

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

Mustafa TUNÇSOY

**BAKIR OKSİT NANOPARTİKÜLLERİ VE BAKIR SÜLFAT
ETKİSİNDE *Oreochromis niloticus*'un DOKULARINDA
SÜREYE BAĞLI BAKIR BİRİKİMİNİN BAZI SERUM
PARAMETRELERİ İLE SERUM VE KARACİĞER ENZİM
AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA-2018

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAKIR OKSİT NANOPARTİKÜLLERİ VE BAKIR SÜLFAT ETKİSİNDE
Oreochromis niloticus'un DOKULARINDA SÜREYE BAĞLI BAKIR
BİRİKİMİNİN BAZI SERUM PARAMETRELERİ İLE SERUM VE
KARACİĞER ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Mustafa TUNÇSOY

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez / /2017 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Cahit ERDEM
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. Ferit KARGIN
ÜYE

.....
Prof. Dr. Bedii CİCİK
ÜYE

.....
Prof. Dr. Özcan AY
ÜYE

.....
Doç. Dr. Hikmet Yeter ÇOĞUN
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

**Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü**

**Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FEF2012D45**

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

ÖZ

DOKTORA TEZİ

**BAKIR OKSİT NANOPARTİKÜLLERİ VE BAKIR SÜLFAT ETKİSİNDE
Oreochromis niloticus'un DOKULARINDA SÜREYE BAĞLI BAKIR
BİRİKİMİNİN BAZI SERUM PARAMETRELERİ İLE SERUM VE
KARACİĞER ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Mustafa TUNÇSOY

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman : Prof. Dr. Cahit ERDEM
Yıl: 2017, Sayfa: 113
Jüri : Prof. Dr. Cahit ERDEM
: Prof. Dr. Ferit KARGIN
: Prof. Dr. Bedii CİCİK
: Prof. Dr. Özcan AY
: Doç. Dr. Hikmet Yeter ÇOĞUN

Bu araştırmada bakır oksit nanopartiküllerinin (CuO NP) ve bakır sülfatın (CuSO₄) 10, 50 ve 100 µg/L derişimlerinin 1, 7 ve 15 günlük sürelerle etkisinde *O. niloticus*'un solungaç, karaciğer, böbrek, dalak ve kas dokularındaki metal birikimi, karaciğer SOD, CAT ve GPx enzim aktiviteleri ve serum parametrelerinden glikoz, total protein, albumin, kolesterol, trigliserit düzeyi ile serum ChE, AST, ALT, ALP ve LDH enzim aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Cu NP ve CuSO₄'ün belirlenen süre ve derişimlerle etkisinde bakır birikimi solungaç, karaciğer, böbrek ve dalak dokusunda kontrole oranla artış göstermiş, en fazla metal birikimi sırasıyla karaciğer, böbrek, dalak, solungaç dokularında olmuş kas dokusunda birikim olmamıştır. 15 günlük etki süresi sonunda karaciğerde antioksidan enzimlerden SOD, CAT ve GPx enzim aktivitesi kontrole oranla artış göstermiştir. Deney süresi sonunda serum glikoz ve albümin düzeyleri artarken serum total protein, kolesterol ve trigliserid düzeyleri kontrole oranla azalmıştır. Serum enzimlerinden ChE aktivitesi azalırken, AST, ALT, ALP ve LDH enzim aktiviteleri artış göstermiştir. Genel olarak dokulardaki metal birikimi ve antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkileri bağlamında Cu NP'nin CuSO₄'e oranla daha etkili olduğu, belirlenen serum parametrelerinde ise belirgin bir ayrımın olmadığı saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Bakır, Nanopartikül, Birikim, Antioksidan enzimler, Serum parametreleri, *O. niloticus*

ABSTRACT

PhD THESIS

**INFLUENCE OF COPPER ACCUMULATION IN TISSUES OF
Oreochromis niloticus EXPOSED TO COPPER OXIDE
NANOPARTICLES AND COPPER SULPHATE WITH ITS EFFECT ON
SOME SERUM PARAMETERS AND ON ENZYME ACTIVITIES IN
SERUM AND LIVER**

Mustafa TUNÇSOY

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

Supervisor : Prof. Dr. Cahit ERDEM
Year: 2017, Pages: 113
Jury : Prof. Dr. Cahit ERDEM
: Prof. Dr. Ferit KARGIN
: Prof. Dr. Bedii CİCİK
: Prof. Dr. Özcan AY
: Assoc. Prof. Dr. Hikmet Yeter ÇOĞUN

Effects of 10, 50, and 100 µg/L waterborne copper sulphate (CuSO₄) and CuO nanoparticles (CuO NPs) on copper accumulation in gill, liver, kidney, spleen and muscle tissues of *O. niloticus* were determined after 1, 7 and 15 days of exposure. Changes in sera glucose, total protein, albumin and triglyceride levels and serum ChE, AST, ALT, ALP and liver SOD, CAT and GPx activities influenced by this accumulation were also studied. Copper levels increased in gill, liver, kidney and spleen tissues of *O. niloticus* compared to control when exposed to both CuSO₄ and CuO NPs whereas no accumulation was detected in muscle tissue at the end of the exposure period. Highest accumulation of copper was observed in the order of liver, kidney, spleen and gill tissues, respectively. Serum glucose and albumin levels increased while serum total protein, cholesterol and triglyceride levels decreased compared with control at the end of the 15th day. There was also a decrease in serum ChE activity whereas serum AST, ALT, ALP and LDH activities increased. SOD, CAT and GPx activities increased in liver tissue at the end of the exposure period. Overall, CuO NPs more effective than CuSO₄ in terms of tissue accumulation and liver enzyme activities while CuSO₄ and CuO NPs had similar effects in serum parameters of *O. niloticus*.

Key Words: Copper, Nanoparticles, Accumulation, Antioxidant enzymes, Serum parameters, *O. niloticus*

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Ağır metaller doğada düşük derisimlerde bulunmakla beraber, hızlı nüfus artışı ve buna bağlı olarak artan sanayileşme su ekosistemlerinde ağır metal derisinin artmasına neden olmuştur. Antropojenik etkiler sonucu su ekosistemlerinde derişimi artan ağır metaller su organizmaları tarafından alınarak doku birikimi ve fizyolojik ve biyokimyasal değışikliklere neden olmakta ve üst trofik düzeylere daha yoğun olarak aktarılmaktadır.

Bakır hayvansal organizmalar tarafından yapısal ve metabolik olaylarının gerçekleşebilmesi için iz miktarlarda gereksinim duyulan ancak belirli bir derişimin üzerinde alındıklarında organizmada özellikle metabolik olarak aktif dokularda birikerek toksik etkilerini gösteren bir metaldir. Bakır oksit nanopartiküllerinin (CuO NP) etkisi boyutu, yüzey alanının genişliği ve kimyasal özellikleri nedeniyle bakırın diğer formlarına göre farklılık göstermekte ve daha toksik olabilmektedir.

Bu araştırmada bakır oksit nanopartiküllerinin (CuO NP) ve bakır sülfatın (CuSO₄) 10, 50 ve 100 µg/L derişimlerinin 1, 7 ve 15 günlük sürelerle etkisinde *O. niloticus*'un solungaç, karaciğer, böbrek, dalak ve kas dokularındaki metal birikimi ve bu birikimin karaciğer SOD, CAT ve GPx enzim aktiviteleri ile serum parametrelerinden glikoz, total protein, albumin, kolesterol, trigliserit düzeyi ile serum ChE, AST, ALT, ALP ve LDH enzim aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Doku birikimi bakımından yapılan bu çalışmada Cu NP ve CuSO₄ etkisinde solungaç dokusunda 7 ve 15 günlük etki süresi sonunda yüksek derişimlerde, karaciğer ve böbrek dokusunda tüm derişim ve sürelerde, dalak dokusunda ise 1 ve 7 günlük etki sürelerinde yüksek derişimlerde kontrole oranla bakır birikimi artış göstermiştir. Kas dokusunda ise her iki uygulamada da tüm derişim ve sürelerde herhangi bir farklılık saptanmamıştır. Metal birikimi

bakımından dokular arasında Karaciğer>Böbrek>Dalak>Solungaç>Kas şeklinde bir ilişki saptanmıştır.

Antioksidan enzim aktiviteleri göz önünde bulundurulduğunda, Cu NP etkisinde SOD, CAT ve GPx aktivitesi genel olarak kontrole oranla artış göstermiş, CuSO₄ etkisinde ise SOD, CAT ve GPx aktivitesi sürenin uzamasıyla kontrole oranla artış göstermekle birlikte Cu NP'ye oranla daha az olmuştur. Süreye bağlı etkide her iki uygulamada enzim aktivitesinde SOD aktivitesi önce artmış sürenin uzamasıyla azalma göstermiş, CAT ve GPx aktivitesi ise artış göstermiştir.

Cu NP ve CuSO₄ etkisinde serum parametrelerinden serum glikoz düzeyi 7 ve 15 günlük etki süresinde, serum albümin düzeyi ise 15 günlük etki süresinde kontrole oranla artış gösterirken, serum total protein, kolesterol ve trigliserid düzeyi 15 günlük etki süresi sonunda kontrole oranla azalmıştır. Serum enzim aktivitelerinde Cu NP ve CuSO₄ etkisinde serum ChE aktivitesi 15 günlük etki süresi sonunda kontrole oranla azalırken, serum AST, ALT, ALP ve LDH aktiviteleri kontrole oranla artış göstermiştir.

Yapılan bu çalışmada bakırın farklı formlarının etkisinde *O. niloticus*'un dokularındaki bakır birikimi, antioksidan enzim aktiviteleri ve serum biyokimyasal parametreleri incelenmiş ve bunun sonucunda Cu NP'nin özellikle doku birikimi ve antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkileri bağlamında CuSO₄'e oranla daha toksik olduğu saptanmıştır.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında benden yardımlarını, desteğini ve deneyimlerini esirgemeyen ve bana daima yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Cahit ERDEM'e, tezimin her aşamasında büyük desteklerini gördüğüm Mersin Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi Öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Bedii CİCİK ve Prof. Dr. Özcan AY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında desteklerini gördüğüm Portekiz, Algarve University, Centre of Marine and Environmental Research (CIMA) Öğretim üyelerinden Prof.Dr. Maria João Bebianno, Dr. Tania Gomes, Dr. Margarida Ribau Teixeira ve Dr. Vânia Sousa'ya teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olan ve benden desteğini esirgemeyen eşim Benay TUNÇSOY'a ve her zaman yardımını gördüğüm doktora kardeşim Servet DURAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarıma maddi destek sağlayan Çukurova Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Burs Programına teşekkürlerimi sunarım.

Benden tüm hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen ve bütün kararlarımda yanımda olup beni destekleyen AİLEMİN her bir üyesine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
SİMGELER VE KISALTMALAR	XIV
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	9
3. MATERYAL VE METOD	19
3.1. Materyal	19
3.1.1. Bakır oksit nanopartikül karakterizasyonu.....	20
3.2. Metod	22
3.2.1. Doku birikimi.....	22
3.2.2. Total protein tayini	22
3.2.3. Antioksidan enzim aktivite tayini	24
3.2.3.1. Katalaz aktivitesi tayini.....	24
3.2.3.2. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi tayini	26
3.2.3.3. Glutasyon peroksidaz (GPx) aktivitesi tayini	28
3.2.4. Serum parametreleri	30
3.2.5. İstatistik.....	31
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	33
4.1. Bulgular.....	33
4.2. Tartışma	75

5. SONUÇ VE ÖNERİLER	89
KAYNAKLAR.....	91
ÖZGEÇMİŞ.....	113



ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1.	Deney ortam suyunun fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	20
Çizelge 3.2.	CuO nanopartikül karakterizasyonu (Ortalama $\pm$ Standart hata).....	21
Çizelge 4.1.	<i>O. niloticus</i> 'un solungaç dokusunda Cu NP ve CuSO ₄ 'ün farklı derişimlerinin etkisinde süreye bağlı bakır birikimi (μ g Cu/g k.a.).....	34
Çizelge 4.2.	<i>O. niloticus</i> 'un karaciğer dokusunda Cu NP ve CuSO ₄ 'ün farklı derişimlerinin etkisinde süreye bağlı bakır birikimi (μ g Cu/g k.a.).....	36
Çizelge 4.3.	<i>O. niloticus</i> 'un böbrek dokusunda Cu NP ve CuSO ₄ 'ün farklı derişimlerinin etkisinde süreye bağlı bakır birikimi (μ g Cu/g k.a.).....	39
Çizelge 4.4.	<i>O. niloticus</i> 'un dalak dokusunda Cu NP ve CuSO ₄ 'ün farklı derişimlerinin etkisinde süreye bağlı bakır birikimi (μ g Cu/g k.a.).....	41
Çizelge 4.5.	<i>O. niloticus</i> 'un kas dokusunda Cu NP ve CuSO ₄ 'ün farklı derişimlerinin etkisinde süreye bağlı bakır birikimi (μ g Cu/g k.a.).....	43
Çizelge 4.6.	Cu NP ve CuSO ₄ 'ün farklı derişimlerinin etkisinde <i>O. niloticus</i> 'un karaciğer dokusundaki bakır birikiminin SOD enzim aktivitesi üzerine süreye bağlı etkisi (U.mg ⁻¹ prot.).....	46
Çizelge 4.7.	Cu NP ve CuSO ₄ 'ün farklı derişimlerinin etkisinde <i>O. niloticus</i> 'un karaciğer dokusundaki bakır birikiminin CAT enzim aktivitesi üzerine süreye bağlı etkisi (μ mol.dk.mg ⁻¹ prot.).....	49

Çizelge 4.8. Cu NP ve CuSO ₄ 'ün farklı derişimlerinin etkisinde <i>O. niloticus</i> 'un karaciğer dokusundaki bakır birikiminin GPx enzim aktivitesi üzerine süreye bağılı etkisi (nmol.dk.mg ⁻¹ prot.).....	52
Çizelge 4.9. Cu NP ve CuSO ₄ 'ün farklı derişimlerinin etkisinde <i>O. niloticus</i> 'un serum glikoz düzeyleri (mg/dL).....	55
Çizelge 4.10. Cu NP ve CuSO ₄ 'ün farklı derişimlerinin etkisinde <i>O. niloticus</i> 'un serum albumin düzeyleri (g/dL).....	57
Çizelge 4.11. Cu NP ve CuSO ₄ 'ün farklı derişimlerinin etkisinde <i>O. niloticus</i> 'un serum total protein düzeyleri (g/dL).....	59
Çizelge 4.12. Cu NP ve CuSO ₄ 'ün farklı derişimlerinin etkisinde <i>O. niloticus</i> 'un serum kolesterol düzeyleri (mg/dL).....	61
Çizelge 4.13. Cu NP ve CuSO ₄ 'ün farklı derişimlerinin etkisinde <i>O. niloticus</i> 'un serum trigliserid düzeyleri (mg/dL).....	63
Çizelge 4.14. Cu NP ve CuSO ₄ 'ün farklı derişimlerinin etkisinde <i>O. niloticus</i> 'un serum ChE aktiviteleri (U/L).....	65
Çizelge 4.15. Cu NP ve CuSO ₄ 'ün farklı derişimlerinin etkisinde <i>O. niloticus</i> 'un serum AST enzim aktiviteleri (U/L).....	67
Çizelge 4.16. Cu NP ve CuSO ₄ 'ün farklı derişimlerinin etkisinde <i>O. niloticus</i> 'un serum ALT enzim aktiviteleri (U/L).....	69
Çizelge 4.17. Cu NP ve CuSO ₄ 'ün farklı derişimlerinin etkisinde <i>O. niloticus</i> 'un serum ALP enzim aktiviteleri (U/L).....	71
Çizelge 4.18. Cu NP ve CuSO ₄ 'ün farklı derişimlerinin etkisinde <i>O. niloticus</i> 'un serum LDH enzim aktiviteleri (U/L).....	73

Şekil 3.1.	CuO NP'nin Transmisyon elektron mikroskobu görüntüsü.....	21
Şekil 3.2.	Protein derişimi ve absorbands arasındaki doğrusal ilişki.	23
Şekil 4.1.	<i>O. niloticus</i> 'un solungaç dokusunda Cu NP ve CuSO ₄ 'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağlı bakır birikimlerinin karşılaştırılması (µg Cu/g k.a.).	35
Şekil 4.2.	<i>O. niloticus</i> 'un karaciğer dokusunda Cu NP ve CuSO ₄ 'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağlı bakır birikimlerinin karşılaştırılması (µg Cu/g k.a.).	38
Şekil 4.3.	<i>O. niloticus</i> 'un böbrek dokusunda Cu NP ve CuSO ₄ 'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağlı bakır birikimlerinin karşılaştırılması (µg Cu/g k.a.).	40
Şekil 4.4.	<i>O. niloticus</i> 'un dalak dokusunda Cu NP ve CuSO ₄ 'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağlı bakır birikimlerinin karşılaştırılması (µg Cu/g k.a.).	42
Şekil 4.5.	<i>O. niloticus</i> 'un kas dokusunda Cu NP ve CuSO ₄ 'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağlı bakır birikimlerinin karşılaştırılması (µg Cu/g k.a.).	44
Şekil 4.6.	<i>O. niloticus</i> 'un karaciğer dokusunda Cu NP ve CuSO ₄ 'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağlı SOD enzim aktivitelerinin karşılaştırılması (U.mg ⁻¹ prot.).....	47
Şekil 4.7.	<i>O. niloticus</i> 'un karaciğer dokusunda Cu NP ve CuSO ₄ 'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağlı CAT enzim aktivitelerinin karşılaştırılması (µmol.dk.mg ⁻¹ prot.).....	50
Şekil 4.8.	<i>O. niloticus</i> 'un karaciğer dokusunda Cu NP ve CuSO ₄ 'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağlı CAT enzim aktivitelerinin karşılaştırılması (nmol.dk.mg ⁻¹ prot.).....	53

Şekil 4.9.	<i>O. niloticus</i> 'da Cu NP ve CuSO ₄ 'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağı serum glikoz düzeylerinin karşılaştırılması (mg/dL).....	56
Şekil 4.10.	<i>O. niloticus</i> 'da Cu NP ve CuSO ₄ 'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağı serum albumin düzeylerinin karşılaştırılması (g/dL).....	58
Şekil 4.11.	<i>O. niloticus</i> 'da Cu NP ve CuSO ₄ 'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağı serum total protein düzeylerinin karşılaştırılması (g/dL).....	60
Şekil 4.12.	<i>O. niloticus</i> 'da Cu NP ve CuSO ₄ 'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağı serum kolesterol düzeylerinin karşılaştırılması (mg/dL).....	62
Şekil 4.13.	<i>O. niloticus</i> 'da Cu NP ve CuSO ₄ 'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağı serum trigliserid düzeylerinin karşılaştırılması (mg/dL).....	64
Şekil 4.14.	<i>O. niloticus</i> 'da Cu NP ve CuSO ₄ 'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağı serum ChE aktivitelerinin karşılaştırılması (U/L).....	66
Şekil 4.15.	<i>O. niloticus</i> 'da Cu NP ve CuSO ₄ 'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağı serum AST aktivitelerinin karşılaştırılması (U/L).....	68
Şekil 4.16.	<i>O. niloticus</i> 'da Cu NP ve CuSO ₄ 'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağı serum ALT aktivitelerinin karşılaştırılması (U/L).....	70
Şekil 4.17.	<i>O. niloticus</i> 'da Cu NP ve CuSO ₄ 'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağı serum ALP aktivitelerinin karşılaştırılması (U/L).....	72

Şekil 4.18. *O. niloticus*'da Cu NP ve CuSO₄'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağı serum LDH aktivitelerinin karşılaştırılması (U/L).....74





SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: santigrad derece
cm	: santimetre
dk	: dakika
gr	: gram
µg	: mikrogram
M	: molarite
mg	: miligram
ml	: mililitre
mm	: milimetre
nm	: nanometre
nmol	: nanomol
sn	: saniye
µl	: mikrolitre
BSA	: bovin serum albumin
EDTA	: etilendiamintetraasetik asit
GR	: glutatyon redüktaz
GSH	: indirgenmiş gulutatyon
GSSG	: okside glutatyon
H ₂ O	: su
H ₂ O ₂	: hidrojen peroksit
KCl	: potasyum klorür
KH ₂ PO ₄	: potasyum dihidrojen fosfat
K ₂ HPO ₄	: dipotasyum hidrojen fosfat
MDA	: malondialdehit
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NaH ₂ PO ₄	: sodyum dihidrojen fosfat
Na ₂ HPO ₄	: disodyum hidrojen fosfat

$O_2^{\cdot -}$	: superoksit radikali
$OH^{\cdot}$	: hidroksil radikali
g k.a.	: gram kuru ağırlık
U/L	: litre başına birim
mg/dL	: desilitre başına miligram
mmol/L	: litre başına milimol
g/dL	: gram başına desilitre



1. GİRİŞ

Günümüzde ağır metaller teknolojik gelişmelerin ve besinsel gereksinimlerin karşılanması amacıyla madencilik, boya, plastik, cam sanayi ve metal kaplama gibi çeşitli endüstri alanlarında, tarımda ise kaliteli ve daha fazla ürün elde etmek için pestisit ve yapay gübrelerde artan miktarlarda kullanılmakta ve bunun sonucu olarak doğal ortamlardaki derişimleri tehlikeli düzeylere çıkabilmektedir. Su ekosistemlerinde ağır metaller, düşük derişimlerde volkanik aktiviteler, sel, erozyon gibi doğal olaylara ek olarak antropojenik faktörlerin etkisiyle sucul ortamlara katılımı artmakta, önemli çevre ve sağlık sorunlarına neden olmaktadır (Hu, 2000; De ve ark., 2010; Jorgensen, 2010).

Başlıca alıcı ortam olan su ekosistemlerinde derişimi artan ağır metaller, letal olmayan derişimlerde öncelikle sucul organizmaların iç dinamiklerinde çok yönlü değişimlere ve doku birikimine neden olurken (Al-Attar, 2005), boşaltım, metabolik depolama ve detoksifikasyon mekanizmalarının alınımı karşılamadığı durumlarda toksik etkilere neden olur (Handy, 2003).

Nanopartiküller su ortamında daha dengeli olmaları, daha küçük olan boyutları ve spesifik yüzey alanlarının daha büyük olmaları nedeniyle büyük kütleli metallere oranla daha hızlı reaksiyona girmektedirler. Bu gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak endüstrideki kullanımları ilk kullanımları olan 2000 yılından günümüze yüksek bir ivme ile artmaktadır. Ancak bu artış doğaya daha yüksek düzeylerde salınmaları ile sonlandığından özellikle su organizmaları için tehlike oluşturmaktadır.

Nanomateriyaller yüzey alanlarının geniş olması ve yüksek reaksiyon aktiviteleri son yıllarda oldukça dikkat çekmektedir. Nanoteknolojinin hızlı gelişim göstermesi sonucu çeşitli boyut ve çaplardaki bu nanomateriyaller ticari ve endüstriyel alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır (Amelia ve ark., 2012; Tang ve ark., 2012). Metal bazlı nanomateriyaller cam ve boya sanayinde, cilalamada, elektronik eşya üretiminde, ilaç ve gıda katkı maddelerinde, kozmetik ve kişisel bakım

ürünlerinde, biyoteknoloji ve tıp alanında görüntülemeye sıklıkla kullanılmakta ve çevreyi kirletmektedir (Gomes ve ark., 2013).

Nanopartiküller (NP) boyutları 1 – 100 nm arasında değişen küçük boyutlu ve yüksek yüzey alanı olan partiküller olarak tanımlanırlar (Gomes ve ark., 2013). Kimyasal kompozisyonları göz önüne alındığında nanopartiküllerin en önemlileri karbon kaynaklı nanopartiküller ve metal içerikli metal oksit nanopartikülleridir (Klaine ve ark., 2008; Bhatt ve Tripathi, 2011). Son yıllarda toksikolojik araştırmalar bu nanopartikül çeşitlerinden metal oksit nanopartiküllerine odaklanmıştır (Ringwood ve ark., 2010; Buffet ve ark., 2011). Bu nanopartiküllere örnek olarak çinko oksit (ZnO), titanyum dioksit (TiO₂), seryum dioksit (CeO₂), bakır oksit (CuO), krom dioksit (CrO₂) ve bizmut trioksit (Bi₂O₃) verilebilir (Klaine ve ark., 2008).

Metal oksit nanopartikülleri, çeşitli ticari ürünlerde diğer nanopartiküllere kıyasla en fazla kullanılan nanopartiküllerdir ve potansiyel toksisiteleri bakımından çevre ve insan sağlığı açısından büyük tehdit oluşturmaktadır (Aschberger ve ark., 2011). Metal oksit nanopartiküllerinin artan kullanımı sonucu bu partiküller su ortamlarına ulaşmaktadır. Biyolojik membranlardan rahatlıkla geçebilen nanopartiküller organ, doku, hücre ve moleküler düzeyde olumsuz etkilere neden olabilmektedirler (Schrand ve ark., 2010). Nanopartiküllerin, su ortamları ve organizmalar üzerine olumsuz etkileri son yıllarda araştırmacıların çok fazla dikkatini çekmektedir (Blaise ve ark., 2008; Farre ve ark., 2009).

Yüksek düzeyde termal ve elektriksel iletkenliği olması nedeniyle metal oksit nanopartikülleri arasında Cu NP en yaygın kullanılan nanopartiküllerdir. Cu NP makinelerde ısı transfer akışında (Chang ve ark., 2005), polimerler, plastikler ve gaz sensörlerinde (Li ve ark., 2007), ahşap koruma ve basım makinelerinin elektronik aksamalarında (Lee ve ark., 2008) ve mikroçip ve pillerin kaplamasında (Dhas ve ark., 1998) yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak antimikrobiyal özellikleri nedeniyle Cu NP bazı cilt bakım ürünlerinde ve tekstilde kullanılmaktadır (Cioffi ve ark., 2005; Ren ve ark., 2008).

Yüksek organizasyonlu organizmalar bakır gibi ağır metallere yapısal ve metabolik olaylarının gerçekleşebilmesi için iz miktarlarda gereksinim duyarlar ancak belirli bir derişimin üzerinde alındığında organizmada özellikle metabolik olarak aktif dokularda birikerek toksik etkilerini gösterirler (Galvez ve ark, 1998; Cicik, 2003). Hayvansal organizmalarda bakır, kemik oluşumu, omuriliğin miyelinleşmesi, hemoglobin sentezi, metalloenzimlerin özellikle sitokrom oksidazlarla redoks reaksiyonlarında iş gören enzimlerin yapısal bileşenini oluşturur.

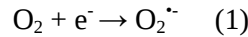
Su organizmaları tarafından ağır metallerin vücuda alınımı, solungaçlar, su, besin ve tüm vücut yüzeyinden absorpsiyon yolları ile olmaktadır. Balıklarda solungaçlar doğrudan doğruya ortam ile etkileşim halinde olduğundan başlıca alımın yolunu oluşturur. Solungaçlar aracılığı ile vücuda alınan ağır metaller dolaşım sistemi aracılığı ile doku ve organlara taşındığı gibi ağır metal etkisinde kan bileşenleri, endokrin sistem ile metabolik olaylarda değişimler ve sonuçta doku hasarı ile sonuçlanır (Heath, 1995).

Balıklarda solungaçlar oldukça geniş yüzey alanına sahip ve doğrudan doğruya ortamla etkileşim halinde olduğundan metal birikimi bakımından hedef organlar olup metal öncelikle bu organdaki mukus üretimini arttırmakta ve solungaç lamellerinde şişmeye sonuçta hipoksiyaya neden olmaktadır (De Boeck ve ark., 2007). Sodyum bakımından fakir olan yumuşak sularda bakır, solungaçlardaki apikal hücrelerce alınarak sodyum alımını engellemekte, Na^+/K^+ATP -az aktivitesini inhibe ederek iyon dengesini bozmakta ve mortaliteye neden olmaktadır (Van Heerden ve ark., 2004). Bu işlevleri nedeniyle bakır canlıda yüksek düzeyde regüle edilir. Karaciğer ise besin maddelerinin dönüşümünde, zararlı bileşiklerin etkisiz hale getirilmesinde ve özellikle yağların sindirilmesinde iş gören metabolik bakımdan aktif bir organdır (Heath, 1995). Balık ve memelilerde karaciğer, bakır için başlıca depo organı olarak iş görür (Kruger, 2002). Vücuda alınan metallerin bir kısmı su ve metabolizma atıkları ile birlikte böbreğe taşınmakta ve metallothionenin gibi metal bağlayıcı proteinlere bağlanarak

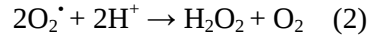
yüksek düzeyde birikime neden olmaktadır (Hollis ve ark., 1999). Kas dokusu metal bağlamada etkin olmamakla birlikte bu dokudaki birikim metalin üst trofik düzeylere daha yoğun olarak aktarılmasına ve bu düzeylerdeki türlerde mortalite veya habitat değişimine neden olarak besin zincirinde kopmalarla sonuçlanır ki bu durum ekosistemde kalıcı değişimlere neden olabilir.

Ağır metallerin organizmalardaki birikimi reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna, hücre membran bütünlüğünün bozulmasına ve enzimlerin inhibisyonuna neden olmaktadır (Viarengo, 1985). Aeorobik organizmalarda hücre metabolizma, moleküler oksijenin (O_2) redüksiyonunu içeren enerji metabolizmasının en etkili şekillerinden birisidir. Moleküler oksijenin eksik redüksiyonu endojenik reaksiyonlarda oldukça toksik olan, radikal ve radikal olmayan reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olmaktadır (Mates, 2000; Livingstone, 2001). Bu reaktif oksijen türleri radikal olan süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$), peroksil radikali ($RO_2^{\cdot}$), alkoksil ($RO^{\cdot}$), hidroperoksil ($HO_2^{\cdot}$), nitrik oksit ($NO^{\cdot}$) ve radikal olmayan singlet oksijen (1O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2), ozon (O_3) Hipokloröz asit ($HOCl$) ve peroksinitrit ($OOHNO$) (Di Giulio ve ark., 1995; Livingstone, 2001).

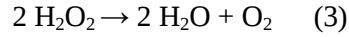
ROS oluşumu bütünüyle moleküler oksijeninin oksidasyonu ve redüksiyonu ile ilgilidir. Bu redüksiyon sonucunda moleküler oksijen, $O_2^{\cdot-}$ radikaline ve sonrasında daha reaktif olan H_2O_2 ve $OH^{\cdot}$ radikaline en sonunda ise suya (H_2O) indirgenir. Aerobik organizmalarda süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşmaktadır (Reaksiyon 1) (Unfried ve ark., 2007).



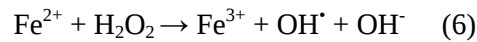
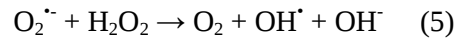
$O_2^{\cdot -}$ radikali çok fazla zararlı olamamakla birlikte, H_2O_2 kaynağı olması sebebiyle önem kazanmaktadır. Süperoksit kendiliğinden ya da süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından dismutasyonla H_2O_2 'ye çevrilebilir (Reaksiyon 2) (Lesser, 2006; Unfried ve ark., 2007).



H_2O_2 yüksüz, $O_2^{\cdot -}$ 'ye oranla daha kararlı ve yapısında su bulundurmasından dolayı biyolojik membranlardan kolaylıkla geçebilmektedir. Katalaz (CAT) enzimi H_2O_2 'yi su ve oksijene katalizleyen enzimdir (Reaksiyon 3). Glutasyon peroksidaz (GPx) ise redükte glutasyonu (GSH) kullanarak H_2O_2 'nin indirgenmesini katalizleyen ve GSH'ı okside glutatyon okside eden bir peroksidazdır (Reaksiyon 4). H_2O_2 katalaz ya da glutasyon peroksidaz enzimleri tarafından yok edilmez ve tamamen H_2O ve O_2 'ye indirgenmezse en reaktif olan reaktif oksijen türlerinden $OH^{\cdot}$ radikaline çevrilebilir (Halliwell ve Gutteridge, 1999; Lesser, 2006; Unfried ve ark., 2007).



Endojen kaynaklı H_2O_2 detoksifiye edilmezse metallerin katalizörlüğünde Haber-Weis (Reaksiyon 5) ve Fenton (Reaksiyon 6) reaksiyonları sonucunda $OH^{\cdot}$ oluşur. Haber Weis ve Fenton reaksiyonları demir ve bakır gibi geçiş metallerinin varlığında H_2O_2 'nin indirgenmesi sonucu $OH^{\cdot}$ radikalinin oluşması şeklinde gerçekleşir (Lesser, 2006; Unfried ve ark., 2007).



Antioksidan sistemler bütün organizmalarda bulunmakla birlikte, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimlerin dışında serbest radikalleri yok eden ve enzimatik olmayan glutatyon (GSH), metallothionenin, askorbik asit (vitamin C), retinol (vitamin A), tokoferol (vitamin E) ve beta karotenleri içermektedir (Almeida ve ark., 2007). Antioksidan enzimlerin işlevleri oksidatif zararları onarmak ve reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırarak organizmaları oksidatif stresten korumaktır. Antioksidan savunma bozulduğunda oksidatif stres, DNA hasarlarına ve enzimlerin işlevlerinin aksamasına neden olmaktadır (Doyotte ve ark., 1997).

Glikoz, omurgalı hayvanlarda başlıca yüksek enerjili bileşik olup, fazlası kas ve karaciğerde glikojen formunda depo edilirken, serumdaki düzeyi endokrin sistem aracılığı ile kontrol edilmektedir (Dange, 1986). Balıklarda açlık, üreme, hipoksik koşullar ve ağır metal etkisi gibi stres faktörleri, karbonhidrat metabolizmasında ve sonuçta serum glikoz düzeyinde değişimlere neden olur (Vosyliene, 1999; Kuşatan ve Cıık, 2004). Albumin karaciğer orijinli bir serum proteindir ve kanın ozmotik basıncını ve pH'ını düzenlemekte ayrıca metaller, organik bileşikler ve hormonlar için taşıyıcı olarak görev yapmaktadır (Heath, 1995). Aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) karaciğer orijinli enzimler olup, aminoasit metabolizmasında iş görürler ve normal koşullarda kanda düşük derişimlerde bulunurlar. Karaciğer dokusunun zarar görmesi durumunda bu enzimlerin serumdaki düzeyleri artış göstermektedir (Cowey ve Walton, 1988). Balıklarda metal etkisi metalin ortam derişimi ve etkide kalma süresine bağılı olarak serum kolinesteraz (ChE), AST ve ALT düzeylerinde değışikliklere sebep olmakla birlikte dokularda hasar düzeyi de bu enzimlerin serumdaki düzeyini etkilemektedir. Alkalen fosfataz (ALP) ve laktat dehidrojenaz (LDH) da serum enzimleri olup bu enzimlerin serumdaki düzeyleri karaciğer ve böbrek dokularının zarar görmesi durumunda artış göstermektedir. Hayvansal organizmalarda kolesterol lipoproteinlerin, safra asitlerinin ve steroid hormonların başlıca yapısal bileşenini oluşturur ve ağır metaller gibi kirleticilerin etkisinde

lipolizisin uyarılması sonucu serumdaki düzeyi değişim gösterir. Serum proteinleri ise organik ve inorganik bileşenlerin taşınımında görev yapar (Heath, 1995).

Balıklarda ağır metal toksisitesi ortam koşullarına da bağlı olarak değişim gösterir. Çözünmüş oksijen, sıcaklık, sertlik, tuzluluk ve ortamda diğer metallerin bulunması gibi çevresel faktörler ağır metallerin su organizmalarına toksisitesini etkilemektedir (Witeska ve Jezierska, 2003). Çeşitli balık türleri ile yapılan araştırmalarda çinko toksisitesinin su sertliği, sıcaklık, pH, çözünmüş oksijen derişimi gibi suyun fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak değişim gösterdiği saptamıştır (Nussey, 1998). Su sıcaklığındaki artış ve buna bağlı olarak çözünmüş oksijen derişimindeki düşme çinko toksisitesini artırırken (Heath, 1995), su sertliği, alkalinite ve kompleksleştirici bileşiklerin derişimindeki artışın toksisiteyi azalttığı belirlenmiştir (Chappman, 1978). Su sıcaklığındaki artmanın balıklarda kadmiyum toksisitesini arttırdığı, ortam pH'ındaki düşmenin ise hidrojen iyonlarının hücre membranındaki bağlanma yerleri için kadmiyum ile rekabet halinde olmaları nedeniyle toksisiteyi azalttığı belirtilmektedir (Carpene ve ark., 1987).

Araştırmada materyal olarak kullanılan *O. niloticus* tropikal kökenli bir balık olup, protein kaynağı olarak tüketildiğinden günümüz kültür koşullarında yetiştiriciliği yaygın bir şekilde yapılmaktadır. Kültür koşullarındaki yetiştiriciliğinin yaygın olmasındaki faktörler arasında tropik ve subtropik bölgelerde sıcaklık ve tuzluluk değişimlerine karşı oldukça dirençli olmaları, besin kaynağının çeşitli ve yem değerlendirme yeteneklerinin yüksek olması, kısa bir besin zincirine sahip olmaları, yoğun stoklamaya karşı kısa sürede adapte olmaları, kültür koşullarında bakım ve beslenmelerinin uygun olması, uygun ortam koşullarında yılda 3-4 kez döl verebilmeleri, paraziter hastalıklara ve uygun olmayan ortam koşullarına karşı oldukça dirençli olmaları sayılabilir.

Metallerin çeşitli balık türleri üzerine etkisi üzerine çok sayıda araştırma bulunmasına rağmen, metal nanopartiküllerinin balık türleri üzerine etkilerinin incelendiği çalışmalar sınırlıdır. Bunun yanında nanopartiküllerin sucul

organizmalardaki biyolojik bulunurlukları, nanopartiküllerin alınımı ve iletimi, organizmanın hücre ve dokularındaki dağılımı ile ilgili araştırmalar azdır. Bakır nanopartiküllerinin bakırın diğer formlarına kıyasla toksisitesinin farklı olması da ayrıca önem taşımaktadır. Bu nedenle bu araştırmada bakır nanopartiküllerinin ve bakır sülfatın 10, 50 ve 100 µg/L derişimlerinin 1, 7 ve 15 günlük sürelerle etkisinde *O. niloticus*'un karaciğer antioksidan enzim aktiviteleri (SOD, CAT, GPx), serum parametreleri (Glikoz, Total Protein, Serum Albumin, Kolesterol, Trigliserit, ChE, AST, ALT, ALP ve LDH) ve dokularındaki (Solungaç, Karaciğer, Böbrek, Dalak ve Kas) metal birikim düzeyleri üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Cu NP'nin aşırı üretimi ve kullanımı bu metalin su ekosistemine katılımını hızlandırarak su organizmalarında bakır birikimine neden olmakta ve üst trofik düzeylere daha yoğun olarak aktarılmaktadır (Zhao ve ark., 2011; Shaw ve ark., 2012). Birçok araştırmacı Cu nanopartikülerinin balıklar üzerinde akut ve kronik toksik etkisinin etkisini incelemişler ve bunun sonucunda doku birikimine, reaktif oksijen kaynaklı oksidatif strese, DNA hasarlarına ve biyokimyasal parametrelerde değişimlere neden olduğunu belirtmişlerdir (Federici ve ark., 2007; Karlsson ve ark., 2008; Gomes ve ark., 2011; Abdel-Khalek ve ark., 2015; Khabbazi ve ark., 2015).

Kargın (1996), *Mullus barbatus* ve *Sparus aurata* türleri ile yaptığı çalışmada her iki türde de Cu birikiminin en fazla karaciğerde olduğunu bunu solungaçlar ve kas dokusunun izlediğini belirtmiştir.

McGeer ve ark. (2000), *Oncorhynchus mykiss* ile yürüttükleri bir çalışmada 75 µg/L Cu'nun 100 günlük süreyle etkisinde en fazla bakır birikiminin karaciğerde olduğunu ve bunu sırasıyla solungaç ve böbrek dokularının izlediğini ve Cu birikiminin, etki süresinin başlangıcında hızla arttığını ve sürenin uzamasıyla durağan hale geldiğini saptamışlardır.

O. mykiss ile yürütülen bir çalışmada 30 günlük bakır etkisinde en yüksek Cu birikiminin karaciğerde olduğu, bunu böbrek ve solungaçların izlediğini belirlenmiştir (Hollis ve ark., 2001).

Raja erinacea ve *Myoxocephalus octodecemspinosus* türleri ile yapılan bir çalışmada Cu'nun 7 günlük etki süresinde en fazla Cu birikiminin karaciğerde olduğu, beyin ve kas dokularında ise Cu birikiminin oldukça düşük düzeyde olduğu bildirilmiştir (Grosell ve ark., 2003).

Danio rerio ile yapılan bir çalışmada bakır sülfat ve bakır oksit için 96 saatlik LC₅₀ değerini sırasıyla 0.094 mg/L ve 0.083 mg/L olarak belirlemişlerdir (Oliveria-Filho ve ark., 2004).

Griffitt ve ark., (2007) *D. rerio* için Cu NP'nin 48 saatlik LC₅₀ değeri olan 250 µg/L ve yine CuSO₄'ün LC₅₀ değeri olan 1,56 mg/L'lik derişimlerini inceledikleri çalışmalarında bakır sülfatın bakır nanopartikülüne oranla daha toksik olduğunu belirtmişlerdir.

Federici ve ark., (2007) titanyum dioksit nanopartiküllerinin (Ti NP) 0.1, 0.5 ve 1 mg/L'lik derişimlerinin 14 günlük süreyle etkisinde *O. mykiss*'in dokularındaki birikim düzeylerini tespit etmişler ve karaciğer dokusunda tüm derişimlerde Ti birikiminde artış gözlenirken, solungaç ve kas dokusunda tüm derişimlerde herhangi bir değişim olmadığını belirtmişlerdir.

Griffitt ve ark., (2008) Ag NP ve Cu NP'nin *D. rerio* için 48 saatlik LC₅₀ değerini sırasıyla 7.07 mg/L ve 0.98 mg/L olarak belirlemiş buna ek olarak da Ag NP'nin AgNO₃'e ve Cu NP'nin CuCl₂'ye oranla daha az toksik olduğunu belirtmiştir.

Griffitt ve ark., (2009) Cu nanopartikülünün ve bakır sülfatın 100 µg/L derişimlerinin 48 saat süreyle etkisinde *D. rerio*'nun solungaç dokusundaki metal birikiminin artış gösterdiğini ve Cu NP'nin, CuSO₄'e oranla daha fazla biriktüğünü belirtmiştir.

Zhao ve ark., (2011) CuO'nun nano (<10nm) ve daha büyük formunu (1500nm) karşılaştırdığı çalışmalarında *Cyprinus carpio*'da 30 günlük etki süresinde nano formunda en fazla birikim karaciğere oranla solungaçta olurken, CuO'nun daha büyük formunda en fazla birikim solungaca oranla karaciğerde olduğunu bildirmişlerdir.

Shaw ve ark., (2012) *O. mykiss* ile yürüttükleri bir çalışmada CuSO₄ ve Cu NP'nin 10 günlük süreyle solungaç ve karaciğer dokusunda etkisini incelemişler her iki uygulamada da bakır birikiminin her iki dokuda artış gösterdiğini ve CuSO₄'ün Cu NP'ye oranla solungaç ve karaciğer dokusunda daha fazla bakır birikimine neden olduğunu belirtmişlerdir.

Hao ve ark., (2013) *C. carpio* juvenilleri ile yürüttükleri bir çalışmada ZnO nanopartikülünün ve çinko sülfatın 50 mg/L'lik derişiminin 30 günlük süreyle etkisinde her iki uygulamada da solungaç ve karaciğerde çinko birikiminde artış gözleendiğini, doku sıralaması bakımından en fazla birikimin solungaç ve karaciğerde olduğunu ve kas dokusunda herhangi bir değişimin olmadığını belirtmişlerdir. Çinko kaynağı bakımından da çinko oksit nanopartiküllerinin çinko sülfata oranla daha fazla birikime neden olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte solungaç ve karaciğer dokusunda her iki uygulama sonucunda SOD aktivitesini azalttığını belirtmişlerdir.

Al-Bairuty ve ark., (2013) *O. mykiss* ile yürüttükleri bir çalışmada 20 ve 100 µg/L Cu NP ve 20 µg/L CuSO₄ derişimlerinin 10 günlük süreyle etkisinde solungaç dokusunda tüm derişimlerde ve karaciğer dokusunda yalnızca 20 µg/L CuSO₄ uygulamasında bakır birikiminde artış gözlemlenirken, dalak ve kas dokusunda herhangi bir değişim gözlemlenmediğini belirtmişlerdir.

Ateş ve ark., (2014) Cu NP'nin farklı derişimlerinin 7 günlük süreyle etkisinde *Cyprinodon variegatus*'da MDA düzeyinin arttığını ve buna bağlı olarak oksidatif strese neden olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte en fazla bakır birikiminin sırasıyla karaciğer ve solungaçta olduğunu ve kas ve beyin dokusunda herhangi bir değişim gözlenmediğini belirtmişlerdir.

Villarreal ve ark., (2014) *O. mossambicus* ile yürüttükleri bir çalışmada 5 ppm Cu NP etkisinde karaciğer dokusunda bakır birikimde artış gözleendiğini, yine karaciğer dokusunda metal etkisinde CAT aktivitesi artış gösterirken, SOD aktivitesinde herhangi bir değişim gözlenmediğini belirtmişlerdir.

Wang ve ark., (2014) *Epinephelus coioides* ile yürüttükleri bir çalışmada bakır oksit nanopartikülü ve bakır sülfatın 100 µg/L derişiminin 25 gün süreyle etkisini incelemişler ve en fazla bakır birikiminin sırasıyla karaciğer ve solungaçta en az birikimin ise kasta olduğunu belirtmişlerdir. Karaciğer dokusunda MDA düzeyinin önemli düzeyde kontrole oranla artış gösterdiğini ve SOD aktivitesinde ise 25 günlük etki süresi sonunda azalma olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte

25 günlük etki süresi sonunda CuSO_4 'ün Cu NP'ye oranla daha toksik olduğunu belirlemişlerdir.

Wang ve ark., (2015) *E. coioides* ile yürüttükleri bir çalışmada Cu NP ve CuSO_4 'ün 20 ve 100 $\mu\text{g/L}$ derişimlerinin 25 gün süreyle etkisinde solungaç ve karaciğerde doku hasarlarına neden olduğunu ve bakır sülfatın bakır oksit nanopartikülünden daha toksik olduğunu belirtmiştir.

Mansouri ve ark. (2016) CuO nanopartikülünün 2.5 ve 5.0, TiO_2 nanopartikülünün 10 mg/L derişiminin 4 günlük süreyle etkisinde *C. carpio*'nun solungaç ve karaciğer dokusunda histopatolojik anomaliye neden olduğunu belirtmişlerdir.

Lakani ve ark., (2016) *Acipenser baerii* juvenilleri ile yürüttükleri bir çalışmada Cu NP'nin 50, 100 ve 200 $\mu\text{g/L}$ derişimlerinin 14 gün süreyle etkisinde solungaç, karaciğer, barsak ve kas dokularını incelemişlerdir. Deneyde 7 ve 14 günlük etki süresi sonunda bakırın tüm dokulardaki birikimi artış göstermiş ve en fazla birikim sırasıyla barsak>solungaç>karaciğer>kas olarak belirlenmiştir.

Basha ve Rani (2003), *O. mossambicus* ile yaptıkları bir çalışmada 5 ppm kadmiyumun karaciğerde SOD ve CAT aktivitesinde artışa neden olduğunu belirtmişlerdir.

Dautremepuits ve ark. (2004), 0.1 ve 0.25 mg/L Cu'nun etkisine 8 gün süre ile bıraktıkları *C. carpio*'nun karaciğer dokusunda CAT aktivitesinde artış gösterdiğini belirtmişlerdir.

Ferreira ve ark. (2005), Douro nehrinden kirliliğin yoğun olduğu yerden örnekledikleri *M. cephalus* ve *Platichthys flesus*'in karaciğer dokularında lipid peroksidasyonunun yüksek düzeyde, SOD ve CAT aktivitesinin düşük düzeyde olduğunu saptamışlardır.

Vutukuru ve ark. (2005) *Esomus danricus* ile yürüttükleri bir çalışmada bakırın 1.402 mg/L derişiminin 96 saatlik etki süresinde solungaçlarda belirgin histolojik değişimlere ve hipoksiyaya neden olduğunu belirtmişlerdir.

Leporinus obtusidens'in karaciğer dokusunda LC₅₀ değeri olarak belirlenen derişimlerin %10 ve %20'sine denk gelen derişim olan 20 ve 40 µg/L'lik Cu etkisinde CAT aktivitesinin artış gösterdiğini belirtilmiştir (Gioda ve ark., 2007).

Li ve ark., (2008) *Oryzias latipes* ile yürüttükleri bir çalışmada selenyum nanopartikülleri (Se NP) ile sodyum selenitin 100 µg/L'lik derişimlerinin 10 günlük süreyle etkisinde solungaç, karaciğer ve kas dokusundaki birikimlerini ve SOD ve GPx enzim aktivitelerini incelemişlerdir. 10 günlük etki süresi sonunda tüm dokulardaki birikim düzeyi artış göstermiş, Se NP'nin sodyum selenite oranla daha toksik olduğunu belirtmişlerdir. Se NP etkisinde SOD ve GPx aktivitelerinde ise etki süresi sonunda SOD aktivitesinde azalma gözlenirken, GPx aktivitesinde artış gözleendiği belirtilmiştir.

Chae ve ark., (2009) gümüş nanopartiküllerinin (Ag NP) *O. latipes* türü üzerindeki toksik etkisini inceledikleri çalışmalarında 1 ve 25 µg/L Ag NP'nin 96 saatlik süreyle etkisinde metalin DNA hasarlarına ve oksidatif strese neden olduğunu belirtmişlerdir.

Hao ve ark., (2009) Ti NP'nin 10 mg/L'lik derişimlerinin 8 günlük süreyle etkisinde *C. carpio*'da solungaç, karaciğer ve beyin dokusundaki SOD ve CAT enzim aktivitesini incelemişler ve bu enzimlerin karaciğer dokusundaki aktivitesinin diğer dokulara oranla daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte karaciğer dokusunda etki süresi sonunda SOD ve CAT aktiviteleri kontrole oranla artış gösterdiği ve süreye bağlı etkisinde ise başlangıçta hızla aktivitenin arttığını sürenin uzamasıyla da bu artışın durduğunu belirtmişlerdir.

Xiong ve ark., (2011) *D. rerio* ile yürüttükleri bir çalışmada metal oksit nanopartiküllerinin oksidatif stresi arttırdığını ve bu nanopartiküllerin metalin diğer formlarına oranla daha fazla oksidatif hasara yol açtığını belirtmişlerdir.

Lee ve ark., (2012) *C. carpio* ile yürüttükleri bir çalışmada gümüş nanopartiküllerinin (Ag NP) 25, 50, 100 ve 200 µg/L'lik derişimlerinin 48 ve 96 saatlik süreyle antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkilerini incelemişler ve

SOD ve CAT aktivitelerinin karaciğer dokusunda solungaç ve beyin dokusuna oranla daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Pretto ve ark., (2014) *Rhamdia quelen* ile yürüttükleri bir çalışmada bakırın 16 ve 29 µg/L'lik derişimlerinin 45 günlük süreyle etkisinde karaciğer dokusunda CAT aktivitesinin kontrole oranla her iki derişimde de azaldığını belirtmişlerdir.

Abdel-Khalek ve ark., (2015) bakırın nano ve daha büyük formlarını kıyasladığı bir çalışmada CuO'nun 96 saatlik LC₅₀ değerinin 1/10 ve 1/20'sinin 30 günlük süreyle etkisinde *O. niloticus*'un solungaç ve karaciğer dokularındaki antioksidan enzim aktivitelerini incelemişlerdir. Antioksidan enzim aktivitelerinde ise *O. niloticus*'un karaciğer dokusunda SOD ve CAT aktivitesinde bakırın daha büyük formunda artış gözlenmiş, nano formunda ise bu enzimlerin inhibe olduğu belirtilmiştir. GPx aktivitesinde ise solungaç ve karaciğerde bakırın her iki formunda da artış olduğu belirtilmiştir. Tüm bu veriler ışığında sonuç olarak CuO'nun nano formunun daha toksik olduğu belirtmişlerdir.

Ostaszewska ve ark., (2015) Ag NP'nin 0,1, 0,5 ve 1,5 mg/L'lik ve Cu NP'nin 0,01, 0,05 ve 0,15 mg/L'lik derişimlerinin *A. baerii*'in solungaç ve karaciğer dokularında 21 günlük süreyle etkisini incelemişler ve Cu NP'nin 0,15 mg/L ve Ag NP'nin 1,5 mg/L derişimlerinin en fazla histopatolojik lezyonlara neden olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte araştırmacılar Cu NP'nin Ag NP'ye oranla daha toksik olduğunu belirtmişlerdir.

Su ekosistemlerine giren ağır metallerin akut veya kronik etkisi balıkların doku ve organlarında birikimin yanı sıra, serumdaki biyokimyasal parametreleri de etkileyerek metabolik ve fizyolojik olaylarda değişime neden olmaktadır (Heath, 1995). Biyokimyasal parametrelerin analizi hedef organ toksisitesinin belirlenmesinin yanında organizmaların genel sağlık durumlarının belirlenmesini ve stres halindeki organizmada erken uyarı sinyallerinin alınmasını da sağlayabilir (David ve ark., 2010; Dube ve ark., 2014).

Nemcsok ve Hughes (1988), 0.2 ve 2.0 ppm Cu'nun 24 ve 48 saat süre ile etkisinde *Salmo gairdneri*'nin biyokimyasal parametrelerindeki derişimleri

incelemişlerdir. 2 ppm Cu etkisinde 24 ve 48 saatlik süre sonunda kan glukoz düzeyi kontrole oranla artış gösterirken, plazma AChE aktivitesinde düşüş meydana gelmiştir. 0.2 ppm Cu etkisinde ise 48 saatlik etki süresinde benzer değişiklikler gözlenmiştir.

Singh ve Reddy (1990), *Heteropneustes fossilis* ile yürüttükleri bir çalışmada bakır sülfatın, kan parametrelerinde Na^+ , ve K^+ düzeylerinde artışın olduğunu saptamışlardır.

Pelgrom ve ark. (1995), *O. mossambicus*'da bakır etkisinde serum Na^+ ve Cl^- iyon düzeylerinde bir azalma meydana geldiğini belirtmişlerdir.

Dethloff ve ark. (1999), *O. mykiss* ile yaptıkları bir çalışmada bakırın 6.4, 16.0, 26.9 $\mu g/L$ derişimlerinin 3, 7, 14 ve 21 gün süre ile etkisinde glikoz ve kortizol düzeylerinin başlangıçta kontrole oranla arttığını, sürenin uzamasıyla kontrol düzeyine geldiğini belirtmişlerdir.

Mazon ve ark. (2002) *Prochilodus scrofa* ile 96 saat 30 $\mu g/L$ 'lik bakır etkisinde ilk 24 saatlik etki süresinde plazma laktat seviyesinin arttığını, sürenin uzamasıyla kontrol seviyesine indiğini; Schjolden ve ark. (2007) *Carassius carassius* ile 14 gün 300 $\mu g/L$ 'lik bakır etkisinde plazma laktat seviyesinin kontrole oranla artış gösterdiğini belirtmişlerdir.

Chen ve ark. (2004), *O. niloticus* ile yürüttükleri bir çalışmada bakırın 7 günlük etkisinde total protein ve albumin seviyesinin değişmediğini, glikoz, kolesterol ve ALP düzeyinin ise kontrole oranla artış gösterdiğini belirtmişlerdir.

Zaghloul ve ark. (2006), bakırın üç farklı tür olan *Clarias gariepinus*, *O. niloticus* ve *Tilapia zillii*'de serum glikoz düzeyinde kontrole oranla artışa neden olurken, serum total protein düzeyinde azalmaya neden olduğunu belirtmiştir. Serum AST, ALT ve ALP aktiviteleri ise kontrole oranla artış gösterdiğini belirtmişlerdir.

Ramesh ve ark. (2007) *C. carpio* ile yaptıkları çalışmada 0.7 ppm bakırın 7 günlük etki süresinde kortizol seviyesinin belirgin bir seviyede arttığını gözlemlemişlerdir.

Öner ve ark. (2008) bakırın 30 gün süreyle etkisinde *O. niloticus*'un serum total protein seviyesinin azaldığını tespit etmişlerdir.

Heydarnejad ve ark., (2013) *O. mykiss* ile yaptıkları bir çalışmada bakırın 10 ve 30 µg/L'lik derişimlerinin 1, 15 ve 30 günlük süreyle etkisinde serum parametrelerindeki değışiklikleri incelemişlerdir. Serum glikoz düzeyi ve AST, ALT aktivitelerinde 15 günlük etki süresinde her iki derişimde de artış gözlenirken 30 günlük etki süresinde kontrol düzeyine indiğı belirtilmiştir. Serum ALP aktivesi ve total protein miktarında da etkide kalma süresine bağılı olarak artışın devamlılık gösterdiği belirtilmiştir. Serum kolestrol ve trigliserid düzeylerinin ise 15 günlük etki süresinde her iki derişimde de kontrole oranla azalma gösterdiği belirtilmiştir.

R. quelen ile yürütölen bir çalışmada bakırın 16 ve 29 µg/L'lik derişiminin 45 günlük etki süresinde serum glikoz düzeyinde artış gözlenirken serum total protein düzeyinde azalma meydana gelmiştir (Pretto ve ark., 2014).

Abdel-Khalek ve ark., (2015) bakırın nano ve daha büyük formlarını kıyasladığı bir çalışmada CuO'nun 96 saatlik LC₅₀ değerinin 1/10 ve 1/20'sinin 30 günlük süreyle etkisinde *O. niloticus*'un serum parametreleri üzerine etkisini incelemişlerdir. Buna göre serum glikoz seviyesi ile serum AST, ALT ve ALP aktivitelerinde artış göröldüğünü, serum total protein, total lipid, albümin ve globölin düzeyinin ise azalma gösterdiğini belirtmişlerdir.

Mazandarini ve Hoseini (2015) *C. carpio*'da 0.25 ppm CuSO₄ ve 0.25 ve 25 ppm Cu NP derişimlerinin 3, 7 ve 14 günlük süreyle serum parametreleri üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında serum trigliserid düzeyi 0.25 ppm CuSO₄ etkisinde 3 ve 7. günde, 25 ppm Cu NP etkisinde 3. günde kontrole oranla artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Serum kolesterol düzeyinde ise 0.25 ppm CuSO₄ etkisinde 3. ve 14. günde, 0.25 ppm Cu NP etkisinde 14. günde ve 25 ppm Cu NP etkisinde ise 14. günde kontrole oranla artış gösterdiğini belirtilmiştir.

Hoseini ve ark., (2016) *C. carpio*'da 0.25 ve 25 ppm Cu NP ile 0.25 ppm CuSO₄'ün 14 günlük etkisini inceledikleri bir çalışmada serum ALT aktivitesi 0.25 ppm Cu ve 25 ppm Cu NP etkisinde kontrole oranla artış göstermiş, AST aktivitesi ise 0.25 ppm Cu NP etkisinde artış gösterdiği belirtilmiştir. Bununla birlikte araştırmacılar *C. carpio*'da bakır sülfatın bakır nanopartiküllerine oranla daha toksik olduğunu belirtmişlerdir.





3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Araştırmada materyal olarak kullanılan *O. niloticus* Çukurova Üniversitesi Su ürünleri üretim havuzlarından alınarak deneylerin yürütüldüğü kontrollü ortam şartlarındaki Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Ekotoksikoloji Laboratuvarına getirilmiştir. Balıklar her biri 40x120x40 cm boyutlarında, içerisinde 120 L çeşme suyu bulunan stok akvaryumlar içerisinde 2 ay süreyle tutularak laboratuvar ortam koşullarına adaptasyonları sağlanmıştır. Bu süre sonunda deneyde kullanılan balıklar 20.50 ± 1.50 cm boy ve 170.95 ± 5.21 g ağırlığa ulaşmışlardır.

Adaptasyon ve deney süresince ortam sıcaklığı $25 \pm 1^\circ\text{C}$ sabit tutularak 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık fotoperiyodu uygulanmıştır. Akvaryumlar merkezi havalandırma sistemi ile havalandırılmış ve balıklar günde iki kez toplam biyomasın %2 si kadar hazır balık yemi (Pınar hazır balık yemi Pelet No:2, Türkiye) ile beslenmişlerdir.

Deneyde 40x120x40 cm boyutlarında toplam 7 tane cam akvaryum kullanılmış olup her birine 120 L dinlendirilmiş metal içermeyen çeşme suyu konulmuştur. Her bir akvaryuma 9 balık konulmuş, toplamda 63 balık kullanılmıştır. İlk 3 akvaryuma son derişimleri sırası ile 10, 50 ve 100 µg Cu/L olacak şekilde 1000 ppm CuO NP çözeltisi, 4, 5 ve 6. akvaryumlara ise yine son derişimleri 10, 50 ve 100 µg Cu/L olacak şekilde 1000 ppm CuSO₄ çözeltisi eklenmiştir. Yedinci akvaryuma ise metal içermeyen dinlenmiş çeşme suyu konulup kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Deney çözeltilerinin hazırlanmasında bakır sülfat (Sigma Aldrich, CuSO₄:5H₂O) ve bakır oksit nanopartikülü (Sigma-Aldrich; CuO; partikül boyutu <50nm) kullanılmıştır. Deneyler süresince ortam suyunun bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Deney ortam suyunun fiziksel ve kimyasal özellikleri

Sıcaklık (Akvaryum):	$23 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$
Toplam alkalinite	: $315 \pm 0.5 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$
Çözünmüş oksijen	: $7.0 \pm 0.3 \text{ mg/L}$
pH	: 8.2 ± 0.3

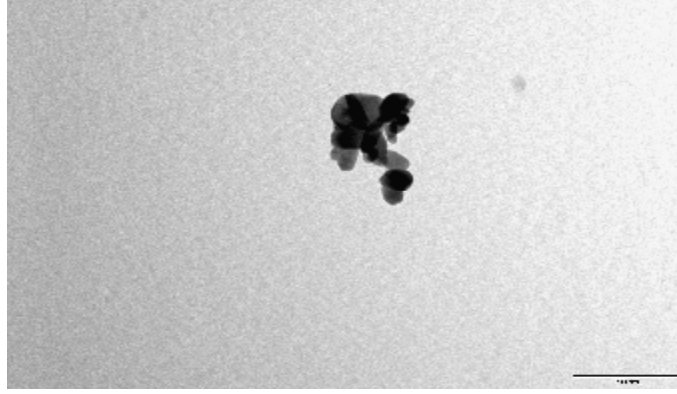
Deneyler üç tekrarlı olarak yürütülmüş olup her tekrarda bir balık olacak şekilde toplam 63 balık kullanılmıştır. Deney süresince adsorbsiyon ve evaporasyon gibi nedenlerle metal çözeltilerinin derişimlerinde değışimler olabileceğinden deney çözeltileri her gün taze olarak hazırlanan stok çözeltilerinden uygun seyreltmeler yapılarak değıştirilmiştir.

Belirlenen sürelerin sonunda akvaryumların her birinden metal analizinde kullanılacak doku örneklemeleri yapmak üzere üç balık çıkarılmıştır. Daha sonra çeşme suyu ile iyice yıkanarak, kurutma kağıdı ile kurutulmuş ve kan örnekleri alındıktan sonra solungaç, karaciğer, böbrek, dalak ve kas dokuları disekte edilmiştir.

3.1.1. Bakır oksit nanopartikül karakterizasyonu

Deneylerde partikül büyüklüğü 50 nm'den küçük olan bakır oksit nanopartikülü (Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. CuO NP çözeltinin derişimi 100 mg/L olacak şekilde hem ultra saf su hem de çeşme suyu içerisinde çözülmüştür. Elde edilen karışım analizden hemen önce 15 dakika süreyle ultrasonik banyoda sonikasyona bırakılmış ve ardından analiz işlemine geçilmiştir.

Transmisyon elektron mikroskobu (TEM) analizleri için ultra saf su ile hazırlanan 100 mg/L CuO NP sonikasyona bırakılmış ardından üzeri karbon tabaka ile kaplanarak oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Partikül boyut aralığı JEOL (JEM-1011) mikroskopta görüntü analiz yazılımı (Soft Imaging System) kullanılarak rastgele seçilmiş 60 nanopartikül analizi ile belirlenmiştir.



Şekil 3.1. CuO NP'nin Transmisyon elektron mikroskobu görüntüsü

Hidrodinamik çap ve zeta potansiyeli belirlemek için ultra saf su ve çeşme suyu ile 100 mg/L CuO NP çözeltisi hazırlanmış Zetasizer Nano ZS analizatörü kullanılarak (Malvern Instruments Inc., UK) sırasıyla dinamik ışık saçılımı (DLS) ve elektroforetik ışık saçılımı (ELS) ile belirlenmiştir. Işık kaynağı olarak 633 nm dalga boyu sabitlenmiş He-Ne lazeri kullanılmış ve saçılan ışık yoğunluğu 90° de detektör ile ölçülmüştür. NP boyutu Stokes-Einstein eşitliği kullanılarak z-ortalama hidrodinamik çap olarak belirlenmiştir. Her bir boyut ölçümü üç tekrarlı olmak üzere 1 ml süspansiyon tek kullanımlık polistren küvet (DTS0012, Malvern, Inc.) içerisine konularak uygulanmıştır. Zeta potansiyeli tek kullanımlık polikarbonat kapiler hücre (DTS1061, Malvern Inc.) içerisinde yine aynı cihaz kullanılarak belirlenmiştir. Tüm ölçümler 25°C'de yürütülmüştür.

Çizelge 3.2. CuO nanopartikül karakterizasyonu (Ortalama $\pm$ Standart hata)

Partikül özelliği	Metod	Ultra saf su	Çeşme suyu
Boyut (nm)	TEM	< 50 ^a	-
Partikül Boyut dağılımı (nm)	TEM	33.0 $\pm$ 8.3 ^b	-
Hidrodinamik çap (nm)	DLS	586.6 $\pm$ 89.4 ^b	812.8 $\pm$ 98.8 ^b
Zeta potansiyeli (mV)	ELS	-17.1 $\pm$ 0.4 ^b	-18.5 $\pm$ 2.1 ^b

^aSigma-Aldrich

^b100 mg/L CuO NP

3.2. Metod

3.2.1. Doku birikimi

Disekte edilen dokular metal analizleri için petri kaplarına yerleştirilmiş ve etüvde 150°C’de 48 saat süreyle kurutulmaya bırakılmıştır. Sabit tartıma getirilen dokular 0.0001 duyarlılıktaki terazide (Sartorius CP-2248) kuru ağırlıkları alındıktan sonra deney tüplerine aktararak üzerlerine 2:1 oranında nitrik asit (Merck, %65, Ö.A. 1.40) ve perklorik asit (Merck, %60, Ö.A. 1.53) eklenerek çeker ocakta 120°C’de 3 saat süreyle yakılmıştır (Muramoto, 1983). Yakım işlemi tamamlanan örnekler polietilen tüplere aktarılmış ve üzerleri ultra saf su ile 5 ml’ye tamamlanarak metal analizine hazır hale getirilmiştir. Dokulardaki metal birikimleri Perkin Elmer 7000 DV marka (Waltham, Massachusetts, USA) ICP-OES spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.2. Total protein tayini

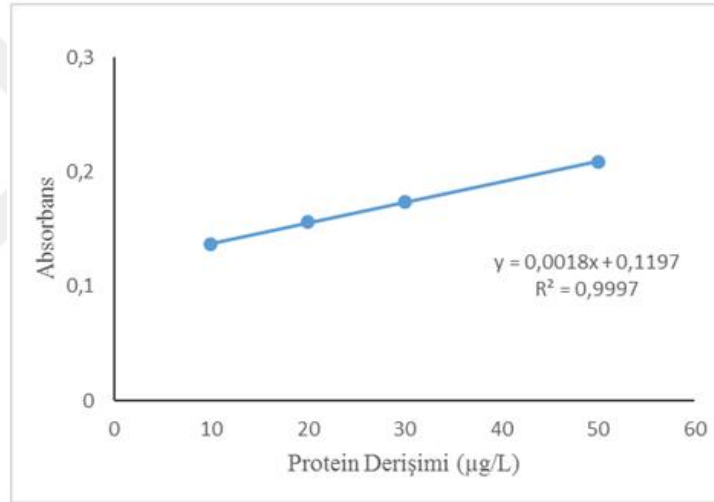
Bradford yöntemi, proteinlerde bulunan arjinin, triptofan, tirozin, histidin ve fenilalanin gibi aminoasit rezidülerinin, Coomassie brilliant blue G-250 boyasına bağlanmasıyla mavi renkli kompleks oluşması esasına dayanır. Oluşan çözeltinin absoransı 595 nm’de ölçülür (Bradford, 1976).

Standart grafiğin oluşturulması için Bovin serum albümin (BSA) kullanılarak 1 mg/mL’lik stok protein çözeltisi hazırlanmıştır. Stok protein çözeltisi 0, 10, 20, 30 ve 50 µg/L derişimlerinde seyreltilerek standart protein çözeltileri hazırlanmıştır. Örnek protein derişimlerinin ölçülmesinde kullanılan yöntem ile bu standartların absorans değerleri belirlenmiş ve standart grafiğin oluşturulmasında kullanılmıştır. Çözeltiler hazırlandıktan sonra 5 saniye vortekste karıştırılmıştır.

Bradford reaktifinin hazırlanmasında 10 ml Bradford reaktifi üzerine 40 ml ultra saf su eklenmiştir. Örneklerin hazırlanmasında ise dokuların homojenizasyonu sonucunda elde edilen supernatantlar ilk önce 1/100 oranında seyreltilmiş, daha sonra tekrar 1/5 oranında seyreltilmiştir.

1. seyreltme: 1/100; 990 µl ultra saf su
10 µl örnek
2. seyreltme: 1/5; 200 µl ultra saf su
50 µl 1/100 oranında seyreltme yapılmış örnek

Hazırlanan standart çözeltilerden başka bir tüpe 250 µl eklenmiş, üzerine 750 µl Bradford reaktifi ilave edilmiştir. Çözeltiler vorteks ile çalkalandıktan sonra 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu süre sonunda örnekler 595 nm absorbansta spektrofotometrede okunmuştur.



Şekil 3.2. Protein derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki.

Örneklerin protein miktarlarının tayininde ise, seyreltilmiş supernatantlardan 250 µl alınarak üzerlerine 750 µl Bradford reaktifi ilave edilmiştir. Çözeltiler vorteks ile çalkalandıktan sonra 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu süre sonunda örnekler 595 nm absorbansta spektrofotometrede okunmuştur. Kör olarak örnekle aynı miktarda ultra saf su kullanılmıştır.

3.2.3. Antioksidan enzim aktivite tayini

Belirlenen süreler sonunda disekte edilen karaciğer dokuları yaş ağırlıkları alındıktan sonra içerisinde homojenizasyon tamponu bulunan tüplere aktararak +4°C’de homojenize edilmiştir. Homojenizasyon sonrasında homojenatlar 500g’de 15 dk. +4°C’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda alınan süpernatant başka bir tüpe aktararak, 12000 g’ de +4 °C’de 45 dk. tekrar santrifüj edilmiştir. Doku homojenatlarının santrifüj edilmesi sonucunda elde edilen süpernatantlardan 100 µl Eppendorflara protein tayini için ayrılmıştır. Daha sonra süzme işlemine geçilmiş ve bu işlem için Sephadex® G-25 jel kolonları kullanılmıştır (Gonzalez-Reya ve ark, 2014). Süzülen örnekler enzim aktivitesi için eppendorf tüplere ayrılmıştır. Tüplere ayrılan örnekler, -80°C’de enzim aktivitelerinin tayin işlemlerine kadar Revco Ultima II marka derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

3.2.3.1. Katalaz aktivitesi tayini

Katalaz aktivitesi (CAT) bir dakika boyunca 240 nm absorbansta H_2O_2 ’ in parçalanmasıyla açığa çıkan azalan absorbansın ölçülmesidir. Sabit sayısı ($\epsilon_{240}= 40 M^{-1}cm^{-1}$) kullanılarak birim zaman başına absorbanstaki değişimler katalaz aktivitesinin ölçümü olarak alınmıştır. Enzim aktivitesi $nmol\ dk^{-1}\ mg^{-1}$ protein birimiyle verilmiştir (Greenwald, 1985).

A) Çözeltiler:**Fosfat tamponu;**

Solüsyon A: KH_2PO_4 10.9 g

1L ultra saf su

Solüsyon B; K_2HPO_4 13.92 g

1L ultra saf su

50 ml Sol A+ 250 ml Sol B; pH 7.8

1L ultra saf su ile tamamlanır, pH 7.5 olarak HCl ile ayarlanır.

% 30 H₂O₂:

Ayrı bir balon jodede % 30' luk H₂O₂ 1,7 ml konulur ve üzeri hazırlanan fosfat tamponu ile 100 ml' ye tamamlanır.

B) Örneklerin ölçülmesi:

Çizelge 3.3. Katalaz aktivitesinin ölçümü

Solüsyon	Hacim (µl)	Kör
Fosfat tamponu	1900	3000
H ₂ O ₂	1000	-
Örnek	100	-
Toplam	3000	3000

Örnekler, Optizen 3220 UV marka spektrofotometrede 240 nm absorbansta 10 saniye aralıklarla 1 dakika boyunca kinetik olarak okunmuştur.

C) Hesaplama

$$Aktivite(nmoldk^{-1}mg^{-1}) = \left(\frac{|DODörnek|}{40} \cdot \frac{3}{V_{örnek(ml)}} \cdot 1.4 \right) / TP(mg/ml) * 1000$$

ΔOD– Absorbans farkı

40 – Ekstinksiyon katsayısı

3 – Reaksiyon küvetlerindeki toplam hacim

1.4 – Örneklerin saflaştırılmasında kullanılan Sephadex kolonlarının seyreltme faktörü

TP – Total protein konsantrasyonu

3.2.3.2. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi tayini

Süperoksit dismutaz aktivitesi (SOD, EC.1.15.1.1) ksantinoksidaz/hipoksantin sistemi tarafından sitokrom c' nin azalmasının ölçülmesiyle tespit edilmektedir. 1 ünite SOD, sitokrom c azalışının %50' sinin inhibe edilmesiyle biriken enzim miktarı ile tanımlanmaktadır (McCord ve Fridovich, 1969). SOD aktivitesi, total protein konsantrasyonunun $U\ mg^{-1}$ olarak tanımlanmasıyla elde edilir.

A) Çözeltiler:**Fosfat tamponu;**

Solüsyon A: KH_2PO_4	6,8 g
EDTA	0,0292 g
1L ultra saf su	
Solüsyon B; K_2HPO_4	8,7 g
EDTA	0,0292 g
1L ultra saf su	

100 ml Sol A+ 850 ml Sol B; pH 7.8

Hipoksantin;

Hipoksantin	20,4 g
Ultra saf su	100 ml

Tamamen çözünene kadar 50 °C' de ısıtılır.

Sitokrom c oksidaz;

Sitokrom c	37,5 g
Fosfat tamponu	20 ml

Ksantin oksidaz (56 μ m/ml):

Ksantin	50 μ l (38,5 U/ml)
---------	------------------------

Fosfat tamponu 2 ml

B) Ksantin oksidaz testi:

Örnekler okunmadan önce 550 nm absorbansta bir dakika boyunca üç tekrarlı olmak üzere ksantin oksidaz testi yapılmıştır.

Çizelge 3.4. Ksantin oksidaz testi

Solüsyon	Hacim (µl)
Fosfat tamponu	2700
Hipoksantin	100
Sitokrom c oksidaz	100
Ksantin oksidaz	100
Toplam	3000

C) Örneklerin ölçülmesi

Çizelge 3.5. Süperoksit dismutaz aktivitesinin ölçümü

Solüsyon	Hacim (µl)	Kör
Fosfat tamponu	2650	2800
Hipoksantin	100	100
Sitokrom c oksidaz	100	100
Örnek	50	-
Ksantin oksidaz	100	-
Toplam	3000	3000

Örnekler Optizen 3220 UV marka spektrofotometrede 550 nm absorbansda 1 dakika boyunca kinetik olarak okunmuştur.

D) Hesaplama

Ksantin inhibisyonu;

$$\%I = 100 - 1 - \frac{\text{DODörnek}}{\text{DODksantin}}$$

SOD aktivitesi;

$$\text{Aktivite (U mg}^{-1}\text{)} = \frac{\%I}{50} \cdot \frac{3}{\text{Vörnek (ml)}} \cdot 1.4 \cdot \frac{\text{TP}}{\text{TP}} \cdot \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

ΔOD – Absorbans farkı

50– Ekstinksiyon katsayısı

3– Reaksiyon küvetlerinin toplam hacmi

1.4– Örneklerin saflaştırılmasında kullanılan Sephadex kolonlarının seyreltme faktörü

TP– Total protein konsantrasyonu

3.2.3.3. Glutasyon peroksidaz (GPx) aktivitesi tayini

Total glutasyon peroksidaz (GPx) NADPH' ın 340 nm' de oksidasyonunu takiben glutasyon reduktaz, redükte glutasyon ve substrat olarak kümen hidroperoksit varlığında ölçülür (Lawrence ve Burk, 1976). GPx aktivitesi, total protein konsantrasyonun nmol dk⁻¹ mg⁻¹ cinsinden ifade edilir.

A) Çözeltiler:**Fosfat tamponu;**

Solüsyon A: KH₂PO₄ 13.6 g

1L ultra saf su

Solüsyon B; K₂HPO₄ 17.4 g

1L ultra saf su

50 ml Sol A+ 250 ml Sol B; pH 7.8

GSH (redükte glutatyon);

GSH	0,123 g
Fosfat tamponu	10 ml

Kümen hidroperoksit

Kümen (% 80)	0,563 ml
Etanol	20 ml
100 ml' ye kadar ultra saf su ilave edilir.	

GR (glutatyon reduktaz)

GR	38,4 µl (38,5 U/ml)
Fosfat tamponu	1,78 ml

NADPH

NADPH	4 mg
Fosfat tamponu	2 ml

B) Kümen hidroperoksit testi

Çizelge 3.6. Kümen hidroperoksit testi

Solüsyon	Hacim (µl)
Fosfat tamponu	450
GSH	50
GR	50
NADPH	50
Tris Tamponu*	300
Kümen hidroperoksit	100
Toplam	1000

*Örneğin homojenizasyonunda kullanılan Tris HCl tamponu

C) Örneklerin ölçülmesi

Çizelge 3.7. Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesinin ölçümü

Solüsyon	Hacim (µl)	Kör
Fosfat tamponu	450	1000
GSH	50	-
GR	50	-
NADPH	50	-
Örnek	300	-
Kümen hidroperoksit	100	-
Toplam	1000	1000

Örnekler, Optizen 3220 UV marka spektrofotometrede 340 nm absorbandsda 1 dakika boyunca okunmuştur.

D) Hesaplama

Aktivite (nmol dk⁻¹ mg⁻¹)=

$$\frac{\Delta OD_{\text{Örnek}} - \Delta OD_{\text{Kümen}}}{6.2} \cdot \frac{1}{V_{\text{örnek}}} \cdot \frac{1.4}{TP} \cdot \frac{mg}{\text{Örnek}} \cdot 1000$$

ΔOD– Absorbans farkı

6,2– Ekstinksiyon katsayısı

1– Reaksiyon küvetlerinin total hacmi

1.4– Sephadex kolonunun seyreltme faktörü

TP– Total protein konsantrasyonu

3.2.4. Serum parametreleri

Serum parametrelerin incelenmesinde kullanılan kan örnekleri her bir deneğin kaudal pedinkülünün vertikal doğrultuda kesilmesi yolu ile elde edilmiştir. Alınan kan örnekleri içerisinde herhangi bir antikoagülant madde bulunmayan santrifüj tüplerine aktararak 4000 dev/dak.'da 10 dakika süreyle santrifüj (Nüve, NF 400 marka) edilmiş ve serum örnekleri elde edilmiştir. Elde edilen serum

örnekleri serum tüplerine aktararak analize hazır hale getirilmiş ve serum parametrelerinin analizinde Beckman Coulter DXI 800 ve DXC 800 marka otoanalizatör cihazı kullanılmıştır.

3.2.5. İstatistik

Deneylerden elde edilen verilerin istatistik analizleri SPSS 21 Paket Programı kullanılarak Varyans Analizi ve Student-Newman Keul's Test (SNK) testleri uygulanarak yapılmıştır (Sokal ve Rohlf, 1995).





4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

Belirlenen süre ve derişimlerde Cu NP ve CuSO₄ etkisinde balıklarda mortalite gözlenmemiştir. Balıklar metal etkisi başlangıcında besin almama, akvaryum yüzeyine yönelme, operkulum hareketlerinde artış, yüzme hareketlerinde koordinasyon bozukluğu gibi davranış değişiklikleri göstermişlerdir. Etkide kalma süresinin uzaması ile bu değişikliklerin normale döndüğü belirlenmiştir.

Solungaç dokusunda Cu NP etkisinde 1. gündeki bakır birikimi tüm derişimlerde kontrole oranla artış gösterirken (Çizelge 4.1.; $P<0.05$), 7. günde 10 ve 100 µg/L'lik derişimlerde kontrole oranla artış göstermiştir ($P<0.05$). 15 günlük etki süresinde Cu NP etkisinde bakır birikimi 10 ve 50 µg/L'lik derişimlerde kontrole oranla artış göstermiştir ($P<0.05$). Cu NP etkisinde solungaç dokusundaki bakır birikimi 15 günlük etki süresinde 10 µg/L'lik derişimde 50 µg/L'lik derişime oranla daha fazla olmuştur ($P<0.05$).

CuSO₄ etkisinde solungaç dokusunda 1. gündeki bakır birikimi tüm derişimlerde kontrole oranla herhangi bir değişim göstermezken ($P>0.05$), 7. günde tüm derişimlerde kontrole oranla artış göstermiş ($P<0.05$), 15. günde ise 50 ve 100 µg/L'lik derişimlerde kontrole oranla artış belirlenmiştir ($P<0.05$). CuSO₄ etkisinde solungaç dokusunda 7 günlük etki süresindeki birikim 10 µg/L'lik derişimde 50 µg/L'lik derişime oranla daha fazla olmuştur ($P<0.05$).

Süreye bağlı metal etkisi incelendiğinde 10 µg/L'lik Cu NP etkisinde 15. günde 1 ve 7. günlere göre bakır birikimi artış gösterirken ($P<0.05$), 50 µg/L'lik derişimde 7. günde 1. güne oranla azalmış, 15. günde ise 7. güne oranla artış göstermiş ($P<0.05$), 100 µg/L'lik derişimde ise 7. günde 1. güne oranla artmış ve 15. günde 7. güne oranla azalma göstermiştir ($P<0.05$).

CuSO₄'ün süreye bağlı etkisinde 10 µg/L'lik CuSO₄ etkisinde 7. gündeki bakır birikimi 1. güne oranla artış gösterirken, 50 ve 100 µg/L'lik CuSO₄ etkisinde 7 ve 15. günlerdeki birikim 1. güne oranla artış göstermiştir ($P<0.05$).

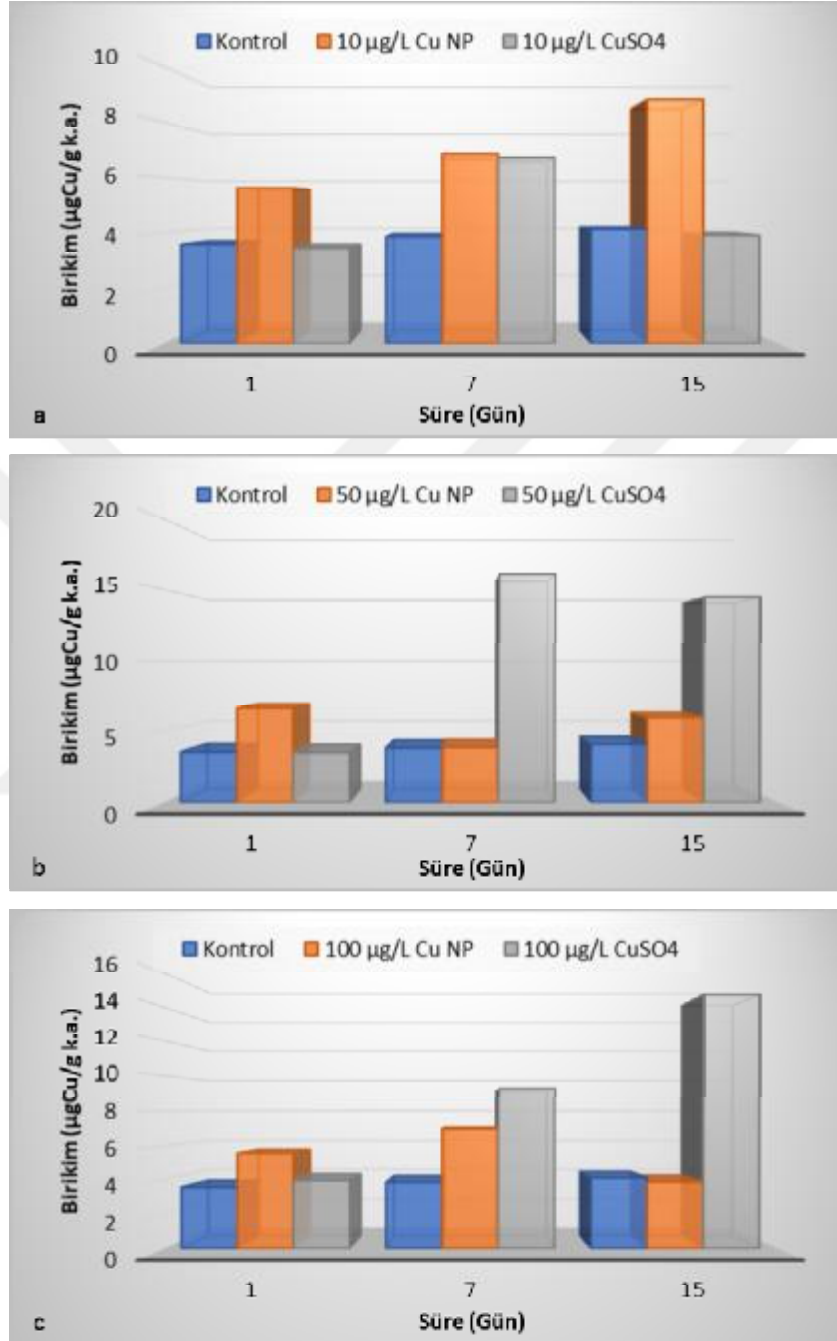
Çizelge 4.1. *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Cu NP ve CuSO₄'ün farklı derişimlerinin etkisinde süreye bağı bakır birikimi (µg Cu/g k.a.).

DERİŞİM (µg/L)	SÜRE (GÜN)		
	1	7	15
	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *
Kontrol	3.578 ± 0.275 as	3.860 ± 0.549 as	4.124 ± 0.389 as
10 µg/L Cu NP	5.602 ± 0.234 bs	6.838 ± 0.268 bs	8.819 ± 0.693 bt
50 µg/L Cu NP	6.649 ± 0.291 bs	3.900 ± 0.385 at	5.970 ± 0.287 cs
100 µg/L Cu NP	5.575 ± 0.464 bs	6.975 ± 0.260 bt	3.884 ± 0.398 ax
10 µg/L CuSO ₄	3.440 ± 0.591 as	6.713 ± 0.210 bt	3.905 ± 0.441 as
50 µg/L CuSO ₄	3.531 ± 0.386 as	16.15 ± 0.190 ct	14.47 ± 0.069 dx
100 µg/L CuSO ₄	3.973 ± 0.425 as	9.250 ± 0.475 dt	14.74 ± 0.558 dx

*SNK; a, b, c ve d ile gösterilen harfler derişimler arası, s, t ve x harfleri ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P < 0.05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.

$\bar{X} \pm s\bar{x}$: Aritmetik ortalama ± Standart Hata

Cu NP ve CuSO₄ solungaç dokusundaki etkisi kıyaslandığında, 10 µg/L'lik derişimde 1 ve 15 günlük etki süresinde Cu NP etkisinde CuSO₄'e oranla daha fazla bakır birikimi gözlenmiş (Şekil 4.1. P<0.05), 7 günlük etki süresinde ayrım görülmemiştir (P>0.05). 50 ve 100 µg/L'lik derişimlerde ise 1.günde Cu NP, 7 ve 15. günde ise CuSO₄ etkisindeki bakır birikimi daha fazla olmuştur (P<0.05).



Şekil 4.1. *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Cu NP ve CuSO₄'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağlı bakır birikimlerinin karşılaştırılması (µg Cu/g k.a.).

Karaciğer dokusunda Cu NP etkisindeki bakır birikimi tüm derişim ve sürelerde kontrole oranla artış göstermiştir (Çizelge 4.2.; $P < 0.05$). 1 günlük etki süresinde derişimdeki artışa paralel olarak bakır birikimi artış gösterirken ($P < 0.05$), 7 ve 15 günlük etki süresinde 50 ve 100 $\mu\text{g/L}$ 'lik derişimde 10 $\mu\text{g/L}$ 'lik derişime oranla daha fazla biriktiği belirlenmiştir ($P < 0.05$).

CuSO_4 etkisinde karaciğer dokusundaki bakır birikimi de tüm derişim ve sürelerde kontrole oranla artış göstermiştir ($P < 0.05$). 1 ve 15 günlük etki süresinde 100 $\mu\text{g/L}$ 'lik derişimde 10 ve 50 $\mu\text{g/L}$ 'lik derişimlere oranla ($P < 0.05$), 7 günlük etki süresinde ise 50 ve 100 $\mu\text{g/L}$ 'lik derişimlerde 10 $\mu\text{g/L}$ 'lik derişime oranla birikim daha fazladır ($P < 0.05$).

Çizelge 4.2. *O. niloticus*'un karaciğer dokusunda Cu NP ve CuSO_4 'ün farklı derişimlerinin etkisinde süreye bağlı bakır birikimi ($\mu\text{g Cu/g k.a.}$).

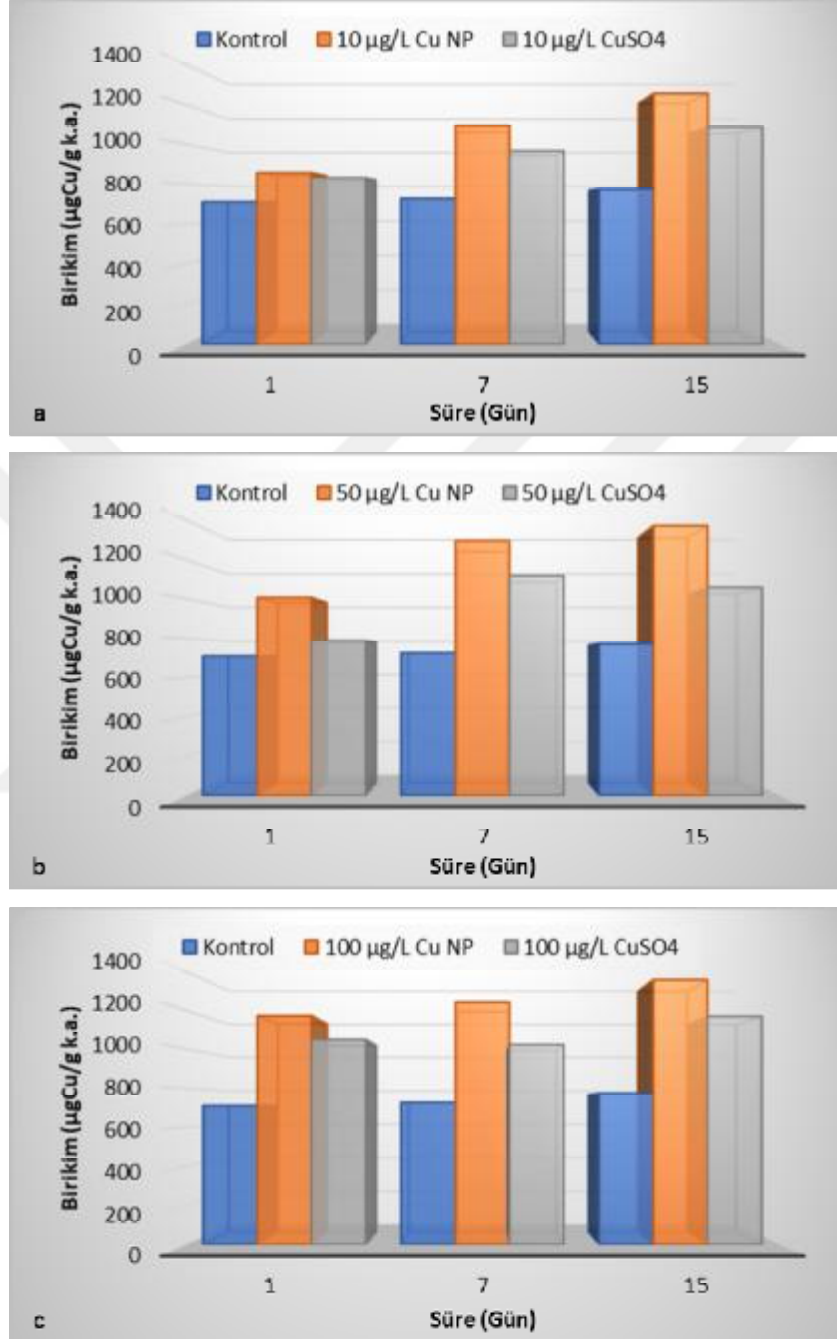
DERİŞİM ($\mu\text{g/L}$)	SÜRE (GÜN)		
	1 $\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	7 $\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	15 $\bar{X} \pm s\bar{x}$ *
Kontrol	709.7 $\pm$ 28.77 as	726.5 $\pm$ 53.25 as	773.7 $\pm$ 9.694 as
10 $\mu\text{g/L}$ Cu NP	857.2 $\pm$ 20.12 bs	1093 $\pm$ 7.961 bt	1254 $\pm$ 11.16 bx
50 $\mu\text{g/L}$ Cu NP	1007 $\pm$ 22.20 cs	1294 $\pm$ 11.82 ct	1368 $\pm$ 9.282 cx
100 $\mu\text{g/L}$ Cu NP	1172 $\pm$ 13.30 ds	1242 $\pm$ 21.07 ct	1355 $\pm$ 8.372 cx
10 $\mu\text{g/L}$ CuSO_4	832.7 $\pm$ 29.16 bs	965.4 $\pm$ 26.12 dt	1086 $\pm$ 21.72 dx
50 $\mu\text{g/L}$ CuSO_4	789.5 $\pm$ 20.89 bs	1120 $\pm$ 23.53 bt	1056 $\pm$ 9.002 dt
100 $\mu\text{g/L}$ CuSO_4	1046 $\pm$ 30.02 cs	1021 $\pm$ 41.44 bs	1169 $\pm$ 10.31 et

*SNK; a, b, c, d ve e ile gösterilen harfler derişimler arası, s, t ve x harfleri ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P < 0.05$ düzeyinde istatistik ayrım vardır.

$\bar{X} \pm s\bar{x}$: Aritmetik ortalama $\pm$ Standart Hata

Süreye bağlı metal etkisi incelendiğinde, 10 µg/L'lik CuSO₄ ve Cu NP etkisinde karaciğerde etki süresine bağlı olarak bakır birikiminde artış gözlenirken (P<0.05), 50 ve 100 µg/L'lik CuSO₄ ve Cu NP etkisinde 7 ve 15 günlük etki süresinde 1 günlük etki süresine oranla artış belirlenmiştir (P<0.05).

Cu NP ve CuSO₄ karaciğer dokusundaki etkisi kıyaslandığında, 10 µg/L'lik derişimde 1. günde herhangi bir farklılık gözlenmezken (Şekil 4.2.; P>0.05), 7 ve 15 günlük etki süresinde Cu NP'deki birikim CuSO₄'teki bakır birikimine oranla daha fazla olmuştur (P<0.05). 50 ve 100 µg/L'lik derişimlerde tüm sürelerde Cu NP etkisindeki birikim CuSO₄ etkisindeki birikime oranla daha fazla olmuştur (P<0.05).



Şekil 4.2. *O. niloticus*'un karaciğer dokusunda Cu NP ve CuSO₄'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağlı bakır birikimlerinin karşılaştırılması (µg Cu/g k.a.).

Böbrek dokusunda Cu NP etkisindeki bakır birikimi tüm derişim ve sürelerde kontrole oranla artış göstermiştir (Çizelge 4.3.; $P<0.05$). 1 günlük etki süresindeki bakır birikimi 50 ve 100 $\mu\text{g/L}$ 'lik derişimlerde 10 $\mu\text{g/L}$ 'lik derişime oranla daha fazla olurken, 7 günlük etki süresindeki birikim 100 $\mu\text{g/L}$ 'lik derişimde diğer derişimlere oranla daha fazla olmuştur ($P<0.05$).

CuSO_4 etkisinde böbrek dokusundaki bakır birikimi de tüm derişim ve sürelerde kontrole oranla artış göstermiştir ($P<0.05$).

Süreye bağlı metal etkisi incelendiğinde 50 $\mu\text{g/L}$ 'lik Cu NP ve 50 ve 100 $\mu\text{g/L}$ 'lik CuSO_4 etkisinde 7 ve 15 günlük etki süresindeki bakır birimi 1. güne oranla azalma gösterirken ($P<0.05$), 100 $\mu\text{g/L}$ 'lik Cu NP etkisinde 15. günde birikim 1 ve 7. güne oranla azalma göstermiştir ($P<0.05$).

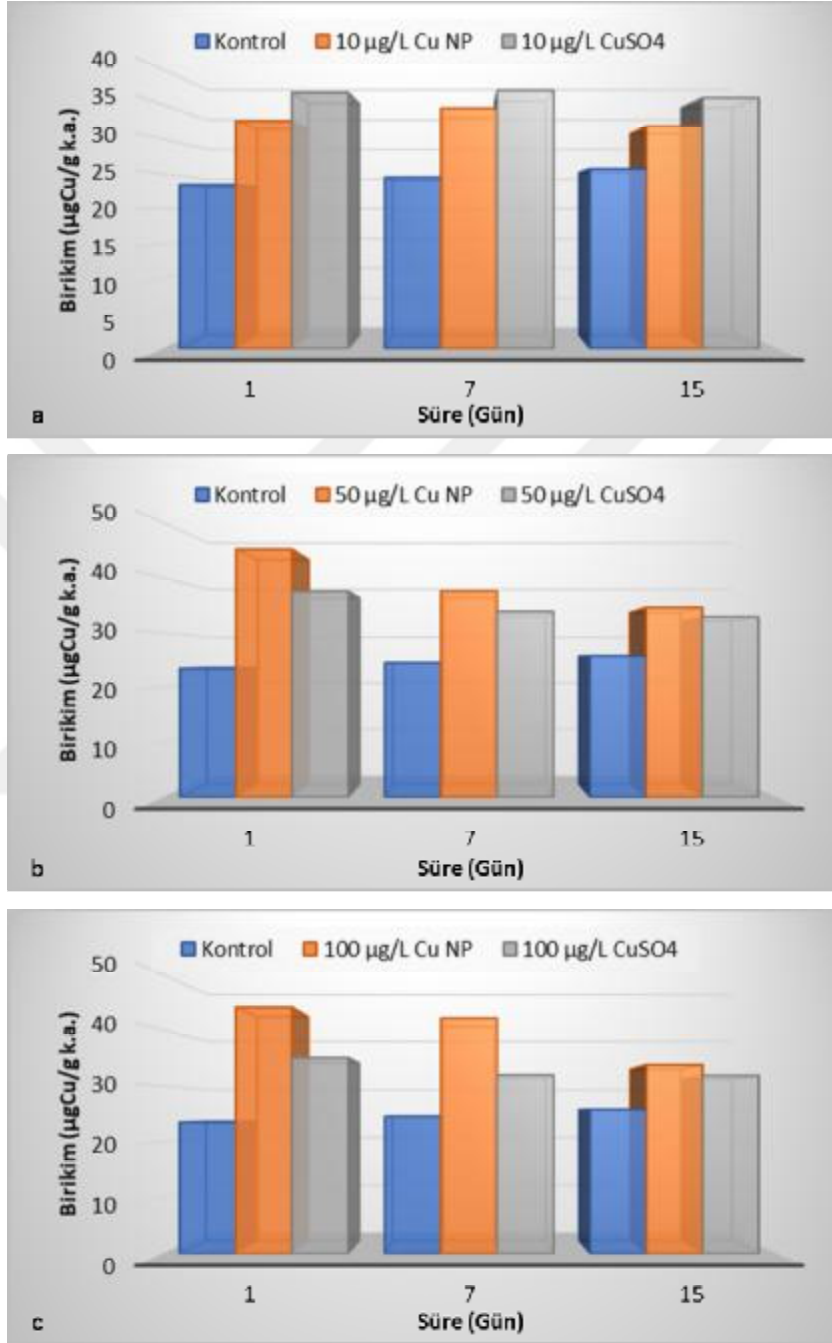
Çizelge 4.3. *O. niloticus*'un böbrek dokusunda Cu NP ve CuSO_4 'ün farklı derişimlerinin etkisinde süreye bağlı bakır birikimi ($\mu\text{g Cu/g k.a.}$).

DERİŞİM ($\mu\text{g/L}$)	SÜRE (GÜN)		
	1 $\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	7 $\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	15 $\bar{X} \pm s\bar{x}$ *
Kontrol	23.42 $\pm$ 2.459 as	24.49 $\pm$ 2.273 as	25.70 $\pm$ 1.714 as
10 $\mu\text{g/L}$ Cu NP	32.58 $\pm$ 1.756 bs	34.39 $\pm$ 1.374 bs	31.82 $\pm$ 1.596 bs
50 $\mu\text{g/L}$ Cu NP	45.11 $\pm$ 1.291 cs	37.45 $\pm$ 0.655 bt	34.53 $\pm$ 1.093 bt
100 $\mu\text{g/L}$ Cu NP	44.04 $\pm$ 2.255 cs	42.05 $\pm$ 0.510 cs	33.70 $\pm$ 2.184 bt
10 $\mu\text{g/L}$ CuSO_4	36.62 $\pm$ 1.295 ds	36.94 $\pm$ 1.783 bs	35.90 $\pm$ 1.666 bs
50 $\mu\text{g/L}$ CuSO_4	37.40 $\pm$ 1.239 ds	33.83 $\pm$ 0.276 bt	32.86 $\pm$ 1.051 bt
100 $\mu\text{g/L}$ CuSO_4	34.91 $\pm$ 1.333 ds	31.88 $\pm$ 1.096 bt	31.76 $\pm$ 1.050 bt

*SNK; a, b, c ve d ile gösterilen harfler derişimler arası, s ve t harfleri ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P < 0.05$ düzeyinde istatistik ayrım vardır.

$\bar{X} \pm s\bar{x}$: Aritmetik ortalama $\pm$ Standart Hata

Cu NP ve CuSO_4 böbrek dokusundaki etkisi kıyaslandığında, 10 $\mu\text{g/L}$ 'lik derişimde bakır birikiminde farklılık gözlenmezken (Şekil 4.3.; $P<0.05$), 50 ve 100 $\mu\text{g/L}$ 'lik derişimlerde 1. günde ve 100 $\mu\text{g/L}$ 'lik derişimde 7. günde Cu NP'deki birikim CuSO_4 'teki bakır birikimine oranla daha fazla olmuştur ($P<0.05$).



Şekil 4.3. *O. niloticus*'un böbrek dokusunda Cu NP ve CuSO₄'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağlı bakır birikimlerinin karşılaştırılması (µg Cu/g k.a.).

Dalak dokusunda Cu NP ve CuSO₄ etkisindeki bakır birikimi 1 ve 7 günlük etki süresinde 50 ve 100 µg/L'lik derişimlerde kontrole oranla atış gösterirken (Çizelge 4.4.; P<0.05), 15 günlük etki süresinde değişiklik göstermemiştir (P>0.05).

Süreye bağlı metal etkisi incelendiğinde Cu NP etkisinde 50 ve 100 µg/L'lik derişimlerde 7 ve 15 günlük etki sürelerinde 1. güne oranla, CuSO₄ etkisinde 50 µg/L'lik derişimde 15 günlük etki süresinde 1 ve 7. güne oranla bakır birikimi azalmıştır (P<0.05).

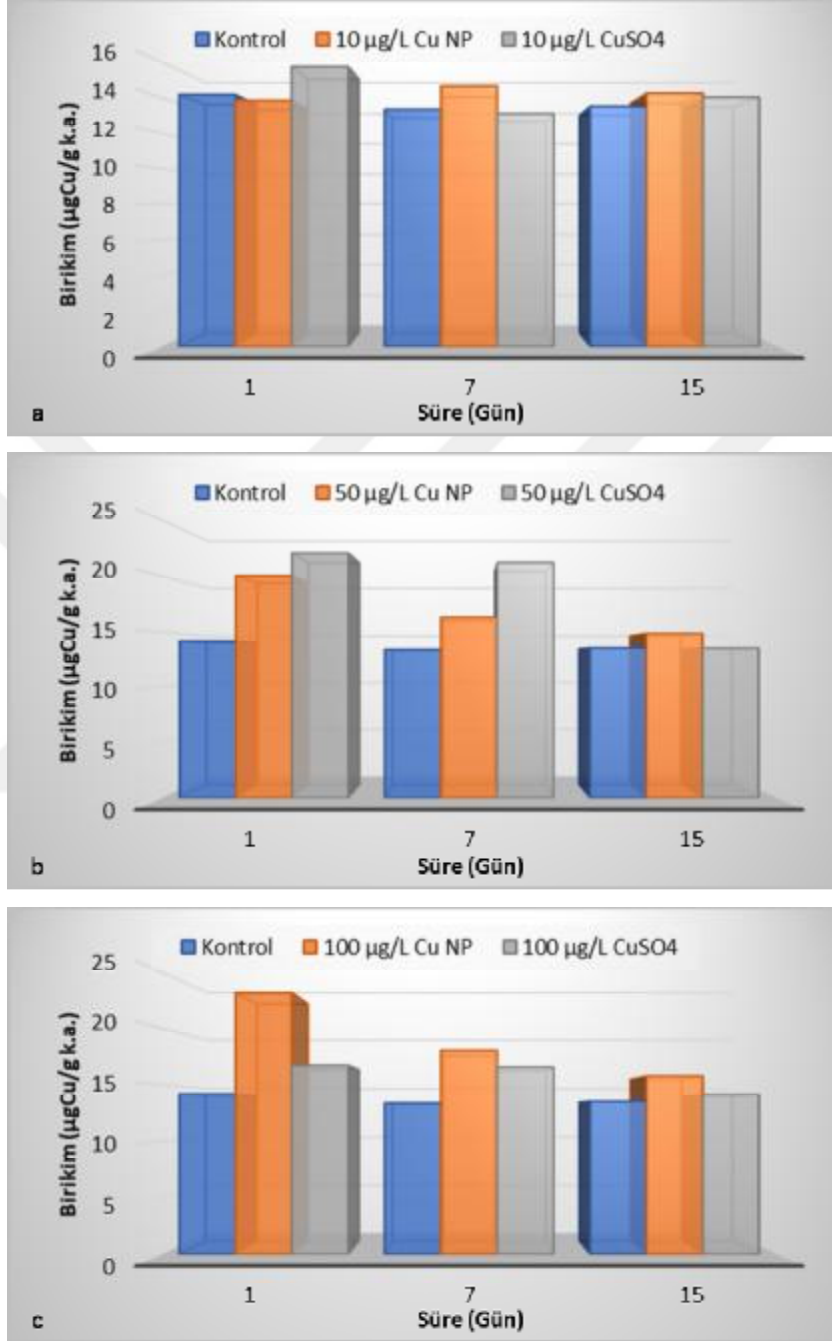
Çizelge 4.4. *O. niloticus*'un dalak dokusunda Cu NP ve CuSO₄'ün farklı derişimlerinin etkisinde süreye bağlı bakır birikimi (µg Cu/g k.a.).

DERİŞİM (µg/L)	SÜRE (GÜN)		
	1	7	15
	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *
Kontrol	14.17 ± 2.275 as	13.35 ± 1.670 as	13.51 ± 1.825 as
10 µg/L Cu NP	13.86 ± 1.472 as	14.64 ± 1.856 as	14.25 ± 2.266 as
50 µg/L Cu NP	20.04 ± 1.060 bs	16.29 ± 0.382 bt	14.86 ± 1.878 at
100 µg/L Cu NP	23.13 ± 1.398 bs	17.99 ± 0.426 bt	15.76 ± 1.795 at
10 µg/L CuSO ₄	15.73 ± 2.343 as	13.12 ± 0.522 as	14.02 ± 1.337 as
50 µg/L CuSO ₄	22.07 ± 0.893 bs	21.22 ± 0.468 bs	13.48 ± 1.648 at
100 µg/L CuSO ₄	16.70 ± 1.620 bs	16.54 ± 1.691 bs	14.12 ± 0.663 as

*SNK; a ve b ile gösterilen harfler derişimler arası, s ve t harfleri ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P < 0.05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.

$\bar{X} \pm s\bar{x}$: Aritmetik ortalama ± Standart Hata

Cu NP ve CuSO₄ dalak dokusundaki etkisi kıyaslandığında, tüm süre ve derişimlerde her iki uygulamada da herhangi bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.4.; P>0.05).



Şekil 4.4. *O. niloticus*'un dalak dokusunda Cu NP ve CuSO₄'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağılı bakır birikimlerinin karşılaştırılması (µg Cu/g k.a.).

Kas dokusunda Cu NP ve CuSO₄ etkisindeki bakır birikiminde herhangi bir değişim gözlenmemiştir (Çizelge 4.5.; P>0.05).

Süreye bağlı metal etkisi incelendiğinde Cu NP ve CuSO₄ etkisinde tüm derişimlerde herhangi bir değişim gözlenmemiştir (P>0.05).

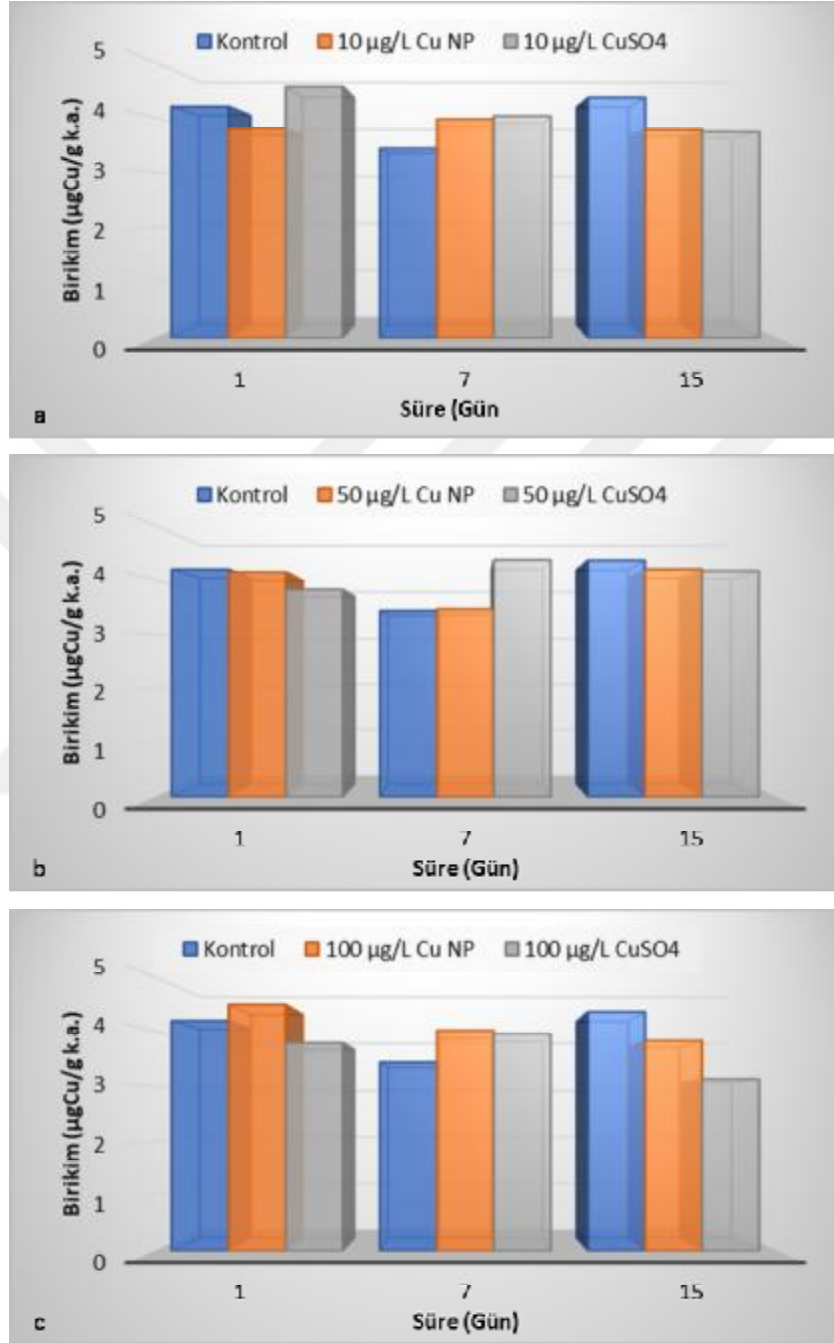
Çizelge 4.5. *O. niloticus*'un kas dokusunda Cu NP ve CuSO₄'ün farklı derişimlerinin etkisinde süreye bağlı bakır birikimi (µg Cu/g k.a.).

DERİŞİM (µg/L)	SÜRE (GÜN)		
	1	7	15
	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *
Kontrol	4.191 ± 0.532 as	3.431 ± 0.661 as	4.351 ± 0.087 as
10 µg/L Cu NP	3.791 ± 0.332 as	3.963 ± 0.357 as	3.772 ± 0.481 as
50 µg/L Cu NP	4.141 ± 0.614 as	3.458 ± 0.529 as	4.195 ± 0.323 as
100 µg/L Cu NP	4.489 ± 0.116 as	4.009 ± 0.451 as	3.820 ± 0.269 as
10 µg/L CuSO ₄	4.547 ± 0.635 as	4.025 ± 0.381 as	3.734 ± 0.443 as
50 µg/L CuSO ₄	3.812 ± 0.369 as	4.362 ± 0.456 as	4.162 ± 0.071 as
100 µg/L CuSO ₄	3.779 ± 0.507 as	3.947 ± 0.511 as	3.127 ± 0.172 as

*SNK; a ve b ile gösterilen harfler derişimler arası, s ve t harfleri ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P < 0.05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.

$\bar{X} \pm s\bar{x}$: Aritmetik ortalama ± Standart Hata

Cu NP ve CuSO₄ kas dokusundaki etkisi kıyaslandığında, tüm süre ve derişimlerde her iki uygulamada da herhangi bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.5.; P>0.05)



Şekil 4.5. *O. niloticus*'un kas dokusunda Cu NP ve CuSO₄'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağlı bakır birikimlerinin karşılaştırılması (µg Cu/g k.a.).

Karaciğer dokusunda Cu NP etkisindeki SOD enzim aktivitesi 1, 7 ve 15 günlük etki süresinde tüm derişimlerde kontrole oranla artış göstermiştir (Çizelge 4.6.; $P<0.05$). 1 günlük etki süresinde derişimler arasında herhangi bir ayırım gözlenmezken ($P>0.05$), 7 günlük etki süresinde derişimdeki artışa bağılı olarak enzim aktivitesinin arttığı ($P<0.05$) 15 günlük etki süresinde ise derişimdeki artışa bağılı olarak aktivitede azalma gözlenmiştir ($P<0.05$).

CuSO₄ etkisinde karaciğer dokusundaki SOD enzim aktivitesi 1 günlük etki süresinde herhangi bir değışim göstermezken ($P>0.05$), 7 günlük etki süresinde tüm derişimlerde kontrole oranla artmış ($P<0.05$), 15 günlük etki süresinde ise 10 ve 50 µg/L'lik derişimlerde kontrole oranla azalırken, 100 µg/L'lik derişimde kontrole oranla artış göstermiştir ($P<0.05$). 7 günlük etki süresindeki SOD aktivitesinin 10 µg/L'lik derişimde diğder derişimlere oranla daha düşük düzeyde olduğı belirlenmiştir ($P<0.05$).

Süreye bağılı metal etkisi incelendiğinde, 10 µg/L Cu NP etkisinde 15 günlük etki süresinde 1 ve 7 günlük etki sürelerine oranla enzim aktivitesi artarken ($P<0.05$), 100 µg/L Cu NP etkisinde 15 günlük etki süresinde 1 ve 7. güne oranla aktivite azalmıştır ($P<0.05$). CuSO₄ etkisinde ise tüm derişimlerde 7 günlük etki süresinde aktivitede artış gözlenirken, 15 günlük etki süresinde 7. güne oranla azalma görölmüştür ($P<0.05$).

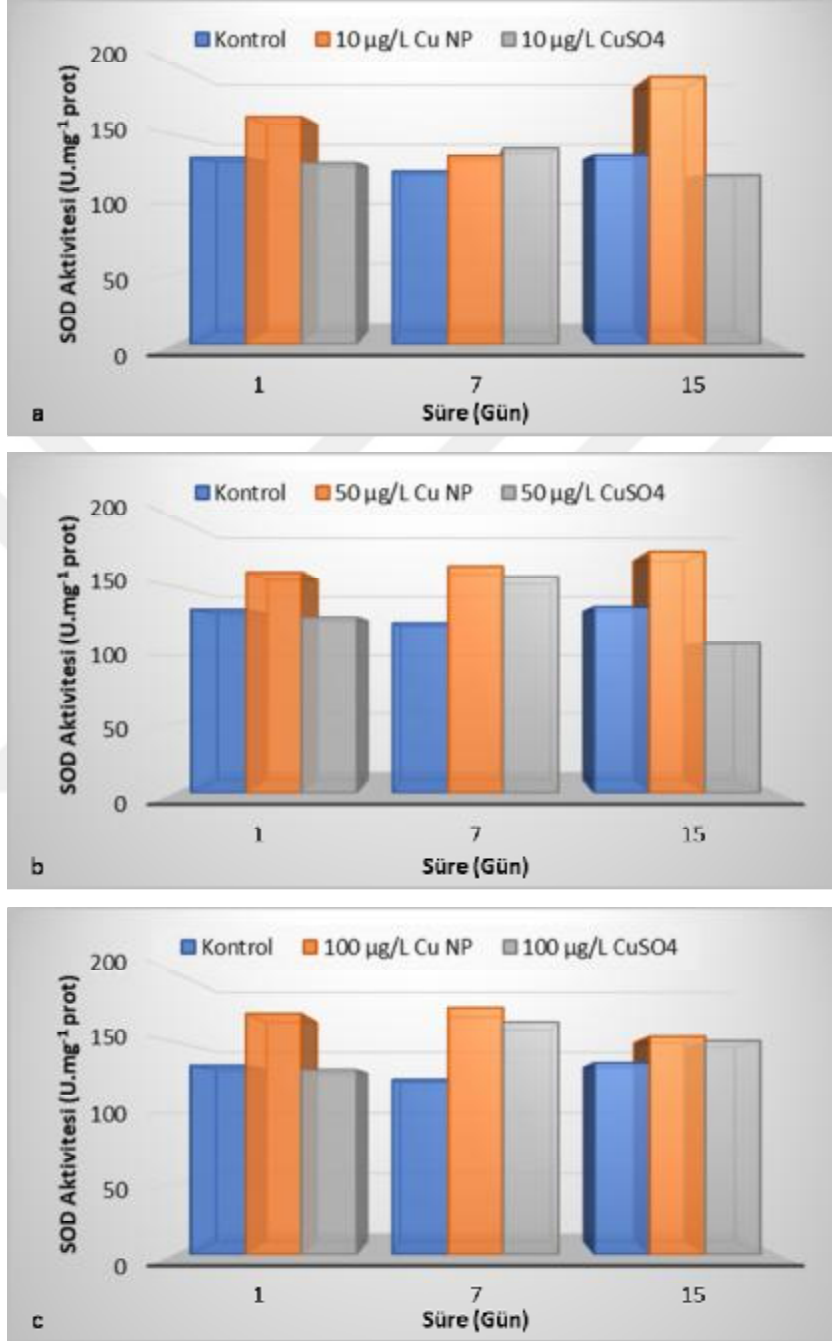
Çizelge 4.6. Cu NP ve CuSO₄'ün farklı derişimlerinin etkisinde *O. niloticus*'un karaciğer dokusundaki bakır birikiminin SOD enzim aktivitesi üzerine süreye bağı etkisi (U.mg⁻¹ prot.).

DERİŞİM (µg/L)	SÜRE (GÜN)		
	1	7	15
	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *
Kontrol	133.4 ± 2.089 as	123.6 ± 5.132 as	135.2 ± 2.675 as
10 µg/L Cu NP	162.6 ± 8.002 bs	134.7 ± 2.917 bt	190.8 ± 3.298 bx
50 µg/L Cu NP	160.2 ± 9.932 bs	164.7 ± 6.814 cs	175.2 ± 4.234 cs
100 µg/L Cu NP	170.3 ± 5.003 bs	174.5 ± 2.111 ds	153.8 ± 3.841 dt
10 µg/L CuSO ₄	129.7 ± 2.377 as	140.0 ± 0.975 bt	121.0 ± 2.994 ex
50 µg/L CuSO ₄	127.8 ± 2.211 as	157.1 ± 1.959 ct	109.0 ± 4.120 fx
100 µg/L CuSO ₄	130.5 ± 3.705 as	164.3 ± 5.426 ct	150.6 ± 0.469 dx

*SNK; a, b, c, d, e ve f ile gösterilen harfler derişimler arası, s, t ve x harfleri ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P < 0.05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.

$\bar{X} \pm s\bar{x}$: Aritmetik ortalama ± Standart Hata

Cu NP ve CuSO₄'ün karaciğer dokusundaki SOD enzim aktivitesi kıyaslandığında, 10 ve 50 µg/L'lik derişimde 1 ve 15 günlük etki sürelerindeki SOD aktivitesi Cu NP etkisinde CuSO₄'e oranla daha fazla iken (Şekil 4.6.; P<0.05), 7 günlük etki süresinde herhangi bir farklılık gözlenmemiştir (P>0.05). 100 µg/L'lik derişimde ise 1 ve 7 günlük etki sürelerindeki enzim aktiviteleri Cu NP etkisinde CuSO₄'e oranla daha fazla iken (P<0.05), 15 günlük etki süresinde herhangi bir farklılık gözlenmemiştir (P>0.05).



Şekil 4.6. *O. niloticus*'un karaciğer dokusunda Cu NP ve CuSO₄'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağlı SOD enzim aktivitelerinin karşılaştırılması (U.mg⁻¹ prot.).

Karaciğer dokusunda Cu NP etkisindeki CAT enzim aktivitesi 7 ve 15 günlük etki süresinde kontrole oranla tüm derişimlerde artış gösterirken (Çizelge 4.6.; $P<0.05$), 1 günlük etki süresinde 10 $\mu\text{g/L}$ 'lik derişimde enzim aktivitesinde herhangi bir değişim gözlenmemiş ($P>0.05$), 50 ve 100 $\mu\text{g/L}$ 'lik derişimlerde ise artmıştır ($P<0.05$).

CuSO_4 etkisinde karaciğer dokusundaki CAT enzim aktivitesi 1 günlük etki süresinde 10 $\mu\text{g/L}$ 'derişimde değişmezken ($P>0.05$), 7 ve 15 günlük etki sürelerinde tüm derişimlerde kontrole oranla artış göstermiştir ($P<0.05$). 1 günlük etki süresinde derişimler arasında 50 ve 100 $\mu\text{g/L}$ 'lik derişimlerde 10 $\mu\text{g/L}$ 'lik derişime oranla aktivitenin daha fazla olduğu, 7 ve 15 günlük etki süresinde ise 100 $\mu\text{g/L}$ 'lik derişimde 50 ve 10 $\mu\text{g/L}$ 'lik derişimlerin etkisindekine oranla enzim aktivitesinin daha fazla olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$).

Süreye bağlı metal etkisi incelendiğinde, 10 ve 50 $\mu\text{g/L}$ Cu NP etkisinde etkide kalma süresindeki artışa bağlı olarak herhangi bir değişim gözlenmezken ($P>0.05$), 100 $\mu\text{g/L}$ Cu NP etkisinde etkide kalma süresindeki artışa bağlı olarak CAT enzimi aktivitesinde artış gözlenmiştir ($P<0.05$). CuSO_4 etkisinde ise 7 ve 15 günlük etki sürelerinde 1 günlük etki sürelerine oranla tüm derişimlerde enzim aktivitesinde artış belirlenmiştir ($P<0.05$).

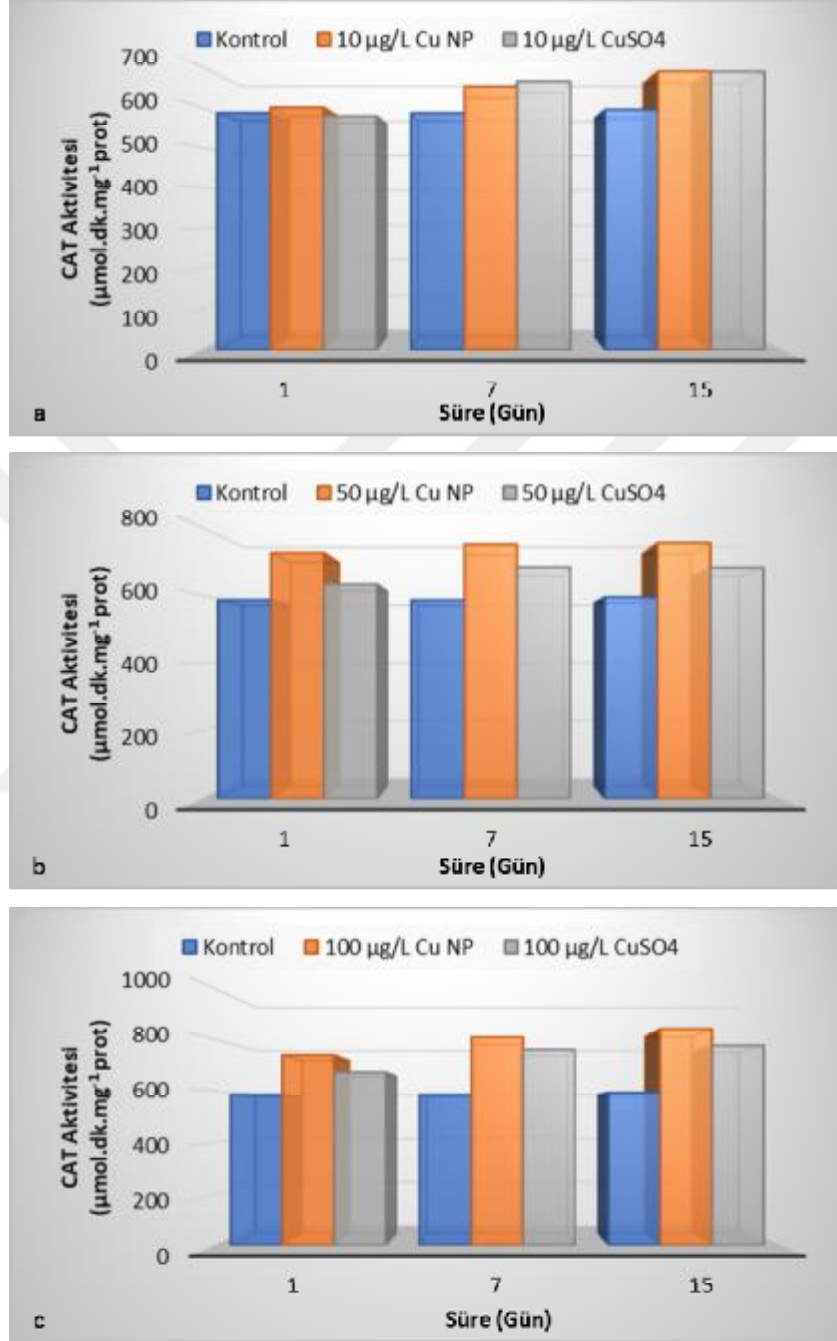
Çizelge 4.7. Cu NP ve CuSO₄'ün farklı derişimlerinin etkisinde *O. niloticus*'un karaciğer dokusundaki bakır birikiminin CAT enzim aktivitesi üzerine süreye bağı etkisi ($\mu\text{mol.dk.mg}^{-1}\text{prot.}$).

DERİŞİM ($\mu\text{g/L}$)	SÜRE (GÜN)		
	1	7	15
	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *
Kontrol	586.1 $\pm$ 22.55 as	585.9 $\pm$ 26.62 as	594.1 $\pm$ 21.16 as
10 $\mu\text{g/L}$ Cu NP	599.7 $\pm$ 28.92 as	649.4 $\pm$ 16.20 bs	686.9 $\pm$ 15.31 bs
50 $\mu\text{g/L}$ Cu NP	725.4 $\pm$ 7.600 bs	749.1 $\pm$ 9.809 cs	753.7 $\pm$ 8.679 cs
100 $\mu\text{g/L}$ Cu NP	738.5 $\pm$ 6.028 bs	808.4 $\pm$ 1.950 dt	841.2 $\pm$ 10.03 dx
10 $\mu\text{g/L}$ CuSO ₄	578.2 $\pm$ 10.91 as	662.2 $\pm$ 19.05 bt	686.1 $\pm$ 9.198 bt
50 $\mu\text{g/L}$ CuSO ₄	631.8 $\pm$ 12.22 cs	683.3 $\pm$ 6.487 bt	681.9 $\pm$ 3.434 bt
100 $\mu\text{g/L}$ CuSO ₄	672.8 $\pm$ 7.599 cs	759.5 $\pm$ 6.809 ct	775.3 $\pm$ 11.63 ct

*SNK; a, b, c ve d ile gösterilen harfler derişimler arası, s, t ve x harfleri ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P < 0.05$ düzeyinde istatistik ayrım vardır.

$\bar{X} \pm s\bar{x}$: Aritmetik ortalama $\pm$ Standart Hata

Cu NP ve CuSO₄'ün karaciğer dokusundaki CAT enzim aktivitesi üzerine etkileri karşılaştırıldığında, 10 $\mu\text{g/L}$ 'lik derişimde 1, 7 ve 15 günlük etki sürelerinde enzim aktivitesi üzerine Cu NP ve CuSO₄'ün etkileri arasında herhangi bir farklılık belirlenmemiştir (Şekil 4.7.; $P > 0.05$). 50 ve 100 $\mu\text{g/L}$ 'lik derişimlerde ise Cu NP etkisindeki CAT enzim aktivitesinin tüm etki sürelerinde CuSO₄ etkisindeki enzim aktivitesine oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($P < 0.05$).



Şekil 4.7. *O. niloticus*'un karaciğer dokusunda Cu NP ve CuSO₄'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağlı CAT enzim aktivitelerinin karşılaştırılması (µmol.dk.mg⁻¹prot.).

Karaciğer dokusunda Cu NP etkisindeki GPx enzim aktivitesi 1 ve 7. günlerde 10 µg/L'lik derişimin etkisi dışında belirlenen süre ve incelenen derişimlerin etkisinde kontrole oranla önemli düzeyde artış göstermiştir (Çizelge 4.8.; $P<0.05$). Cu NP'nin ortam derişimindeki artış belirlenen sürelerde GPx aktivitesini kontrole göre arttırmıştır ($P<0.05$).

CuSO₄ etkisinde karaciğer dokusundaki GPx enzim aktivitesi tüm sürelerde 10 µg/L'lik derişimde kontrole oranla herhangi bir değişim olmamış ($P>0.05$), 50 ve 100 µg/L'lik derişimlerde ise tüm etki sürelerinde kontrole oranla artış olmuştur ($P<0.05$). Tüm sürelerde 50 µg/L'lik derişimde enzim aktivitesi 10 µg/L'lik derişime oranla ve 100 µg/L'lik derişimde enzim aktivitesi 50 µg/L'lik derişime oranla artış göstermiştir ($P<0.05$).

Süreye bağlı metal etkisi incelendiğinde, tüm derişimlerde Cu NP etkisindeki GPx aktivitesi 7 günlük etki süresinde 1. güne oranla herhangi bir değişim göstermezken ($P>0.05$), 15 günlük etki süresinde 1 ve 7. güne oranla artmıştır ($P<0.05$). CuSO₄ etkisinde ise 10 ve 50 µg/L'lik derişimlerde etkide kalma süresindeki artışa bağlı olarak enzim aktivitesinde herhangi bir değişim gözlenmezken ($P>0.05$), 100 µg/L'lik derişimde etkide kalma süresindeki artışa bağlı olarak enzim aktivitesi artmıştır ($P<0.05$).

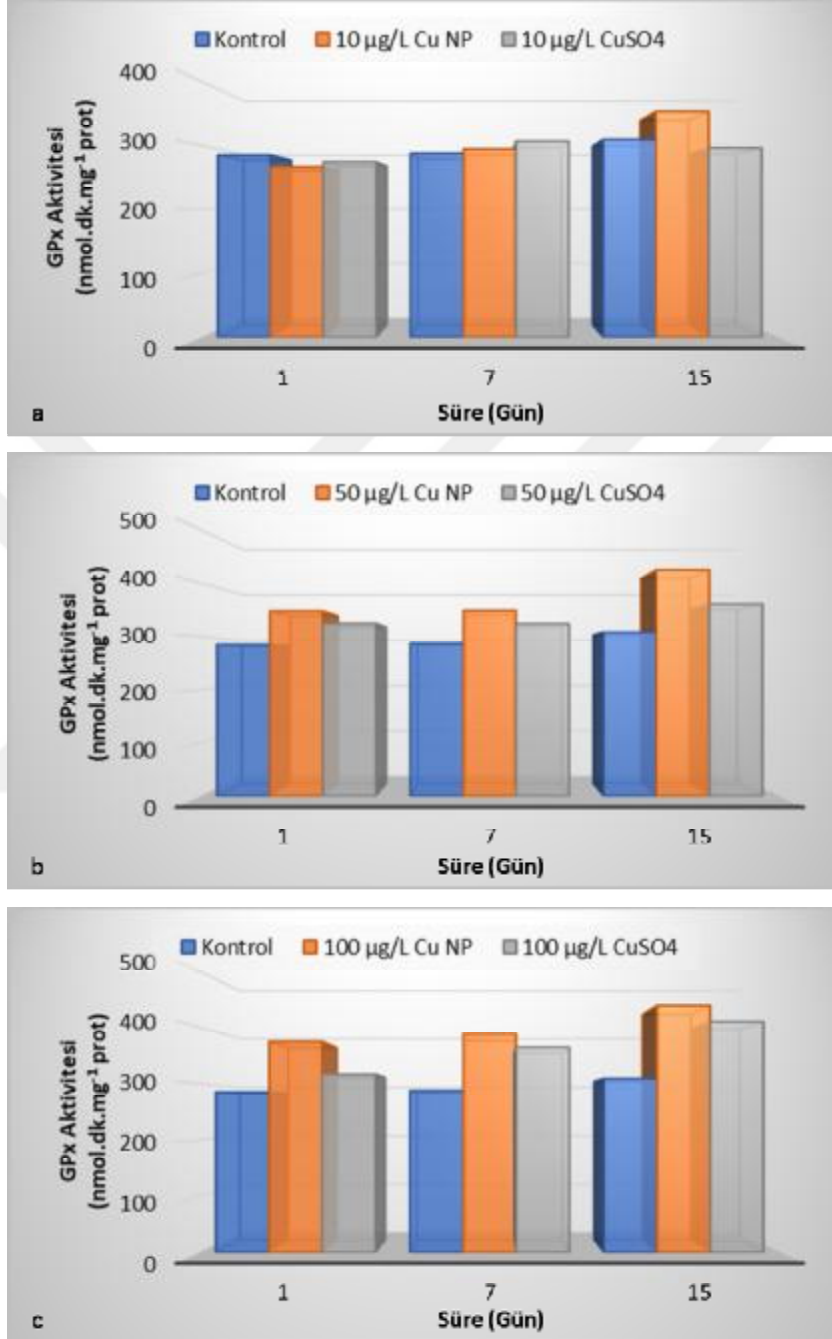
Çizelge 4.8. Cu NP ve CuSO₄'ün farklı derişimlerinin etkisinde *O. niloticus*'un karaciğer dokusundaki bakır birikiminin GPx enzim aktivitesi üzerine süreye bağı etkisi (nmol.dk.mg⁻¹ prot.).

DERİŞİM (µg/L)	SÜRE (GÜN)		
	1	7	15
	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *
Kontrol	284.9 ± 10.59 as	287.2 ± 2.026 as	308.9 ± 10.97 as
10 µg/L Cu NP	266.5 ± 16.51 as	294.0 ± 6.362 as	353.9 ± 10.13 bt
50 µg/L Cu NP	348.0 ± 14.84 bs	349.0 ± 8.422 bs	425.3 ± 9.768 ct
100 µg/L Cu NP	373.5 ± 11.91 cs	387.4 ± 2.111 cs	438.9 ± 5.744 ct
10 µg/L CuSO ₄	274.4 ± 11.35 as	306.5 ± 10.34 as	295.4 ± 11.62 as
50 µg/L CuSO ₄	325.0 ± 2.091 ds	324.3 ± 5.347 ds	360.6 ± 14.13 bs
100 µg/L CuSO ₄	316.3 ± 8.777 ds	363.5 ± 7.438 bt	409.9 ± 7.213 cx

*SNK; a, b, c ve d ile gösterilen harfler derişimler arası, s, t ve x harfleri ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P < 0.05 düzeyinde istatistik ayırım vardır.

$\bar{X} \pm s\bar{x}$: Aritmetik ortalama ± Standart Hata

Cu NP ve CuSO₄'ün karaciğer dokusundaki GPx enzim aktivitesi kıyaslandığında, 10 µg/L'lik derişimde yalnızca 15 günlük etki süresindeki enzim aktivitesinde Cu NP etkisinde CuSO₄'e oranla daha fazla iken (Şekil 4.8.; P<0.05), 50 ve 100 µg/L'lik derişimlerde 1, 7 ve 15 günlük etki sürelerindeki GPx aktivitesinin Cu NP etkisinde CuSO₄'e oranla daha fazla olduğu belirlenmiştir (P<0.05).



Şekil 4.8. *O. niloticus*'un karaciğer dokusunda Cu NP ve CuSO₄'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağlı CAT enzim aktivitelerinin karşılaştırılması (nmol.dk.mg⁻¹ prot.).

Cu NP ve CuSO₄ etkisindeki serum glikoz düzeyinde 1 günlük etki süresi sonunda tüm derişimlerde kontrole oranla herhangi bir değişim göstermezken (Çizelge 4.9.; $P>0.05$), 7 ve 15 günlük etki sürelerinde tüm derişimlerde kontrole oranla artış göstermiştir ($P<0.05$). CuNP ve CuSO₄ etkisinde 7 günlük etki süresi sonunda 100 µg/L'lik derişimde, 10 ve 50 µg/L'lik derişimlere oranla serum glikoz düzeyinde artış gözlenirken ($P<0.05$), 15 günlük etki süresinde 50 ve 100 µg/L'lik derişimlerde, 10 µg/L'lik derişime oranla artış gözlenmiştir ($P<0.05$).

Süreye bağlı metal etkisi incelendiğinde, 10 µg/L'lik Cu NP etkisinde 7 ve 15 günlük etki süresinde 1 günlük etki süresine oranla, 50 ve 100 µg/L'lik derişimlerde ise 15 günlük etki süresinde 1 ve 7 günlük etki sürelerine oranla serum glikoz düzeyi artmıştır ($P<0.05$). 10 µg/L'lik CuSO₄ etkisinde 7 ve 15 günlük etki süresinde 1 günlük etki süresine oranla, 100 µg/L'lik derişimde ise 15 günlük etki süresinde 1 ve 7 günlük etki süresine oranla serum glikoz düzeyi artmıştır ($P<0.05$). 50 µg/L'lik derişimde ise etkide kalma süresindeki artışa bağlı olarak serum glikoz düzeyinde artış belirlenmiştir ($P<0.05$).

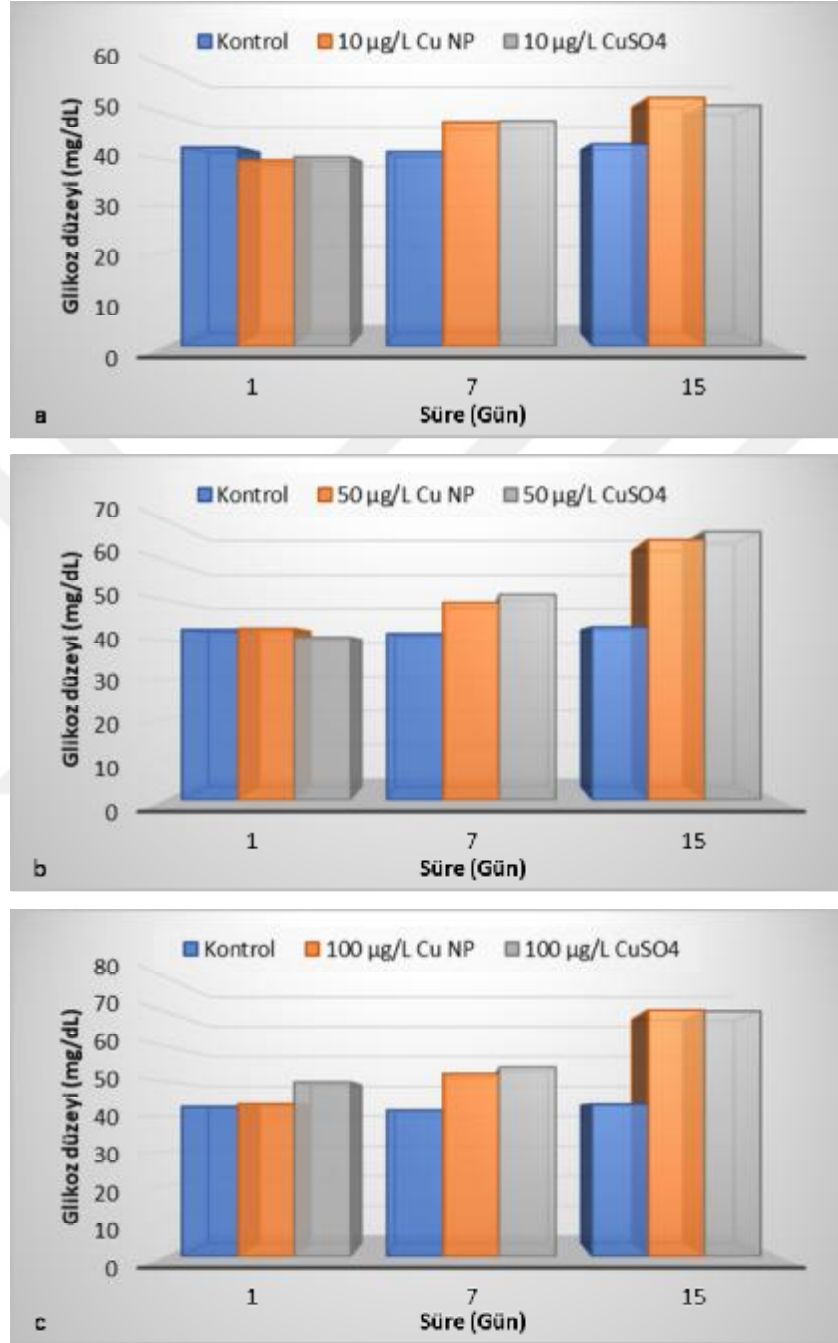
Çizelge 4.9. Cu NP ve CuSO₄'ün farklı derişimlerinin etkisinde *O. niloticus*'un serum glikoz düzeyleri (mg/dL).

DERİŞİM (µg/L)	SÜRE (GÜN)		
	1	7	15
	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *
Kontrol	42.67 ± 2.906 as	41.67 ± 3.180 as	43.33 ± 3.712 as
10 µg/L Cu NP	39.87 ± 3.120 as	48.13 ± 1.618 bt	53.33 ± 2.404 bt
50 µg/L Cu NP	42.93 ± 3.475 as	49.33 ± 4.667 bs	65.00 ± 3.215 ct
100 µg/L Cu NP	43.43 ± 2.224 as	52.13 ± 3.476 cs	70.33 ± 2.728 ct
10 µg/L CuSO ₄	40.60 ± 3.646 as	48.33 ± 1.453 bt	51.67 ± 1.856 bt
50 µg/L CuSO ₄	40.67 ± 0.882 as	51.33 ± 3.756 bt	67.00 ± 1.527 cx
100 µg/L CuSO ₄	49.80 ± 0.917 as	54.00 ± 2.646 cs	70.00 ± 1.732 ct

*SNK; a, b ve c ile gösterilen harfler derişimler arası, s, t ve x harfleri ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P < 0.05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.

$\bar{X} \pm s\bar{x}$: Aritmetik ortalama ± Standart Hata

Cu NP ve CuSO₄'ün serum glikoz düzeyine etkisi kıyaslandığında, tüm derişim ve sürelerde herhangi bir ayrım gözlenmemiştir (Şekil 4.9.; P<0.05).



Şekil 4.9. *O. niloticus*'da Cu NP ve CuSO₄'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağı serum glikoz düzeylerinin karşılaştırılması (mg/dL).

Cu NP ve CuSO₄ etkisindeki serum albumin düzeyinde 1 ve 7 günlük etki sürelerinde tüm derişimlerde kontrole oranla herhangi bir farklılık göstermezken (Çizelge 4.10.; P>0.05), 15 günlük etki süresi sonunda tüm derişimlerde kontrole oranla artmıştır (P<0.05). 15 günlük etki süresinde 100 µg/L'lik Cu NP etkisinde 10 ve 50 µg/L'lik derişimlere oranla serum albumin düzeyinde artış gözlenirken, 50 µg/L'lik derişimde CuSO₄ etkisinde 10 ve 100 µg/L'lik derişimlere oranla artış gözlenmiştir (P<0.05). Süreye bağlı metal etkisi incelendiğinde Cu NP ve CuSO₄ etkisinde tüm derişimlerde serum albümin düzeyinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir (P>0.05).

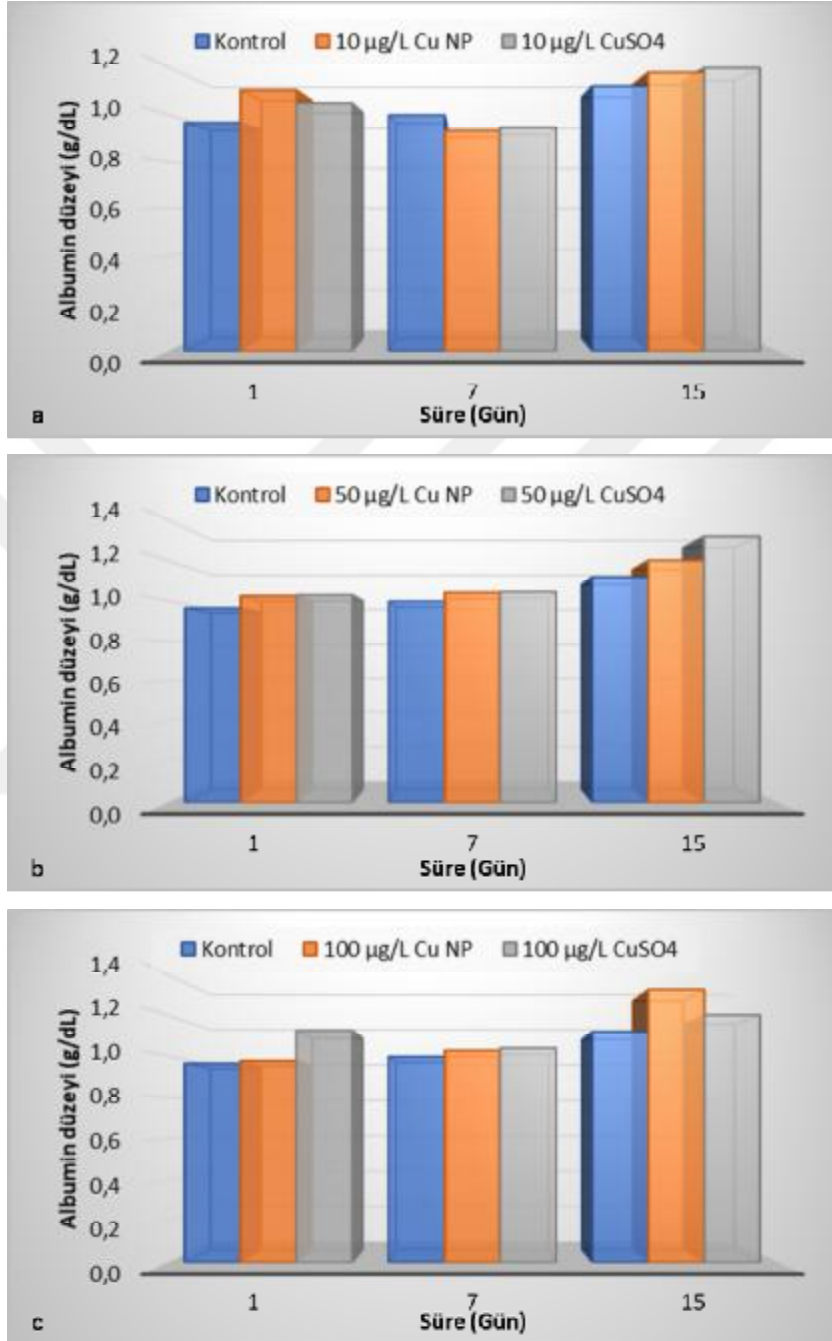
Çizelge 4.10. Cu NP ve CuSO₄'ün farklı derişimlerinin etkisinde *O. niloticus*'un serum albumin düzeyleri (g/dL).

DERİŞİM (µg/L)	SÜRE (GÜN)		
	1 $\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	7 $\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	15 $\bar{X} \pm s\bar{x}$ *
Kontrol	0.963 ± 0.070 as	0.997 ± 0.072 as	1.117 ± 0.073 as
10 µg/L Cu NP	1.100 ± 0.163 as	0.930 ± 0.045 as	1.173 ± 0.044 bs
50 µg/L Cu NP	1.024 ± 0.225 as	1.040 ± 0.087 as	1.199 ± 0.029 bs
100 µg/L Cu NP	0.977 ± 0.069 as	1.027 ± 0.108 as	1.323 ± 0.079 cs
10 µg/L CuSO ₄	1.046 ± 0.191 as	0.943 ± 0.107 as	1.193 ± 0.072 bs
50 µg/L CuSO ₄	1.028 ± 0.220 as	1.043 ± 0.139 as	1.317 ± 0.148 cs
100 µg/L CuSO ₄	1.123 ± 0.168 as	1.037 ± 0.102 as	1.200 ± 0.049 bs

*SNK; a, b ve c ile gösterilen harfler derişimler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P < 0.05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.

$\bar{X} \pm s\bar{x}$: Aritmetik ortalama ± Standart Hata

Cu NP ve CuSO₄'ün serum albumin düzeyine etkisi kıyaslandığında, 1 ve 7 günlük etki sürelerinde tüm derişimlerde herhangi bir ayrım gözlenmezken (Şekil 4.10.; P>0.05), 15 günlük etki süresinde 50 µg/L'lik derişimde serum albümin düzeyi CuSO₄ etkisinde Cu NP'ye oranla daha fazla iken, 100 µg/L'lik derişimde Cu NP etkisinde CuSO₄'e oranla daha fazladır (P<0.05).



Şekil 4.10. *O. niloticus*'da Cu NP ve CuSO₄'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağlı serum albumin düzeylerinin karşılaştırılması (g/dL).

Cu NP etkisindeki serum total protein düzeyinde 1 günlük etki süresinde tüm derişimlerde kontrole oranla herhangi bir değişim olmazken (Çizelge 4.11.; $P>0.05$), 7 ve 15 günlük etki süresinde tüm derişimlerde kontrole oranla azalma görölmüştür ($P<0.05$). CuSO_4 etkisinde ise 1 ve 7günlük etki sürelerinde incelenen tüm derişimlerin etkisinde serum total protein düzeyinde kontrole oranla herhangi bir değişim gözlenmezken ($P>0.05$), 15 günlük etki süresinde tüm derişimlerde kontrole oranla azalmıştır ($P<0.05$). Süreye bağlı metal etkisi incelendiğinde Cu NP ve CuSO_4 etkisinde tüm derişimlerde serum total protein düzeyinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir ($P>0.05$).

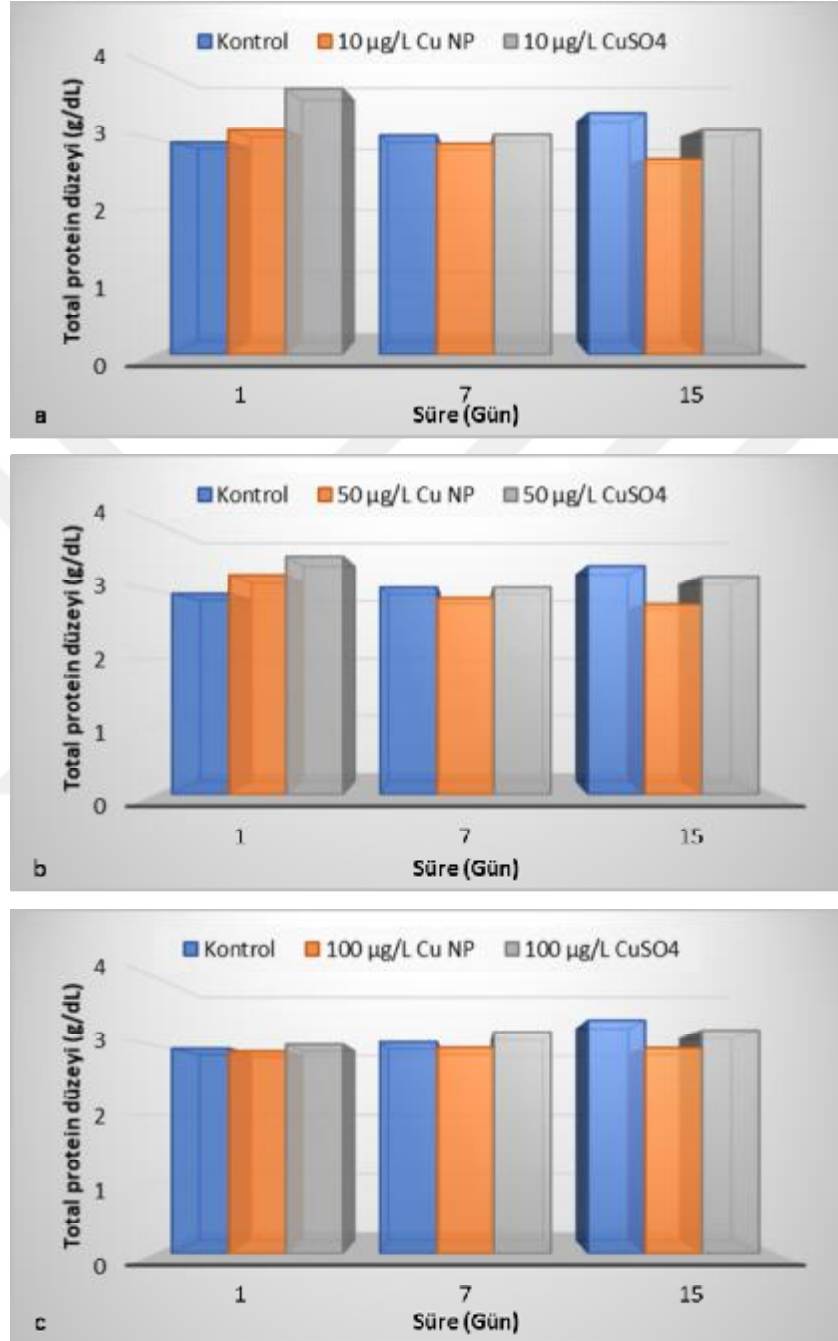
Çizelge 4.11. Cu NP ve CuSO_4 'ün farklı derişimlerinin etkisinde *O. niloticus*'un serum total protein düzeyleri (g/dL).

DERİŞİM ($\mu\text{g/L}$)	SÜRE (GÜN)		
	1 $\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	7 $\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	15 $\bar{X} \pm s\bar{x}$ *
Kontrol	2.953 $\pm$ 0.742 as	3.047 $\pm$ 0.105 as	3.363 $\pm$ 0.128 as
10 $\mu\text{g/L}$ Cu NP	3.127 $\pm$ 0.213 as	2.933 $\pm$ 0.055 bs	2.720 $\pm$ 0.021 bs
50 $\mu\text{g/L}$ Cu NP	3.230 $\pm$ 0.479 as	2.893 $\pm$ 0.099 bs	2.800 $\pm$ 0.072 bs
100 $\mu\text{g/L}$ Cu NP	2.917 $\pm$ 0.047 as	2.967 $\pm$ 0.104 bs	2.963 $\pm$ 0.102 bs
10 $\mu\text{g/L}$ CuSO_4	3.693 $\pm$ 0.457 as	3.057 $\pm$ 0.334 as	3.127 $\pm$ 0.169 cs
50 $\mu\text{g/L}$ CuSO_4	3.500 $\pm$ 0.440 as	3.047 $\pm$ 0.208 as	3.207 $\pm$ 0.015 cs
100 $\mu\text{g/L}$ CuSO_4	3.013 $\pm$ 0.232 as	3.190 $\pm$ 0.085 as	3.213 $\pm$ 0.148 cs

*SNK; a, b ve c ile gösterilen harfler derişimler arası, s ve t harfleri ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P < 0.05$ düzeyinde istatistik ayırım vardır.

$\bar{X} \pm s\bar{x}$: Aritmetik ortalama $\pm$ Standart Hata

Cu NP ve CuSO_4 'ün serum total protein düzeyine etkisi kıyaslandığında, 1 günlük etki süresinde tüm derişimlerde herhangi bir ayırım gözlenmezken (Şekil 4.11.; $P>0.05$), 7 ve 15 günlük etki süresinde 50 ve 100 $\mu\text{g/L}$ 'lik derişimlerde serum total protein düzeyindeki azalma Cu NP etkisinde CuSO_4 'e oranla daha fazla olmuştur ($P<0.05$).



Şekil 4.11. *O. niloticus*'da Cu NP ve CuSO₄'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağı serum total protein düzeylerinin karşılaştırılması (g/dL).

Cu NP ve CuSO₄ etkisindeki serum kolesterol düzeyinde 1 ve 7 günlük etki sürelerinde tüm derişimlerde kontrole oranla herhangi bir farklılık göstermezken (Çizelge 4.12.; $P>0.05$), 15 günlük etki süresi sonunda tüm derişimlerde kontrole oranla azalmıştır ($P<0.05$). 15 günlük etki süresinde 50 ve 100 µg/L'lik Cu NP ve CuSO₄ etkisinde serum kolesterol düzeyi 10 µg/L'lik derişime oranla azalma göstermiştir ($P<0.05$).

Süreye bağlı metal etkisi incelendiğinde, 50 µg/L'lik Cu NP etkisinde 15 günlük etki süresinde 1 ve 7 günlük etki süresine oranla, 100 µg/L'lik derişimde ise 7 ve 15 günlük etki süresinde 1 günlük etki süresine oranla serum kolesterol düzeyinde azalma görülmüştür ($P<0.05$). 50 ve 100 µg/L'lik CuSO₄ etkisinde ise 15 günlük etki süresinde 1 ve 7 günlük etki süresine oranla serum kolesterol düzeyinde azalma görülmüştür ($P<0.05$).

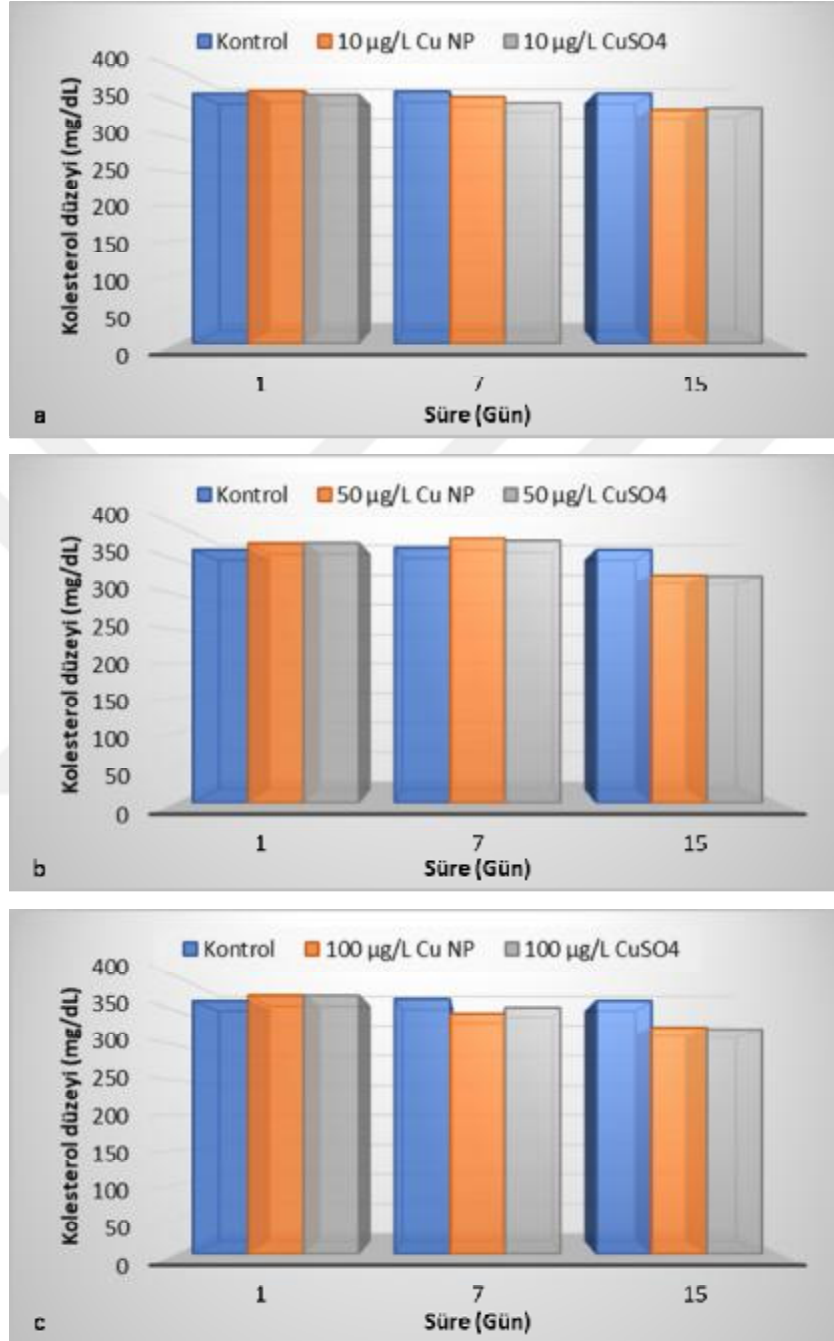
Çizelge 4.12. Cu NP ve CuSO₄'ün farklı derişimlerinin etkisinde *O. niloticus*'un serum kolesterol düzeyleri (mg/dL).

DERİŞİM (µg/L)	SÜRE (GÜN)		
	1	7	15
	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *
Kontrol	364.0 ± 10.78 as	367.0 ± 12.74 as	364.0 ± 8.962 as
10 µg/L Cu NP	367.7 ± 10.93 as	359.3 ± 18.05 as	340.7 ± 4.910 bs
50 µg/L Cu NP	373.3 ± 7.881 as	380.0 ± 3.214 as	327.3 ± 3.528 ct
100 µg/L Cu NP	372.3 ± 9.135 as	345.7 ± 7.881 at	325.0 ± 2.082 ct
10 µg/L CuSO ₄	362.7 ± 10.14 as	351.0 ± 12.77 as	343.3 ± 4.256 bs
50 µg/L CuSO ₄	373.7 ± 6.333 as	376.7 ± 4.702 as	326.0 ± 2.887 ct
100 µg/L CuSO ₄	372.0 ± 8.021 as	354.3 ± 6.173 as	322.3 ± 4.096 ct

*SNK; a, b ve c ile gösterilen harfler derişimler arası, s ve t harfleri ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P < 0.05$ düzeyinde istatistik ayrım vardır.

$\bar{X} \pm s\bar{x}$: Aritmetik ortalama ± Standart Hata

Cu NP ve CuSO₄'ün serum kolesterol düzeyine etkisi kıyaslandığında, tüm derişim ve sürelerde herhangi bir ayrım gözlenmemiştir (Şekil 4.12.; $P>0.05$).



Şekil 4.12. *O. niloticus*'da Cu NP ve CuSO₄'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağı serum kolesterol düzeylerinin karşılaştırılması (mg/dL).

Cu NP ve CuSO₄ etkisindeki serum trigliserid düzeyinde 1 ve 7 günlük etki sürelerinde tüm derişimlerde kontrole oranla herhangi bir farklılık göstermezken (Çizelge 4.13.; P>0.05), 15 günlük etki süresi sonunda tüm derişimlerde kontrole oranla azalmıştır (P<0.05).

Süreye bağlı metal etkisi incelendiğinde, CuNP ve CuSO₄ etkisinde uygulanan tüm derişimlerdeki serum trigliserid düzeyi 15 günlük etki süresinde 1 ve 7 günlük etki sürelerine oranla azalma göstermiştir (P<0.05).

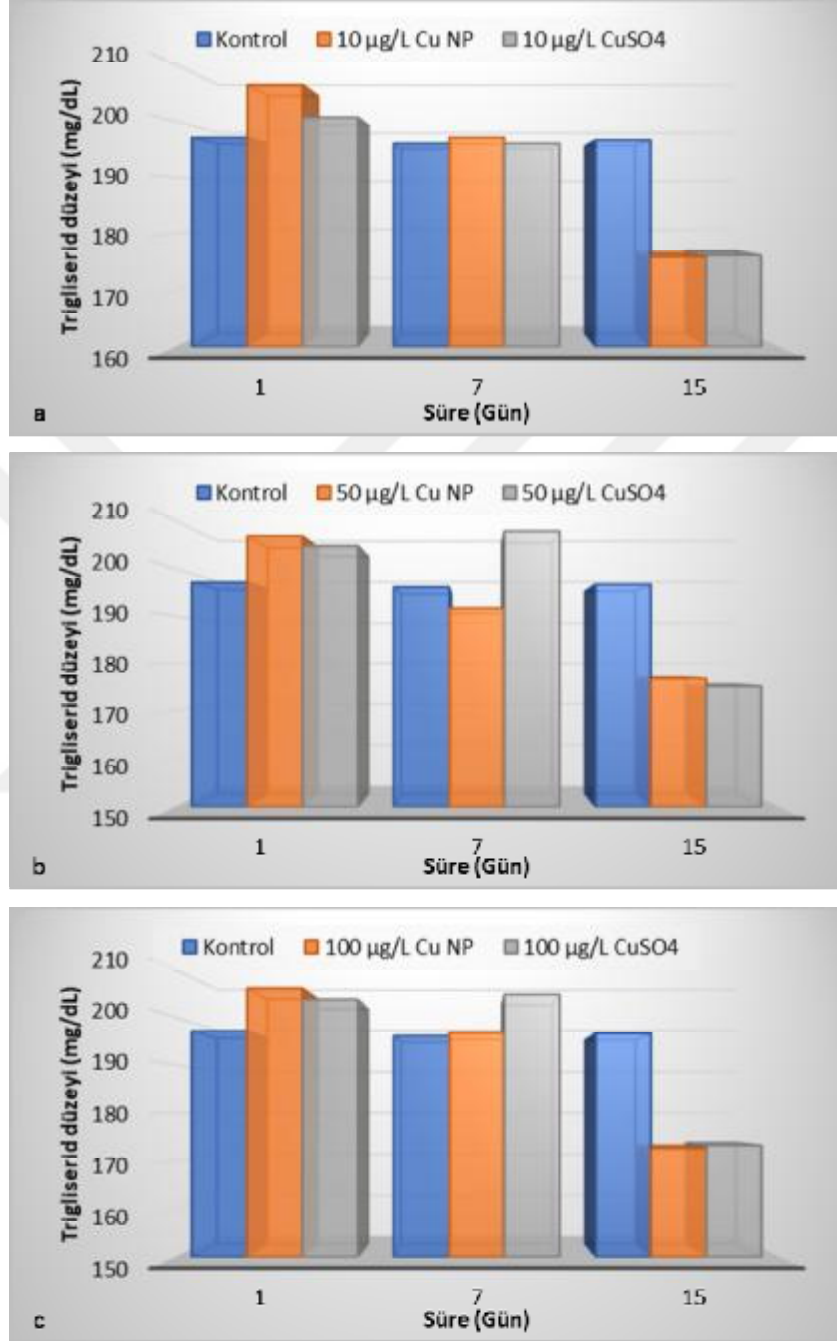
Çizelge 4.13. Cu NP ve CuSO₄'ün farklı derişimlerinin etkisinde *O. niloticus*'un serum trigliserid düzeyleri (mg/dL).

DERİŞİM (µg/L)	SÜRE (GÜN)		
	1	7	15
	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *
Kontrol	197.0 ± 5.568 as	196.0 ± 4.619 as	196.6 ± 6.194 as
10 µg/L Cu NP	206.3 ± 4.256 as	197.0 ± 3.786 as	175.9 ± 5.200 bt
50 µg/L Cu NP	206.7 ± 5.607 as	191.7 ± 7.881 as	176.9 ± 5.102 bt
100 µg/L Cu NP	206.0 ± 4.163 as	196.7 ± 3.700 as	172.6 ± 6.361 bt
10 µg/L CuSO ₄	200.7 ± 3.180 as	196.0 ± 2.887 as	176.2 ± 3.943 bt
50 µg/L CuSO ₄	204.7 ± 4.667 as	207.7 ± 4.910 as	175.3 ± 5.384 bt
100 µg/L CuSO ₄	203.7 ± 6.741 as	204.7 ± 6.359 as	173.3 ± 8.187 bt

*SNK; a, b ve c ile gösterilen harfler derişimler arası, s ve t harfleri ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P < 0.05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.

$\bar{X} \pm s\bar{x}$: Aritmetik ortalama ± Standart Hata

Cu NP ve CuSO₄'ün serum trigliserid düzeyine etkisi kıyaslandığında, tüm derişim ve sürelerde herhangi bir ayrım gözlenmemiştir (Şekil 4.13.; P>0.05).



Şekil 4.13. *O. niloticus*'da Cu NP ve CuSO₄'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağı serum trigliserid düzeylerinin karşılaştırılması (mg/dL).

Cu NP ve CuSO₄ etkisindeki serum ChE aktivitesinde 1 ve 7 günlük etki sürelerinde tüm derişimlerde kontrole oranla herhangi bir farklılık göstermezken (Çizelge 4.14.; $P>0.05$), 15 günlük etki süresi sonunda tüm derişimlerde kontrole oranla azalmıştır ($P<0.05$). 15 günlük etki süresinde 100 µg/L'lik Cu NP ve CuSO₄ etkisinde serum ChE aktivitesi 10 ve 50 µg/L'lik derişimlere oranla azalma göstermiştir ($P<0.05$).

Süreye bağlı metal etkisi incelendiğinde, Cu NP ve CuSO₄ etkisinde 10 µg/L'lik derişimlerde 15 günlük etki süresinde 1 ve 7 günlük etki süresine oranla serum ChE aktivitesi azalırken, diğer tüm derişimlerde etkide kalma süresindeki artışa bağlı olarak serum ChE aktivitesinde azalma görülmüştür ($P<0.05$).

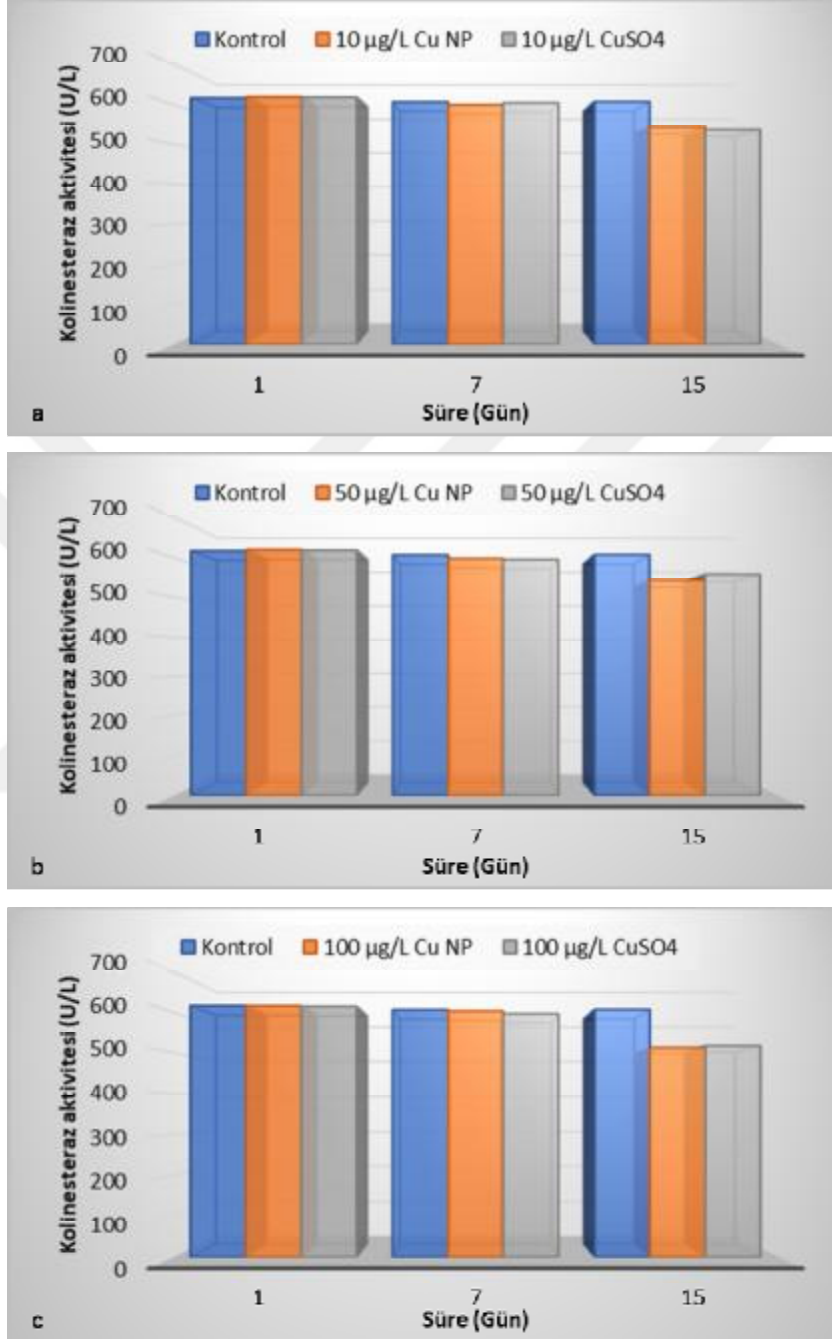
Çizelge 4.14. Cu NP ve CuSO₄'ün farklı derişimlerinin etkisinde *O. niloticus*'un serum ChE aktiviteleri (U/L).

DERİŞİM (µg/L)	SÜRE (GÜN)		
	1	7	15
	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *
Kontrol	616.67 ± 2.906 as	606.33 ± 8.647 as	606.67 ± 4.667 as
10 µg/L Cu NP	619.33 ± 4.177 as	599.00 ± 10.21 as	543.33 ± 5.925 bt
50 µg/L Cu NP	619.67 ± 3.283 as	597.00 ± 4.359 at	542.33 ± 6.359 bx
100 µg/L Cu NP	616.33 ± 4.631 as	603.00 ± 4.932 at	512.00 ± 3.214 cx
10 µg/L CuSO ₄	618.33 ± 1.202 as	604.00 ± 7.638 as	536.67 ± 9.528 bt
50 µg/L CuSO ₄	618.33 ± 3.756 as	594.67 ± 4.667 at	557.33 ± 5.548 bx
100 µg/L CuSO ₄	614.67 ± 4.055 as	596.33 ± 5.783 at	516.33 ± 4.631 cx

*SNK; a, b ve c ile gösterilen harfler derişimler arası, s, t ve x harfleri ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P < 0.05$ düzeyinde istatistik ayrım vardır.

$\bar{X} \pm s\bar{x}$: Aritmetik ortalama ± Standart Hata

Cu NP ve CuSO₄'ün serum ChE aktivitesine etkisi kıyaslandığında, tüm derişim ve sürelerde herhangi bir ayrım gözlenmemiştir (Şekil 4.14.; $P>0.05$).



Şekil 4.14. *O. niloticus*'da Cu NP ve CuSO₄'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağı serum ChE aktivitelerinin karşılaştırılması (U/L).

Cu NP ve CuSO₄ etkisindeki serum AST aktivitesi 1 günlük etki süresinde tüm derişimlerde kontrole oranla herhangi bir farklılık göstermezken (Çizelge 4.15.; P>0.05), 7 ve 15 günlük etki süreleri sonunda tüm derişimlerde kontrole oranla artmıştır (P<0.05). 7 günlük etki süresinde 100 µg/L'lik Cu NP ve CuSO₄ etkisinde serum AST aktivitesi 10 ve 50µg/L'lik derişimlere oranla artış gösterirken (P<0.05), 15 günlük etki süresinde 50 ve 100 µg/L'lik Cu NP ve CuSO₄ etkisinde 10µg/L'lik derişime oranla artış göstermiştir (P<0.05).

Süreye bağlı metal etkisi incelendiğinde, CuNP ve CuSO₄ etkisinde 10 µg/L'lik Cu NP derişimi dışındaki uygulanan tüm derişimlerde serum AST enzimi aktivitesi 7 ve 15 günlük etki sürelerinde 1 günlük etki süresine oranla artış göstermiştir (P<0.05).

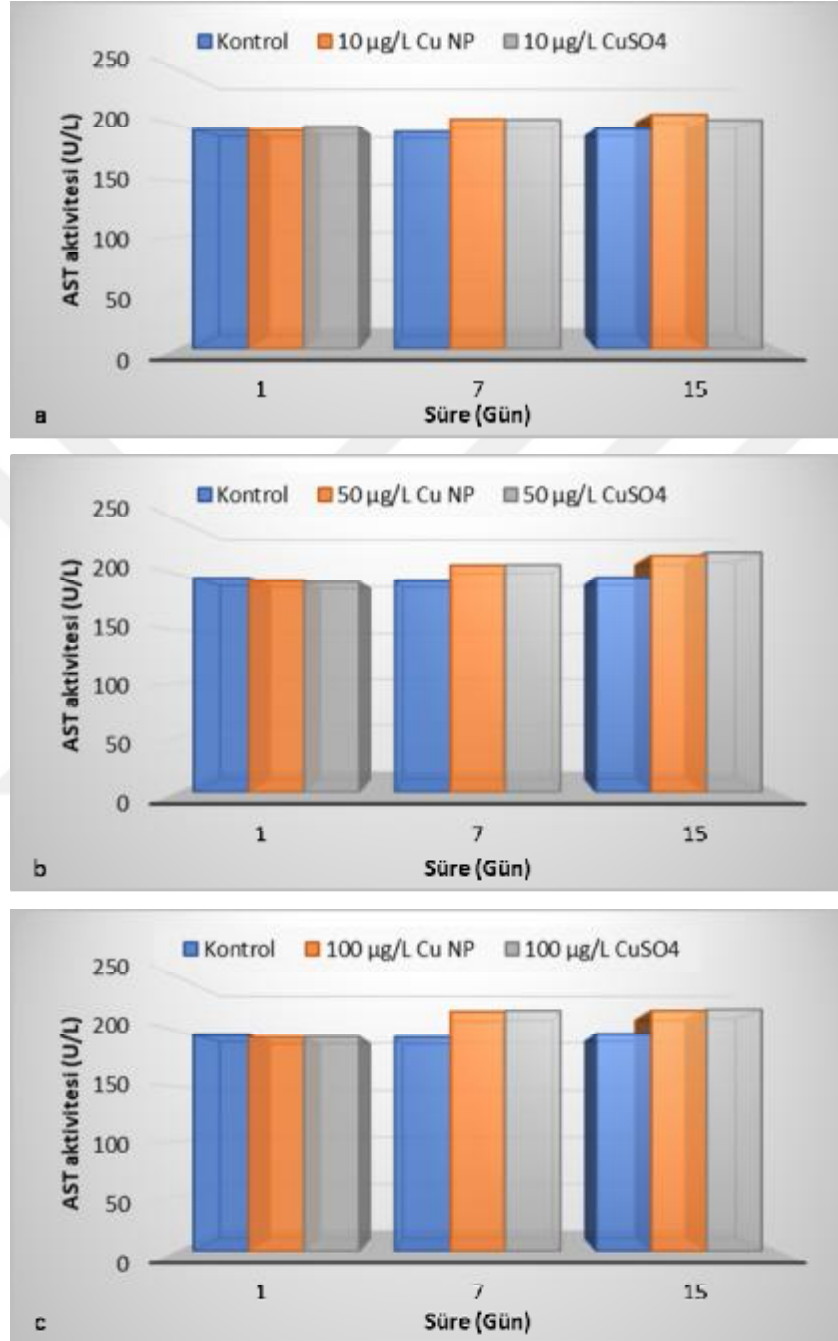
Çizelge 4.15. Cu NP ve CuSO₄'ün farklı derişimlerinin etkisinde *O. niloticus*'un serum AST enzim aktivite (U/L).

DERİŞİM (µg/L)	SÜRE (GÜN)		
	1 $\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	7 $\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	15 $\bar{X} \pm s\bar{x}$ *
Kontrol	196.3 ± 4.807 as	194.3 ± 3.930 as	196.9 ± 5.783 as
10 µg/L Cu NP	195.7 ± 3.930 as	205.0 ± 6.831 bs	209.3 ± 2.404 bs
50 µg/L Cu NP	194.3 ± 4.409 as	208.3 ± 3.180 bt	217.0 ± 5.686 ct
100 µg/L Cu NP	194.3 ± 5.239 as	217.4 ± 4.748 ct	218.3 ± 4.333 ct
10 µg/L CuSO ₄	198.3 ± 4.631 as	204.7 ± 5.207 bs	204.3 ± 6.009 bs
50 µg/L CuSO ₄	193.0 ± 4.041 as	208.7 ± 5.487 bt	220.0 ± 5.686 ct
100 µg/L CuSO ₄	194.7 ± 5.457 as	218.3 ± 4.910 ct	219.7 ± 4.702 ct

*SNK; a, b ve c ile gösterilen harfler derişimler arası, s ve t harfleri ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P < 0.05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.

$\bar{X} \pm s\bar{x}$: Aritmetik ortalama ± Standart Hata

Cu NP ve CuSO₄'ün serum AST enzimi aktivitesi üzerine etkisi kıyaslandığında, tüm derişim ve sürelerde herhangi bir ayrım gözlenmemiştir (Şekil 4.15.; P>0.05).



Şekil 4.15. *O. niloticus*'da Cu NP ve CuSO₄'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağı serum AST aktivitelerinin karşılaştırılması (U/L).

Cu NP ve CuSO₄ etkisindeki serum ALT aktivitesi 1 günlük etki süresinde tüm derişimlerde kontrole oranla herhangi bir farklılık göstermezken (Çizelge 4.16.; P>0.05), 7 ve 15 günlük etki süreleri sonunda tüm derişimlerde kontrole oranla artmıştır (P<0.05). 15 günlük etki süresinde 50 ve 100 µg/L'lik Cu NP etkisinde 10 µg/L'lik derişime oranla, 50 µg/L'lik CuSO₄ etkisinde ise 10 ve 100 µg/L'lik derişimlere oranla ALT aktivitesinde artış gözlenmiştir (P<0.05).

Süreye bağlı metal etkisi incelendiğinde, CuNP ve CuSO₄ etkisinde uygulanan tüm derişimlerdeki serum ALT enzimi aktivitesi 7 ve 15 günlük etki sürelerinde 1 günlük etki süresine oranla artış göstermiştir (P<0.05).

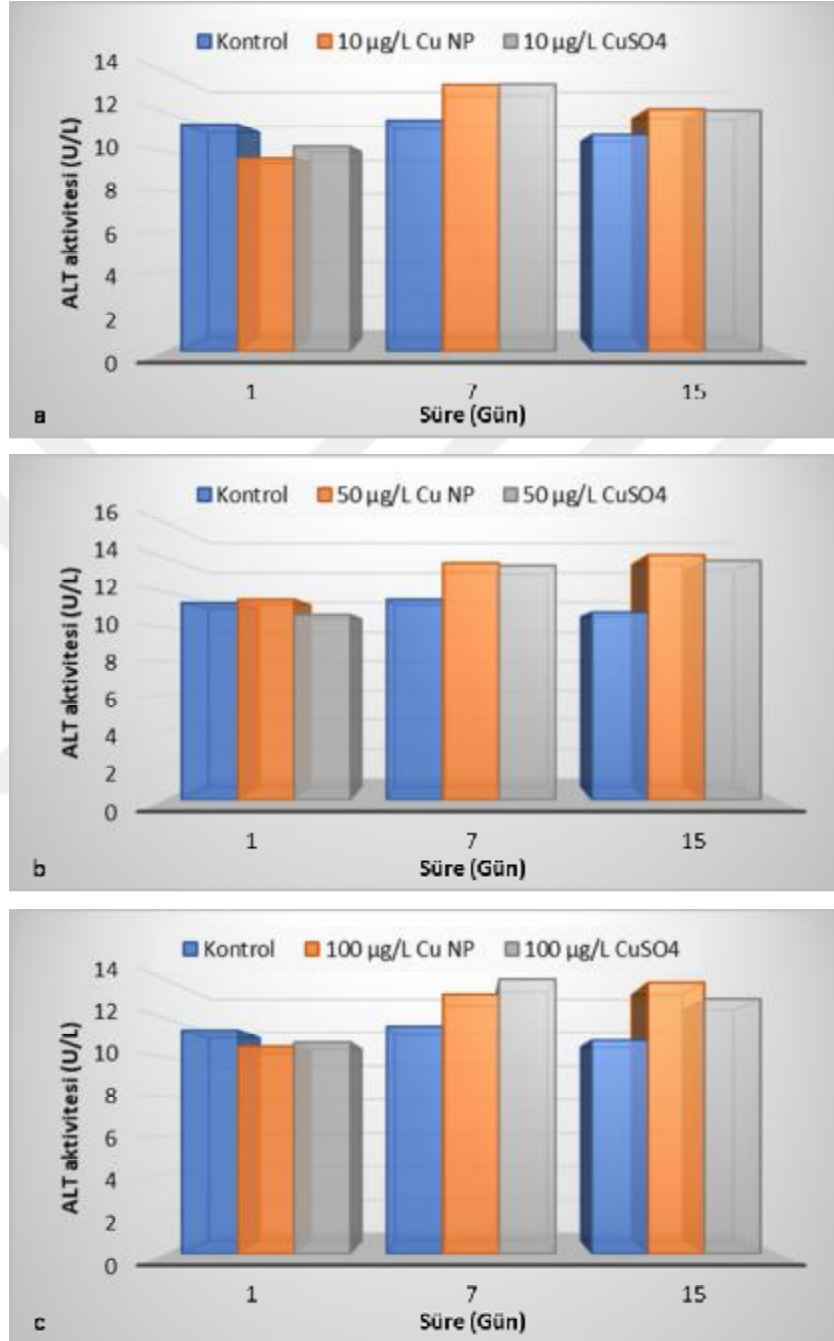
Çizelge 4.16. Cu NP ve CuSO₄'ün farklı derişimlerinin etkisinde *O. niloticus*'un serum ALT enzim aktivite (U/L).

DERİŞİM (µg/L)	SÜRE (GÜN)		
	1	7	15
	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *
Kontrol	11.37 ± 0.284 as	11.57 ± 0.524 as	10.83 ± 0.548 as
10 µg/L Cu NP	9.667 ± 0.393 as	13.33 ± 0.393 bt	12.13 ± 0.470 bt
50 µg/L Cu NP	11.57 ± 0.352 as	13.67 ± 0.285 bt	14.13 ± 0.318 ct
100 µg/L Cu NP	10.53 ± 0.470 as	13.20 ± 0.231 bt	13.80 ± 0.115 ct
10 µg/L CuSO ₄	10.27 ± 0.260 as	13.37 ± 0.425 bt	12.07 ± 0.218 bt
50 µg/L CuSO ₄	10.70 ± 0.737 as	13.53 ± 0.783 bt	13.80 ± 0.153 ct
100 µg/L CuSO ₄	10.73 ± 0.441 as	13.97 ± 0.233 bt	12.97 ± 0.088 bt

*SNK; a, b ve c ile gösterilen harfler derişimler arası, s ve t harfleri ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P < 0.05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.

$\bar{X} \pm s\bar{x}$: Aritmetik ortalama ± Standart Hata

Cu NP ve CuSO₄'ün serum ALT enzimi aktivitesi üzerine etkisi kıyaslandığında, 15 günlük etki süresinde 100 µg/L'lik derişimde serum ALT enzimi aktivitesindeki artış Cu NP etkisinde CuSO₄'e oranla daha fazla olmuştur (Şekil 4.16.; P<0.05).



Şekil 4.16. *O. niloticus*'da Cu NP ve CuSO₄'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağlı serum ALT aktivitelerinin karşılaştırılması (U/L).

Cu NP ve CuSO₄ etkisindeki serum ALP aktivitesi 1 günlük etki süresinde tüm derişimlerde kontrole oranla herhangi bir farklılık göstermezken (Çizelge 4.17.; P>0.05), 7 ve 15 günlük etki süreleri sonunda tüm derişimlerde kontrole oranla artmıştır (P<0.05). 15 günlük etki süresinde 100 µg/L'lik Cu NP etkisinde 10 ve 50 µg/L'lik derişimlere oranla ALP aktivitesinde artış gözlenmiştir (P<0.05).

Süreye bağlı metal etkisi incelendiğinde, 100 µg/L'lik Cu NP etkisinde serum ALP enzimi aktivitesi 7 ve 15 günlük etki sürelerinde 1 günlük etki süresine oranla artış göstermiştir (P<0.05).

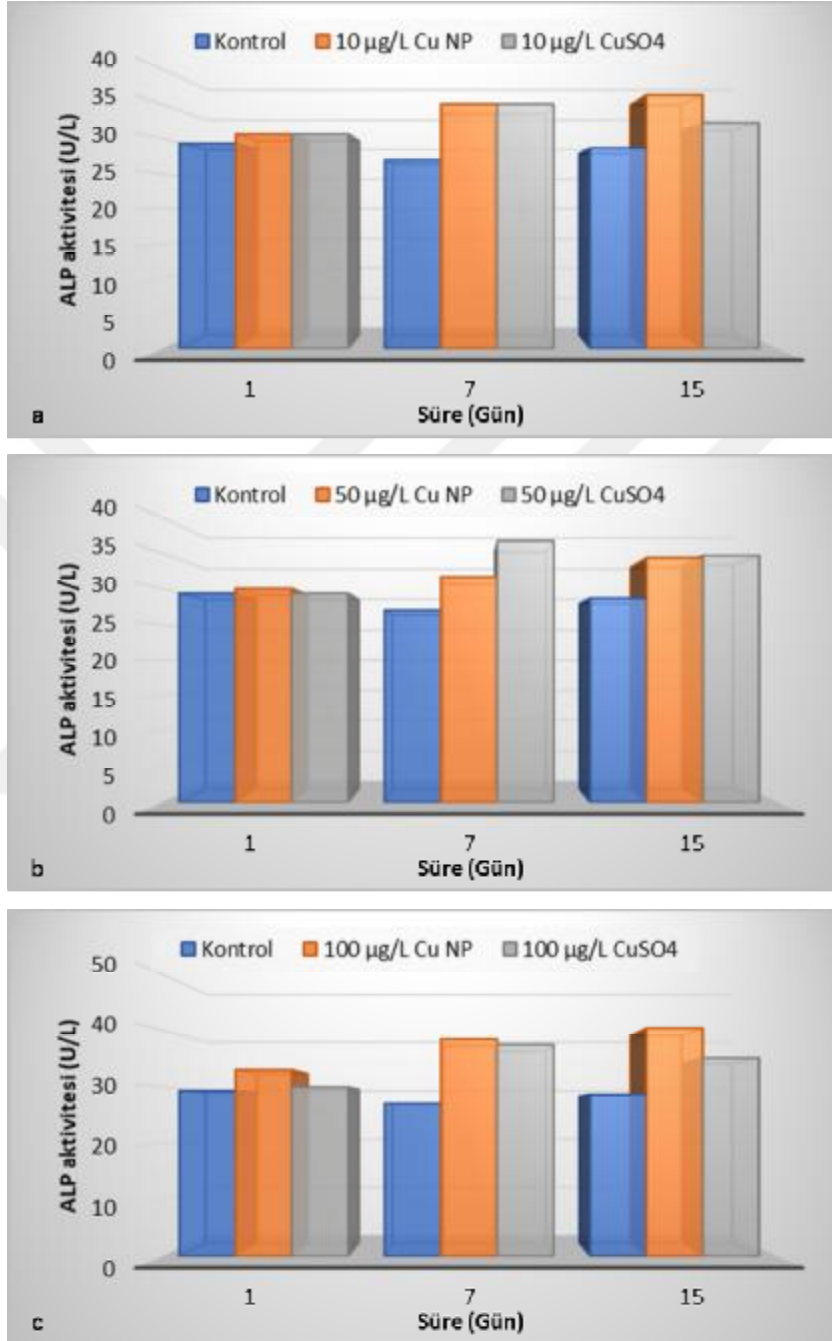
Çizelge 4.17. Cu NP ve CuSO₄'ün farklı derişimlerinin etkisinde *O. niloticus*'un serum ALP enzim aktiviteleri (U/L).

DERİŞİM (µg/L)	SÜRE (GÜN)		
	1	7	15
	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *
Kontrol	29.33 ± 0.883 as	27.00 ± 1.527 as	28.67 ± 1.764 as
10 µg/L Cu NP	30.67 ± 1.453 as	35.00 ± 2.081 bs	36.33 ± 1.453 bs
50 µg/L Cu NP	30.00 ± 3.000 as	31.67 ± 2.333 bs	34.33 ± 1.764 bs
100 µg/L Cu NP	33.00 ± 1.155 as	38.33 ± 2.027 bt	40.33 ± 0.882 ct
10 µg/L CuSO ₄	30.67 ± 2.667 as	35.00 ± 2.000 bs	32.33 ± 0.882 bs
50 µg/L CuSO ₄	29.33 ± 0.882 as	36.67 ± 2.403 bs	34.67 ± 1.667 bs
100 µg/L CuSO ₄	30.00 ± 2.082 as	37.33 ± 1.856 bs	35.00 ± 1.527 bs

*SNK; a, b ve c ile gösterilen harfler derişimler arası, s ve t harfleri ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P < 0.05 düzeyinde istatistik ayırım vardır.

$\bar{X} \pm s\bar{x}$: Aritmetik ortalama ± Standart Hata

Cu NP ve CuSO₄'ün serum ALP enzimi aktivitesi üzerine etkisi kıyaslandığında, 15 günlük etki süresinde 100 µg/L'lik derişimde serum ALP enzimi aktivitesindeki artış Cu NP etkisinde CuSO₄'e oranla daha fazla olmuştur (Şekil 4.17.; P<0.05).



Şekil 4.17. *O. niloticus*'da Cu NP ve CuSO₄'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağlı serum ALP aktivitelerinin karşılaştırılması (U/L).

Cu NP ve CuSO₄ etkisindeki serum LDH aktivitesi 1 günlük etki süresinde tüm derişimlerde kontrole oranla herhangi bir farklılık göstermezken (Çizelge 4.18.; $P>0.05$), 7 ve 15 günlük etki süreleri sonunda tüm derişimlerde kontrole oranla artmıştır ($P<0.05$). 7 günlük etki süresinde 100 µg/L'lik Cu NP ve CuSO₄ etkisinde 10 ve 50 µg/L'lik derişimlere oranla LDH aktivitesinde artış gözlenmiştir ($P<0.05$). 15 günlük etki süresinde Cu NP ve CuSO₄ etkisinde derişim artışa bağlı olarak LDH aktivitesinde de artış belirlenmiştir ($P<0.05$).

Süreye bağlı metal etkisi incelendiğinde Cu NP ve CuSO₄ etkisinde, 50 µg/L'lik derişimde serum LDH aktivitesi 15 günlük etki sürelerinde 1 ve 7 günlük etki süresine oranla artış gösterirken ($P<0.05$), 100 µg/L'lik derişimde etkide kalma süresindeki artışa bağlı olarak enzim aktivitesi artmıştır ($P<0.05$).

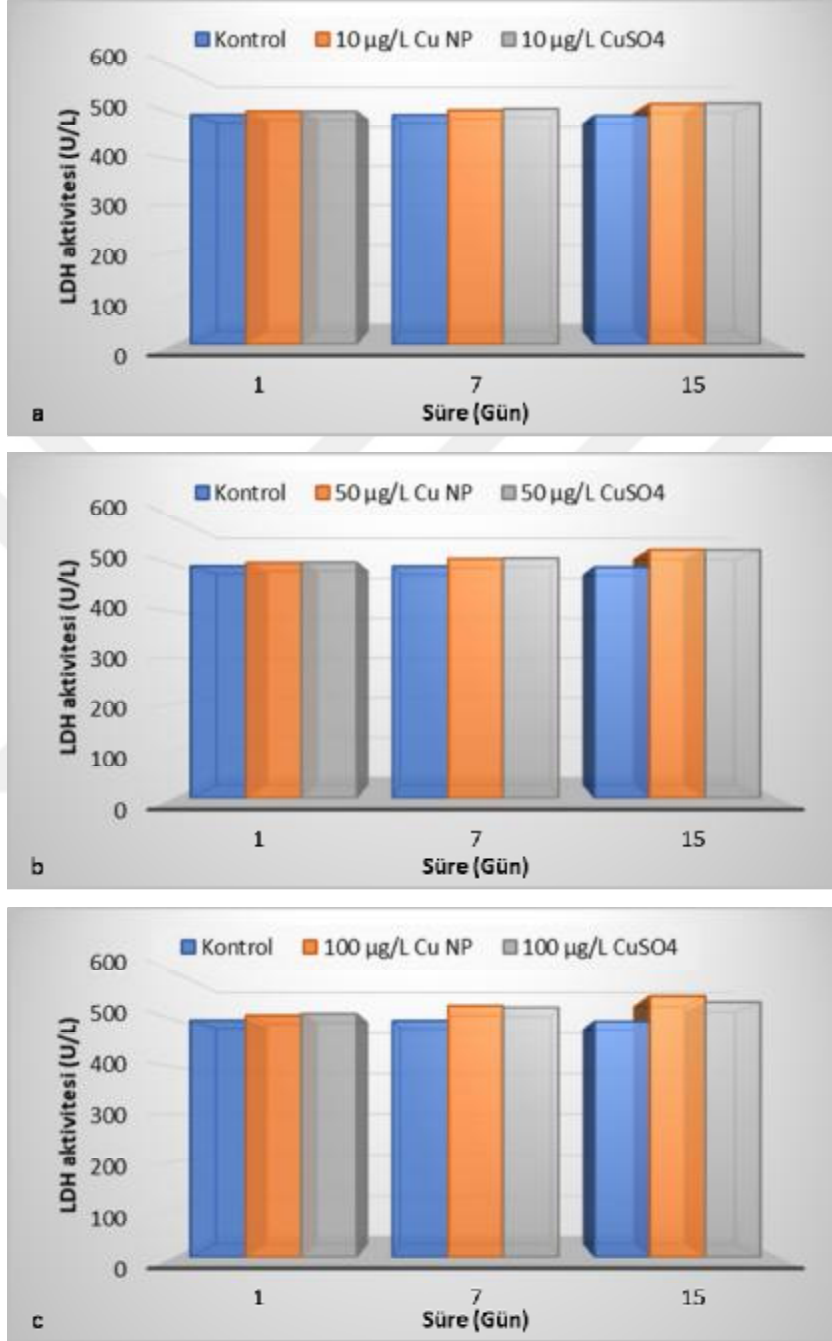
Çizelge 4.18. Cu NP ve CuSO₄'ün farklı derişimlerinin etkisinde *O. niloticus*'un serum LDH enzim aktiviteleri (U/L).

DERİŞİM (µg/L)	SÜRE (GÜN)		
	1 $\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	7 $\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	15 $\bar{X} \pm s\bar{x}$ *
Kontrol	497.3 ± 5.207 as	496.7 ± 5.925 as	495.0 ± 3.786 as
10 µg/L Cu NP	504.7 ± 5.547 as	506.7 ± 5.487 bs	520.3 ± 2.333 bs
50 µg/L Cu NP	504.3 ± 6.333 as	512.3 ± 2.962 bs	531.7 ± 1.453 ct
100 µg/L Cu NP	508.0 ± 4.041 as	528.0 ± 3.055 ct	548.3 ± 5.044 dx
10 µg/L CuSO ₄	504.3 ± 4.978 as	510.0 ± 4.582 bs	521.7 ± 2.186 bs
50 µg/L CuSO ₄	505.0 ± 6.351 as	513.7 ± 4.333 bs	531.3 ± 3.180 ct
100 µg/L CuSO ₄	511.3 ± 2.603 as	524.7 ± 2.906 ct	535.7 ± 2.603 cx

*SNK; a, b, c ve d ile gösterilen harfler derişimler arası, s, t ve x harfleri ise süreler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P < 0.05$ düzeyinde istatistik ayrım vardır.

$\bar{X} \pm s\bar{x}$: Aritmetik ortalama ± Standart Hata

Cu NP ve CuSO₄'ün serum LDH enzimi aktivitesi üzerine etkisi kıyaslandığında, 15 günlük etki süresinde 100 µg/L'lik derişimde serum LDH enzimi aktivitesindeki artış Cu NP etkisinde CuSO₄'e oranla daha fazla olmuştur (Şekil 4.18.; $P<0.05$).



Şekil 4.18. *O. niloticus*'da Cu NP ve CuSO₄'ün 10 (a), 50 (b), 100 µg/L (c) derişimlerinin etkisinde süreye bağı serum LDH aktivitelerinin karşılaştırılması (U/L).

4.2. Tartışma

Ağır metaller başlıca alım yolları olan deri, solungaç, besin yoluyla alındıktan sonra kan yoluyla detoksifikasyon için karaciğere, depolama ve atılım için diğer organlara transfer edilir. Ağır metaller atılım, depolama ve detoksifikasyon mekanizmalarının, alımını karşılamadığı durumlarda balıkların farklı doku ve organlarında birikim göstermektedir (Handy, 2003).

Balıklarda ağır metallerin birikim ve toksik etkileri türe (Yi ve Zhang, 2012), türün gelişme evresine (Zhu ve ark., 2011), eşeye (Perkins ve ark., 1997), metale, metalin ortam derişimine (Kargın ve Erdem, 1991), etkide kalma süresine (Cicik ve ark., 2004), suyun fiziksel ve kimyasal özelliklerine (Hollis ve ark., 1999) ve ortamda bulunan diğer metallere bağlı olarak da değişim gösterir (Kamunde ve MacPhail, 2011). Metal nanopartiküllerinin birikim ve toksik etkileri ise bunlara ek olarak nanopartikülün boyutuna, şekline, kimyasal kompozisyonuna ve çözünabilirliğine, bağlı olarak değişim göstermektedir (Fabrega ve ark., 2011; Luoma ve Rainbow, 2005; Wang, 2011).

Balıklarda ağır metallerin birikim ve toksik etkileri çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik etmenlerin yanı sıra metale ve öncelikle ortam derişimi ve etki süresine bağlı olarak değişim gösterir. Tolere edilebilir düzeydeki ağır metal derişimleri doku ve organlarda birikime, metabolik ve fizyolojik olaylarda değişime neden olurken bu düzeyin aşılması mortalite ile sonuçlanmaktadır (Abel ve Papoutsoglou, 1987; Lemus ve Chung, 1999). *Ictalurus punctatus* ile yapılan bir araştırmada bakırın 354 ve 465 µg/l derişimlerinde mortaliteye neden olduğu belirtilirken (Perkins ve ark., 1997), Erdem ve Kargın (1992), 30 gün süreyle bakırın 0.01, 0.1, 1 ve 5 ppm'lik derişimlerinin *Tilapia nilotica*'da mortaliteye neden olmadığını belirtmiş, Cicik ve Erdem (1992), 30 gün süreyle 10 ppm'lik bakır derişimin tüm balıklarda mortaliteye neden olduğunu belirtmişlerdir.

O. niloticus ile yürütülen bu araştırmada da Cu NP ve CuSO₄ etkisinde deney süresince balıklarda besin almama, akvaryum yüzeyine yönelme, operkulum hareketlerinde artış, yüzme hareketlerinde koordinasyon bozukluğu gibi davranış

değişiklikleri görülmüş ve tüm süre ve derişimlerde mortalite gözlenmemiştir. Görülen bu davranış değişiklikleri ortama eklenen kirleticinin etkisine tepki olarak balığın değişen ortam şartlarına uyum sağlamaya çalışmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Mortalite gözlenmemesi, 10, 50 ve 100 µg/L'lik derişimlerin belirlenen etki sürelerinde bu tür için letal olmaması, metalin toksik etkisinin taşıma kapasitesini aşmaması veya toksik etki sonucunda detoksifikasyon mekanizmalarının devreye girmesinden kaynaklanması ile açıklanabilir.

Balıklarda solungaçlar oldukça geniş yüzey alanına sahip ve doğrudan doğruya ortamla etkileşim halinde olduğundan metal birikimi bakımından hedef organ olmakla birlikte aynı zamanda da önemli atılım yollarındandır (Heath, 1995; Deb ve Fukushima, 1999). Solungaçlar yapıları nedeniyle, oksijen, karbondioksit, elektrolitler, sudaki amonyak ve hidrojen iyonlarının kan ve su arasındaki hareketleri için çok geniş bir yüzey alanı sağlarlar. Bu nedenle, solungaçlar solunum gazları değişimi, ozmoregülasyon, asit-baz dengesi ve azotlu atıkların atılması gibi çok sayıda fonksiyona katılan organlardır. Metal etkisinde membranın yapısal bütünlüğünün bozulması, aktif taşıma sistemlerinin bloke olması, değişen ortam koşullarına tepki olarak solungaç yüzeyinin mukusla kaplanması gibi yapısal değişimlere neden olmaktadır (Heath, 1995).

M. barbatus ve *S. aurata*'da her iki türde de Cu birikiminin solungaç dokusunda yüksek düzeyde olduğu belirtilmiştir (Kargın, 1996). *D. rerio*'da CuO nanopartikülünün ve bakır sülfatın 100 µg/L'lik derişiminin 48 saatlik süreyle etkisinde solungaç dokusundaki metal birikiminin her iki uygulamada da yüksek düzeyde olduğu belirtilmiştir (Griffitt ve ark., 2009). *O. mykiss*'de TiO₂ nanopartikülünün 0,1, 0,5 ve 1 mg/L'lik derişimlerinin 14 günlük süreyle etkisinde solungaç dokusunda tüm derişimlerde herhangi bir değişim olmadığını belirtmişlerdir (Federici ve ark., 2007). *O. mykiss*'de Cu NP ve CuSO₄'ün sırasıyla 20 ve 100 µg/L'lik derişimlerinin 10 günlük süreyle etkisinde solungaç dokusunda yüksek düzeyde biriktiği belirtilmiştir (Al-Bairuty ve ark., 2013). *O. niloticus* ile yürütülen bu araştırmada da Cu NP etkisinde 15 günlük etki süresi 100 µg/L'lik

derişim dışında tüm süre ve derişimlerde solungaçlardaki bakır birikimi artış göstermiş, CuSO_4 etkisinde ise 1 günlük etki süresinde değişim gözlenmezken 7 ve 15 günlük etki sürelerinde kontrole oranla artış belirlenmiştir. Bakır etkisi başlangıcında solungaçtaki birikim bu dokunun geniş bir yüzey alanı olması nedeniyle ortamla doğrudan etkileşim içerisinde olması ve metalin solungaçlarda mukusun glikoprotein bileşenlerine bağlanması ile açıklanabilir.

Balıklarda karaciğer, ağır metalleri bağlamada ve toksik etkilerinin giderilmesinde işlevi olan metallothionein ve glutatyon gibi metal bağlayıcı proteinlerin sentez yeri olmakla birlikte (Asagba ve ark., 2008), besin maddelerinin birbirine dönüşümü, başta glikojen olmak üzere birçok madde depolama, safra oluşumu, plazma proteinlerinin sentezlenmesi ve kolesterol sentezi gibi önemli işlevleri olan metabolik bakımdan aktif bir organdır (Heath, 1995). Metallothioneinler düşük molekül ağırlıklı proteinler olup, metalleri bağlayarak, protein, DNA, lipid ve membran bileşenleri gibi yüksek molekül ağırlıklı bileşiklere bağlanmasını engeller ve organizmayı toksik etkilerden korurlar (Cousins, 1985).

Karaciğer, balıklarda Cu metabolizmasının kontrol edildiği organdır (Grosell ve ark., 1997) ve metal kaynaklı kirleticilerin neden olduğu doku hasarının belirlenmesinde referans olarak kullanılmaktadır (Amaral ve ark., 2002; Cort'es ve ark., 2013). Johari ve ark. (2015) *O. mykiss*'de metal nanopartiküllerinin etkisinde en fazla birikimin sırasıyla karaciğer, solungaç ve barsakta olduğunu belirtmişlerdir. *O. mykiss*'de 30 günlük bakır etkisinde en yüksek Cu birikiminin karaciğerde olduğu belirlenmiştir (Hollis ve ark., 2001). *O. mossambicus*'da 5 ppm Cu NP etkisinde karaciğer dokusunda kontrole oranla bakır birikimde artış gösterdiği belirtilmiştir (Villarreal ve ark., 2014). *O. mykiss* ile yürütölen bir çalışmada CuSO_4 ve Cu NP'nin 10 günlük süreyle karaciğer dokusunda her iki uygulamada da bakır birikiminin artış gösterdiği belirtilmiştir (Shaw ve ark., 2012). Wang ve ark., (2015) *E. coioides*'de Cu NP ve CuSO_4 'ün 20 ve 100 $\mu\text{g/L}$ derişimlerinin 25 gün süreyle etkisinde karaciğerde doku hasarlarına neden

olduğunu belirtmişlerdir. *O. niloticus* ile yürütülen bu araştırmada da Cu NP ve CuSO₄ etkisinde tüm derişim ve sürelerde bakır birikimi artış göstermiştir. Derişim ve sürelerdeki artışa paralel olarak her iki uygulamada da bakır birikiminin artış gösterdiği belirlenmiştir. Karaciğerdeki bakır birikiminin artması, bu dokunun metabolik bakımdan aktif bir doku olması, bakır için hedef doku olması ve metallerin detoksifikasyonundan sorumlu olmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Vücuda alınan metallerin bir kısmı su ve metabolizma atıkları ile birlikte böbreğe taşınmakta ve metallothionenin gibi metal bağlayıcı proteinlere bağlanarak yüksek düzeyde birikime neden olmaktadır (Hollis ve ark., 1999). *O. niloticus*' da bakırın akut ve kronik etkisinde böbrekte birikime bağlı doku hasarı olduğu belirtilmiştir (Abdel-Tawwab ve ark., 2007; Kosai ve ark., 2009). Scown ve ark. (2009) Ti NP etkisinde *O. mykiss*'in böbrek dokusunda yüksek düzeyde birikimin meydana geldiğini ve bunu sonucunda metal etkisinin doku hasarına neden olduğunu belirtmişlerdir. McGeer ve ark. (2000) *O. mykiss*'de 75µg/L Cu'nun 100 günlük süreyle etkisinde bakır birikiminin böbrek dokusunda artış gösterdiğini belirtmiştir. Cu NP'nin 0,02 mg/L'lik derişimini *O. mykiss*'de 10 gün süreyle etkisinde böbrek dokusunda artış gösterdiği ve böbrek tübüllerinde dejenerasyon gibi doku hasarlarına neden olduğu belirtilmiştir (Al-Bairuty ve ark., 2013). Bu araştırmada da Cu NP ve CuSO₄ etkisinde tüm derişim ve sürelerde bakır birikimi kontrole oranla artış göstermiştir. Metallerin birikimindeki bu artış böbrek dokusunun metabolik olarak aktif bir doku olmasından, belirlenen süre ve derişimlerde metalin atılım için böbreğe iletilmesinden ve bu dokuda metallothionenin gibi metal bağlayıcı proteinlere bağlanmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Balıklarda dalak hematopoietik bir organ olup, kan hücrelerinin üretiminde görevli ve sürecini tamamlamış eritrositleri kandan alıp parçalayarak, yeni eritrositlerin sentezinde kullanılacak öncü maddelerin metabolik kaynağını oluşturan bir organdır (Heath, 1995). Chen ve ark., (2006) Cu NP'nin karaciğer,

dalak ve böbrek dokularında patolojik etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir. *O. mykiss*'de Ti NP'nin 8 hafta süreyle etkisinde birikim dalak dokusunda artış göstermiş ve en fazla birikimin bu dokuda olduğu belirtilmiştir (Ramsden ve ark., 2009). Erdem ve Kargın (1990) *T. nilotica*'da bakır birikiminin dalakta artış gösterdiğini ve en fazla birikimin diğer dokulara oranla dalakta olduğunu belirtmişlerdir. *C. carpio*'da bakır birikiminin dalak dokusunda kontrole oranla artış gösterdiği belirtilmiştir (Kargın ve Erdem, 1991). Shaw ve ark., (2012) *O. mykiss*'de CuSO₄ ve Cu NP'nin 10 günlük süreyle etkisinde dalak dokusunda herhangi bir değişiklik meydana gelmediğini belirtmişlerdir. *O. niloticus* ile yürütülen bu araştırmada da Cu NP ve CuSO₄ etkisinde 1 ve 7. günlerde yüksek derişimlerde dalak dokusundaki bakır birikimi kontrole oranla artış gösterirken 15. günde tüm derişimlerde herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Bunun da nedeni dalak dokusunun metabolik bakımdan aktif bir doku olmasının yanında metalin direkt olarak dolaşımdan alınmasından ve metal etkisinde aşırı miktarda eritrosit yıkımının olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kas dokusu metabolik aktivite bakımından aktif olmamasına karşı metalin besin zincirinde iletilmesi bakımından önem taşır. Bu dokudaki birikim metalin üst trofik düzeylere daha yoğun olarak aktarılmasına neden olurken, habitat değişimi ve mortalite sonucu türün sistemden çıkması besin zincirinde kopmalara buna bağlı olarak ekosistemde kalıcı değişimlere yol açmakta olup bu da dokudaki metal birikiminin incelenmesinin önemini ortaya koymaktadır. *C. carpio*'da subletal kadmiyum derişimlerinin uzun süreli etkisinde kas dokusundaki birikim düzeyinin 106 günlük etkide kalma süresi sonunda tehlikeli düzeye ulaştığı bildirilmiştir (De Conto Cinier ve ark., 1999). Federici ve ark., (2007) Ti NP'nin 0,1, 0,5 ve 1 mg/L'lik derişimlerinin 14 günlük süreyle etkisinde *O. mykiss*'in kas dokusunda herhangi bir değişimin olmadığını belirtmişlerdir. Hao ve ark., (2013) *C. carpio*'da ZnO nanopartikülünün kas dokusunda herhangi bir değişime neden olmadığını belirtmişlerdir. *O. mykiss*'de 20 ve 100 µg/L Cu NP ve 20 µg/L CuSO₄ derişimlerinin 10 günlük süreyle etkisinde kas dokusunda birikim olmadığını

belirtilmiştir (Al-Baurity ve ark., 2013). Bu araştırmada da denenen tüm metal ve derişimlerin etkisinde kas dokusunda metal birikimi gözlenmemiştir. Bu da kas dokusunun metabolik bakımdan aktif olmaması ve belirlenen sürenin düşük olması ile açıklanabilir.

Balıklarda metal dağılımı dokuya bağılı olarak değışim göstermekle birlikte genel olarak metabolik bakımdan aktif dokularda daha fazla birikmektedir. *O. mykiss*'de 30 günlük bakır etkisinde en yüksek Cu birikiminin karaciğerde olduğı, bunu böbrek ve solungaçların izlediğini belirlenmiştir (Hollis ve ark., 2001). 5 ppm bakır etkisinde 24, 48 ve 96 saat sürelerle tutulan *O. niloticus*'un dokularındaki en fazla metal birikimi karaciğerde en az birikim ise kasta olduğı belirtilmiştir (Tunçsoy ve Erdem, 2014). *C. gariepinus*'da 5 ppm Cu'nun 15 gün süreyle etkisinde en fazla birikim sırasıyla karaciğer, böbrek, solungaç, dalak ve kas şeklinde belirlenmiştir (Duran ve ark., 2015). Ateş ve ark., (2014) CuO NP'nin farklı derişimlerinin 7 günlük süreyle etkisinde *Cyprinodon variegatus*'da en fazla bakır birikiminin karaciğerde olduğunu belirtmiştir. Bu araştırmada da Cu NP ve CuSO₄ etkisindeki bakır birikimi en fazla karaciğerde olmuş ve bunu sırasıyla böbrek, dalak, solungaç ve kas dokusu izlemiştir. Metal dağılımındaki bu farklılık doku ve organların metabolik aktivitelerindeki ayırım ve metallerin detoksifikasyon için karaciğere, atılım için de böbreğe taşınması ile açıklanabilir.

Metallerin balıklar üzerine etkisi sıklıkla incelense de metal nanopartiküllerinin etkisi son yıllarda çalışılmaya başlanmıştır. Nanopartiküller benzersiz fizikokimyasal özelliklerinden dolayı diğer formlarına oranla farklılık göstermekte (Harman ve ark., 2002; McDonald ve ark., 2005) ve bu formlara oranla daha fazla toksik etki göstermektedir (Kasemets ve ark., 2009).

Cu NP'nin balıklar üzerine etkisinin incelendiğı çalışmaları günümüzde artmaktadır (Shaw ve Handy, 2011; Al-Baurity ve ark., 2013). Bu çalışmalar çoğunlukla Cu NP'nin letal dozunun belirlenmesi (Griffitt ve ark., 2009), birikimi (Zhao ve ark., 2011; Shaw ve ark., 2012), stres fizyolojisi (Basuini ve ark., 2016), osmoregülasyona etkileri (Wang ve ark., 2014) ve patolojik etkileri (Al-Baurity ve

ark., 2013) üzerine odaklanmıştır. Cu NP kimyasal kompozisyonları, şekil ve boyutları ve yüzey alanları nedeniyle bakırın diğer formlarına oranla toksisitelerinde farklılık göstermektedir (Aitken ve ark. 2004; Bystrzejewska-Piotrowska ve ark., 2009). Griffitt ve ark., (2009), *D. reiro*'da Cu NP ve CuSO₄'ün 48 saatlik LC₅₀ değerlerini sırasıyla 0.71 ve 1.78 mg/L olarak belirlemiş ve Cu NP'nin daha toksik olduğunu belirtmiştir. Wang ve ark., (2015) *E. coioides*'de Cu NP ve CuSO₄'ün 20 ve 100 µg/L derişimlerinin 25 gün süreyle etkisinde solungaç ve karaciğerde CuSO₄'ün, Cu NP'ye oranla daha etkin olduğunu belirtmiştir. Hao ve ark., (2013) *C. carpio*'da ZnO NP ve ZnSO₄'ün 50 mg/L'lik derişiminin 30 günlük süreyle etkisinde solungaç ve karaciğerde ZnO NP'nin ZnSO₄'e oranla daha fazla birikime neden olduğunu belirtmişlerdir. *D. reiro*'da Cu NP'nin 48 saatlik LC₅₀ değeri olan 250 µg/L ve yine CuSO₄'ün LC₅₀ değeri olan 1,56 mg/L'lik derişimlerinin etkisinde bakır sülfatın bakır nanopartikülüne oranla daha toksik olduğu belirtilmiştir (Griffitt ve ark., 2007). Bu araştırmada da solungaç dokusunda 1. gün haricinde CuSO₄ etkisindeki birikim Cu NP'ye oranla daha fazla olurken, karaciğer ve böbrek dokusunda özellikle yüksek derişimlerdeki bakır birikimi Cu NP etkisinde CuSO₄'e oranla daha fazla olmuş, dalak ve kas dokusunda ise uygulamalar arasında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. Metaller arasındaki farklılık Cu NP'nin boyutlarının küçük, yüzey alanlarının geniş olması ve metaller arasındaki çözünme farklılığından kaynaklı olması ile açıklanabilir.

Antioksidan sistem yanıtları su organizmalarında metabolik değışimlerin ve kirleticilerin etkilerinin belirlenmesinde önemli bir belirteçtir (Sanchez ve ark., 2005). Ağır metaller de diğer tüm kirleticiler gibi ya direkt organizmalarda reaktif oksijen türlerini oluşturarak ya da antioksidan hücre savunmasını yok ederek oksidatif strese neden olmaktadır (Janero, 1990; Termini, 2000; Kong ve ark., 2013). Reaktif oksijen türlerinin organizmanın antioksidan savunmasının karşılayamadığı düzeyde üretilmesi lipid, protein ve DNA hasarları gibi çeşitli toksik etkilere neden olmaktadır (Sabatini ve ark., 2009; Vale ve ark., 2016).

Cu balıklarda Heber Weis ve Fenton reaksiyonlarını katalizleyerek reaktif oksijen türlerini oluşturur ve oksidatif strese neden olur (Prousek, 2007). Pozitif Cu^{+2} iyonu direkt olarak negatif yüklü protein-SH gruplarına bağlanarak, enzimleri denatüre ederek ya da indirekt olarak reaktif oksijen türlerini oluşturarak oksidatif strese neden olur (Ahmad ve ark., 2005; Bopp ve ark., 2008). Cu NP gibi metalik nanopartiküller de boyutları, dağılımları ve çözünmelerine bağlı olarak reaktif oksijen türlerinin artmasına neden olurlar (Fu ve ark., 2014). Boyutlarının küçük olması nedeniyle kolaylıkla hücre membranlarını geçerek sitotoksositeye neden olmaktadır (Sakai ve ark., 2011).

Tüm organizmalarda metal ve metal oksit nanopartiküllerinden kaynaklı oksidatif stresin zararlı etkileri SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan enzimler tarafından etkisiz hale getirilir (Ma ve ark., 2010). Diğer organizmalar gibi balıklarda da reaktif oksijen türlerinden kaynaklı oksidatif stres SOD, CAT ve GPx enzimleri tarafından superoksit ($\text{O}_2^{\cdot-}$) radikalini hidrojen peroksit (H_2O_2) ardından H_2O_2 'yi de H_2O ve O_2 'ye çevirerek yok edilir (Valavanidis ve ark., 2006).

SOD enzimi lipid peroksidasyonu engelleyen ve süperoksit radikallerini H_2O_2 'ye dönüşmesini sağlayan antioksidan savunma için çok önemli bir enzimdir. CAT enzimi hücrel antioksidan mekanizma için anahtar öneme sahip detoksifikasyon enzimidir ve H_2O_2 'yi moleküler oksijen ve suya metabolize eder (Daoud ve ark., 2012). SOD-CAT sistemi oksijen toksisitesine karşı ilk savunma sistemini oluşturmaktadır (Kumar ve ark., 2003). CAT enzime benzer bir şekilde GPx enzimi H_2O_2 detoksifikasyonu için tamamlayıcı bir özellikte olup, H_2O_2 'yi uzaklaştırarak doku hasarlarını önlemektedir (Xiong ve ark., 2011).

Xiong ve ark., (2011) *D. rerio*'da metal oksit nanopartiküllerinin oksidatif stresi arttırdığını ve bu nanopartiküllerin metalin diğer formlarına oranla daha fazla oksidatif hasara yol açtığını belirtmişlerdir. Cu NP etkisinin reaktif oksijen türlerinin artışına ve oksidatif strese neden olduğu belirtilmiştir (Fahmy ve Cormier, 2009). Ateş ve ark., (2014) Cu NP'nin *C. variegatus*'da MDA düzeyinin

kontrole oranla arttırdığını ve buna bağlı olarak oksidatif strese neden olduğunu belirtmişlerdir.

C. carpio'nun 8 gün süre ile 0,1 ve 0,25 mg/L Cu'nun etkisinde karaciğer dokusunda CAT aktivitesinin artış gösterdiği belirtilmiştir (Dautremepuits ve ark., 2004). Baily ve ark., (1996) farklı kirleticilerin etkisi altında *O. niloticus*'da SOD aktivitesinin arttığını belirtmişlerdir. *O. mossambicus*'da 5 ppm Cu NP etkisinde karaciğer dokusunda CAT aktivitesi artış gösterirken, SOD aktivitesinde herhangi bir değişim gözlenmediği belirtilmiştir (Villarreal ve ark., 2014). *Leporinus obtusidens*'in karaciğer dokusunda 20 ve 40 µg/l'lik Cu etkisinde CAT aktivitesinin artış gösterdiğini belirtilmiştir (Gioda ve ark., 2007). Abdel-Khalek ve ark., (2015) bakırın nano ve daha büyük formlarını kıyasladığı çalışmalarında *O. niloticus*'un karaciğer dokusunda SOD ve CAT aktivitesinde bakırın daha büyük formunda artış gözlenmiş, nano formunda ise bu enzimlerin inhibe olduğu belirtilmiş, GPx aktivitesinde ise karaciğerde bakırın her iki formunda da artış olduğunu ve CuO'nun nano formunun daha toksik olduğu bildirmiştir. Bu araştırmada da Cu NP etkisinde SOD, CAT ve GPx aktivitesi genel olarak kontrole oranla artış göstermiş, CuSO₄ etkisinde ise SOD, CAT ve GPx aktivitesi sürenin uzamasıyla kontrole oranla artış göstermekle birlikte, bu artış Cu NP'ye oranla daha az olmuştur. Süreye bağlı etkide ise enzim aktivitesinde SOD aktivitesi önce artmış sürenin uzamasıyla azalma göstermiş, CAT ve GPx aktivitesi ise artış göstermiştir. Antioksidan enzim aktiviteleri göz önünde bulundurulduğunda genel olarak Cu NP'nin CuSO₄'e oranla daha toksik olduğu belirlenmiştir. Enzim aktivitesindeki bu artışın metal etkisinde reaktif oksijen türlerinin artmasından kaynaklandığı, SOD aktivitesindeki artışın metal etkisinde oluşan süperoksit radikalının H₂O₂'ye, CAT ve GPx aktivitesindeki artışın ise artan H₂O₂'nin oksijen ve suya katalizlenmesinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Cu NP etkisindeki daha fazla artışın ise metalin küçük boyutlu olması nedeniyle sitotoksisiteyi arttırarak daha fazla reaktif oksijen türlerini oluşturmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Serum biyokimyasal parametreleri fizyolojik stres yanıtları için bir indikatör olmakla birlikte aynı zamanda balıkların genel sağlık durumları ile ilgili de bilgi vermektedir (Dawood ve ark., 2016). Kirleticilerin etkisinde serum biyokimyasal parametrelerin incelenmesi aynı zamanda hedef organ toksisitesinde de belirleyici bir rol oynamakta (Prashanth, 2012; Dube ve ark., 2014) ve bu parametrelerin ağır metal toksisitesinin bir göstergesi olarak kullanılabileceği belirtilmektedir (Fırat ve Kargın, 2010a).

Serumdaki düzeyi endokrin sistem tarafından kontrol edilen glikoz balıklarda yaşamsal olaylar için gerekli olan enerjinin kaynağıdır ve fazlası kas ve karaciğerde glikojen formunda depo edilir (Javed ve Usmani, 2013). Metal etkisi gibi stres faktörleri kortizol, epinefrin ve katekolamin gibi hormonların salınımını arttırarak, karbonhidrat metabolizmasında değişikliklere neden olmaktadır (Vosyliene, 1999). Balıklarda ağır metal etkisinin strese neden olduğu, stres koşullarında enerji gereksiniminin arttığı ve bunu sonucunda bu hormonların salınımını stimule ederek glikojenlisis ile kas ve karaciğer glikojeninin mobilizasyonuna neden olduğu belirtilmektedir (Brown, 1993; Tuncsoy ve ark., 2016). Yapılan birçok çalışmada stres koşullarında serum glikoz düzeyinde artış meydana geldiği belirtilmiştir (Iwama ve ark., 1999; Cicik ve Engin, 2005; Ramesh, 2007). *S. trutta*'da bakır etkisinin ortam derişimi ve etkide kalma süresine bağlı olarak serum glikoz ve kortizol düzeylerini arttırdığı belirlenmiştir (Nemcsok ve Hughes, 1988). Bu araştırmada da Cu NP ve CuSO₄ etkisinde serum glikoz düzeyi metal etkisi ve süreye bağlı olarak artış göstermiştir. Serum glikoz düzeyindeki bu artış metal etkisinin yarattığı stres nedeniyle enerji gereksiniminin glikojenlisisin artması sonucunda oluşan glikozdan sağlaması ile açıklanabilir.

Balıklarda ağır metaller, kanda bulunan albumin, globulin ve seruloplazmin gibi proteinlere bağlanarak doku ve organlara taşınırlar. Sentez yerleri karaciğer olan albüminlerin taşıyıcı görevlerinin dışında kan ve dokular arasındaki ozmotik dengeyi sağlar ve gerektiğinde aminoasit kaynağı olarak kullanılmaktadır (Heath 1995). Chen ve ark. (2004), *O. niloticus*'da bakırın 7

günlük etkisinde albumin seviyesinin değişmediğini belirtmişlerdir. Fırat ve Kargın (2010b) 14 günlük metal etkisi sonunda *O. niloticus*'da serum albümin seviyesinde artış meydana geldiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada da 15 günlük etki süresi sonunda *O. niloticus*'da Cu NP ve CuSO₄ etkisinin serum albümin düzeyinde artışa neden olmuştur. Bu artışın metal etkisi süresince metal taşıyıcı proteinlerin taşıma kapasitesindeki artışa bağlı olarak sentezindeki artmadan kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Serum total protein düzeyinin belirlenmesi karaciğer hasarının indikatörü olarak kullanılmakla birlikte balıkların beslenme durumlarıyla ilgili bir parametredir ve ksenobiyotik kaynaklı stresin bir belirteci olarak kullanılmaktadır (Schaperclaus ve ark., 1992; Yang ve Chen, 2003). Zaghoul ve ark., (2006), *C. gariepinus*, *O. niloticus* ve *T. zillii*'de serum total protein düzeyinde azalmaya neden olduğunu belirtmiştir. *O. niloticus*'da 30 günlük bakır etkisinde serum total protein düzeyin azalma meydana geldiği belirtilmiştir (Öner ve ark., 2008). *R. quelen*'de bakırın 16 ve 29 µg/L'lik derişiminin 45 günlük etki süresinde serum glikoz düzeyinde artış gözlenirken serum total protein düzeyinde azalma meydana gelmiştir (Pretto ve ark., 2014). Singh ve Reddy, (1990) *H. fossilis*'de 30 günlük etki süresinde 0.25 ppm bakırın serum total protein düzeyinde azalmaya neden olduğunu belirtmişlerdir. *O. niloticus* ile yürütülen bu çalışmada da Cu NP etkisinde 7 günlük etki süresinden itibaren, CuSO₄ etkisinde ise 15 günlük etki süresinde serum total protein düzeyinde azalma meydana gelmiştir. Serum total proteinindeki bu azalma metal etkisine bağlı karaciğerdeki yapısal bozulmanın bir sonucu olarak serum proteinlerinin sentezindeki inhibisyondan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çoğunlukla karaciğer tarafından sentezlenen kolesterol hücre membranlarının, lipoproteinlerin, safra asitlerinin ve steroid hormonların başlıca yapısal bileşenini oluşturur (Heath., 1995) ve stres etkisindeki balıklarda çevresel stres faktörlerinin etkilerini belirlemek amacıyla kullanılır (Yang ve Chen, 2003). Dutta ve Haghighi (1986) balıklarda ağır metallerin kolesterol sentezini inhibe

ettiğini belirtmiştir. *C. carpio*'da metal etkisinde derişimin artmasına bağı olarak serum total kolesterol düzeyinde önemli ölçüde düşüş gözleendiği belirtilmiştir (Shaheen ve Akhtar, 2012). Heydarnejad ve ark., (2013) *O. mykiss*'de bakır etkisinde serum kolesterol düzeyinin azaldığını belirtmiştir. Bu araştırmada da 15 günlük etki süresi sonunda Cu NP ve CuSO₄ etkisinde kontrole oranla serum kolesterol düzeyinde azalma belirlenmiştir. Bu azalmanın da metal etkisine bağı karaciğer hasarından, kolesterol sentezindeki bozulmalardan ve kolesterolün kortikosteroid hormonların sentezinde kullanılmasından ve glikoneogenezden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Trigliseridlerin başlıca görevi depolama ve hücrel enerjiyi sağlama olmakla birlikte balıkların beslenme durumunun bir belirteci olarak kullanılmaktadır (Heydarnejad ve ark., 2013). Öner ve ark., (2008) *O. niloticus*'da bakırın 20 gün süreyle etkisinde serum trigliserid düzeyinde azalma meydana getirdiğini belirtmişlerdir. Artacho ve ark. (2007), stres altında enerji gereksiniminin karşılanması için lipit depolarının kullanıldığını belirtmektedir. Heydarnejad ve ark., (2013) *O. mykiss*'de bakırın 15 günlük etkisinin serum trigliserid düzeyinde azalmaya neden olduğunu belirtmiştir. Bu araştırmada da Cu NP ve CuSO₄ etkisinde serum trigliserid düzeyi 15 günlük etki süresi sonunda kontrole oranla azalmıştır. Bu azalma metal etkisinde enerji gereksiniminin glikoneogenezin artmasıyla ile glikojen olmayan kaynaklardan sağlanması ile açıklanabilir.

ChE, AST, ALT, ALP ve LDH gibi serum enzimleri su organizmaları için kirleticilerin etkisini belirlemede hassas biyomarkırlar olarak kullanılmaktadır (Vaglio ve Landriscina, 1999; Levesque ve ark., 2002; Nel ve ark., 2009). ChE'ler, asetilkolin ve diğer kolin-esterleri hidroliz eden enzimlerdir. AST ve ALT aminoasit metabolizmasına katılmakla birlikte serumdaki artan düzeyleri başta karaciğer olmak üzere böbrek, solungaç gibi dokuların hasarlarına işaret etmektedir (Hoseini ve ark., 2012). Balıklarda ağır metal etkisinde gereksinim duyulan enerji, glikoz ve glikojen gibi karbohidratların yanı sıra sentez yeri karaciğer olan AST

ve ALT gibi glukoneogenik enzimler aracılığı ile, protein ve lipit gibi karbonhidrat olmayan kaynaklardan da sağlanmaktadır (Levesque ve ark., 2002).

Fosfatazlar ve dehidrojenazlar önemli enzim grupları olmakla birlikte makromoleküllerin detoksifikasyonu, metabolizması ve biyosentezi, gibi proseslerde görev almaktadırlar (Yousef ve ark., 2007). ALP transfosforilazda, su organizmalarında iskelet mineralizasyonunda ve membran transport aktivitelerinde görevli bir enzimdir (Bernet ve ark., 2001). ALP'nin serumdaki düzeyi karaciğer ve böbrek dokularının hasarı olması durumunda artış göstermektedir (Karan ve ark., 1998). LDH, laktatın piruvata geri dönüşümlü oksidasyonunu katalizleyen bir enzimdir ve doku hasarlarında serumdaki düzeyi artış göstermektedir.

C. carpio'da CuO nanopartikülünün 2.5 mg/L derişiminin 4 günlük süreyle etkisi solungaç ve karaciğer dokusunda histopatolojik anomaliye neden olduğu belirtilmiştir (Mansouri ve ark., 2016). Ostaszewska ve ark., (2015) Cu NP'nin 0,01, 0,05 ve 0,15 mg/L'lik derişimlerinin *A. baerii*'de solungaç ve karaciğerde histopatolojik lezyonlara neden olduğunu belirtmişlerdir. Wu ve ark., (2003) stres faktörlerinin etkisinde *E. areolatus*'da serum AST ve ALT düzeyinin artış gösterdiğini ve bunu da karaciğer hasarından kaynaklandığını belirtmişlerdir. Metal etkisinde dokulardaki fizyolojik değişikliklerden dolayı serum ALP aktivitesinin artış gösterdiği belirtilmiştir (Jiraungkoorskul ve ark., 2003).

O. niloticus'da metal etkisinde ChE aktivitesinde azalma, AST, ALT, ALP ve LDH aktivitesinde artış olduğu belirtilmiştir (Fırat ve Kargın 2010b). Zaghloul ve ark., (2006), *C. gariepinus*, *O. niloticus* ve *T. zillii*'de serum AST, ALT ve ALP aktivitelerinin kontrole oranla artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Heydarnejad ve ark., (2013) *O. mykiss*'de bakırın 10 ve 30 µg/L'lik derişimlerinin 15 günlük süreyle etkisinde serum AST, ALT ve ALP aktivitesinde artış olduğunu belirtmişlerdir. Chen ve ark. (2004), *O. niloticus*'da bakırın 7 günlük etkisinde ALP düzeyinin kontrole oranla artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Schjolden ve ark. (2007) *C. carassius* ile 14 gün 300 µg/L'lik bakır etkisinde plazma laktat seviyesinin kontrole oranla artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Hoseini ve ark.,

(2016) *C. carpio*'da CuSO_4 ve Cu NP etkisinde AST ve ALT aktivitesinde artış meydana geldiğini belirtmişlerdir. Abdel-Khalek ve ark., (2015) 30 günlük CuO etkisinde *O. niloticus*'da serum AST, ALT ve ALP aktivitelerinde artış görüldüğünü belirtmişlerdir. Bu araştırmada da Cu NP ve CuSO_4 etkisinde 15 günlük etki süresi sonunda ChE aktivitesinde azalma, serum AST, ALT, ALP ve LDH aktivitesinde 7 günlük etki süresinden itibaren kontrole oranla ve etkide kalma süresindeki artışa paralel olarak belirgin bir artış görülmektedir. Serum enzim aktivitelerindeki bu değişimlerin metal etkisinin artan enerji gereksiniminin karbonhidrat olmayan kaynaklardan sağlanmasından ve karaciğer, böbrek ve solungaç gibi dokularında meydana gelen hasarlardan dolayı serumdaki düzeyinin arttığı düşünülmektedir.

Yapılan bu çalışmada Cu NP ve CuSO_4 'ün *O. niloticus*'un dokularındaki birikim düzeyleri, antioksidan enzim aktiviteleri ve serum biyokimyasal parametreleri üzerine etkileri karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir. Cu NP'nin genel olarak dokulardaki birikimi ve antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkilerine bakıldığında CuSO_4 'e oranla daha toksik olduğu, serum parametrelerinde ise genel olarak belirgin bir fark olmadığı sonucuna varılmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde sanayideki gelişim ve nüfus artışına bağlı insan etkileri su ekosistemlerinin ağır metaller gibi çeşitli kirleticiler tarafından kirletilmesine neden olmaktadır. Teknolojik gelişmelerin ve endüstriyel atıkların artmasından kaynaklanan artan miktarlarda ağır metal kirliliği sonucu besin olarak tüketilen ve ekonomik öneme sahip bir türün dokularında biriken metal derişimleri ile birlikte fizyolojik ve biyokimyasal değişimlerin periyodik olarak belirlenmesi ekosistemin yapısal bütünlüğü bakımından büyük önem taşımakla birlikte hem insan sağlığı hem de ekonomik bağlamda da önem taşımaktadır.

Nanopartiküller gıda, tekstil, malzeme, bilişim, otomobiller ve metal endüstrisi gibi birçok sektörde ve özellikle tıp alanında görüntüleme cihazlarında ve biyosensörlerde kullanılmaktadır. Günlük kullanılan kir tutmayan bebek elbiseleri ve masa örtüleri, su tutmayan-ıslanmayan-kirlenmeyen boyalar, traş losyonları ve güneş kremleri dahil birçok alanda nanoteknolojik ürünler kullanılmaktadır. CuO NP, Ag NP ve Ti NP gibi çeşitli endüstriyel ve ticari uygulamalarda kullanılan nanopartiküllerin kaçınılmaz bir şekilde son bulacağı yer sucul ortamlardır. Günümüzde yaygın olarak kullanılmalarına karşın bu nanopartiküllerin balıklar üzerine etkisi ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır.

Artan yoğunlukta kullanılan nanopartiküllerin çevreye salınımları insan ve çevre sağlığı üzerine etkilerinin araştırıldığı birçok araştırma sonucunda bu partiküllerin metallerin diğer formlarına oranla toksisitelerinde farklılıkların olması, bu materyallere olan şüpheleri arttırmıştır. Doğadaki makro ve mikro yapılar insan ve çevre sağlığını tehdit ettiği gibi nanopartiküllerin de tehdit unsuru olduğu açıktır. Ülkemizde konu ile ilgili araştırmaların çok kısıtlı olması nedeni ile nanopartikül toksisitesinin öncelikle araştırılması ve metallerin diğer formlarına oranla farklılıklarının belirlenmesi son derece önemlidir.

Yapılan bu çalışmada *O. niloticus*'un incelenen metaller etkisinde dokularındaki metal birikimi, antioksidan enzim aktiviteleri ve serum biyokimyasal parametreleri incelenmiş ve bunun sonucunda Cu NP'nin özellikle doku birikimi ve antioksidan enzim aktiviteleri bağlamında CuSO₄'e oranla daha toksik olduğu sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte incelenen metallerin etkisinde her iki uygulamada da anılan türde incelenen parametrelerin değişikliklere neden olması bu parametrelerin kirlilik belirteci olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.



KAYNAKLAR

- Abdel-Khalek, A.A., Kadry, M.A.M., Badran, S.R., Marie, M.S., 2015. Comparative Toxicity of Copper Oxide Bulk and Nano Particles in Nile Tilapia; *Oreochromis niloticus*: Biochemical and Oxidative Stress. Journal of Basic and Applied Biology, 72:43-57.
- Abdel-Tawwab, M., Mousa, M.A.A., Ahmad, M.H., Sakr, S.F.M., 2007. The Use of Calcium Pre-exposure as a Protective Agent against Environmental Copper Toxicity for Juvenile Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). Aquaculture, 264(1-4):236-246.
- Abel, P.D., Papoutsoglou, S.E., 1987. Lethal Toxicity of Cadmium to *Cyprinus carpio* and *Tilapia aurea*. Bulletin Environmental Contamination and Toxicology, 38:382-386.
- Ahmad, I., Oliveira, M., Pacheco, M., Santos, M.A., 2005. *Anguilla anguilla* L. Oxidative Stress Biomarkers Responses to Copper Exposure with or Without B-Naphthoflavone Pre-Exposure. Chemosphere 61:267-275.
- Aitken, R.J., Creely, K.S., Tran, C.L., 2004. Nanoparticles: An Occupational Hygiene Review. Health and Safety Executive, Suffolk, UK. s. 91
- Al-Attar, A.M., 2005. Biochemical Effects of Short-Term Cadmium Exposure on the Freshwater Fish, *Oreochromis niloticus*. Journal of Biological Science, 5:260-265.
- Al-Bairuty, G.A., Shaw, B.J., Handy, R.D., Henry, T.B., 2013. Histopathological Effects of Waterborne Copper Nanoparticles and Copper Sulphate on the Organs of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology, 126:104-115.

- Almeida, E.A., Bainy, A.C.D., Loureiro, A.P.D.M., Martinez, G.R., Miyamoto, S., Onuki, J., Barbosa, L.F., Garcia, C.C.M., Prado, F.M., Ronsein, G.E., Sigolo, C.A., Brochini, C.B., Martins, A.M.G., De Medeiros, M.H.G., Mascio, P.D., 2007. Oxidative Stress in *Perna perna* and Other Bivalves as Indicators of Environmental Stress in the Brazilian Marine Environment: Antioxidants, Lipid Peroxidation and DNA Damage. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*. 146:588-600.
- Amaral, A.F., Alvarado, N., Marigomez, I., Cunha, R., Hylland, K., Soto, M., 2002. Autometallography and Metallothionein Immunohistochemistry in Hepatocytes Of Turbot (*Scophthalmus maximus* L.) After Exposure to Cadmium and Depuration Treatment. *Biomarkers*, 7(6):491-500.
- Amelia, M., Lincheneau, C., Silvi, S., Credi, A., 2012. Electrochemical Properties of CdSe and CdTe Quantum Dots. *Chemical Society Review*, 41:5728-5743.
- Artacho, P., Soto-Gamboa, M., Verdugo, C., Nespolo, R.F., 2007. Blood Biochemistry Reveals Malnutrition in Black-Necked Swans (*Cygnus melanocoryphus*) Living in a Conservation Priority Area. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 146:283-290.
- Asagba, S.A, Eriyamremu, G.E., Igberaese, M.E., 2008. Bioaccumulation of Cadmium and Its Biochemical Effect on Selected Tissues of The Catfish (*Clarias gariepinus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 34:61-69.
- Aschberger, K., Micheletti, C., Sokull-Kluttgen, B., Christensen, F.M., 2011. Analysis of Currently Available Data for Characterising the Risk of Engineered Nanomaterials to the Environment and Human Health Lessons Learned from Four Case Studies. *Environment International*, 37(6):1143-1156.

- Ateş, M., Dugo, M.A., Demir, V., Arslan, Z., Tchounwou, P.B., 2014. Effect of Copper Oxide Nanoparticles to Sheepshead Minnow (*Cyprinodon variegatus*) at Different Salinities. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 9(1):369-377.
- Bainy, A.C.D., Saito, E., Carvalho, P.S.M., Junqueira, V.B.C., 1996. Oxidative Stress in Gill, Erythrocytes, Liver and Kindney of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a Polluted Site. *Aquatic Toxicology*, 34:151-162.
- Basha, P.S., Rani, A.U., 2003. Cadmium-Induced Antioxidant Defense Mechanism in Freshwater Teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56:218-221.
- Bernet, D., Schmidt, H., Wahli, T., Burkhardt-Holm, P., 2001. Effluent from a Sewage Treatment Works Causes Changes in Serum Chemistry of Brown Trout (*Salmo trutta* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 48(2):140-147.
- Bhatt, I., Tripathi, B.N., 2011. Interaction of Engineered Nanoparticles with Various Components of the Environment and Possible Strategies for Their Risk Assessment. *Chemosphere*, 82(3):308-317.
- Blaise, C., Gagne, F., Ferard, J.F., 2008. Ecotoxicity of Selected Nanomaterials to Aquatic Organisms. *Environmental Toxicology*, 23:591-598.
- Bopp, S.K., Abicht, H.K., Knauer, K., 2008. Copper-Induced Oxidative Stress in Rainbow Trout Gill Cells. *Aquatic Toxicology* 86:197-204
- Bradford, M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for The Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.
- Brown, J.A., 1993. Endocrine Responses to Environmental Pollutants. In: Rankin, J.C., Jensen, F.B. (eds.) *Fish Ecophysiology*. Chapman and Hall, London, UK, s. 276-296.

- Buffet, P.E., Tankoua, O.F., Pan, J.F., Berhanu, D., Herrenknecht, C., Poirier, L., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Bérard, J.B., Risso, C., Guibbolini, M., Roméo, M., Reip, P., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C., 2011. Behavioural and Biochemical Responses of Two Marine Invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to Copper Oxide Nanoparticles. *Chemosphere*, 84:166-174.
- Bystrejska-Piotrowska, G., Golimowski, J., Urban, P.L., 2009. Nanoparticles: Their Potential Toxicity, Waste and Environmental Management. *Waste Management*, 29:2587-2595
- Carpene, E., Cortesi, P., Tacconi, S., Cattani, O., Isani, G., Serrazanetti, G.P., 1987. Cd-Metlothionein and Metal-Enzymes Interactions in the Goldfish *Carassius auratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 86(2):267-272.
- Chae, Y.J., Pham, C.H., Lee, J., Bae, E., Yi, J., Gu, M.B., 2009. Evaluation of The Toxic Impact of Silver Nanoparticles on Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology* 94:320-327.
- Chang, H., Jwo, C., Lo, C., Tsung, T., Kao, M., Lin, H., 2005. Rheology of CuO Nanoparticle Suspension Prepared by ASNSS. *Reviews on Advanced Material Science*, 10:128-132.
- Chappman, G.A., 1978. Effects of Continuous Zinc Exposure on Sockeye Salmon during Adult to Smolt Freshwater Residency. *Transactions of the American Fisheries Society*, 107(6):828-836.
- Chen, C.Y., Wooster, G.A., Bowser, P.R., 2004. Comparative Blood Chemistry and Histopathology of Tilapia Infected with *Vibrio vulnificus* or *Streptococcus iniae* or Exposed to Carbon Tetrachloride, Gentamicin or Copper Sulphate. *Aquaculture*, 239:421-443.
- Chen, C., Meng, H., Xing, G., Chen, C., Zhao, Y., Jia, G., 2006. Acute Toxicological Effects of Copper Nanoparticles In Vivo. *Toxicology Letters*, 163:109-20.

- Cicik, B., Erdem, C. 1992. Effects of Copper on the Quantitative Protein Changes in Liver and Muscle Tissues of *Tilapia nilotica*. *Biyokimya Dergisi*, 17(1):51-64.
- Cicik, B., 2003. Bakır-Çinko Etkileşiminin Sazan (*Cyprinus carpio*)'ın Karaciğer, Solungaç ve Kas Dokularındaki Metal Birikimi Üzerine Etkileri. *Ekoloji*, 12(48):32-36.
- Cicik, B., Ay, Ö., Karayakar, F., 2004. Effects of Lead and Cadmium Interactions on the Metal Accumulation in Tissue and Organs of the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72:141-148.
- Cicik, B., Engin, K., 2005. The Effects of Cadmium on Levels of Glucose in Serum and Glycogen Reserves in the Liver and Muscle Tissues of *Cyprinus carpio* (L., 1758). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 29:113-117
- Cioffi, N., Ditaranto, N., Torsi, L., Picca, R.A., De Giglio, E., Sabbatini, L., Novello, L., Tantillo, G., Bleve-Zacheo, T., Zambonin, P.G., 2005. Synthesis, Analytical Characterization and Bioactivity of Ag and Cu Nanoparticles Embedded in Poly-Vinyl-Methyl-Ketone Films. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382:1912-1918.
- Cortés, R., Teles, M., Trídico, R., Acerete, L., Tort, L., 2013. Effects of Cortisol Administered through Slow-Release Implants on Innate Immune Responses in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Genomics*, 2013:7.
- Cousins, R.J., 1985. Absorption, Transport and Hepatic Metabolism of Copper and Zinc: Special Reference to Metallothionein and Ceruloplasmin. *Physiological Reviews*, 65(2):238-309.
- Cowey, C.B., Walton, M.J., 1988. *Intermediary Metabolism in Fish Nutrition*. 2nd Edition. Academic Press, San Diego.

- Dange, A.D., 1986. Changes in Carbohydrate Metabolism in Tilapia *Oreochromis mossambicus*, During Short-term Exposure to Different Types of Pollutants. *Environmental Pollution*, 41:165-177.
- Daoud, A., Saud, A., Sudhir, K., Maqsood, A., Maqsood, A.S., 2012. Oxidative Stress and Genotoxic Effect of Zinc Oxide Nanoparticles in Freshwater Snail *Lymnaea luteola* L. *Aquatic Toxicology*, 124(125): 83-90.
- Dautremepuits, C., Paris-Palacios, S., Betoulle, S., 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.
- David, M., Ramesh, H., Patil, V.K., Marigoudar, S.R., Chebbi, S.G., 2010. Sodium Cyanide-Induced Modulations in the Activities of Some Oxidative Enzymes and Metabolites in the Fingerlings of *C. carpio* (L). *Toxicological and Environmental Chemistry*, 92:1841-1849.
- Dawood, M.A.O., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., El Basuni, M.F., Hossain, M.S., Nhu, T.H., Dossoua, S., Moss, A.S., 2016. Effects of Dietary Supplementation of *Lactobacillus rhamnosus* or/and *Lactococcus lactis* on the Growth, Gut Microbiota and Immune Responses of Red Sea Bream, *Pagrus major*. *Fish & Shellfish Immunology*, 49:275-285
- De, T.K., De, M., Das, S., Ray, R., Ghosh, P.B., 2010. Level of Heavy Metals in Some Edible Marine Fishes of Mangrove Dominated Tropical Estuarine Areas of Hooghly River, North East Coast of Bay of Bengal, India. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 85:385-390.
- De Boeck, G., Van Der Ven, K., Meeus, W., Blust, R., 2007. Sublethal Copper Exposure Induces Respiratory Stress in Common and Gibel Carp but not in Rainbow Trout. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 144:380-390.

- De Conto Cinier, C., Ramel, M.P., Faure, R., Garin, D., Bouvet, Y., 1999. Kinetics of Cd Accumulation and Elimination in Carp *Cyprinus carpio* Tissues. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 122:345-352.
- Deb, S.C., Fukushima, T., 1999. Metals in Aquatic Ecosystems Mechanisms of Uptake, Accumulation and Release Ecotoxicological. International Journal of Environmental Science and Technology, 56(3):385-418.
- Dethloff, G.M., Schlenk, D., Hamm, J.T., Bailey, H.C., 1999. Alterations in Physiological Parameters of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) with Exposure to Copper and Copper/Zinc Mixtures. Ecotoxicology and Environmental Safety, 42:253-264.
- Dhas, N.A., Raj, C.P., Gedanken, A., 1998. Synthesis, Characterization, and Properties of Metallic Copper Nanoparticles. Chemical Materials, 10:1446-1452.
- Di Giulio, R.T., Benson, W.H., Sanders, B.M., Van Held, P.A., 1995. Biochemical Mechanisms: Metabolism, Adaptation and Toxicity. In: Rand, G.M. (Ed). Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment. Taylor and Francis, 523-561.
- Doyotte, A., Cossu, C., Jacquin, M.C., Babut, M., 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.
- Dube, P.N., Shwetha, A., Hosetti, B.B., 2014. Impact of Copper Cyanide on the Key Metabolic Enzymes of Freshwater Fish *Catla catla* (Hamilton). Biotechnology in Animal Husbandry, 30:499-508.
- Duran, S., Tunçsoy, M., Yesilbudak, B., Ay, O., Cicik, B., Erdem, C., 2015. Metal Accumulation in Various Tissues of *Clarias gariepinus* Exposed to Copper, Zinc, Cadmium and Lead Singly and in Mixture. Fresenius Environmental Bulletin, 24(12C):4738-4742.

- Dutta, H.M., Haghighi, A.Z., 1986. Methylmercuric Chloride and Serum Cholesterol Levels in Blugill *Lepomis macrochirus*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 36:181-185.
- El Basuini, M.F., El-Halis, A.M., Dawood, M.A.O., Abou-Zeid, A.S., El-Damrawy, S.Z., Khalafalla, M.M.E., Koshio, S., Ishikawa, M., Dossou, S., 2016. Effects of Different Levels of Dietary Copper Nanoparticles and Copper Sulphate on Growth Performance, Blood Biochemical Profiles, Antioxidant Status and Immune Response of Red Sea Bream (*Pagrus major*). Aquaculture, 455:32-40.
- Erdem, C., Kargin, F., 1990. Farklı Ortam Derişimlerinde *Tilapia nilotica* (L.)'nın Doku ve Organlarında Bakır Birikimi. Doğa-Turkish Journal of Zoology, 14:173-178.
- Erdem, C., Kargin, F., 1992. *Cyprinus carpio* ile *Tilapia nilotica*'nın Karaciğer, Dalak, Barsak, Solungaç ve Kas Dokularındaki Bakır Birikiminin Karşılaştırmalı Olarak Araştırılması. Biyokimya Dergisi, 7(1):13-27.
- Fabrega, J., Luoma, S.N., Tyler, C.R., Galloway, T.M., Lead, J.R., 2011. Silver Nanoparticles: Behaviour and Effects in the Aquatic Environment. Environmental International, 37(2):517-531.
- Fahmy, B., Cormier, S.A., 2009. Copper Oxide Nanoparticles Induce Oxidative Stress and Cytotoxicity in Airway Epithelial Cells. Toxicology In Vitro, 23:1365-1371.
- Farre, M., Gajda-Schranz, K., Kantiani, L., Barcelo, D., 2009. Ecotoxicity and Analysis of Nanomaterials in the Aquatic Environment. Analytical And Bioanalytical Chemistry, 393:81-95.
- Federici, G., Shaw, B.J., Handy, R.D., 2007. Toxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill Injury, Oxidative Stress, and Other Physiological Effects. Aquatic Toxicology, 84(4):415-430.

- Ferreira, M., Morades-Ferreira, P., Reis-Henriques, M.A., 2005. Oxidative Stress Biomarkers in Two Resident Species, Mullet (*Mugil cephalus*) and Flounder (*Platichthys flesus*), from a Polluted Site in River Douro Estuary, Portugal. *Aquatic Toxicology*, 71:39-48.
- Fırat, Ö., Kargın, F., 2010a. Biochemical Alterations Induced by Zn and Cd Individually or in Combination in the Serum of *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36:647-653.
- Fırat, Ö., Kargın, F., 2010b. Individual and Combined Effects of Heavy Metals on Serum Biochemistry of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58:151-157.
- Fu, P.P., Xia, Q., Hwang, H.M., Ray, P.C., Yu, H., 2014. Mechanisms of Nanotoxicity: Generation of Reactive Oxygen Species. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22:64-75.
- Galvez, F., Nebb, N., Hogstrand C., Wood, C.M., 1998. Zinc Binding to the Gills of Rainbow Trout: The Effect of Long-Term Exposure to Sublethal Zinc. *Journal of Fish Biology*, 52:1089-1104.
- Gioda, C.R., Lissner, L.A., Pretto, A., Rocha, J.B.T., Schetinger, M.R.C., Neto, J.R., Morsch, V.M., Loro, V.L., 2007. Exposure to Sublethal Concentrations of Zn (II) and Cu (II) Changes Biochemical Parameters in *Leporinus obtusidens*. *Chemosphere* 69:170-175.
- Gomes, T., Pinheiro, J.P., Cancio, I., Pereira, C.G., Cardoso, C., Bebianno, M.J. 2011. Effects of Copper Nanoparticles Exposure in the Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Sciences and Technology*, 45:9356-9362.
- Gomes, T., Pereira, C.G., Cardoso, C., Pinheiro, J.P., Cancio, I., Bebianno, M.J., 2012. Accumulation and Toxicity of Copper Oxide Nanoparticles in the Digestive Gland of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 118(119):72-79.

- Gomes, T., Pereira, C.G., Cardoso, C., Bebianno, M.J., 2013. Differential Protein Expression in Mussels *Mytilus galloprovincialis* Exposed to Nano and Ionic Ag. *Aquatic Toxicology*, 136(137):79-90.
- Gonzalez-Reya, M., Mattos, J.J., Piazza, C.E., Bainy, A.C.D., Bebianno, M.J., 2014. Effects of Active Pharmaceutical Ingredients Mixtures in mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 153:12-26.
- Greenwald, R.A., 1985. Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. CRC Press, Boca Raton, FL, s. 447.
- Griffitt, R.J., Weil, R., Hyndman, K.A., Denslow, N.D., Powers, K., Taylor, D., Barber, D.S., 2007. Exposure to Copper Nanoparticles Causes Gill Injury and Acute Lethality in Zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science & Technology*, 41:8178-8186.
- Griffitt, R.J., Luo, J., Gao, J., Bonzongo, J.C., Barber, D.S., 2008. Effects of Particle Composition and Species on Toxicity of Metallic Nanomaterials in Aquatic Organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27:1972-1978.
- Griffitt, R.J., Hyndman, K., Denslow, N.D., Barber, D.S., 2009. Comparison of Molecular and Histological Changes in Zebrafish Gills Exposed to Metallic Nanoparticles. *Toxicological Sciences*, 107(2):404-415.
- Grosell, M.H., Hogstrand, C., Wood, C.M., 1997. Cu Uptake and Turnover in Both Cu-Acclimated and Non-Acclimated Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 38:257-276.
- Grosell, M., Wood, C.M., Walsh, P.J., 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.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. New York, Oxford Univ. Press, s. 936.

- Handy, R.D., 2003. Chronic Effects of Copper Exposure Versus Endocrine Toxicity: Two Sides of the Same Toxicological Process. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 135(A):25-38.
- Hao, L., Wang, Z., Xing, B., 2009. Effect of Sub-Acute Exposure to TiO₂ Nanoparticles on Oxidative Stress and Histopathological Changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Environmental Science*, 21:1459-1466.
- Hao, L., Chen, L., Hao, J., Zhong, N., 2013. Bioaccumulation and Sub-Acute Toxicity of Zinc Oxide Nanoparticles in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*): A Comparative Study with Its Bulk Counterparts. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 91:52-60.
- Harman, T.C., Taylor, P.J., Walsh, M.P., LaForge, B.E., 2002. Quantum Dot Super Lattice Thermoelectric Materials and Devices. *Science* 297:2229-2232.
- Heath, A.G., 1995. *Water Pollution and Fish Physiology*. CRC press, Florida, USA, s. 245.
- Heydarnejad, M.S., Khosravian-Hemami, M., Nematollahi, A., Rahnama, S., 2013. Effects of Copper at Sublethal Concentrations on Growth and Biochemical Parameters in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Review of Hydrobiology*, 98:71-79.
- Hollis, L., McGeer, J.C., McDonald, D.G., Wood, C.M., 1999. Cadmium Accumulation, Gill Cd Binding, Acclimation and Physiological Effects during Long Term Sublethal Cd Exposure in Rainbow Trout. *Aquatic Toxicology*, 46:101-119.
- Hollis, L., Hogstrand, C., Wood, C.M., 2001. Tissue-Specific Cadmium Accumulation, Metallothionein Induction, and Tissue Zinc and Copper Levels During Chronic Sublethal Cd Exposure in Juvenil Rainbow Trout. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 41:468-474.

- Hoseini, S.M., Hosseini, S.A., Soudagar, M., 2012. Dietary Tryptophan Changes Serum Stress Markers, Enzyme Activity, and Ions Concentration of Wild Common Carp *Cyprinus carpio* Exposed to Ambient Copper. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(5):1419-1426.
- Hoseini, S.M., Hedayati, A., Taheri Mirghaed, A., Ghelichpour, M., 2016. Toxic Effects of Copper Sulfate and Copper Nanoparticles on Minerals, Enzymes, Thyroid Hormones and Protein Fractions of Plasma and Histopathology in Common Carp *Cyprinus carpio*. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 68(9):493-503.
- Hu, H., 2000. Exposure to Metals. *Occupational and Environmental Medicine*, 27: 983-996.
- Iwama, G.K., Vijayan, M.M., Forsyth, R.B., Ackerman, P.A., 1999. Heat Shock Proteins and Physiological in Fish. *American Zoologist*, 39:901-909.
- Janero, D.R., 1990. Malondialdehyde and Thiobarbituric Acid-Reactivity as Diagnostic Indices of Lipid Peroxidation and Peroxidative Tissue Injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 9:515-540.
- Javed, M., Usmani, N., 2013. Assessment of Heavy Metal (Cu, Ni, Fe, Co, Mn, Cr, Zn) Pollution in Effluent Dominated Rivulet Water and Their Effect on Glycogen Metabolism and Histology of *Mastacembelus armatus*. *Springer Plus*, 2:390.
- Jiraungkoorskul, W., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Shaphong, S., Vichasri-Grams, S., Pokethitiyook, P., 2003. Biochemical and Histopathological Effects of Glyphosate Herbicide on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Toxicology*, 18:260-267.
- Johari, S.A., Kalbassi, M.R., Yu, I.J., Lee, J.H., 2015. Chronic Effect of Waterborne Silver Nanoparticles on Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Histopathology and Bioaccumulation. *Comparative Clinical Pathology*, 5:995-1007.

- Jorgensen, S.W., 2010. A Derivative of Encyclopedia of Ecology. In: Ecotoxicology. Academic Press, London, s. 390.
- Kamunde, C., MacPhail, R., 2011. Metal–metal Interactions of Dietary Cadmium, Copper and Zinc in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 74:658-667.
- Karan, V., Vitorović, S., Tutundžić, V., Poleksić, V., 1998. Functional Enzymes Activity and Gill Histology of Carp After Copper Sulfate Exposure and Recovery. Ecotoxicology and Environmental Safety, 40(1):49-55.
- Kargın, F., Erdem, C., 1991. *Cyprinus carpio*'da Bakırın Karaciğer, Dalak, Mide, Bağırsak, Solungaç ve Kas Dokularındaki Birikimi. Turkish Journal of Zoology, 15:306-314.
- Kargın, F., 1996. Seasonal Changes in Levels of Heavy Metals in Tissues of *Mullus barbatus* and *Sparus aurata* Collected From Iskenderun Gulf (Turkey). Water, Air and Soil Pollution, 90:557-562.
- Karlsson, H.L., Cronholm, P., Gustafsson, J., Moller, L., 2008. Copper Oxide Nanoparticles are Highly Toxic: A Comparison between Metal Oxide Nanoparticles and Carbon Nanotubes. Chemical Research in Toxicology, 21:1726-1732.
- Kasemets, K., Ivask, A., Dubourguier, H.C., Kahru, A., 2009. Toxicity of Nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Toxicology In Vitro, 23:1116-1122.
- Khabbazi, M., Harsij, M., Hedayati, A.K., Gholipour, H., Gerami, M.H., Ghafari Farsani, H., 2015. Effect of CuO Nanoparticles on Some Hematological Indices of Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* and Their Potential Toxicity. Nanomedicine Journal, 2:67-73.
- Klaine, S.J., Alvarez, P.J.J., Batley, G.E., Fernandes, T.F., Handy, R.D., Lyon, D.Y., Mahendra, S., Mclaughlin, M.J., Lead, J.R. 2008. Nanomaterials in The Environment: Behavior, Fate, Bioavailability and Effects. Environmental Toxicology and Chemistry, 27(9):1825-1851.

- Kong, X., Jiang, H., Wang, S., Wu, X., Fei, W., Li, L., Nie, G., Li, X., 2013. Effects of Copper Exposure on The Hatching Status and Antioxidant Defense at Different Develop-Mental Stages of Embryos and Larvae of Goldfish *Carassius auratus*. *Chemosphere*, 92:1458-1464.
- Kosai, P., Jiraungkoorskul, W., Thammasunthorn, T., Jiraungkoorskul, K., 2009. Reduction of Copper-Induced Histopathological Alterations by Calcium Exposure in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Toxicology Mechanisms and Methods*, 19(6-7):461-467.
- Kruger, T., 2002. Effects of Zinc, Copper and Cadmium on *Oreochromis mossambicus* Free-Embryos and Randomly Selected Mosquito Larvae as Biological Indicators during Acute Toxicity Testing. MSc Thesis, Rand Afrikaans University, South Africa, 4:55-115.
- Kumar, O., Sugendran, K., Vijayaraghavan, R., 2003. Oxidative Stress Associated Hepatic and Renal Toxicity Induced by Ricin in Mice. *Toxicology* 41:333-338.
- Kuşatan, Z., Cıçık, B., 2004. *Clarias lazera* (Valenciennes, 1840)'da Kadmiyum'un Solungaç, Karaciğer, Böbrek, Dalak ve Kas Dokularındaki Birikimi. *Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 2(12):59-66.
- Lakani, B.F., Meshkini, S., Sadati, Y.M.A., Falahatkar, B., 2016. Bioaccumulation of Copper Nanoparticle in Gill, Liver, Intestine and Muscle of Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii*) Juvenile. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 14(2):105-115.
- Lawrence, R.A., Burk, R.F., 1976. Glutathione Peroxidase Activity in Selenium Deficient Rat Liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 71(4):952-958.
- Lee, Y., Choi, J.R., Lee, K.J., Stott, N.E., Kim, D., 2008. Large-Scale Synthesis of Copper Nanoparticles by Chemically Controlled Reduction for Applications of Inkjet-Printed Electronics. *Nanotechnology*, 19:7.

- Lee, B., Duong, C. N., Cho, J., Lee, J., Kim, K., Seo, Y., Kim, P., Choi, K., Yoon, J., 2012. Toxicity of Citrate-Capped Silver Nanoparticles in Common Carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Biomedicine and Biotechnology, 262670:1-14.
- Lemus, M.J., Chung, K.S., 1999. Effect of Temperature on Copper Toxicity, Accumulation and Purification in Tropical Fish Juveniles *Petenia kraussii*. Caribbean Journal of Science, 35:64-69.
- Lesser, M.P., 2006. Oxidative Stress in Marine Environments: Biochemistry and Physiology Ecology. Annual Reviews in Physiology. 68:253-278.
- Levesque, H.M., Moon, T.W., Campbell, P.G.C., Hontela, A., 2002. Seasonal Variation in Carbohydrate and Lipid Metabolism of Yellow Perch (*Perca flavescens*) Chronically Exposed to Metals in the Field. Aquatic Toxicology 60:257-267.
- Li, Y., Liang, J., Tao, Z., Chen, J., 2007. CuO Particles and Plates: Synthesis and Gas-Sensor Applications. Materials Research Bulletin. 43:2380-2385.
- Li, H., Zhang, J., Wang, T., Luo, W., Zhou, Q., Jiang, G., 2008. Elemental Selenium Particles at Nano-Size (Nano-Se) are More Toxic to Medaka (*Oryzias latipes*) as a Consequence of Hyperaccumulation of Selenium: a Comparison with Sodium Selenite. Aquatic Toxicology, 89:251-256.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-Stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. Marine Pollution Bulletin, 42:656-666.
- Luoma, S.N., Rainbow, P.S., 2005. Why Is Metal Bioaccumulation So Variable? Biodynamics as a Unifying Concept. Environmental Science and Technology, 39:1921-1931.
- Ma, L.L., Liu, J., Li, N., Wang, J., Duan, Y.M., Yan, J.Y., Liu, H.T., Wang, H., Hong, F.S., 2010. Oxidative Stress in the Brain of Mice Caused by Translocated Nanoparticulate TiO₂ Delivered to the Abdominal Cavity. Biomaterials, 31:99-105.

- Matés, J.M., 2000. Effects of Antioxidant Enzymes in the Molecular Control of Reactive Oxygen Species Toxicology. *Toxicology*, 153:83-104.
- Mansouri, B., Maleki, A., Davari, B., Johari, S.A., Shahmoradi, B., Mohammadi, E., Shahsavari, S., 2016. Histopathological Effects Following Short-Term Coexposure of *Cyprinus carpio* to Nanoparticles of TiO₂ and CuO. *Environmental Monitoring and Assessment*, 188(575):5-12.
- Mazandarini, M., Hoseini, S.M., 2015. Anaemia and Plasma Lipid Profile in Common Carp (*Cyprinus carpio*) Exposed to Ambient Copper Sulphate and Nano-Scale Copper Oxide. *Aquaculture Research*, 1-9.
- Mazon, A.F., Monteiro, E.A.S, Pinheiro, G.H.D., Fernandes, M.N., 2002. Hematological and Physiological Changes Induced by Short-Term Exposure to Copper in the Freshwater Fish *Prochilodus scrofa*. *Brazilian Journal of Biology*, 62:621-631.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide Dismutase: an Enzymic Function for Erythrocuprein (Hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244(22):6049-6055.
- McDonald, S.A., Konstantatos, G., Zhang, S.G., Cyr, P.W., Klem, E.J., Levina, L., Saegent, E.H., 2005. Solution-Processed PbS Quantum Dot Infrared Photodetectors and Photovoltaics. *Nature Materials*, 4:138-142.
- McGeer, J.C., Szebedinszky C., McDonald, D.G., Wood, C.M., 2000. Effect of Chronic Sublethal Exposure to Waterborne Cu, Cd or Zn in Rainbow trout 2: Tissue Specific Metal Accumulation. *Aquatic Toxicology*, 50:245-256.
- Muramoto, S., 1983. Elimination of Copper from Cu-Contaminated Fish by Long-Term Exposure to EDTA and freshwater. *Journal of Environmental Science Health*, 18A(3):455-461.
- Nemcsok, J., Hughes, G.M., 1988. The Effect of Copper Sulphate on Some Biochemical Parameters of Rainbow Trout. *Environmental Pollution*, 49:77-85.

- Nel, A.E., Madler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E.M., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V., Thompson, M., 2009. Understanding Biophysicochemical Interactions at the Nanobio Interface. *Nature Materials*, 8:543-557.
- Nussey, G., 1998. Metal Ecotoxicology of the Upper Olifants River at Selected Localities and the Effect of Copper and Zinc on Fish Blood Physiology. PhD-thesis, Rand Afrikaans University, South Africa, s. 158.
- Oliveira-Filho, E.C., Lopes, R.M., Paumgarten, F.J.R. 2004. Comparative Study on the Susceptibility of Freshwater Species to Copper-Based Pesticides. *Chemosphere*, 56:369-374.
- Ostaszewska, T., Chojnacki, M., Kamaszewski, M., Sawosz-Chwalibóg, E., 2015. Histopathological Effects of Silver and Copper Nanoparticles on the Epidermis, Gills, and Liver of Siberian Sturgeon. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(2):1621-1633.
- Öner, M., Atli, G., Canli, M., 2008. Changes in Serum Parameters of Freshwater Fish *Oreochromis niloticus* Following Prolonged Metal (Ag, Cd, Cr, Cu, Zn) Exposures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2:360-366.
- Pelgrom, S.M.G.J., Lock, R.A. C., Balm, P.H.M., Wendelaar Bonga, S.E., 1995. Integrated Physiological Response of Tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to Sublethal Copper Exposure. *Aquatic Toxicology*, 32:303-320.
- Perkins, E.J., Griffin, B., Hobbs, M., Gollon, J., Wolford, L., Schlenk, D., 1997. Sexual Differences in Mortality and Sublethal Stress in Channel Catfish Following a 10 Week Exposure to Copper Sulfate. *Aquatic Toxicology*, 37: 327-339.
- Prashanth, M.S., 2012. Acute Toxicity, Behavioral and Nitrogen Metabolism Changes of Sodium Cyanide Affected on Tissues of *Tilapia mossambica* (Peters). *Drug and Chemical Toxicology*. 35:178-183.

- Pretto, A., Loro, V.L., Silva, V.M.M., Salbego, J., de Menezes, C.C., Souza, C.F., Gioda, C.R., Baldisserotto, B., 2014. Exposure to Sublethal Concentrations of Copper Changes Biochemistry Parameters in Silver Catfish, *Rhamdia quelen*, (Quoy & Gaimard, 1824). Bulletin Environmental Contamination and Toxicology, 392-399.
- Prousek, J., 2007. Fenton Chemistry in Biology and Medicine. Pure and Applied Chemistry, 79:2325-2338.
- Ramesh, M., Senthil Kumaran, S., Kavith, C., Saravanan, M., Mustafa, A., 2007. Primary Stress Responses of Common Carp, *Cyprinus carpio* Exposed to Copper Toxicity. Acta Ichthyologica et Piscatoria, 37:81-85.
- Ramsden, C.S., Smith, T.J., Shaw, B.S., Handy, R.D. 2009. Dietary Exposure to Titanium Dioxide Nanoparticles in Rainbow Trout, (*Oncorhynchus mykiss*): No Effect on Growth, But Subtle Biochemical Disturbances in the Brain. Ecotoxicology, 18:939-951.
- Ren, G., Hu, D., Cheng, E.W.C., Vargas-Reus, M.A., Reip, P., Allaker, R.P., 2008. Characterisation of Copper Oxide Nanoparticles for Antimicrobial Applications. International Journal of Antimicrobial Agents, 33:587-590.
- Ringwood, A.H., McCarthy, M., Bates, T.C., Carroll, D.L., 2010. The Effects of Silver Nanoparticles on Oyster Embryos. Marine Environmental Research, 69(1):549-551.
- Sabatini, S.E., Juarez, A.B., Eppis, M.R., Bianchi, L., Luquet, C.M., Molina, M.C., 2009. Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Two Green Microalgae Exposed to Copper. Ecotoxicology and Environment Safety, 72:1200-1206.
- Sakai, N., Matsui, Y., Nakayama, A., Tsuda, A., Yoneda, M., 2011. Functional-Dependent and Size-Dependent Uptake of Nanoparticles in PC12. Journal of Physics, 304:1.

- Sanchez, W., Palluel, O., Meunier, L., Coquery, M., Porcher, J.M., Ait-Aissa, S., 2005. Copper-Induced Oxidative Stress in Three-Spined Stickleback: Relationship with Hepatic Metal Levels. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 19:177-183.
- Schaperclaus, W., Kulow, H., Schreckenbach, K., 1992. In: *Fish Diseases*, vol. 1. Rotterdam, Septicemia of Fish, Fish Disease Leaflet, 68:1-24.
- Schjolden, J., Sorensen, J., Nilsson, G.E., Poleo, A.B.S., 2007. The Toxicity of Copper to Crucian Carp (*Carassius carassius*) in Soft Water. *Science of the Total Environment*, 384:239-251.
- Schrand, A.M., Rahman, M.F., Hussain, S.M., Schlager, J.J., Smith, D.A., Syed, A.F., 2010. Metal-based Nanoparticles and Their Toxicity Assessment. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2(5):544-568.
- Scown, T.M., Van Aerle, R., Johnston, B.D., Cumberland, S., Lead, J.R., Owen, R., Tyler, C.R., 2009. High Doses of Intravenously Administered Titanium Dioxide Nanoparticles Accumulate in the Kidneys of Rainbow Trout but with no Observable Impairment of Renal Function. *Toxicological Sciences* 109:372-380.
- Shaheen, T., Akhtar, T., 2012. Assessment of Chromium Toxicity in *Cyprinus carpio* through Hematological and Biochemical Blood Markers. *Turkish Journal of Zoology*, 36:682-690.
- Shaw, B.J., Handy, R.D., 2011. Physiological Effects of Nanoparticles On Fish: A Comparison of Nanometals Versus Metal Ions. *Environment International*, 37(6):1083-1097.
- Shaw, B.J., Al-Baurity, G., Handy, R.D., 2012. Effects of Waterborne Copper Nanoparticles and Copper Sulphate on Rainbow Trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Physiology and Accumulation. *Aquatic Toxicology*, 116(117):90-101.

- Singh, H.S., Reddy, T.V., 1990. Effect of Copper Sulfate on Hematology, Blood Chemistry, and Hepato-somatic Index of an Indian Catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch), and Its Recovery. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 20:30-35.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1995. *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*, 3rd edition. W.H. Freeman and Co., New York, s. 887
- Tang, F., Li, L., Chen, D., 2012. Mesoporous Silica Nanoparticles: Synthesis, Biocompatibility and Drug Delivery. *Advance Materials*, 24:1504-1534.
- Termini, J., 2000. Hydroperoxide-Induced DNA Damage and Mutations. *Mutation Research*, 450:107-124.
- Tunçsoy, M., Erdem, C., 2014. Accumulation of Copper, Zinc and Cadmium in Liver, Gill and Muscle Tissues of *Oreochromis niloticus* Exposed to these Metals Separately and in Mixture. *Fresenius Environmental Bulletin*, 23(5):1143-1149.
- Tunçsoy, M., Duran, S., Yesilbudak, B., Ay, O., Cici, B., Erdem, C., 2016. Short Term Effects of Zinc on some Sera Biochemical Parameters and on Tissue Accumulation of *Clarias gariepinus*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 25(2):658-664.
- Unfried, K., Albrecht, C., Klotz, L., Mikecz, A.V., Grether-Beck, S., Schins, R.P.F., 2007. Cellular Responses to Nanoparticles: Target Structures and Mechanisms. *Nanotoxicology*, 1(1):52-71.
- Vaglio, A., Landriscina, C., 1999. Changes in Liver Enzyme Activity in The Teleost *Sparus aurata* in Response to Cadmium Intoxication. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 43:111-116.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullos, M., 2006. Molecular Biomarkers of Oxidative Stress in Aquatic Organisms in Relation to Toxic Environmental Pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64:178-189.

- Vale, G., Mehennaoui, K., Cambier, S., Libralato, G., Jomini, S., Domingos, R.F., 2016. Manufactured Nanoparticles in the Aquatic Environment- Biochemical Responses on Freshwater Organisms: A Critical Overview. *Aquatic Toxicology*, 170:162-174.
- Van Heerden, D., Tiedt, L., Vosloo, A., 2004. Gill Damage in *Oreochromis mossambicus* and *Tilapia sparrmanii* after Short-Term Copper Exposure. *International Congress Series*, 1275:195-200.
- Viarengo, A., 1985. Biochemical Effects of Trace Metals. *Marine Pollution Bulletin*, 16(4):153-158.
- Villarreal, F.D., Das, G.K., Abid, A., Kennedy, M., Kultz, D., 2014. Sublethal Effects of CuO Nanoparticles on Mozambique Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) are Modulated by Environmental Salinity. *Plos One*, 9(2):1-15.
- Vosyliene, M.Z., 1999. The Effect of Heavy Metals on Hematological Indices. *Acta Zoologica Litvanica Hydrobiologia*, 9:76-82.
- Vutukuru, S.S., Suma, C., Madhavi, K.R., Pauleena, J.S., Rao, J.V., Anjaneyulu, Y., 2005. Studies on The Development of Potential Biomarkers for Rapid Assessment of Copper Toxicity to Freshwater Fish using *Esomus danricus* as Model. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2:63-73.
- Wang, W.X., 2011. Incorporating Exposure into Aquatic Toxicological Studies: An Imperative. *Aquatic Toxicology*, 105(3-4):9-15.
- Wang, T., Long, X., Cheng, Y., Liu, Z., Yan, S., 2014. The Potential Toxicity of Copper Nanoparticles and Copper Sulphate on Juvenile *Epinephelus coioides*. *Aquatic Toxicology*, 152:96-104.
- Wang, T., Long, X., Cheng, Y., Liu, Z., Yan, S., 2015. A Comparison Effect of Copper Nanoparticles versus Copper Sulphate on Juvenile *Epinephelus coioides*: Growth Parameters, Digestive Enzymes, Body Composition, and Histology as Biomarkers. *International Journal of Genomics*, 215:1-10.

- Witeska, M., Jezierska, B., 2003. The Effects of Environmental Factors on Metal Toxicity to Fish. *Fresenius Environmental Bulletin*, 12(8):824-829.
- Wu, R.S., Pollino, C.A., Au, D.W., Zheng, D.W., Yuen, B., Lam, P.K., 2003. Evaluation of Biomarkers of Exposure and Effect in Juvenile Areolated Grouper (*Epinephelus areolatus*) on Food-Borne Exposure to Benzo-a-Pyrene. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22:68-73.
- Xiong, D., Fang, T., Yu, L., Sima, X., Zhu, W., 2011. Effects of Nano-Scale TiO₂, ZnO and Their Bulk Counterparts on Zebrafish: Acute Toxicity, Oxidative Stress and Oxidative Damage. *Science of the Total Environment*, 409:1444-1452.
- Yang, J.L., Chen, H.C., 2003. Effects of Gallium on Common Carp (*Cyprinus carpio*): Acute Test, Serum Biochemistry, and Erythrocyte Morphology. *Chemosphere*, 53:877-882.
- Yi, Y.J., Zhang, S.H., 2012. The Relationships Between Fish Heavy Metal Concentrations and Fish Size in the Upper and Middle Reach of Yangtze River. *Procedia Environmental Sciences*, 13:1699-1707.
- Yousef, M.I., Awad, T.I., Elhag, F.A., Khaled, F.A., 2007. Study of The Protective Effect of Ascorbic Acid against The Toxicity of Stannous Chloride on Oxidative Damage, Antioxidant Enzymes and Biochemical Parameters in Rabbits. *Toxicology*, 235:194-202.
- Zaghloul, K.H., Omar, W.A., Abo-Hegab, S., 2006. Toxicity Specificity of Copper in Some Freshwater Fishes. *Egyptian Journal of Zoology*, 47:383-400.
- Zhao, J., Wang, Z., Liu, X., Xie, X., Zhang, K., Xing, B., 2011. Distribution of CuO Nanoparticles in Juvenil Carp (*Cyprinus carpio*) and Their Potential Toxicity. *Journal of Hazardous Materials*, 197:304-310.
- Zhu, B., Wu, Z., Li, J., Wang, G., 2011. Single and Joint Action Toxicity of Heavy Metals on Early Developmental Stages of Chinese Rare Minnow (*Gabiocypris rarus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74:2193-2202.

ÖZGEÇMİŞ

17.07.1984 yılında Adana’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Adana’da Şükran Çobanoğlu İlköğretim Okulunda, lise öğrenimini Adana’da Borsa Lisesinde tamamladı. Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde 2007 yılında lisans öğrenimini tamamlayarak, 2008 yılında Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı ve 2011 yılında tamamladı. 2012 yılı şubat ayında aynı anabilim dalında doktora başladı. 2013 yılında Portekiz, Algarve University, Centre of Marine and Environmental Research (CIMA)’da bir projeye katılarak metal oksit nanopartikülleri üzerine araştırmalar yaptı.