Perna viridis* with Reference to Alterations in Oxygen Uptake, Fltration Rate and Membrane Bound ATPase System as Biomarkers. Chemosphere, 69: 979–986.

WANG, W.N., WANG, A.L., CHEN, L., LIU, Y., and SUN, R.Y., 2002. Effects of pH on Survival, Phosphorus Concentration, Adenylate Energy Charge and Na^{+}–K^{+} ATPase Activities of *Penaeus chinensis* Osbeck Juveniles. Aquatic Toxicology, 60: 75–83.

WATSON, T.A., and BEAMISH, F.W.H., 1980. Effects of Zinc on Branchial ATPase Activity *İn vivo* in Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 66: 77-82.

———, 1981. The Effects of Zinc on Branchial Adenosine Triphosphatase Enzymes *İn vitro* from Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 68: 167-173.

WATSON, C.F., and BENSON, W.H., 1987. Comparative Activity of Gill ATPase in Three Freshwater Teleosts Exposed to Cadmium. Ecotoxicology and Environmental Safety, 14: 252-259.

WEBB, N.A., SHAW, J.R., MORGAN, J., HOGSTRAND, C., and WOOD, C.M., 2001. Acute and Chronic Physiological Effects of Silver Exposure in Three Marine Teleosts. Aquatic Toxicology, 54: 161-178.

WENDELAAR BONGA, S.E., and LOCK, R.A.C., 1991. Toxicants and Osmoregulation in Fish. Netherlands Journal of Zoology, 42: 478-493.

WHO, 1992. Cadmium—Environmental aspects. Environmental Health Criteria No. 135. World Health Organisation (WHO), The International Programme on Chemical Safety (IPCS), Geneva.

WOOD, C.M., HOGSTRAND, C., and GALVEZ, F., 1996. The Physiology of Waterborne Silver Toxicity in Freshwater Rainbow Trout (*Oncorhynhus mykiss*). 1. The Effects of Ionic Ag^{+}. Aquatic Toxicology, 35: 93-109.

WOOD, C.M., PLAYLE, R.C., and HOGSTRAND, C., 1999. Physiology and Modeling of Mechanisms of Silver Uptake and Toxicity in Fish. Environmental Toxicology and Chemistry, 18 (1): 71–83.

WOOD, C.M., 2001. Toxic Responses of the Gill. (D. SCHLENK and D. BENSON editör). Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts, Taylor and Francis, London, UK, s.1–89.

WOOD, C.M., KELLY, S.P., ZHOU, B., FLETCHER, M., O'DONNEll, M., ELETTI, B., and PART, P., 2002. Cultured Gill Epithelia as Models for the Freshwater Fish Gill, Review. Biochimica Et Biophysica Acta, 1566: 72– 83.

WONG, C.K.C., and WONG, M.H., 2000. Morphological and Biochemical Changes in the Gills of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to Ambient Cadmium Exposure. Aquatic Toxicology, 48: 517–527.

ZAFARULLAH, M., OLSSON, P.E., and GEDAMU, L., 1990. Differential Regulation of Metallothionein Genes in Rainbow Trout Fibroblasts, RTG-2. Biochimica Et Biophysica Acta, 1049: 318-323.

ZHOU, B., NICHOLS, J., PLAYLE, R.C., and WOOD, C.M., 2005. An *İn vitro* Biotic Ligand Model (BLM) for Silver Binding to Cultured gill Epithelia of

Freshwater Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Toxicology and Applied Pharmacology, 202: 25– 37.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Adana'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Adana'da tamamladıktan sonra 1995 yılında kazandığım Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 1999 yılında birincilikle mezun oldum.

1999 yılı Eylül ayında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Yüksel Lisans eğitimine başladım. Yüksek Lisans eğitimimi 2001 yılında tamamladıktan sonra aynı tarihte Doktora eğitimime başladım. Doktora tez aşamasında 2006-2007 Güz dönemi süresince Erasmus öğrenci değişimi programı kapsamında üç ay boyunca İspanya'nın Girona şehrinde "Universitat de Girona" üniversitesinde bulundum. Çukurova Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde 2000 yılından itibaren araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.

EK-1. Akut metal etkilerinde *O. niloticus* dokularında % ATPaz aktiviteleri.

Metal	Derişim (µg/mL)	Na^{+}/K^{+}-ATPaz		Mg^{+2}-ATPaz		Total-ATPaz		Ca^{+2}-ATPaz		
		Solungaç	Böbrek	Solungaç	Böbrek	Solungaç	Böbrek	Solungaç	Böbrek	Kas
Cd^{+2}	**0.1**	-33	-47	31	32	9	5	-51	-59	-96
	0.5	-76	-43	34	40	-7	7	-92	-48	-94
	1.0	-89	-19	27	54	-10	18	-91	-84	-88
	1.5	-83	-63	52	69	11	32	-91	-63	-71
Cu^{+2}	**0.1**	-55	10	-8	48	-25	61	-90	-79	-57
	0.5	-45	-91	-12	69	-24	40	-88	-94	-66
	1.0	-25	86	-2	7	-8	59	-95	-84	-1
	1.5	-71	23	-1	39	-23	63	-92	-72	-71
Zn^{+2}	**0.1**	-56	-49	-76	-47	-68	-51	-82	-55	-78
	0.5	-49	-48	-59	-50	-55	-36	-68	-86	-91
	1.0	-39	-15	-64	-48	-56	-15	-74	-74	-96
	1.5	-67	11	-59	-15	-61	21	-82	-42	-90
Cr^{+6}	**0.1**	-20	6	-56	-54	-43	22	-91	-94	42
	0.5	-30	43	-48	-31	-41	36	-84	-78	179
	1.0	-4	44	-57	-32	-45	23	-87	-78	76
	1.5	-21	27	-61	0	-42	40	-95	-85	105
Ag^{+}	**0.1**	-86	69	-62	-27	-69	63	-71	-73	-42
	0.5	-87	63	-72	-48	-75	24	-74	-74	-46
	1.0	-90	138	-72	-30	-79	76	-60	-91	-33
	1.5	-95	111	-74	-23	-81	68	-87	-72	-82

EK-2. Akut ve kronik metal etkilerinde *O. niloticus* dokularında % toplam protein düzeyleri.

Metal	Derişim (µg/mL)	Akut Dönem-Protein			Metal	Süre (gün)	Kronik Dönem-Protein		
		Solungaç	Böbrek	Kas			Solungaç	Böbrek	Kas
Cd^{+2}	**0.1**	4	-16	27	**Cd^{+2}**	**5**	14	9	20
	0.5	5	-20	19		**10**	16	-10	0
	1.0	12	-23	12		**20**	-1	-13	-3
	1.5	9	-16	19		**30**	-17	-25	-19
Cu^{+2}	**0.1**	-32	-69	-34	**Cu^{+2}**	**5**	21	19	22
	0.5	-21	-70	-29		**10**	17	9	12
	1.0	-8	-64	-25		**20**	-2	-7	-3
	1.5	-21	-63	-44		**30**	-15	-23	-20
Zn^{+2}	**0.1**	-3	3	-6	**Zn^{+2}**	**5**	5	-13	6
	0.5	1	8	-8		**10**	2	-11	-3
	1.0	-8	9	5		**20**	16	-4	18
	1.5	-5	-5	-1		**30**	1	13	4
Cr^{+6}	**0.1**	-7	15	-7	**Cr^{+6}**	**5**	4	-3	-7
	0.5	-4	-17	2		**10**	-1	-12	8
	1.0	-1	-3	-7		**20**	16	-12	16
	1.5	0	6	7		**30**	3	14	8
Ag^{+}	**0.1**	-6	1	20	**Ag^{+}**	**5**	3	-18	1
	0.5	0	4	19		**10**	1	-17	-2
	1.0	-15	-4	8		**16**	-3	-5	-16
	1.5	-24	-22	-5					

EK-3. Akut ve kronik metal etkilerinde *O. niloticus* dokularında % toplam metal düzeyleri.

Metal	Derişim (µg/mL)	Akut Dönem-Metal			Metal	Süre (gün)	Kronik Dönem-Metal		
		Solungaç	Böbrek	Kas			Solungaç	Böbrek	Kas
Cd^{+2}	**0.1**	1019	227900	37300	**Cd^{+2}**	**5**	582	0	35600
	0.5	392	450900	20300		**10**	1257	0	49500
	1.0	579	496900	23200		**20**	1511	22400	37700
	1.5	1479	972900	6500		**30**	1630	142900	51300
Cu^{+2}	**0.1**	25	0	0	**Cu^{+2}**	**5**	96	414900	37000
	0.5	165	0	0		**10**	152	457900	51500
	1.0	129	205900	13900		**20**	187	485900	21300
	1.5	208	93900	0		**30**	205	608900	19700
Zn^{+2}	**0.1**	1	2	30	**Zn^{+2}**	**5**	13	60	10
	0.5	15	-7	44		**10**	29	47	4
	1.0	22	23	13		**20**	12	71	3
	1.5	17	72	39		**30**	20	67	0
Cr^{+6}	**0.1**	1990	-	-	**Cr^{+6}**	**5**	-	-	-
	0.5	0	-	-		**10**	-	-	-
	1.0	42500	-	-		**20**	-	-	-
	1.5	51200	-	-		**30**	-	-	-
Ag^{+}	**0.1**	22000	-	-	**Ag^{+}**	**5**	-	-	-
	0.5	24700	-	-		**10**	-	-	-
	1.0	22300	-	-		**16**	-	-	-
	1.5	28300	-	-					

EK-4. Akut metal etkilerinde *O. niloticus* dokularında % toplam iyon düzeyleri.

Metal	Derişim (µg/mL)	Na^{+}			K^{+}			Mg^{+2}			Ca^{+2}		
		Solungaç	**Böbrek**	**Kas**	**Solungaç**	**Böbrek**	**Kas**	**Solungaç**	**Böbrek**	**Kas**	**Solungaç**	**Böbrek**	**Kas**
Cd^{+2}	**0.1**	-37	-15	1	-34	-5	-33	1	3	12	1	81	10387
	0.5	-30	-38	-9	-29	-28	-30	20	20	16	10	96	7387
	1.0	5	-43	-26	-9	-25	13	36	20	37	46	273	1903
	1.5	-18	-46	-30	-16	-24	-45	44	35	1	30	119	1877
Cu^{+2}	**0.1**	-72	4	-36	-64	9	24	-12	95	-26	0	364	-39
	0.5	-4	-2	-74	-6	7	-41	49	15	-13	78	146	2344
	1.0	-33	-41	-32	-27	-16	-54	-25	-17	-21	-4	19	-15
	1.5	-22	-42	-40	-22	-6	-44	-18	-24	-25	36	119	39
Zn^{+2}	**0.1**	-20	-17	-37	-20	-35	-24	11	22	-7	18	19	-26
	0.5	-2	-70	-43	-13	-29	-53	16	2	-10	27	-8	87
	1.0	-8	-68	-45	-15	-36	-70	41	34	-42	27	165	1320
	1.5	-14	-66	-57	-19	-25	-40	6	12	-44	26	2	126
Cr^{+6}	**0.1**	-37	-58	-34	-31	-44	-24	18	-14	-1	3	83	0.0
	0.5	-30	-55	-35	-20	-32	-30	12	43	-1	15	212	-18
	1.0	-22	-47	-36	-13	-50	-40	29	-17	-1	32	10	23
	1.5	-23	-57	-46	1	-43	-42	36	-9	6	24	21	-54
Ag^{+}	**0.1**	-37	-63	-50	-26	-44	-10	3	-17	19	-1	31	80
	0.5	-32	-66	-46	-32	-41	9	9	32	15	6	102	-26
	1.0	-48	-65	-50	-40	-42	5	4	39	8	-7	81	-31
	1.5	-21	-72	-46	-57	-41	3	32	47	16	28	89	-31

EK-5. İn vitro metal etkilerinde *O. niloticus* dokularında % ATPaz aktiviteleri.

Metal	Derişim (µg/mL)	Na^+/K^+-ATPaz		Mg^{+2}-ATPaz		Total-ATPaz		Ca^{+2}-ATPaz
		Solungaç	Böbrek	Solungaç	Böbrek	Solungaç	Böbrek	Kas
Cd^{+2}	**0.1**	-34	-12	9	18	0	14	-76
	0.5	-57	-70	22	17	5	4	-84
	1.0	-79	-41	17	21	-4	13	-84
	1.5	-78	-100	22	19	1	1	-92
Cu^{+2}	**0.1**	-50	-22	-6	-1	-16	-4	-93
	0.5	-78	-100	1	1	-16	-24	-98
	1.0	-80	-100	-1	6	-18	-29	-92
	1.5	-100	-100	-3	42	-24	-21	-99
Zn^{+2}	**0.1**	-15	-81	-22	22	14	6	-40
	0.5	-15	-76	-31	19	22	5	-73
	1.0	-40	-70	-19	11	6	-2	-77
	1.5	-27	-79	-33	9	20	-3	-93
Cr^{+6}	**0.1**	-46	9	2	2	-9	3	-92
	0.5	-19	13	3	6	-2	7	-88
	1.0	-30	-73	8	13	-1	1	-93
	1.5	-67	-59	6	3	-10	-3	-94
Ag^+	**0.1**	-94	-64	-10	-5	-31	-13	-82
	0.5	-100	-100	-20	6	-39	-24	-100
	1.0	-100	-100	-19	20	-39	-22	-90
	1.5	-100	-100	-17	8	-42	-36	-100

EK-6. Kronik metal etkilerinde *O. niloticus* dokularında % ATPaz aktiviteleri.

Metal	Süre (gün)	Na^+/K^+-ATPaz		Mg^{+2}-ATPaz		Total-ATPaz		Ca^{+2}-ATPaz		
		Solungaç	Böbrek	Solungaç	Böbrek	Solungaç	Böbrek	Solungaç	Böbrek	Kas
Cd^{+2}	**5**	-81	-67	-17	35	-32	-12	-67	-100	-49
	10	-63	-68	-17	101	-27	43	-62	-75	-65
	20	-83	-71	4	49	-15	52	-47	-76	-84
	30	-88	-42	41	69	18	25	48	-76	-20
Cu^{+2}	**5**	-52	-61	-17	49	-27	7	-45	-100	-62
	10	-73	-64	-12	40	-22	-16	-66	-86	-28
	20	-89	-75	7	67	-15	24	-12	-51	-85
	30	-86	-72	36	30	12	-2	-24	-45	-39
Zn^{+2}	**5**	-82	-21	-4	23	-18	-2	84	-33	2
	10	-76	-37	-24	32	-33	-5	-47	-42	-83
	20	-97	-59	-21	3	-39	-20	-47	-57	-80
	30	-54	-61	-7	-22	-10	-34	-48	-81	-37
Cr^{+6}	**5**	-81	19	-11	73	-15	31	-59	-53	25
	10	-55	-58	-5	29	-94	4	-55	-56	-88
	20	-88	-58	-21	-15	-38	-33	-69	-80	-87
	30	-71	-61	-15	-34	-29	-44	-46	-83	-9
Ag^+	**5**	-87	70	1	38	6	33	-37	-37	-56
	10	-62	-70	14	27	-2	49	-83	-52	-65
	16	-90	-8	-63	23	-70	6	-88	-74	-87

EK-7. Kronik metal etkilerinde *O. niloticus* dokularında % toplam iyon düzeyleri.

Metal	Süre (gün)	Na^{+}			K^{+}			Mg^{+2}			Ca^{+2}		
		Solungaç	**Böbrek**	**Kas**	**Solungaç**	**Böbrek**	**Kas**	**Solungaç**	**Böbrek**	**Kas**	**Solungaç**	**Böbrek**	**Kas**
Cd^{+2}	**5**	-33	-62	-48	-28	-38	-3	-10	-27	-13	6	-17	4310
	10	-34	-55	-39	-20	-36	3	-4	-18	-16	0	12	1056
	20	-25	-59	-37	-8	-40	1	-17	-18	-24	8	-2	2490
	30	-28	-58	-41	-16	-41	9	0	-28	-4	-15	-6	13
Cu^{+2}	**5**	-34	-41	-38	-21	-8	-31	-14	22	-10	3	12	3592
	10	-27	3	-40	-11	-20	11	-12	143	21	-11	194	149
	20	-14	-56	-39	-9	-32	-10	-1	-17	-14	4	-8	1685
	30	-19	-38	-31	-14	-29	9	-26	119	-1	-19	77	-8
Zn^{+2}	**5**	-14	-44	-30	-4	-23	16	17	9	25	-3	-10	-33
	10	6	-48	-32	25	-21	19	19	0	-11	12	-21	-5
	20	-11	-43	-32	8	-15	11	43	33	22	14	-29	-28
	30	2	34	-27	17	-7	11	47	16	28	33	-12	-33
Cr^{+6}	**5**	-22	-56	-30	-11	-25	10	3	-12	19	9	46	46
	10	-21	-56	-42	-11	-29	-3	18	-10	-13	9	262	-5
	20	-7	-45	-29	1	-25	15	-2	-12	-10	-8	229	-18
	30	-15	-49	-36	-7	-27	16	-8	-23	-13	12	25	8
Ag^{+}	**5**	-36	-40	-45	-24	-29	-14	14	-5	21	-9	21	8
	10	-17	-42	-34	-8	-34	1	35	33	15	26	227	31
	16	-25	-35	-38	-16	-9	-2	35	117	54	31	308	56