ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zehra DOĞAN

Ca^{+2}, Pb^{+2} ve Ca^{+2}+ Pb^{+2} ETKİSİNDE KALAN BALIK (*Oreochromis niloticus*) DOKULARINDA Na^{+}/K^{+}-ATPaz , Ca^{+2}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2013

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ca^{+2}, Pb^{+2} ve Ca^{+2}+ Pb^{+2} ETKİSİNDE KALAN BALIK (*Oreochromis niloticus*) DOKULARINDA Na^{+}/K^{+}-ATPaz , Ca^{+2}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Zehra DOĞAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

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

……...	…….....	……..…….....
Prof. Dr. Mustafa CANLI	Doç. Dr. Gülüzar ATLI	Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
DANIŞMAN	İKİNCİ DANIŞMAN	ÜYE

……..……..	……..
Doç. Dr. Fatma ÇEVİK	Doç. Dr. Ramazan BİLGİN
ÜYE	ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Selahattin SERİN
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FEF2012YL1

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ca^{+2}, Pb^{+2} ve Ca^{+2}+Pb^{+2} ETKİSİNDE KALAN BALIK (*Oreochromis niloticus*) DOKULARINDA Na^{+}/K^{+}-ATPaz , Ca^{+2}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Zehra DOĞAN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof.Dr. Mustafa CANLI
Yıl:2012, Sayfa: 66
Jüri : Prof.Dr. Mustafa CANLI
: Prof.Dr.Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
: Doç.Dr. Gülüzar ATLI
: Doç.Dr. Ramazan BİLGİN
: Doç.Dr. Fatma ÇEVİK

Tatlısu balığı (*Oreochromis niloticus*) farklı süreler ve farklı derişimlerde Ca^{+2}, Pb^{+2} ve Ca^{+2}+Pb^{+2} etkisine bırakılmıştır. Deney süreleri sonunda solungaç ve bağırsak dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz ile kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktiviteleri ölçülmüştür. Akut (48 saat, 20 μM Pb^{+2}) ve kronik (14gün, 10 μM Pb^{+2}) deneyler sonunda ATPaz aktivitelerinde Pb^{+2} ve Ca^{+2} derişimine, süreye ve doku tipine bağlı olarak önemli değişimler olmuştur. Yüksek Ca^{+2} derişimi etkisindeki kontrol balıkların ATPaz aktiviteleri düşük Ca^{+2} derişimi etkisinde kalanlara göre önemli oranlarda yüksek bulunmuştur. Sadece Ca^{+2} etkisindeki balıklarda genellikle ATPaz aktivitelerinde artış gözlenirken, Ca^{+2}+Pb^{+2} etkisinde ise artış yanında azalış da gözlenmiştir. Solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi akut ve kronik süreçte birbirine zıt tepkiler verirken, diğer ATPaz'lar genellikle benzer yönde aktivite göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Kurşun, Kalsiyum, *Oreochromis niloticus*, ATPaz

ABSTRACT

MSc THESIS

DETERMINATION OF THE ACTIVITIES OF Na^{+}/K^{+}-ATPase , Ca^{+2}-ATPase AND Mg^{+2}-ATPase IN TISSUES OF FISH (*Oreochromis niloticus*) EXPOSED TO Ca^{+2}, Pb^{+2} ve Ca^{+2}+ Pb^{+2}

Zehra DOĞAN

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Supervisor : Prof. Dr. Mustafa CANLI
Year: 2012, Page: 66
Jury : Prof. Dr. Mustafa CANLI
: Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
: Assoc. Prof. Dr. Gülüzar ATLI
: Assoc. Prof. Dr. Ramazan BİLGİN
: Assoc. Prof. Dr. Fatma ÇEVİK

Freshwater fish (*Oreochromis niloticus)* was individually exposed to Ca^{2+}, Pb^{2+} and Ca^{2+}+Pb^{2+} in different concentrations and exposure periods. At the end of exposure periods, Na^{+}/K^{+}-ATPase and Mg^{2+}-ATPase activities in the gills and intestine and Ca^{2+}-ATPase activity in the muscle were measured. There were changes in ATPase activities in relation to Ca^{2+} and Pb^{2+} concentration, exposure time and tissue type in both acute (48 hours, 20 μM Pb^{2+}) and chronic (14 days, 10 μM Pb^{2+}) exposure periods. ATPase activities were found to be higher in control group exposed to higher Ca^{2+} concentration comparing to the group exposed to lower Ca^{2+} concentration. Generally, ATPase activities increased in fish exposed to only Ca^{2+} concentration, while they showed both increases and decreases after exposure to Ca^{2+}+Pb^{2+}. While gill Na^{+}/K^{+}-ATPase activity showed opposite reactions, the others showed similar trend in acute and chronic periods.

Keywords: Lead, Calcium, *Oreochromis niloticus*, ATPase

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince her konuda desteğini gördüğüm, kişisel ve bilimsel çizgisini örnek aldığım değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa CANLI'ya ve çalışmalarımda bana yol gösteren ikinci tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Gülüzar ATLI'ya teşekkürlerimi sunarım. Bu süre içerisinde dostluğu ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan değerli arkadaşım Ceren GÜRLER ile diğer tüm bölüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca her anlamda beni destekleyen ve yanımda olan sevgili annem Fazilet DOĞAN, babam İlhami DOĞAN, kardeşlerim Burcu DOĞAN, Duygu DOĞAN ve Osman Berat DOĞAN'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
İÇİNDEKİLER IV
ÇİZELGELER DİZİNİ VI
ŞEKİLLER DİZİNİ VIII
1. GİRİŞ 1
1.1. Kurşun 4
1.2. Kalsiyum 5
1.3. Adenozin Trifosfataz (ATPaz) Enzimleri 6
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 11
3. MATERYAL VE YÖNTEM 15
3.1. Materyal 15
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler 15
3.1.1.1. Metaller 15
3.1.1.2. ATPaz Aktivite Ölçümünde Kullanılan Kimyasallar 15
3.1.1.3. Protein Analizinde Kullanılan Kimyasallar 16
3.1.2. Kullanılan Aletler 16
3.2. Yöntem 16
3.2.1. Doku Homojenatlarının Hazırlanışı 18
3.2.2. ATPaz Enzim Aktivitelerinin Ölçümü 18
3.2.3. İnorganik Fosfat Tayini 20
3.2.4. Total Protein Analizi 21
3.2.5. ATPaz Aktivitesinin Hesaplanması 24
3.2.6. İstatistik 24
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 25
4.1. Bulgular 25
4.1.1. Akut (48 saat) Deneyler 25
4.1.1.1. Kontrol Grubu Balıklarda ATPaz Aktiviteleri 25

4.1.1.2. Kurşun Etkisinde Kalan Balıklar 26
4.1.2. Kronik (14 gün) Deneyler 29
4.1.2.1. Kontrol Grubu Balıklarda ATPaz Aktiviteleri 29
4.1.2.2. Kurşun Etkisinde Kalan Balıklar 31
4.1.3. İn vitro Ca^{+2} Etkisi 34
4.2. Tartışma 35
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 45
5.1. Sonuçlar 43
5.2. Öneriler 43
KAYNAKLAR 45
ÖZGEÇMİŞ 61
EKLER 62

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 3.1. Akvaryum sularının fizikokimyasal özellikleri (Art. Ort. ± S.D. N=54 17
Çizelge 3.2. Dokularda en yüksek ATPaz enzim aktivitesinin ölçüldüğü ortam koşulları ve inkübasyon ortamındaki iyonların son iyon derişimleri 19
Çizelge 4.1. İn vitro Ca^{+2} etkisinde solungaç, bağırsak ve kas dokusu ATPaz aktiviteleri 34

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. Na^+/K^+-ATPaz'ın yapı ve karakteristikleri..... 7

Şekil 1.2. Sarkolemma ve Sarkoplazmadaki kalsiyum (Ca^{+2}) akışının kontrolü 8

Şekil 3.1. Fosfat derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki..... 21

Şekil 3.2. Sığır albumininden hazırlanan standart derişimler ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki 23

Şekil 4.1. Kurşunun farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesine etkileri 27

Şekil 4.2. Kurşunun farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un solungaç Mg^{+2}-ATPaz aktivitesine etkileri 27

Şekil 4.3. Kurşunun farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un bağırsak Na^+/K^+-ATPaz aktivitesine etkileri 28

Şekil 4.4. Kurşunun farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un bağırsak Mg^{+2}-ATPaz aktivitesine etkileri 28

Şekil 4.5. Kurşunun farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesine etkileri 29

Şekil 4.6. Kurşunun farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesine etkileri 32

Şekil 4.7. Kurşunun farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un solungaç Mg^{+2}-ATPaz aktivitesine etkileri 32

Şekil 4.8. Kurşunun farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un bağırsak Na^+/K^+-ATPaz aktivitesine etkileri 33

Şekil 4.9. Kurşunun farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un bağırsak Mg^{+2}-ATPaz aktivitesine etkileri 33

Şekil 4.10. Kurşunun farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesine etkileri 34

1. GİRİŞ

Teknolojik gelişmeye paralel olarak hızla artan dünya nüfusu ile birlikte gıda kaynakları da kirlenmeye uğramakta ve insanlar için önemli sorunlar oluşturmaktadır. Endüstri, ziraat ve madencilikte yaygın olarak kullanılan ve ekolojik tehlike oluşturan kirleticilerin başında gelen Pb^{+2}, Cd^{+2}, Cr^{+3}, Co^{+2}, Fe^{+2}, Ni^{+2}, Hg^{+2} ve Zn^{+2} gibi ağır metaller çevre kirliliği açısından önemlidir. Ağır metallerden biri olan Pb^{+2} çoğunlukla Ag^{+}, Cu^{+2}, Zn^{+2} ve Fe^{+2} metalleriyle birleşmiş halde bulunmaktadır. Hem doğal çevrede hem de canlı organizmalarda iz halinde Pb^{+2}'ye rastlanır. Canlı organizmada bulunan Pb^{+2}'nin varlığı fizyolojik yaşam için gerekli olması ile ilgili değil, doğal çevrede yiyecek ve içeceklerde bulunan Pb^{+2}'den kaynaklanmaktadır (Leita, 1991). Besinlerle sindirilen Pb^{+2}, kan ve dokularda birikebilmektedir (Alves ve ark., 2006). Buna ilaveten bu birikim tüm doku ve organlarda toksik etki oluşturabilir (Grosell ve ark., 2006).

Doğal ekosistemde sürekli, dengeli bir madde ve enerji döngüsü vardır. Ekosistemi oluşturan canlı grupları birbirine besin zinciri ile bağlıdırlar. Aldıkları besinlerin bir kısmını enerjiye dönüştürüp kullanır, bir kısmını da depolayıp besin zincirinin bir üst halkasındaki canlıya aktarırlar. Canlılardan herhangi biri kirleticiler nedeniyle zarar görürse, canlılar arasında var olan karşılıklı etkileşim bozulmakta ve zincirin farklı basamaklarında bulunan canlı grupları arasındaki besin ve enerji akışı engellenmektedir. Yeryüzü sularındaki aşırı kirlilik, içme sularıyla ya da kontamine olmuş balıkların tüketilmesiyle insan sağlığı üzerinde de olumsuz etkilere yol açar (Silbergeld ve ark., 2005; Dorea, 2006; Verger ve ark., 2007).

İnsanoğlunun yol açtığı çeşitli aktiviteler sonucu çevreye salınan ağır metaller, pestisitler ve kıyı bölgelerdeki atıklar akarsu, yağmur sularının yıkayıcı etkisi ve sucul ortamlara ulaşıp, ekolojik tehlike oluşturmakta ve bu etkileri biyolojik birikimleriyle artış göstermektedir (De la Torre ve ark., 2000). Sucul organizmalar suda bulunan ağır metallerle sürekli etkileşim içerisinde olduklarından, onların zararlı etkileri ile belki de en fazla karşı karşıya kalan organizmalardır. Ağır metaller balık biyokimyasında ve fizyolojisinde önemli değişimlere neden olmakta ve onların işleyiş mekanizmalarını bozabilmektedir (Atlı ve Canlı, 2007, 2011). Çevreden

alınan metaller genellikle proteinlere bağlanarak kan yoluyla, depo bölgelerine ve transformasyon ya da depolama için karaciğere taşınmaktadır. Bir şekilde kontrol edilemeyen metaller, imidazol, karboksil ve özellikle sülfidril grubu içeren proteinler üzerinde çeşitli bölgelere bağlanabilmekte ve bunun sonucunda enzimlerin üç boyutlu yapısını değiştirerek enzim aktivitelerinde azalma veya artışla kendini gösteren önemli değişikliklere neden olabilmektedir (Heath, 1987; Atlı ve Canlı, 2007, 2011).

Fe^{+2}, Cu^{+2}, Cr^{+3}, Zn^{+2} ve Ni^{+2} gibi metaller iz element olarak isimlendirilir ve sucul organizmaların yaşamlarını devam ettirmeleri için düşük düzeylerde mutlaka almaları gerekir. Bunun yanı sıra Pb^{+2}, Cd^{+2} ve Ag^{+} gibi metaller organizmaların yaşamsal fonksiyonlarında önemli rol oynamayan ve çok düşük düzeylerde bile toksik etki gösteren ağır metallerdir. Gerekli olmayan bu metallerin toksik etkilerinin, gerekli olan metallere benzer kimyasal özellik göstermeleri sonucu metabolik döngüde onların yerine geçerek metabolik döngüyü engellemesinden kaynaklandığı belirtilmiştir (Rainbow, 1985). Ağır metaller kendisine benzerlik gösteren herhangi bir moleküle bağlanma eğilimindedirler. Hücre içindeki iz metaller de, sülfür ve azota benzerlik gösterdiğinden çoğu sülfür ve azot içerikli aminoasitlerden yapılmış proteinlere bağlanırlar. Bu benzerlikler nedeniyle toksik olan tüm iz metaller proteinlere ya da diğer moleküllere bağlanarak onların normal metabolik aktivitelerini önlemektedir (Heath, 1987; Kim ve ark., 2001; Javid ve ark., 2007; Atlı ve Canlı, 2011). Cd^{+2} ve Zn^{+2} benzer kimyasal özellikleri nedeniyle madencilik ve endüstri atıklarında genellikle birlikte bulunurlar ve bu nedenlerle de bu iki metal organizmalara girişte aynı alınım yolunu kullanmaktadır (Rainbow ve ark., 2000).

Su sertliği ağır metallerin sucul organizmalar üzerindeki toksik etkilerini değiştirebilir (Kim ve ark., 2001). Birçok ağır metal sert suda daha az toksik hale gelir. Genellikle tatlı sularda su sertliği arttıkça ağır metal toksisitesi organizmaların Ca^{+2} ve Mg^{+2} gibi iyonları almak için yarışmasından dolayı azalmaktadır (Kim ve ark., 2001; Pyle ve ark., 2002; Javid ve ark., 2007). Sert sularda metal aktivitesi metallerin Ca^{+2} ve CO_3 ile bileşik oluşturmasına bağlı olarak düşüş gösterirken, yumuşak sularda düşük Ca^{+2} düzeyi ve tamponlama kapasitesi nedeniyle toksik etki

göstermektedir (Heath, 1987; Verbost ve ark., 1989; Pratap ve Wendelaar- Bonga, 1993; Hollis ve ark., 2000).

Metaller, önemli bir ekosistem bileşeni olmanın yanı sıra besin kaynağı olarak da kullanılan balıkların fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmalarının bütünlüğünü bozabilmektedir (Hogstrand ve ark., 1999; Basha ve Rani, 2003). Su ortamında kirleticilerin bulunması, gerekli olan metallerin yerine geçerek veya çeşitli enzimlerin aktivitelerinde birçok fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikleri meydana getirdiğinden balıklar için önemli bir sorun oluşturmaktadır (Ariyoshi ve ark., 1990). Balıklar ortamdaki ağır metali besin, su ve vücut yüzeyinden absorbsiyon yoluyla, en çok da solungaçlar aracılığıyla almaktadır (Simkiss ve Taylor, 1989; Viarengo, 1989).

Metallerin toksik etkileri, akut (kısa sürede yüksek doz) ve kronik toksisite (uzun sürede düşük doz) olmak üzere iki genel kategoriye ayrılabilir. Akut toksisite genellikle letal etki göstermektedir (Canlı, 1995). Kronik toksisite ise letal ya da subletal olabilmektedir. Sucul ekosistemlerde kimyasalların biyolojik etkileri sadece geleneksel olarak akut toksisite testlerine ait veriler bazında değerlendirildiğinde, bu veriler subletal etkilerin yol açtığı zararların tanımlanmasında yetersiz olabilmektedir (Bury ve ark., 2003). Sucul organizmalar, akut metal kontaminasyonunun etkisinde daha az kalırken, daha çok uzun süreli ve düşük düzeydeki metal derişimlerinin etkisinde kalırlar. Balıkta akut etki sonucu en fazla hasar gören organın solungaç olduğu düşünülmektedir (Olsvik ve ark., 2001). 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).

Yapılan birçok çalışma ile ağır metallerin yüksek derişimlerde sucul organizmalar için letal etki gösterdiği belirtilmiştir (Eisler ve Hennekey, 1977; Mance, 1987; Canlı, 1995). Sucul bir organizma için letal doz, hem metale hem de organizmaya bağlıdır. Metallerin organizmalara olan toksik etkilerinin kimyasal yapıları ile doğrudan ilişkili olduğu ve biyolojik olarak parçalanma özelliği göstermediklerinden ekosistemde uzun süre kalabildikleri bilinmektedir (Tagliari ve

ark., 2004). Metallerin toksik etkileri ile ilgili yapılan çalışmalar, metallerin birlikte yaptıkları etkilerden çok tek başına yaptıkları etkileri içermektedir (Lange ve ark., 2002). Metallerin birlikteki etkileri sinerjistik, antogonistik veya toplam etki şeklinde gözlenebilmektedir. Metal etkileşimleri metallerin emilim, dağılım, atılım ve aynı zamanda biyolojik fonksiyonlarını etkileyebilmektedir (Heath, 1987).

Birçok çalışmada Cu^{+2} ve Pb^{+2}'nin düşük derişimlerinin balıklarda Ca^{+2} homeostasisinin bozulmasına (Viarengo, 1994), çeşitli dokularda iyon regülasyonunda değişikliklere (McGeer ve ark., 2000; Roger ve ark., 2003), plazma iyon düzeylerinde dengesizliğe (Lauren ve McDonald, 1985) ve osmoregülasyon kapasitesinde değişikliklere (Lauren ve McDonald, 1987) neden olduğu gösterilmiştir. Aynı araştırıcılar Pb^{+2}'nin solungaçlarda Ca^{+2} alınımı ile rekabete girerek hipokalseminin oluşumuna ve bunun sonucunda balık ölümlerine neden olduğunu belirlemişlerdir (Lauren ve McDonald, 1987; Roger ve ark., 2003).

1.1. Kurşun

Doğada az miktarda ancak yaygın olarak bulunan Pb^{+2}, periyodik tabloda IV A gurubunda yer alan bir metaldir. Mavimsi-gri renkte bir metal olan Pb^{+2}'nin atom ağırlığı 207,2 g/mol, erime noktası 327,46 ºC ve buharlaşma noktası 550 ºC'dir. Organizmalarda herhangi bir biyolojik işlevi bulunmayan Pb^{+2} yer kabuğunda, kayalarda, toprakta ve suda doğal olarak bulunmaktadır. Doğal sularda normal Pb^{+2} düzeyleri 0,0006-0,12 mg/L arasındadır. Pb^{+2} su ortamına, madencilik, kömür ve petrol yakıtları, çeşitli yapıştırıcı maddelerin üretimi ile kauçuk sanayi, benzin katkı maddesi olarak, akü, boya ve pil yapımı gibi insan aktiviteleri sonucu girmektedir (Heath, 1987; Rogers ve ark., 2003). Pb^{+2}, insan faaliyetleri ile ekolojik sisteme en önemli zararı veren ilk metal olma özelliği taşımaktadır. Atmosfere metal veya bileşik olarak yayılması ile her durumda toksik özellik taşımasından dolayı çevresel kirlilik yaratan en önemli ağır metallerden biridir (Yaramaz, 1992). Pb^{+2} düşük düzeylerde bile üreme, büyüme ve davranış değişikliklerine neden olmaktadır (Burden ve ark., 1998). Solungaçlarda oksijen alımını azalttığı gibi, Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinde de artışa neden olabilmektedir (Torreblanca ve ark., 1989; Atlı ve

Canlı, 2011). Pb^{+2} organizmada genellikle organik bileşikler halinde bulunmakta, ayrıca karaciğer ve böbrek hücrelerinde protoplazmadaki protein moleküllerine bağlanabilmektedir. Pb^{+2} karaciğer ve böbrek gibi organlarda en yüksek birikim düzeyine ulaşırken bir miktar da kemik içerisinde depolanmaktadır (Rogers ve ark., 2003; Alves ve ark., 2006). Pb^{+2}, nitrik asitte iyi çözünen, fosforik asit, hidroklorik asit ve sülfürik asit ile çözünemeyen tuzları oluşturan, klor ve hidroklorik aside dayanıklı ve elektrik iletkenliği düşük olan, iki ve dört değerli bir metaldir.

1.2. Kalsiyum

İyonik kalsiyum (Ca^{+2}) dengesi ve regülasyonu bütün organizmalar için yaşamsal öneme sahiptir. Ca^{+2} fizyolojik süreç için gereklidir ve hem omurgalı hem omurgasızlarda yapısal element olarak görev görür. Sadece besin yoluyla Ca^{+2} emilimi yapabilen karasal omurgalıların aksine, sucul omurgalılar su ortamında Ca^{+2} kaynağına sahiptir. Pb^{+2}, Zn^{+2} ve Cd^{+2} gibi divalent metaller Ca^{+2} antagonistidir. Besinsel Ca^{+2}, hem suyla taşınan hem de besin yoluyla alınan Cd^{+2}'ye karşı koruyucu görev üstlenir (Niyogi ve Wood, 2006). Ca^{+2} balık türlerinin ekolojisinde çok önemli bir faktördür. Tatlı sularda yüksek düzeydeki Ca^{+2}'nin suyun kalitesi ve bitki ile hayvanlarda verimliliğin artışında çok önemli bir iyon olduğu belirtilmiştir (Berntssen ve ark., 2003). Balıklarda artan ortam Ca^{+2}'nin iyon kaybına karşı tampon görevi gördüğü ve düşük Ca^{+2} ile pH ortamında balıkların ozmolalite ve hayatta kalmalarında düşüş olduğu bilinmektedir (McDonald ve ark., 1980; Gonzalez ve ark., 2006). Sucul organizmalarda Ca^{+2} yapısal, elektriksel, ekstraselüler protein ve enzimlerde kofaktör olarak ve intraselüler regülasyonda önemli biyolojik işlevleri olan bir iyondur (Hunn, 1985). Yapısal olarak hem iskelet dokularında (kemik, diş ve pul) hem de yumuşak dokularda önemli işlevi bulunmaktadır. Tatlı su balıkları membran akıcılığı ve bütünlüğü, hücre adhezyonu ve büyümeleri için gerekli bir iyon olan Ca^{+2}'yi direkt olarak sucul ortamdan solungaç ve deri yoluyla almaktadırlar (Ichii ve Mugiya, 1983). Tatlı su balıklarında solungaçlar, bağırsak ve böbrekler iç ve dış ortam arasında Ca^{+2} derişiminin düzenlenmesinde çok önemli organlardır (Hwang ve Yang, 1997). Ca^{+2}, solungaçların apikal membranlarında

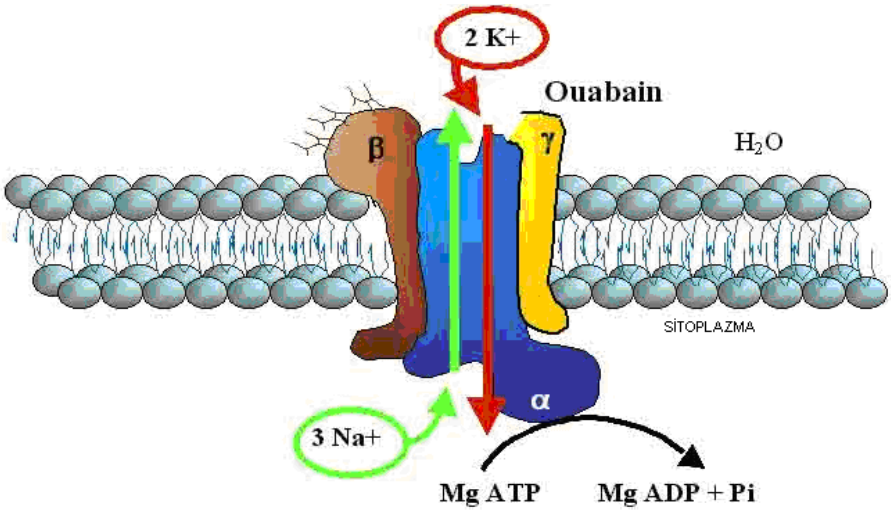
bulunan Ca^{+2} kanallarıyla alınmakta ve basolateral plazma membranlarında Ca^{+2}-ATPazlarla kanın içerisine taşınmaktadırlar (Verbost ve ark., 1989; Baldisserotto ve ark., 2004a). Pb^{+2} potansiyel olarak, Ca^{+2}'nin giriş yollarından herhangi birini etkilemekte ve balık solungacında apikal Ca^{+2} kanallarında yarışmalı olarak Ca^{+2} homeostasisini bozabilmektedir (MacDonald ve ark., 2002). Ca^{+2} sert suların koruyucu etkisinden sorumlu katyonların başında gelmektedir. Balıklarda metal toksisitesinin yumuşak sularla kıyaslandığında sert sularda azaldığı belirlenmiştir (Pagenkopf, 1983; Pascoe ve ark., 1986; Winner ve Gauss, 1986). Benzer sonuçlar Zn^{+2}, Cu^{+2} ve Pb^{+2} gibi diğer metallerde de saptanmıştır (Diamond ve ark., 1992; Playle ve ark., 1992; Barron ve Albeke, 2000). Metal toksisitesi ve birikimi üzerine su sertliğinin iki önemli etki mekanizması bulunmaktadır. Bunlar membran permeabilitesinin azalması ve alınım yerinin azaltılması gibi biyolojik mekanizmalar ile absorbsiyon ve kompleks için rekabet gibi kimyasal mekanizmalardır (Barron ve Albeke, 2000).

1.3. Adenozin Trifosfataz (ATPaz) Enzimleri

Adenozin trifosfataz (ATPaz) enzimleri hücre içi fonksiyonlarda önemli rol oynayan, membrana bağlı ve toksisitede duyarlı belirteç olan bir grup enzimdir. 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 duyarlı olduğu belirtilmiştir (Riedel ve Christensen, 1979; Watson ve Beamish, 1981; Thaker ve ark., 1996; Atlı ve Canlı, 2011). İyi bilinen membrana bağlı ATPaz'lar, Na^{+}/K^{+}-ATPaz, Ca^{+2}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz'dır. 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; Atlı ve Canlı, 2008a, 2011).

Na^{+}/K^{+}-ATPaz, 3 Na^{+} iyonunu hücre dışına, 2 K^{+} iyonunu ise hücre içine transfer etmek için ATP'nin hidrolizi ile açığa çıkan enerjiyi kullanmaktadır (Şekil 1.1.). Böylece hücre hacminin düzenlenmesi, iyon taşınımı, elektrokimyasal

gradientin korunması gibi temel fonksiyonlarda önemli görevlere sahiptir (Grosell ve ark., 2003). Na^+/K^+-ATPaz enziminin kemikli balıkların solungaç epitellerinde çoğunlukla mitokondrice zengin hücrelerde yer aldığı bilinmektedir. Na^+/K^+-ATPaz enzimi, P tipi ATPaz grubunda olup heterodimerik bir integral membran proteinidir. Enzim 100 kDa moleküler ağırlığında α alt ünitesi ile 60 kDa moleküler ağırlığındaki glikozitlenmiş β alt ünitesinden oluşmaktadır. 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 da geliştiği gözlenmiştir. 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).

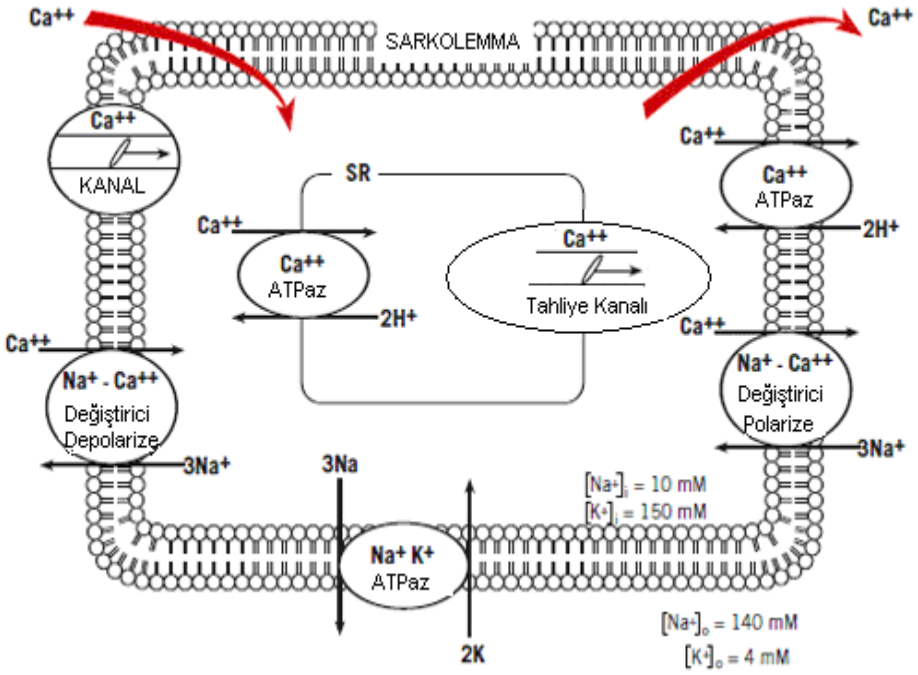


Şekil 1.1. Na^+/K^+-ATPaz'ın yapı ve karakteristikleri
(http://www.bioscience.org/2001/v6/d/watson/figures.htm'den)

Mg^{+2}-ATPaz enzimi, solungaç epitelyumundan hücre membran bütünlüğü ve solungaç geçirgenliğinin stabilizasyonu için gerekli olan Mg^{+2}'nin taşınması ile oksidatif fosforilasyonda görev görmektedir (Parvez ve ark., 2006).

Sarkoplazmik retikulum tübüllerinde lokalize olan Ca^{+2}-ATPaz ise, 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 1.2.). 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). Yapılan çeşitli araştırmalar sonucu balıkların Ca^{+2}'yi sudan absorpladıkları görülmüştür ve tatlı su balıklarında genel olarak emilimin bağırsaktan çok epidermal yolla olduğu ve balıkta Ca^{+2} metabolizmasının düzenlenmesinde Ca^{+2}-ATPaz'ın önemli göreve sahip olduğu da belirtilmektedir. Metal etkisine açık olan solungaçlarda metallerin Ca^{+2}-ATPaz enzimleri üzerindeki etkilerini araştırmak bu anlamda çok büyük önem taşımaktadır (Shephard ve Simkiss, 1978). Bununla birlikte ağır metallerin ATPaz enzimlerine olan etkileri çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir (Gjevre ve Naess, 1996; De la Torre ve ark., 2000; Sancho ve ark., 2003; Craig ve ark., 2007; Atlı ve Canlı, 2007; Atlı ve Canlı, 2008b).



Şekil 1.2. Sarkolemma ve Sarkoplazmadaki kalsiyum (Ca^{+2}) akışının kontrolü (http://www.heartandmetabolism.org/dictionnary_mo.asp'den)

Metal varlığında solungaç ATPaz aktiviteleri inhibe olabilmekte veya uyarılabilmektedir (Shephard ve Simkiss, 1978; Watson ve Beamish, 1980; Watson ve Benson, 1987; Alves ve Wood, 2006; Atlı ve Canlı, 2008c, 2010, 2011). Örneğin, Kuhnert ve ark. (1976), in vivo Cr^{+6} etkisindeki alabalık *Salmo gairdneri*'nin solungaç dokusunda Mg^{+2}-ATPaz'ın aksine Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinde inhibisyon gözlemiştir. Buna karşın, alabalığın solungaç dokusunda in vitro Zn^{+2} etkisinin Mg^{+2}-ATPaz, Ca^{+2}-ATPaz ve Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitelerinde inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir (Watson ve Beamish, 1980). 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 (Flik ve ark., 1985, Verbost ve ark., 1988). Bununla birlikte Atlı ve Canlı (2007), *Oreochromis niloticus*'da kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin Cd^{+2}, Zn^{+2} ve Pb^{+2}'nin 14 günlük etkisi sonunda azalış gösterdiğini kaydetmişlerdir.

Balıklar, sucul ekosistemlerin durumunu ve toksikolojik olarak gelişen patolojiyi değerlendirmede yaygın olarak kullanılan önemli bir biyoindikatördür. Nil tilapyası *O. niloticus*, elde edilişi, kültürü, laboratuarda çalışılması ve toksikolojik araştırmalarda kirleticilere verdiği tepkilerden dolayı iyi bir biyolojik modeldir (Almeida ve ark., 2002; Garcia-Santos ve ark., 2006). 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). 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; 15, 30 ve 60 mg/L derişimindeki Ca^{+2} ve 20 µM ile 10 µM derişimindeki Pb^{+2}'nin tek ve birlikteki etkilerinde, tatlı su balığı *O. niloticus*'un solungaç ve bağırsak Na^{+}/K^{+}-ATPaz ile Mg^{+2}-ATPaz ve kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitelerinin akut (48 saat) ve kronik (14 gün) süreçler sonucunda verdiği tepkilerin ölçülmesi amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Shephard ve Simkiss (1978), tatlısu balığı ***Rutilus rutilus***'un solungaç Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi çalışmalarında enzimin 2 mM Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarının etkisinde en yüksek oranda aktive olduğunu; Na^{+}, K^{+} veya ouabain tarafından etkilenmediğini göstermişlerdir. Ayrıca araştırıcılar 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 aktivitesinin artış gösterdiğini kaydetmişlerdir.

Varanasi ve Gmur (1978), Pb^{+2} içeren ortamda ***Oncorhynchus kisutch***'ı 168 saat bırakıp, 8,4 mg $CaCl_2$ içeren besinle beslediklerinde dokularda Pb^{+2} düzeyinin azaldığını görmüşlerdir.

Miller ve Mackay (1980), gökkuşağı alabalığı ***S. gairdneri*** ile yaptıkları çalışmada balıkların Cu^{+2} toksisitesine karşı korunmasında Ca^{+2} sertliğinin alkaliniteden daha önemli olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Pagenkopf (1983), Ca^{+2} ve Mg^{+2} katyonlarının oluşturduğu sertliğin ağır metal toksisitesini azalttığını, sertlik oluşturan katyonların ve ağır metallerin solungaçtaki bağlayıcı yüzeylerde ve alınım bölgelerinde rekabete girdiklerini açıklamıştır.

Wright ve ark. (1995), Cd^{+2}'nin etkisine bırakılan ***Morone saxatilis***'de düşük Ca^{+2}'nin bulunduğu ortamlarda mortalite gözlerken, yüksek Ca^{+2} derişimlerinin bulunduğu ortamlarda ise mortalite gözlememişlerdir. Bunun sonucu olarak toksisitenin azaltılmasında Ca^{+2}'nin direk olarak biyolojik bir fonksiyonunun olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Gjevre ve Naess (1996), örihalin bir balık olan gökkuşağı alabalığı (***Oncorhynchus mykiss walbavm)*** ve Atlantik salmonun ***(Salmo salar L.***) bağırsak ve solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi için uygun koşulları denemiş ve sonuçta ***S. salar***'ın bağırsak dokusu Na^{+}/K^{+}-ATPaz özelliklerinin, solungaç dokusundakilerden çok farklı olmadığını, fakat bağırsak dokusundaki Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin solungaç dokusuna göre daha yüksek miktarda substrata gereksinim duyduğunu bildirmişlerdir.

Ay ve ark. (1999), *Tilapia zillii*'nin Cu^{+2} ve Pb^{+2}'nin (0,5-4,0 mg/L) 14 günlük etkisi sonunda kas, solungaç ve karaciğer dokularında Cu^{+2} ve Pb^{+2}'nin birikim gösterdiğini, kas dokusunda Cu^{+2} düzeyinin kontrole göre farklı olmadığını belirtmişlerdir. Sonuçta solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin her iki metal etkisinde inhibisyon gösterdiği kaydedilmiştir.

McGeer ve ark. (2000), gökkuşağı alabalığı *O. mykiss*' in sert suda kronik subletal Cd^{+2} (3 μg/L), Cu^{+2} (75 μg/L) ve Zn^{+2} (250 μg/L) etkisine bırakılması sonucu balıklarda büyüme, beslenme alışkanlığı, iyon regülasyonu, yüzme performansı ve oksijen tüketimi gibi parametreleri incelemişlerdir. İncelenen parametrelerde üç metal etkisinde de bir bozulmanın ya da normalden sapmanın olduğu, bazı parametrelerde telafi mekanizmalarının işlediği ve sonunda stabilizasyona uğradığı görülmüştür. Büyümede bir etki görülmezken, beslenmede artış veya azalışlar olduğu tespit edilmiştir. Cu^{+2} etkisinde kalan balıklarda yüzme hızında azalmaya karşın oksijen tüketimi artmıştır. Solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi Cu^{+2} etkisinde kalan balıklarda artarken, Cd^{+2} etkisinde bir değişiklik göstermemiştir. Başlangıçta Na^{+} ve Ca^{+2} dengesinde bozulmalar olsa da uzun sürede kontrol ile bir fark görülmemiştir. Özellikle Cd^{+2} etkisinde kalanlarda Ca^{+2} seviyesinin normale dönmesi yaklaşık bir ayı bulmuştur.

MacDonald ve ark. (2002), Pb^{+2}'nin balık solungacında apikal Ca^{+2} kanallarındaki inhibisyon rekabetiyle Ca^{+2} homeostasisini bozduğunu göstermişlerdir.

Sancho ve ark. (2003), yılan balığı *Anguilla anguilla*'nın 0,22 mg/L derişimindeki tiyobenkarb'ın (herbisit) 96 saatlik etkisi sonrasında solungaç ve kas Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktivitelerini ölçmüşlerdir. Solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz, Mg^{+2}-ATPaz ve Total-ATPaz aktivitelerinin 2-12 saatlik herbisit etkisinde inhibe olduğu ve kas dokusunda da benzer şekilde ATPaz aktivitelerinin düştüğü gösterilmiştir.

Rogers ve ark. (2003), gökkuşağı alabalığı *O. mykiss*' de yaptıkları çalışmada sudaki Pb^{+2}'nin Na^{+} ve Cl^{-} dengesi ve Ca^{+2} homeostasisindeki etkileriyle birlikte iyon regülasyonunda bozulmalara neden olduğunu göstermişlerdir.

Cicik ve ark. (2004), *O. niloticus*'un 7-15 gün süreyle Cd^{+2}, Pb^{+2} ve bu iki metalin karışımın etkisi sonucunda kas, böbrek, karaciğer, dalak ve solungaç dokularında metal birikim düzeylerini ölçmüşlerdir. Kontrollerle karşılaştırıldığında 7-15 gün süreyle Pb^{+2}, Cd^{+2} ve bu iki metalin karışımında bu dokulardaki metal birikiminin arttığını kaydetmişlerdir. En düşük metal birikim düzeyi kas dokusunda görülmesine karşın, 7 günlük etki sonunda böbrek ve kas dokusunun dışındaki dokularda Cd^{+2} birikimi bakımından istatistiksel bir fark olmadığını kaydetmişlerdir. Buna karşın 15. gün sonunda doku ve organlardaki Cd^{+2} birikim düzeylerinin sırasıyla böbrek > karaciğer > dalak > solungaç > kas şeklinde sıralandığını kaydetmişlerdir. Bununla birlikte 15. gün sonunda böbrek ve karaciğerdeki Cd^{+2} birikimi, Cd^{+2} ve Pb^{+2} karışımında artarken, solungaçlarda azalmış, dalak ve kas dokularında ise değişmemiştir.

Atlı ve Canlı (2007), *O. niloticus*'un 14 gün süreyle 5, 10 ve 20 µM derişimlerindeki metal (Cu^{+2}, Cd^{+2}, Zn^{+2} ve Pb^{+2}) etkilerinin ardından solungaç ve bağırsak Na^+/K^+-ATPaz ile kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesini ölçmüşlerdir. Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi solungaçta 20 µM Pb^{+2} etkisinde artış gösterirken, bütün metal etkilerinde ise inhibe olmuştur. Kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ise Cu^{+2} dışındaki diğer metal etkilerinde inhibe olmuştur. Bu sonuçlar ışığında araştırmacılar enzim tepkilerinin metal tipi ve derişimlerine bağlı olarak değişiklik gösterdiğini ve enzimatik tepkilerin ekotoksikoloji alanında sucul ortamlardaki metal kirliliğine duyarlı belirteçler olarak kullanılabileceğini vurgulamışlardır.

Craig ve ark. (2007), 7 gün süreyle yumuşak suya adapte edilen zebra balığı *Danio rerio*'da çeşitli biyokimyasal parametrelerle birlikte Na^+/K^+-ATPaz aktivitesini sert suda yaşayan balıklarla karşılaştırmışlardır. Yumuşak suda iyon düzeyleri sert suya göre azalış gösterirken, tüm vücuttaki iyon düzeylerinde önemli bir fark gözlenmemiştir. Buna karşılık, araştırıcılar solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin yumuşak suda 3. güne kadar önemli düzeyde artışının ardından 7. günde sert sudaki düzeyine yaklaştığını belirtmiş ve elde ettikleri verilerin balıktaki iyon düzenleyici mekanizmaların işleyişi hakkında yol gösterici olabileceğini kaydetmişlerdir.

Ebrahimpour ve ark. (2010), 40, 150 ve 380 mg $CaCO_3$/L sertlik düzeylerine sahip sularda Cu^{+2} ve Zn^{+2}'nin toksisitesinin tatlısu balığı *Capoeta fusca*'ya etkisine bakmışlardır. Elde ettikleri sonuca göre suyun sertliği arttıkça metallerin toksik etkilerinde azalış gözlemiş başka bir deyişle, Cu^{+2} ve Zn^{+2}'nin sert suya göre yumuşak suda çok daha toksik olduğunu belirtmişlerdir.

Mansouri ve Baramaki (2011), farklı sertlik düzeyine sahip sulara adapte edilen (0,118, 0,154 ve 0,180 mg Ca^{+2}/L) *C. fusca*'da akut Hg^{+2} toksisitesi üzerine pH ve artan su sertliğinin etkisi ile ilgili çalışmalarında, su sertliği ve pH arttıkça Hg^{+2} toksisitesinin azaldığını göstermişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

3.1.1.1. Metaller

Kurşun [$Pb(NO_3)_2$]

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′-tetra asetikasit, 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 penta hidrat ($CuSO_4.5H_2O$, Merck)
Folin Ciocalteu Fenol Ayıracı (Sigma)
Bovin Albumin%35 (Sigma)

3.1.2. Kullanılan Aletler

Spektrofotometre: Schimadzu UV-1800
Derin dondurucu (- 80 ^oC): Revco Ultima II
Hassas Terazi: Sartorius Analytic ATL-224-I
Santrifüj: Sigma 2-16 K
Homojenizatör: Janke&Kunkel Ultra Turrax T25
Su Banyosu: Wise Bath WSB-30
pH metre: Hanna HI 8314 membran pH metre
Manyetik Karıştırıcı: Janke&Kunkel IKAMAG RH
Karıştırıcı: Vortex S0 200
Çoklu ölçüm cihazı: ThermoOrionstar 5

3.2. Yöntem

Deneylerde Ç.Ü. Su Ürünleri Fakültesi balık yetiştirme havuzlarından alınan tatlısu balığı *O. niloticus* kullanılmıştır. Sıcaklığın 20±1 ^0C olduğu ve 12 saat aydınlatma periyodunun uygulandığı laboratuar ortamında 40 x 40 x 100 cm ölçülerindeki 120 L çeşme suyu içeren akvaryumlarda yeni koşullara adapte olmaya bırakılmıştır. Akvaryum sularının fizikokimyasal özellikleri Çizelge 3.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Akvaryum sularının fizikokimyasal özellikleri (Art ort. ± S.D., N=54)

Özellik	**15 mg Ca^{+2}/L**	**30 mg Ca^{+2}/L**	**60 mg Ca^{+2}/L**
pH	7,61±0,25	7,46±0,23	7,34±0,22
Oksijen (mg O_2/mL)	7,03±1,20	7,01±0,76	7,23±0,71
İletkenlik (µS/cm**)**	161,0±10,7	242,0±9,50	395,2±40,2
Sertlik (mg $CaCO_3$/L)	91,1±30,3	105,5±12,3	193,3±28,4
Alkalinite (mg $CaCO_3$/L)	95,5±14,0	90,5±12,0	98,0±8,90
Sıcaklık (C°)	17,6±1,43	17,5±1,43	17,6±1,40

Balıklara günde bir defa olmak üzere ağırlıklarının % 2-3'ü kadar hazır Pınar Sazan yavru yemi verilmiştir. Kullanılan balık yemindeki mikro elementlerin miktarları sırasıyla 70 mg Zn^{+2}/kg, 25 mg Mn^{+2}/kg, 25 mg Mg^{+2} /kg, 2 mg Fe^{+2}/kg, 0.7 mg I^{-}/kg, 1 mg Cu^{+2}/kg, 0.2 mg Co^{+3}/kg, 0.03 mg Se^{-}/kg; makro elementlerin miktarları ise en az % 2-en çok % 2,5 Ca^{+2}, en az % 0,2-en çok % 1 Na^{+}, en az % 1 P ve yem içeriğindeki ham protein ise en az % 40'tır. Deney sırasında akvaryumlardaki sert ve yumuşak su ortamının kalitesini belirlemek amacıyla çoklu ölçüm cihazıyla (Thermo Orionstar 5) ölçümler yapılmıştır. Deneylerde Pınar Gökçeağaç marka hazır su (15 mg Ca^{+2}/L) kullanılmıştır ve ayrıca bu hazır su üzerine belirli miktarlarda $CaCl_2$ ilave edilerek farklı sertlik değerlerine (15, 30 ve 60 mg Ca^{+2}/L) sahip sular hazırlanmıştır.

Deney aşamasında balıklar 8 adet olacak şekilde 33x33x40 cm boyutlarındaki akvaryumlarda 15, 30 ve 60 mg Ca^{+2}/L ve ayrıca 20 µM (akut) ve 10 µM (kronik) derişimlerindeki kurşun ($Pb(NO_3)_2$) ile 15, 30 ve 60 mg Ca^{+2}/L etkisine akut olarak 48 saat ve kronik olarak 14 gün süreyle bırakılmıştır. Deney sırasında akvaryumların cam yüzeylerine tutunma, akvaryum suyunun buharlaşması gibi nedenler akvaryumlardaki metal derişimleri değişeceğinden akvaryum suları 2 günde bir taze hazırlanan çözeltilerden yapılan uygun seyreltmelerle

değiştirilmiştir. Metallerin balık yemine yapışmasını önlemek amacıyla su değişiminden 1 saat önce yem verilmiştir. İn vitro olarak ise, *O. niloticus*'un solungaç, bağırsak ve kas dokusu homojenatlarında 15, 30, 60 ve 120 mg/L derişimlerindeki Ca^{+2}'nin direkt etkisindeki ATPaz aktiviteleri de ölçülmüştür.

3.2.1. Doku Homojenatlarının Hazırlanışı

Deney süreleri sonunda balıklar akvaryumlardan alınan balıklar spinal hale getirilip, kurutma kağıdıyla kurulandıktan sonra, boyları en yakın cm ve ağırlıkları en yakın g cinsinden ölçülmüştür. Balıkların ortalama boyları; 15 mg Ca^{+2}/L, 30 mg Ca^{+2}/L ve 60 mg Ca^{+2}/L bulunan ortamlarda sırasıyla 10,3±1,30 cm, 10,2±1,20 cm ve 10,6±1,10 cm olarak ölçülmüştür. Ağırlıkları ise sırasıyla 17,7±6,70 g, 16,9±5,90 g ve 18,9±5,90 g olarak ölçülmüştür ve farklı deney grupları arasında balık boy ve ağırlık bakımından istatistiksel olarak bir ayırım gözlenmemiştir ($P>0.05$). Steril aletler kullanılarak solungaç, bağırsak ve kas dokuları alınıp, homojenize edilinceye kadar -80 ^{0}C'de saklanmıştır. Dokular 250 mM Sukroz, 20 mM Trizma-Base, 1 mM EDTA (pH 7,8) içeren homojenizasyon tamponu ile (1/10, w/v) 9500 rpm'de 1,5 dk süreyle buz üstünde homojenize edilmiştir. Eppendorf tüplerine aktarılan homojenatlar 13.000 g'de 20 dk +4 ^{0}C'de santrifüj edilmiştir ve elde edilen supernatantlar ATPaz analizlerinde ve protein tayininde kullanılmıştır.

3.2.2. ATPaz Enzim Aktivitelerinin Ölçümü

Bu çalışmadaki ATPaz aktivite ölçümünde, laboratuarımızda daha önce yapılan ATPaz karakterizasyon çalışması sonucu (Atlı ve Canlı, 2008c) elde edilen enzim aktivitesinin en yüksek olduğu inkübasyon ortamı derişimleri kullanılmıştır (Çizelge 3.2.).

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

	Total-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 iki tekrarlı olmak üzere her tüpe son iyon derişimleri çizelgede verilen 870 µL inkübasyon ortamı ve 30 µL örnek konarak sıcak su banyosunda 37 ^{0}C'de 5 dk inkübe edildikten sonra reaksiyon, tüplerin üzerlerine 100 µL 3 mM Na_2ATP konmasıyla başlatılmıştır. Reaksiyon, 30 dk inkübasyon süresinin ardından su banyosundan alınıp tüplere konan 500 µL soğuk saf su (+4 ^{o}C) ile sonlandırılmıştır. Tüm bileşenler dışında ATP içermeyen tüpler ATP körü, sadece örnek içermeyen tüpler ise Örnek körü olarak kullanılmıştır. Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi, Total-ATPaz (ouabain içermeyen) aktivitesinden Mg^{+2}-ATPaz (ouabain içeren) aktivitesinin çıkarılması ile hesaplanmıştır. Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ise $CaCl_2$ varlığında ve yokluğunda ölçülen enzim aktiviteleri arasındaki farka dayanarak hesaplanmıştır. Enzim aktiviteleri, µmol Pi/mg prot./sa. cinsinden verilmiştir.

3.2.3. İnorganik Fosfat Tayini

Prensip;

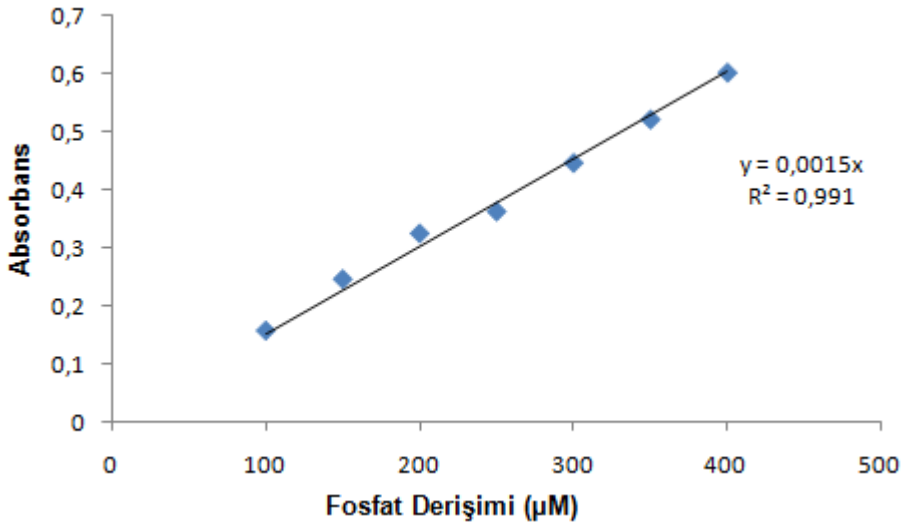
İnorganik fosfat tayini, ATP'den açığa çıkan Pi'nin Polioksietilen 10 Lauril eter ile fosfomolibdatın oluşturduğu sarı renkli bileşiğin absorbansının 390 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır. (Atkinson ve ark., 1973).

Ayıraçlar;

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

Deneyin Yapılışı;

1. 1,5 mL örnek üzerine 3 mL ana ayıraçtan konmuştur.
2. Oda sıcaklığında 10 dk kompleks oluşumu için bekletilmiştir.
3. Absorbans değerleri 390 nm'de ölçülmüştür.
4. Sonuçlar 100, 150, 200, 250, 300, 350 ve 400 μM KH_2PO_4 çözeltisinden hazırlanarak elde edilen standart eğri üzerinden değerlendirilmiştir (Şekil 3.1.)



Şekil 3.1.Fosfat derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki.

3.2.4. Total Protein Analizi

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

Prensip;

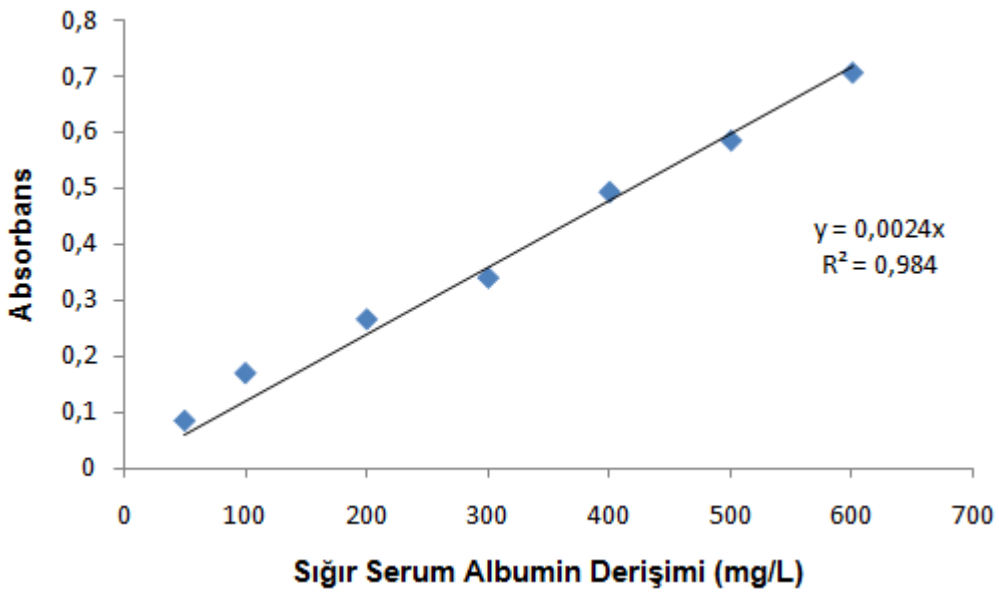
Proteinlerin alkali bakır sülfat ve fosfotungstik asit ile mavi renkli kompleks oluşturması temeline dayanmaktadır. Oluşan bu renkli bileşiğin ise spektrofotometrede 750 nm dalga boyunda absorbansı ölçülerek kantitatif olarak protein miktarı belirlenmektedir. Proteinlerin çoğunda tirozin veya triptofan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

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 sağlanmıştır.
2. Ayıraç B_1: % 1 $CuSO_4$. $5H_2O$. 1 g $CuSO_4.5H_2O$ tartılıp, 100 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır.
3. Ayıraç B_2: % 2 Na-K-Tartarat. 2 g Na-K-Tartarat tartılıp 100 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır.
4. Ayıraç C: 50 hacim ayıraç A + 1 hacim eşit oranda karıştırılan ayıraç B_1ve B_2.
5. Folin-Ciocalteu Çözeltisi: Kullanılırken 1'e 1,5 oranında saf su ile seyreltilmelidir.
6. Standart BovinAlbumin Çözeltisi: 1 mL'de 1 mg (1000 mg/L) bovin albumin olacak şekilde stok bovin albumin çözeltisi hazırlanmıştır ve bundan yapılan uygun seyreltmelerle 50-100-200-300-400-500-600 mg/L olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmıştır.

Deneyin Yapılışı;

1. Deney tüplerine hazırlanan standart çözeltilerden ve örneklerden 0,3 mL konulmuştur.
2. Tüplerin üzerine 3 mL ayıraç C eklenmiştir.
3. Tüpler vortexle karıştırılarak 15 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.
4. Tüplere 0,3 mLFolin-Ciocalteu konarak tüpler iyice karıştırılmıştır.
5. Oda sıcaklığında 30 dk bekletilmiştir.
6. Absorbans değerleri 750 nm'de okunmuştur.
7. Sonuçlar 50, 100, 200, 300, 400, 500 ve 600 mg/L sığır serum albumini çözeltisinden hazırlanarak elde edilen standart eğri üzerinden değerlendirilmiştir (Şekil 3.2.).



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

Buna göre 20 µM Pb^{+2} etkisinde 1 nolu *O. niloticus*'un solungaç dokusunda 48 saat (akut) sonunda total protein düzeyi;

y = 0,0024x

Absorbans: y = 0,462

$$\text{Derişim (x)} = \frac{0,462}{0,0024}$$

Derişim = 0,192 mg prot./mL

Doku homojenatı tamponla 10 mL'ye seyreltildiği için

Derişim = 1,92x10 x10

Derişim = 19,2 mg prot./g y.a.

Aynı regresyon eşitliği kullanılarak kontrol ve metal etkilerindeki gruplarda iki tekrarlı olmak üzere total protein düzeyleri hesaplanmıştır.

3.2.5. ATPaz Aktivitesinin Hesaplanması

$$\text{ATPaz aktivitesi} = \frac{\text{OD}/0{,}0015^{*} \text{ x } 4{,}5 \text{ (mL)}}{1000 \text{ x } 0{,}03 \text{ (mL) x } 0{,}5 \text{ (sa.) x mg prot./mL}}$$

= µmol Pi/mg prot./sa.

* = İnorganik fosfat regresyon eşitliği (y = 0,0015x)

20 µM Pb^{+2} etkisinde 2 nolu *O. niloticus*'un solungacında 48 saatlik (akut) süre sonunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi:

Absorbans: y = 0,035

$$Na^{+}/K^{+}\text{-ATPaz aktivitesi} = \frac{0{,}035/0{,}0015 \text{ x } 4{,}5 \text{ (mL)}}{1000 \text{ x } 0{,}03 \text{ (mL) x } 0{,}5 \text{ (sa.) x } 1{,}92 \text{ mg prot./mL}}$$

Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi = 3,02 µmol Pi/mg prot./sa

3.2.6. İstatistik

Bu çalışmadaki istatistiksel analizler, SPSS yardımıyla "Regresyon Analizi" ve "One-way ANOVA" kullanılarak yapılmıştır. Kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel bir ayırımın olup olamadığı "One-way ANOVA" ile test edilmiştir. Eğer ayrım önemli ($P<0,05$) ise, hangi grup veya grupların farklı olduğunun elirlenmesi için "post-hoc" testlerinden Duncan-test uygulanmıştır. Grafik çizimleri ise Microsoft Excel programı kullanılarak çizilmiştir. Veriler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Akut (48 saat) Deneyler

O. niloticus Ca^{+2}, Pb^{+2} ve Ca^{+2}+Pb^{+2} etkisine akut (20µM-48 saat) olarak bırakılmıştır. Bu süre sonunda solungaç ve bağırsak dokularında Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz ile kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ölçülmüştür.

4.1.1.1. Kontrol Grubu Balıklarda ATPaz Aktiviteleri

15 mg Ca^{+2}/L etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz ile Mg^{+2}-ATPaz aktiviteleri 9,97±3,30 ve 18,2±1,63, bağırsak dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz ile Mg^{+2}-ATPaz aktiviteleri 15,1±1,01 ve 21,7±1,92, kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ise 15,6±1,12 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçülmüştür. Bu değerlere göre yapılan karşılaştırma sonucunda 30 ve 60 mg Ca^{+2}/L etkisinde elde edilen veriler aşağıda belirtilmiştir.

30 mg Ca^{+2}/L etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 120 (21,6±2,10 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,05$) (Şekil 4.1.), Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 4 artmıştır (18,9±3,02 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P>0,05$) (Şekil 4.2.). Aynı koşullarda bağırsak dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 47 (21,9±0,71 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,05$) (Şekil 4.3.), Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 37 artmıştır (30,1±1,50 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,05$) (Şekil 4.4.). Kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 59 artmıştır (37,8±4,15 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,05$) (Şekil 4.5.).

60 mg Ca^{+2}/L etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 25 artmıştır (12,5±0,9 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P>0,05$) (Şekil 4.1.), buna karşın Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi % 7 azalmıştır (16,9±1,20 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P>0,05$) (Şekil 4.2.). Aynı koşullarda bağırsak dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 100 (29,8±1,60 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,05$)

(Şekil 4.3.), Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 86 artmıştır (40,9±2,34 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,05) (Şekil 4.4.). Kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 80 artmıştır (28,9±1,01 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,05) (Şekil 4.5.).

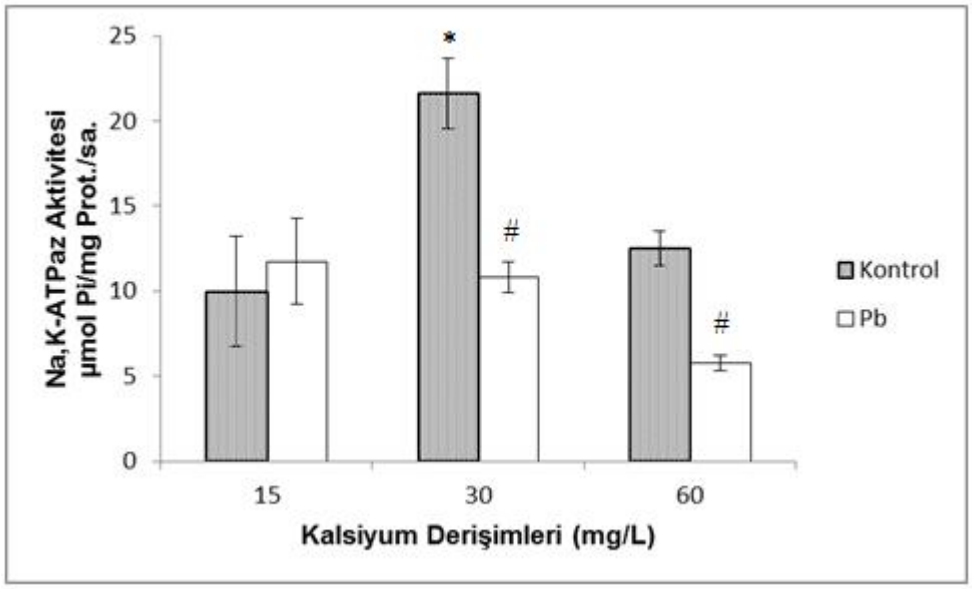
4.1.1.2. Kurşun Etkisinde Kalan Balıklar

15 mg Ca^{+2}/L etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi Pb^{+2} etkisinde kontrole göre % 18 (11,7±2,54 µmol Pi/mg prot./sa.) (P>0,05) (Şekil 4.1.), Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi % 28 oranında artmıştır (23,3±1,60 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,05) (Şekil 4.2.). Aynı koşullarda bağırsak dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi Pb^{+2} etkisinde kontrole göre % 89 (28,4±3,06 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,05) (Şekil 4.3.), Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 38 artmıştır (30,3±3,72 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,05) (Şekil 4.4). Kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi Pb^{+2} etkisindeki kontrole göre % 4 artmıştır (16,2±1,15 µmol Pi/mg prot./sa.) (P>0,05) (Şekil 4.5.).

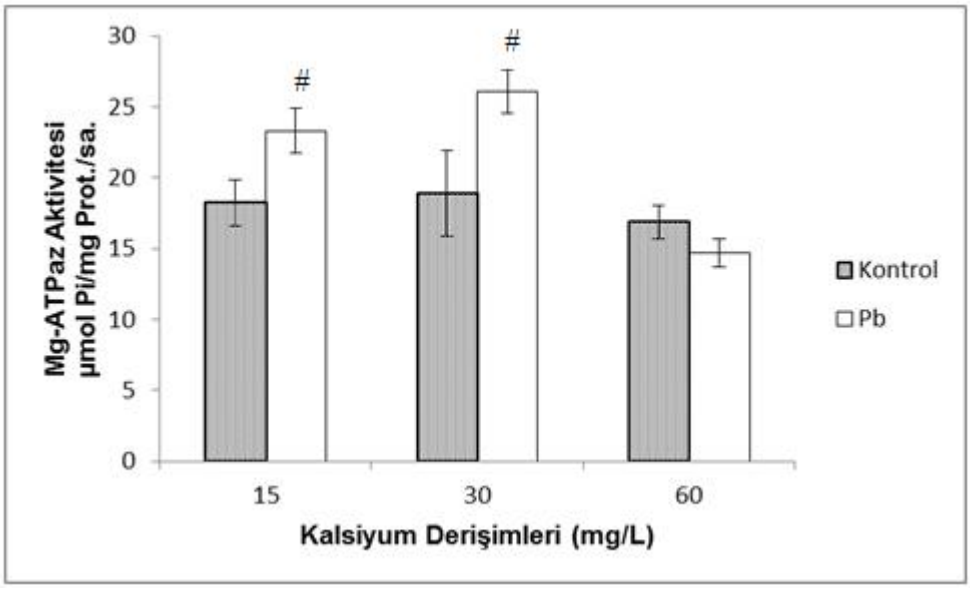
30 mg Ca^{+2}/L etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi Pb^{+2} etkisinde kontrole göre % 50 azalırken (10,8±0,91 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,05) (Şekil 4.1.), Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi % 38 artmıştır (26,1±1,55 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,05) (Şekil 4.2.). Aynı koşullarda bağırsak dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi Pb^{+2} etkisinde kontrole göre % 36 artmıştır (29,5±1,60 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,05) (Şekil 4.3.), Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 10 azalmıştır (27,0±1,71 µmol Pi/mg prot./sa.) (P>0,05) (Şekil 4.4.). Kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi Pb^{+2} etkisindeki kontrole göre % 41 azalmıştır (22,5±2,31 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,05) (Şekil 4.5.).

60 mg Ca^{+2}/L etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi Pb^{+2} etkisinde kontrole göre % 52 (5,75±0,45 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,05) (Şekil 4.1.), Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi % 13 azalmıştır (14,7±1,03 µmol Pi/mg prot./sa.) (P>0,05) (Şekil 4.2.). Aynı koşullarda bağırsak dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi Pb^{+2} etkisinde kontrole göre % 22 (23,3±3,35 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,05) (Şekil 4.3.), Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 51 azalmıştır (19,5±2,64 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,05) (Şekil 4.4.). Kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi Pb^{+2}

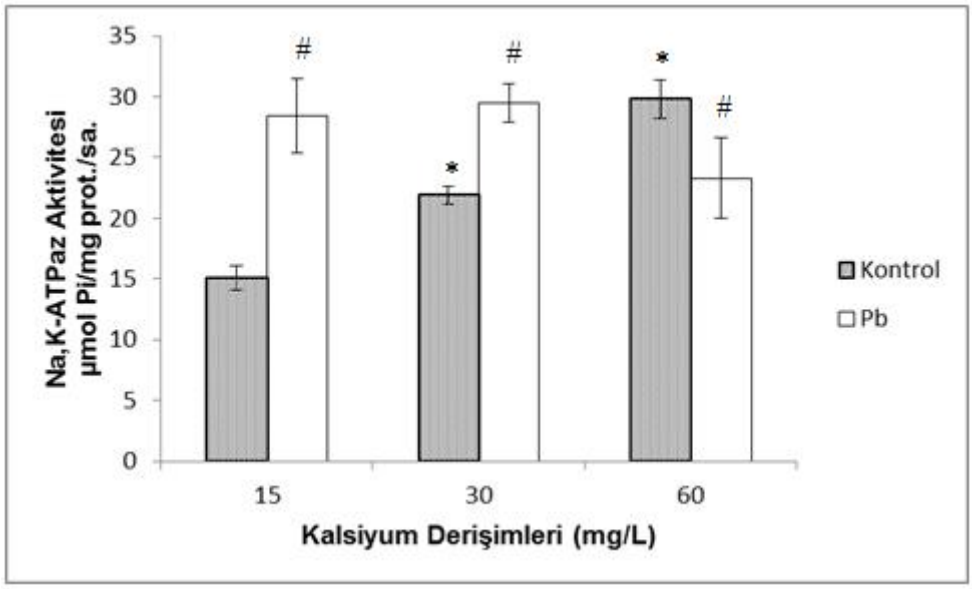
etkisindeki kontrole göre % 38 azalmıştır (17,4±1,60 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,05) (Şekil 4.5.).



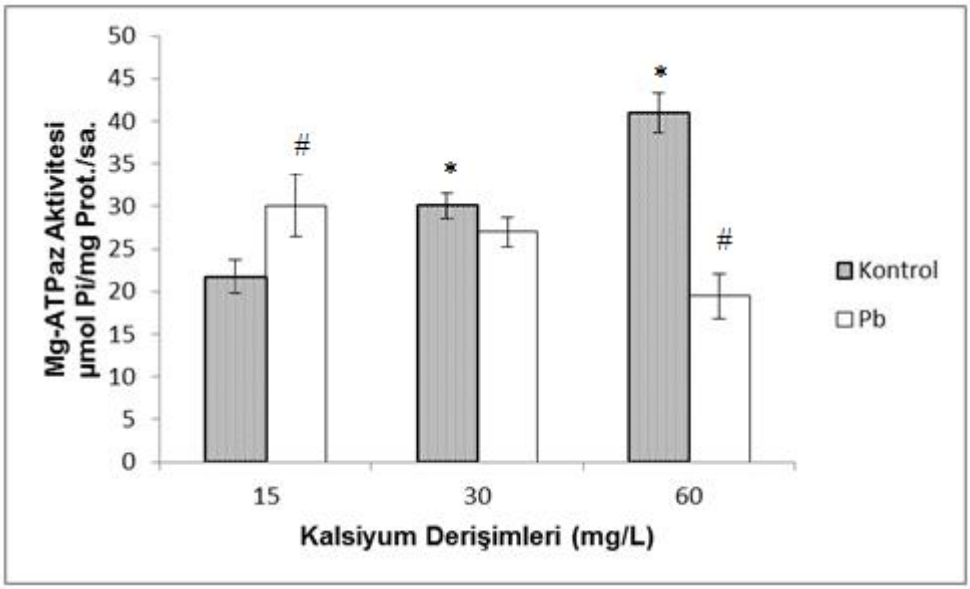
Şekil 4.1. Kurşunun farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesine etkileri. (*: Kontrol-Ca^{+2} gruplarının 15 mg Ca^{+2}/L'ye göre istatistiksel farklılıkları, #: Ca^{+2}+Pb^{+2} etkisindeki grupların kendi kontrollerine göre istatistiksel farklılıkları göstermektedir).



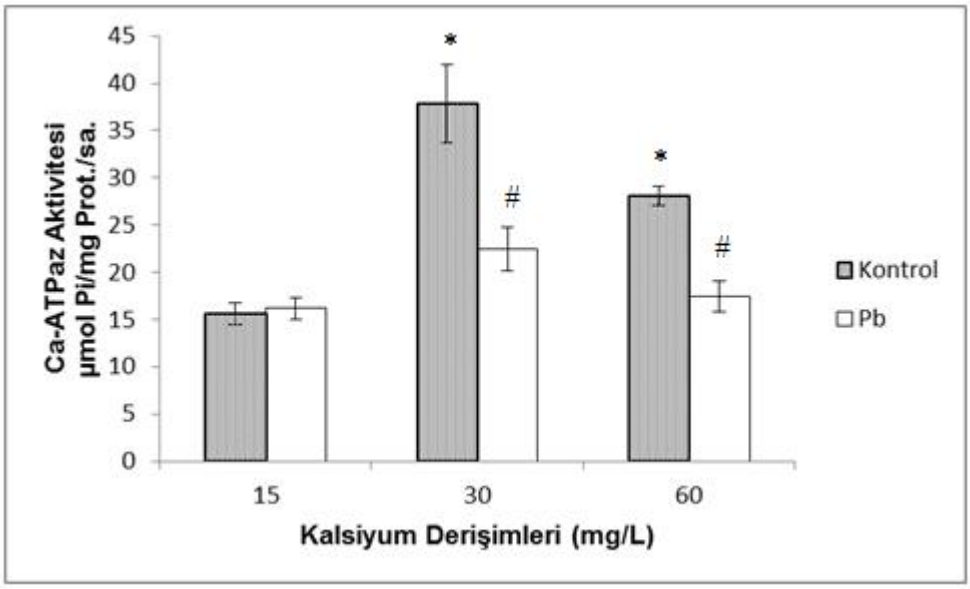
Şekil 4.2. Kurşunun farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un solungaç Mg^{+2}-ATPaz aktivitesine etkileri. Ayrıntılar Şekil 4.1.'de verildiği gibidir.



Şekil 4.3. Kurşunun farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un bağırsak Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesine etkileri. Ayrıntılar Şekil 4.1.'de verildiği gibidir.



Şekil 4.4. Kurşunun farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un bağırsak Mg^{+2}-ATPaz aktivitesine etkileri. Ayrıntılar Şekil 4.1.'de verildiği gibidir.



Şekil 4.5. Kurşunun farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesine etkileri. Ayrıntılar Şekil 4.1.'de verildiği gibidir.

4.1.2. Kronik (14 gün) Deneyler

O. niloticus Ca^{+2}, Pb^{+2} ve Ca^{+2}+Pb^{+2} etkisine kronik (10µM-14 gün) olarak bırakılmıştır. Bu süre sonunda solungaç ve bağırsak dokularında Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz ile kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi değerleri ölçülmüştür.

4.1.2.1. Kontrol Grubu Balıklarda ATPaz Aktiviteleri

15 mg Ca^{+2}/L etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz ile Mg^{+2}-ATPaz aktiviteleri 15,9±1,23 ve 20,8±3,22, bağırsak dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz ile Mg^{+2}-ATPaz aktiviteleri 7,81±1,31 ve 7,85±1,18, kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ise 10,8±2,83 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçülmüştür. Bu değerlere göre yapılan karşılaştırma sonucunda 30 ve 60 mg Ca^{+2}/L etkisinde elde edilen veriler aşağıda belirtilmiştir.

30 mg Ca^{+2}/L etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 31 azalmıştır (10,9±0,95 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,05$) (Şekil 4.6.), Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi % 24 artmıştır (25,8±2,50 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P>0,05$) (Şekil 4.7.). Aynı koşullarda bağırsak dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi

kontrole göre % 33 (10,3±1,14 µmol Pi/mg prot./sa.) (P>0,05) (Şekil 4.8.). Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 93 artmıştır (15,1±1,43 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,05) (Şekil 4.9.). Kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 30 artmıştır (14,2±4,30 µmol Pi/mg prot./sa.) (P>0,05) (Şekil 4.10.).

60 mg Ca^{+2}/L etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 37 (10,1±1,50 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,05) (Şekil 4.6.), Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 9 azalmıştır (18,9±2,53 µmol Pi/mg prot./sa.) (P>0,05) (Şekil 4.7.). Aynı koşullarda bağırsak dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 34 (10,5±1,60 µmol Pi/mg prot./sa.) (P>0,05) (Şekil 4.8.), Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 47 artmıştır (11,5±1,65 µmol Pi/mg prot./sa.) (P>0,05) (Şekil 4.9.). Kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 345 artmıştır (49,1±8,20 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,05) (Şekil 4.10.).

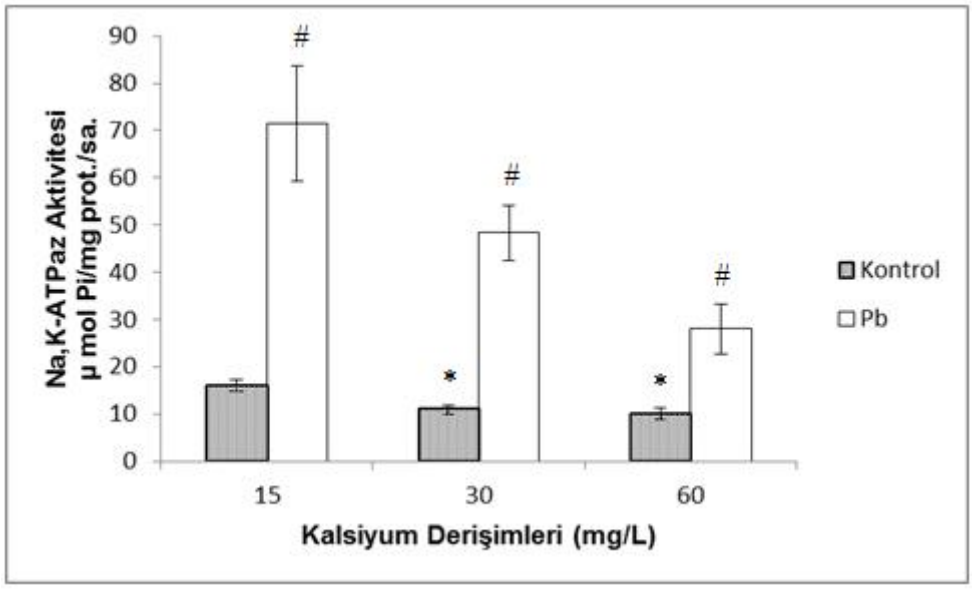
Kronik süreçte Ca^{+2} etkisinde kalan kontrol grubu balıkların solungaç ve bağırsak dokularında Na^{+}/K^{+}-ATPaz ile Mg^{+2}-ATPaz ve kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktiviteleri, akut süreçteki kendi kontrollerine göre de karşılaştırılmıştır. Kronik 15 ve 60 mg Ca^{+2}/L etkisindeki balıkların solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinde akut süreçle karşılaştırıldığında değişiklik görülmezken, 30 mg Ca^{+2}/L etkisindeki balıkların solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi % 50 (11,0±0,95 µmol Pi/mg prot./sa.) azalmıştır (P<0,05). Bağırsak Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi ise 15 mg Ca^{+2}/L etkisinde % 48 (7,81±1,31 µmol Pi/mg prot./sa.), 30 mg Ca^{+2}/L etkisinde % 52 (10,4±1,14 µmol Pi/mg prot./sa.) ve 60 mg Ca^{+2}/L etkisinde % 65 (10,5±1,62 µmol Pi/mg prot./sa.) azalmıştır (P<0,05). Çalışılan üç derişimde de solungaç Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinde bir değişiklik görülmemesine karşın, bağırsak Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi 15 mg Ca^{+2} etkisinde % 64 (7,85±1,18 µmol Pi/mg prot./sa.), 30 mg Ca^{+2}/L etkisinde % 50 (15,1±1,43 µmol Pi/mg prot./sa.) ve 60 mg Ca^{+2}/L etkisinde % 72 (11,5±1,65 µmol Pi/mg prot./sa.) azalmıştır (P<0,05). 15 mg Ca^{+2}/L etkisinde kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi değişiklik göstermezken, 30 mg Ca^{+2}/L etkisinde % 62 (14,2±4,30 µmol Pi/mg prot./sa.) azalış ve 60 mg Ca^{+2}/L etisinde % 75 (49,1±8,18 µmol Pi/mg prot./sa.) artış göstermiştir (P<0,05).

4.1.2.2. Kurşun Etkisinde Kalan Balıklar

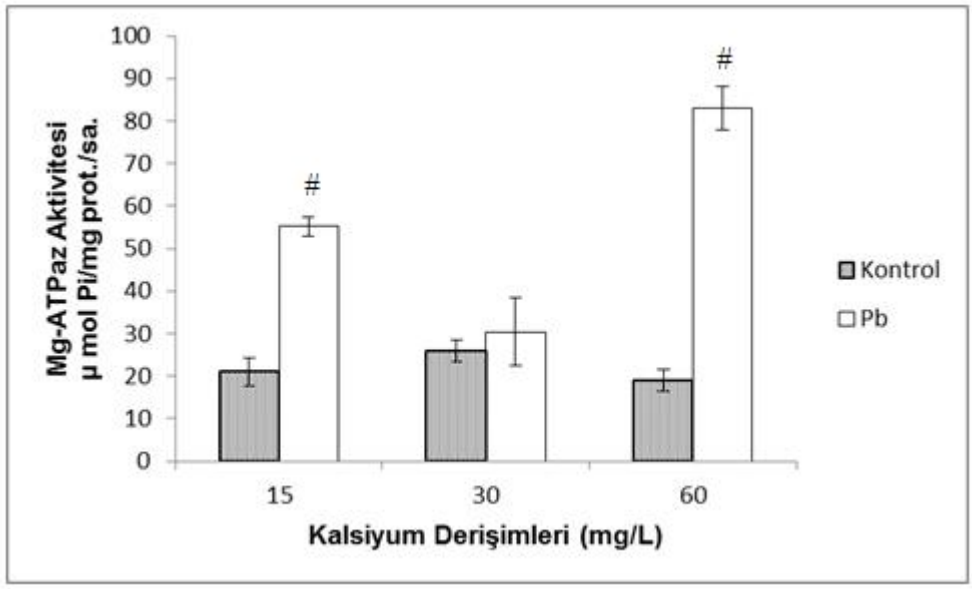
15 mg Ca^{+2}/L etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi Pb^{+2} etkisinde kontrole göre % 349 (71,5±12,1 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,05$) (Şekil 4.6.), Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 164 oranında artmıştır (55,2±2,20 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,05$) (Şekil 4.7.). Aynı koşullarda bağırsak dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi Pb^{+2} etkisinde kontrole göre % 51 (3,9±0,66 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P>0,05$) (Şekil 4.8.), Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 29 azalmıştır (5,53±0,95 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P>0,05$) (Şekil 4.9.). Kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi Pb^{+2} etkisindeki kontrole göre % 41 azalmıştır (6,35±1,12 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P>0,05$) (Şekil 4.10.).

30 mg Ca^{+2}/L etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi Pb^{+2} etkisinde kontrole göre % 342 (48,4±5,73 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,05$) (Şekil 4.6.), Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi % 17 artmıştır (30,4±7,86 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P>0,05$) (Şekil 4.7.). Aynı koşullarda bağırsak dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi Pb^{+2} etkisinde kontrole göre % 22 (8,09±1,79 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,05$) (Şekil 4.8.), Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 54 azalmıştır (6,73±1,16 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,05$) (Şekil 4.9.). Kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi Pb^{+2} etkisindeki kontrole göre % 33 artmıştır (18,8±3,04 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P>0,05$) (Şekil 4.10.).

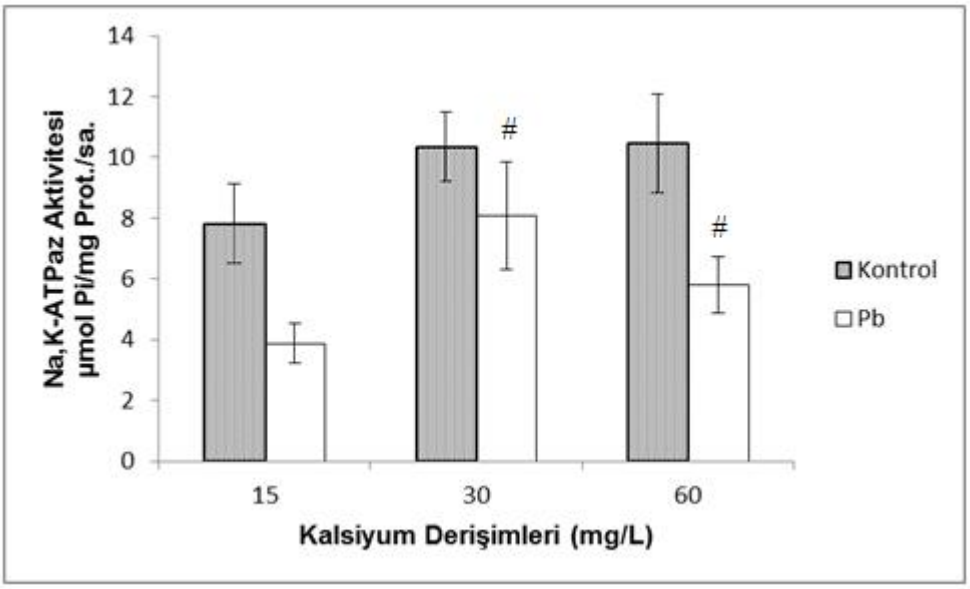
60 mg Ca^{+2}/L etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi Pb^{+2} etkisinde kontrole göre % 174 (27,7±5,26 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,05$) (Şekil 4.6.), Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 337 artmıştır (82,9±4,88 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,05$) (Şekil 4.7.). Aynı koşullarda bağırsak dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi Pb^{+2} etkisinde kontrole göre % 43 (5,79±0,91 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,05$) (Şekil 4.8.), Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 47 azalmıştır (6,36±0,85 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,05$) (Şekil 4.9.). Kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi Pb^{+2} etkisindeki kontrole göre % 69 azalmıştır (15,3±3,17 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,05$) (Şekil 4.10.).



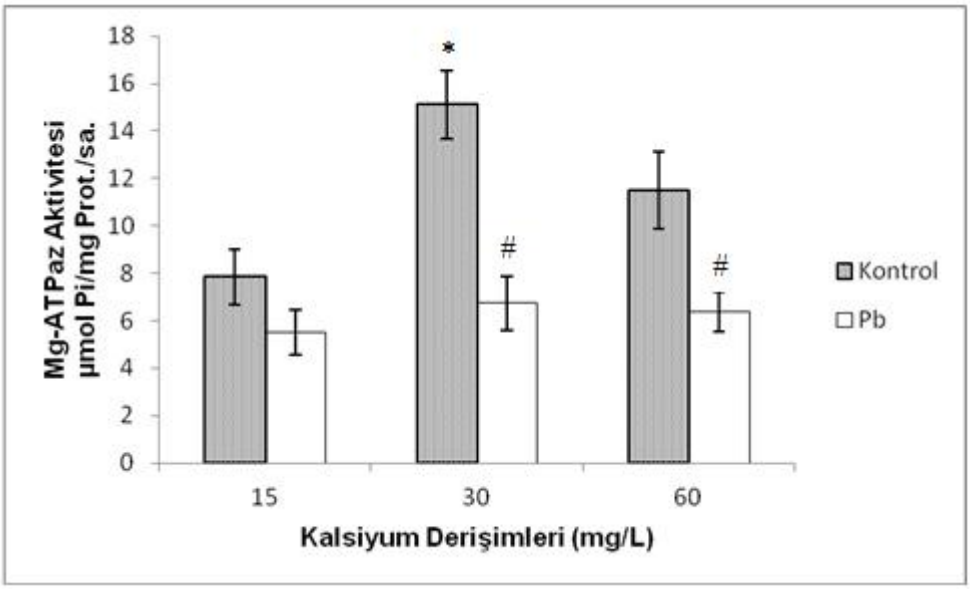
Şekil 4.6. Kurşunun farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesine etkileri. (*: Kontrol-Ca^{+2} gruplarının 15 mg Ca^{+2}/L'ye göre istatistiksel farklılıkları, #: Ca^{+2}+Pb^{+2} etkisindeki grupların kendi kontrollerine göre istatistiksel farklılıkları göstermektedir).



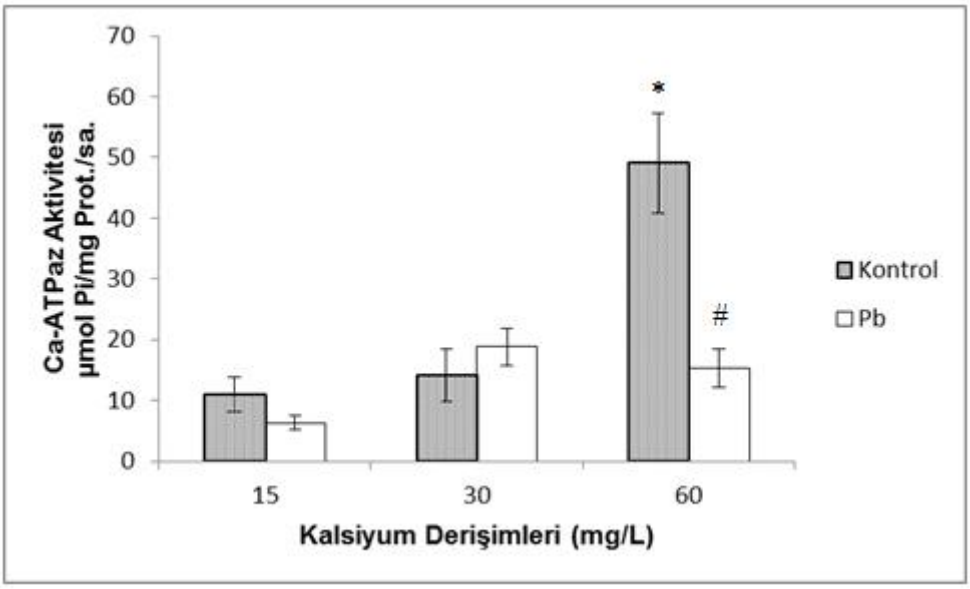
Şekil 4.7. Kurşunun farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un solungaç Mg^{+2}-ATPaz aktivitesine etkileri. Ayrıntılar Şekil 4.6.'da verildiği gibidir.



Şekil 4.8. Kurşunun farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un bağırsak Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesine etkileri. Ayrıntılar Şekil 4.6.'da verildiği gibidir.



Şekil 4.9. Kurşunun farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un bağırsak Mg^{+2}-ATPaz aktivitesine etkileri. Ayrıntılar Şekil 4.6.'da verildiği gibidir.



Şekil 4.10. Kurşunun farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesine etkileri. Ayrıntılar Şekil 4.6.'da verildiği gibidir.

4.1.3. İn vitro Ca^{+2} Etkisi

O. niloticus'un solungaç, bağırsak ve kas dokusu homojenatlarının 15, 30, 60 ve 120 mg/L derişimlerindeki Ca^{+2}'nin direkt etkisindeki ATPaz aktiviteleri Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. İn vitro Ca^{+2} etkisinde solungaç, bağırsak ve kas dokusu ATPaz aktiviteleri.

ENZİM	DOKU	15 mg Ca^{+2}/L	30 mg Ca^{+2}/L	60 mg Ca^{+2}/L	120 mg Ca^{+2}/L
Na^{+}/K^{+}-ATPaz	**Bağırsak**	Kontrol	10,0±2,35	8,39±1,58	1,28±0,34*
	Solungaç	Kontrol	6,77±1,36	5,49±0,66	2,72±0,36
Mg^{+2}-ATPaz	**Bağırsak**	Kontrol	10,6±0,85*	12,3±0,68	11,8±0,37
	Solungaç	Kontrol	14,5±0,18	13,4±0,21*	13,0±0,82*
Ca^{+2}-ATPaz	**Kas**	Kontrol	6,24±2,13*	0,0±0,0*	0,0±0,0*

4.2. Tartışma

Sürekli artan dünya nüfusunun beslenmesi için gerekli gıda kaynaklarının bulunması ve bu gıdaların insanlar için tehlikeli bileşenleri içermesinin önlenmesi günümüzün en önemli sorunlarından biridir. Gelişen teknolojiye bağlı olarak gözlenen çevre kirliliği, bilinçsizlik ve ekonomik güçsüzlük gibi nedenlerden beslenme sorunları artmakta ve güvenli gıda temini zorlaşmaktadır.

Akarsu ve yağmur sularının yıkayıcı etkisiyle su ortamına ulaşan ağır metaller sucul canlılar tarafından su, sediment ve besin yolu ile alınmaktadır (Douben, 1989). Balıklar besin zincirinin bir parçası olması nedeniyle sucul ortamda bulunabilen metallerin etkilerinin belirlenebilmesi için öncelikli çalışılması gereken canlılardandır (Anderson ve ark.,1997; Bervoets ve ark., 2009). Pb^{+2} içeren balıklar güvenli gıda olmaktan çıkıp ağır metal zehirlenmesine sebep olabilmektedirler; örneğin kontamine olmuş içme suyundan (örneğin, kurşun borular) veya gıda zinciri yoluyla Pb^{+2} zehirlenmesi görülmektedir. Metallerin balıklar üzerine etkisinin, çoğunlukla oksidatif strese yol açan reaktif oksijen türlerinde artışa neden olması, osmoregülator sistemin bozulması, ATPaz aktivitesinin inhibisyonu ve doku hasarı ile ilgili olduğu bilinmektedir (Radi ve Matkovics, 1988; Roche ve Boge, 1993; Canlı ve Stagg, 1996; Wong ve Wong, 2000; Ribeiro ve ark., 2002; Dautremepuits ve ark., 2004).

Bu çalışmada Ca^{+2}, Pb^{+2} ve Ca^{+2}+Pb^{+2} etkisine bırakılan tatlısu balığının (*O. niloticus)* solungaç ve bağırsak dokularında Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz ile kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitelerinin, 15, 30 ve 60 mg Ca^{+2}/L derişimlerinde metal toksisitesine verdiği tepkiler akut (48 saat) ve kronik (14 gün) olmak üzere iki farklı süreçte incelenmiştir.

Yapılan çalışmalar ağır metallerin sucul ortamdaki etkilerinin karmaşık olduğunu ve suyun fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak değiştiğini göstermiştir. Balık osmoregülasyon sisteminin önemli bir parçası olan ATPaz enzimlerinin bu koşullardan nasıl etkilendiğini araştırmak bu çalışmanın amacını oluşturmaktadır. Elde edilen verilere göre, akut etki sonucunda 30 ve 60 mg Ca^{+2}/L içeren kontrol gruplarının ATPaz aktivitelerinde artış görülmüştür. Bu süreçte Pb^{+2} etkisine

bakıldığında, Ca^{+2} derişimi arttıkça solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinde azalış buna karşın Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinde ise artış görülmüştür. Bağırsak Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi düşük Ca^{+2} düzeyinde artış gösterirken, en yüksek Ca^{+2} düzeyinde ise tüm ATPaz aktiviteleri azalış göstermiştir. Kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinde de azalış görülmüştür. Kronik süreçte kontrol gruplarında solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinde azalış gözlenirken, bağırsak Mg^{+2}-ATPaz ile kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinde sırasıyla 30 ve 60 mg Ca^{+2}/L içeren ortamlarda artış gözlenmiştir. Bu süreçte Pb^{+2} etkilerine bakıldığında Ca^{+2} derişimi arttıkça solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinde artışın aksine, bağırsak Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz ile kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinde azalış görülmüştür. Genel olarak bakılırsa, sadece Ca^{+2} etkisindeki balıklarda genellikle ATPaz aktivitelerinde artış gözlenirken, Ca^{+2}+Pb^{+2} etkisinde ise artışın yanında azalış da gözlenmiştir. Solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi akut ve kronik süreçte birbirine zıt tepkiler verirken, diğer ATPaz'lar genellikle benzer yönde aktivite göstermiştir (EK.1-EK.2). Kronik süreçte Ca^{+2} etkisinde kalan kontrol grubu balıkların dokularında ATPaz aktiviteleri, akut süreçteki kendi kontrollerine göre karşılaştırıldığında ise solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi sadece 30 mg Ca^{+2}/L içeren sularda azalış gösterirken, Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi denenen üç derişimde de değişiklilik göstermemiştir. Bağırsak Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi Ca^{+2} derişimi arttıkça daha fazla inhibe olmuştur. Kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ise Ca^{+2} derişimi arttıkça önce azalmış daha sonra artmıştır (EK.3-EK.4).

Pb^{+2}'nin balıklarda çok önemli bir enzim inhibitörü olduğu bilinmektedir (Jain ve ark., 1997; Shrivastava ve ark., 2001). Çeşitli çevresel kirleticilere cevap olarak ATPaz aktivitesinde değişikliklerin olduğu ve enzimin metallerin etkisine duyarlı olduğu gösterilmiştir (Watson ve Benson, 1987; Canlı ve Stagg, 1996; Kamunde ve Wood, 2003; Atlı ve Canlı, 2007, 2008c, 2011). Bu nedenle balıklarda fizyolojik olayların tam olarak yapılabilmesi ve canlılığın sürdürülebilmesi için hücre içi ve hücre dışı arasında iyon derişimlerindeki dengenin sürekli olarak korunması gerektiğinden, bunu sağlamak için çeşitli sistemler geliştirilmiştir. Örneğin, Na^{+}/K^{+}-ATPaz sistemi hücre içinde K^{+}'nın, hücre dışında da Na^{+}'nın yüksek derişimlerde tutulmasını (Satyavath ve Rao, 2000), Na^{+}/K^{+}-ATPaz ile Ca^{+2}-Mg^{+2} ATPaz sistemi

solungaçlarda ilgili iyonların aktif taşınmalarını (Sloman ve ark., 2003; Rogers ve ark., 2003), karbonik anhidraz enzimi Na^{+} ve Ca^{+2}'nin taşınmasını (McGeer ve ark., 2000) sağlayarak iyon dengesi ile elektrokimyasal değişimi ve hücre hacminin regülasyonunu sağlamaktadır (Heath, 1987; Canlı ve Stagg, 1996; Grosell ve ark., 2003). Hem deniz hem tatlı su teleostlarının özellikle solungaç, böbrek ve bağırsak gibi osmoregülatör organlarına özgü bir enzim olan Na^{+}/K^{+}-ATPaz enzimi temelde hücre içi homeostasisinin korunmasından sorumludur. Na^{+}/K^{+}-ATPaz enzimi, yaklaşık 100 kDa ağırlığındaki katalitik α-alt ünitesi ile 60 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). Ca^{+2}-ATPaz ise sarkoplazmik retikulum tübüllerinde yer almakta ve ATP hidrolizinden açığa çıkan enerjiyi kullanarak, hücre zarının stabilizasyonunu sağlamak üzere hücrede düşük Ca^{+2} derişimini korumak için sitoplazmadan Ca^{+2}'yi taşımada görev yapmaktadır (Watson ve Beamish, 1981; Saxena ve ark., 2000). Balıkların kas dokusunda Pb^{+2}'nin Ca^{+2}-ATPaz'ın taşıma görevini engellemesi sonucu Ca^{+2} düzeyinde değişikliklere neden olduğu bilinmektedir (Rogers ve ark., 2003). Mg^{+2} canlılar için gerekli bir mineral olup, kemik dokusundaki işlevine ek olarak, karbonhidrat metabolizması ve protein sentezi gibi fizyolojik işlevlerde de önemli görevleri bulunan bir iyondur (Flik ve ark., 1993). Mg^{+2}'nin solungaç apikal membranlarında pasif bir şekilde taşındığı belirlenmiştir. Mg^{+2} derişimi, ouabaine duyarlı olmayan bir integral membran proteini olan Mg^{+2}-ATPaz tarafından kontrol edilmekte ve ağır metallerin Mg^{+2}-ATPaz'ı inhibe etmesi sonucu Mg^{+2} düzeyi değişebilmektedir (Thaker ve ark., 1996; Canlı ve Stagg, 1996; Atlı ve Canlı, 2008b, 2011). Mitokondriyal Mg^{+2}-ATPaz, balık ATPaz sisteminde en önemli enerji bağıntılı enzimdir ve Mg^{+2}-ATPaz inhibisyonu oksidatif fosforilasyonu etkilemektedir.

Metallerin sudaki derişimi ve etki süresi ile tuzluluk, sıcaklık, sertlik ve pH gibi çevresel faktörlerin metal toksisitesini etkilediği gösterilmiştir (Heath, 1987; Canlı ve Atlı, 2003; Baykan ve ark., 2007; Atlı ve Canlı, 2008b, 2008c, 2011). Pb^{+2}, Cd^{+2} ve Zn^{+2} gibi iki değerlikli metaller genellikle Ca^{+2} antagonistidir. Bununla birlikte ağır metallerin sert suya nazaran yumuşak suda daha fazla çözünüp aktif

toksik ajan olduğu (Rathor ve Khangarot, 2003) ve su sertliğinin organizmalar üzerindeki ağır metallerin toksik etkilerini değiştirebildiği bilinmektedir (Kim ve ark., 2001; Atlı ve Canlı, 2008b, 2008c, 2011). Sert sularda metal aktivitesi metallerin Ca^{+2} ve CO_3 ile bileşik oluşturmasına bağlı olarak azalış gösterirken, yumuşak sularda düşük Ca^{+2} düzeyi nedeniyle toksik etki göstermektedir (Heath, 1987). Bununla birlikte, genellikle tatlı sularda su sertliği arttıkça ağır metal toksisitesinin organizmaların Ca^{+2} ve Mg^{+2} gibi iyonları almak için yarışmasından dolayı azaldığı bilinmektedir (Kim ve ark., 2001; Pyle ve ark., 2002; Javid ve ark., 2007). Doğal ortamda Ca^{+2} ve Mg^{+2} ağır metallerden daha fazla oranda bulunmaktadır ve Ca^{+2} derişimi azaldıkça metal iyonlarının solungaç membranlarından pasif geçişi artmaktadır. Ca^{+2} ve Mg^{+2}'nin hücre membranlarından alımı dengenin sağlanmasına neden olur ve bu durum metal iyonlarına karşı geçirgenliği azaltmaktadır (Penttinen, 1998; Kim ve ark., 2001).

Balıklar Pb^{+2} kontaminasyonunun etkisine su ortamının yanı sıra besinle de kalabilirler. Önceki çalışmalarda (Varanasi ve Gmur, 1978), Pb^{+2} içeren ortamda ***O. kisutch***'ı 168 saat bırakıp, 8,4 mg $CaCl_2$ içeren besinle beslediklerinde dokularda Pb^{+2} düzeyinin azaldığını görmüşlerdir. Benzer şekilde, Ca^{+2}'nin suyla taşınan Zn^{+2}'nin (Niyogi ve Wood, 2006) yanı sıra hem besinsel hem de suyla taşınan Cd^{+2}'nin emilimine karşı koruyucu role sahip olduğu gösterilmiştir (Zohouri ve ark., 2001; Baldisserotto ve ark., 2004a, 2004b, 2005; Franklin ve ark., 2005). Pb^{+2} potansiyel olarak, Ca^{+2}'nin giriş yollarından herhangi birini etkilemekte ve balık solungacında apikal Ca^{+2} kanallarının yarışmalı olarak bloke olmasıyla Ca^{+2} homeostasisini bozabilmektedir (MacDonald ve ark., 2002). Pb^{+2} gibi Cd^{+2}'nin de Ca^{+2} analogu olarak Ca^{+2} kanallarına ilgisinin yüksek olduğu ve yumuşak sularda toksisitesinde artış olduğu belirtilirken, sert sularda ise Cd^{+2} toksisitesi Ca^{+2} kanalları için Ca^{+2} ile büyük yarış nedeniyle düşmektedir (Verbost ve ark., 1989; Pratap ve Wendelaar-Bonga, 1993; Hollis ve ark., 2000). Pb^{+2} ile kirlenmiş yumuşak sularda Pb^{+2}, balıklar için en toksik olan serbest iyonik forma dönüşebildiğinden, bu ortamlarda yaşayan balıklar için Ca^{+2} çok önemli olmaktadır. Bu ortamlardaki balıkların Ca^{+2} bakımından zengin yumuşakça ve eklem bacaklı kabuklular gibi canlılarla beslenerek, sadece iyon regülasyonunu değil, aynı zamanda subletal Pb^{+2}

toksisitesine karşı da korundukları belirtilmiştir (Davies ve ark., 1976). Örneğin, artan Ca^{+2}'nin bağırsakta Pb^{+2} emilimini azalttığı, Ca^{+2} akış oranını arttırdığı ve böylece Ca^{+2} regülasyonunun korunduğu bilinmektedir (Alves ve ark., 2006). Tatlısu balıklarında bağırsaklarda Ca^{+2} emilimi öncelikle Na^{+}/Ca^{+2} iyon değiştiricisi ve çok az oranda da Ca^{+2}-ATPaz'la gerçekleştirilmektedir (Flik ve ark., 1993). Birçok çalışmada Cu^{+2} ve Pb^{+2}'nin düşük derişimlerinin balıklarda Ca^{+2} homeostasisinin bozulmasına (Viarengo, 1994), çeşitli dokularda iyon regülasyonunda değişikliklere (McGeer ve ark., 2000; Rogers ve ark., 2003), plazma iyon konsantrasyonları (Lauren ve McDonald, 1985) ve osmoregülasyon kapasitesinde değişikliklere (Lauren ve McDonald, 1987; Atlı ve Canlı, 2011) neden olduğu gösterilmiştir. Aynı araştırıcılar Pb^{+2}'nin solungaçlarda Ca^{+2} alınımı ile rekabete girerek hipokalseminin oluşumuna ve bunun sonucunda balık ölümlerine neden olduğunu göstermişlerdir. 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 bu sonuçlar akut Pb^{+2} etkisinin neden olduğu iyonoregülatör hasar ile açıklanmış ve Pb^{+2}'nin Ca^{+2} ile yarışmasının Cd^{+2} ve Zn^{+2} ile benzerlik gösterdiğine dikkat çekilmiştir. Atlı ve Canlı (2011), *O. niloticus*'u akut olarak farklı derişimlerde Cd^{+2}, Cr^{+6} ve Ag^{+} etkisine 96 saat ve 0,05 µg/mL derişimindeki bu metallerin farklı sürelerdeki etkisine bırakmışlar ve solungaç, böbrek ve kas dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz, Mg^{+2}-ATPaz ve Ca^{+2}-ATPaz aktivitelerini incelemişlerdir. Akut ve kronik metal etkileri sonunda balıklarda solungaç, böbrek ve kas dokularında ölçülen ATPaz enzim aktivitelerinin önemli oranda değiştiğini bildirmişlerdir. Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinde hem azalış hem artış görülmesine karşın, Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Ca^{+2}-ATPaz aktivitelerinin genellikle azaldığını belirtmişlerdir. Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinde görülen bu durumun da, enzimin bulunduğu yer ile ilgili olduğunu ve metallerin direkt etkisine kalmamasıyla açıklamışlardır.

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. 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 toksisitesi çalışmalarında önemli bir belirteç doku olarak çalışılmaktadır (Heath, 1987; De La Torre ve ark., 2007). Bağırsaklar ise solungaç ve böbrek dışında boşaltım ve osmoregülasyon olayında görevli diğer bir önemli osmoregülatör organdır. Balıklarda homeostasisin (su-tuz dengesinin korunması) korunması ve metabolizma artıklarının atılışı, bu organların birlikte ve düzenli çalışmasıyla sağlanmaktadır.

ATPaz enzimlerinin metal tipi, derişimi ve doku tipine bağlı olarak farklılık göstermekle birlikte azalış yönünde tepki vermesi, bu alanda yapılan çalışmalarla uygunluk göstermektedir (Ay ve ark., 1999; Morgan ve ark., 2004; Silvestre ve ark., 2005; Atlı ve Canlı, 2007, 2008c, 2011). Artış yönündeki tepkiler, kronik süreçte solungaç dokusunda Pb^{+2}'ye karşı gelişen dirençlilikle ilgili olabilmektedir. Bu bilgiler ışığında, hem akut hem de uzun süreli metal etkisi sonucunda kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinde görülen azalmalar, Pb^{+2}'nin Ca^{+2} ile yarışarak Ca^{+2}-ATPaz yapısındaki –SH gruplarına bağlanması ile enzimi inhibe etmesinden ve sonuçta Ca^{+2} homeostazisinin bozulmasından veya doku hasarından kaynaklanabilmektedir. Kas dokusunda olduğu gibi bağırsak enzim aktiviteleri de her iki süreçte azalış göstermiştir. Bu doku su ve iyon homeostazislerini dengeleyerek değişen dış ortam koşullarına uyum sağlama yeteneğinde birincil öneme sahiptir (Larsson ve ark., 1985; Simkiss ve Taylor, 1989). Metal etkilerinde Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinde gözlenen azalma, enzimin oksidatif fosforilasyonda görev alması nedeniyle ATP üretiminin indirgenmesine yol açabilmektedir (Parvez ve ark., 2006).

Su ile taşınan Pb^{+2}'nin, akut süreçte Na^{+}, Cl^{-} ve Ca^{+2} regülasyonunda bozulmalar, kronik süreçte spinal hasarlar ve siyah kuyruk oluşumu ve her iki süreç boyunca da hemoglobin sentezinde aksamalara neden olduğu bilinmektedir (Hodson ve ark., 1978; Rogers ve ark., 2003, 2005; Rogers ve Wood, 2004). Farklı etki

sürelerinde ATPaz aktivitelerinde gözlenen farklılıklar daha önce yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir. Örneğin, akut süreçte Cu^{+2} etkisine bırakılan *Cyprinus carpio* ve *O. mykiss*'te solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde azalış olmasına karşın (Lauren ve McDonald, 1987; De Boeck ve ark., 2007), uzun süreli etki Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin normal düzeye dönmesine (Lauren ve McDonald, 1987) ya da artmasına neden olmuştur (McGeer ve ark., 2000). Buna karşın, bu çalışmada kronik süreçte enzim aktiviteleri genellikle azalış göstermiştir. Bunun nedeni de, metal toksisitesinin bu süreçte devam ederek enzim yapılarında önemli değişikliklere yol açması ve olası uyum mekanizmalarının bu durumu engellemede yetersiz kalması bu sonucun nedenlerinden biri olabilir.

Genel olarak, 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 değişiklikler, dokudaki yapısal farklılıklar ile bunlara bağlı gelişen iyon ve osmoregülatör sistem bozukluklar aktivitede azalmaya neden olabilmektedir. Bunun dışında enzim aktivitesinde özellikle kronik süreçte gözlenen artışlar ise metallothionein ve antioksidan sistemler gibi olası telafi ve onarım mekanizmalarının devreye girmesi 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.

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). Bu anlamda çevresel risk değerlendirilmesinde metallerin kısa süreli yüksek derişimlerinin etkisinin değerlendirilmesi yanında özellikle uzun süreli çevresel düzeylerine daha yakın düşük derişimdeki metallerin etkilerinin değerlendirilmesi daha fazla önem kazanmaktadır.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, suyun fizikokimyasal özelliklerinin ve organizmanın metabolik faaliyetlerinin, sucul ortamlarda ağır metal kirliliğinin saptanmasında ve canlı organizmalara olan etkilerinin belirlenmesinde önemli kriterler olabileceğini ve çevresel etki değerlendirilmeleri yapılırken bunların dikkate alınması gerektiğini vurgulamaktadır. Ayrıca canlı organizmada "erken uyarıcı sistemler" adı altında metal toksisitesine gösterdiği duyarlılıktan dolayı ATPaz enzimlerinin çevresel kirliliğin önceden belirlenmesinde önemli biyokimyasal belirteçler olarak kullanılabileceğine dikkat çekilmiştir. Bununla birlikte antioksidan enzimler ve karbonik anhidrazı kapsayan diğer enzimatik sistemlerle birlikte metallothionein ve redükte glutatyon gibi enzimatik olmayan sistemlerde yer alan biyokimyasal parametreler de kullanılarak ağır metallerden sucul organizmaların ne kadar ve nasıl etkilendikleri hakkında daha aydınlatıcı bilgiler elde edilebilir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

1. *O. niloticus* 15, 30 ve 60 mg Ca^{+2}/L ve ayrıca 20 µM (akut) ve 10 µM (kronik) derişimlerindeki kurşun ($Pb(NO_3)_2$) ile 15, 30 ve 60 mg Ca^{+2}/L'nin birlikteki etkisine akut olarak 48 saat ve kronik olarak 14 gün süreyle bırakılmıştır.
2. Bu süreler sonunda balıklarda solungaç ve bağırsak dokularında Na^+/K^+-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz ile kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktiviteleri ölçülmüştür.
3. Balıklarda hem akut hem de kronik süreçte metal etkisi sonucunda solungaç, bağırsak ve kas ATPaz aktiviteleri önemli oranda değişmiştir. Buna göre akut süreçte kontrol gruplarında Na^+/K^+-ATPaz, Ca^{+2}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktiviteleri artış göstermesine karşın, Pb^{+2} etkisinde bu enzim aktiviteleri etki süresi, doku tipi ve farklı Ca^{+2} derişimlerine bağlı olarak genellikle azalış göstermiştir. Kronik süreçte kontrol gruplarında hem azalış hem artış görülmüştür. Pb^{+2} etkisinde ise bağırsak ve kas ATPaz aktiviteleri azalış gösterirken, solungaç Na^+/K^+-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktiviteleri artış göstermiştir.
4. Kronik süreçte Ca^{+2} etkisinde kalan kontrol grubu balıkların dokularında ATPaz aktiviteleri, akut süreçteki kendi kontrollerine göre karşılaştırıldığında ise solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi sadece 30 mg Ca^{+2}/L içeren sularda azalış gösterirken, Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi denenen üç derişimde de değişiklilik göstermemiştir. Bağırsak Na^+/K^+-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi Ca^{+2} derişimi arttıkça daha fazla inhibe olmuştur. Kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ise Ca^{+2} derişimi arttıkça önce azalmış daha sonra artmıştır.

5.2. Öneriler

1. Bu çalışma su sertliğinin ATPaz enzimleri üzerinde meydana getirdiği değişimleri inceleyerek, osmoregülasyon sistemin subletal metal kirliliği için duyarlı bir belirteç olarak kullanılabilme potansiyelini araştırmak üzere tasarlanmıştır. Bilindiği gibi metal toksisitesini etkileyen faktörler arasında su sertliği, pH, organik madde içeriği ve tuzluluk da sayılmaktadır. Ayrıca suyun diğer kimyasal özelliklerini de çalışarak daha geniş bir araştırma alanı elde edilebilir ve karşılaştırmalı sonuçlar üretilebilir.
2. Laboratuar ortamında gerçekleştirilen deneyler dışında doğal ortamda balık türlerinin karşılaştığı metallerin toksik etkilerinin belirlenmesi için geniş zaman aralıklarında doğal ortamda yapılan çalışmalarla çok daha doğru sonuçlar elde edilebilir.
3. ATPaz enzimlerinin yanı sıra oksidatif hasarın tanısında önemli antioksidan enzimlerin kullanılmasıyla da metallerin toksik etkileri belirlenebilir.
4. Farklı balık türleri veya metal etkileşimi gibi uygulamalar yapılarak, türler arası metal toksisitesine duyarlılık ve dirençlilik arasında karşılaştırma yapılabilir.

KAYNAKLAR

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 Us 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.

ALVES, L.C., GLOVER C.N. AND WOOD C.M., 2006. Dietary Pb accumulation in juvenile freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Archives of Environmental Contamination andToxicology, 51: 615-625.

ANDERSON, M.B., PRESLAN, J.E., JOLIBOIS, L., BOLLINGER, J.E., GEARGE, W.J., 1997. Bioaccumulation of lead nitrate in red swamp clayfish (*Procambarus clarkii*). Journal of Hazardous Materials, 54: 15-29.

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.

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

ATLI, G., and CANLI, M., 2008a. Responses of Metallothionein and Reduced Glutathionein a Freshwater Fish *Oreochromis niloticus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 145: 282-287

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

ATLI, G., and CANLI, M., 2008c. 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.

ATLI, G., and CANLI, M., 2010. Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. Ecotoxicology and Environmental Safety, 73: 1884–1889.

ATLI, G., and CANLI, M., 2011. Essential metal (Cu, Zn) exposures alter the activity of ATPases in gill, kidney and muscle of tilapia *Oreochromis niloticus*. Ecotoxicology, 20: 1861–1869.

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.

BALDISSEROTTO, B., CHOWDHURY, M.J., WOOD, C. M., 2005. Effects of dietary calcium and cadmium on cadmium accumulation, calcium and cadmium uptake from the water, and their interactions in juvenile rainbow trout. Aquatic Toxicology, 72: 99-117.

BALDISSEROTTO, B., KAMUNDE, C., MATSUO, A. and WOOD, C. M., 2004a. A protective effect of dietary calcium against acute waterborne cadmium uptake in rainbow trout. Aquatic Toxicology, 67: 57-73.

BALDISSEROTTO, B., KAMUNDE, C., MATSUO, A. and WOOD, C. M., 2004b. Acute Waterborne Cadmium Uptake in Rainbow Trout is Reduced by dietary Calcium Carbonate. Comparative Biochemical And Physology, Part C 137: 363-372.

BARRON, M. G. and ALBEKE, S., 2000. Calcium Control of Zinc Uptake in Rainbow Trout. Aquatic Toxicology, 50: 257-264.

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.

BAYKAN, U., ATLI, G., and CANLI, M., 2007. The Effects of Temperature and Metal Expasures on the Profiles of Metallothionein-like 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.

BERVOETS, L., CAMPENHOUT, K.V., REYNDERS, H., KNAPEN, D., COVACI, A., and BLUST, R., 2009. Bioaccumulation of Micropollutants and Biomarker Responses in Caged Carp (*Cyprinus carpio*). Ecotoxicology and Environmental Safety 72: 720-728.

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

BURDEN, V. M., SANDHEINRICH, M. B. and CALDWELL, C. A., 1998. Effects of Lead on the Growth and δ-aminolevulinic Acid Dehydratase Activity of Juvenile Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss.* Environmental Pollution, 101: 285-289.

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.

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.

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

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., and STAGG, R.M., 1996. The Effects of In 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.

CİCİK, B., AY, Ö., KARAYAKAR, F., 2004, Effects of Lead and Cadmium İnteractions on the Metal Accumulation in Tissue and Organs of the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Bulletin of Enviromental Contamination and Toxicology, 72: 141-148

CRAIG, P.M., WOOD, C.M. and McCLELLAND, G.B., 2007. Gill membrane remodeling with soft-water acclimation in zebrafish (*Danio rerio*). Physiology Genomics, 30: 53-60

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 JR., J.P., SINLEY, R., SMITH, N.F., 1976. Acute and chronic toxicity of lead to rainbow trout *Salmo gairdneri* in hard and soft water. Water Research, 10: 199-206.

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 LA TORRE, F.R., SALIBIAN, A., and FERRARI, L, 2007. Assessment of the Pollution Impact on Biomarkers of Effect of a Freshwater Fish. Chemosphere, 68: 1582-1590.

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.

DIAMOND, J. M., WINCHESTER, E. L., MACKLER, D. G., RASNAKE, W. J., FANELLI, J. K. and GRUBER, D., 1992. Toxicity of Cobalt to Freshwater Indicator Species as a Function of Water Hardness. Aquatic Toxicology, 22: 163-180.

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.

DOREA, J. G., 2006. Fish meal in animal feed and human exposure to persistent bioaccumulative and toxic substances. Journal of Food Protection, *69* (11): 2777– 2785.

DOUBEN, P. E. T., 1989. Uptake and elimination of waterborne cadmium by the fish *Neomacheilus barbatulus* (Stone Loach). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 18: 576-586.

EBRAHIMPOUR, M., ALIPOUR, H., and RAKHSHAH, S., 2010. Influence of water hardness on acute toxicity of copper and zinc on fish. Toxicology and Industrial Heath, 6: 631-365.

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.

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

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.

FRANKLIN, N.M., GLOVER, C.N., NICOL, J.A., WOOD, C.M., 2005. Calcium/cadmium interactions at uptake surfaces in rainbow trout: waterborne vs dietary routs of exposure. Environmental Toxicology and Chemistry, 24: 2954-2964.

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.

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.

GONZALEZ, R. J., WILSON, R. W. and WOOD, C. M., 2006. Ionoregulation in tropical fishes from ion-poor, acidic backwaters. In The Physiology of Tropical Fishes, Fish Physiology, 21 (ed. A. L. Val, V. M. F. de Almeida-Val and D. J. Randall), pp. 397-442. San Diego: Academic Press.

GROSELL, M., GERDES, R.M. AND BRIX, K.V., 2006. Chronic toxicity of lead to three freshwater invertebrates - *Brachionus calyciflorus, Chironomus tentans,* and *Lymnaea stagnalis.* Environmental Toxicology and Chemistry, 25: 97-104.

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 .

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

HODSON , P.V., BLUNT, B.R., SPRY, D.J., 1978. Chronic toxicity of water-borne and dietary lead to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in Lake Ontario water. Water Research, 12: 869-878.

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

HUNN, J. B., 1985. Role of Calcium in Gill Function in Freshwater Fishes. Comparative Biochemistry and Physiology, 82A: 543-547.

HWANG, P. P. and YANG, C. H., 1997. Modulation of Calcium Uptake in Cadmium-Pretreated Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) larvae. Fish Physiology and Biochemistry, 16: 403-410.

ICHII, T. and MUGIYA, Y., 1983. Effects of a Dietary Deficiency in Calcium on Growth and Calcium Uptake from the Aquatic Environment in the Goldfish, *Carassius auratus.* Comparative Biochemistry and Physiology, 74A 2: 259-262.

JAIN, S.K., RAIZADA, A.K., JAIN, K., 1997. Protective role of zeolite on lead toxicity in freshwater fish. XIII ISEB., Monopoli, Bari, Italy.

JAVID A., JAVED M., and ABDULLAH S., 2007. Nickel bio-accumulation inthe bodies of *Catla catla, Labeo rohita* and *Cirrhina mrigala* during 96-hr LC_{50} exposures. International Journal of Agriculture and Biology, 9: 139-142.

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.

KIM A.D., GU M.B., ALLEN H.E., and CHA D., 2001. Physiochemical factors affecting the sensitivity of *Ceriodaphnia bulba* to copper. Environmental Monitoring and Assessment, 70: 105-106.

KUHNERT, P.M., KUHNERT, B.R., and STOKES, R.M., 1976. The Effect of In 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.

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

LAUREN, D. J. and McDONALD, D. G. 1985. Effects of Copper on Branchial Ionoregulation in the Rainbow Trout, *Salmo gairdneri* Richardson Modulation by Hardness and pH. Journal of Comparative Physiology, B. 155: 635-644.

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.

LEITA, L., 1991. Heavy Metal Bioaccumulauon in Lamp and Sheep Brcd in Smelting and Mining Areas of Sardinia. S. W. Environmental. Contamination Toxicology, 46: 887-893.

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.

MACDONALD, A., SİLK, L., SCHWARTZ, M., PLAYLE, R.C., 2002. A lead-gill binding model to predict acute lead toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 13: 227-242.

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

MANSOURİ, B. AND BARAMAKİ, R., 2011. Influence of water hardness and pH on acute toxicity of Hg on freshwater fish *Capoeta fusca* World Journal of Fish and Marine Sciences, 3 (2): 132-136.

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.

McDONALD, D.G., HOBE, H. and WOOD, C. M., 1980. The influence of environmental calcium on the physiological responses of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, to low environmental pH. Journal of Experimental Biology, 88: 109-131.

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.

MILLER, T. G. and MACKAY, W. C., 1980. The Effects of Hardness, Alkalinity and pH of Test Water on the Toxicity of Copper to Rainbow Trout (*Salmo gairdneri)*. Water Research, 14: 129-133.

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.

NIYOGI, S., WOOD, C.M., 2006. Interaction between dietary calcium supplementation and chronic waterborne zinc exposure in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comparative Biochemistry Physiology C, 143: 93–102.

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: 189-201.

PAGENKOPF, G. K., 1983. Gill Surface Interaction Model for Trace- Metal Toxicity to Fishes: Role of Complexation, pH, and Water Hardness. Environmental Science and Technology, 17: 342-347.

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.

PASCOE, D., EVANS, S. A. and WOODWORTH, J., 1986. Heavy Metal Toxicity to Fish and Influences of Water Hardness. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 15: 481-487.

PENTTINEN, S., KOSTAMO, A., and KUKKONEN, J.V.K., 1998. Combined effects of dissolved organic material and water hardness on toxicity of cadmium to *Daphnia manga*. Environmental Toxicology and Chemistry, 17: 2498-2503.

PLAYLE, R. C., GENSEMER, R. W and DIXON, D. G., 1992. Copper Accumulation on Gills of Fathead Minnows: Influence of Water Hardness, Complexation and pH of the Gill Micro-Environment. Environmental Toxicology and Chemistry. Vol. 11, pp. 381-391.

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.

PYLE G.G., SWANSON S.M., and LEHMKUHT D.M., 2002. The influence of water hardness, pH, and suspended solids on nickel toxicity to larva fathead minnows (*Pimephales promelas*). Water Air and Soil Pollution, 133: 215-226.

RADI A.A.R., MATKOVICS B., 1988. Effects of metal ions on the antioxidant enzyme activities, protein contents and lipid peroxidation of carp tissues. Comparative Biochemistry Physiology C, 90: 69-72.

RAINBOW, P. S., 1985.The Biology of Heavy Metals in the Sea. International Journal of Environmental Studies, 25: 195-211.

RAINBOW, P. S., AMIARD-TRIQUET, C., AMIARD, J. C., SMITH, B. D. And LANGSTON, W. J., 2000. Observation on the Interaction of Zinc and Cadmium Uptake Rates in Crustaceans (Amphipods and Crabs) from Coastal Sites in UK and France Differantially Enriched With Trace Metals. Aquatic Toxicology, 50: 189-204.

RATHOR R.S., KHANGAROT BS., 2003. Effects of water hardness and metal concentration on a fresh water *Tubifex tubifex* muller. Water Air and Soil Pollution, 142:341-356.

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.

ROCHE, H., BOGE, G., 1993. Effects of Cu, Zn and Cr salts on antioxidant enzyme activities in vitro of red blood cells of a marine fish *Dicentrarchus labrax*. Toxicology In vitro, 7: 623-629.

ROGERS, J.T., PATEL, M., GILMOUR, K.M., WOOD, C.M., 2005. Mechanisms behind Pb-induced disruptions of Na^+ and Cl^- balance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Am. Journal Physiology Roy., 289: R463-R472.

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.

ROGERS, J.T., WOOD, C.M., 2004. Characterization of branchial lead-calcium interactions in the freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Experimental Biology, 207: 813-825.

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.

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.

SATYAVATHI, C. and RAO, Y. P., 2000. Inhibition of Na^{+}, K^{+}-ATPase in *Penaeus indicus* Postlarvae by Lead. Comparative Biochemstry Physiology, C. 127: 11-22.

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.

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.

SHRIVASTAVA, S., MİSHRA, M., JAİN, S.K., 2001. Remediation of lead toxicity in fish tissues through zeolite with reference to glycogen content. Journal of Natcon, 13 (2): 231-235.

SILBERGELD, E. K., SILVA, I. A., & NYLAND, J. F., 2005. Mercury and autoimmunity: Implications for occupational and environmental health. Toxicology and Applied Pharmacology, 207 (2 Suppl): 282–292.

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.

SLOMAN, K. A., MORGAN, T. P., McDONALD, D. G. and WOOD, C. M., 2003.Socially-induced Changes in Sodium Regulation Affect the Uptake of Waterborne Copper and Silver in the Rainbow trouth, *Oncorhynchus mykiss*. Comparative Biochemistry and Physiology, C. 135: 393-403.

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.

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.

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.

VARANASI, U., GMUR, D.J., 1978. Influence of water-borne and dietary calcium on the uptake and retention of lead by coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Toxicology and Applied Pharmacology, 46: 65-75.

VERBOST, P. M., FLIK, G., LOCK, R. A. C., and WENDELAAR BONGA, S. E., 1989. The Movement of Cadmium Through Freshwater Trout Branchial Epithelium and Its Interference With Calcium Transport. Journal of Experimental Biology, 145: 185-197.

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.

VERGER, P., HOUDART, S., MARETTE, S., ROOSEN, J., AND BLANCHEMANCHE, S., 2007. Impact of a risk–benefit advisory on fish consumption and dietary exposure to methylmercury in France. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 48: 259–269.

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., 1994. Heavy Metal Cytotoxicity in Marine Organism: Effects on Ca^{2+} Homeostasis and Possible Alteration of Signal Transduction Pathways. In: Gilles, R. (Editor), Comparative and Environmental Physiology Springer, Berlin, 85-110.

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.

WATSON, T.A., and BEAMISH, F.W.H, 1981. The Effects of Zinc on Branchial Adenosine Triphosphatase Enzymes In Vitro from Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 68: 167-173.

WATSON, T.A., and BEAMISH, F.W.H., 1980. Effects of Zinc on Branchial ATPase Activity In Vivo in Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 66: 77-82.

WINNER, R. W., and GAUSS, J. D., 1986. Relationship Between Chronic Toxicity and Bioaccumulation of Copper, Cadmium and Zinc As Affected by Water Hardness and Humic Acid. Aquatic Toxicology, 8: 149-161.

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.

WRIGHT, D. A., 1995. Trace Metal and Major Ion Interactions in Aquatic Animals. Marine Pollution Bulletin, 31: 8-18.

YARAMAZ, Ö., 1992. Su Kalitesi. Ege Üniversitesi Basım Evi, Bornova, Ders Kitabı, 105s, İzmir.

ZOHOURI, M.A., PYLE, G.G., WOOD, C.M., 2001. Dietary Ca^{2+} inhibits water-borne Cd uptake in Cd-exposed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Comparative Biochemistry Physiology C, 130: 347-356.

http://www.bioscience.org/2001/v6/d/watson/figures.htm (Erişim tarihi: 10 Haziran 2010)

http://www.heartandmetabolism.org/dictionnary_mo.asp (Erişim tarihi: 10 Haziran 2010)

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Adana'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana'da tamamladı. 2006 yılında kazandığı Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2010 yılında mezun oldu. 2011 yılı Şubat ayında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Yüksek Lisans eğitimine başladı.

EKLER

EK 1. *O. niloticus*'un Pb^{+2} ve Ca^{+2} etkisinde kalan solungaç ve bağırsak dokularında Na^{+}/K^{+}- ATPaz, kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitelerinin kontrole göre yüzde (%) değişimleri. (*: Kontrol-Ca^{+2} gruplarının 15 mg Ca^{+2}/L'ye göre istatistiksel farklılıkları, #: Ca^{+2}+Pb^{+2} etkisindeki grupların kendi kontrollerine göre istatistiksel farklılıkları göstermektedir)

Gün	**Doku**	**Solungaç**	**Bağırsak**	**Kas**
Akut	**15 mg/L Ca^{+2}**	**-**	**-**	**-**
	30 mg/L Ca^{+2}	120 ↑*****	47 ↑*****	59 ↑*****
	60 mg/L Ca^{+2}	25 ↑	100 ↑*****	80 ↑*****
	15 mg/L Ca^{+2} + Pb^{+2}	18 ↑	89 ↑#	4 ↑
	30 mg/L Ca^{+2} + Pb^{+2}	50 ↓#	36 ↑#	41 ↓#
	60 mg/L Ca^{+2} + Pb^{+2}	52 ↓#	22 ↓#	38 ↓#
Kronik	**15 mg/L Ca^{+2}**	-	-	-
	30 mg/L Ca^{+2}	31↓*****	33 ↑	30 ↑
	60 mg/L Ca^{+2}	37↓*****	34 ↑	345 ↑*****
	15 mg/L Ca^{+2} + Pb^{+2}	349 ↑#	51 ↓	41 ↓
	30 mg/L Ca^{+2} + Pb^{+2}	342 ↑#	22 ↓#	33 ↑
	60 mg/L Ca^{+2} + Pb^{+2}	174 ↑#	43 ↓#	69 ↓#

EK 2. *O. niloticus*'un Pb^{+2} ve Ca^{+2} etkisinde kalan solungaç ve bağırsak dokularında Mg^{+2}- ATPaz aktivitesinin kontrole göre yüzde (%) değişimleri. (*: Kontrol-Ca^{+2} gruplarının 15 mg Ca^{+2}/L'ye göre istatistiksel farklılıkları, #: Ca^{+2}+Pb^{+2} etkisindeki grupların kendi kontrollerine göre istatistiksel farklılıkları göstermektedir)

Gün	**Doku**	**Solungaç**	**Bağırsak**
Akut	**15 mg/L Ca^{+2}**	**-**	**-**
	30 mg/L Ca^{+2}	4 ↑	37 ↑*
	60 mg/L Ca^{+2}	7 ↓	86 ↑*
	15 mg/L Ca^{+2} + Pb^{+2}	28 ↑#	38 ↑#
	30 mg/L Ca^{+2} + Pb^{+2}	38 ↑#	10 ↓
	60 mg/L Ca^{+2} + Pb^{+2}	13 ↓	51 ↓#
Kronik	**15 mg/L Ca^{+2}**	-	-
	30 mg/L Ca^{+2}	24 ↑	93 ↑*
	60 mg/L Ca^{+2}	9 ↓	47 ↑
	15 mg/L Ca^{+2} + Pb^{+2}	164 ↑#	29 ↓
	30 mg/L Ca^{+2} + Pb^{+2}	17 ↑	54 ↓#
	60 mg/L Ca^{+2} + Pb^{+2}	337 ↑#	47 ↓#

EK 3. Kronik süreçte Ca^{+2} etkisinde kalan kontrol grubu balıkların (*O. niloticus*) solungaç ve bağırsak dokularında Na^{+}/K^{+}- ATPaz, kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitelerinin akut süreçteki kendi kontrollerine göre yüzde (%) değişimleri. (*: Kronik süreç ATPaz aktivitelerinin akut sürece göre istatistiksel farklarını göstermektedir.)

Gün	Derişim	Solungaç	Bağırsak	Kas
Akut	15 mg Ca^{+2}/L	-	-	-
	30 mg Ca^{+2}/L	-	-	-
	60 mg Ca^{+2}/L	-	-	-
Kronik	15 mg Ca^{+2}/L	-	48↓*	-
	30 mg Ca^{+2}/L	50↓*	52↓*	62↓*
	60 mg Ca^{+2}/L	-	65↓*	75↑*

EK 4. Kronik süreçte Ca^{+2} etkisinde kalan kontrol grubu balıkların (*O. niloticus*) solungaç ve bağırsak dokularında Mg^{+2}- ATPaz aktivitelerinin akut süreçteki kendi kontrollerine göre yüzde (%) değişimleri. (*: Kronik süreç ATPaz aktivitelerinin akut sürece göre istatistiksel farklarını göstermektedir.)

Gün	Derişim	Solungaç	Bağırsak
Akut	15 mg Ca^{+2}/L	-	-
	30 mg Ca^{+2}/L	-	-
	60 mg Ca^{+2}/L	-	-
Kronik	15 mg Ca^{+2}/L	-	64↓*
	30 mg Ca^{+2}/L	-	50↓*
	60 mg Ca^{+2}/L	-	72↓*