ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Farklı Düzeylerde Kalsiyum İçeren Sularda Bakır Etkisinde Kalan Balıkların (*Oreochromis niloticus*) Antioksidan ve Ozmoregülasyon Sistemlerinin İncelenmesi

Zehra DOĞAN ANIT

Biyoloji Anabilim Dalı

Mart, 2024

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZ ONAYI

Farklı Düzeylerde Kalsiyum İçeren Sularda Bakır Etkisinde Kalan Balıkların (*Oreochromis niloticus*) Antioksidan ve Ozmoregülasyon Sistemlerinin İncelenmesi

---

Zehra DOĞAN ANIT

Biyoloji Anabilim Dalı

Bu Doktora Tezi 11/03/2024 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Değerlendirilmiş ve Oy Birliği ~~/ Oy Çokluğu~~ ile Kabul Edilmiştir.

Jüri	: Prof. Dr. Mustafa CANLI	(Danışman)	……
	: Prof. Dr. Burhan ARIKAN		……
	: Prof. Dr. Mustafa COŞKUN		……
	: Prof. Dr. Tamer KAYIŞ		……
	: Doç. Dr. Esin Gülnaz CANLI		……

Bu Tez Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.

Tez No:

Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FDK-2015-3814

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.

İÇİNDEKİLER

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
ÇİZELGELER DİZİNİ IV
ŞEKİLLER DİZİNİ V
SİMGELER VE KISALTMALAR VII
1. GİRİŞ 1
1.1. Bakır 3
1.2. Kalsiyum 4
1.3. Adenozin Trifosfataz (ATPaz) Enzimleri 5
1.4. Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1758) 8
1.5. Solungaç Dokusu 8
1.6. Bağırsak Dokusu 8
1.7. Kas Dokusu 9
1.8. Karaciğer Dokusu 9
1.9. Antioksidan Enzimler 9
1.10. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller 11
1.11. Antioksidan Savunma Mekanizması 12
1.11.1. Süperoksit Dismutaz 13
1.11.2. Katalaz 14
1.11.3. Glutatyon Peroksidaz 14
1.11.4. Glutatyon Redüktaz 15
1.12. Nonenzimatik Antioksidanlar 15
1.12.1. Glutatyon 15
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 17
3. MATERYAL VE YÖNTEM 23
3.1. Materyal 23
3.1.1. Metaller 23
3.2. Yöntem 25
3.2.1. İnorganik Fosfat Tayini 29
3.2.2. ATPaz Aktivitesinin Hesaplanması 30
3.2.3. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Ölçümü 31
3.2.4. Total Protein Analizi 37
3.2.5. Kalsiyum ve Sertlik Tayini 39
3.2.6. İstatistik 40

4. BULGULAR VE TARTIŞMA 41
4.1. Bulgular 41
4.1.1. Akut (3 gün) Deneyler 41
4.1.2. Kronik (30 gün) Deneyler 49
4.2. Tartışma 59
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 67
5.1. Sonuçlar 67
5.2. Öneriler 67
KAYNAKLAR 69
ÖZGEÇMİŞ 85
EKLER 87
EK 1. Cu^{+2} ve Ca^{+2} etkisinde kalan *O. niloticus*'un solungaç ve bağırsak dokularında Mg^{+2}-ATPaz, kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitelerinin kontrole göre yüzde (%) değişimleri. 89
EK 2. Cu^{+2} ve Ca^{+2} etkisinde kalan *O. niloticus*'un solungaç ve bağırsak dokularında Na^{+}/K^{+}- ATPaz aktivitesinin kontrole göre yüzde (%) değişimleri. 90
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. 91
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. 92
EK 5. Cu^{+2} ve Ca^{+2} etkisinde kalan *O. niloticus*'un karaciğer dokularında antioksidan enzim aktivitelerinin kontrole göre yüzde (%) değişimleri. 93

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Farklı Düzeylerde Kalsiyum İçeren Sularda Bakır Etkisinde Kalan Balıkların (*Oreochromis niloticus*) Antioksidan ve Ozmoregülasyon Sistemlerinin İncelenmesi

Zehra DOĞAN ANIT

Danışman: Prof. Dr. Mustafa CANLI

Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZ

Tatlısuların sertlik değerleri coğrafik bölgeye bağlı olarak değişmektedir. Su sertliğinde katkısı olan en önemli parametreleriden birisi suda bulunan kalsiyum (Ca^{+2}) miktarıdır. Metal toksisitesi suda bulunan iyonlardan etkilenebilmektedir. Bu çalışmada, bir tatlısu balığı olan Nil Çuprası (*Oreochromis niloticus*) farklı düzeylerde Ca^{+2} içeren sularda farklı bakır (Cu^{+2}) derişimlerinin etkisine bırakılmıştır. Deneyler akut (3 gün, 0,3 µM Cu^{+2}) ve kronik (30 gün, 0,03 µM Cu^{+2}) olarak iki farklı süreçlerde yürütülmüştür. Bu süreçler sonunda, balıkların solungaç ve bağırsak dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktivitleri, kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ve karaciğer dokusunda antioksidan enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Akut ve kronik deneyler sonunda ATPaz ve antioksidan enzim aktivitelerinde Cu^{+2} ve Ca^{+2} derişimine, süreye ve doku tipine bağlı olarak anlamlı ($p<0.05$) değişimler olmuştur. Ca^{+2}+Cu^{+2} etkisindeki balıklarda genellikle ATPaz aktivitelerinde azalış gözlenirken, sadece Ca^{+2} etkisinde ise artış yanında azalış da gözlenmiştir. Karaciğerdeki antioksidan sisteme özgü olan parametrelerde akut süreçte sınırlı bir etki gözlenirken, kronik süreçte daha fazla parametrede anlamlı değişimler gözlenmiştir. Kronik süreçte, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon S-transferaz (GST) aktivitlerinde artışlar görülürken, katalaz (CAT) aktivitesinde azalış görülmüştür. Diğer yandan, toplam glutatyon (GSH) ve okside glutatyon (GSSG) düzeylerinde de anlamlı artışlarlar görülmüştür. Bu çalışma, farklı sertlik değerine sahip olan sularda metal toksisitesinin değişebileceğini gösterirken, aynı zamanda sucul ortamlardaki doğal çalışmalarda dikkat edilmesi gerekliliğini vurgulamıştır.

Anahtar Kelimeler: Bakır, Kalsiyum, *Oreochromis niloticus*, ATPaz, Antioksidan

CUKUROVA UNIVERSITY

INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

PhD THESIS

Investigation of Antioxidant and Osmoregulation Systems of Fish (*Oreochromis niloticus*) Exposed to Copper in Differing Calcium Levels

Zehra DOGAN ANIT

Advisor: Prof. Dr. Mustafa CANLI

Department of Biology

ABSTRACT

Hardness values of freshwater vary depending on geographical regions. One of the most important parameters that determine water hardness is the amount of calcium (Ca^{+2}) in the water. Metal toxicity can be affected by ions present in water. In this study, the Nile fish (*Oreochromis niloticus*) were exposed to different copper (Cu^{+2}) concentrations in differing Ca^{+2} levels. Experiments were carried out in two different durations: acute (3 days, 0.3 μM Cu^{+2}) and chronic (30 days, 0.03 μM Cu^{+2}). After these durations, Na^{+}/K^{+}-ATPase and Mg^{+2}-ATPase activities in the gill and small intestine and Ca^{+2}-ATPase activity in the muscle and antioxidant enzyme activities in the liver were measured. At the end of acute and chronic experiments, there were significant ($p<0.05$) changes in ATPase and antioxidant enzyme activities depending on Cu^{+2} and Ca^{+2} concentrations, period and tissue type. While a decrease in ATPase activities was generally observed in fish after exposure to Ca^{+2}+Cu^{+2}, both increases and decreases were observed depending on Ca^{+2} levels alone. Although there were a few significant changes in parameters belonging to the antioxidant system in the liver after acute exposures, there were more significant changes after chronic exposures. In the chronic duration, there were increases in superoxide dismutase (SOD) and glutathione S-transferase (GST) activities, while catalase (CAT) activity decreased. On the other hand, significant increases were also observed in total glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) levels. This study demonstrated that metal toxicity can vary in waters with different hardness values, emphasizing the need for caution in natural studies in aquatic environments.

Keywords: Copper, Calcium, *Oreochromis niloticus*, ATPase, Antioxidant

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa CANLI' ya teşekkürlerimi sunarım. Bu süre içerisinde ilmi, dostluğu ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan Uzman Biyolog Merve Saffet Dura ELMACI'ya teşekkür ederim. Lisans, Yüksek Lisans ve Doktora eğitimim süresince hep güler yüzle sorularımı yanıtlayan, kalbi güzel kıymetli hocam merhum Prof. Dr. İskender EMRE'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Tez projemi 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Doktora Burs Programında değerlendirmeye alan ve doktora eğitimim süresince bana burs desteği sağlayarak çalışmalarıma maddi destek veren TÜBİTAK-BİDEB'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yaşamım boyunca her anlamda beni destekleyen ve yanımda olan sevgili annem Fazilet DOĞAN, babam İlhami DOĞAN, kardeşlerim Burcu DOĞAN, Osman Berat DOĞAN, Duygu DOĞAN ve ailemizin kıymetlileri biricik yeğenlerim Sare Liva TÜRKSOY Barış Efe Uzun, Emir Berat DOĞAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Bilimsel çalışmalarıma daha sıkı bağlanmamı sağlayan, beni her konuda destekleyen ve yoğun çalışma süreçlerimde bana gösterdiği hoşgörü ve fedakarlığından dolayı sevgili hayat arkadaşım Emre Halim ANIT ile zorlu Covit-19 pandemi sürecinde kucağıma aldığım kıymetli kızım Arya Mina ANIT'a da bana verdiği güç ve huzur için sonsuz teşekkür ederim.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. ATPaz Aktivite Ölçümünde Kullanılan Kimyasallar 23
Çizelge 3.2. Antioksidan Enzim Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Kimyasallar..... 24
Çizelge 3.3. Protein Analizinde Kullanılan Kimyasallar..... 24
Çizelge 3.4. Kalsiyum ve Sertlik Tayininde Kullanılan Kimyasallar..... 25
Çizelge 3.5. Kullanılan Aletler 25
Çizelge 3.6. Deney ortamının fizikokimyasal özellikleri (Art ort. ± S.D., N=72)..... 26
Çizelge 3.7. Balık Yeminde Bulunan Mikro Elementler..... 26
Çizelge 3.8. Balık Yeminde Bulunan Makro Elementler 26
Çizelge 3.9. Nestle Pure Life İz Element ve İyon Derişimleri..... 27
Çizelge 3.10. Balıkların ortalama boy ve ağrılıkları..... 27
Çizelge 3.11. Dokularda en yüksek ATPaz enzim aktivitesinin ölçüldüğü ortam koşulları ve inkübasyon ortamındaki iyonların son iyon derişimleri. 28

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Sucul ekosisteme ulaşan kirleticiler. 1
Şekil 1.2. Na^{+}/K^{+}-ATPaz enziminin yapısı ve iyon transfer mekanizması..... 6
Şekil 1.3. Kalsiyum (Ca^{+2}) akışının kontrolü..... 7
Şekil 1.4. Antioksidan savunma mekanizması. 12
Şekil 1.5. Elektron transferi.. 12
Şekil 3.1. ATPaz aktivite ölçümlerinin şematik görüntüsü. 30
Şekil 3.2. Fosfat derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki. 30
Şekil 3.3. GSH standardı absorbans değişim grafiği. 36
Şekil 3.4. Sığır albumininden hazırlanan standart derişimler ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki. 38
Şekil 4.1. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesine etkileri..... 42
Şekil 4.2. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un solungaç Mg^{+2}-ATPaz aktivitesine etkileri..... 43
Şekil 4.3. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un bağırsak Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesine etkileri..... 43
Şekil 4.4. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un bağırsak Mg^{+2}- ATPaz aktivitesine etkileri..... 44
Şekil 4.5. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesine etkileri..... 44
Şekil 4.6. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un karaciğer SOD aktivitesine etkileri..... 46
Şekil 4.7. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un karaciğer CAT aktivitesine etkileri..... 46
Şekil 4.8. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un karaciğer GST aktivitesine etkileri..... 47
Şekil 4.9. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un karaciğer GR aktivitesine etkileri..... 47
Şekil 4.10. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un karaciğer GPx aktivitesine etkileri..... 48
Şekil 4.11. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un karaciğer GSH düzeyine etkileri..... 48

Şekil 4.12. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un karaciğer GSSG düzeyine etkileri. 49
Şekil 4.13. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesine etkileri. 51
Şekil 4.14. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un solungaç Mg^{+2}-ATPaz aktivitesine etkileri. 51
Şekil 4.15. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un bağırsak Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesine etkileri. 52
Şekil 4.16. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un bağırsak Mg^{+2}-ATPaz aktivitesine etkileri. 52
Şekil 4.17. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesine etkileri. 53
Şekil 4.18. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un karaciğer SOD aktivitesine etkileri. 55
Şekil 4. 19. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un karaciğer CAT aktivitesine etkileri. 55
Şekil 4.20. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un karaciğer GST aktivitesine etkileri. 56
Şekil 4.21.Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un karaciğer GR aktivitesine etkileri. 56
Şekil 4.22. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un karaciğer GPx aktivitesine etkileri. 57
Şekil 4.23. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un karaciğer GSH düzeyine etkileri.. 57
Şekil 4.24. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un karaciğer GSSG düzeyine etkileri. 58
Şekil 4.25. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un karaciğer rGSH düzeyine etkileri. 58
Şekil 4.26. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un karaciğer GSH/GSSG düzeyine etkileri. 59

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C : Santigrat derece

°F :Fransız Sertliği

ATPaz : Adenozin trifosfataz

g : Gram

Km : Michaelis sabiti, reaksiyon hızının Vmax'ın yarısı olduğu substrat konsantrasyonudur

mg : Miligram

ml : Mililitre

Pi : İnorganik fosfat

ppt : g çözünen / kg veya litre çözelti

sa : Saat

Vmax : Maksimum reaksiyon hızı

µg : Mikro gram

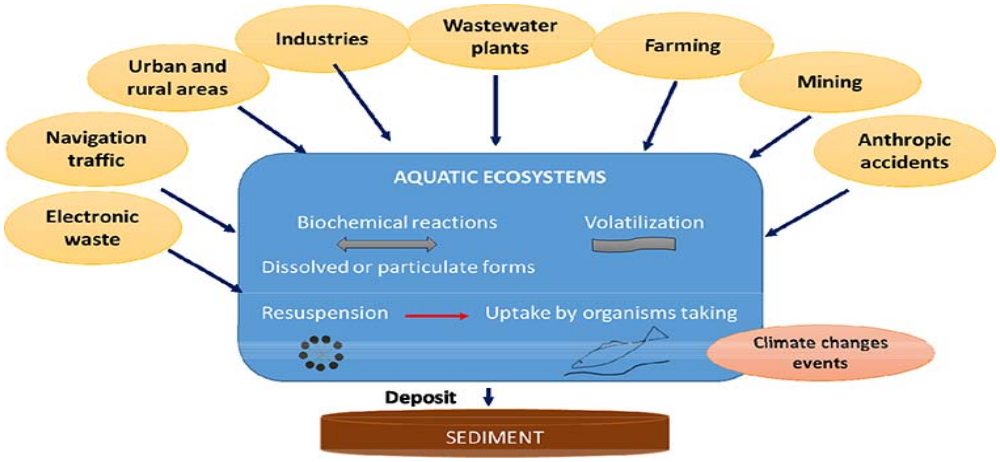
µM : Mikro molar

µmol : Mikromol

1. GİRİŞ

İnsan oğlunun madenciliği öğrenmesi ile başlayan çevresel metal kirliliği, sanayiinin artmasına paralel olarak çoğalarak artmış ve sonunda metaller pedosfere, hidrosfere ve atmosfere yayılmaya başlamışlardır. Endüstriyel atıklar, bazı organik maddeler, yapay tarımsal gübreler, radyoaktifler, deterjanlar, bazı organik maddeler, ağır metaller ve pestisitler ekolojik dengeyi bozan unsurlar olarak bilinmektedir. En önemli kirletici kategorisinde yer alan, su ortamına ve sudaki canlılarda birikim gösteren ağır metaller insanlığı tehdit eden en önemli kirleticilerdendir (Sunlu ve Egemen, 1998; Schüürmann ve Markert, 1998; Hu, 2000).

Sucul ekosistemde yaşayan organizmalar besin zinciri ile birbirleri ile ilişkili olduklarından, zincirin bir halkasında meydana gelen kirlilik unsurları zincirin diğer halkasına da geçerek kitlesel bir etkilenmeye neden olabilmektedir. Bunun sonucu olarak, organizmalar arasındaki etkileşim bozulurken, aynı zamanda besin/enerji akışı engellenmektedir. Madencilik, endüstri ve ziraat alanlarında yaygın kullanılan, ekolojik tehlike oluşturan kirleticiler başında Cu^{+2}, Pb^{+2}, Cd^{+2}, Fe^{+2}, Co^{+2}, Cr^{+3}, Zn^{+2}, Hg^{+2} ve Ni^{+2} yer alırken, çevre kirliliği açısından büyük öneme sahiptir. Parazitler, pestisit, mikroorganizmalar, biyotoksinler ve ağır metaller balıkları olumsuz etkileyen çevre faktörleri arasında yer almaktadır. Ayrıca, kirliliğin ulaştığı içme suyunu içmek veya kontamine balıklarla beslenmek insan sağlığını etkiler (Lloyd, 1992; Silbergeld ve ark., 2005; Dorea, 2006; Verger ve ark., 2007).



Şekil 1.1. Sucul ekosisteme ulaşan kirleticiler. Digital Kaynak 1. (https://www.intechopen.com)

Sucul organizmalar suda bulunan ağır metallerle etkileşimde olan ve onların toksik etkileriyle en çok karşı karşıya kalan canlı grubu arasında yer almaktadır. Bunun nedeni, çevreye bırakılan her türlü kirleticinin yağmurların yıkayıcı etkisi nedeniyle son durak olarak sucul ortamlarda bulunmasıdır. Böylece, sucul organizmalar kirleticilerden en fazla etkilenen organizmalar arasındadır. Metaller balık fizyolojisi ve biyokimyasında önemli değişikliklere neden olup,

metabolik işleyiş mekanizmasında hasarlar oluşturmaktadır (Atlı ve Canlı, 2007, 2011). Metallerin parçalanarak ortamdan uzaklaşılması veya yok edilmesi mümkün olamadığından kalıcı bir kirlilik oluşturmakta ve sonsuz bir tehlike kaynağı olarak tehdit oluşturmaktadır.

Ağır metallerin doğadaki oranları genelde düşüktür, fakat doğal yaşam koşullarında oranlarında yükselme olursa Ag^{+}, Pb^{+2}, Cd^{+2} ve Cu^{+2} gibi metaller enzimleri inhibe edebilir ve toksik etki gösterebilirler (Doğan ve ark., 2015). İz element (Zn^{+2}, Cr^{+3}, Fe^{+2}, Ni^{+2} ve Cu^{+2}) olarak bilinen ve sudaki canlıların düşük düzeylerde almaları gereken metallerin yanı sıra çok düşük düzeylerde toksik etkisi olan ve yaşamsal sürecin devamı için önemli rolü olmayan metaller (Ag^{+}, Cd^{+2} ve Pb^{+2}) ağır metal olarak bilinmektedir. Biyolojik rolü olmayan metallerin toksik etkilerinin, metabolik döngüde benzer kimyasal özellik gösterdikleri iz elementlerin yerine geçip bu döngüyü bozmalarından kaynakladığı bilinmektedir (Rainbow, 1985; Ariyoshi ve ark., 1990).

Yapılan araştırmaların çoğu bir ağır metalin belirlenmiş bir sürede balıklar üzerinde etkisiyle ilgilidir. Doğal koşullarda ağır metallerin bir arada bulunabileceği göz önüne alındığında metal etkileşimi sucul canlıların enzim aktivitesinde çok önemli bir faktör olmaktadır. Çevre kirliliğini göz önünde aldığımızda balıklar genelde tek bir metalin değil metal karışımlarının etkisinde oldukları görülmüştür (Pelgrom ve ark., 1995). Diğer metallerle birlikte bazı ağır metallerin bir arada bulunmaları genelde suyun fizikokimyasal özelliklerinin de etkisiyle organizmalarda önemli değişimler olabileceği birçok araştırıcı tarafından ortaya konmuştur (Eroğlu ve Canlı, 2013; Doğan ve ark., 2014; Doğan ve ark., 2015). Balıklarda metal etkileşimi ile ilgili yapılan çalışmalar; metallerin atılımları, birikimleri ve biyotransformasyonlarının belirlenebilmesi açısından büyük önem taşımaktadır (Wicklund ve ark., 1988).

Hem ekosistemde önemli bir yeri olan hem de besin kaynağı olarak tüketilen balıkların biyokimyasal ve fizyolojik mekanizmaları, inorganik kirleticiler sınıfında yer alan ağır metallerin etkisinde bütünlüklerini kaybetmektedirler (Ariyoshi ve ark., 1990; Hogstrand ve ark., 1999; Basha ve Rani, 2003). Metallerin etkilerini kısa süreli yüksek doz (akut) ve uzun süreli düşük doz (kronik) olarak iki yöntemle incelemek daha anlamlı sonuçlar vermektedir. Genelde akut deneylerde yüksek metal derişimlerinin çalışılmasının nedeni, deşarj bölgelerindeki durumu gösterirken, kronik deneylerde çevrede bulunması daha olası olan metal derişimleri çalışılarak yaygın etkiler belirlenmeye çalışılmaktadır (Canlı, 1995). Kimyasalların biyolojik etkileri ile ilgili araştırmalarda sadece akut toksisite verileri baz alındığında, sucul ortamda subletal etkilerin tanımlanmasında yetersiz kalabilmektedir (Bury ve ark., 2003). Akut etki süresinde balıklarda en fazla hasar gören organ solungaç olduğu belirtilmiştir (Olsvik ve ark., 2001). Akut ve kronik stres farklı ortam şartlarını temsil ettiğinden canlı organizmalar bu koşullara fizyolojik, morfolojik ve biyokimyasal tepkiler göstererek direnç kazanırlar. Kronik stresin letal toksisiteye artan direnç (uyum) mekanizmalarını indüklediği gösterilmiştir (Silvestre ve ark., 2005). Hem metal hem de canlı organizmaya bağlı olan ve su ortamındaki canlılar için yüksek derişimlerde görülen ağır metallerin letal etkisi birçok çalışma ile gösterilmiştir. Toksik etkinin metalin kimyasal yapısıyla ilişkili olduğu

ve uzun süre ekosistemde kalabildiği görülmüştür (Eisler ve Hennekey, 1977; Mance, 1987; Canlı, 1995; Tagliari ve ark., 2004).

Su ortamında toksikolojik olarak ortaya çıkan patolojiyi ve ekosistemin durumunu belirlemede kullanılan en yaygın biyoindikatör canlı grubu balıklardır. Beslenme sorunu olmaması ve kolayca üreyebilmesi sebebiyle çevresel kirlilik ve hastalıklara karşı dirençli olan *O.niloticus*, besin kaynağı olarak çok tercih edilen bu türün istenmeyen özelliği, ağır metallere göstermiş olduğu dirençtir. Bu direnç nedeniyle ağır metalden etkilenmiş balığın tüketilmesi metal birikimi nedeniyle insanlarda da bazı sağlık sorunlarına yol açabilmektedir (Sarıhan ve Toral, 1982; Canlı ve Erdem, 1994).

Metal etkisine bırakılan balıklarda ATPaz aktivitesi inhibisyonu ve doku zararıyla ilgili olan oksidatif stres ve ozmoregülasyon sisteminde bozukluklara yol açan süperoksit radikali, hidroksi radikal ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinde artış gözlenmektedir (Canlı ve Stagg, 1996; Wong ve Wong, 2000; Ribeiro ve ark., 2002; Dautremepuits ve ark., 2004).

1.1. Bakır

Cyprium kelimesinden türetilen, atom numarası 29 ve 1B geçiş grubu elementi olan bakıra tarihte ilk defa Kıbrıs'ta rastlanmıştır. 200'den fazla bakır mineralinden doğada endüstriyel öneme sahip sadece 20 tane bakır cevheri bulunmaktadır (Kartal ve ark., 2004). Bakır, tüm ökaryotik hücrelerin solunumu için gerekli olan ve süperoksit dismutaz, sitokrom oksidaz gibi enzimlerin prostetik grubudur. Buna rağmen endüstriyel aktiviteler sonucu meydana gelen atıklarda bulunan Cu^{+2}, su ortamındaki canlılar için toksik olabilmektedir (Heath, 1987). Bakırın sucul organzimalarda oksiradikal oluşumunu teşvik ettiği ve enzim ve proteinlerdeki sülfidril gruplarına yüksek affinite gösterdiği bilinmektedir (Canesi ve ark., 1998). Tarım ve kültür balıkçılığı, cam-boya sanayi, elektrik ve madencilikte kullanılan bakırın suda derişimi arttıkça sucul canlılardaki birikimi de giderek artmaktadır. Bakır canlı organizmada serbest (+2 değerlikli katyon) veya kompleks oluşturarak; üreme sistemi, enzim aktivitesi ve kan parametrelerinde değişikliğe sebep olduğu görülmüştür (Roch ve McCarter, 1984; Hazma-Chaffai ve ark., 1998; Lopes ve ark., 2001; Couture ve Kumar, 2003). Basit yapılı küçük canlılarda toksik etki olurken, daha büyük canlılar için temel yapı bileşeni olduğundan bakır ve bileşikleri fungusit, biosit, anti bakteriyel madde ve böcek zehri olarak tarım zararlılarına ve yumuşakçalara karşı yaygın olarak kullanılmaktadır. Bakırın az oranda alınmasıyla vücudun bakır dengesi bozulmaktadır. Buna bağlı olarak enzim aktivitesi engellenir ve karaciğer, beyin ve böbreklerin çalışma fonksiyonunu bozmaktadır. Bakır; ağır metal kirlenmesi olarak çevrede çok bulunan, mikroorganizma, bitki, hayvan ve insanlara belirli konsantrasyonların üzerinde zehirlilik etkisi gösteren ağır metallerden birisidir (Dunn ve Bull, 1983). Hücrede şelatlama kapasitesinin üstünde biriken bakırın çok fazla sitotoksik olduğu, oksidatif strese neden olduğu ve hücresel düzeyde zarar verdiği bilinmektedir. Bakırın kronik etkisine kalan balıkların; oksijen

tüketiminde artma, yüzme hızında azalma, iyon regülasyonunda değişiklikler, enzim aktivitelerinde negatif etkiler gibi fizyolojik değişiklikler meydana gelmektedir (Henczova ve ark., 2008).

Sucul hayvanlarda, bakır homeostazisi pek çok faktöre bağlı olmakla birlikte, son derece düzenli bir süreçtir (Kamunde ve ark., 2002; Jorge ve ark., 2012). Yapılan bir çalışmada, 67 gün boyunca yüksek bakır içerikli diyetle beslenen Mavi Kefal Balığı'nda (*Chelon labrosus*), oksidatif strese bağlı hasar oluştuğu sonucuna varılmıştır (Baker ve ark., 1998). Başka bir çalışmada, Çipura'ya (*Sparus aurata*) $CuCl_2$ enjeksiyonu sonucunda tiyobarbitürik reaktif maddelerin, SOD enzim aktivitesi ve protein seviyelerini arttırdığı rapor edilmiştir (Pedrajas ve ark., 1995). Afrika Kedi balığı'nın (*Clarias gariepinus*) yüksek dozda bakır etkisi sonucunda, bağırsak, karaciğer ve solungaçlarda bakır derişimini yükselttiği ve aynı zamanda solungaç ve bağırsakta TBARS konsantrasyonunu önemli derecede arttırdığı ve bağırsakta total glutatyon içeriğinin iki katına çıktığı görülmüştür (Hoyle ve ark., 2007). Hansen ve ark. (2006 a ve b), Kahverengi Alabalık (*Salmo trutta*) dokularında bazı antioksidan enzimler üzerine su kirliliğinin etkilerini araştırdıkları çalışma sonuçlarına göre, metal iyonlarına özelliklede bakır etkisine kalan balıklarda birincil (SOD, CAT, GSH) ve ikincil (Glutatyon redüktaz (GSSG), Metallotiyonein (MT) enzim aktivitelerinin arttığı ve protein seviyelerinin yükseldiğini göstermişlerdir. Diğer taraftan, Bopp ve ark. (2008) farklı dozlarda bakır çözeltileri uygulanmış Gökkuşağı Alabalığı'nın (*Oncorhynchus mykiss*) solungaç hücrelerinde doza bağlı olarak yüksek sitotoksisite ve oksidatif stres belirtileri olduğu belirtmişlerdir. Bir diğer araştırmada, farklı dozlarda bakır etkisinde kalan Zebra balıklarında CAT aktivitesinin değişmediği görülmüştür (Craig ve ark., 2007). Barata ve ark. (2005) su piresinin (*Daphnia magna*) bakır iyonları etkisinde kaldığında CAT, GPx, GST ve SOD aktivitelerinin arttığı gözlemlemişlerdir. Diğer taraftan, Mavi Yengeç (*Callinectes sapidus*) ile yapılan bir çalışmada, farklı bakır konsantrasyonlarının hücre içi GSH düzeyi ve CAT aktivitesini etkilemediği sonucuna varılmıştır (Abele ve ark., 2012). Böylece bakırın farklı organizmalarda farklı etkilerinin olabileceği gösterilmiştir.

1.2. Kalsiyum

Bütün canlılar için yaşamsal öneme sahip olan kalsiyum, omurgalı ve omurgasız canlılarda yapısal ve fizyolojik öneme sahiptir. Karada yaşayan omurgalılar besin yoluyla kalsiyum emilimi yaparken, sucul omurgalılar sudan emilimle kalsiyumu alırlar. Divalent metaller (Cd^{+2}, Pb^{+2}, Cu^{+2} ve Zn^{+2}) kalsiyum antagonisti olarak bilinirler. Hem besin hem de su ile taşınan kalsiyum, bu metallere karşı koruyucu görev üstlenmekle beraber balık ekolojisinde önemli bir yere sahiptir. Yüksek düzeyde kalsiyuma sahip tatlı suların hayvan ile bitkilerde verimlilik artışında ve suyun kalitesi açısından önemli bir iyon olduğu bilinmektedir. Sucul ortamda düşük düzeydeki kalsiyum ile pH ortamı balıkların hayatta kalma ve ozmolalitelerinde düşüşe sebep olurken, artan ortam kalsiyumu iyon kaybına karşı tampon görevi üstlenmektedir (McDonald ve ark., 1980; Berntssen ve ark., 2003; Niyogi ve Wood, 2006; Gonzalez ve ark., 2006). Kalsiyumun sudaki canlılarda intraselüler

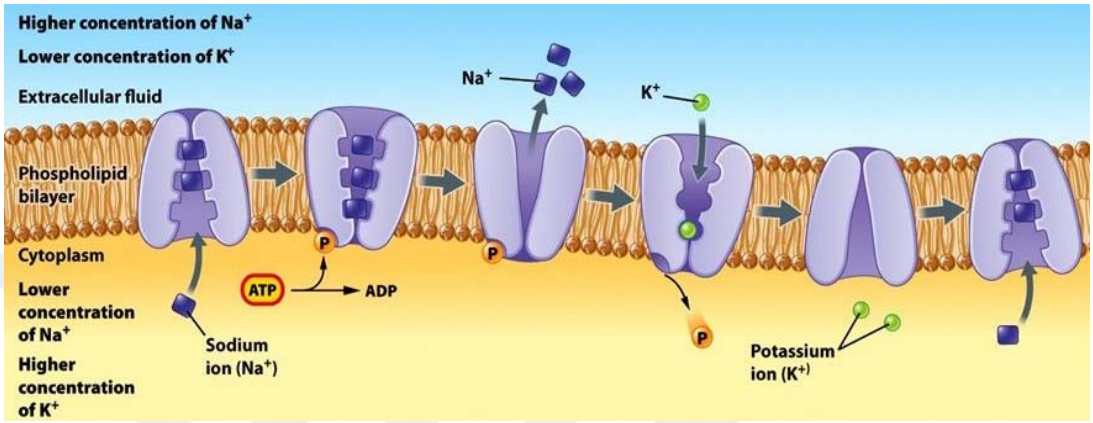
regülasyonda önemli biyolojik işlevine ilaveten elektriksel, yapısal, ekstraselüler enzim ve proteinlerde kofaktör görevi vardır. Hem yumuşak dokularda hem de kemik, diş ve pul gibi iskelet dokularında yapısal olarak önemli işleve sahiptir. İç ve dış ortam arasındaki kalsiyum dengesini korumada görevli olan organlar solungaç, böbrek ve bağırsaklardır. Deri ve solungaçlarından direkt alınan kalsiyum, tatlı suda yaşayan balıklarda büyüme, membran bütünlüğü ve akıcılığı, hücre adhezyonu için gerekli bir iyondur. Bazolateral plazma membranında yer alan Ca^{+2}-ATPaz'larla kana taşınan kalsiyum, solungaç apikal membranında yer alan kalsiyum kanalları ile taşınmaktadır (Ichii ve Mugiya, 1983; Hunn, 1985; Verbost ve ark., 1989; Hwang ve Yang, 1997; Baldisserotto ve ark., 2004a, b). Sert suların koruma etkisinden sorumlu katyonlar arasında en önemlilerinden biri kalsiyumdur. Sert sulardaki balıklar yumuşak sulardaki balıklarla kıyaslandığında metal toksisitesinin azaldığı görülmüştür (Pagenkopf, 1983; Winner ve Gauss, 1986; Pascoe ve ark., 1986; Playle ve ark., 1992, Diamond ve ark., 1992 ve Barron ve Albeke, 2000).

Kalsiyumun metal birikimi ve toksisitesinde iki önemli etki mekanizması vardır. Bu mekanizmalar kimyasal olarak kompleks ve absorbsiyon için rekabet ile biyolojik olarak alınım yerlerinin azaltılması ve membran geçirgenliğinin azalması gibi etkileri vardır (Barron ve Albeke, 2000). Su sertliğinin tatlı sularda artmasıyla canlı organizmalarda kalsiyum ve magnezyum gibi iyonları almak için yarışmalarından dolayı azaldığı görülmektedir. Yumuşak sularda tamponlama kapasitesi ve düşük kalsiyum düzeyi nedeniyle toksik etki görülürken, sert sularda enzim aktivitesi metallerin karbonat ve kalsiyum ile bileşik oluşturmalarına bağlı olarak düşüş göstermektedir (Heath, 1987; Verbost ve ark., 1989; Pratap ve Wendelaar- Bonga, 1993; Hollis ve ark., 2000; Kim ve ark., 2001; Pyle ve ark., 2002; Javid ve ark., 2007).

1.3. Adenozin Trifosfataz (ATPaz) Enzimleri

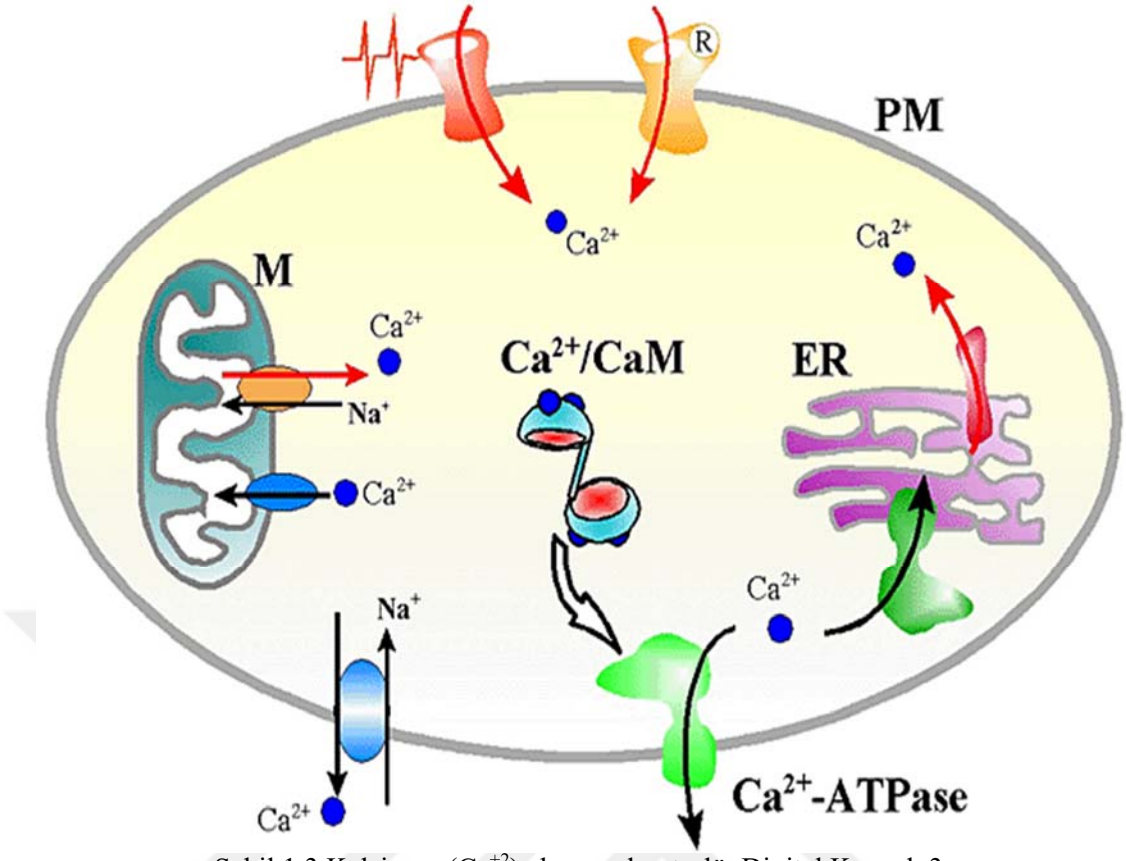
Toksisiteye duyarlı belirteç olarak kullanılan, membrana bağlı ve hücre içi fonksiyonlarda önemli role sahip olan bu enzim dokudaki osmotik basınç, iyon hareketi ve membran geçirgenliği gibi görevlere sahiptir ve gösterdiği yüksek elektronegatiflik sebebiyle geçiş grubu metallerine duyarlıdır. ATPaz grubu enzimler arasında Mg^{+2}-ATPaz, Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Ca^{+2}-ATPaz başta gelmektedir. Bu enzimlerin aktivitelerinin değişimine sebep olan metaller arasında ise Hg^{+2}, Cu^{+2}, Cr^{+6}, Zn^{+2} ve Pb^{+2} sayılmaktadır (Shephard ve Simkiss, 1978; Riedel ve Christensen, 1979; Watson ve Beamish, 1980; Watson ve Beamish, 1981; Thaker ve ark., 1996; Atlı ve Canlı, 2008a, 2011). Mg^{+2}-ATPaz'ın görevi oksidatif fosforilasyon ile solungaçta geçirgenliğin stabilizasyonu için gerekli magnezyumun (Mg^{+2}) taşınması ve solungaç epitelyumunda hücre membran bütünlüğünü korumaktır (Parvez ve ark., 2006). Na^{+}/K^{+}-ATPaz'ın görevi ATP'nin hidroliz olmasıyla ortaya çıkan enerjiyi kullanarak, 2 K^{+} iyonunu hücre içine ve 3 Na^{+} iyonunu hücre dışına transfer eder. Bu şekilde iyon taşınımı, elektrokimyasal gradiyentin korunması ve hücre hacminin düzenlenmesini sağlar (Grosell ve ark., 2003). Kemikli balıkların solungaç epitelinde mitokondrilerce zengin hücrelerde yer alan bu enzim, 60 kDa moleküler ağırlığındaki glikozitlenmiş β (beta) alt ünite ve 100 kDa

moleküler ağırlığında olan α (alfa) alt ünitesinden oluşan P tipi ATPaz grubunda yer almaktadır. Aynı zamanda su ortamında yaşamını sürdüren canlılarda iyon düzenlenmesinde yaşamsal öneme sahip olduğu bilinen bu enzimin aktivitesinde meydana gelecek herhangi bir değişimin çevresel kirleticilere tepki olarak doğal stres kaynaklı oluştuğu bilinmektedir. Tuzlu ve tatlı su balıklarında bu enzimi inhibe eden ve ozmoregülasyonda bozulmaya neden olan metaller arasında Zn^{+2}, Ag^{+}, Hg^{+2}, Cu^{+2} ve Cd^{+2} sayılabilir (Bianchini ve Wood, 2003; Bianchini ve ark., 2004, 2005).



Şekil 1.2. Na^{+}/K^{+}-ATPaz enziminin yapısı ve iyon transfer mekanizması. Digital Kaynak 2. (http://pumphonebiwa.blogspot.com)

Ca^{+2}-ATPaz'ın görevi ATP hidrolizi sonrası ortaya çıkan enerjiyi kullanıp sitoplazmadan kalsiyumun uzaklaştırılmasını sağlayarak hücresel kalsiyum içeriğinin düşük kalmasını korumaktır. Sarkoplazmik retikulum tübüllerinde yer alan bu enzim, nM düzeyde kalsiyum ile aktive olup hücre membran stabilizasyonunu sağlar (Watson ve Beamish, 1981; Saxena ve ark., 2000). Bu enzim yapısındaki fonksiyonel sülfidril grupları ve kalsiyum metabolizmasındaki görevi ile birlikte metal etkisinde inhibe olmasıyla kirliliğin etkisini araştıran çalışmalarda büyük öneme sahiptir (Shephard ve Simkiss, 1978; Wong ve Wong, 2000). Solungaçlar su ile sürekli temas halinde olduklarından metallerin etkisine çok daha fazla maruz kaldıklarından bu dokudaki enzimler sürekli bir tehdit altında bulunmaktadırlar (Shephard ve Simkiss, 1978; 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, 2008 a).



Şekil 1.3.Kalsiyum (Ca^{+2}) akışının kontrolü. Digital Kaynak 3. (https://www.bioscience.org)

Metallerin ATPaz grubu enzimler üzerine olan etkileri çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir. Kuhnert ve ark. (1976) yaptıkları çalışmada, alabalığın (*Salmo gairdneri*) in vivo Cr^{+6} metaline maruz kalması sonucu solungaçta Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesini inhibe ettiğini göstermiştir. Diğer yandan, Watson ve Beamish (1980) Zn^{+2} nun in vitro etkisi ile solungaçta Na^{+}/K^{+}-ATPaz, Ca^{+2}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz'da anlamlı inhibisyonların olduğunu belirtmiştir. Kadmiyum etkisinde kalan balıkların klorit hücrelerinde bulunan Ca^{+2}-ATPaz'ın Ca^{+2} bağlayan bölgesinin inhibisyon bölgesi olması nedeniyle kadmiyum için klorit hücrelerinin primer hedef olduğu vurgulanmıştır (Flik ve ark., 1985, Verbost ve ark., 1988). Laboratuarımızda yapılan çalışmada, metallerin (Pb^{+2}, Cd^{+2}, Cu^{+2}, Zn^{+2}) 10 ve 20 µM derişimlerine maruz kalan balıkların (*O. niloticus*) kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi, bağırsak ve solungaçlarda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitelerinde kurşunun yüksek derişimde artış görülürken, diğer metallerin etkisinde inhibe olduğu görülmüştür. Diğer taraftan, kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin bakır dışındaki tüm metaller tarafından azaltıldığı belirtilmiştir (KAYNAK). Araştırıcılar enzim aktivitelerinde meydana gelen değişikliklerin metal derişimi ve tipine bağlı olduğu ve su ortamında bu enzimlerin metal kirliliği alanındaki çalışmalarda belirteç olabileceğini vurgulamışlardır. Benzer şekilde, diğer bir çalışmada (Doğan ve ark., 2015), farklı Ca^{+2} derişimlerinde (15, 30 ve 60 mg Ca^{+2}/L) Pb^{+2} etkisine kalan *O. niloticus*'un akut (48 saat, 20 µM Pb^{+2}) ve kronik (14gün, 10 µM Pb^{+2}) süreçlerde solungaç, bağırsak ve kas dokularında Na^{+}/K^{+}-ATPaz, Mg^{+2}-ATPaz ve Ca^{+2}-ATPaz aktivitelerinde anlamlı değişimler olduğunu göstermişlerdir.

Sonuçlar, Ca^{+2}+Pb^{+2} etkisine kalan balıklarda yumuşak sularda ATPaz aktivitelerinde artış görülürken, sert sularda azalışlar olduğunu göstermiştir. Bunun yanında, kronik olarak sert su etkisinde kalan balıklarda ATPaz aktivitelerinde hem artış hem azalış görülürken, Ca^{+2}+Pb^{+2} etkisine kalan balıklarda yumuşak sularda ATPaz aktivitelerinde artış görmüşlerdir.

1.4. Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1758)

Cichlidae familyasının en önemli cinslerinden biri olan Tilapia cinsi balıklar genellikle tropik bölgelere adapte olmuş olup, nispeten ılıman Tatlısularda yaşamaktadır. En iyi gelişme gösterdikleri su sıcaklıkları 20 ˚C'nin üzerindeki ve 30 ˚C'ye yakın olan sulardır. Su sıcaklığı 13-14 ˚C'nin altına düştüğünde gelişmeleri dururken, 10 ˚C'nin altında ölmeye başlarlar. Diğer yandan düşük oksijen ihtiyaçları, hastalıklara karşı dirençli olmaları ve beslenmelerinin kolay olması nedeniyle de laboratuvar çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadırlar. Daha da önemlisi, Tilapia'lar tuzluluğa karşı dayanıklı olduklarından acı sularda bile yaşayabilen türler olup, özellikle Mısır, Ürdün ve İsrail'de yaygın görülen Doğu Afrika kökenli balıklardır. Ülkemizde de kültür balıkçılığı yapılmakta olup, Çukurova Üniversitesinde de üretimi yapılmaktadır. Geniş bir aile olan Tilapia'nın kültüre yatkın olan 5 türü vardır. Tatlı su çipurası olarak da bilinen *Oreochromin nilotica* doğal ortamda kültüre uygun olan Türkiye'deki tek türdür. Beslenme şekilleri omnivor olup, özellikle küçük bireylerin başlıca besin kaynağı hayvansal planktonlar olmak üzere, larva ve böcekler oluşturmaktadır. Büyümeye bağlı olarak beslenmelerinde fitoplanktonların payı artmaktadır. Erkekler dişilere göre daha hızlı gelişir ve daha büyük ağırlıklara ulaşırlar. Büyük göllerde yaşayanların 2-10 kg'a kadar ulaştıkları bilinmektedir.

1.5. Solungaç Dokusu

Solungaçlar kandaki karbondioksitin dışarı atılmasını**,** suda erimiş oksijenin kana alınmasını sağlayan solunum yüzeyinin dallanmasıyla ve kıvrılmasıyla meydana gelen önemli yapılardır (Demirsoy, 1992). Su ortamında yaşayan canlılar oksijen ihtiyaçlarını, solungaçlarının sürekli sulu ortamda bulunması ile sağlayabilmektedirler (Noyan, 1993). Çevre ile sürekli teması sağlayan solungaçlar, suda çözünen toksik maddelerin ilk giriş yollarından birisi olduğundan, kirleticilerden en fazla etkilenen organdır. Solungaçların kirleticilerden etkilenmesi balığın solunum sisteminde, başta toksikopatolojik lezyonlar (genel olarak epitel dokuda kabarma, nekroz, lamellar yapıda erime, hipertrofi, hiperplazi, epitel dokuda kopma, mukus salgısında artış) olmak üzere ölüm gibi çok ciddi hasarlara neden olurlar (Val ve Kapoor, 1987; Lawrence ve Hemingway, 2003).

1.6. Bağırsak Dokusu

Balık bağırsağı midenin pilorik kısmı ile anüs arasındaki onikiparmak bağırsağı, ön bağırsak, arka bağırsak ve son bağırsaktan oluşmaktadır. Onikiparmak bağırsağı, hepatik ve pankreatik

kanalların bağırsağa açıldığı ve pilorik kör keselerin bulunduğu kısımdır (Buddington, 2000; Timur, 2013). Balıklarda makromoleküllerin emildiği ana yer posterior kısmıdır. Yapılan çalışmalarda bakır gibi iz elementlerin genellikle balıkların metabolik olarak aktif olan bağırsak, böbrek ve dalak gibi iç organlarında yüksek birikim gösterdiği bildirilmiştir (Fange, 1986; Hard ve ark., 1988; Flajnik, 1998; Canlı ve ark., 2003; Yazkan ve ark., 2002; Cicik ve ark., 2004; Yılmaz ve ark., 2007).

1.7. Kas Dokusu

Miyamerlerden meydana gelen kas sistemine sahip olan balıklardaki kas fibrilleri yapı bakımından sıcakkanlı hayvanların kas fibrilleri ile aynıdır. Tek farkı kas fibrillerinin uzunluğu sıcakkanlı hayvanların kas fibrillerinin uzunluğu kadar değildir (Demir, 1992; Ternes, 1994). Balıklarda miyoglobin konsantrasyon farkından kaynaklanan açık veya koyu renkli kas bölümleri vardır. Koyu renkliler kalp kasına benzer ve kesintisiz yüzmeyi sağlar. Sırt ve karın bölgesinde bulunan açık renkli kaslar ise kaçma gibi durumlarda işe yarar (Tülsner ve Band, 1994). Balık insan diyetinin önemli bir parçasını oluşturur. Bu sebeple, kasta meydana gelen hasarlar, bu balığı tüketen insanlara besin zinciri yolu ile etkilemektedir (Lenka ve ark., 2014).

1.8. Karaciğer Dokusu

Hem anabolizma hem katabolizma da görev alan karaciğer birçok hayati fonksiyonu kontrol eden önemli bir organdır (Brusle ve Anadon, 1996). Metallotionein gibi detoksifikasyon proteinlerinin sentezlendiği yer olan karaciğer (Cinier ve ark., 1999), sudaki kirleticilerin biyotransformasyonu, detoksifikasyonu ve atılımında, minerallerin depolanması ve sindirimde işlevi olan önemli bir organdır (Ali ve ark., 2003).

Toksik maddelere maruz kalan balık karaciğerinde histolojik değişimler meydana geldiğinden bu organda kirleticilere duyarlı biyobelirteçler bulunmaktadır (Hinton ve Couch, 1984). Kirleticilerin bazı balık türlerinde nodül ve tümör oluşturabilmektedir ve arazi şartlarında kolaylıkla tespit edilmektedir (Lawrence ve Hemingway, 2003). Toksik etkiyi indirgeme özelliğine rağmen, yüksek konsantrasyonlar karaciğerin bu mekanizmasını devre dışı bırakma eğilimindedir.

1.9. Antioksidan Enzimler

Oksijenin tahrip edici reaksiyonuna (oksidasyon) karşı koruyucu özellik gösteren antioksidanlar organizmanın gerek iç (sindirim, solunum, hastalık, yaralanma vb.) ve gerekse dış (çevresel) faktörlerle uyarılmaktadır. Bu uyarımlar nedeniyle oluşan oksidan moleküller doku ve hücrelere saldırarak tahribata neden olmaktadır (Quiles ve ark., 2002). Reaktif oksijen türleriyle beraber diğer prooksidanları, antioksidan enzim ve düşük molekül ağırlıklı serbest radikal gidericilerle sürekli olarak etkisizleştiren bir sistem organizmalarda bulunmaktadır. Hücre içi ile hücre dışı enzim ve non-enzim (enzim olmayan) reaktif oksijen türlerine karşı gösterilen savunma

mekanizmasına antioksidan savunma sistemi denilmektedir (Ritola ve ark., 2002; McLean ve ark., 2005).

Sucul organizmaların dokularında ve hücrelerinde tüm çevresel kirleticilerin (ağır metaller dahil), oksidatif stresi arttırdığı saptanmıştır (Campana ve ark., 2003). Çevre kirleticileriyle birlikte oksidatif stresteki artışın sonucu olarak organizmada doku hasarının arttığı belirlenmiştir (Malins ve ark., 1988). Reaktif oksijen türlerini (ROS) ortadan kaldırmakla görevli olan ve hemen tüm organizmalarda bulunan antioksidan savunma sistemi; antioksidan enzimler (Süperoksit dismutaz, katalaz, glutation peroksidaz) ve serbest radikalleri yok eden vitaminlerden (Vitamin C ve E, karotenoidler) oluşmaktadır (Doyotte ve ark., 1997; Elumalai ve ark., 2002). Antioksidan savunma sisteminde bozulma meydana geldiğinde oksidatif stres sebebiyle DNA hasarları oluşmakta ve enzim işlevlerinde aksama olmaktadır (Doyotte ve ark., 1997).

Oksidatif stresle ilişkili olan antioksidan mekanizması ekotoksikoloji alanında büyük bir ilgi görmektedir ve böylece antioksidan enzimler de ATPaz'lar gibi, sucul canlılarda zararlı etkiler meydana gelmeden önce "erken uyarıcı sistemler" olarak önemlidir (Heath, 1987). Antioksidan enzimlerin oksidatif stresi göstermede iyi bir moleküler indikatör olmalarından dolayı, genelde metallerin etkisine bırakılan organizmalarda bir tepki olarak oluşmaktadırlar. Oluşan bu tepki, organizmaların ortamlarına adaptasyonunu göstermektedir (Lopes ve ark., 2001). Balıkta ölçülen moleküler ve hücresel belirteçler, metallerin oluşturduğu strese karşı verdikleri hızlı tepkiler ve organizmaların sağlık durumu açısından değerlendirilmesinde kullanılabilmeleri nedeniyle ekotoksikoloji çalışmalarında son yıllarda giderek önem kazanmaktadır. Metallerin enzim aktivitelerinde artış ve azalışa sebep olmasında bazı etkenler vardır, bunlar; metal derişimi ve tipi, metal etkisine kalan balığın türü, metale maruz kalınan süre ve suyun sertliğine göre değişkenlik göstermektedir. Bu amaçla günümüzde antioksidanlar gibi birçok enzim aktivite ölçümü organizmalarda geri dönüşümsüz hasarlar oluşmadan önce erken uyarıcı sinyaller olarak kullanılmaktadır (Watson ve Beamish, 1981; Simkiss ve Taylor, 1989; Ritola ve ark, 2002).

Omurgalı ve omurgasız birçok hayvanda oksiradikallerin detoksifikasyonunda görevli olan antioksidan enzimler, hücre homeostazisinin korunmasında büyük öneme sahiptir (Regoli ve Principato, 1995).

Organizmalar metabolizma için gerekli olan ve olmayan ağır metaller ile oksidatif strese neden olan diğer ksenobiyotiklerin toksik etkilerinden kendilerini korumak adına çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bu gibi stresler altında birincil olarak antioksidan koruma sağlayan enzimler arasında glutatyon metabolizmasında görev alan glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon peroksidaz (GPX) ve glutatyon redüktaz (GR) gelmektedir. SOD, süper oksit radikallerinin H_2O_2, ye dönüştürülmesini katalizler, CAT ise bu H_2O_2' yi H_2O ve O_2, ye çevirir. Glutatyon metallere oldukça duyarlı olan bir proteindir ve oksidatif stres başta olmak üzere elektrofillerin detoksifikasyonu, serbest radikallerin tutulması ve thiol-disülfidin dengelenmesinde görevi olan bir tripeptittir. Zararlı ksenobiyotiklere karşı savunmada kilit rol oynadığından farklı kirletici etkilerinde çeşitli balık

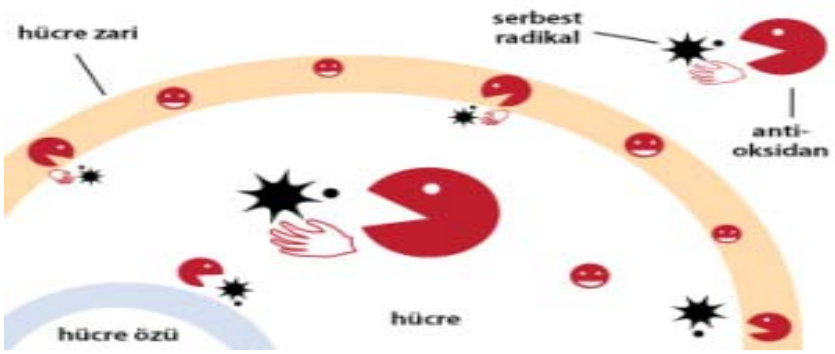
türlerinde belirteç olarak görev aldığı bilinmektedir (Elia ve ark., 2003; Sanchez ve ark., 2005). GPX hidrojen peroksiti veya lipit peroksidasyonu sonucu oluşan organik hidroperoksitleri detoksifiye ederken, GST glutatyon ile çeşitli elektrofilik moleküllerin konjugasyonunu, GR ise okside glutatyonun redükte glutatyona indirgenmesini katalizlemektedir. Oksidatif stres altında, canlıları serbest radikallerden korumak için antioksidan savunma sistemleri diğer detoksifikasyon sistemlerinden önce indüklenmektedir. Bu antioksidan enzimler, Cu^{+2} ve Fe^{+3} varlığında $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 arasında gerçekleşen Haber-Weiss reaksiyonu ile oluşan reaktif ve zararlı hidroksil radikal türlerinin düşük düzeylerde tutulmasına katkıda bulunmaktadır. Böylece artan reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonu sonucu enzim inhibisyonu, DNA hasarı, lipit peroksidasyonu ve protein parçalanması gibi oksidatif hasarlar önlenmektedir (Barata ve ark., 2005).

Metal etkisine kalan hayvanlarda hem doğa hem de laboratuvar koşullarında verdikleri enzimatik cevaplar araştırılmıştır. Alınan yanıtlarda göre; enzim aktiviteleri metale maruz kalınan süre, tür ve doza göre artış ve azalışlar göstermiştir (Wong ve Wong, 2000; Jiraungkoorskul ve ark., 2003; Sanchez ve ark., 2005; Doğan ve ark., 2014; Doğan ve ark., 2015).

Balık metabolizmasında yaşamsal öneme sahip olan ozmoregülasyon ve antioksidan sistemlere bakır toksisitesinin yanı sıra suyun fizikokimyasal özelliklerinden biri olan su sertliği ile etki sürelerinin olası katkılarının araştırılması bu çalışmanın amacını oluşturmaktadır. Değişen ortam koşullarına bağlı olarak analiz edilecek ozmoregülasyon ve antioksidan sistem cevabının, çevresel kirliliğin sağlık risk değerlendirme aşamasında gösterdiği duyarlılığın geçerliliği test edilecektir. Ozmoregülasyon ve antioksidan sistemin verdiği cevaplar arasında da duyarlılık yönünden bir karşılaştırma yapılacak ve metal dışındaki sertlik faktörünün bu tepkilere olan etkileri de istatistiksel olarak değerlendirilecektir.

1.10. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller

Organik moleküllerin temel yapı taşlarını başta canlılık için eşsiz bir element olan oksijen ile birlikte hidrojen, karbon, nitrojen ve kükürt oluşturmaktadır (Sun, 2005). Ancak oksijenli solunum yapan canlıların hücrelerinde gerçekleşen metabolik reaksiyonlar için gerekli olan oksijen, canlılar için en tehlikeli formlardan biri olan serbest radikallere dönüşmektedir (Fang ve ark., 2002; Gök ve ark., 2006). Membranı oluşturan ve oksitlenebilen hücre elemanları; fosfolipitler, glikolipitler, gliseritler, DNA, doymamış yağ asitleri ve membran proteinleri radikaller için çekici hedeflerdir (Fernandes ve ark., 2004). Bazen oksidan moleküller, belirli düzeyin üstüne çıkarak reaktif oksijen ürünlerinin oluşumunu engelleyememekte ve antioksidan savunma mekanizmasını bozmaktadır (Şekil 2.1.) (Ricciarelli ve ark., 2007; Wang ve ark., 2006).



Şekil 1.4. Antioksidan savunma mekanizması. Digital Kaynak 4. (https://resifmarket.wordpress.com)

Hücrelerde meydana gelen metabolik tüm aktivitelerde serbest radikaller oluşabilmektedirler. Serbest radikaller veya oksidanlar, kısa ömürlü, dış orbitallerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron bulunan reaktif atom, iyon veya moleküllerdir (Choi ve ark., 2004). Organizmadaki enerjinin açığa çıkışı, metabolik süreçlerde meydana gelen serbest elektronların bir sistemden diğerine aktarılmasının sonucu oluşmaktadır. Bu aktarım sırasında elektron transfer zincirinden sızan elektronların oluşturduğu oksiradikaller (Şekil 2.2.) hücrede geçirgenlik ve bütünlük bozukluklarına sebep olmaktadır (Fang ve ark., 2002).



Şekil 1.5. Elektron transferi. Digital Kaynak 5. (https://www.fitekran.com)

1.11. Antioksidan Savunma Mekanizması

Oksidanların zararlarını önlemede, antioksidanlar 4 farklı savunma mekanizması yolu izlerler (Wang ve ark., 2006).

1. **Temizleme etkisi:** Enzimlerin etkisiyle oksidan moleküllerinin zayıflaması ve oksijen ile reaksiyona girerek ya da onun yerini alarak oksijen düzeyini azaltmak,
2. **Baskılama etkisi:** Oksidanlara bir hidrojen molekülü vererek hidroksil radikali yapısında bulunan hidrojen atomları ile bağ oluşturabilecek yapıdaki ürünleri temizleyip peroksidasyonun başlamasını önleyebilmeleri,
3. **Onarma etkisi:** Serbest radikallerin oluşturduğu hasarları onarabilmeleri,

4. **Zincir koparma etkisi:** Bu etkiyi oksidanları bağlayıp fonksiyonlarını engelleyerek kendini gösterir ve hemoglobin, seroplazmin ve E vitamini tarafından yapılır. Fenoller ve aromatik aminler zincir kırıcı antioksidanlar arasında en yaygın olanlarıdır.

Balıklarda hücre içi enzim yapısına sahip antioksidanlar; süperoksit dismütaz (SOD), katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR) enzimleridir (Heiske, 2005; Filho, 2007). Hücre dışı ve hücre dışı vücut sıvılarındaki ROS seviyeleri nonenzimatik ve enzimatik antioksidanların etkisiyle kontrol edilir. Enzimatik antioksidan savunma sistemi elemanlarından süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) serbest radikalleri yok etme yeteneğindedir. Balıklar diğer omurgalılarda olduğu gibi enzimatik olmayan ve enzimatik antioksidan savunma sistemine sahiptirler (Van der Oost ve ark., 2003; Trenzado ve ark., 2006). Stresin de dahil olduğu birçok patolojik ve fizyolojik koşullar antioksidan maddelerin seviyeleri ve enzim aktiviteleri ile ilişkili oldukları bilinmektedir. Normal vücut homeostazını değiştiren stresin, davranışsal, fizyolojik ve biyokimyasal değişikliğe yol açtığı bilinmektedir (Tsigos ve ark., 2016). Karaciğer, ksenobiyotik metabolizmanın birincil organıdır ve oksitlenebilen substratlar bakımından zengin oldukları için oksidatif hasara karşı duyarlıdır (Mudipalli, 2007). Nil tilapyası (*Oreochromis niloticus*) toksikolojik çalışmalar için kolay üreme ve yüksek adaptasyona sahip olması nedeniyle iyi bir modeldir ve sıklıkla kullanılmaktadır (Wu ve ark., 1999). Antioksidan enzimlerin aktivitesi, kirleticilerin baskısı altında indüklenebilmekte veya inhibe edilebilmektedir. Oksidatif stres altında, enzim aktivitelerinde farklılıklar görülebilmektedir. Stres başlangıcında önce aktiviteler uyarılır, ancak stres uzun sürerse, enzim inhibisyonu başlar (Annabi Berrahal ve ark., 2007). Canlıda görülen bu etkiler; stres yoğunluğuna, türlerinin hassasiyetine bağlı olarak değişebilir (Awoyemi ve ark., 2014). SOD ve CAT enzimleri ROS'a karşı ilk savunma sağlamakta ve ROS'un toksisitesine karşı hücresel bir savunma mekanizmasını temsil etmektedir (Van der Oost ve ark., 2003). SOD enziminin üretilen süperoksit radikallerini hidrojen peroksitlere dönüştürerek serbest radikal kaynaklı oluşacak zarara karşı koruma sağladığı bilinmektedir. Hidrojen peroksit daha sonra sisteme su ve moleküler oksijene dönüştüren CAT enzimi ile giderilmektedir (Van der Oost ve ark., 2003). Artan CAT ve SOD aktiviteleri, metallere uzun süreli maruz kalındığında detoksifikasyon mekanizmasındaki bir değişimi göstermektedir. Bu durum, *O. niloticus*'ta SOD'un aktivitesini arttırarak süperoksit anyon radikalinin toksik etkisine karşı kendisini korumasını, CAT aktivitesindeki artış ise, daha yüksek düzeyde peroksit seviyesinin varlığına işaret etmektedir (Fernandes ve ark., 2008).

1.11.1. Süperoksit Dismutaz

Reaktif oksijen türlerine karşı ilk savunma yolunu oluşturan (Sen ve ark., 2010; Sen ve ark., 2011) Süperoksit dismutaz; süperoksit radikalini (O_2.-) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) katalizleyen enzimatik bir antioksidandır. Oluşan hidrojen peroksit CAT ya da GPx ile ortamdan uzaklaştırılır (Young ve ark., 2001). İnsanlarda SOD'un üç formu bulunur. Bunlardan bakır

(Cu) ve çinko (Zn) içeren süperoksit dismutaz (Cu/Zn SOD) sitozolde, manganez (Mn) içeren süperoksit dismutaz (Mn SOD) mitokondride ve ekstrasellüler süperoksit dismutaz (EC SOD) hücre dışı sıvılarda bulunur (Sen ve ark., 2011; Young ve ark., 2001). Süperoksit dismutaz izoenzimlerinden ve hücrede en bol bulunan SOD formu olan sitozolik dimerik Cu/Zn SOD, 32 kDa molekül ağırlığına sahiptir ve iki eşit alt üniteden oluşur. Her bir alt ünitesinde bir Cu ve bir Zn atomu içermektedir (Mruk ve ark., 2002; Nordberg ve ark., 2001). Bir diğer SOD izoenzimi olan Mn SOD, 80 kDa molekül ağırlığına sahiptir. Mitokondriyal bir enzim olup dört eşit alt üniteye sahiptir. Aktif bölgesinde Mn^{+3} bulundurmaktadır. Farklılıklara rağmen Cu/Zn SOD ile aynı reaksiyonu katalizlemektedir (Fridovich ve ark., 1995; Orbea ve ark., 2000). Ekstrasellüler süperoksit dismutaz (EC SOD), 135,000 kDa? moleküler ağırlığa sahiptir. Fibroblast hücreleri, glia hücreleri ve endotel hücreleri tarafından salgılanmakta ve sentezlenmekte olan Ekstrasellüler süperoksit dismutaz, her bir alt ünitesinde enzimatik aktivite için gerekli bir Cu ve bir Zn atomu içermektedir. Ekstrasellüler süperoksit dismutazın öncelikli yeri ekstrasellüler matriks ve hücre yüzeyleridir. Bu bölgelerde plazmada bulunandan daha yüksek yoğunlukta bulunur. Akciğer dokusunda tip II epitel hücrelerinin ve solunum yolları ile kan damarlarını çevreleyen düz kas hücrelerinin yoğunluğuna bağlı olarak EC SOD sevileri yüksektir. Ekstrasellüler düzeyde enzimatik olarak O_2.-'leri etkisizleştirebilen tek antioksidan olması sebebiyle, EC SOD oksidan hasarı, yangı ve fibrozis gibi birçok akciğer hastalıklarından korunmada çok önemli bir role sahiptir (Gao ve ark., 2008).

1.11.2. Katalaz

Katalaz, her bir alt birimi bir hem grubu ve bir NADPH molekülü içeren dört protein alt birimden meydana gelir (Young ve ark., 2001, Kirkman ve ark., 1987). Birçok katalazda NADPH molekülü yüzeye yakın ve sıkıca bağlıdır (Zamocky ve ark., 1999). Hidrojen peroksitin, H_2O ve O_2'ye dönüşümünü katalize eden (Limon-Pacheco ve ark., 2009) katalaz, büyük ölçüde peroksizomlar gibi hücre içi organellerde ve daha az olarak mitokondri ve endoplazmik retikulumda bulunur. Süperoksit radikali, SOD aracılığıyla H_2O_2'ye dönüştürülür. Hidrojen peroksit bir radikal olmamasına ve biyolojik önemi olan moleküllerin çoğu ile reaksiyona girmemesine rağmen, Cu ve Fe iyonlarının katalizörlüğünde Fenton reaksiyonu ile en reaktif oksijen türü olan hidroksil radikali (OH.) oluşumunda bir ön madde olarak rol oynamaktadır (Cheung ve ark., 2001; Larson ve ark., 1988).

1.11.3. Glutatyon Peroksidaz

Hücrelerin sitoplazmasında bulunup H_2O_2'den kaynaklanan oksidatif hasara karşı hücreleri koruyan ve her bir alt birimi bir selenyum atomu içeren dört protein alt birimden oluşan Glutatyon peroksidaz; H_2O_2 'den OH.'nin oluşmasını engellemektedir (Sen ve ark., 2011). Glutatyon peroksidaz, elektron kaynağı olarak glutatyonu (GSH) kullanarak H_2O_2'yi ve organik hidroperoksitleri (lipit hidroperoksitler, DNA hidroperoksitler) metabolize eden bir enzimdir.

Glutatyon peroksidaz enziminin iki ana tipi bulunmaktadır. Bir tanesi aktif bölgesinde selenyum içeren selenyuma bağımlı glutatyon peroksidaz (Se-GPx)'dır. Bu enzim, H_2O_2 ve organik hiperoksitlere karşı etkilidir. Diğeri ise Selenyuma bağımlı olmayan glutatyon peroksidaz (GST), daha çok organik hidroperoksitlerin metabolize edilmesinde faaliyet göstermektedir (Cnubben, 2001; Reiter ve ark., 1995). Bu metabolize etme reaksiyonları sırasında GSH, hidrojen verici olarak hareket ettiğinden dolayı H_2O_2 ve hidroperoksitler indirgenirken GSH okside olmaktadır (Reiter ve ark., 1995). Okside glutatyon, glutatyon disülfittir (GSSG). Glutatyon redüktaz (GR) enzimi varlığında okside glutatyon redükte glutatyon haline geri indirgenmektedir. Bu indirgenme reaksiyonu esnasında GR elektron vericisi olarak NADPH'yi kullanmaktadır (Sen ve ark., 2011; Reiter ve ark., 1995).

1.11.4. Glutatyon Redüktaz

Flavin adenin dinükleotid (FAD) içeren flavoprotein bir enzim olan Glutatyon redüktaz (GR), NADPH'nin bir elektronunu okside glutatyonun disülfid bağlarına aktararak yeniden GSH'ye dönüştürülmektedir. Bu nedenle NADPH serbest radikal hasarını engellemek için gerekli ve en önemli kaynağı heksoz monofosfat (pentoz fosfat) yoludur (Sen ve ark., 2010; Özkan ve ark., 2004).

1.12. Nonenzimatik Antioksidanlar

Enzimsel olmayan antioksidanlar arasında glutatyon, melatonin, ürik asit, bilurubin, albümin, koenzim Q10, selenyum, α-lipoik asit, seruloplazmin ve transferrin sayılabilir (Sen ve ark., 2010; Pham-Huy ve ark., 2008; Sen ve ark., 2011; Valko ve ark., 2007; Droge ve ark., 2002; Willcox ve ark., 2004).

1.12.1. Glutatyon

Glutatyon, hemen hemen bütün ökaryotik hücrelerde sentezlendiğinden dolayı yüksek yoğunluklarda bulunur. Glutatyon bir antioksidan olarak hareket eder ve ayrıca hücrenin redoks halini korumada, detoksifikasyon sisteminin çalışmasında, hücre sinyal mekanizmasının düzenlenmesinde, gen ekspresyonunda ve apoptozisde de antioksidan olarak faaliyet göstermektedir (Townsend ve ark., 2003). Glutatyonun yaklaşık olarak %85-90'ı sitoplazmada bulunmasına rağmen bazen sitoplazmada sentezlendikten sonra mitokondri, çekirdek, peroksizomlar ve endoplazmik retikulumda da bulunabilmektedir (Green ve ark., 2006; Kalinina ve ark., 2014). Glutatyon, GPx'in katalitik etkisiyle lipit peroksitleri ve H_2O_2 'yi detoksifiye eder ya da singlet oksijen ve OH. 'yi temizler. GSH plazma membranından aminoasit transportunu sağlamakta ve bazı önemli antioksidanları yeniden oluşturmaktadır. Vitamin E ve vitamin C GSH tarafından düzenlenmektedir. Örneğin GSH direkt olarak vitamin E'nin tokoferol radikalini, dolaylı olarak da askorbatı semidehidroaskorbata indirgeyebilmektedir (Sen ve ark., 2011).

Bu çalışmanın amacı, farklı Ca^{+2} derişimlerine (15, 30 ve 90 mg/L) sahip olan tatlısularda Cu^{+2}'nin balıkların sistemleri üzerine olan etkileri incelenmiştir. Bunun için tatlısu balığı *O. niloticus* Cu^{+2}'nin akut (0,3 μM, 3 gün) ve kronik (0,03 μM, 30 gün) etkilerine maruz bırakılmış ve bunu takiben antioksidan ve ozmoregülasyon sistemlerinin verdikleri tepkiler özgün biyobelirteçler yardımıyla belirlenmiştir.

Bu çalışmada iki metabolik sisteme özgün biyobelirteçler aşağıda belirtildiği gibi analiz edildi;

1. Antioksidan sistemin bakır etkisine verdiği tepkileri belirlemek için karaciğer dokusunda SOD, CAT, GR, GST ve GPx gibi enzimlerin aktiviteleri ve farklı glutatyon moleküllerinin (GSH, GSSG, rGSH) düzeyleri ölçülürken GSH/GSSG oranı da hesaplanmıştır.
2. Ozmoregülasyon sistemin bakır etkisine verdiği tepkileri belirlemek için solungaç ve bağırsak dokusunda Na,K-ATPaz ile Mg-ATPaz, kas dokusunda Ca-ATPaz aktiviteleri olarak ölçüldü.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

McGeer ve ark. (2000), *O. mykiss*' in (Gökkuşağı alabalığı) sert suda kronik subletal Zn^{+2} - 250 µg/L, Cu^{+2} - 75 µg/L ve Cd^{+2} - 3 µg/L, etkisinde kalmasıyla balıklarda beslenme alışkanlığı, büyüme, yüzme performansı, iyon regülasyonu ve oksijen tüketimi parametrelerine bakmışlardır. Bakılan değerlerde metallerin etkisinde normalden sağma ya da bozulma ile birlikte bazı parametrelerde telafi mekanizmasının işleyerek stabilize olduğu görülmüştür. Beslenmede azalış – artış olmasına karşın, büyüme üzerinde bir etki görülmemiştir. Sadece bakır (Cu^{+2}) ile etkilenen balıklarda oksijen tüketimi artarken, yüzme hızı azaldığı görülmüştür. Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi solungaçlarda, Cd^{+2} ile etkilenen balıklarda değişiklik göstermezken, Cu^{+2} ile etkilenen balıklarda artış göstermiştir.

Paris-Palacios ve ark. (2000), Cu'nun yüksek derişimlerinin etkisine bırakılan *B. rerio*'nun karaciğerinde CAT enzim aktivitesinin arttığını saptamışlardır.

Romeo ve ark. (2000), *Dicentrarchus labrax* balıklarının böbrek dokusundaki CAT aktivitesi Cd etkisinde (500, 1000 ve 2000 ng/g) azalırken, Cu etkisinde (50, 250 ve 1000 ng/g) önemli bir değişiklik gözlenmemiştir.

Lopes ve ark. (2001), maden deşarjlarının olduğu yerlerden alınan *Leuciscus alburnoides*'in karaciğerinde GST aktivitesine bakmışlardır. Buradaki balıkların karaciğerinde GST aktivitesi, kontrol bölgesinden alınan örneklerle kıyaslayınca oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. Kirli yerden alınanlarda Cu'nun düzeyindeki artışa bağlı olarak GST aktivitesinde artış gözlenirken, bu artışın karaciğerde Cu'nun konsantrasyon yüksekliğine bağlı olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Varanka ve ark. (2001), Cu'nun akut toksik etkisi *Cyprinus carpio'*nun 48 saat maruz kalmasıyla ölçülmek istenmiştir. Karaciğerdeki GSH düzeyi kontrolle kıyaslanınca azalırken, karaciğer MDA düzeyi ile glukoz seviyesi ise artış göstermiştir.

Naddy ve ark. (2002), Rainbow trout, Daphnia magna ve Ceriodaphnia dubia'nın (tatlı su organizmaları) Cu toksisitesi üzerinde, Ca ve Mg'nin etkisini araştırmışlardır. Farklı derişimlerde Ca ve Mg çözeltileri bulunan ortamlarda elde ettikleri sonuçlar; Cu toksisitesine direncin Ca'nın fazla olduğu ortamlarda daha çok görüldüğü ve Mg'den daha fazla koruyucu etkiye sahip olduğu görülmüştür.

MacDonald ve ark. (2002), balık solungacında Ca^{+2} kanallarında Pb^{+2}'nin rekabetiyle Ca^{+2} iç dengesini bozduğunu açıklamışlardır.

Dautremepuits ve ark. (2003), *C. carpio*'yu 0.1-0.5 mg/L Cu etkisine (96 saat) süreyle bırakıp böbrek ve karaciğerde GST aktivitesinin kontrolle kıyaslandığında önemli oranda azaldığını göstermişlerdir.

Hamed ve ark. (2003), endüstriyel ve evsel atık suların deşarj olduğu Nil nehrinin farklı bölgelerinden tatlı su balıklarının (*Clarias lazera* /*O. Niloticus)*, karaciğer ve böbreklerinde antioksidan enzim aktivitelerine bakmışlardır. Kontrole göre kıyasla kirli bölgelerden alınan *O.*

niloticus dokularında (karaciğer ve böbrek) GR, GPx ve GST aktivitelerinin önemli düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir. Ayrıca *C. Lazera* dokularında (karaciğer ve böbrek) GST aktivitesinin kontrole göre düşük olduğu belirlenmiştir.

Lionetto ve ark. (2003), İtalya'da liman ve endüstri bölgelerinden toplanan *Mytilus galloprovincialis* ve *Mullus barbatus* dokularında AChE, GPx ve CAT biyomarkırlarına bakmışlardır. AChE aktivitesi *M. Barbatus'*ta GPx aktivitesiyle, *M. Galloprovincialis'*te ise CAT aktivitesiyle negatif bir ilişki ortaya çıkarmıştır. Oksidatif streste önemli etken olan ağır metal ve pestisit kirliliğinin, incelenen parametrelerde önemli değişikliklere yol açtığını bildirilmişlerdir.

Sancho ve ark. (2003), 0,22 mg/L derişimde herbisitin (tiyobenkarb) 96 saat etkisiyle *Anguilla anguilla*'nın (Yılan balığı) kas ve solungaç Mg^{+2}-ATPaz ve Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktiviteleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; solungaçtaTotal-ATPaz, Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz'ın herbisit etkisinde (2-12 saat) inhibe olurken, kasta da aynı şekilde ATPaz aktivitelerinin azaldığı gösterilmiştir.

Rogers ve ark. (2003), *O. mykiss*' de (gökkuşağı alabalığı) yapılan incelemede suda bulunan Pb^{+2}'nin Ca^{+2} homeostasisi ve Na^{+}/Cl^{-} dengesindeki etkileriyle birlikte iyon regülasyonunda bozulmalara neden olduğu ortaya konmuştur.

Dautremepuits ve ark. (2004), *C. carpio'* yu 0.1 - 0.25 mg/L Cu etkisine (8 gün) bırakıp metal birikimi ve GST aktivitesi araştırılmıştır. Kontrole göre 8. günde 4. güne karaciğerdeki GST aktivitesi daha yüksek düzeyde görülmüştür. Böbreklerde GST aktivitesi (0.1 mg/L Cu etkisinde) karaciğerdekinden daha yüksek gözlenmiştir.

Böbrekte herhangi bir değişiklik olmazken, karaciğerdeki toplam protein derişimi; kontrole göre 0.25 mg/L Cu derişiminde önemli oranda yüksek ölçülmüştür. Karaciğer CAT aktivitesinin artarken, böbrek CAT aktivitesi azaldığı görülmüştür.

Jee ve Kang (2005), *Pralichthys olivaceu'* na 4 hafta boyunca (0.5 - 1.0 - 2.0 μM) Phenanthrene uygulayıp glutatyon düzeyleri ve antioksidan enzim aktivitelerini incelemişlerdir. Böbrek, karaciğer ve solungaçta CAT, GST ve GR aktivitelerinin kontrole göre süre ve artan derişime bağlı olarak artış gösterdiği görülmüştür.

Manduzio ve ark. (2004), kirli bölgelerden (endüstriyel atık suların bırakıldığı) ve temiz bölgelerden alınan *Mytilus edulis*'in solungaçtaki GST aktivitelerini incelmişlerdir. Kontrole göre kirli bölgeden alınan solungaç dokularında GST aktivitesi önemli oranda yüksek gözlenmiştir.

Cicik ve ark. (2004), 7 ve 15 gün Pb^{+2}, Cd^{+2} ve Pb^{+2} + Cd^{+2}'nin *O. niloticus*'un karaciğer, böbrek, dalak, kas ve solungaçta birikim düzeylerini araştırmışlardır. Kontrole göre kıyasladıklarında dokularda metal birikiminin arttığı görülmüştür. 7 gün etkisinde kas ve böbrek dışındaki dokularda Cd^{+2} birikimi yönünden önemli farklılık görülmemesine karşın, en düşük düzeyde metal birikimi kasta olmuştur. Organ ve dokulardaki Cd^{+2} birikim düzeylerinin 15. gün sonunda en yüksekten düşüğe olacak şekilde böbrek, karaciğer, dalak, solungaç ve kas olduğu görülmüştür. Bu süre

sonunda Cd^{+2} birikimi, karaciğer ve böbrekte Pb^{+2} + Cd^{+2} karışımında artış göstermiştir. Kas ve dalakta değişim görülmezken, solungaçlarda azalış görülmüştür.

Ferreira ve ark. (2005), endüstriyel ve evsel atıkların arıtılmadan boşaltıldığı Portekiz'deki bir nehirden alınan balıklarda (*Platichthys flesus* ve *Mugil cephalus)* antioksidan enzim aktivitelerini araştırılmıştır. Karaciğerlerinde CAT ve SOD aktiviteleri düşük düzeyde sonuçlanırken, lipid peroksidasyonu oldukça yüksek düzeyde belirlenmiştir.

Monteiro ve ark. (2005), 40 - 400 µg/L Cu etkisine 21 gün bırakılan *O. niloticus*'un solungaçlarında, etki süresinin uzamasıyla Cu birikimi kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi üzerine Cu'nun inhibisyon etkisi olduğu görülmüştür.

Sanchez ve ark. (2005), 0, 25, 100 ve 200 µg/L Cu derişimlerinde toksik etki araştırması yapılan *Gasterosteus aculeatus*'ta (4, 8 ve 12 gün); artan süre ve derişime bağlı olarak Cu'nun karaciğerde birikiminde önemli artış görülmüştür. 4. - 8. günlerin sonunda kontrol grubuna göre Cu etkisinde karaciğerdeki GST aktivitesinde anlamlı değişiklik olmaz iken, total GSH'ta azalış, 12. gün sonunda ise artış görülmüştür. Bununla beraber deney başladıktan sonra balıklar Cu etkisinde oksidatif strese karşı antioksidan sistemlerini hızlıca aktive ettiklerini belirtmişlerdir.

Atlı ve Canlı (2007), *O. niloticus*'un 5 - 10 - 20 µM derişimlerindeki (14 gün) metal (Cd^{+2}, Zn^{+2}, Pb^{+2} ve Cu^{+2}) etkilerinde kas Ca^{+2}-ATPaz ile bağırsak ve solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitelerini ölçmüşlerdir. Solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi 20 µM'lık Pb^{+2} etkisinde artış gösterirken, diğer metallerin etkisinde inhibe olduğu görülmüştür. Cu^{+2} hariç diğer tüm metallerin etkisinde kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin inhibe olduğu görülmüştür. Ekotoksikoloji alanında metal derişimi ve tipine bağlı olarak enzim tepkisinde değişiklik görülebileceği ve bu tepkilerin metal kirliliğine duyarlı belirteç olacakları belirtilmiştir.

Craig ve ark. (2007), *Danio rerio* (zebra balığı) 7 gün boyunca yumuşak suya adapte edilmiş ve Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi ile birlikte farklı biyokimyasal parametreler sert suda yaşayanlarla kıyaslanmıştır. Tüm vücuttaki iyon düzeylerinde anlamlı bir fark görülmez iken, sert suya göre yumuşak sudaki iyon düzeyleri azalış göstermişlerdir. Araştırıcılar yumuşak suda solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin 3. güne kadar artış gösterdikten sonra 7. günde sert sudaki düzeye oldukça yaklaştığını göstermişler ve bunun balıkta iyon düzenleyici mekanizmadan kaynaklandığını öne sürmüşlerdir.

Cazenava ve ark. (2009), evsel, tarımsal ve endüstriyel atıkların deşarj edildiği Salodo nehrinden alınan *Prochilodus lineatus'*ta beyaz kan hücreleri kontrole göre daha yüksek düzeyde iken, hemoglobin konsantrasyonu daha düşük düzeyde ölçülmüştür. Total protein ve plazma glukoz düzeyleri kontrole göre önemli oranda artış göstermiştir. Solungaçta GR ve GST aktiviteleri kirli ve kontrol bölgesinden alınanlara göre farklılık göstermez iken, böbrek ve karaciğerdeki GR ve GST aktiviteleri kontrole göre artış göstermiştir. Solungaç, böbrek ve karaciğerdeki lipid peroksidasyonu düzeyi kontrole göre daha yüksek bulunmuştur. Araştırmacılar balıkların çevresel stres faktörleri

altında yaşamlarını sürdürmelerine bağlı olarak, ölçülen parametreler arasında farklar görüldüğünü açıklamışlardır.

Dautremepuits ve ark. (2009), oksidatif stres biyomarkırlarını incelemek için şehrin atık sularının boşaltıldığı St. Lawrance nehrinde, kirliliğin farklı düzeyde olduğu yerlerden alınan *Perca flavescens'*in böbrek ve solungaçlarına bakılmıştır. Kirli yerlerden (özellikle Cu ve diğer metallerin yoğun olduğu) alınan balıklarda, kontrole göre solungaç GST aktivitesi düşük düzeyde iken, böbrekteki GST aktivitesi daha yüksek düzeyde ölçülmüştür. Böbrekte GR, CAT, lizozim ve seruloplazmin aktiviteleri ise kontrole göre daha yüksek düzeyde görülmüştür.

Ebrahimpour ve ark. (2010), Zn^{+2} ve Cu^{+2}'nun sertlik düzeyi 40, 150 ve 380 mg $CaCO_3$/L olan sularda *Capoeta fusca*'ya olan etkisine bakmışlardır. Su sertliği arttıkça metallerin toksik etkilerinde azalış görülmüş ve bu verilerle metallerin (Zn^{+2} ve Cu^{+2}) yumuşak suda sert suya oranla daha toksik oldukları görülmüştür.

Pereira ve ark. (2010), Obidos lagününde metal kirliliğinin lipid peroksidasyonu, GSH düzeyi ve GST aktivitesi üzerine etkisi *Liza aurata'*da araştırılmıştır. Kontrol balıklarına göre, kirliliğin yoğun olduğu yerlerden alınan balıklarda böbrek ve karaciğer lipid peroksidasyonun ve GST aktivitesinin daha yüksek olduğu görülmüştür. GSH düzeyi ise karaciğer dokusunda azaldığı, böbrek dokusunda arttığı belirlenmiştir.

Mansouri ve Baramaki (2011), *C. Fusca*'da akut Hg^{+2} toksisitesi üzerinde su sertliği ve pH'nın etkisini görmek için farklı sertlikteki (0,118, 0,154 ve 0,180 mg Ca^{+2}/L) sulara bırakılmışlardır. Hg^{+2} toksisitesinin pH ve su sertliği arttıkça azaldığı görülmüştür.

Doğan ve ark. (2015), Ca^{+2}, Pb^{+2} ve Ca^{+2}+Pb^{+2} etkisine akut (48 saat, 20 µM Pb^{+2}) ve kronik (14gün, 10 µM Pb^{+2}) olarak bırakılan *O. niloticus'*un solungaç-bağırsak dokusu (Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve ve Mg^{+2}-ATPaz) ve kas dokusu (Ca^{+2}-ATPaz) enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Deney sonunda metal derişimine (Pb^{+2} ve Ca^{+2}), süre ve doku tipine göre enzim aktivitelerinde önemli değişimler gözlenmiştir. ATPaz aktiviteleri, yüksek Ca^{+2} derişimindeki kontrol balıklarında düşük Ca^{+2} etkisindeki balıklara oranla daha yüksek görülmüştür. Metal etkisinde (Ca^{+2}+Pb^{+2}) balıkların ATPaz aktivitelerinde artış ya da azalış gözlenirken, sadece Ca^{+2} etkisindeki balıklarda artış gözlenmiştir. Solungaçtaki enzim aktiviteleri genelde benzer tepkiler gösterirken, Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi her iki etki süresinde de birbirine zıt tepkiler vermiştir.

Doğan ve ark. (2014), *O. niloticus*'u yumuşak su (80 mg $CaCO_3$) ve sert su (320 mg $CaCO_3$) ortamlarında Cu ve Cr etkisine bırakmışlardır (20 µM- 48 saat- 10 µM 144 saat). Bu süreler sonunda karaciğer antioksidan enzim aktiviteleri (SOD, CAT, GPX, GR ve GST) ve glutatyon (GSH) düzeylerini ölçmüşlerdir. Yumuşak suda bulunan kontrol grubu balıklarda SOD ve CAT aktivite değerleri, sert sudaki kontrol grubu balıklarınkinden önemli düzeyde düşük bulunmuştur. Bununla birlikte glutatyon mekanizması her iki kontrol grubunda da su sertliğinden etkilenmemiştir. Akut metal etkileri glutatyon metabolizmasını değiştirmemiştir, buna karşın yumuşak uda SOD aktivitesi ve her iki suda CAT aktivitesi önemli düzeyde değişmiştir. Subkronik süreçte Cu etkisi GST

aktivitesi ve GSH düzeyi hariç ölçülen parametrelerde önemli azalışlara sebep olmuştur. Benzer şekilde GST aktivitesi ve GSH düzeyi Cu'dan etkilenmemiştir.

Doğan ve ark. (2015), farklı Ca^{+2} derişimlerinde Pb^{+2} etkisine kalan tatlısu balığı *O. niloticus*'un 15, 30 ve 60 mg Ca^{+2}/L içeren ortamlarda Pb^{+2} etkisine akut (48 saat, 20 µM Pb^{+2}) ve kronik (14gün, 10 µM Pb^{+2}) olmak üzere iki farklı protokol ile sürdürmüşlerdir. Deneyler sonunda solungaç ve bağırsak dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz ile kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktiviteleri ölçülmüşlerdir. Akut süreçte, sadece Ca^{+2} etkisinde kalan balıklarda ATPaz aktivitelerinde artış görmüşlerdir. Ca^{+2} ve Pb^{+2}'nin birlikteki etkisine kalanlarda düşük Ca^{+2} derişimlerinde ATPaz aktivitelerinde artış görülürken, yüksek Ca^{+2} derişimlerinde azalış görmüşlerdir. Kronik süreçte, sadece Ca^{+2} etkisinde kalan balıklarda ATPaz aktivitelerinde hem artış hem azalış görülmüştür. Ca^{+2} ve Pb^{+2}'nin birlikteki etkisine kalanlarda sadece düşük Ca^{+2} derişimlerinde ATPaz aktivitelerinde artış görmüşlerdir.

Canlı ve ark. (2016), farklı sertlikteki sularda (15, 30 ve 90 mg/L Ca^{+2}) akut (0.3 µM Cu) ve kronik (0.03 µM Cu) metal etkisine bırakılan *O. niloticus* eritrositlerinde ATPaz aktivitelerini incelemişlerdir. Her iki etki süresinde de 30 mg/L sertlikteki metal etkisindeki Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi kontrole kıyasla bir artış göstermiştir. Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise akut metal etkisinde 3 sertlik derişiminde de anlamlı artış gösterirken kronik süreçte sadece 90 mg/L Ca sertliğinde artış gözlenmiştir.

Çoğun ve ark. (2016), *Oreochromis niloticus*'un karaciğer, solungaç ve kas dokularında bakır birikimi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Balıklar 5, 10 ve 15 gün sürelerle 1.0 mg/L Cu, 1.0 mg/L Cu+1.0 mg/L Ca, 1.0 mg/L Cu+0.1 g/L Zeolite karışımının etkisine bırakılmıştır. Çalışılan dokularda bakır derişimi etkis süresinin uzamasına bağlı olarak artmıştır. En yüksek bakır birikimi sırasıyla karaciğer solungaç ve kas dokusu şeklinde olmuştur. Etki süresinde, *O. niloticus*'un dokularında bakır birikimi kalsiyum ve zeolitin varlığında azalış göstermiştir. Çalışma sonuçları göstermiştir ki bakır birikimi zeolit ve kalsiyum tarafından azaltılmış ve önemli bir koruyucu etki yapmıştır.

Eroğlu ve ark. (2017), *O. niloticus*'u Cr, Ni, Zn ve Hg' nın iki farklı derişiminin etkisine 30, 60 ve 90 mg/L Ca sertliklerindeki sularda akut ve kronik etki sürelerinde farklı dokulardaki (solungaç, bağırsak ve kas) ATPaz aktivitelerini ölçmüşlerdir. Etki süreleri sonunda farklı sertliklerde metal etkilerinin de farklı olduğu görülmesiyle beraber, 30 mg/L Ca+metal etkisinde ATPaz aktivitelerinde anlamlı azalışlar gözlenirken, 60 ve 90 mg/L Ca sertliklerindeki sularda genel olarak metal etkisinde ortadan kalkmıştır. Her iki etki süresinde metal etkisinden en az etkilenen doku kas dokusu olmuştur. Solungaç ise diğer dokulara oranla Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin en fazla etkilendiği doku olmuştur.

Atlı (2018), *Oreochromis niloticus*'u farklı Ca^{+2} düzeylerinde (15, 30 ve 90 mg Ca^{+2}/L) akut süreçte 30 µM Ni^{+2} ve 0.3 µM Hg^{+2}, kronik süreçte 10 µM Ni^{+2} ve 0.03 µM Hg^{+2} etkisine bırakmıştır. Deney süreleri sonunda beyinde ATPaz aktivitelerine (Total-ATPaz, Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Mg^{+2}-

ATPaz) ve AChE aktivitelerine bakılmıştır. Yalnızca Ca etkisine bırakılanlarda aktivitede azalma olmasına rağmen Ca derişimine bağlı olarak Hg^{+2} ve Ni^{+2} etkisinde de değişimler olmuştur. Aktivitelerde azalma, yüksek Ca^{+2} etkisinde bırakılanlarda bile akut metal etkisinden sonra görülmüştür. AChE aktivitesindeki değişikliklerin çoğu Hg etkisinde olmasına karşın, ATPaz aktivitelerinde de değişken farklılıklar olmuştur. ATPaz ve AChE aktivitesi hem metal tipinden hem de Ca^{+2} konsantrasyonundaki farklılıklardan etkilenmiştir. Fakat ATPaz aktiviteleri daha da etkilenmiştir. Aktivitelerdeki değişiklikler, hayati önemi olan bu enzimlerin çevresel faktörlere karşı hassas olduğunu göstermiştir.

Firidin (2019), *Oreochromis niloticus*'un kas dokusunda glutatyon S-transferaz aktivitesi ile glutatyon ve protein miktarı üzerine bakır ve bakırın kalsiyum karışımlarının etkisini incelemiştir. Balıklar 7, 14 ve 28 günlük sürelerle 0,1, 0,5 ve 1,0 ppm Cu ile kalsiyum karışımlarının 0,1 ppm Cu+1,0 ppm Ca, 0,5 ppm Cu+5,0 ppm Ca, 1,0 Cu ppm+10,0 ppm Ca etkisine maruz kalmışlardır. Kas glutathione S-transferaz aktivitesi bakır ve bakırın kalsiyum karışımlarının etkisinde deney süresince kontrole göre azalmıştır. Çalışma sonuçları bakır ve bakırın kalsiyum karışımlarının *O. niloticus*'un kas dokusunda glutathione S-transferaz aktivitesinde önemli değişiklilere sebep olmuştur. Bu değişiklikler bakırın kalsiyum karışımlarının etkisinde bakırın tek başına etkisine göre daha az olmuştur.

Gopi ve ark. (2019), *O. niloticus*'u 3 test grubunda akut (30 gün) ve kronik (60 gün) olarak incelemişlerdir: ilk grup kontrol olarak (su içerisinde Cu^{+2} olmadan) kullanıldı, ikinci ve üçüncü gruplardaki sular sırasıyla 40 µg/L ve 400 µg/L Cu^{+2} içermekteydi. Cu^{+2}'ye kronik olarak maruz kalan balıklarda deney süresi boyunca herhangi bir ölüm görülmedi. Fakat Cu^{+2} etkisinde kaldıktan sonra, etkide kalan balıkların büyümesi kontrol grubuna (su içerisinde Cu^{+2} olmadan) göre daha fazla etkilenmiştir. Aynı zamanda karaciğer dokusunda Cu^{+2} birikimi kontrol grubuna göre kıyaslayınca solungaç dokusundakinden daha fazlaydı. Cu^{+2} etkisinde kalan balıkların solungaç ve karaciğer dokularındaki antioksidan enzimleri SOD, CAT, GPx ve GST) kontrol grubuna göre kıyaslandığında anlamlı bir azalış göstermiştir. Enzimatik olmayan antioksidanlardan GSH ve MT, kontrol grubuna göre kıyaslandığında, Cu^{+2} etkisinde kalan balıkların solungaç ve karaciğer dokularında anlamlı artış göstermiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Metaller

Bakır klorür dihidrat [$CuCl_2.2H_2O$]

Kimyasallar

Çizelge 3.1. ATPaz Aktivite Ölçümünde Kullanılan Kimyasallar

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-aminoetileter)-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)

Çizelge 3.2. Antioksidan Enzim Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Kimyasallar

Antioksidan Enzim Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Kimyasallar
Hypoxanthine ($C_5H_4N_4O$, Sigma)
Cytochrome c (Sigma)
Xanthine oxidase (Sigma)
NADPH (Sigma)
Glutathion S- transferase (Sigma)
CHP
Metanol
Vinil piridin
CDNB (Sigma)
Hidrojen peroksit (H_2O_2, Merck)
Sodyum sitrat ($C_6H_5Na_3O_7$, Merck)
Sodyum klorür (NaCl, Merck)
Na_2EDTA (Merck)
Potasyum hidroksit (KOH, Merck)
Fosforik asit (H_3PO_4, Merck)
Redükte glutatyon (Sigma)
Okside glutatyon (Sigma)
Glutatyon redüktaz (Sigma)
1-kloro-2,4-dinitro benzen (Merck)
Potasyum klorür (KCl, Merck)
Trizma-Base (Tris [hidroksimetil] aminometan); $C_4H_{11}NO_3$, Sigma)
Metafosforik asit (HPO_3, Merck)
Etanol (C_2H_6O, Merck)
Hidroklorik asit (HCl, Merck)

Çizelge 3.3. Protein Analizinde Kullanılan Kimyasallar

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)

Çizelge 3.4. Kalsiyum ve Sertlik Tayininde Kullanılan Kimyasallar

Kalsiyum ve Sertlik Tayininde Kullanılan Kimyasallar
EDTA (Etilendiamintetraasetikasit, Merck)
Sodyum hidroksit (NaOH, Merck)
Kalsiyum klorür ($CaCl_2.6H_2O$, Merck)
Hidroklorik asit (HCl % 37, Merck)
Kalsiyum karbonat (Çökelti) ($CaCO_3$, Merck)
Amonyum klorür (NH_4Cl, Merck)
Eriochrome Black T. (Merck)
Müreksit (Ammonium purpurate, Merck)
Sodyum klorür (NaCl, Merck)

Çizelge 3.5. Kullanılan Aletler

Kullanılan Aletler
Spektrofotometre: Schimadzu UV-1800
Derin dondurucu (- 80 ^{o}C): 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

3.2. Yöntem

Bu çalışmada kullanılan tatlı su balıkları (*O. niloticus)* Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'nin balık yetiştirme havuzlarından alınmıştır. 12 saatlik aydınlatma ve ortam sıcaklığının 20±1 ^{0}C olduğu laboratuvar şartlarında standart ölçüye (40 x 40 x 100 cm) sahip akvaryumlara 100 L Nestle Pure Life marka doğal kaynak suyunda bir ay süre ile yeni koşullara adaptasyonları sağlanmıştır. Adaptasyon ve deneyler sırasında kullanılan akvaryum sularındaki fizikokimyasal değerler Çizelge 3.6.'da gösterilmiştir. Bu süreçler içeresinde, bütün balıklar günde sadece 1 kez hazır balık yemi pelletleri ile (Pınar Balık Yemi, İzmir, pellet No, 2) ağırlıklarının %2-3'ü olacak şekilde beslenmişlerdir. Bu balık yemindeki makro ve mikro element miktarları aşağıdaki çizelgelerde (Çizelge. 3.7-3.8) verilmiştir.

Çizelge 3.6. Deney ortamının fizikokimyasal özellikleri (Art ort. ± S.D., N=72)

Özellik	**0 mg Ca^{+2}/L**	**30 mg Ca^{+2}/L**	**90 mg Ca^{+2}/L**
pH	6,83±0,01	6,73±0,01	6,63±0,07
İletkenlik (µS/cm**)**	77,3±0,5	163±1,3	329±3,02
Toplam Sertlik (mg $CaCO_3$/L)	105,4±20,8	194±12,3	318±13
Alkalinite (mg $CaCO_3$/L)	76,2±13	77,5±5,2	76,3±5,6
Sıcaklık (C°)	23,3±0,05	23,3±0,08	23,3±0,05

Çizelge 3.7. Balık Yeminde Bulunan Mikro Elementler

Balık Yeminde Bulunan Mikro Elementler
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

Çizelge 3.8. Balık Yeminde Bulunan Makro Elementler

Balık Yeminde Bulunan Makro Elementler
en az % 2-en çok % 2,5 Ca^{+2}
en az % 0,2-en çok % 1 Na^+
en az % 1 P
ham protein ise en az % 40

Deneyler sürecinde farklı özelliklere sahip olan suların çeşitli fizikokimyasal ölçümleri Thermo Orionstar 5 çoklu ölçüm cihazı ile yapılmıştır. Sertlik ölçümleri ise titrasyon metoduna göre yapılmıştır. Bu çalışmada, çok yumuşak su olması bakımından Uludağ kökenli olan Nestle Pure Life kaynak suları kullanılmıştır. Bu suya ait diğer ölçümler Çizelge. 3.9 da verilmiştir.

Çizelge 3.9. Nestle Pure Life İz Element ve İyon Derişimleri

Nestle Pure Life İz Element ve İyon Derişimleri
Al 4 µg/l
NH_4^+ <0.02 mg/l
Cl 1.2 mg/l
Fe <1 µg/l
Mn <1 µg/l
SO4 7 mg/l
Na 1.265 mg/l

Suyun Ca^{+2} düzeyleri Calgon yöntemine göre belirlenmiştir. Buna göre Nestle Pure Life kaynak suları düşük kalsiyum (15 mg Ca^{+2}/L) düzeyine sahip olduğundan çok yumuşak su grubuna girmektedir. Temel olarak alınan bu kaynak suyuna hiç eklenmeden doğrudan kullanıldığından Ca0 kontrolü olarak adlandırmıştır. Bu suya 15 mg Ca^{+2}/L eklenerek Ca1 kontrolü (30 mg Ca^{+2}/L) ve 75 mg Ca^{+2}/L 90 eklenerek Ca2 kontrolü (90 mg Ca^{+2}/L) elde edilmiştir. Böylece 3 farklı Ca^{+2} düzeylerine ait kontroller elde edilmiş olup, her grup kendi kontrolü ile karşılaştırılmıştır.

Yapılan deney sürecinde balıklar standart ölçüdeki akvaryumlarda (33x33x40 cm) 6'şar adet olacak şekilde yerleştirilmiştir. Deneyde yalnızca Ca etkisi (Ca0, Ca1, Ca2) ile 0,3 µM (akut) ve 0,03 µM (kronik) derişimlerindeki bakır ~~klorür dihidrat~~ ($CuCl_2.6H_2O$) (Ca0+Cu, Ca1+Cu ve Ca2+Cu) etkisine 3 gün (akut) ve 30 gün (kronik) 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.

Uygulanan deney süresi sonrasında akvaryumdan alınan balıklar spinal hale getirilmiştir. Kurutma kağıdıyla kurulanıp, boyları ve ağırlıkları en yakın cm ve g cinsinden ölçülmüştür. Balıkların ortalama boy ve ağrılıkları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir. Farklı deney grupları arasında balık boy ve ağırlık bakımından istatistiksel olarak bir ayırım gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Çizelge 3.10. Balıkların ortalama boy ve ağrılıkları

Balıkların Ortalama Boy ve Ağırlıkları	**0 mg Ca^{+2}/L**	**30 mg Ca^{+2}/L**	**90 mg Ca^{+2}/L**
Boy	15,2±1,15 cm	16,1±1,74 cm	15,0±1,8 cm
Ağırlık	59,2±11 g	69±18,2 g	53,5±24 g

Solungaç, kas, bağırsak ve karaciğer dokuları steril ekipmanlar kullanılarak alınmış olup, -80 ^{0}C'de aktivite ölçümü için homojenize edilene kadar saklanmışlardır. ATPaz aktiviteleri için solungaç, bağırsak ve kas dokuları homojenizasyon tamponu ile 1,5 dk süreyle 9500 rpm'de buz üzerinde homojenize edilmiştir. Homojenizasyon tampon içeriği; 20 mM Trizma-Base, 250 mM

Sükroz ve pH'si 7,8 olan EDTA'dan oluşmaktadır. Dokular 1/10 oranında homojenizasyon tamponu ile homojenize edilmiştir. Dokular homojenize olduktan sonra ependorf tüplere aktarılarak santrifüj (13.000 g, 20 dk, +4 ^{0}C) edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantlar protein tayini ve ATPaz ölçümlerinde kullanılmıştır. Dokulardaki ATPaz aktivitesi Atkinson ve ark. (1973) kullandığı inorganik fosfat analizi yöntemi ile total protein düzeyi ise Lowry ve ark. (1951) kullandıkları yönteme göre belirlenmiştir. Karaciğer 100 mM fosfat tamponu ile 1-2 dk süre ile 9500 rpm'de buz üzerinde homojenize edilmiştir. Fosfat tamponu 1 mM EDTA ve 100 mM KCl içermektedir. Karaciğer dokuları 1/10 oranında fosfat tamponu ile homojenize edilmiştir. Dokular homojenize olduktan sonra ependorf tüplere aktarılarak santrifüj (10.000 g, 30 dk, +4 ^{0}C) edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantlar antioksidan enzim aktivite ölçümlerinde kullanılmıştır. Dokulardaki SOD aktivitesi McCord ve Fridovich (1969), CAT aktivitesi Beutler (1984), GST aktivitesi Habig ve ark. (1974), GP_X aktivitesi Livingstone ve ark. (1992), GR aktivitesi Carlberg ve Mannervik (1975), GSH ve GSSG düzeyi Griffith (1980) kullandıkları yöntemlere göre belirlenmiştir.

ATPaz aktivitelerini ölçerken, daha önce laboratuvarımızda yapılmış olan karakterizasyon çalışmasından elde edilen enzim aktivitelerinin en yüksek görüldüğü inkübasyon ortam derişimleri kullanılarak yapılmıştır (Atlı ve Canlı, 2008c) (Çizelge 3.11.).

Çizelge 3.11. 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
^{o}C	37	37-40	37

Ouabain içermeyen Total-ATPaz aktivitesinden ouabain içeren Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin çıkarılmasıyla Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi elde edilmektedir. $CaCl_2$ varlığında ve yokluğunda ölçülen enzim aktiviteleri arasındaki fark da Ca^{+2}-ATPaz aktivitesini vermektedir. µmol Pi/mg prot./sa. cinsinden enzim aktiviteleri ifade edilmektedir.

3.2.1. İnorganik Fosfat Tayini

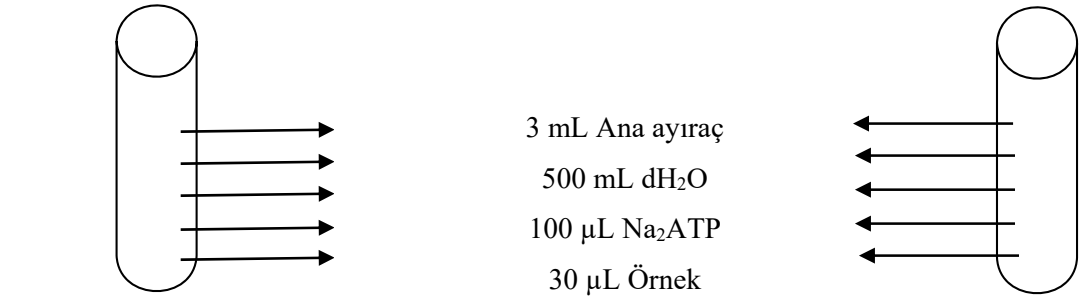
ATPaz aktivitesinin tayini, ATP'nin ADP'ye dönüşümünde açığa çıkan inorganik fosfatın (Pi), Polioksietilen 10 Lauril eter ile fosfomolibdatın oluşturduğu sarı renkli bileşiğin absorbansının 390 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Atkinson ve ark., 1973).

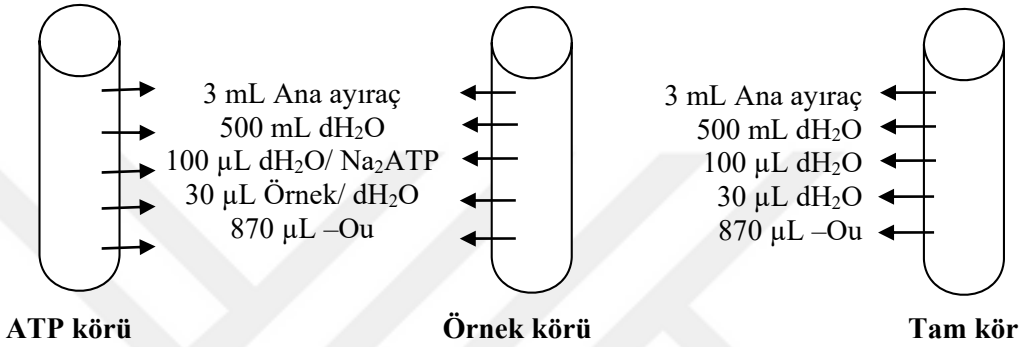
Ayıraçlar;

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.

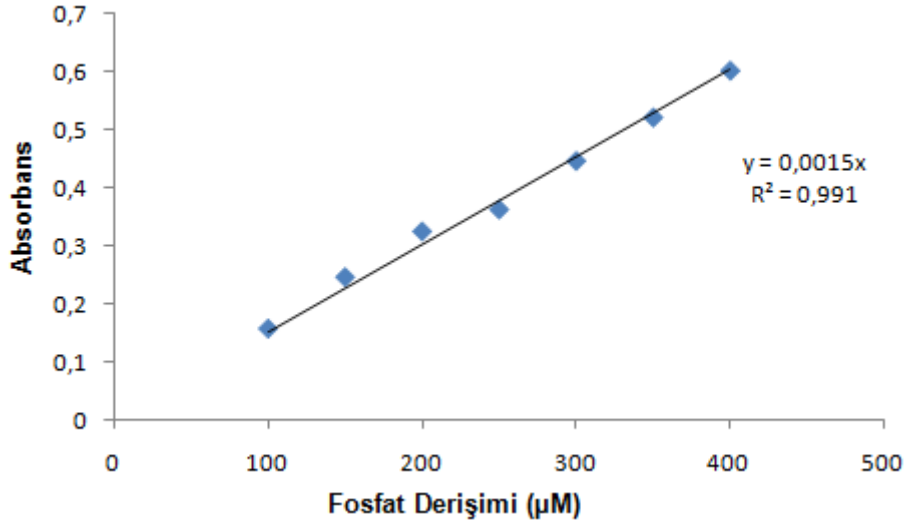
Deneyin Yapılışı;

1. 870 µL –Ou/+Ou inkübasyon ortamlarından tüplere konur.
2. Üzerine 30 µL örnek konur. (5 dakika su banyosunda bekletilir)
3. 100 µL ATP su banyosundayken konur.
4. 30 dakika reaksiyon oluşumu için su banyosunda beklenir.
5. 500 mL soğuk dH_2O eklenir.
6. 3 mL ana ayıraç eklendikten sonra 10 dakika daha beklenir (Şekil 3.1.).
7. Absorbans değerleri 390 nm'de ölçülür.
8. Sonuçlar 100, 150, 200, 250, 300, 350 ve 400 µM KH_2PO_4 çözeltisinden hazırlanarak elde edilen standart eğri üzerinden değerlendirilmiştir (Şekil 3.2.)





Şekil 3.1. ATPaz aktivite ölçümlerinin şematik görüntüsü.



Şekil 3.2. Fosfat derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki.

3.2.2. ATPaz Aktivitesinin Hesaplanması

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

= µmol Pi/mg prot./sa.

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

0,3 µM Cu^{+2} etkisinde 2 nolu *O. Niloticus*'un solungacında 3 gün (akut) süre sonunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi:

Absorbans: y = 0,05

$$Na^{+}/K^{+}\text{-ATPaz aktivitesi} = \frac{0,05/0,0015 \text{ x } 4,5 \text{ (mL)}}{1000 \text{ x } 0,03 \text{ (mL) x } 0,5 \text{ (sa.) x } 2,54 \text{ mg prot./mL}}$$

Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi = 5,71 µmol Pi/mg prot./sa

3.2.3. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Ölçümü

Karaciğer 100 mM fosfat tamponu ile 1-2 dk süre ile 9500 rpm'de buz üzerinde homojenize edilmiştir. Fosfat tamponu 1 mM EDTA ve 100 mM KCl içermektedir. Karaciğer dokuları 1/10 oranında fosfat tamponu ile homojenize edilmiştir. Dokular homojenize olduktan sonra ependorf tüplere aktarılarak santrifüj (10.000 g, 30 dk, +4 ^{0}C) edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantlar antioksidan enzim aktivite ölçümlerinde kullanılmıştır. Dokulardaki SOD aktivitesi McCord ve Fridovich (1969), CAT aktivitesi Beutler (1984), GST aktivitesi Habig ve ark. (1974), GP_X aktivitesi Livingstone ve ark. (1992), GR aktivitesi Carlberg ve Mannervik (1975), GSH ve GSSG düzeyi Griffith (1980) kullandıkları yöntemlere göre belirlenmiştir.

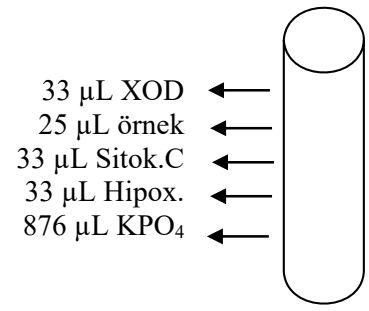
Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçümü

Süperoksit radikalinin (O_2^{-}); H_2O_2 ve O_2'ye dönüşümünü katalizleyen enzim süperoksit dismutazdır. Reaksiyonun formülize hali aşağıdaki gibidir. Süperoksit radikalleri, ksantin ve ksantin oksidaz (XOD) bulunan ortamda oluşmakta ve bu radikaller 2-(4- iyodofenil)-3(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolyum klorid ile reaksiyona girerek kırmızı renkli formazon bileşiği meydana getirmektedir. SOD aktivitesi, oluşan formazon bileşiğinin inhibisyonunun 550 nm dalga boyunda kinetik olarak 0 ve 1. dakikalarda spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmesi esasına dayanmaktadır (McCord ve Fridovich, 1969).

$$2\ O_2^{-} + 2\ H^{+} \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

Deneyin yapılışı;

1. 876 µL Fosfat tamponu (50mM-pH 7.8 KPO_4)
2. tüplere konur.
3. Üzerine 33 µL Hipoksantin (1.5 mM) konur.
4. 33 µL Sitokrom C (0.30 mM) eklenir.
5. 25 µL Örnek eklenir. Beklenir.
6. 33 µL XOD (56.6 mU/mL) eklenir.



7. Bekletmeden hemen 550 nm'de 0-1 dakika arasında kinetik ölçüm yapılır.

SOD aktivitesinin hesaplanması;

Net absorbans= 0 ile 1 dakika ölçümleri arasındaki farktır.

% İnhibisyon= Kör- Net absorbans/ Kör

V_t= Toplam hacim

$V_ö$= Örnek hacmi

SOD aktivitesi formülü;

$$\frac{\%\ inh.}{50} \times \frac{1\ U}{mL} \times \frac{V_t}{V_ö} \times \frac{1}{mg\ prot/mL} = Unit/\ mg\ prot$$

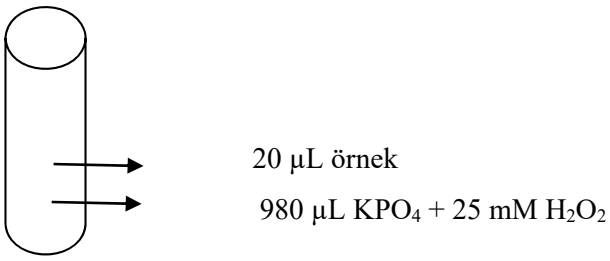
Katalaz (CAT) Aktivitesi Ölçümü

Katalaz'ın H_2O_2'yi parçalayıp H_2O'ya dönüştürme hızının 240 nm dalga boyunda kinetik olarak 0 ve 1. dakikalarda spektrofotometrede ölçülmesi esasına dayanır. H_2O_2 240 nm dalga boyunda ışığı absorbe etmektedir. Absorbanstaki azalma H_2O_2'nin ortamda azaldığını göstermektedir. Katalaz aktivitesinin hesaplanmasında 240 nm'de H_2O_2 ekstinksiyon katsayısı elde edilmektedir ve bu değer katalaz aktivitesinin hesaplanmasında kullanılmaktadır (Beutler, 1984).

$$2\ H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2\ H_2O + O_2$$

Deneyin yapılışı;

1. 980 µL Fosfat tamponu (75mM-pH 7.0 KPO_4) tüplere konur.
2. 25 mM H_2O_2 eklenir.
3. 20 µL örnek eklenir.
4. Bekletmeden hemen 240 nm'de 0-1 dakika arasında kinetik ölçüm yapılır.



CAT aktivitesinin hesaplanması;

OD= 0 ile 1 dakika ölçümleri arasındaki farktır.

V_t= Toplam hacim

$V_ö$= Örnek hacmi

t= Zaman

0,0392= H_2O_2'nin 240 nm'deki ekstinksiyon katsayısı

CAT aktivitesi formülü;

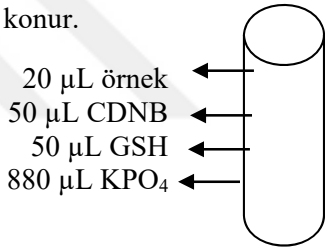
$$\frac{OD\ (Ör.\text{-}Kör) \times V_t}{0{,}0392 \times V_ö \times t \times (mg\ prot./mL)} = \mu mol\ H_2O_2/mg\ prot./dk$$

Glutatyaon S-Transferaz (GST) Aktivitesi Ölçümü

GSH'a bağlı tiyol grubunun (SH) elektrofilik bileşiklerle tepkimeye girmesini katalizlemek ile görevli enzim Glutatyon S-transferaz'dır. GST aktivite ölçümü GSH ve 1-kloro-2,4-dinitrobenzenin (CDNB) konjugasyonu sırasında meydana gelen absorbansın spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda okunması esasına dayanmaktadır (Habig ve ark., 1974). Aşağıda GST aktivitesini ölçmek için gerekli olan çözeltiler, kör ve örnek miktarları gösterilmektedir.

Deneyin yapılışı;

1. 880 µL Fosfat tamponu (100mM-pH 7.4 KPO_4) tüplere konur.
2. 50 µL GSH (20mM) eklenir.
3. 50 µL CDNB (20mM) eklenir.
4. 20 µL örnek eklenir.
5. 340 nm'de 0-1 dakika arasında kinetik ölçüm yapılır.



GST aktivitesinin hesaplanması;

OD= 0 ile 1 dakika ölçümleri arasındaki farktır.

Vö = Örnek hacmi

Vt = Toplam hacim

9.6 = 20 mM CDNB'nin 1 cm'lik ışık yolunda verdiği OD değeri

GST aktivitesi formülü;

$$\frac{OD\ (Ör.\text{-}Kör) \times V_t}{9.6 \times V_ö \times t \times (mg\ prot./mL)} = \mu mol\ /mg\ prot./dk$$

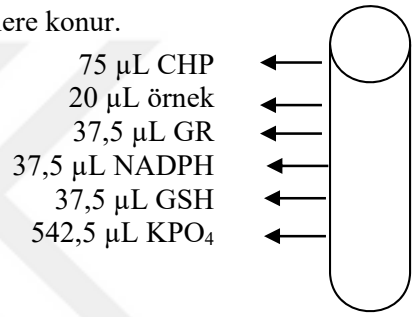
Glutatyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesi Ölçümü

T-bütil hidroperoksit bulunan ortamda glutatyonun (GSH) okside glutatyona (GSSG) oksidasyonu gerçekleştiren enzim Glutatyon peroksidaz'dır. Okside glutatyonun tekrar GSH'a indirgenmesi için glutatyon Redüktaz (GR) ve NADPH gerekmektedir. Bu yönteme göre GPx aktivitesinin ölçümü için NADPH'ın $NADP^+$'ye oksidasyonu gerekmektedir. Bu reaksiyonda meydana gelen kompleksin absorbansının 340 nm dalga boyunda okuma yapılması ile aktivite ölçümü yapılmaktadır (Livingston ve ark., 1992).

$$2GSH + H_2O_2 \xrightarrow{GP_x} GSSG + H_2O$$

Deneyin yapılışı;

1. 542,5 µL Fosfat tamponu (100mM-pH 7.4 KPO_4) tüplere konur.
2. 37,5 µL GSH (40mM) eklenir.
3. 37,5 µL NADPH (2.4mM) eklenir.
4. 37,5 µL GR (40 units) eklenir.
5. 20 µL örnek eklenir.
6. 75 µL CHP (30mM) eklenir.
7. 340 nm'de 0-1 dakika arasında kinetik ölçüm yapılır.



GP_X aktivitesinin hesaplanması;

OD= 0 ile 1 dakika ölçümleri arasındaki farktır.

Vö = Örnek hacmi

Vt = Toplam hacim

6.22 = 1 µmol NADPH'ın 1 cm'lik ışık yolunda verdiği OD değeri

GP_X aktivitesi formülü;

$$\frac{OD\ (Ör.\text{-}Kör) \times V_t}{6.22 \times V_ö \times t \times (mg\ prot./mL)} = \mu mol\ /mg\ prot./dk$$

Glutatyon Redüktaz (GR) Aktivitesi Ölçümü

Glutatyon redüktaz, GSSG'nin GSH'ye indirgenmesini katalizleyen enzimdir. Bu reaksiyonun gerçekleşebilmesi için ortamda NADPH olması gerekmektedir. NADPH'ın $NADP^+$'ye yükseltgenmesi esnasında oluşan absorbans farkının da 340 nm dalga boyunda ölçülmesiyle GR aktivitesi belirlenmektedir (Carlberg ve Mannervik, 1975).

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} 2GSH + NADP^+$$

Deneyin yapılışı;

1. 624 µL Fosfat tamponu (100mM-pH 7.4 KPO_4) tüplere konur.
2. 31,25 µL NADPH eklenir.
3. 20 µL örnek eklenir.
4. 75 µL GSSG eklenir.
5. 340 nm'de 0-1 dakika arasında kinetik ölçüm yapılır.

75 µL GSSG ←
20 µL örnek ←
31,5 µL NADPH ←
624 µL KPO_4 ←

GR aktivitesinin hesaplanması;

OD= 0 ile 1 dakika ölçümleri arasındaki farktır.

Vö = Örnek hacmi

Vt = Toplam hacim

6.22 = 1 µmol NADPH'ın 1 cm'lik ışık yolunda verdiği OD değeri

GR aktivitesi formülü;

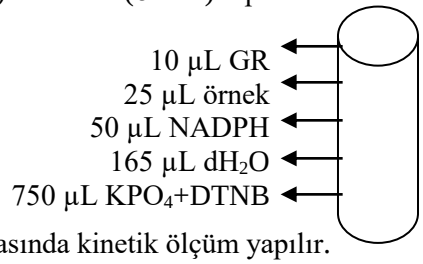
$$\frac{OD\ (Ör.\text{-}Kör) \times V_t}{6.22 \times V_ö \times t \times (mg\ prot./mL)} = \mu mol\ /mg\ prot./dk$$

3.2.5.6. Total Glutatyon (GSH) Miktarının Ölçümü

Toplam GSH miktarı, GSH'ın DTNB tarafından okside edilmesi esnasında meydana gelen sarı renkli 2-nitro-5-tiyobenzoik asidin 412 nm dalga boyunda absorbansının ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Ortamda bulunan okside glutatyon (GSSG) ve GR enzimiyle NADPH'ın indirgenmesi sırasında GSH'ı meydana getirmektedir (Griffith, 1980).

Deneyin yapılışı;

1. 750 µL Fosfat tamponu (75mM-pH 7.5 KPO_4) + DTNB (6 mM) tüplere konur.
2. 165 µL dH_2O
3. 50 µL NADPH (0.3 mM) eklenir.
4. 25 µL örnek eklenir.
5. 10 µL GR (75 U/mL) eklenir.
6. Bekletmeden hemen 412 nm'de 0-1 dakika arasında kinetik ölçüm yapılır.

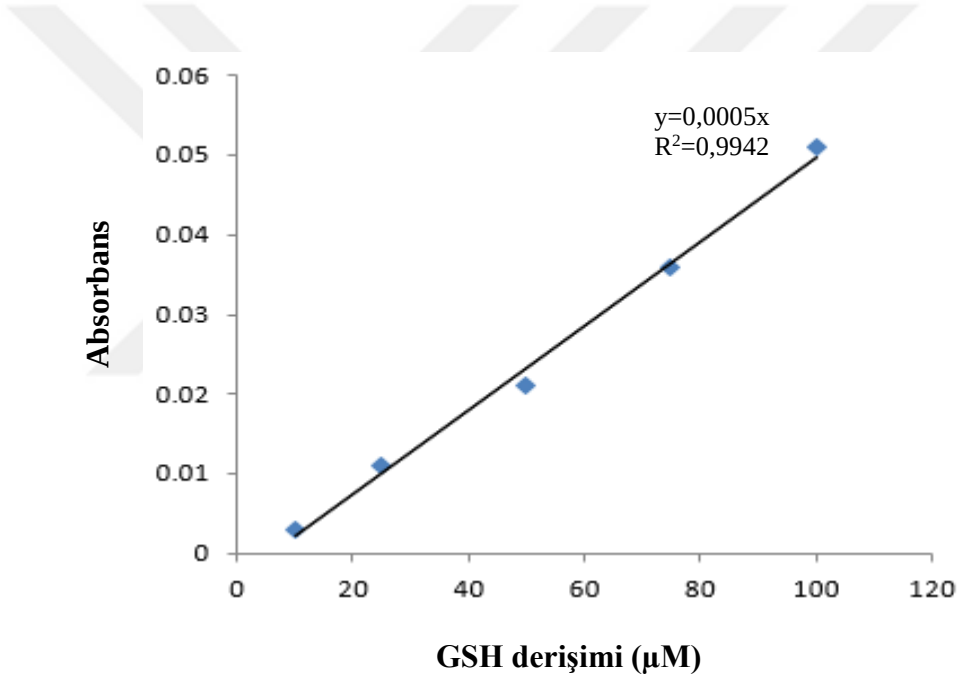


GSH miktarının hesaplanması ise;

Bunun için öncelikle GSH standartlarının hazırlanmakta ve bu standartların 412 nm dalga boyundaki absorbansları ölçülmektedir. Hazırlanan standartların absorbans değerlerinden elde edilen grafik kullanılarak örneklerin GSH absorbansları GSH derişimlerine dönüştürülmektedir.

Standartların Hazırlanması:

Çalışma tamponu kullanılarak 1 mM'lık stok GSH çözeltisi hazırlanır. Daha sonra uygun seri seyretmeler ile absorbans ölçümlerinde kullanılacak olan derişimler (10, 25, 50, 75, 100 µM) hazırlanır. Her bir derişime karşılık gelen absorbans değerleri bulunarak regresyon eşitliği (y=0.0005x) bulunur ve tüm hesaplamalarda bu eşitlik kullanılır. GSH derişimi µmol/mg protein/dk. olarak ifade edilmektedir (Şekil. 3.1.)



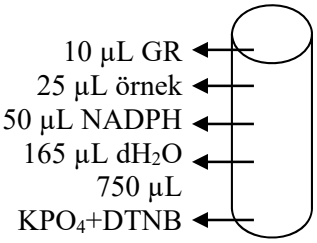
Şekil. 3.3. GSH standardı absorbans değişim grafiği.

Okside Glutatyon (GSSG) Miktarının Ölçümü

GSSG miktarı ölçümünde toplam GSH miktarı ölçümünde kullanılan çözeltiler ve yöntemler aynıdır. Aralarındaki temel fark GSSG ölçümünde 5-sülfosalisilik asit içeren homojenatlara 2-vinilpiridin eklenmesi, pH'nın 7.0'a ayarlanması ve böylece GSH'ın bağlanmasıdır. Sonrasında toplam GSH miktarı ölçümünde kullanılan yöntem kullanılarak ortamdaki GSSG miktarı belirlenmektedir (Griffith, 1980). Glutatyonun 2-vinilpiridin ile türevlendirilmesi için 600 µL örnek üzerine 12 µL 2-vinilpiridin eklenmektedir. Sonrasında bu karışım üzerine azar azar 1 N NaOH eklenerek pH 7.0'ye ayarlanır. Daha sonra oda sıcaklığında karanlık ortamda 1 saat bekletilerek inkübe edilmektedir.

Deneyin yapılışı;

1. 750 µL Fosfat tamponu (75mM-pH 7.5 KPO_4) + DTNB (6 mM) tüplere konur.
2. 165 µL dH_2O
3. 50 µL NADPH (0.3 mM) eklenir.
4. 25 µL örnek eklenir.
5. 10 µL GR (75 U/mL) eklenir.
6. Bekletmeden hemen 412 nm'de 0-1 dakika arasında kinetik ölçüm yapılır.



Redükte Glutatyon (rGSH) miktarının hesaplanması;

Toplam GSH (tGSH) miktarından GSSG çıkarılarak redükte glutatyon (rGSH) hesaplanmaktadır. Böylece bulunan GSH ve GSSG ile GSH/GSSG oranı da şu şekilde belirlenmektedir;

GSH /GSSG = tGSH – GSSG /(GSSG /2)

Toplam GSH, rGSH ve GSSG derişimleri kullanılan süpernatantın protein miktarı ile normalize edildiğinde, bu üç derişimin anlamı dakikada mg protein başına düşen GSH miktarıdır.

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.

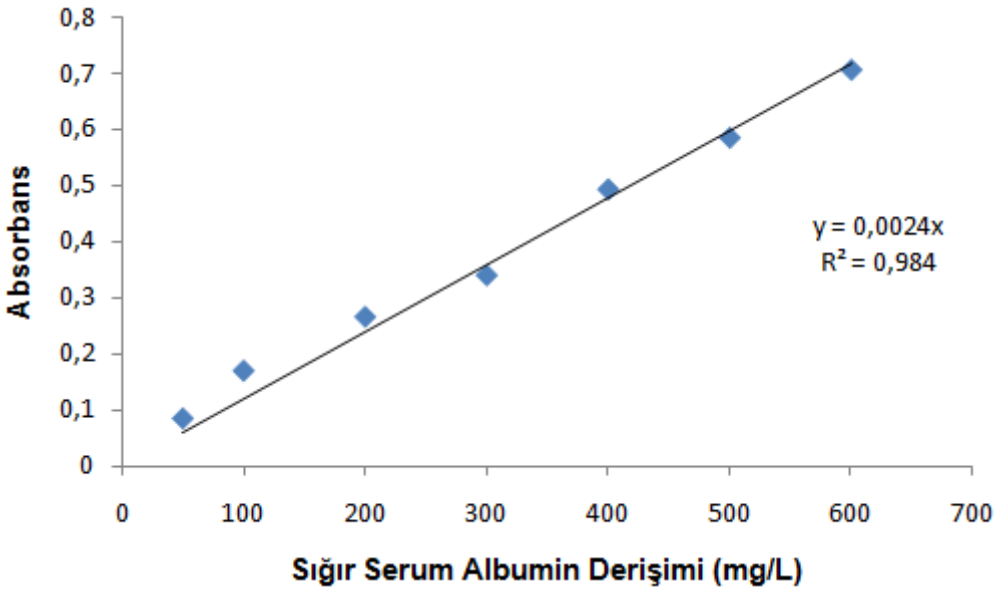
Ayıraçlar;

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 B1: % 1 $CuSO_4$. $5H_2O$. 1 g $CuSO_4.5H_2O$ tartılıp, 100 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır.
3. Ayıraç B2: % 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 3.4. Sığır albumininden hazırlanan standart derişimler ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki.

Buna göre 0,3 µM Cu^{+2} etkisinde 1 nolu *O. niloticus*'un solungaç dokusunda 3 gün (akut) sonunda total protein düzeyi;

y = 0,0024x

Absorbans: y = 0,611

$$\text{Derişim (x)} = \frac{0,611}{0,0024}$$

Derişim = 0,254 mg prot./mL

Doku homojenatı tamponla 10 mL'ye seyreltildiği için

1. Derişim = 2,54X10 X10

Derişim = 25,4 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. Kalsiyum ve Sertlik Tayini

EDTA Metoduyla Su Sertliğinin Belirlenmesi

Bu yöntemde titrasyon çözeltisi olarak Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA) kullanılmaktadır. Kalsiyum sertliği ve toplam sertlik bu yöntemle belirlenmiştir.

M + EDTA $\longrightarrow$ M.EDTA kompleksi

EDTA çözeltisi, 1 ml EDTA 1° F'ne yani 10 ppm $CaCO_3$'a ekivalent olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu da 1/50 N veya 0.01 M EDTA çözeltisidir.

Kullanılan Çözeltiler

a) 0.01 M EDTA çözeltisi

b) EDTA'nın ayarlanması için standart çözelti: Bu 20° F sertliğinde standart çözeltidir.

c) $NH_4OH + NH_4Cl$ tampon çözeltisi (Toplam sertlik için)

d) 1 M NaOH çözeltisi (Ca sertliği için)

e) Eriochrome black T. indikatörü (Toplam sertlik için)

f) Müreksit indikatörü (Ca sertliği için)

Deneyin Yapılışı:

Kalsiyum Sertliği: 25 ml su örneği alınarak üzerine 1-2 ml 1 M NaOH çözeltisi ilave edildi. 0.1 g müreksit indikatörü ilave edildikten sonra 0.01 M EDTA ile renk pembeden menekşeye dönene kadar titre edildi. Harcanan EDTA miktarı Ca sertliği hesabı için not edildi.

Toplam Sertlik: 100 ml su örneği alındı, 0.5-2.0 ml kadar tampon çözeltisi (NH_4Cl+NH_4OH) ilave edildi ve 0.1 g toplam sertlik indikatörü Eriochrome black T katıldıktan sonra, renk şarap kırmızısından, maviye dönene kadar 0.01 M EDTA eklendi ve harcanan EDTA miktarı toplam sertlik hesabı için not edildi.

3.2.7.2. Kalsiyum Sertliği ve Toplam Sertliğin Hesaplanması

$$\text{Kalsiyum Sertliği (mg/l Ca)} = \frac{\text{Harcanan EDTA (ml) x 0.01x40}}{\text{Örnek (ml) x 1/1000}}$$

$$\text{Toplam Sertlik (mg/l } CaCO_3\text{)} = \frac{\text{Harcanan EDTA (ml) x 1000}}{\text{Örnek (ml)}}$$

3.2.6. İstatistik

Bu elde edilen veriler istatistiksel analiz programı olan SPSS (versiyon 20) Paket Programı ile yapılmıştır. Verilerin ile olarak dağılımları incelenmiş ve daha sonra "Regresyon Analizi" ve "One-way ANOVA" kullanılarak çeşitli istatiksel karşılaştırmalar yapılmıştır. Sadece farklı kalsiyum düzeylerinde (Ca0, Ca1, Ca2) kalan kontrol balıklar kendi aralarında istatiksel karşılaştırmaya tabi tutulurken, bakır etkisinde kalan balıklar hangi kalsiyum düzeyinde bakır etkisinde kaldıysa onunla karşılaştırılmıştır. Akut ve kronik süreçler ayrı ayrı analiz edilmiştir. Akut veya kronik süreçte, bir kontrol grubu ile kontrol+bakır etkisinde kalan gruplarda "One-way ANOVA" test sonucuna anlamlı ($p<0,05$) bir fark olduğundan "post-hoc" testleri (Duncan-testi) ile hangi grubun kontrolden farklı olduğu bulunmuştur. SPPS analizlerinden elde edilen verilere (aritmetik ortalama ± standart hata) ait değerler ile Microsoft Excel programı kullanılarak grafikler çizilmiş olup, anlamlı ($p<0,05$) istatistiksel sonuçlar * ile vurgulanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Akut (3 gün) Deneyler

Akut deneylerde balıklar (*O. niloticus*), sadece Ca^{+2} kontrolleri etkisine ve 0,3 µM bakır derişimine Ca0+Cu, Ca1+Cu ve Ca2+Cu ortamlarında 3 gün süre ile bırakılmıştır. Akut süre sonunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktiviteleri bağırsak ve solungaç dokularında, Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ise kas dokusunda ölçülmüştür. Karaciğer dokusunda ise CAT, SOD, GST, GR, GPX, GR aktiviteleri ile GSSG ve GSH düzeylerine bakılmıştır.

Ca0, Ca1 ve Ca2 (Kontrol Grubu) Balıklarda ATPaz Aktiviteleri

Ca0 etkisindeki balıkların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz ile Mg^{+2}-ATPaz aktiviteleri 5,02±0,45 ve 10,4±0,3, bağırsak dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz ile Mg^{+2}-ATPaz aktiviteleri 1,05±0,51 ve 8,25±0,87, kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ise 13,44±1,21 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçülmüştür. Bu değerlere göre yapılan karşılaştırma sonucunda Ca1 ve Ca2 etkisinde elde edilen veriler aşağıda belirtilmiştir.

Ca1 etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 16 (5,8±0,65 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P>0,05$) (Şekil 4.1.), Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 6 artmıştır (11±0,5 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P>0,05$) (Şekil 4.2.). Aynı koşullarda bağırsak dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 395 (5,2±1,1 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,05$) (Şekil 4.3.), Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 28 artmıştır (10,6±1,24 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P>0,05$) (Şekil 4.4.). Kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 47 azalmıştır (7,1±1,19 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,05$) (Şekil 4.5.).

Ca2 etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 20 artmıştır (6±0,82 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P>0,05$) (Şekil 4.1.), buna karşın Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi % 6 azalmıştır (9,82±0,61 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P>0,05$) (Şekil 4.2.). Aynı koşullarda bağırsak dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 110 artmıştır (2,21±1,1 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,05$) (Şekil 4.3.), buna karşın Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 86 azalmıştır (6,4±0,75 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,05$) (Şekil 4.4.). Kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 37 azalmıştır (8,45±1,33 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,05$) (Şekil 4.5.).

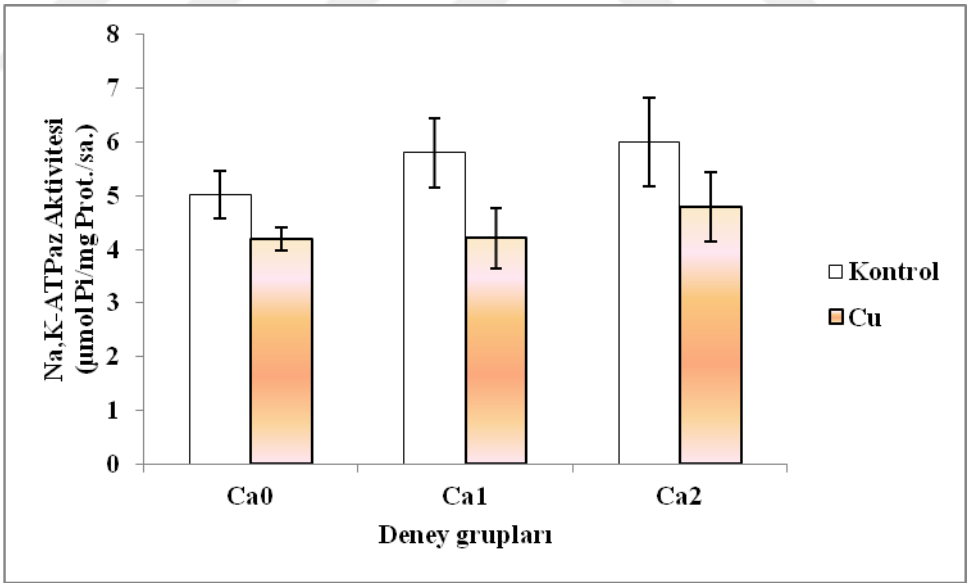
Bakır Etkisinde Kalan Balıklarda ATPaz Aktiviteleri

Ca0+Cu etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 16 (4,2±0,22 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P>0,05$) (Şekil 4.1.), Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi % 3 azalmıştır (10,13±0,85 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P>0,05$) (Şekil 4.2.). Aynı koşullarda bağırsak dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 636 (7,73±1,83 µmol Pi/mg prot./sa.)

(P<0,05) (Şekil 4.3.), Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 55 artmıştır (12,8±3,34 µmol Pi/mg prot./sa.) (P>0,05) (Şekil 4.4). Kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 56 azalmıştır (5,97±0,9 µmol Pi/mg prot./sa.) (P>0,05) (Şekil 4.5.).

Ca1+Cu etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 27 (4,21±0,57 µmol Pi/mg prot./sa.) (P>0,05) (Şekil 4.1.), Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi % 17 azalmıştır (9,11±1,2 µmol Pi/mg prot./sa.) (P>0,05) (Şekil 4.2.). Aynı koşullarda bağırsak dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 75 (1,3±0,37 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,05) (Şekil 4.3.), Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 47 azalmıştır (5,6±0,97 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,05) (Şekil 4.4.). Kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 44 azalmıştır (3,95±1,85 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,05) (Şekil 4.5.).

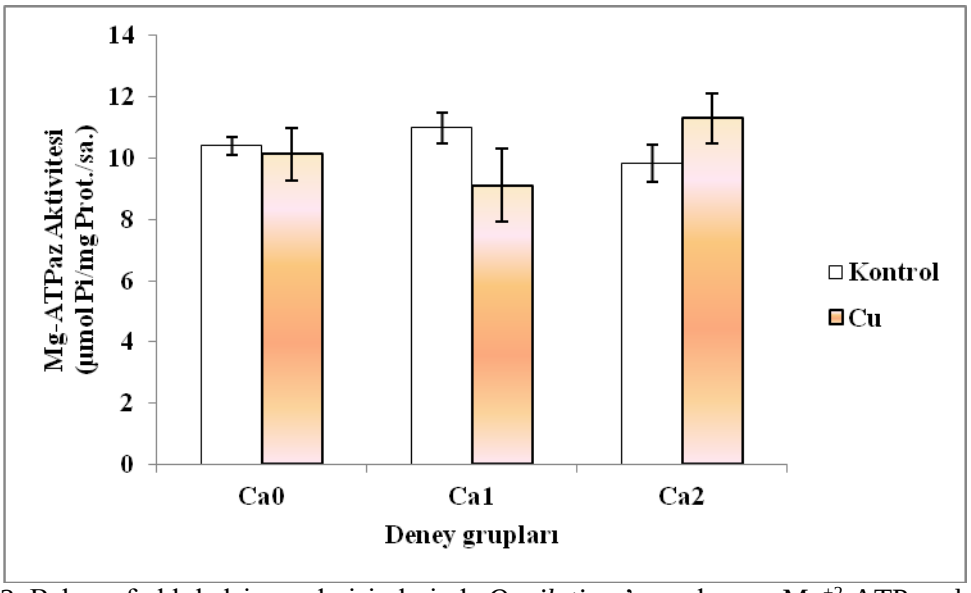
Ca2+Cu etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 20 azalmıştır (4,79±0,64 µmol Pi/mg prot./sa.) (P>0,05) (Şekil 4.1.), buna karşın Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi % 15 artmıştır (11,3±0,8 µmol Pi/mg prot./sa.) (P>0,05) (Şekil 4.2.). Aynı koşullarda bağırsak dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 55 (0,99±0,39 µmol Pi/mg prot./sa.) (P>0,05) (Şekil 4.3.), Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 4 azalmıştır (6,14±1,98 µmol Pi/mg prot./sa.) (P>0,05) (Şekil 4.4.). Kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 44 azalmıştır (4,71±1,6 µmol Pi/mg prot./sa.) (P>0,05) (Şekil 4.5.).



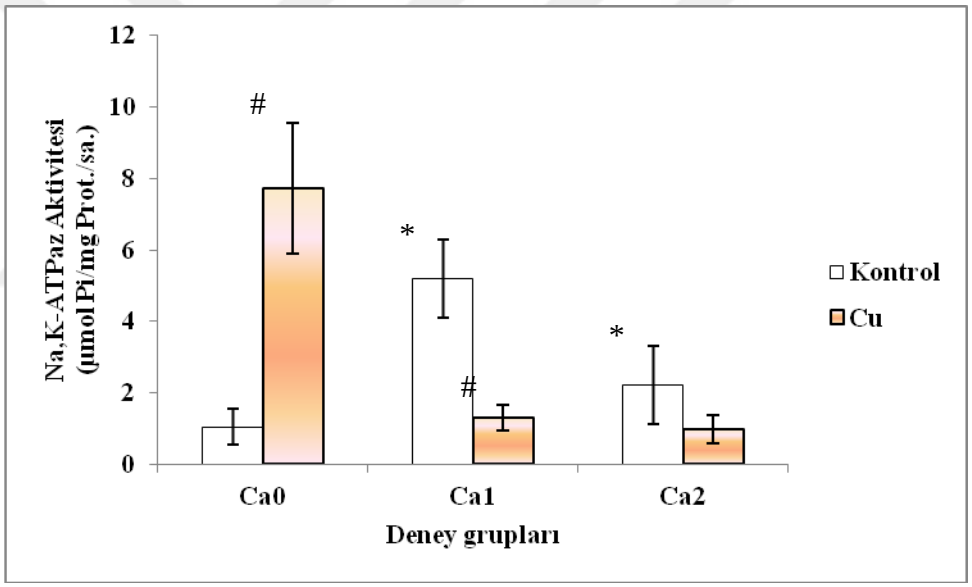
Şekil 4.1. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesine etkileri.

*: Kontrol grupları (Ca0, Ca1, Ca2) arasındaki anlamlı istatistiksel farklılıkları (p<0.05) göstermektedir.

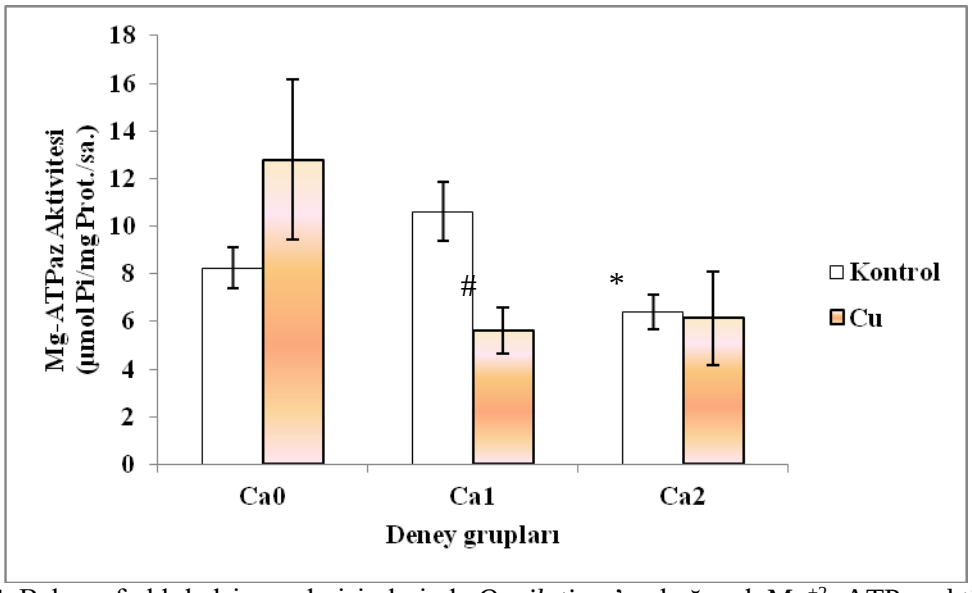
#: Cu etkisindeki grupların kendi kontrollerine göre anlamlı istatistiksel farklılıkları (p<0.05) göstermektedir.



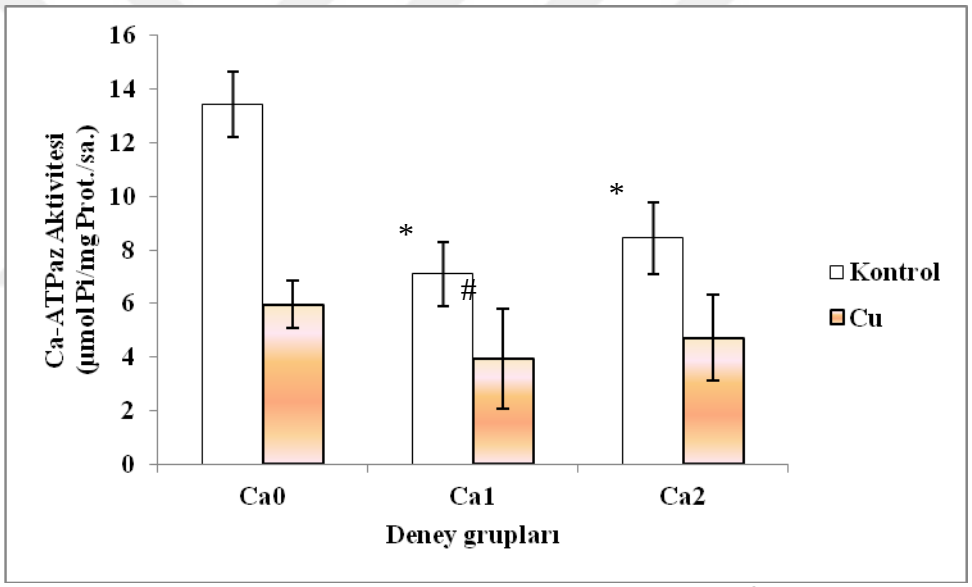
Şekil 4.2. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un solungaç Mg^{+2}-ATPaz aktivitesine etkileri. Ayrıntılar Şekil 4.1.'de verildiği gibidir.



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



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



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

Kontrol Grubu Balıklarda Antioksidan Enzim Aktiviteleri

Ca0 etkisinde kalan balıkların karaciğer dokusunda SOD (45,03±2,73 Unit/mg prot.), CAT (99,2±10,8 µmol H_2O_2/mg prot./dk.), GST (17,2±0,5 µmol/mg prot./dk.), GR (1,71±0,04 µmol/mg prot./dk.), GPx (1,42±0,09 µmol/mg prot./dk.) aktiviteleri ile GSH (0,4±0,04 µmol/mg prot.), GSSG (0,35±0,05 µmol GSSG/mg prot./dk.), rGSH (0,04±0,03 µmol GSH/mg prot./dk.) düzeyi ve GSH/GSSG (0,08±0,05) oranı ölçülmüştür.

Ca1 etkisinde kalan balıkların karaciğer dokusunda SOD aktivitesi kontrole göre % 13 (50,68±3,06 Unit/mg prot.) ($P>0,05$) (Şekil 4.6.), CAT aktivitesi % 19 (118,1±15,8 µmol H_2O_2/mg prot./dk.) ($P>0,05$) (Şekil 4.7.), GST aktivitesi % 9 artmıştır (18,8±0,73 µmol/mg prot./dk.)

(P>0,05) (Şekil 4.8.). Aynı koşullarda GR aktivitesi kontrole göre % 5 (1,63±0,04 µmol/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.9.) ve GPx aktivitesi % 4 azalmıştır (1,37 ±0,05 µmol/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.10.). GSH düzeyi değişim göstermezken (0,4±0,04 µmol/mg prot.) (P>0,05) (Şekil 4.11.), GSSG düzeyi %14 artmıştır (0,4±0,03 µmol GSSG/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.12.). rGSH düzeyi ve GSH/GSSG oranı sırasıyla %75 (0,01±0,025 µmol GSH/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.13.), %225 azalmıştır (-0,1±0,03) (P>0,05) (Şekil 4.14.).

Ca2 etkisinde kalan balıkların karaciğer dokusunda SOD aktivitesi kontrole göre % 10 (49,53±2,44 Unit/mg prot.) (P>0,05) (Şekil 4.6.), CAT aktivitesi % 25 (123,7±6,9 µmol H_2O_2/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.7.), GST aktivitesi % 10 artmıştır (19±2,4 µmol/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.8.). Aynı koşullarda GR aktivitesi kontrole göre % 9 azalırken (1,56±0,1 µmol/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.9.), GPx aktivitesi % 1 artmıştır (1,43±0,12 µmol/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.10.). GSH düzeyi %20 (0,32±0,05 µmol/mg prot.) (P>0,05) (Şekil 4.11.), GSSG düzeyi %9 (0,32±0,05 µmol GSSG/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.12.), rGSH düzeyi %100 (0±0,024 µmol GSH/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.13.) ve GSH/GSSG oranı %83 azalmıştır (0,014±0,05) (P>0,05) (Şekil 4.14.).

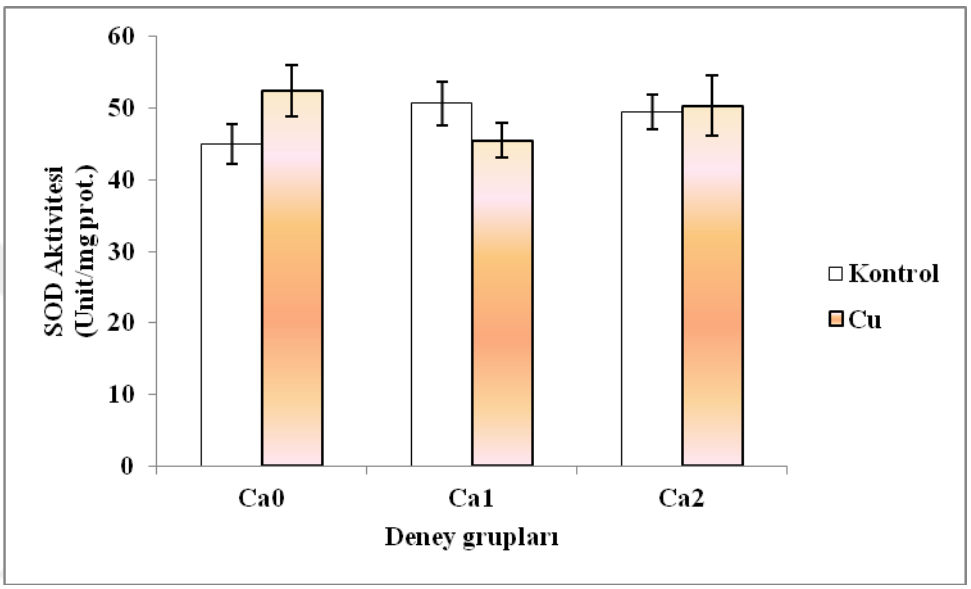
Bakır Etkisinde Kalan Balıklarda Antioksidan Enzim Aktiviteleri

Ca0+Cu etkisinde kalan balıkların karaciğer dokusunda SOD aktivitesi kontrole göre %16 (52,4±3,55 Unit/mg prot.) (P>0,05) (Şekil 4.6.), CAT aktivitesi % 11 artmıştır (109,9±7,01 µmol H_2O_2/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.7.). GST aktivitesi % 6 (16,1±1,45 µmol/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.8.), GR aktivitesi % 7 (1,59±0,07 µmol/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.9.) ve GPx aktivitesi % 6 azalmıştır (1,33±0,06 µmol/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.10.). GSH düzeyi %13 (0,45±0,02 µmol/mg prot.) (P>0,05) (Şekil 4.11.) ve GSSG düzeyi %17 artış gösterirken (0,41±0,02 µmol GSSG/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.12.), rGSH düzeyi değişmemiş (0,04±0,01 µmol GSH/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.13.) ve GSH/GSSG oranı %34 azalmıştır (0,053±0,01) (P>0,05) (Şekil 4.14.).

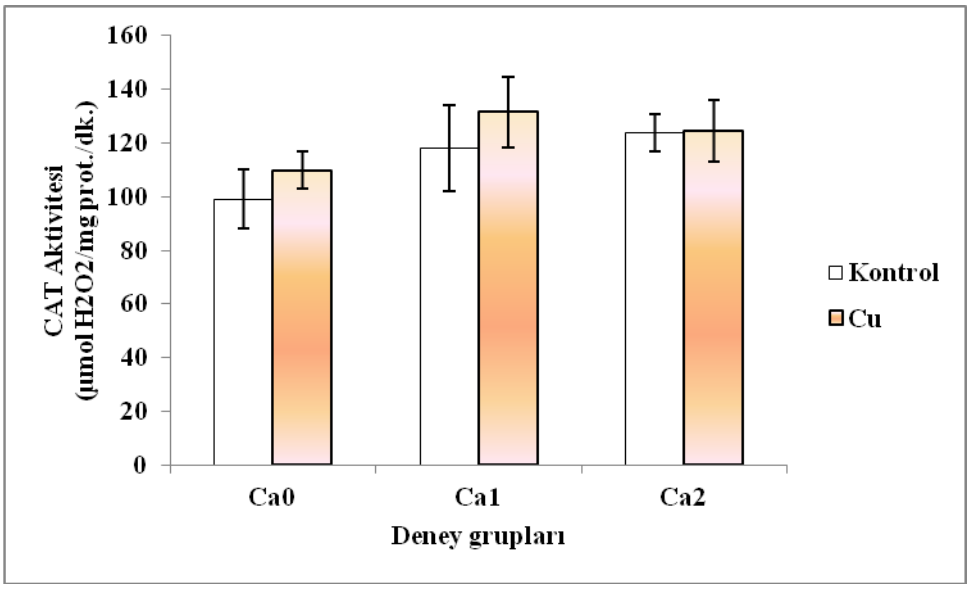
Ca1+Cu etkisinde kalan balıkların karaciğer dokusunda SOD aktivitesi kontrole göre %10 azalırken (45,54±2,45 Unit/mg prot.) (P>0,05) (Şekil 4.6.), CAT aktivitesi % 11 artmıştır (131,6±13,2 µmol H_2O_2/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.7.). GST aktivitesi % 36 (12±1,8 µmol/mg prot./dk.) (P<0,05) (Şekil 4.8.) ve GR aktivitesi % 6 azalırken (1,54±0,05 µmol/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.9.), GPx aktivitesi % 1 artmıştır (1,38±0,08 µmol/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.10.). GSH düzeyi %13 (0,35±0,02 µmol/mg prot.) (P>0,05) (Şekil 4.11.) ve GSSG düzeyi %23 azalış gösterirken (0,31±0,03 µmol GSSG/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.12.), rGSH düzeyi % 250 (0,035±0,02 µmol GSH/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.13.) ve GSH/GSSG oranı %170 artmıştır (0,07±0,04) (P<0,05) (Şekil 4.14.).

Ca2+Cu etkisinde kalan balıkların karaciğer dokusunda SOD aktivitesi kontrole göre % 2 (50,35±4,17 Unit/mg prot.) (P>0,05) (Şekil 4.6.), CAT aktivitesi % 1 artmıştır (124,5±11,5 µmol

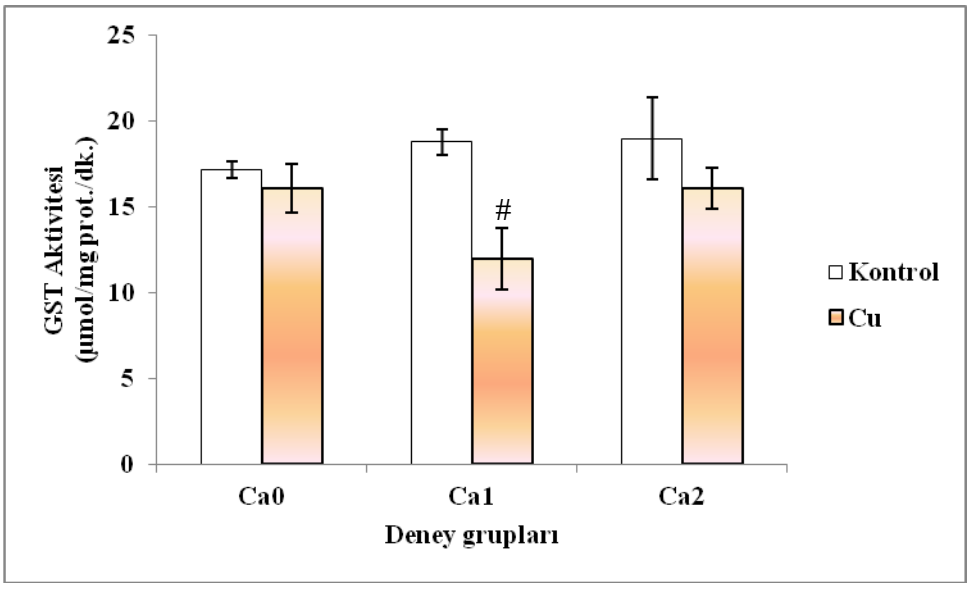
H_2O_2/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.7.). GST aktivitesi % 15 (16,1±1,2 µmol/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.8.), GR aktivitesi % 1 (1,54±0,05 µmol/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.9.) ve GPx aktivitesi % 22 azalmıştır (1,12±0,07 µmol/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.10.). GSH düzeyi %31 (0,42±0,05 µmol/mg prot.) (P>0,05) (Şekil 4.11.) ve GSSG düzeyi % 16 artmıştır (0,37±0,06 µmol GSSG/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.12.). rGSH düzeyi değişim göstermezken (0,06±0,03 µmol GSH/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.13.), GSH/GSSG oranı % 685 artmıştır (0,11±0,06) (P<0,05) (Şekil 4.14.).



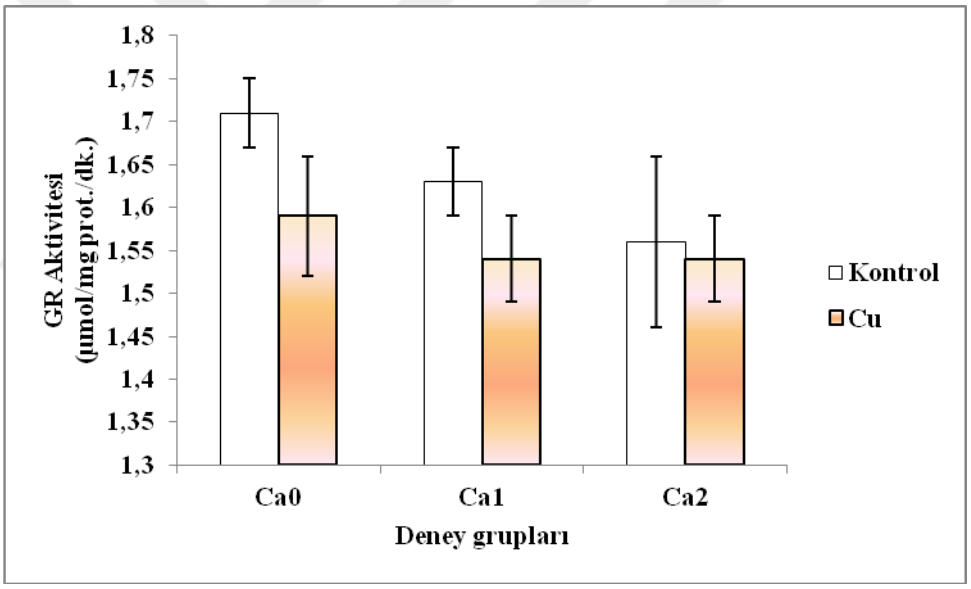
Şekil 4.6. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un karaciğer SOD aktivitesine etkileri. (*: Kontrol grupları (Ca0, Ca1, Ca2) arasındaki istatistiksel farklılıkları, #: Cu etkisindeki grupların kendi kontrollerine göre istatistiksel farklılıkları göstermektedir).



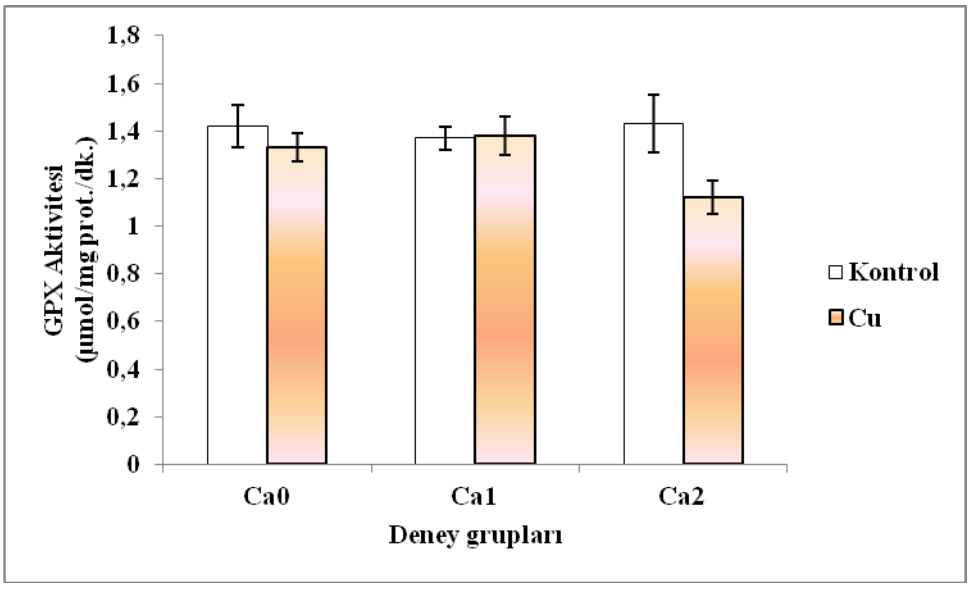
Şekil 4.7. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un karaciğer CAT aktivitesine etkileri. Ayrıntılar Şekil 4.6.'da verildiği gibidir.



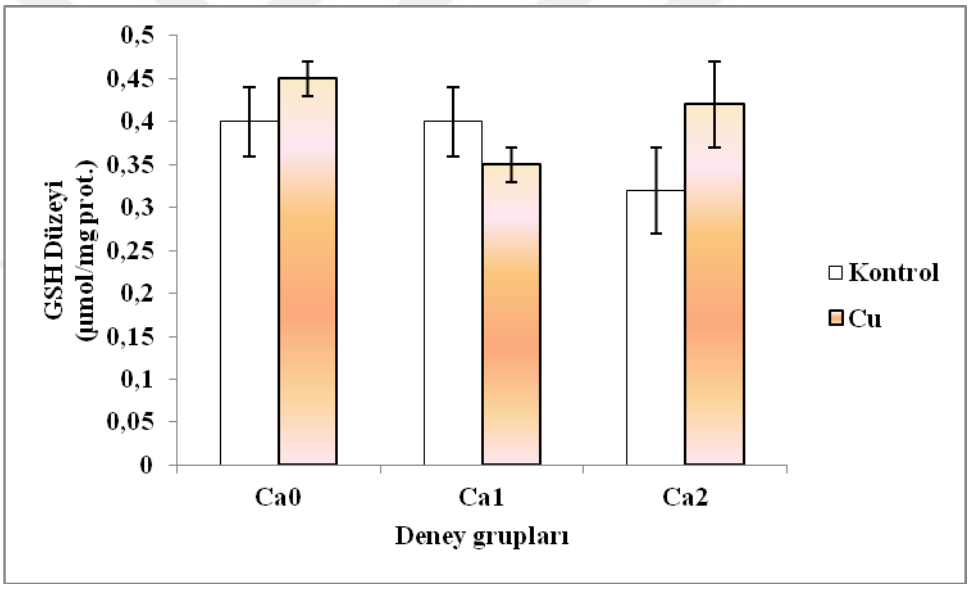
Şekil 4.8. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un karaciğer GST aktivitesine etkileri. Ayrıntılar Şekil 4.6.'da verildiği gibidir.



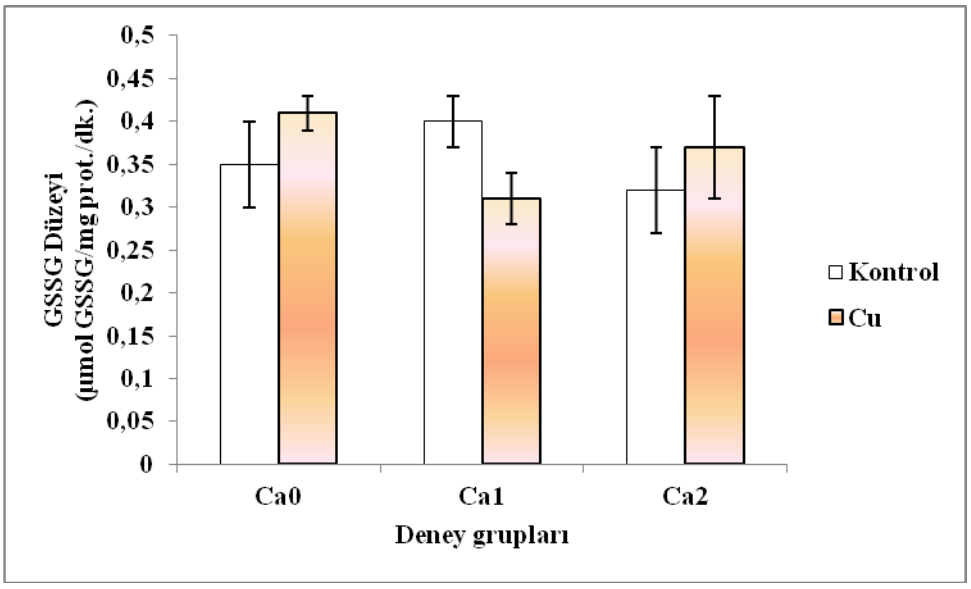
Şekil 4.9. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un karaciğer GR aktivitesine etkileri. Ayrıntılar Şekil 4.6.'da verildiği gibidir.



Şekil 4.10. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un karaciğer GPx aktivitesine etkileri. Ayrıntılar Şekil 4.6.'da verildiği gibidir.



Şekil 4.11. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un karaciğer GSH düzeyine etkileri. Ayrıntılar Şekil 4.6.'da verildiği gibidir.



Şekil 4.12. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un karaciğer GSSG düzeyine etkileri. Ayrıntılar Şekil 4.6.'da verildiği gibidir.

4.1.2. Kronik (30 gün) Deneyler

Kronik deneylerde balıklar (*O. niloticus*), sadece Ca^{+2} kontrolleri etkisine ve 0,03 µM bakır derişimine Ca0+Cu, Ca1+Cu ve Ca2+Cu ortamlarında 30 gün süre ile bırakılmıştır. Bu süre sonunda solungaç ve bağırsak dokularında Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz ile kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi değerleri ölçülmüştür. Karaciğer dokusunda ise SOD, CAT, GST, GPX, GR aktiviteleri ile GSH ve GSSG düzeyleri ölçülmüştür.

Kontrol Grubu Balıklarda ATPaz Aktiviteleri

Ca0 etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz ile Mg^{+2}-ATPaz aktiviteleri 4,7±0,63 ve 16,53±1,04, bağırsak dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz ile Mg^{+2}-ATPaz aktiviteleri 11,53±1,38 ve 9,79±1,25, kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ise 14,5±3,0 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçülmüştür. Bu değerlere göre yapılan karşılaştırma sonucunda Ca1 ve Ca2 etkisinde elde edilen veriler aşağıda belirtilmiştir.

Ca1 etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 30 (3,31±0,41 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P>0,05$) (Şekil 4.15.), Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi % 1 azalmıştır (16,4±0,7 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P>0,05$) (Şekil 4.16.). Aynı koşullarda bağırsak dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 77 (2,67±1,15 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,05$) (Şekil 4.17.). Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 16 azalmıştır (8,27 ±1,42 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P>0,05$) (Şekil 4.18.). Kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 56 artmıştır (6,37±1,25 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P<0,05$) (Şekil 4.19.).

Ca2 etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 19 artmıştır (5,6±0,52 µmol Pi/mg prot./sa.) ($P>0,05$) (Şekil 4.15.), buna karşın Mg^{+2}-ATPaz

aktivitesi ise % 1 azalmıştır (16,3±0,9 µmol Pi/mg prot./sa.) (P>0,05) (Şekil 4.16.). Aynı koşullarda bağırsak dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 74 azalmıştır (3,04±0,73 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,05) (Şekil 4.17.), buna karşın Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 11 artmıştır (10,83±1,91 µmol Pi/mg prot./sa.) (P>0,05) (Şekil 4.18.). Kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 19 azalmıştır (11,73±2,0 µmol Pi/mg prot./sa.) (P>0,05) (Şekil 4.19.).

Bakır Etkisinde Kalan Balıklarda ATPaz Aktiviteleri

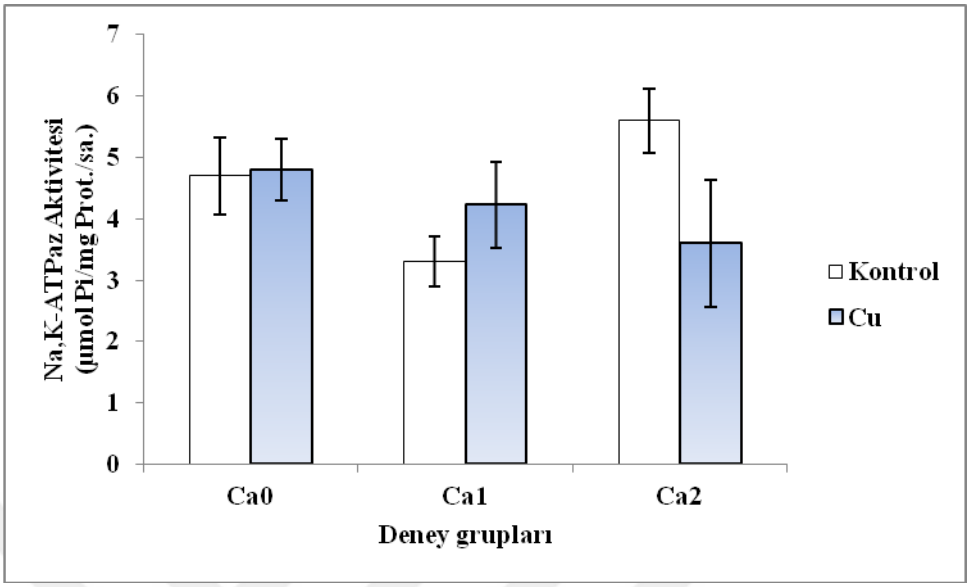
Ca0+Cu etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 2 (4,8±0,15 µmol Pi/mg prot./sa.) (P>0,05) (Şekil 4.15.), Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 7 artmıştır (17,7±0,95 µmol Pi/mg prot./sa.) (P>0,05) (Şekil 4.16.). Aynı koşullarda bağırsak dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 65 azalmıştır (3,98±0,85 µmol Pi/mg prot./sa.) (P>0,05) (Şekil 4.17.), buna karşın Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 11 artmıştır (10,82±1,41 µmol Pi/mg prot./sa.) (P>0,05) (Şekil 4.18.). Kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 79 azalmıştır (3,0±1,8 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,05) (Şekil 4.19.).

Ca1+Cu etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 28 artmıştır (4,23±0,7 µmol Pi/mg prot./sa.) (P>0,05) (Şekil 4.15.), buna karşın Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi % 3 azalmıştır (15,9±1,1 µmol Pi/mg prot./sa.) (P>0,05) (Şekil 4.16.). Aynı koşullarda bağırsak dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 6 artmıştır (2,84±1,45 µmol Pi/mg prot./sa.) (P>0,05) (Şekil 4.17.), buna karşın Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 22 azalmıştır (6,48±0,91 µmol Pi/mg prot./sa.) (P>0,05) (Şekil 4.18.). Kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 95 azalmıştır (6,3±0,3 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,05) (Şekil 4.19.).

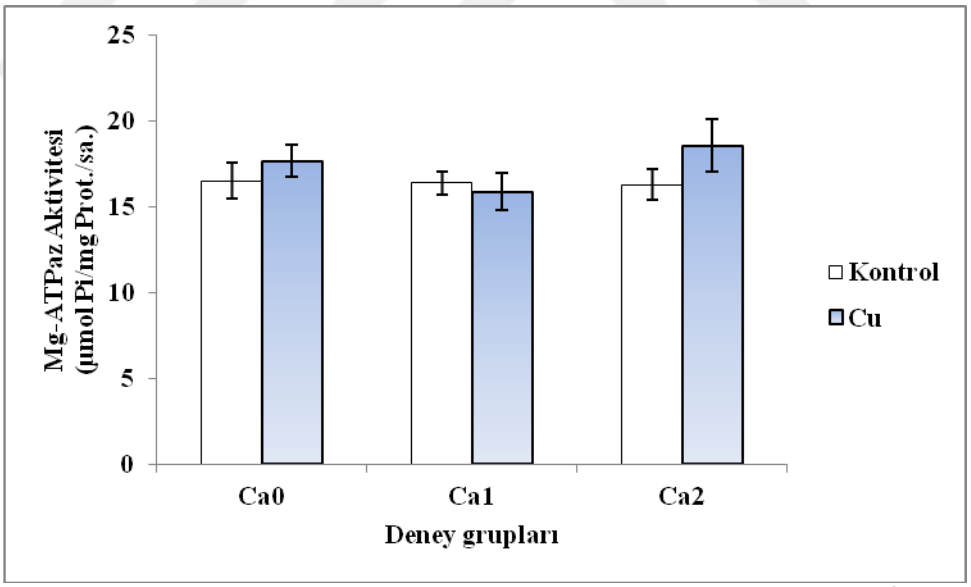
Ca2+Cu etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 36 azalmıştır (3,6±1,04 µmol Pi/mg prot./sa.) (P>0,05) (Şekil 4.15.), buna karşın Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 14 artmıştır (18,6±1,54 µmol Pi/mg prot./sa.) (P>0,05) (Şekil 4.16.). Aynı koşullarda bağırsak dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 48 (1,59±0,67 µmol Pi/mg prot./sa.) (P>0,05) (Şekil 4.17.), Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ise % 48 azalmıştır (5,66±1,2 µmol Pi/mg prot./sa.) (P>0,05) (Şekil 4.18.). Kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 88 azalmıştır (1,44±0,93 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,05) (Şekil 4.19.).

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 Ca0 ve Ca2 etkisindeki balıkların solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinde akut süreçle karşılaştırıldığında değişiklik görülmezken, Ca1 etkisindeki balıkların solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi % 43 (3,31±0,41 µmol Pi/mg prot./sa.) azalmıştır (P<0,05). Bağırsak Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi ise Ca0 etkisinde % 995 (11,53±1,4 µmol Pi/mg prot./sa.) artmıştır (P<0,05). Çalışılan üç derişimde de bağırsak Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinde bir değişiklik görülmemesine karşın, solungaç Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi Ca0 etkisinde % 59 (16,5±1,04 µmol Pi/mg prot./sa.), Ca1 etkisinde % 49 (16,4±0,7 µmol Pi/mg prot./sa.) ve Ca2

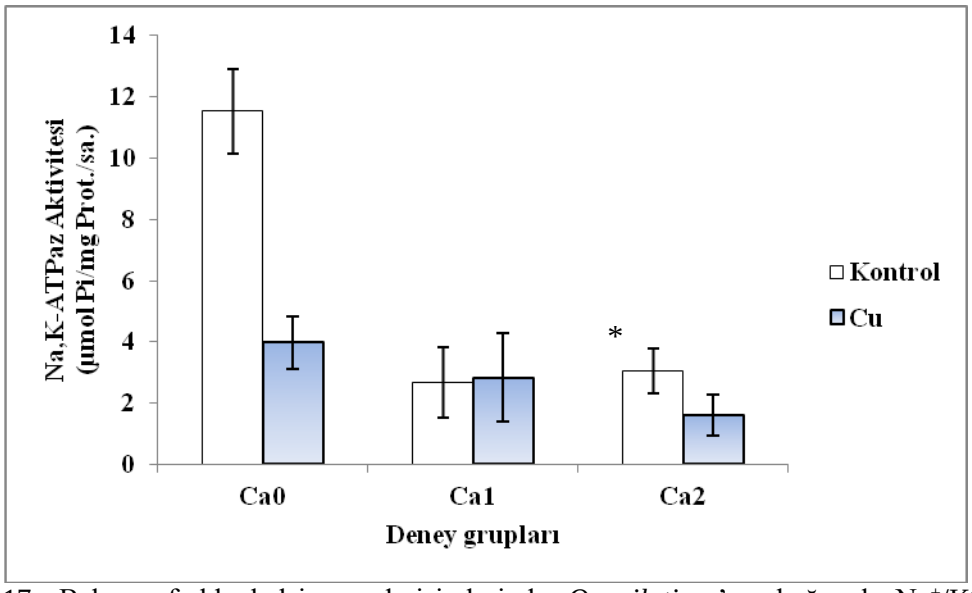
etkisinde % 66 (16,2±0,9 µmol Pi/mg prot./sa.) artmıştır (P<0,05). Çalışılan üç derişimde de kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi değişiklik göstermemiştir.



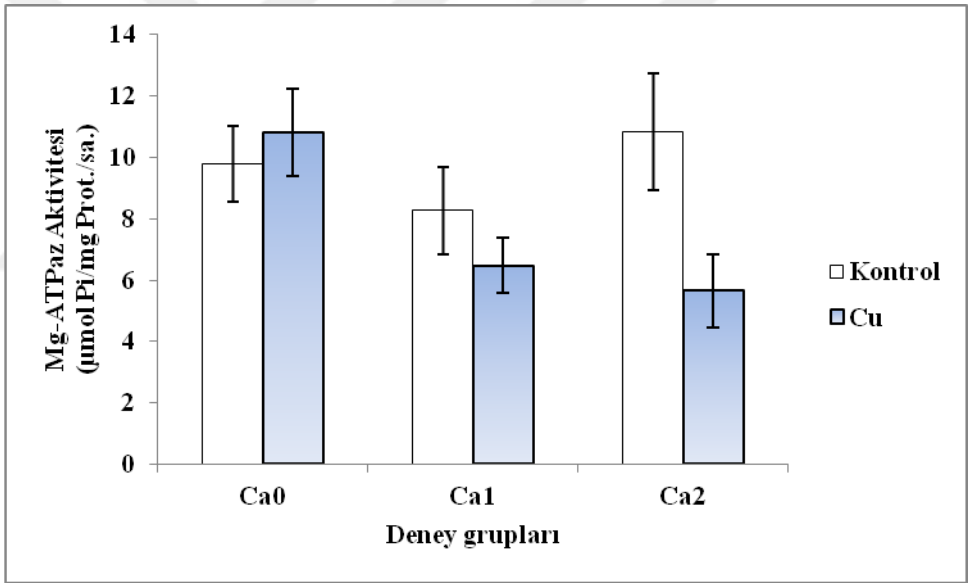
Şekil 4.15. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesine etkileri. Ayrıntılar Şekil 4.1 de verildiği gibidir.



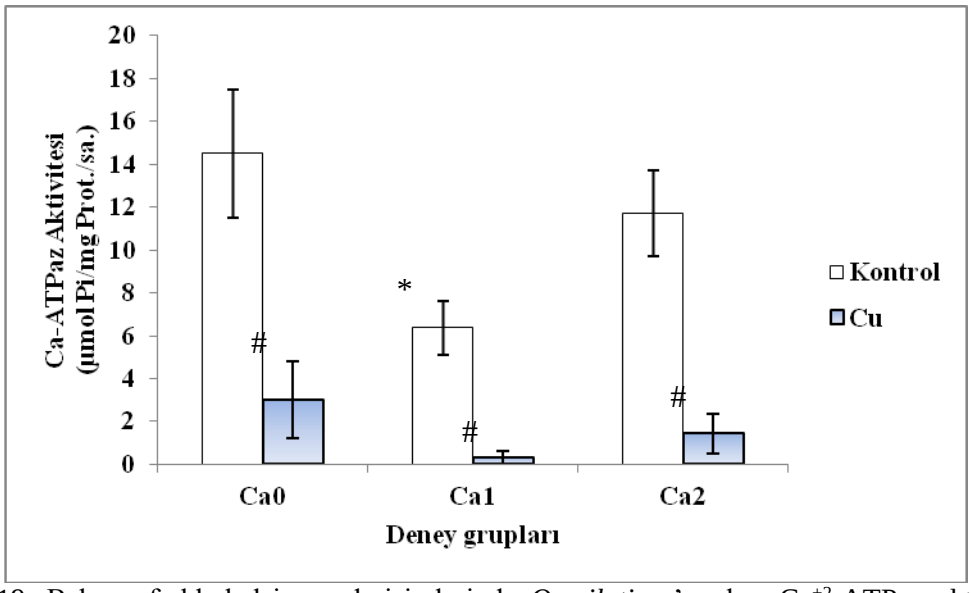
Şekil 4.16. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un solungaç Mg^{+2}-ATPaz aktivitesine etkileri. Şekil 4.1 de verildiği gibidir.



Şekil 4.17. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un bağırsak Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesine etkileri. Şekil 4.1 de verildiği gibidir.



Şekil 4.18. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un bağırsak Mg^{+2}-ATPaz aktivitesine etkileri. Şekil 4.1 de verildiği gibidir.



Şekil 4.19. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesine etkileri. Şekil 4.1 de verildiği gibidir.

Kontrol Grubu Balıklarda Antioksidan Enzim Aktiviteleri

Ca0 etkisinde kalan balıkların karaciğer dokusunda SOD (49,6±3,52 Unit/mg prot.), CAT (311,6±36 µmol H_2O_2/mg prot./dk.), GST (18,55±1,56 µmol/mg prot./dk.), GR (1,56±0,07 µmol/mg prot./dk.), GPx (0,99±0,1 µmol/mg prot./dk.) aktiviteleri ile GSH (0,19±0,014 µmol/mg prot.), GSSG (0,17±0,02 µmol GSSG/mg prot./dk.), rGSH düzeyi (0,05±0,02 µmol GSH/mg prot./dk.) ve GSH/GSSG oranı (0,21±0,11) ölçülmüştür.

Ca1 etkisinde kalan balıkların karaciğer dokusunda SOD aktivitesi kontrole göre % 6 artış gösterirken (52,5±4,9 Unit/mg prot.) (P>0,05) (Şekil 4.20.), CAT aktivitesi % 21 (246,9±30 µmol H_2O_2/mg prot./dk.) (P<0,05) (Şekil 4.21.) ve GST aktivitesi % 2 azalmıştır (18,13±1,36 µmol/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.22.). Aynı koşullarda GR aktivitesi kontrole göre % 12 (1,75±0,1 µmol/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.23.), GPx aktivitesi % 16 (1,15 ±0,11 µmol/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.24.), GSH düzeyi % 21 (0,23±0,03 µmol/mg prot.) (P>0,05) (Şekil 4.25.) ve GSSG düzeyi % 24 artmştır (0,21±0,03 µmol GSSG/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.26.). rGSH düzeyi ve GSH/GSSG oranı sırasıyla % 40 (0,03±0,01 µmol GSH/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.27.) ve % 48 azalmıştır (0,11±0,06) (P>0,05) (Şekil 4.28.).

Ca2 etkisinde kalan balıkların karaciğer dokusunda SOD aktivitesi kontrole göre % 30 artış gösterirken (64,7±2,22 Unit/mg prot.) (P<0,05) (Şekil 4.20.), CAT aktivitesi % 49 (159,4±15 µmol H_2O_2/mg prot./dk.) (P<0,05) (Şekil 4.21.) ve GST aktivitesi % 9 azalmıştır (16,9±1,53 µmol/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.22.). Aynı koşullarda GR aktivitesi kontrole göre % 8 (1,69±0,09 µmol/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.23.), GPx aktivitesi % 17 (1,16±0,08 µmol/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.24.), GSH düzeyi % 11 (0,21±0,024 µmol/mg prot.) (P>0,05) (Şekil 4.25.) ve

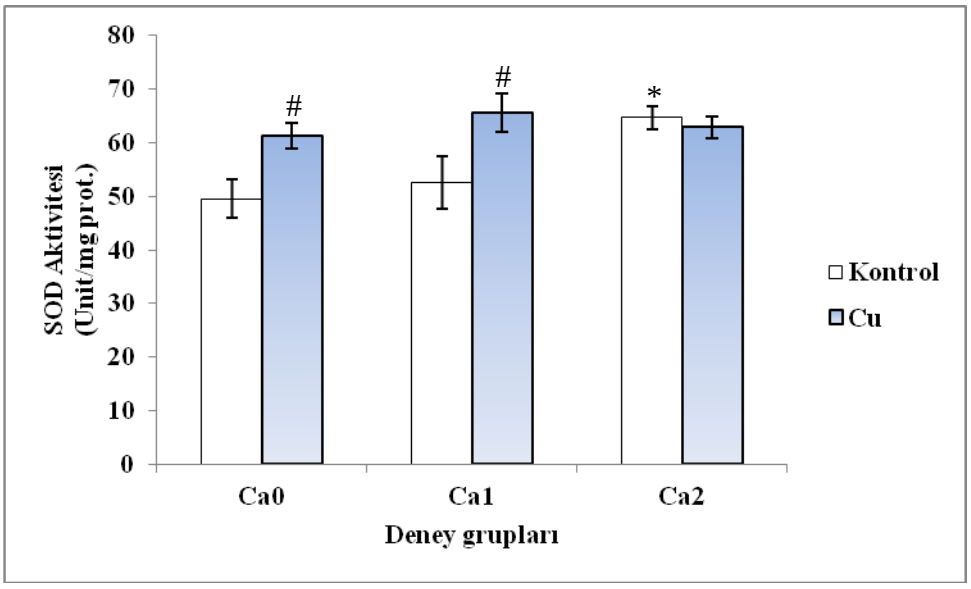
GSSG düzeyi % 6 artmıştır (0,18±0,02 µmol GSSG/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.26.). rGSH düzeyi % 20 (0,04±0,003 µmol GSH/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.27.) ve GSH/GSSG oranı % 43 azalmıştır (0,12±0,02) (P>0,05) (Şekil 4.28.).

Bakır Etkisinde Kalan Balıklarda Antioksidan Enzim Aktiviteleri

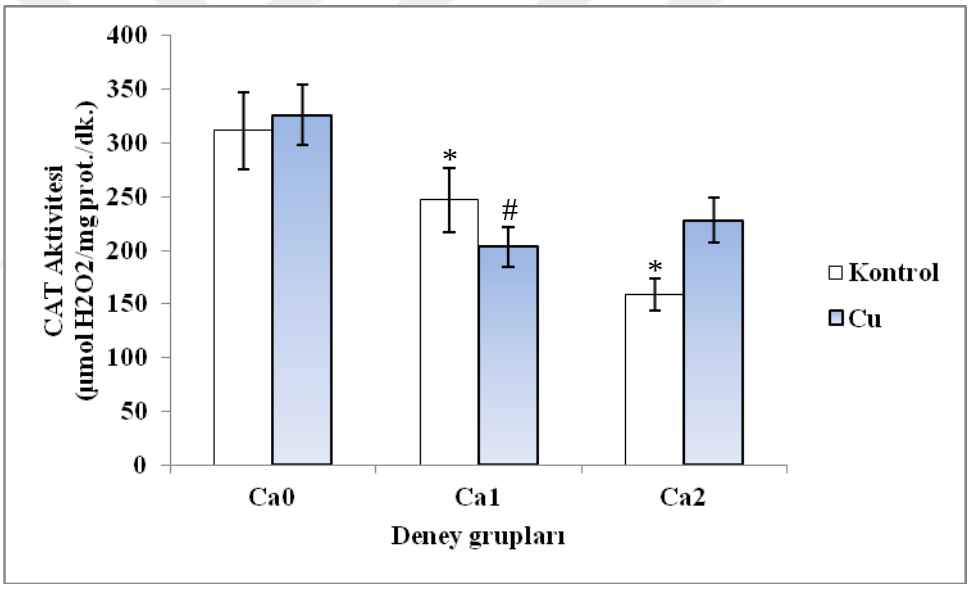
Ca0+Cu etkisinde kalan balıkların karaciğer dokusunda SOD aktivitesi kontrole göre % 24 (61,4±2,4 Unit/mg prot.) (P<0,05) (Şekil 4.20.) ve CAT aktivitesi % 5 artış gösterirken (326±28 µmol H_2O_2/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.21.), GST aktivitesi % 4 azalmıştır (17,9±1,15 µmol/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.22.), GR aktivitesi % 10 (1,71±0,07 µmol/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.23.), GPx aktivitesi % 22 (1,21±0,07 µmol/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.24.), GSH düzeyi %58 (0,3±0,03 µmol/mg prot.) (P<0,05) (Şekil 4.25.) , GSSG düzeyi %47 (0,25±0,02 µmol GSSG/mg prot./dk.) (P<0,05) (Şekil 4.26.) ve rGSH düzeyi % 220 artış gösterirken (0,16±0,064 µmol GSH/mg prot./dk.) (P<0,05) (Şekil 4.27.), GSH/GSSG oranı %48 azalmıştır (0,11±0,05) (P>0,05) (Şekil 4.28.).

Ca1+Cu etkisinde kalan balıkların karaciğer dokusunda SOD aktivitesi kontrole göre %25 artış gösteriken (65,6±3,61 Unit/mg prot.) (P<0,05) (Şekil 4.20.), CAT aktivitesi % 18 azalmıştır (203,2±18 µmol H_2O_2/mg prot./dk.) (P<0,05) (Şekil 4.21.). GST aktivitesi % 3 artış gösterirken (18,7±1,28 µmol/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.22.), GR aktivitesi % 4 (1,68±0,073 µmol/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.23.) ve GPx aktivitesi % 15 azalmıştır (0,98±0,13 µmol/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.24.). GSH düzeyi %22 (0,28±0,03 µmol/mg prot.) (P>0,05) (Şekil 4.25.) ve GSSG düzeyi %14 (0,24±0,02 µmol GSSG/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.26.), rGSH düzeyi % 133 (0,07±0,024 µmol GSH/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.27.) ve GSH/GSSG oranı %36 artmıştır (0,15±0,06) (P>0,05) (Şekil 4.28.).

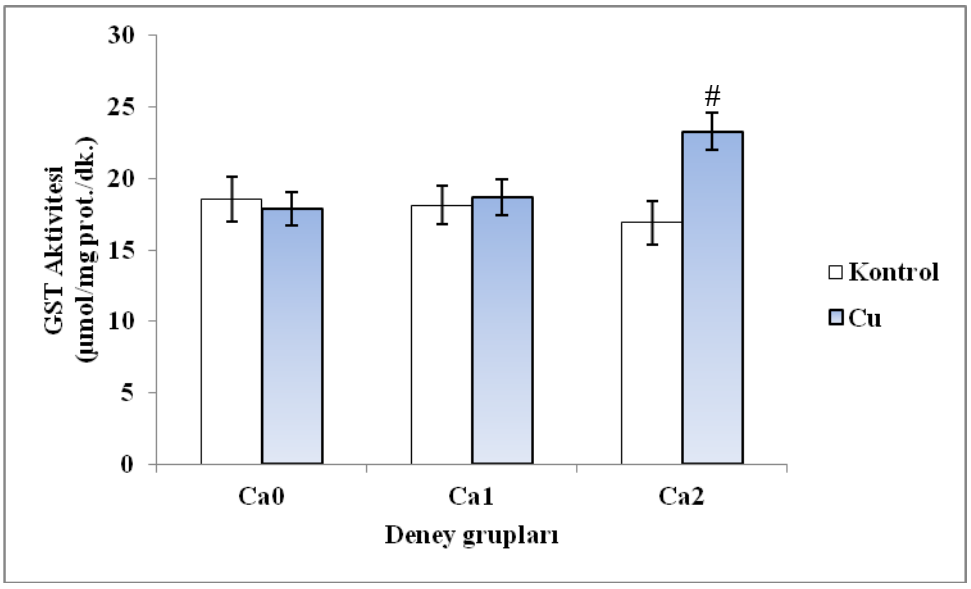
Ca2+Cu etkisinde kalan balıkların karaciğer dokusunda SOD aktivitesi kontrole göre %3 azalırken (62,9±2,12 Unit/mg prot.) (P>0,05) (Şekil 4.20.), CAT aktivitesi % 43 (228±21,2 µmol H_2O_2/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.21.) ve GST aktivitesi % 38 artmıştır (23,3±1,31 µmol/mg prot./dk.) (P<0,05) (Şekil 4.22.). GR aktivitesi % 8 (1,83±0,085 µmol/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.23.), GPx aktivitesi % 15 (1,33±0,05 µmol/mg prot./dk.) (P>0,05) (Şekil 4.24.), GSH düzeyi %100 (0,42±0,03 µmol/mg prot.) (P<0,05) (Şekil 4.25.), GSSG düzeyi % 50 (0,27±0,04 µmol GSSG/mg prot./dk.) (P<0,05) (Şekil 4.26.), rGSH düzeyi %325 (0,17±0,025 µmol GSH/mg prot./dk.) (P<0,05) (Şekil 4.27.) ve GSH/GSSG oranı % 233 artmıştır (0,4±0,11) (P<0,05) (Şekil 4.28.).



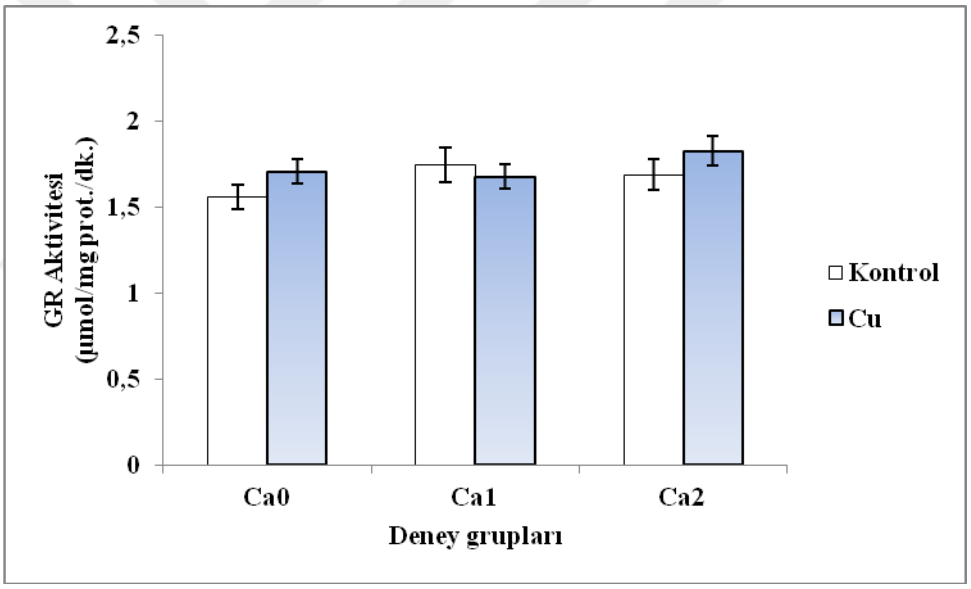
Şekil 4.20. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un karaciğer SOD aktivitesine etkileri. Şekil 4.1 de verildiği gibidir.



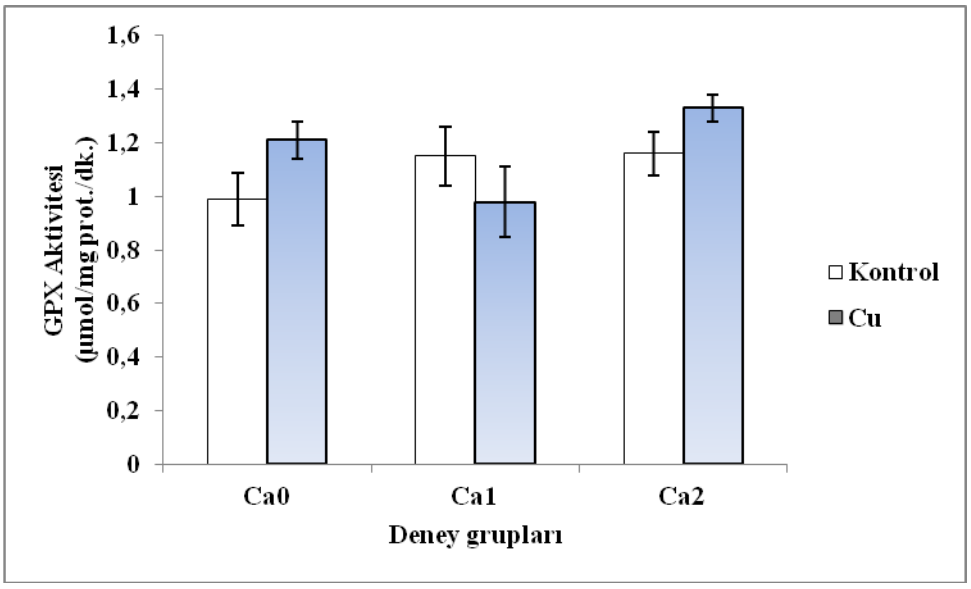
Şekil 4.21.Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un karaciğer CAT aktivitesine etkileri. Şekil 4.1 de verildiği gibidir.



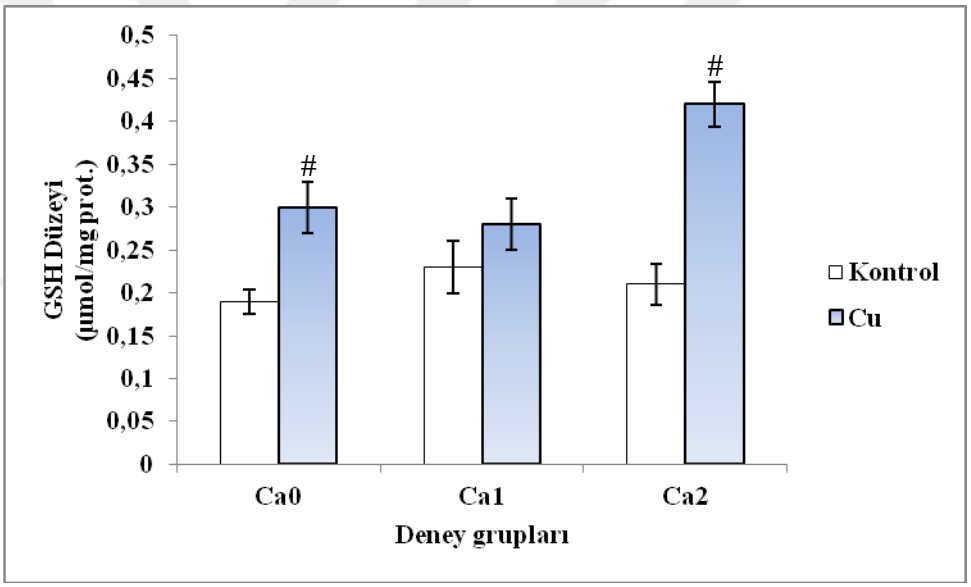
Şekil 4.22. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un karaciğer GST aktivitesine etkileri. Şekil 4.1 de verildiği gibidir.



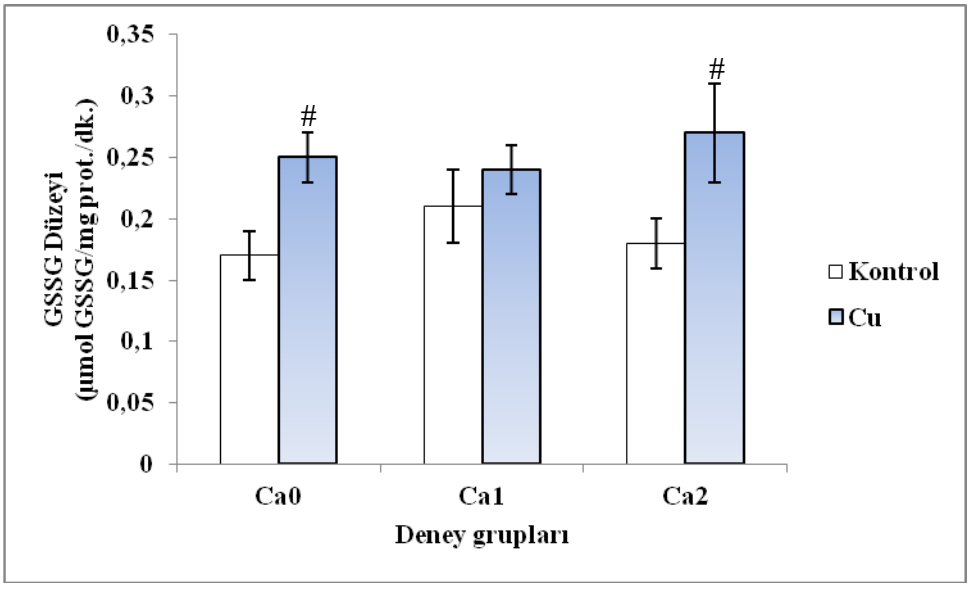
Şekil 4.23.Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un karaciğer GR aktivitesine etkileri. Şekil 4.1 de verildiği gibidir.



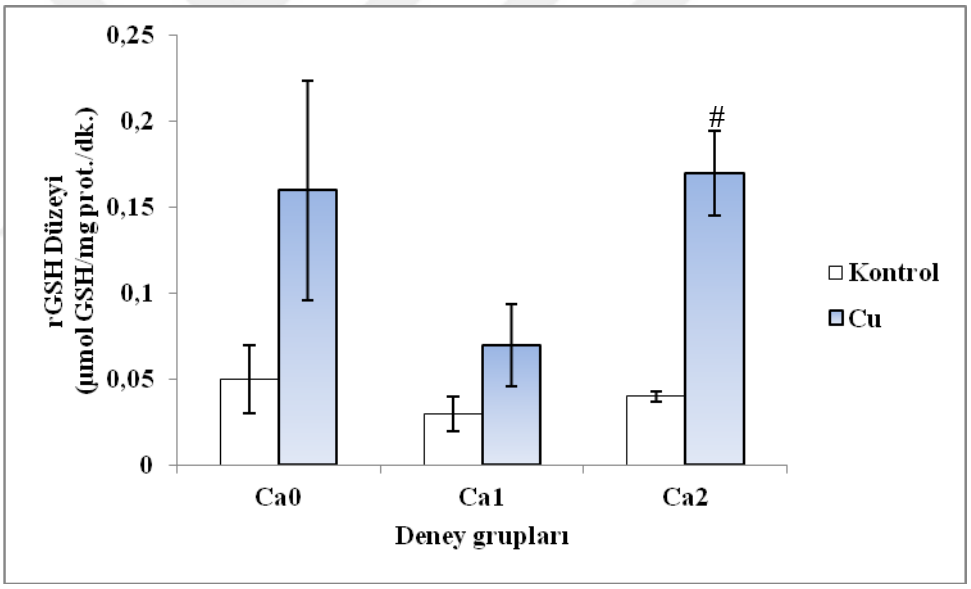
Şekil 4.24. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un karaciğer GPx aktivitesine etkileri. Şekil 4.1 de verildiği gibidir.



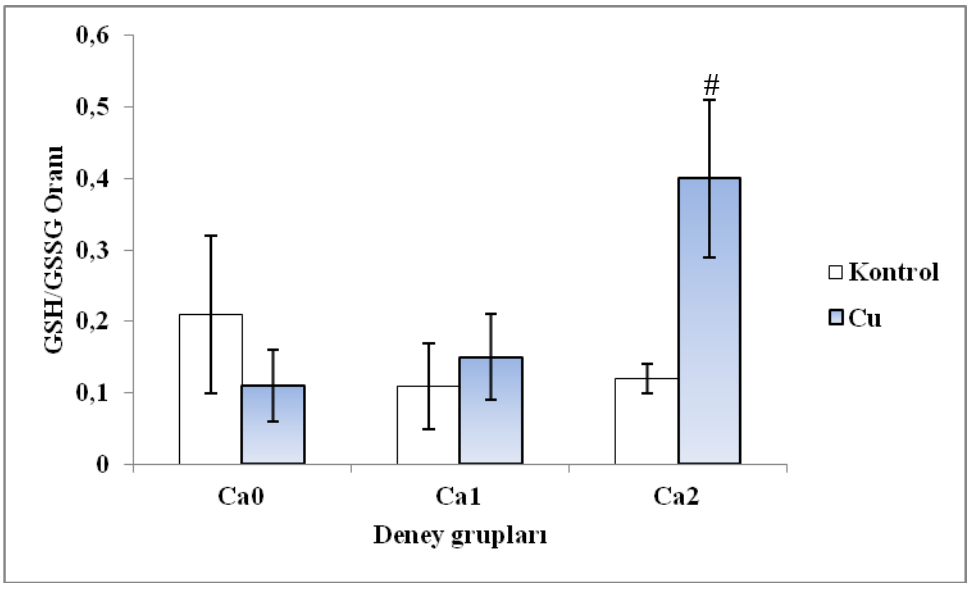
Şekil 4.25. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un karaciğer GSH düzeyine etkileri. Ayrıntılar Şekil 4.1 de verildiği gibidir.



Şekil 4.26. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un karaciğer GSSG düzeyine etkileri. Şekil 4.1 de verildiği gibidir.



Şekil 4.27.Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un karaciğer rGSH düzeyine etkileri. Şekil 4.1 de verildiği gibidir.



Şekil 4.28. Bakırın farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un karaciğer GSH/GSSG düzeyine etkileri. Şekil 4.1 de verildiği gibidir.

4.2. Tartışma

Bu çalışmanın sonuçları ile kalsiyum ve/veya bakır toksisitesi üzerinde kapsamlı bilgiler elde edilmiştir. Akut (3 gün) ve kronik (30 gün) süreçlerde kalsiyum ve/veya bakır etkinde kalan Nil Çupralarında (*O. niloticus*) herhangi bir balık ölümü olmadığı gibi, balıkların yüzme hareketlerinde, beslenme alışkanlıklarında ve morfolojilerinde gözle görülür bir değişim saptanmamıştır. Bu nedenle, bu çalışmanın subletal bakır derişimlerinde yapıldığı ve çevresel olarak uygun şartların test edildiği sonucuna varılabilir. Diğer taraftan, deneylerin farklı kalsiyum (sertlik) düzeylerinde yapılmış olması farklı coğrafik bölgelerde bulunan tatlısuları temsil etmesi bakımından da önemli olmuştur.

Toksik maddelerin oluşturduğu çevresel kirlilik dünyadaki en önemli problemlerden biridir (Chandran ve ark., 2005). Sucul ortamlarda canlı organizmaları tehdit eden, tarımsal, kimyasal ve endüstriyel süreçlerde de kullanımları artmakta olan ağır metal ve pestisit kontaminasyonu tüm dünyada araştırmacıların dikkatini çekmektedir (Dutta ve Dalal, 2008). Sucul türler arasında balıklar, toksik maddelerin kontaminasyonunda hedef canlılardır. Balıklar çoğunlukla sucul ortamın kalitesinin değerlendirilmesinde kullanılmakta ve çevresel kirliliğin biyoindikatörü olarak görev yapmaktadırlar.

O.niloticus, balıkçılık ve balık yetiştiriciliğinde ekonomik önemiyle beraber dünya çapında çok yaygın bir teleost balık türüdür. Farklı ayırt edici özellikleri, büyüme oranlarındaki hız, farklı beslenme koşullarına kolay adaptasyon, hastalıklar ve uygulanan maddelere fazla dirençli olmaları, kolayca üremeleri ve sonuç olarak çevresel şartlara çok iyi tolerans göstermeleri nedeniyle toksikoloji çalışmaları için iyi bir biyolojik modeldir (Fantainhas-Fernandes, 1998). Günümüzün en

önemli sorunlarından biri, sürekli artış gösteren dünya nüfusu için gıdaların tehlikeli bileşenler içermemesini sağlamak ve gıda kaynaklarının bulunmasıdır. Beslenme sorunlarındaki artış ve güvenli gıdaya ulaşımın zorlaşması; gelişen teknolojiyle ekonomik güçsüzlük, bilinçsizlik ve artan çevre kirliliği gibi nedenlerdendir.

Antropojenik aktiviteler sonucu göller ve nehirlere metaller girmekte ve ortamdaki canlı türlerini olumsuz etkilemektedir. Yağmur suları ve akarsuların etkisiyle su ortamına ulaşan ağır metalleri su ortamında yaşayan canlılar besin yolu, sediment ve su ile almakta ve birikim göstererek toksik etki etkiye sebep olmaktadırlar (Douben, 1989; Atlı ve Canlı, 2007; Dogan ve ark., 2015). Su ortamındaki metallerin etkilerinin belirlenmesinde öncelik verilmesi gereken canlılar, besin döngüsünde de önemli bir yere sahip olan balıklardır (Anderson ve ark.,1997; Bervoets ve ark., 2009). Bakır birikimi olan balıklar ağır metal zehirlenmesine yol açıp, güvenli gıda kategorisinde yer almazlar. Örnek verilecek olunursa, kirli içme suyu veya besin zinciriyle bakır zehirlenmesi görülebilmektedir. Balıklar üzerinde metal etkisini osmoregülatör sistem bozulması, doku hasarı, ATPaz aktivitesini inhibe etme ve oksisdatif strese yol açan reaktif oksijen türünde artış ile kendini gösterdiği birçok çalışma ile desteklenmiştir (Roche ve Boge, 1993; Canlı ve Stagg, 1996; Ribeiro ve ark., 2002; Dautremepuits ve ark., 2004; Baysoy ve ark., 2012; Eroğlu ve ark., 2013; Kanak ve ark., 2014; Doğan ve ark., 2015)

Bakırın canlı tüm organizmalar için gereksinim duyulan bir element olduğu gösterilmiştir. Hızlı nüfus artışı ve endüstriyel gelişime bağlı olarak yaygın bir şekilde kullanılan bakır, ekosistemde yer alan canlılarda telafisi olmayan hasarlara ve su ortamının kirlenmesine yol açmaktadır. Canlılarda verimlilik artışında ve suyun sertlik kalitesini belirlemede önemli iyon olan kalsiyum; salgı hücrelerinin aktivasyonunda, elektriksel iletimde kasların kasılmasında, sudaki canlılarda yapısal, enzimlerde kofaktör olarak rol alan biyolojik işlevi açısından oldukça büyük öneme sahip bir iyondur. Ağır metal toksisitesi bakımından su sertliği önemli rol oynamaktadır. Sert suya oranla yumuşak suda metal toksisitesinin daha toksik olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir (Bradley ve Sprague, 1985; Hunn, 1985; Munoz ve ark., 1991; Arrelano ve ark., 1999; Berntssen ve ark., 2003; Matyar ve ark., 2009; Sipahi ve ark., 2013).

Sucul ortamda ağır metallerin etkilerinin suyun fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak değiştiği, karmaşık olduğu bununla birlikte ağır metal gibi kirleticilerin çalışılan parametrelerin aktivitelerini birbiri içerisinde etkiledikleri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. ATPaz enzimleri balık osmoregülasyon sisteminde önemli role sahip olduğundan bu enzimlerin nasıl etkilendiğini araştırmakla birlikte kirliliğin potansiyel biyomarkırı olan antioksidadif savunma mekanizmasında meydana gelen değişimler, bu çalışmanın temel amaçlarını oluşturmaktadır.

Bu çalışmada Cu^{+2} etkisinde kalan tatlısu balığı *O. niloticus*'un kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz, solungaç ve bağırsakta Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktiviteleri ile karaciğer dokusundaki antioksidan enzim aktivitelerinin, 15, 30 ve 90 mg Ca^{+2}/L derişimlerinde metal etkisine verdiği tepkiler akut-3 gün ve kronik-30 süreçlerde incelenmiştir. Yapılan bu çalışmadan

elde edilen sonuçlar göstermiştir ki, akut etki süreci sonunda kontrol gruplarının ATPaz aktivitelerinde hem azalış hem de artış görülürken, Cu^{+2} etkisinde Ca^{+2} derişimindeki artışla solungaç Mg^{+2}-ATPaz ve Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitelerinde değişim olmamıştır. Çalışılan tüm ATPaz aktivitelerinde yüksek Ca^{+2} düzeyinde azalış görülürken, düşük Ca^{+2} düzeyinde bağırsak Mg^{+2}-ATPaz ve Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitelerinde artış görülmüştür. Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinde (kas dokusunda) azalış görülmüştür. Kronik etki sürecindeki kontrol grubu balıklarda kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinde artış ve bağırsak Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi azalırken, solungaç Mg^{+2}-ATPaz ve Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitelerinde değişim olmamıştır. Cu^{+2} etkisine bakıldığında ise Ca^{+2} derişimi arttıkça kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinde azalış görülürken, bağırsak ve solungaç Mg^{+2}-ATPaz ile Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitelerinde değişim olmamıştır.

Genele baktığımızda ise, kontrol grubu (sadece Ca^{+2} etkisi) balıklarda ATPaz aktivitelerinde hem artış hem azalış gözlenirken, metal etkisinde (Ca^{+2}+Cu^{+2}) ise azalış gözlenmiştir. Bağırsaktaki ATPaz aktiviteleri birbirine zıt tepkiler, solungaç Mg^{+2}-ATPaz ve Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktiviteleri akut ve kronik süreç birbirine benzer tepkiler vermiştir. Kronik süreçte kontrol grubu (sadece Ca^{+2} etkisi) balıklarda ATPaz aktiviteleri akut süreçteki kontrolleriyle kıyaslandığında solungaç Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi çalışılan üç derişimde artış göstermezken, Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi sadece 30 mg Ca^{+2}/L olan ortamda azalış göstermiştir. Bağırsak Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi sadece 15 mg Ca^{+2}/L içeren sularda artış gösterirken, Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ve kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi denenen üç derişimde de değişiklik göstermemiştir.

Cu^{+2}'nin balıklarda selüler metabolizma ve tüm ökaryotik hücrelerde respirasyon için gerekli bir elementtir. Intraselüler proteinler, sitokro-c oksidaz ve süperoksit dismutaz gibi enzimleri içeren redox reaksiyonlarında kofaktördür. Bakır konsantrasyonu, el değmemiş sularda nadiren 3 µg/L' ye ulaşmasına rağmen, kirlenmiş sularda 63 µg/L'yi geçebilmekte ve bazı türleri için toksiste sınırına ulaşır (Taylor ve ark., 2003). ATPaz aktivitesinde değişiklikler ve enzimlerin metal etkisine olan duyarlılıkları canlı dokuların kirleticilere karşı oluşturduğu cevap olarak birçok çalışma ile kanıtlanmıştır (Canlı ve Stagg, 1996; Atlı ve Canlı, 2007, 2008c, 2011; Doğan ve ark., 2015). Balıklarda canlılığın sürdürülebilmesi ve fizyolojik olayların gerçekleşebilmesi için gerek hücre içi gerekse hücre dışında iyon derişim dengesinin korunması gerektiği bilinmektedir. Bu dengeyi sağlamak için geliştirilen sistemlere örnek verecek olursak; hücre içinde K^{+} ile hücre dışında Na^{+}'nın yüksek derişimlerde tutulması için Na^{+}/K^{+}-ATPaz sistemi, solungaçlarda aktif iyon taşınımında Ca^{+2}-Mg^{+2} ATPaz ve Na^{+}/K^{+}-ATPaz sistemi, Ca^{+2} ve Na^{+}'nın taşınması için karbonik anhidraz enzimi burada iyon dengesini sağlayarak hücre hacminin regülasyonu ve elektrokimyasal değişimde rol oynamaktadır (Heath, 1987; Canlı ve Stagg, 1996; McGeer ve ark., 2000; Satyavath ve Rao, 2000; Grosell ve ark., 2003; Sloman ve ark., 2003; Rogers ve ark., 2003). 60 kDa ağırlığındaki glikozile β-alt ünitesi ile ~100 kDa ağırlığında olan katalitik alfa (α) alt ünitesinden oluşan, kardiyak glikoziti (steroid türevi) ouabain tarafından inhibe olabilen ve –SH grubu bakımından zengin Na^{+}/K^{+}-ATPaz enzimi; tatlı su teleostlarının (hem tuzlu su hem de tatlı

suda yaşayan) bağırsak, böbrek ve solungaç dokularında içi homeostasisin korunmasında görev almaktadır (Heath., 1987; Diaz ve ark., 1998; Ribeiro ve ark., 2002). Sarkoplazmik retikulum tübüllerinde yer alan Ca^{+2}-ATPaz ise hücre zararı stabilizasyonunu koruma adına sitoplazmadan kalsiyumu taşıyıp hücrede düşük kalsiyum derişimini dengede tutmak için ATP hidrolizinden çıkan enerjiyi kullanmaktadır (Watson ve Beamish, 1981; Saxena ve ark., 2000). Solungaç apikal membranlarında pasif olarak taşınan, protein sentezi ve karbonhidrat metabolizması gibi fizyolojik işlevlerine ilaveten kemik dokusundaki işleviyle de canlılar için en önemli iyonlardan biridir (Flik ve ark., 1993). Balık ATP sisteminde en önemli enerji bağlantılı enzim olan Mg^{+2}-ATPaz, oubaine duyarlı olmayan integral membran proteinidir ve magnezyum iyonlarının derişimi bu enzim tarafından kontrol edilmektedir. Bu iyonun düzeyi ağır metallerin Mg^{+2}-ATPaz'ı inhibe etmesiyle değişebilmekte ve bu inhibisyon oksidatif fosforilasyonu etkilemektedir (Thaker ve ark., 1996; Canlı ve Stagg, 1996; Atlı ve Canlı, 2008b, 2011).

Metallerin etki süresi ve su ortamındaki derişimi ile çevresel faktörlerin (sıcaklık, tuzluluk, pH ve sertlik gibi) toksisiteyi önemli ölçüde etkilediği bilinmektedir (Heath, 1987; Canlı ve Atlı, 2003; Baykan ve ark., 2007; Atlı ve Canlı, 2008 b, 2008 c, 2011). İki değerlikli metaller (Zn^{+2}, Cd^{+2} ve Pb^{+2}) kalsiyum antagonistidir. Yumuşak suda sert suya nazaran ağır metallerin daha fazla çözünerek toksik olduğu ve ağır metallerin canlılar üzerindeki etkiyi suyun sertliğinin değiştirebileceği görülmüştür (Kim ve ark., 2001; Rathor ve Khangarot, 2003; Atlı ve Canlı, 2008 b, 2008 c, 2011). Magnezyum ve kalsiyum oranı doğal ortam koşullarında ağır metallere göre fazla olmakla beraber solungaç membranlarından metallerin geçişi kalsiyum derişimi azaldıkça artmaktadır. Magnezyum ve kalsiyumun hücre membranlarından alımı metal iyonlarına karşı geçirgenliği azaltır ve dengenin sağlanmasına neden olur (Penttinen, 1998; Kim ve ark., 2001). Ca^{+2} emilimi tatlı su balıklarında Na^{+}/Ca^{+2} iyon değiştiricisi başta olmak üzere Ca^{+2}-ATPaz ile de gerçekleştiği bilinmektedir (Flik ve ark., 1993). Ağır metallerden Pb^{+2} ve Cu^{+2}'nin düşük derişimleri bile balıklarda dokulardaki iyon regülasyonunun değiştirmekte, Ca^{+2} homeostasisini bozmakta, osmoregülasyon kapasitesi ve plazma iyon konsantrasyonlarını değiştirmekle beraber solungaçta Ca^{+2} alınımı ile rekabete girerek balık ölümlerine ve hipokalsemiye neden olmaktadır (Lauren ve McDonald, 1985; Lauren ve McDonald, 1987; Viarengo, 1994; McGeer ve ark., 2000; Rogers ve ark., 2003; Atlı ve Canlı, 2011).

Metal derişimi, tipi ve dokuya bağlı olarak ATPaz enzimlerinin tepkilerinin farklılık göstermesiyle birlikte azalış olarak tepki vermesi, diğer çalışmalarla uyumludur (Ay ve ark., 1999; Morgan ve ark., 2004; Silvestre ve ark., 2005; Atlı ve Canlı, 2007, 2008c, 2011; Dogan ve ark., 2015). Kasta Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinde bakır etkisinde görülen azalmaların (hem akut hem de kronik süreçte), bakırın kalsiyum ile yarışarak, kalsiyum tedariğinin yetersiz kalmasına yol açıp enzimin sülfidril (-SH) gruplarına bağlanıp inhibe etmesi ve doku hasarı ya da kalsiyumun iç dengesinin bozulmasından kaynaklanabilmektedir. Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin tiyole bağlanan bileşiklerle inhibe olduğu bilinmektedir (Viarengo, 1991), Cu^{+2} tiyol gruplarına yüksek affinite

gösterir ve tiyol gruplarına bağlanmasıyla bu enzimi inhibe eder. Aynı zamanda Cu^{+2} reaktif oksijen türlerinin oluşmasına yol açar ve serbest radikallerin oluşması Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinde inhibisyon meydana getirdiği bilinmektedir (Rohn, Hinds ve Vincenzi 1993). Bağırsak, değişen dış ortam koşullarına uyumu iyon ve su homeostazisini dengeleyerek sağlamaktadır (Larsson ve ark., 1985; Simkiss ve Taylor, 1989). Bağırsak Na^{+}/K^{+}-ATPaz enzim aktiviteleri kronik süreçte azalış gösterirken, akut süreçte sadece Ca^{+2} etkisinde artış metal etkisinde ise hem artış hem de azalış göstermiştir. Meydana gelen artışlar metallerin direkt etkilerine bağlı olduğu gibi enzimlerin telafi mekanizmaları ve miktarlarıyla da ilgili olabilmektedir. Meydana gelen azalışlar olası uyum mekanizmalarının enzim yapısında önemli değişikliklere yol açmasını engellemede yetersiz kalmasından kaynaklanıyor olabilir. Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin bağırsakta azalış göstermesi, oksidatif fosforilasyonda rolü olan bu enzimin ATP üretiminin indirgenmesine yol açmasından kaynaklanabilmektedir (Parvez ve ark., 2006). Memran yapısını bozan metaller enzimin geçişi için gerekli olan magnezyum iyon alımını inhibe ederler. Solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktiviteleri hem akut hem de kronik etki sürecinde etkilenmemiştir. Bu durum epitelyal taşınımının morfolojik ve fonksiyonel bütünlüğünün bozulması, kirliliğin etkisi, konuya dahil olan kirleticinin dolaylı ya da direkt olarak endokrin sistemde hasar oluşturmasına göre gelişebilmektedir.

Farklı etki süresine bağlı olarak enzim aktivitelerinde (ATPaz) görülen değişiklikler daha önceki çalışmalarda da görülmüştür. Örnek verecek olursak; Bakırın solungaç dokusu üzerine akut etkisinin araştırıldığı balıkların (*Cyprinus carpio* ve *O. mykiss*) Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi azalış göstermesine karşın, kronik etkisinde enzim aktivitesi normale dönmüş veya artmıştır (Lauren ve McDonald, 1987; McGeer ve ark., 2000; De Boeck ve ark., 2007). Bu doktora çalışmasında ise kronik etki sürecinde enzim aktivitelerinde genellikle azalış görülmüştür. Gösterilen olası uyum mekanizmalarının metal toksisitesinin bu etki sürecinde enzim yapısında önemli değişikliklere yol açmasını engellemede yetersiz kalmasından kaynaklı olabileceğini göstermektedir. Bir diğer neden ise dokulardaki yüksek affinitesi olan bölgelere metallerin bağlanması ve metallere duyulan duyarlılık nedeniyle oluşabileceği düşünülmektedir.

Karaciğer dokusunda antioksidan enzim aktivitelerindeki değişikliklere bakacak olursak; Akut süreçte çalışılan enzimler içerisinde sadece GST ~~ve~~ aktivitesinde ve GSH/GSSG oranında anlamlı değişiklikler olmuştur. GST aktivitesinde metal etkisinde 30 mg Ca^{+2}/L içeren sulardaki grupta anlamlı bir azalış görülmüştür. Meydana gelen bu azalış hayatta kalabilmek için toksik kirleticiye yüksek dozda kısa süreli maruz kalmanın meydana getirdiği bir adaptasyon olarak açıklanabilmektedir. GSH/GSSG oranında kontrol grubunda Ca1 (30 mg Ca^{+2}/L) grubunda meydana gelen azalışın değişmeyen antioksidan aktivitelerinin sonucu olabileceği düşünülmektedir. GSH/GSSG oranında metal grubunda 30 mg Ca^{+2}/L içeren sularda meydana gelen artış oksidatif strese karşı koruma olarak açıklanabilmektedir. Çalışılan diğer tüm parametrelerde hem metal etkisinde hem de kontrol gruplarında artış ve azalış olmuş fakat anlamlı olarak değerlendirilmemiştir. Kronik sürece baktığımızda ise; SOD aktivitesinde hem metal hem de

kontrol gruplarında artış görülmüştür. Bu durum reaktif oksijen türleri üretimin eliminasyonu için fizyolojik bir adaptasyon veya serbest radikallerle olan mücadelenin sonucu meydana gelen anlamlı bir aktivite artışıdır. CAT aktivitesinde hem metal hem de kontrol gruplarında azalış görülmüştür. Oksidatif hasarın otokatalizi olarak bilinen süperoksit ve hidroksit radikallerinin maksimum düzeye ulaşmaları sonucu ve metallerin enzimlerin –SH gruplarına bağlanmasıyla CAT aktivitesinde azalışlar meydana gelmektedir. GST aktivitesi metal etkisinde sadece 90 mg Ca^{+2}/L içeren sulardaki grupta anlamlı artış göstermiştir. Bu durum savunma mekanizmasının kirleticilere karşı başladığını göstermektedir. Ağır metallerin etkisiyle oksidatif strese karşı koruyu rol ve adaptasyon durumu olarak GST aktivitesinde artış görüldüğü birçok çalışma ile desteklenmiştir (Paris-Palacios ve ark., 2000). GR ve GPX aktivitelerinde çalışılan tüm ortamlarda herhangi anlamlı bir değişim olmamıştır. GSH, GSSG ve rGSH düzeylerinde metal etkisinde artış görülmüştür. Bu artış, serbest radikallerin ortamdan uzaklaştırıldığının göstergesi ve antioksidan sistemin subkronik süreçte adaptasyonu olarak açıklanabilmektedir.

Genel olarak baktığımızda sunulan çalışmada; enzim aktivitesinde meydana gelen azalışların hücre zarında yapısal hasar sebebiyle zar geçirgenliğinde değişim meydana gelmesinden veya antioksidan ve osmoregülasyon sistemdeki bozulmalardan kaynaklanabilmektedir. Metallerin dokularda oluşturduğu farklılıklarla birlikte antioksidan ve osmoregülasyon sistemde meydana gelen bozukluklar, enzimlerin –SH (sülfidril) gruplarına bağlanarak meydana gelen konformasyonel değişiklikler veya tek ve iki değerlikli iyonlarla yarış halinde olması aktivitede azalmaya neden olmaktadır. Antioksidan sistemler gibi olası onarım ve telafi mekanizmalarının devreye girmesiyle ve adaptasyon geliştirmesiyle özellikle enzim aktivitesinde kronik süreçte artış olarak ortaya çıkmaktadır. Sudaki kirleticilerin balıklarda akut veya kronik etkide artış veya azalış görülebildiği gibi herhangi bir değişiklik de göstermeyebilir (De La Torre ve ark., 2007). Canlı organizmada meydana gelen tüm tepkiler, fizyolojik ve morfolojik bütünlüğünün bozulmasına doğrudan kirleticilerin etkisinin olması, epitelyal taşınımda fizyolojik, morfolojik ve fonksiyonel yapının bozulması veya endokrin sistemde oluşan hasardan kaynaklı olabileceği vurgulanmıştır. Değişen ortam şartlarına enzimlerin verdiği yanıtlar stres sınıflandırmasında ve metabolik uyum düzenlemelerinde büyük bir önem arz etmektedir.

Sudaki canlılar metallerin uzun süreli çok düşük dozdaki etkileriyle beraber kısa süreli yüksek dozdaki etkilerine de maruz kalmaktadır. Sucul canlılarda akut ve kronik strese bağlı olarak morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikler gözlenebilmektedir. Toksik maddeye karşı kronik süreçte meydana gelen dirençliliğe bağlı olarak olası uyum mekanizmaları gelişebilmektedir, bu sebeple kısa süreli yüksek dozda etkilerinin sonuçlarına bakmanın yanı sıra uzun süreli düşük dozda metal etkilerinin değerlendirilmesi çevresel risk değerlendirmesi açısından daha büyük öneme sahiptir (McDonald ve Wood, 1993; Silvestre ve ark., 2005).

Bu çalışmasının verileri ile balıkların metabolik faaliyetleri, kullanılan suyun fizikokimyasal özellikleri, su ortamında metal kirliliğinin canlı organizmalara olan etkisinin

belirlenmesinde önemli bir parametre olabileceğini ve çevresel etki değerlendirmeleri yapılırken mutlaka dikkate alınması gerektiğinin altı çizilmiştir. Bununla beraber deneye konu olan balıklarda çevresel kirliliğin belirlenmesinde erken uyarıcı sistem olarak bilinen ATPaz enzimlerinin biyobelirteç olarak kullanılabileceğini vurgulamaktadır. Öte yandan ağır metallerden sucul canlıların nasıl ve ne oranda etkilendiklerini tespit edebilmek için antioksidan ve enzimatik olmayan sistemlerde yer alan biyokimyasal parametreler kullanılarak daha aydınlatıcı bilgiler elde edilebilir. Diğer taraftan hem akut hem de kronik süreçlerde bütün bakır derişimlerinde balık ölümünün olmaması, yüzme ve beslenme davranışının değişmemesi çalışma koşullarının subletal olduğunu vurgularken, buna rağmen ozmoregülasyon ve antioksidan sisteminin önemli tepkiler vermeleri toksikolojik açıdan çok önemli bulunmuştur.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

O. niloticus 15 (Ca0), 30 (Ca1) ve 90 (Ca2) mg Ca^{+2}/L ve ayrıca 0,3 µM-akut ve 0,03 µM-kronik derişimlerindeki bakır klorür dihidrat ($CuCl_2.2H_2O$) ile 0 (Ca0), 30 (Ca1) ve 90 (Ca2) mg Ca^{+2}/L'nin birlikteki etkisine farklı sürelerde (3 gün-akut ve 30 gün-kronik) bırakılmıştır. Akut ve kronik süre sonunda balıklarda Na^+/K^+-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz (solungaç ve bağırsak) ile Ca^{+2}-ATPaz (kas) aktivitesiyle birlikte karaciğer dokusunda antioksidan enzim aktivitelerine bakılmıştır. Balıklarda ATPaz aktiviteleri metal etkisi sonucunda akut ve kronik etki süresinde (3-30 gün) önemli değişiklikler göstermiştir. Kontrol grubunda akut süreçte bağırsak Mg^{+2}-ATPaz ve Na^+/K^+-ATPaz aktiviteleri birbirine zıt tepkiler verirken, metal etkisinde etki süresi, farklı sertlik düzeyleri ve dokuya bağlı olarak genellikle azalış göstermiştir. Kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi hem kontrol hem Cu^{+2} etkisinde benzer yönde eğilim göstermiştir. Kontrol gruplarında kronik süreçte (30 gün) hem azalış hem artış görülmüştür. Cu^{+2} etkisinde solungaç dokusunda Mg^{+2}-ATPaz ve Na^+/K^+-ATPaz ile bağırsak Mg^{+2}-ATPaz aktiviteleri değişim göstermezken, Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi kas dokusunda azalış göstermiştir. Akut sürecin kendi kontrolüne göre kronik süreçle kıyaslanmasında ATPaz aktivitelerine bakıldığında ise solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi sadece Ca1 içeren sularda azalış gösterirken, bağırsak Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi Ca0 içeren sularda artış göstermiştir. Solungaç dokusunda Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi her üç derişimde de artış gösterirken, bağırsaktaki Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi ve kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi değişim göstermemiştir. Bağırsaklar en fazla etkilenen doku, solungaçlar en az etkilenen doku olurken, toplam protein düzeyleri ise genel olarak herhangi bir değişiklik göstermemiştir. Akut süreçte çalışılan enzimler içerisinde sadece GST ve aktivitesinde ve GSH/GSSG oranında anlamlı değişiklikler olmuştur. GST aktivitesinde metal etkisinde 30 mg Ca^{+2}/L içeren sulardaki grupta anlamlı bir azalış görülmüştür. Çalışılan diğer tüm parametrelerde hem metal etkisinde hem de kontrol gruplarında artış ve azalış olmuş fakat anlamlı olarak değerlendirilmemiştir. Kronik süreçte ise; SOD aktivitesinde hem metal hem de kontrol gruplarında artış görülmüştür. CAT aktivitesinde hem metal hem de kontrol gruplarında azalış görülmüştür. GST aktivitesi metal etkisinde sadece 90 mg Ca^{+2}/L içeren sulardaki grupta anlamlı artış göstermiştir. GR ve GPX aktivitelerinde çalışılan tüm ortamlarda herhangi anlamlı bir değişim olmamıştır. GSH, GSSG ve rGSH düzeylerinde metal etkisinde artış görülmüştür.

5.2. Öneriler

Bu doktora çalışmasında su sertliğiyle birlikte bakırın solungaç, bağırsak ve kas ATPaz aktiviteleri ve karaciğer antioksidan sistem parametrelerinde meydana gelen değişimler incelenerek, ozmoregülasyon ve antioksidan sistemin metal kirliliğinde biyobelirteç olarak kullanılabilitesini göstermek üzere planlanmıştır. Su sertliği başta olmak üzere metal toksisitesini etkileyen faktörler arasında tuzluluk, içeriğindeki organik madde miktarı ve pH yer almaktadır. Suyun bunlar dışında

kalan diğer kimyasal özellikleri de çalışarak daha kapsamlı ve karşılaştırmalı sonuçlar ortaya konabilir. Yapay ortamda (laboratuvar) gerçekleştirilen deneyler dışında doğal yaşam alanında balıkların karşı karşıya kaldığı bakır dışında diğer inorganik kirleticilerin toksik etkilerinin belirlenmesi için yapılan çalışmalarla sağlık riski değerlendirmesi kapsamında çok daha doğru sonuçlar elde edilebilir. Metal etkileşiminde farklı metaller kullanılarak ya da farklı balıklar ile çalışılarak, türler arası karşılaştırma yapılıp metal toksisitesine duyarlılık ve dirençlilik ölçülebilir. Erken uyarıcı sistem olarak bilinen ATPaz ve antioksidan enzimlerle beraber metal toksisitesinin belirlenmesinde diğer enzimatik sistemlerle birlikte enzimatik olmayan sistemlerde (metallothionein ve redükte glutatyon gibi) yer alan biyokimyasal parametreler de kullanılarak metal etkileri incelenebilir. Aynı sucul organizmanın farklı türlerinde ve farklı sucul organizmalarda antioksidan ve osmoregülasyon sistemlerle metal toksisitesine duyarlı belirteçler kullanılarak dirençli ve duyarlı türler karşılaştırılabilir. Su sertliği ve metal türüne bağlı olarak yaptığımız bu çalışmanın yanında suyun farklı fiziksel ve kimyasal özellikleri (tuzluluk ve alkalinite gibi) göz önünde bulundurularak ATPaz ve antioksidan enzim aktiviteleri ölçülebilir. Çevresel risk değerlendirmede ve biyolojik molekül düzeyinin belirlenmesinde faydalı olan metallerin sebep olduğu doku hasarlarının gözlenebilmesi için doku histolojisine de yer verilebilir. Kirliliğin olduğu yerlerde çevresel risk değerlendirme kapsamında metallerin tek başına değil birlikte de bulunabilecekleri göz önüne alınarak etkileri incelenebilir. Dışarıdan alınan reaktif oksijenler canlı organizma metabolizmasında devamlı meydana gelen oksidasyon olaylarını hızlandırmaktadır. Canlı vücudunda serbest radikallerin artışıyla hücre hasarları oluşur ve sağlık açısından önemli sorunlar oluşturabilir. Serbest radikallerdeki bu artış nedeniyle kardiyovasküler hastalıklar, boşaltım ve solunum sisteminde bozulmalar, gastrointestinal hastalıklar ve infertilite gibi birçok soruna sebep olabilir. Serbest radikallerin olumsuz etkilerinden kurtulmak için yeterli miktarda antioksidan alımı ve dengeli beslenme gereklidir. Oksidan kaynaklı hastalıkların görülme riskinin azalması, daha uzun ve kaliteli bir hayat sürülebilmesi için savunma mekanizması olarak antioksidanlar önerilebilir.

KAYNAKLAR

Abdullah A.S, Vijculata P, Sivarajasingam S, Ragavan K. 1987. Haematologlogic and growth response to prepartum administration of vitamin A in in calves. Growth. 51: 198-201.

Abele, D., Vazoquez-Medina, J. P., Zentano-Savin, T. (2012). Oxidative stress in aquatic ecosystems. Wiley-Blackwell, UK. ISBN 978-1-4443-3548-4

Ali, B. A., Al-Ogaily, S. M., Al-Asgah, N. A., Gropp, J: 2003. Effect of sublethal concentrations of copper on the growth performance of Oreochromis niloticus. J Appl Ichthyol, 19, 183-188.

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

Anderson, M.B., Preslan, J.E., Jolıboıs, L., Bollınger, J.E., Gearge, W.J., 1997. Bioaccumulation of lead nitrate in red swamp clayfish (*Procambarus clarkii*). Journal of Hazardous Materials, 54: 15-29.

Annabi Berrahal A, Nehdi A, Hajjaji N, Gharbi N, El-Fazâa S. 2007. Antioxidant enzymes activities and bilirubin level in adult rat treated with lead. Comptes Rendus Biologies, 330; 581-588

Arellano JM, Storch V, Sarasquete C (1999) Histological Changes and Copper Accumulation in Liver and Gills of the Senegales Sole, Solea senegalensis. Ecotoxicology and Environmental Safety 44: 62-72.

Arıyoshı, T., Shıiba, S., Hasegawa, H., and Arızono, 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.

Atlı, G. (2021). Affiliation: Cukurova University, Biotechnology Center, Adana, Turkey. DOI: 10.4194/1303-2712-v19_5_01.

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

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

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

Atlı, G., and Canlı, 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.

Atlı, G., and Canlı, 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.

Atlı, G., and Canlı, 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.

Awoyemi OM, Bawa-Allah KA, Otitoloju AA. 2014. Accumulation and anti-oxidant enzymes as biomarkers of heavy metal exposure in Clarias gariepinus and Oreochromis niloticus. Applied Ecology and Environmental Sciences, 2(5): 114-122

Ay, Ö., Kalay, M., Tamer, L., and Canlı, 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.

Bai S.C, Gatlin D.M. 1992. Dietary vitamin E concentration and duration of feeding affect tissue α-tokopherol concentrations of channel catfish (Ictalurus punctatus). Aquaculture. 113: 130-135.

Baker, R.T.M., Handy, R.D., Davies, S.J., Snook, J.C. (1998). Chronic dietary exposure to copper affects growth, tissue lipid peroxidation, and metal composition of the grey mullet, Chelon labrosus. Mar. Environ. Res., 45: 357–365. DOI: 10.1016/S0141- 1136(98)00098-1

Baldısserotto, 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.

Baldısserotto, 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.

Baldısserotto, 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.

Banudevi S, Krishnamoorthy G, Venkataraman P, Vignesh C, Aruldash M.M, Arunakaron J. 2006. Role of α-tocopherol on antioxidant status in liver, lung and kidney of PCP exposed male albino rats. Food and Chemical Toxicology. 10: 243-252.

Barata, C., Varo, I., Navarro, J.C., Arun, S., Porte, C. (2005). Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran Daphnia magna exposed to redox cycling compounds. Comp. Biochem. Physiol., C 140: 175–186. DOI: 10.1016/S0166-445X(97)00047-7

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

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

Baykan, U., Atlı, G., and Canlı, 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.

Baysoy, E., Atli, G., Gürler, C.Ö., Dogan, Z., Eroglu, A., Kocalar, K., & Canli, M. (2012). The effects of increased freshwater salinity on the biodisponibility of metals (Cr, Pb) and effects on antioxidant systems of Oreochromis niloticus. Ecotoxicology and Environmental Safety, 84, 249-253.

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., Covacı, 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

Bopp, S.K., Abicht, H.K., Knauer, K. (2008). Copper-induced oxidative stress in rainbow trout gill cells. Aquat. Toxicol., 86: 197–204. DOI: 10.1016/j.aquatox.2007.10.014

Bradley, R. W. And Sprague, J. B., 1985. Accumulation of zinc by Rainbow Trout as influenced by pH, water hardness and fish size. Environmental Toxicology and Chemistry. 4, 685-694

Brauner J.C. 1999. The effect of diet and short duration hyperoxia exposure on seawater transfer in coho salmon smolts (Oncorhynchus kisutch). Aquaculture. 177: 257-265.

Brusle, J., Anadon G. G., 1996. The structure and function of fish liver. In: Fish Morphology, (eds) J.S.D. Munshi & H.M. Dutta. Science Publishers Inc. CRC pres. 77-83.

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.

Campana, O., Saraquete, C. and Blasco, J., 2003. Effect of Lead on ALAD Activity, Metallothionein Levels, and Lipid Peroxidation in Blood, Kidney, and Liver of the Toadfish Halobatrachus didactylus. Ecotoxicol. and Environ. Safe., 55: 116–125

Canesı, L., Cıaccı, C., Pıccolı, G., Stocchı, V., Vıarengo, A., and Gallo, G., 1998. In Vitro and In Vivo Effects of Heavy Metals on Mussel Digestive Gland Hexokinase Activity: The Role of Glutathione. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 120: 261-268.

Canlı, E. G., Atlı, G., & Canlı, M. (2016). Responses of the antioxidant and osmoregulation systems of fish erythrocyte following copper exposures in differing calcium levels. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 97(5), 601-608.

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

Canlı, 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.

Canlı, 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.

Carlberg, I., & Mannervik, B. (1975, July 25). Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. Journal of Biological Chemistry, 250(14), 5475-5480. PMID: 237922.

Cazenave, J., C. Bacchetta, M. J. Parma, P. A. Scarabotti & D. A Wunderlin. 2009. Multiple biomarkers responses in Prochilodus lineatus allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe Argentina). Environmental Pollution, 157: 3025-3033

Chandran R, Sivakumar AA, Mohandass S, Aruchami M (2005) Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. Comp Biochem Physiol 140C:422–426. doi:10.1016/j.cca.2005.04.007

Choi W, Benzic F, Collins A, Hannigon M, Strain J. 2004. Vitamin C and E: Acut ınteractive effects on biomarkers of antioxidant defance and oxidative stres. Mutation Research. 551: 109-117.

Cicik, 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

Cinier, C. De C., Petit-Ramel, M., Faure, R., Garin, D. And Bouvet, Y. 1999. Kinetics of cadmium accumulation and elimination in carp Cyprinus carpio tissues. Comparative Biochemistry and Physology. 122, 345-352.

Couture, P., and Kumar, P.R., 2003. Impairment of Metabolic Capacities in Copper and Cadmium Contaminated Wild Yellow Perch (Perca flavescens). Aquatic Toxicology, 64: 107-120.

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

Craig, P.M., Wood, C.M., McClelland, G.B. (2007). Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (Danio rerio). Am. J. Physiol., 293: 1882–1892. DOI:10.1152/ajpregu.00383.2007

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.

Dautremepuits C., Betoulle S., Vernet G. 2003. Stimulation of antioxidant enzymes levels in carp (Cyprinus carpio L.) infected by Ptychobothrium sp. (Cestoda). Fish and Shellfish Immunology, 15: 467- 471.

Dautremepuits, C., Marcogliese, D.J., Gendron, A.D., Fournier, M., 2009. Gill and kidney antioxidant processes and innate immune system responses of yellow perch (Perca flavescens) exposed to different contaminants in the St. Lawrence River, Canada. Science of the Total Environment 407, 1055-1064.

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 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.

Demir, N. (1992). İhtiyoloji. İstanbul Üniversitesi Yayınları Sayı: 3668, Fen Fakültesi Basımevi No: 219, İstanbul, 116-117.

Demirsoy, A. (1992). Yaşamın Temel Kuralları, Cilt 1, Kısım 2. Meteksan Yayınları, Ankara.

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., Cozzı, 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.

Doğan, Z., Atlı, G., and Canlı, M., 2015. Effects of Lead on ATPases in Tissues ff Freshwater Fish (*Oreochromis niloticus*) in Differing Calcium Levels. Tr. J. Fish. Aq. Sci., 15(2): 223-233.

Doğan, Z., Eroğlu, A., Kanak, E.G., Atlı, G., and Canlı, M., 2014. Response of Antioxidant System of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Following Exposure to Chromium and Copper in Differing Hardness. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 92(6), 680-686.

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.

Doyotte, A., Cossu, C., Jacquın, M.C., Babut, M., and Vasseur, R., 1997. Antioxidant Enzymes, Glutathione and Lipid Peroxidation as Relevant Biomarkers of Experimental or Field Exposure in the Gills and the Digestive Gland of the Freshwater Bivalve Unio turnidus. Aquatic Toxicology, 39: 93- 110.

Dunn, G.M. ve Bull, A.T. 1983. Bioaccumulation of copper by a defined community of activated sludge bacteria. European J. Appl. Microbiology. Biotechnology, (17), 30-34

Dutta HM, Dalal R (2008) The effect of endosulfan on the ovary of bluegill sunfish: a histopathological study (*Lepomis macrochirus* sp). Int J Environ Res 2:215–224

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.

Eısler, 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.

Elia AC, Galarini R, Taticchi MI, Dörr AJM, Mantilacci L. 2003. Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. Ecotoxicology and Environmental Safety 55:162–167. 10.1016/S0147-6513(02)00123-9

Elumalai, M., Antunes, C., and Guilhermino, L., 2002. Effects of Single Metals and Their Mixtures on Selected Enzymes of Carcinus maenas. Water, Air and Soil Pollution, 141: 273-280.

Eroğlu, A., and Canlı, M., 2013. Effects of Cd, Zn and Cd+Zn Combination on ATPase Activitiy in the Gill and Muscle of Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 91(4): 420-425.

Fang Y.Z, Yang S, Wu G. 2002. Free radicals, antioxidants and nutrition. Nutrition, 18: 872-879.

Fange, R., & Nilsson, S. (1985). The fish spleen: Structure and function. Experientia, 41, 152-158.Flajnik, M.F., 1998. Churchill and the immuno system of ectothermic vertebrates. Immunol. Rev., 166:199- 120.

Fernandes A., Cromorty D, Albercht C, Jonson C. 2004. The antioxidant potential of sutherlandia frutescens. Journal of Ethnopharmacology. 95: 1-5.

Fernandes C, Fontainhas-Fernandes A, Ferreira M, Salgado MA. 2008. Oxidative stress response in gill and liver of Liza saliens, from the Esmoriz–Paramos Coastal Lagoon Portugal. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 55(2): 262-269.

Ferreira, C. S., Madureira, L. S., Klippel, S., Weigert, S., Habiaga, R. G. P. & Duvoisin, A. C. 2005. Mapas do Relevo marinho das regiões sudeste, sul e central do Brasil: acústica e altimetria. Série documentos REVIZEE: Score Sul. São Paulo. 40p. ISBN 85-98729-10-8.

Filho D.W. 2007. Reactive oxygen species, antioxidants and fish mitocondria. Frontiers in Bioscience 12 (1): 1229-1237.

Firidin, G. (2019). Oreochromis niloticus'un Kas Dokusunda Glutathione S -Transferaz Aktivitesi, Glutatyon ve Protein Miktarı Üzerine Bakır ve Bakırın Kalsiyum Karışımlarının Etkisi. Aquatic Sciences and Engineering, 15(2), 181-187.

Flik, G., Van Rıjs, 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.

Fontainhas-Fernandes AA (1998) Tilapia production. In: Reis-Henriques MA (ed) Aquaculture handbook. Academic Press, California, pp 135–150.

Franklin, N.M., Glover, C.N., Nıcol, 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.

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.

Gopia, N., Vijayakumar, S., Rajagopalan, R., Govindarajan, T., Alharbie, N. S., Kadaikunnane, S., Vaseeharan, B. (2019). Chronic exposure of Oreochromis niloticus to sub-lethal copper concentrations: Effects on growth, antioxidant, non-enzymatic antioxidant, oxidative stress, and non-specific immune responses. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 55, 170-179.

Gök V, Kayacıer A, Telli R. 2006. Hayvansal ve mikrobiyal kaynaklı doğal antioksidanlar. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi. 2: 35-40.

Griffith, O. W. (1980, July 15). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. Analytical Biochemistry, 106(1), 207-212. doi: 10.1016/0003-2697(80)90139-6. PMID: 7416462.

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.

Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974, Kasım 25). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. Journal of Biological Chemistry, 249(22), 7130-7139. PMID: 4436300.

Hamed, R.R., Farid, N.M., Elowa, S.H.E. & Abdalla, A.M. (2003). Glutathione related enzyme levels of freshwater fish as bioindicators of pollution. The Environmentalist, 23:313–322.

Hansen, B.H., Rømma, S., Garmo, Ø.A., Olsvik, P.A., Andersen, R.A. (2006a). Antioxidative stress proteins and their gene expression in brown trout (Salmo trutta) from three rivers with different heavy metal levels. Comp. Biochem. Physiol., C 143: 263–274. DOI:10.1016/j.cbpc.2006.02.010

Hansen, B.H., Rømma, S., Søfteland, L.I., Olsvik, P.A., Andersen, R.A. (2006b). Induction and activity of oxidative stress-related proteins during waterborne Cuexposure in brown trout (Salmo trutta). Chemosphere, 65: 1707–1714. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2006.04.088

Hard, S., Wrathmell, A. B., Harris, J. E., & Grayson, T. H. (1988). Gut immunology in fish: A review. Developmental and Comparative Immunology, 12, 453-480.

Hazma-Chaffaı, A., Romeo, M., Gnassıa-Barelli, M., and El Abed, A., 1998. Effect of Copper and Lindane on Some Biomarkers Measured in the Clam Ruditapes decussatus. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 61: 397-404.

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

Heiske K. 2005. Interaction of oxygen supply, oxidative stress and molecular defence system during temparature stress in fish. Dem Fachbereich Biologie Der Üniversitat, Brama, 1-223.

Henczova, M., Deer, A.K., Filla, A., Komlosı, V. and MINK, J., 2008. Effects of Cu2+ and Pb2+ on Different Fish Species: Liver Cytochrome P450- dependent Monooxygenase Activities and FTIR Spectra. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 148: 53-60.

Hinton, D.E., Couch J.A., 1984. Pathological measures of marine pollution effects. In:Concepts in marine pollution measurements, (ed) H. White. University of Maryland, Sea Grant College, College Park.

Hogstrand, C., Ferguson, E.A., Galvez, F., Shaw, R., Webb, N.A., and Wood, C.M., 1999. Physiology of Acute Silver Toxicity in the Starry Flounder (*Platichthys Stellatus*) in Seawater. Journal of Comparative Physiology B, 169: 461-473.

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

Hoyle, I., Shaw, B.J., Handy, R.D. (2007). Dietary copper exposure in the African walking catfish, Clarias gariepinus: transient osmoregulatory disturbances and oxidative stress. Aquat. Toxicol., 83: 62–72. DOI: 10.1016/j.aquatox.2007.03.014

Hu H., 2000. Exposure to metals. Occupational and Environmental Medicine, 27, 983-996.

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 Mugıya, 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.

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.

Jee, J., Masroor, F. and Kang, J., 2005. Responses of Cypermethrin-induced Stres in Hematological Parameters of Korean Rockfish, Sebastes schlegeli(Hilgendorf). Aquatcult. Res., 36: 898-905.

Jiraungkoorskul W., Upatham E.S., Kruatrachue M., Sahaphong S., Vichasri-Grams S. & Pokethitiyook P. 2003. Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Environ. Toxicol. 18:260-267.

Jorge, M. B., Loro, V. L., Bianchini, A., Wood, C. M., Gillis, P. L. (2013). Mortality, bioaccumulation and physiological responses in juvenile freshwater mussels (Lampsilis siliquoidea) chronically exposed to copper. Aquat. Toxicol., 126:137-147. DOI: 10.1016/j.aquatox.2012.10.014

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.

Kamunde, C., Clayton, C., Wood, C.M. (2002). Waterborne vs. dietary copper uptake in rainbow trout and the effects of previous waterborne copper exposure. Am. J. Physiol., 283: 69–78. DOI:10.1152/ajpregu.00016.2002

Kanak, E. G., Dogan, Z., Eroglu, A., Atli, G., & Canli, M. (2014). Effects of fish size on the response of antioxidant systems of Oreochromis niloticus following metal exposures. Fish Physiology and Biochemistry, 40(4), 1083-1091.

Kartal G., Kahvecioðlu Ö., Güven A., Timur S., (2004), "Metallerin Çevresel Etkileri-II" , Metalurji Dergisi, s. 46-51, Sayý 137

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.

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

Lawrence, A. J., & Hemingway, K. L. (2003). Effects of Pollution on Fish. In: "UK", s. 144-153.

Lenka, S., Kamila, K., & Zdenˇka, S. (2014). Mercury speciation in fish muscles from major Czech rivers and assessment of health risks. Food Chemistry, 150, 360–365.

Lionetto, M. G., Caricato, R., Giordano, M. E., Pascariello, M. F., Marinoscı, L. and Schettino, T., 2003. Integrated Use of Biomarkers (Acetylcholinesterase and Antioxidant Enzymes

Activities) in Mytilus galloprovincialis and Mullus barbatus in an Italian Coastal Marine Area. Mar. Poll. Bull., 46: 324–330.

Livingstone, D.R., F. Lips, P. Garcia Martinez and R.K.Pipe 1992. Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel Mytilus edulis. Mar. Biol. 112:265-276.

Lloyd, R., 1992. Pollution and Freshwater Fish, Fishing new books. 77-85

Lopes, P.A., Pinheiro, T., Santos, M.C., Mathias, M.L., Collarespereira, M.J., and Viegas-Crespo, A.M., 2001. Response of Antioxidant Enzymes in Freshwater Fish Populations (Leuciscus alburnoides complex) to Inorganic Pollutants Exposure. The Science of the Total Environment, 280: 153-163.

Macdonald, A., Silk, 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.

Malins, D.C., Mccaın, B.B., Landahl, J.T., Meyers, M.S., Krahn, M.M., Brosn, D.W., Chan, S.L., and Roubal, W.T., 1988. Neoplastic and Other Diseases in Fish in Relation to Toxic Chemicals: An overview. Aquatic Toxicology, 11: 43-67.

Manduzio, H., Monsinjon, T., Galap, C., Leboulenger, F., Rocher, B., 2004. Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels Mytilus edulis collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. Aquatic Toxicology, 70, 83-93.

Mansouri, B. And Baramaki, 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.

Matyar, F., Eraslan, B., Akkan, T., Kaya, A., Dinçer, S. 2009. İskenderun Körfezi balıklarından izole edilen bakterilerde antibiyotik ve ağır metal dirençliliklerinin araştırılması. Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi 2 (2), 1-5.

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.

McLean J.A, Karadas F, Surai P.F, McDevitt R.M, Speake B.K. 2005. Lipidsoluble and water-soluble antioxidant activities of the avian intestinal mucosa at different sites along the intestinal tract. Comparative Biochemistry and Physiology. 141:366-372.

Monteıro, S.M., Mancera, J.M., Fontaınhas-Fernandes, A. and SOUSA, M., 2005. Copper Induced Alterations of Biochemical Parameters in the Gill and Plasma of Oreochromis niloticus. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 141: 375-383.

Morgan, 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.

Mudipalli A. 2007. Lead hepatotoxicity and potential health effects. Indian J. Med. Res. 126, 518–527

Munoz, M. J., Carballo, M. And Tarazona, J. V. 1991. The effect of sublethal levels of copper and cyanide on some biochemical parameters of Rainbow Trout Along Subacute Explotion. Comparative Biochemistry and Physiology. 100C, 3; 577-582.

Naddy, R. B., W. A. Stubblefield, J. R. May, S. A. Tucker, and J. R. Hockett. 2002. The effect of calcium and magnesium ratios on the toxicity of copper to five aquatic species in freshwater. Environmental Toxicology and Chemistry 21:347-352.

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.

Noyan, A. (1993). Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji. 17. Baskı. Ankara: Ocak Yayınları.

Olsvik, P.A., Gundersen, P., Andersen, R.A., and Zacharıassen,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.

Paris-Palacios, S., Biagianti-Rısborg, S. and Vernet, G. 2000. Biochemical and (Ultra)structual Hepatic Perturbations of Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) Exposed to Two Sublethal Concentrations of Copper Sulate. Aquatic Toxicology., 50; 109-124.

Parvez, S., Sayeed, I., and Raısuddin, 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.

Pedrajas, J.R., Peinado, J., López-Barea, J. (1995). Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu,Zn-superoxide dismutase as potential biomarkers. Chem. Biol. Interact., 98: 267–282.

Pelgrom, S. M. G. J., Lock, R. A. C., Balm, P. H. M. and Wendelaar Bonga, S. E. 1995. Integrated Physiological Response of Tilapia, Oreochromis mossambicus, to sublethal copper exposure. Aquatic Toxicology. 32, 303-320.

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.

Pereira P, Pablo HD, Vale C, Pacheco M (2010) Combined use of environmental data and biomarkers in fish (Liza aurata) inhabiting a eutrophic and metal contaminated coastal system gills reflect environmental contamination. Mar Environ Res 69:53–62

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.

Quiles J, Huertas J, Batine M, Mataix J, Tortosa C. 2002. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. Toxicology. 180: 79- 95.

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.

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.

Regoli, F. and Principato, G., 1995. Glutathione, Glutathione-dependent and Antioxidant Enzymes in Mussel, Mytilus galloprovinciallis, Exposed to Metals under Field and Laboratory Conditioons: Implications for the Use of Biochemical Biomarkers. Aquatic Toxicology, 31: 143-164.

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.

Ricciarelli R, Argellati F, Pronzato M, Donenicotti C. 2007. Vitamin E and neurodegenerative diseases. Molecular Aspects of Medicine. 27: 2067-2997.

Ritola O, Livingstone D.R, Peters L.D, Lind P.S. 2002. Antioksidant processes are affected in juvenile rinbow trout (Oncorhynchus mykiss) exposed to G. Tuna Keleştemur ve Y. Özdemir / Derleme Dergisi, 4(1): 69-73, 2011 73 ozone and oxygen-supersaturated water. Aquaculture. 210: 1-19.

Roche, H. and Boge, G., 1996. Fish Blood Parameters as a Potentiol Tool for Identification of Stress Caused by Environmental Factors and Chemical Intoxication. Marine Environmental Research, 41: 27-43.

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., 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.

Sanchez W, Palluel O, Meunier L, Coquery M, Porcher JM, Aït-Aïssa S (2005): Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. Environmental Toxicology and Pharmacology 19, 177–183.

Sancho, E., Fernandez-Vega, C., Ferrando, M.D., and Andreu-Molıner, E., 2003. Eel ATPase Activity as Biomarker of Thiobencarb Exposure. Ecotoxicology and Environmental Safety, 56: 434–441.

Sarıhan, 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.

Schüürmann, G. and B. Markert: (1998). Ecotoxicology, ecological fundamentals, chemical exposure, and biological effects, John Wiley & Sons, Inc. and Spektrum Akademischer Verlag, pp. 900.

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.

Shiau S.Y, Hsu Y.C. 2002. Vitamin E sparing effect by dietary vitamin C in juvenile hybrid tilapia (Oreochromis niloticus× O. aureus). Aquaculture, 210: 335-342

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.

Sipahi, N., Mutlu, C., Akkan, T., 2013. Giresun İlinde Tüketime Sunulan Bazı Balıklardan İzole Edilen Enterobacteriaceae Üyelerinin Antibiyotik ve Ağır Metal Dirençlilik Düzeyleri. GIDA, 38(6):343- 349, doi: 10.5505/gida.2013.55264.

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.

Sun T, Hu C. 2005. Antioxidant activites of buckweat extracts. Food Chemistry. 90: 743-749.

Sunlu, U., Egemen, Ö. (1998). Homa Dalyanı ve İzmir Körfezi'nin (Ege Denizi) Farklı Bölgelerindeki Kirlenme Durumu ile Bazı Ekonomik Balık Türlerinde Ağır Metal Düzeylerinin Araştırılması. Su Ürünleri Dergisi, 15(3-4), 241-261.

Tagliari, K.C., Vargas, V.M.F., Zimiani, K., and Cecchini, R., 2004. Oxidative Stress Damage in the Liver of Fish and Rats Receiving an Intraperitoneal Injection of Hexavalent Chromium as Evaluated by Chemiluminescence. Environmental Toxicology and Pharmacology, 17: 149–157.

Taylor, L.N., Wood, C.M., McDonald, D.G., 2003. An evaluation of sodium loss and gill metal binding properties in rainbow trout and yellow perch to explain species differences in copper tolerance. Env. Toxicol. Chem. 22, 2159–2166.

Ternes, W. (1994). Naturwissenschaftliche Grundlagen der Lebensmittelzubereitung (2. Auflage). Behr’s Verlag, Hamburg, Deutschland.

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.

The Effect of Waterborne Mercury and Nickel on the ATPases and AChE Activities in the Brain of Freshwater Fish (*Oreochromis niloticus*) Depending on the Ca^{2+} Concentrations

Timur, G. (2013). Balık Histolojisi ve Embriyolojisi. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yayın No:15. İstanbul, 275s.Buddington, R.K., 2000. Digestive System in The Laboratory Fish, 379-383, Ed. Ostranders G.K., Academic Press, London. pp 663

Trenzado C., Carmen H.M., Gallego M.G., Morales A.E., Furne M., Domezain A., Domezain J. Sanz A. 2006. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon Acipencer naccarii and trout Oncorhynchus mykiss. A comparative study. Aquaculture, 254: 758-767

Tsigos C, Kyrou I, Kassi E. 2016. Stress, endocrine physiology and pathophysiology. In: De Groot LJ, et al. (eds) Endotext [Internet]. South Dartmouth, MA: MDText.com, Inc.

Tülsner, M., & Band, I. (1994). Rohstoff-eigenschaften und Grundlagen der Verarbeitungsprozesse. Behr's Verlag, Hamburg, Deutschland.

Val, A. L., & Kapoor, B. G. (1987). Fish Adaptations. In: "Science Publishers Inc", s. 208-220.

Van Der Oost, R., Beyer, J. and Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental assessment: a review. Environmental Toxicology and Pharmacology, vol. 13, no. 2, pp. 57-149. PMid:21782649. http://dx.doi.org/10.1016/ S1382-6689(02)00126-6.

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.

Varanka , Z. Rojik, I., Varanka, I., Nemcsok, J. and Abraham, M. 2001. Biochemical and Morphological Changes in Carp (Cyprinus carpio L.) Liver Following Exposure to Copper Sulfate and Tannic Acid. Comp. Biochem. Physiol. P. C. 128; 467-478.

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.

Wang Y, Chien Y, Pan T. 2006. Effect of dietary supplementation of caretenoids on survival, growth, pigmentation, and antioxidant capacity of characins, Hypssobrycon callistus. Aquaculture. 261: 641-648.

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.

Wicklund A, Runn P, Norrgren L (1988) Cadmium and Zinc Interactions in Fish; Effects of Zinc on the Uptake, Organ Distribution and Elimination of 109 Cd in the Zebrafish, Brachydanio rerio. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 17, 345-354.

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.

Wu SM, Weng CF, Yu MJ, Lin CC, Chen ST, Hwang JC, Hang PP. 1999. Cadmium-inducible metallothionein in tilapia (Oreochromis mossambicus). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 62: 758-768.

Yazkan, M., Özdemir, F., & Gölükcü, M. (2002). Antalya Körfezi'nde Avlanan Bazı Balık Türlerinde Cu, Zn, Pb, ve Cd İçeriği. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 26, 1309-1313.Yılmaz. F. Özdemir, N. Demirak, A. ve Tuna, A.L. 2007. Heavy metal levels in two fish species Leuciscus cephalus and Lepomis gibbosus. Food Chemistry, 100, 830-835.

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.

(https://www.intechopen.com)

(http://pumphonebiwa.blogspot.com)

(https://www.bioscience.org)

(https://resifmarket.wordpress.com)

(https://www.fitekran.com)

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : DOĞAN ANIT, Zehra

Eğitim

Derece	Kurum	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Çukurova Üniversitesi	2013
Lisans	Çukurova Üniversitesi	2010
Ortaöğretim	Şehit Temel Cingöz Lisesi	2005

Çalışma Tecrübesi

Yıl	İşyeri	Unvan
2021-Halen	AlfaBeta Tıbbi Araştırma	Saha Yöneticisi
2016-2021	AlfaBeta Tıbbi Araştırma	Saha Koordinatörü

Yayınlar

A1. Kanak, E. G., Dogan, Z., Eroglu, A., Atli, G. & Canli, M. (2014). Effects of fish size on the response of antioxidant systems of *Oreochromis niloticus* following metal exposures. Fish Physiology and Biochemistry. Volume 40: 1083-1091.

A2. Dogan, Z., Eroglu, A., Kanak, E. G., Atli, G. & Canli, M. (2014). Response of antioxidant system of tilapia (*Oreochromis niloticus*) following exposure to chromium and copper in differing hardness. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. Volume 92: 680-686.

A3. Eroglu, A., Dogan, Z., Kanak, E. G., Atli, G. & Canli, M. (2015). Effects of Heavy Metals (Cd, Cu, Cr, Pb, Zn) on fish glutathione metabolism. Environmental Science and Pollution Research. 22: 3229-3237.

A4. Dogan, Z., Atli, G., & Canli, M. (2015). Effects of lead on ATPases in tissues of freshwater fish (Oreochromis niloticus) in differing calcium levels. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *15*(2), 223-233.

A5. Atli, G., Ariyurek, S. Y., Kanak, E. G. & Canli, M. (2015). Alterations in the serum biomarkers belonging to different metabolic systems of fish (*Oreochromis niloticus*) after Cd and Pb exposures. Environmental Toxicology and Pharmacology, 40(2): 508-515.

A6. Atli, G., Canli, E. G., Eroglu, A. & Canli, M. (2016). Characterization of antioxidant system parameters in four freshwater fish species. Ecotoxicology and Environmental Safety, 126: 30-37.

A7. Atli, G., Canli, E. G., Eroglu, A., Dogan, Z. & Canli, M. (2016). Cadmium and lead alter the antioxidant and osmoregulation systems in the erythrocyte of fish (*Oreochromis niloticus*). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 16: 361-369.

EKLER

EK 1. Cu^{+2} ve Ca^{+2} etkisinde kalan *O. niloticus*'un solungaç ve bağırsak dokularında Mg^{+2}-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}+Cu^{+2} etkisindeki grupların kendi kontrollerine göre istatistiksel farklılıkları göstermektedir)

Etki Süresi	Deney Ortamı	Solungaç	Bağırsak	Kas
Akut	15 mg/L Ca^{+2}	-	-	-
	30 mg/L Ca^{+2}	6 ↑	28 ↑	47↓*
	90 mg/L Ca^{+2}	6 ↓	23↓*	37↓*
	0 mg/L Ca^{+2} + Cu^{+2}	3 ↓	55 ↑	56 ↓
	30 mg/L Ca^{+2} + Cu^{+2}	17 ↓	47↓#	44↓#
	90 mg/L Ca^{+2} + Cu^{+2}	15 ↑	4 ↓	44↓
Kronik	15 mg/L Ca^{+2}	-	-	-
	30 mg/L Ca^{+2}	1 ↓	16 ↓	56 ↑*
	90 mg/L Ca^{+2}	1 ↓	11 ↑	19 ↓
	15 mg/L Ca^{+2} + Cu^{+2}	7 ↑	11 ↑	79 ↓#
	30 mg/L Ca^{+2} + Cu^{+2}	3↓	22 ↓	95 ↓#
	90 mg/L Ca^{+2} + Cu^{+2}	14 ↑	48 ↓	88 ↓#

EK 2. Cu^{+2} ve Ca^{+2} etkisinde kalan *O. niloticus*'un solungaç ve bağırsak dokularında Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin kontrole göre yüzde (%) değişimleri. (*: Kontrol-Ca^{+2} gruplarının 0 mg Ca^{+2}/L'ye göre istatistiksel farklılıkları, #: Ca^{+2}+Cu^{+2} etkisindeki grupların kendi kontrollerine göre istatistiksel farklılıkları göstermektedir)

Etki Süresi	Deney Ortamı	Solungaç	Bağırsak
Akut	15 mg/L Ca^{+2}	-	-
	30 mg/L Ca^{+2}	16 ↑	395 ↑*
	90 mg/L Ca^{+2}	20 ↑	110 ↑*
	15 mg/L Ca^{+2} + Cu^{+2}	16 ↓	636 ↑#
	30 mg/L Ca^{+2} + Cu^{+2}	27 ↓	75 ↓#
	90 mg/L Ca^{+2} + Cu^{+2}	20 ↓	55 ↓
Kronik	0 mg/L Ca^{+2}	-	-
	30 mg/L Ca^{+2}	30 ↓	77 ↓*
	90 mg/L Ca^{+2}	19 ↑	74 ↓*
	15 mg/L Ca^{+2} + Cu^{+2}	2 ↑	65 ↓
	30 mg/L Ca^{+2} + Cu^{+2}	28↑	6 ↑
	90 mg/L Ca^{+2} + Cu^{+2}	36 ↓	48 ↓

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.)

Etki Süresi	Deney Ortamı	Solungaç	Bağırsak	Kas
Akut	15 mg Ca^{+2}/L	-	-	-
	30 mg Ca^{+2}/L	-	-	-
	90 mg Ca^{+2}/L	-	-	-
Kronik	15 mg Ca^{+2}/L	-	↑*	-
	30 mg Ca^{+2}/L	↓*	-	-
	90 mg Ca^{+2}/L	-	-	-

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.)

Etki Süresi	Deney Ortamı	Solungaç	Bağırsak
Akut	15 mg Ca^{+2}/L	-	-
	30 mg Ca^{+2}/L	-	-
	90 mg Ca^{+2}/L	-	-
Kronik	15 mg Ca^{+2}/L	↑*	-
	30 mg Ca^{+2}/L	↑*	-
	90 mg Ca^{+2}/L	↑*	-

EK 5. Cu^{+2} ve Ca^{+2} etkisinde kalan *O. niloticus*'un karaciğer dokularında antioksidan enzim aktivitelerinin kontrole göre yüzde (%) değişimleri. (*: Kontrol-Ca^{+2} gruplarının 15 mg Ca^{+2}/L'ye göre istatistiksel farklılıkları, #: Ca^{+2}+Cu^{+2} etkisindeki grupların kendi kontrollerine göre istatistiksel farklılıkları göstermektedir)

Etki Süresi	Deney Ortamı	SOD	CAT	GST	GR	GPX	GSH	GSSG	rGSH	GSH/GSSG
Akut	15 mg/L Ca^{+2}	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30 mg/L Ca^{+2}	↑	↑	↑	↓	↓	-	↑	↓	↓*
	90 mg/L Ca^{+2}	↑	↑	↑	↓	↑	↓	↓	↓	↓
	15 mg/L Ca^{+2} + Cu^{+2}	↑	↑	↓	↓	↓	↑	↑	-	↓
	30 mg/L Ca^{+2} + Cu^{+2}	↓	↑	↓#	↓	↑	↓	↓	↑	↑#
	90 mg/L Ca^{+2} + Cu^{+2}	↑	↑	↓	↓	↓	↑	↑	-	↑
Kronik	15 mg/L Ca^{+2}	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30 mg/L Ca^{+2}	↑	↓*	↓	↑	↑	↑	↑	↓	↓
	90 mg/L Ca^{+2}	↑*	↓*	↓	↑	↑	↑	↑	↓	↓
	15 mg/L Ca^{+2} + Cu^{+2}	↑#	↑	↓	↑	↑	↑#	↑#	↑#	↓
	30 mg/L Ca^{+2} + Cu^{+2}	↑#	↓#	↑	↓	↓	↑	↑	↑	↑
	90 mg/L Ca^{+2} + Cu^{+2}	↓	↑	↑#	↑	↑	↑#	↑#	↑#	↑