

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

Kadir KOCALAR

**BALIK (*Oreochromis niloticus*) ANTİOKSİDAN SİSTEMİNİN
Cr⁺⁶, Ni⁺², Zn⁺² ve Hg⁺² ETKİSİNE VERDİKLERİ TEPKİLERİN
BELİRLENMESİNDE SU SERTLİĞİNİN ÖNEMİ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA-2023

ÖZ

DOKTORA TEZİ

**BALIK (*Oreochromis niloticus*) ANTİOKSİDAN SİSTEMİNİN Cr^{+6} ,
 Ni^{+2} , Zn^{+2} ve Hg^{+2} ETKİSİNE VERDİKLERİ TEPKİLERİN
BELİRLENMESİNDE SU SERTLİĞİNİN ÖNEMİ**

Kadir KOCALAR

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

Danışman : Prof. Dr. Mustafa CANLI
Yıl: 2023, Sayfa: 139
Jüri : Prof. Dr. Mustafa CANLI
: Prof. Dr. Fatma ÇEVİK
: Prof. Dr. Mustafa COŞKUN
: Doç. Dr. Tamer KAYIŞ
: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet SULANÇ

Bu çalışmada tatlısu balığı *Oreochromis niloticus* farklı sertlik düzeylerine (30, 60 ve 120 mg Ca^{2+}/L) sahip sularda krom, nikel, çinko ve cıvanın etkilerine akut (3 gün) ve kronik (30 gün) olarak bırakıldıktan sonra, antioksidan sisteminin verdiği tepkiler incelenmiştir. Bu amaç için, metallerin subletal derişimlerine maruz kalan balıkların karaciğerlerinde antioksidan sisteme özgün enzimatik ve enzimatik olmayan biyobelirteçlerin tepkileri ölçülmüştür. Antioksidan sistem parametreleri farklı sertlik düzeylerinde hem akut, hem de kronik deneylerde anlamlı değışimler ($P<0.05$) göstermiştir. Her iki deney sürecinde, en fazla etkilenen enzimler glutatyon-S-transferaz (GST) ve glutatyon peroksidaz (GPx) olurken, en az etkilenen enzimler katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) olmuştur. Ayrıca, farklı deneylerde enzimlerin etkilenme şekli de fark göstermiştir. CAT ve SOD aktivitelerinde anlamlı artışlar olurken, GPx ve GST aktivitelerinde anlamlı azalmalar görülmüştür. Enzimatik olmayan glutatyon (GSH) düzeyleri ise akut deneylerde azalma gösterirken, kronik deneylerde artışlar göstermiştir. Sonuçlar farklı su sertliklerinde metal etkisinde kalan balıkların antioksidan sistemlerinin verdiği tepkilerin de farklı olduğunu göstermiştir. Akut deneylerde, orta sertlik değeriindeki sularda en az etki görülürken, kronik deneylerde bunun tersi olmuş olup, en fazla etki orta sertlik değeriindeki sularda görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Tatlısu, Balık, Karaciğer, Metal, Kalsiyum, Antioksidan

ABSTRACT

PhD THESIS

**THE IMPORTANCE of WATER HARDNESS in DETERMINING
THE REACTIONS of the FISH ((*Oreochromis niloticus*)
ANTIOXIDANT SYSTEM to the EFFECT of Cr⁺⁶, Ni⁺², Zn⁺² and Hg⁺²**

Kadir KOCALAR

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

Supervisor : Prof. Dr. Mustafa CANLI
Year: 2023, Page: 139
Jury : Prof. Dr. Mustafa CANLI
: Prof. Dr. Fatma Çevik
: Prof. Dr. Mustafa COŞKUN
: Assoc. Prof. Dr. Tamer KAYIŞ
: Assist. Prof. Dr. Mehmet SULANÇ

In this study, the responses of the antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* were investigated following exposure to chromium, nickel, zinc and mercury in differing hardness (30, 60 and 120 mg Ca²⁺/L) in acute (3 days) and chronic (30 days) durations. For this purpose, the responses of enzymatic and non-enzymatic biomarkers belonging to the antioxidant system were measured in the livers of fish exposed to sublethal concentrations of metals. Antioxidant system parameters showed significant changes (P<0.05) in both acute and chronic experiments in differing hardness. The enzymes that were most affected in both exposure durations were glutathione-S-transferase (GST) and glutathione peroxidase (GPx), while the least affected enzymes were catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD). Furthermore, the responses of the enzymes also varied among different exposure types. There were significant increases in CAT and SOD activities, while there were significant decreases in GPx and GST activities. The levels of the non-enzymatic biomarker, glutathione (GSH), decreased in acute exposures, while they increased in chronic exposures. The results showed that the responses of the antioxidant systems of the fish exposed to metals in differing water hardness were also different. It was evident that the least effect was observed in medium-hardness in acute exposures, while the opposite was observed in chronic exposures, as the most effects were seen in medium-hardness.

Keywords: Freshwater, Fish, Metal, Calcium, Liver, Antioxidant

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Bilindiği gibi ağır metaller biyolojik olarak gerekli olanlar ve olmayanlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Metabolizma için gerekli olmayan metaller toksik etkilerini metabolik döngü sırasında gerekli metallerin yerine geçerek göstermektedir (Rainbow, 1985). Sucul ortamlarda metal etkisine maruz kalan balıkların dokularında metal birikimi balığın biyolojik özelliklerinin yanında suyun metal derişimine, etkide kalma süresine ve diğer çevresel faktörlere (tuzluluk, sıcaklık, pH ve sertlik gibi) bağlı olarak değişmektedir (Heath, 1995; Canlı ve Atlı, 2003; Baykan ve ark., 2007; Atlı ve Canlı, 2008; Baysoy ve ark., 2013).

Metaller önemli bir ekosistem bileşeni olduğu kadar, besin kaynağı olarak da tüketilen balıkların fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmalarının bütünlüğünü bozabilmektedir (Hogstrand ve ark., 1999; Basha ve Rani, 2003). Su ortamında kirleticilerin bulunması çeşitli enzimlerin aktivitelerinde ve birçok fizyolojik ve biyokimyasal parametrede değişiklikler meydana getirdiğinden, bu ortamda yaşayan canlılar için önemli bir sorun oluşturmaktadır (Ariyoshi ve ark., 1990). Balıklar ortamdaki ağır metalleri besin, su ve vücut yüzeyinden alabilmektedir (Simkiss ve Taylor, 1989; Heath, 1995). Tatlı sularda su sertliği ile ağır metallerin toksisitesi arasında negatif bir ilişki vardır; diğer bir deyişle sertlik arttıkça ağır metal toksisitesinde bir azalma söz konusudur. Örneğin tatlı sularda su sertliği arttıkça ağır metal alımı organizmaların Ca ve Mg gibi iyonları almak için yarışması nedeniyle azalmaktadır (Kim ve ark., 2001; Pyle ve ark., 2002).

Bu çalışmada, tatlısu balıkları (*O. niloticus*) farklı düzeylerde kalsiyum (30, 60 ve 120 mg Ca²⁺/l) içeren sularda metallerin (Cr⁺⁶, Hg⁺² ve Ni⁺², Zn⁺²) etkisine akut (3 gün) ve kronik (30 gün) süreçlerde bırakıldıktan sonra, karaciğer dokusunda antioksidan sistemin verdiği tepkiler çeşitli biyobelirteçler (enzimatik ve enzimatik olmayan) aracılığı ile belirlenmiştir. Akut deneylerde balıklar Cr⁺⁶, Ni⁺² ve Zn⁺²'nin 30 µM derişimlerine ayrı ayrı maruz bırakılırken, Hg⁺²'nin 0.3

μM derişimine maruz bırakılmışlardır. Kronik deneylerde ise balıklar Cr^{+6} , Ni^{+2} ve Zn^{+2} 'nin $10 \mu\text{M}$ derişimlerine ayrı ayrı maruz bırakılırken, Hg^{2+} 'nin $0.03 \mu\text{M}$ derişimine maruz bırakılmıştır. Metallerin derişimlerinin belirlenmesi literatür taramaları ve laboratuvarımızda yapılan ön çalışmalar ile yapılmış olup, bütün derişimler subletal derişimler olarak belirlenmiştir. Deney protokolünde her kalsiyum derişimi (su sertliği) için ayrı ayrı kontroller kullanılmıştır. Şöyle ki; En düşük kalsiyum derişiminde (Ca_{30}) metal etkisinde kalan balıkların istatistiksel analizleri kalsiyum değeri en düşük ($30 \text{ mg Ca}^{2+}/\text{l}$) olan kontrol ile yapılmıştır. Aynı şekilde orta (Ca_{60}) ve yüksek (Ca_{120}) düzeylerde kalsiyum içeren ortamlarda metal etkileri incelenirken ilgili kontrol değerleri ile istatistiki karşılaştırmalar yapılmıştır. Balık antioksidan sisteminin metallere verdikleri tepkilerin belirlenmesi için karaciğer dokusunda antioksidan sisteme özgü enzim (SOD, CAT, GPx, GR, GST) aktiviteleri ve enzimatik olmayan parametre (GSH) düzeyleri incelenmiştir. Akut ve kronik deneyler sonunda balıklarda herhangi bir ölüm görülmemiştir. Karaciğer dokusundaki enzimatik ve enzimatik olmayan parametrelerin analizi ilgili metotlar yardımı ile kısa süre içerisinde yapılmıştır. Veriler antioksidan sisteme özgü parametrelerin aktivitelerinde ve düzeylerinde suyun sertlik derecesine, metal çeşidine ve metal maruziyet süresine bağlı olarak farklılıklar göstermiştir. Kalsiyum ve/veya metal etkisinde kalan balıklarda ortaya çıkan değişimler istatistiksel olarak karşılaştırıldı ve anlamlı ($P<0.05$) ve anlamsız ($P>0.05$) farklar not edilmiştir.

Kromun akut etkisi incelendiğinde Ca_{30} su sertliğinde SOD ve CAT aktivitesinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Ca_{60} ve Ca_{120} su sertliklerinde GPx aktivitesinde, Ca_{30} ve Ca_{120} su sertliğinde ise GST aktivitesinde önemli bir azalış görülmüştür. GR aktivitesi ve GSH düzeyinde ise hiçbir su sertliğinde anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Kromun kronik etkisi incelendiğinde Ca_{30} su sertliğinde GR aktivitesinin arttığı, CAT ve SOD aktivitesinin ise Ca_{60} su sertliğinde anlamlı arttığı, GPx aktivitesinin ise anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür. GSH

düzeyleri Ca_{30} su sertliğinde anlamlı bir artış gösterirken, Ca_{120} su sertliğinde anlamlı azalışlar göstermiştir. GST aktivitesi ise hiçbir su sertliğinde krom etkisiyle anlamlı değişimler göstermemiştir. Nikelin akut etkileri incelendiğinde SOD, CAT ve GR aktivitesinde ve GSH düzeylerinde hiçbir su sertliğinde anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Ancak, GPx aktivitesinde tüm su sertliklerinde anlamlı azalışlar görülmüştür. GST aktivitesi ise Ca_{30} ve Ca_{120} su sertliklerinde anlamlı azalışlar göstermiştir. Kronik deneylerde, SOD, CAT ve GR aktivitelerinde akut etkiye benzer şekilde hiçbir su sertliğinde anlamlı bir değişiklik olmamıştır. GPx aktivitesinde ise sadece Ca_{60} su sertliğinde anlamlı bir azalış görülmüştür. GST aktivitesinde Ca_{60} su sertliğinde anlamlı bir azalma olmuştur. GSH düzeyleri sadece Ca_{30} su sertliğinde anlamlı bir artış gösterirken, Ca_{60} ve Ca_{120} su sertliklerinde anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Çinkonun akut etkisi incelendiğinde, Ca_{30} su sertliğinde CAT aktivitesinde bir artış, GPx aktivitesinde Ca_{120} su sertliğinde GST aktivitesinde, Ca_{30} ve Ca_{120} su sertliğinde GSH düzeyinde ise Ca_{60} su sertliğinde anlamlı azalışlar görülmüştür. Ancak, SOD ve GR aktivitesinde herhangi bir su sertliği anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Çinkonun kronik etkisi incelendiğinde, SOD ve CAT aktivitesinde herhangi bir su sertliğinde anlamlı bir değişiklik olmaz iken, Ca_{60} su sertliğinde GPx ve GST aktivitesinde, Ca_{120} su sertliğinde GR aktivitesinde anlamlı azalışlar olmuştur. GSH düzeyi ise Ca_{30} su sertliğinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. GR aktivitesi ise sadece Ca_{120} su sertliğinde anlamlı bir azalış göstermiştir. Cıvanın akut etkileri incelendiğinde, GR aktivitesinde Ca_{120} su sertliğinde ve GST aktivitesinde Ca_{30} su sertliğinde anlamlı azalışlar görülmüştür. GSH düzeyinde ise Ca_{60} su sertliğinde anlamlı bir azalma olmuştur. Kronik deneylerde, bütün enzim aktivitelerinde anlamlı azalışlar olurken, CAT aktivitesinde ise Ca_{60}

sertliğinde anlamlı bir artış olmuştur. GSH düzeyinde ise hiçbir metal anlamlı değişime neden olamamıştır.

Bu çalışmanın sonuçları ile metallerin (Cr^{+6} , Hg^{+2} ve Ni^{+2} , Zn^{+2}) farklı su sertliklerinde balıkların (*O. nioticus*) karaciğer antioksidan sistem parametreleri üzerine olan etkileri akut ve kronik deneyler ile gösterilmiştir. İstatistiksel analizler, ortaya çıkan anlamlı etkilerde metal türünün, metal derişiminin, su sertliğinin (kalsiyum düzeyi) ve etkilenme süresinin de etkili olduğunu ortaya çıkarmıştır. Böylece, bu çalışma ile tatlı su balıklarında çevre toksikolojisinin balık fizyolojisi üzerine olan etkileri gösterilirken, suyun kalsiyum düzeyinin de çevresel metal toksikolojisi çalışmalarında dikkate alınması gerektiğini vurgulanmıştır.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince fikir ve görüşleriyle desteğini eksik etmeyip bana bu çalışma konusunu vererek doktora yapma fırsatı veren danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa CANLI'ya çalışmalarım sırasında bilgi ve birikimiyle bilimsel desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Gülüzar ATLI' ya teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca doktora tez savunma jürimde görev alan Prof. Dr. Fatma Çevik, Prof. Dr. Mustafa Coşkun, Doç. Dr. Tamer Kayış ve Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Sulanç'a katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Bu süre içerisinde dostlukları ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan Moleküler Ekotoksikoloji laboratuvarında lisansüstü eğitimlerini yapan arkadaşlarıma da teşekkürü borç bilirim.

Hayatım boyunca her anlamda beni destekleyen ve yanımda olan rahmetli babam Necati KOCALAR, annem Perihan KOCALAR ve ağabeylerim Mustafa KOCALAR, Tolga KOCALAR ve Teoman KOCALAR' a teşekkür ederim.

En özel teşekkürlerimi, sevgili eşim Deniz YETKİN KOCALAR ve tez aşamasında dünyaya gelerek bana dünyanın en güzel duygusu olan baba olma duygusunu yaşatan oğlum Toprak Ali KOCALAR' a sunuyorum.

Bu tezi tüm aileme atfediyorum.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIV
1. GİRİŞ	1
1.1. Sucul Canlılarda Metal Düzeyleri	6
1.2. Ağır Metallerin Detoksifiye Mekanizmaları.....	8
1.3. Tarihte Meydana Gelen Bazı Ağır Metal Felaketleri	9
1.4. Sucul Canlılarda Metaller ile Yapılan Toksisite Çalışmaları	10
1.5. Halk Sağlığı Standartları.....	13
1.6. Antioksidan Sistem	14
1.6.1. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres.....	14
1.6.1.1. Süperoksit Anyon Radikali.....	15
1.6.1.2. Hidroksil Radikali.....	17
1.6.1.3 Singlet Oksijen.....	18
1.6.2. Oksidatif Stresten Korunma Mekanizmaları.....	18
1.6.2.1. Antioksidanlar.....	18
1.6.3. Antioksidan Sistem Enzimleri.....	20
1.6.3.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	20
1.6.3.2. Katalaz (CAT)	21
1.6.3.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx).....	22
1.6.3.4. Glutasyon Redüktaz (GR).....	23
1.6.3.5. Glutasyon-S-Transferaz (GST).....	23

1.6.4. Glutasyon Metabolizması ve Enzimatik Olmayan	
Antioksidanlar	23
1.6.5. Reaktif Oksijen Türlerinin Homeostazisi ve Hücre Bileşenlerine	
Zararları.....	25
1.6.5.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Homeostazisi	25
1.6.5.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Hücre Bileşenlerine Zararları	26
1.7. Deneyde Kullanılan Ağır Metallerin Özellikleri ve Kullanım Alanları	27
1.7.1. Cıva	27
1.7.2. Krom	29
1.7.3. Nikel.....	29
1.7.4. Çinko.....	29
1.8. <i>Oreochromis niloticus</i> (Linnaeus 1758)	30
1.9. Karaciğer	32
1.9.1. Karaciğerin Görevleri	32
1.10. Amaç.....	34
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	35
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	49
3.1. Materyal.....	49
3.1.1. Deneyde Kullanılan Kimyasal Malzemeler	49
3.1.1.1. Deneyde Kullanılan Metaller	49
3.1.1.2. Antioksidan Enzim Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan	
Kimyasallar	49
3.1.1.3. Protein Analizinde Kullanılan Kimyasallar.....	50
3.1.1.4. Kalsiyum ve Sertlik Tayininde Kullanılan Kimyasallar.....	50
3.1.2. Kullanılan Aletler	51
3.2. Yöntem	51
3.2.1. Doku Homojenatlarının Hazırlanışı.....	54
3.2.2. Antioksidan Sistem Parametrelerinin Ölçümü	54

3.2.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Ölçümü	55
3.2.2.2. Katalaz (CAT) Aktivitesi Ölçümü.....	56
3.2.2.3. Glutatyon S-Transferaz (GST) Aktivitesi Ölçümü	57
3.2.2.4. Glutatyon Peroksidaz (GP _x) Aktivitesi Ölçümü.....	58
3.2.2.5. Glutatyon Redüktaz (GR) Aktivitesi Ölçümü	60
3.2.2.6. Total Glutatyon (GSH) Miktarının Ölçümü	61
3.2.2.7. Okside Glutatyon (GSSG) Miktarının Ölçümü	63
3.2.2.8. Redükte Glutatyon (rGSH) miktarının hesaplanması;.....	64
3.2.3. Total Protein Analizi	64
3.2.4. Kalsiyum ve Sertlik Tayini.....	67
3.2.4.1. EDTA Metoduyla Su Sertliğinin Belirlenmesi.....	67
3.2.4.2. Kalsiyum Sertliği ve Toplam Sertliğin Hesaplanması	68
3.2.5. İstatistiksel Analizler	69
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	71
4.1. Bulgular	71
4.1.1. Akut Etki	71
4.2. Tartışma	96
4.2.1. Krom Etkisi	98
4.2.2. Nikel Etkisi.....	100
4.2.3. Çinko Etkisi.....	101
4.2.4 Civa Etkisi	103
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	107
5.1. Sonuçlar	107
5.2. Öneriler.....	107
KAYNAKLAR	109
ÖZGEÇMİŞ	139



ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1. Deney Akvaryumlarındaki Suyun Fiziksel Ve Kimyasal Özellikleri. Veriler (N=20) Aritmetik Ortalamayı Ve Standart Sapmayı Göstermektedir.	52
Çizelge 3.2. SOD Aktivitesi Ölçüm Tablosu.	55
Çizelge 3.3. GSH Standardı Absorbans Değişim Grafiği.	63
Çizelge 3.4. Bovin Serum Albümininden Hazırlanmış Olan Standart Derişimler Ve Absorbans Arasındaki Doğrusal İlişkiyi Gösteren Grafik	66
Çizelge 4.1. Farklı su sertliklerinde Cr^{+6} , Ni^{+2} , Zn^{+2} ve Hg^{+2} ye maruz bırakılan balıkların enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlarında meydana gelen değişikliklerin yüzdelik(%) oranları	96



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1.	Toksik elementlerin organizmadaki fizyolojik yolları ve biyolojik yanıtları	8
Şekil 1.2.	Balık dolaşım sistemine alınan ağır metallerin izleyebileceği yollar.	11
Şekil 1.3.	Reaktif oksijen türleri üretilmesi ve giderilmesi arasındaki dengenin bozulması.	15
Şekil 1.4.	Organizmalardaki oksijen metabolizması ve reaktif oksijen türleri arasındaki dönüşüm	17
Şekil 1.5.	Hücresinin antioksidan savunma mekanizması	20
Şekil 1.6.	Moleküler oksijenin bir elektron ve dört elektronla indirgenmesi ve birinci ve ikinci sıra antioksidan enzimler	26
Şekil 4.1.	Ca ₃₀ (30 mg Ca ⁺² /L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer SOD aktiviteleri.....	71
Şekil 4.2.	Ca ₆₀ (60 mg Ca ⁺² /L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer SOD aktiviteleri.....	72
Şekil 4.3.	Ca ₁₂₀ (120 mg Ca ⁺² /L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer SOD aktiviteleri.....	72
Şekil 4.4.	Ca ₃₀ (30 mg Ca ⁺² /L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer CAT aktiviteleri.....	73
Şekil 4.5.	Ca ₆₀ (60 mg Ca ⁺² /L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer CAT aktiviteleri.....	74
Şekil 4.6.	Ca ₁₂₀ (120 mg Ca ⁺² /L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer CAT aktiviteleri.....	74
Şekil 4.7.	Ca ₃₀ (30 mg Ca ⁺² /L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GPX aktiviteleri	75

Şekil 4.8. Ca ₆₀ (60 mg Ca ⁺² /L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GPX aktiviteleri.....	76
Şekil 4.9. Ca ₁₂₀ (120 mg Ca ⁺² /L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GPX aktiviteleri.....	76
Şekil 4.10. Ca ₃₀ (30 mg Ca ⁺² /L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GR aktiviteleri	77
Şekil 4.11. Ca ₆₀ (60 mg Ca ⁺² /L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GR aktiviteleri	78
Şekil 4.12. Ca ₁₂₀ (120 mg Ca ⁺² /L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GR aktiviteleri	78
Şekil 4.13. Ca ₃₀ (30 mg Ca ⁺² /L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GST aktiviteleri	79
Şekil 4.14. Ca ₆₀ (60 mg Ca ⁺² /L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GST aktiviteleri	80
Şekil 4.15. Ca ₁₂₀ (120 mg Ca ⁺² /L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GST aktiviteleri	80
Şekil 4.16. Ca ₃₀ (30 mg Ca ⁺² /L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GSH düzeyleri).....	81
Şekil 4.17. Ca ₆₀ (60 mg Ca ⁺² /L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GSH düzeyleri).....	82
Şekil 4.18. Ca ₁₂₀ (120 mg Ca ⁺² /L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GSH düzeyleri	82
Şekil 4.19. Ca ₃₀ (30 mg Ca ⁺² /L) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer SOD aktiviteleri.....	83
Şekil 4.20. Ca ₆₀ (60 mg Ca ⁺² /L) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer SOD aktiviteleri	84

Şekil 4.21. Ca ₁₂₀ (120 mg Ca ⁺² /L) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer SOD aktiviteleri	84
Şekil 4.22. Ca ₃₀ (30 mg Ca ⁺² /L) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer CAT aktiviteleri	85
Şekil 4.23. Ca ₆₀ (60 mg Ca ⁺² /L) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer CAT aktiviteleri	86
Şekil 4.24. Ca ₁₂₀ (120 mg Ca ⁺² /L) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer CAT aktiviteleri	86
Şekil 4.25. Ca ₃₀ (30 mg Ca ⁺² /L) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GPX aktiviteleri	87
Şekil 4.26. Ca ₆₀ (60 mg Ca ⁺² /L) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GPX aktiviteleri	88
Şekil 4.27. Ca ₁₂₀ (120 mg Ca ⁺² /L) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GPX aktiviteleri	88
Şekil 4.28. Ca ₃₀ (30 mg Ca ⁺² /L) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GR aktiviteleri	89
Şekil 4.29. Ca ₆₀ (60 mg Ca ⁺² /L) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GR aktiviteleri	90
Şekil 4.30. Ca ₁₂₀ (120 mg Ca ⁺² /L) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GR aktiviteleri	90
Şekil 4.31. Ca ₃₀ (30 mg Ca ⁺² /L) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GST aktiviteleri	91
Şekil 4.32. Ca ₆₀ (60 mg Ca ⁺² /L) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GST aktiviteleri	92
Şekil 4.33. Ca ₁₂₀ (120 mg Ca ⁺² /L) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GST aktiviteleri	92

Şekil 4.34. Ca ₃₀ (30 mg Ca ⁺² /L) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GSH düzeyleri	93
Şekil 4.35. Ca ₆₀ (60 mg Ca ⁺² /L) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GSH düzeyleri	94
Şekil 4.36. Ca ₁₂₀ (120 mg Ca ⁺² /L) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GSH düzeyleri	94



1. GİRİŞ

Teknolojinin gelişmesine bağlı olarak dünya nüfusunun hızla artması ile birlikte besin kaynakları kirlenmekte ve insan popülasyonu için önemli problemler yaratmaktadır. Endüstriyel alanlarda, tarım ve madencilikte sıklıkla kullanılan Pb^{+2} , Cd^{+2} , Cr^{+3} , Co^{+2} , Fe^{+2} , Ni^{+2} , Hg^{+2} ve Zn^{+2} gibi ağır metaller çevre kirliliği bakımından önemlidir ve ekolojik tehlike oluşmasına neden olan kirleticilerin önde gelenlerindendir.

Ağır metaller çevrede doğal olarak bulunmakta olup yeraltı ve yüzey sularında değişen seviyelerde bulunmaktadır. Bununla birlikte, antropojenik faaliyetler metallerin doğal sucul ekosistemlere girişinin artmasına neden olabilmektedir. Bazı durumlarda, sucul organizmalar metallerin doğal olmayan yüksek seviyelerine maruz kalabilmektedirler. Balıklar bulundukları ortamların fiziksel ve kimyasal değişikliklerine karşı oldukça duyarlıdır. Bu nedenle, balıklardan elde edilecek biyobelirteç verileri belirli bir su ekosisteminin kirlilik durumunu yansıtabilir ve iyi bir gösterge olabilmektedir. Kirliliğin erken toksik etkileri, balık davranışında veya dış görünümünde önemli değişiklikler tanımlanmadan önce yalnızca hücresel veya doku düzeyinde belirgin olabilir. Histolojik inceleme çok hassas bir parametre gibi görünmektedir ve karaciğer gibi hedef organlarda meydana gelebilecek hücresel değişiklikleri belirlemede çok önemlidir. Ağır metallere maruz kalmak karaciğerde histolojik değişikliklere neden olabilir. Balık karaciğeri histolojisi bu nedenle çevresel faktörler ile karaciğer yapıları ve işlevleri arasındaki etkileşimleri incelemek için iyi bir model organ olarak hizmet edebilmektedir (Hinton ve Lauren, 1993; Gernhofer ve ark., 2001).

Sucul ekosistemler, yağmur sularının yıkama kabiliyetinin bir sonucu olarak neredeyse tüm antropojenik deşarjlar için nihai varış noktasıdır. Metaller biyolojik olarak parçalanamadıkları veya ekosistemlerden elimine edilemedikleri için sucul ekosistemlerin başlıca kirleticileri olarak kabul edilmektedirler. Bu nedenle, aşırı endüstriyel ve antropojenik faaliyetlerin bulunduğu bazı bölgelerde

metaller sucul yaşamı ciddi şekilde tehdit etmektedir (Mance 1987; Heath 1995; Jorgensen 2012). Nehirler ve göller hacimce daha küçük olduklarından ve genellikle insan yerleşim bölgelerinin yakınında bulunduğundan, antropojenik kaynaklardan büyük miktarlarda metal alma riski taşımaktadır. Bu nedenle, bu sular hassas ekosistemler oldukları için belirli dönemlerde hassas bir şekilde kontrol edilmelidir.

Balıklarda metal birikimi metal türüne, maruz kalma süresine, su kimyasına ve balık beslenme biyolojisine bağlı olarak değişebilmekte ve dokularında yüksek düzeylerde biriktikten sonra hem balık için hem de balık ile beslenen diğer canlılar için toksik olabilmektedir (Pinto ve ark. 2003; Sampaio ve ark. 2008; Sağlam ve ark. 2013). Literatür verileri, doğal sularda Pb, Cr, Cu ve Zn düzeylerinin sırasıyla 0,6–120, 1–10, 0,20–30 ve 0,5–10 µg/L aralığında olduğunu, kadmiyum düzeylerinin ise <0,1 µg/L olduğunu göstermiştir. Ancak, aşırı miktarda antropojenik girdinin bulunduğu sucul sistemlerde metallerin konsantrasyonları doğal seviyelerinin birçok katı olabilir (Mance 1987; Heath 1995; Jorgensen 2012). Böylece balıklarda biriken metal miktarı da çok fazla olabilmektedir. Metallerin toksik etkileri, boşaltım, metabolik, depolama ve detoksifikasyon mekanizmaları ile bertaraf edilemediği zaman toksik etkiler başlayabilir (Heath 1995; Jorgensen 2012).

Balık dokularında metal birikimindeki artışlar hidrojen peroksit, süperoksit radikali ve hidroksil radikali gibi reaktif oksijen çeşitlerinin (ROT) oluşturduğu oksidatif strese neden olmaktadır. Ayrıca hücrel antioksidan kapasiteyi azalttığı gibi fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmanın bütünlüğünü de bozmaktadır (Radi ve Matkovics 1988; Roche ve Bogé 1996; Dautremepuits ve ark. 2002; Pinto ve ark. 2003; Atli ve Canli 2010). Ağır metaller, ROT'un hücrel konsantrasyonunu doğrudan arttırarak ve hücrel antioksidan kapasitesini azaltarak oksidatif hasarı destekleyebilir (Pinto ve ark., 2003). Metallerin antioksidan sistem üzerindeki etkileri metallerin esansiyel olup olmamasına göre değişmesinin yanında, redoks aktif veya inaktif doğasına göre de değişebilmektedir (Wood ve ark. 2012).

Biyobelirteçler, suda yaşayan hayvanlarda tehlikeli etkiler ortaya çıkmadan önce “erken uyarı sistemleri” olarak önemlidir. Ayrıca, doğal suları öldürücü olmayan toksik madde seviyeleri için test etmede önemli parametreler olabilirler. Bu nedenle biyobelirteçler son yıllarda metal toksisite izleme programları için önem kazanmıştır. Karaciğer ve böbrek gibi balık dokuları ksenobiyotiklerin neden olduğu oksidatif stresten korunmak için bazı antioksidan sistemler (Basha ve Rani 2003; Atli ve Canli 2007; Baysoy ve ark. 2012). Doğal ve antropojenik kaynaklar nedeniyle sucul ortamın metallerle kirlenmesi dünya çapında bir çevre sorunudur. Metallerle maruz kalma, suda yaşayan hayvanlarda doku hasarı, solunum değişiklikleri, biyokimyasal ve fizyolojik mekanizmalardaki değişiklikler ve nihayetinde ölüm dahil olmak üzere çeşitli toksik etkilere yol açabilir (Heath 1995). Bu nedenle enzimatik ve enzimatik olmayan biyobelirteçler, organizmalarda ciddi toksik etkiler ortaya çıkmadan önce metal maruziyetlerinin etkilerini tahmin etmek için hassas araçlar olarak önem kazanmaktadır. Aspartat transaminaz (AST) ve alanin transaminaz (ALT), amino asit metabolizmasında yer alan transaminazlar olarak görev yapan en önemli enzimlerdir ve metal maruziyetlerine duyarlı oldukları bilinmektedir (Almeida ve ark. 2001; Levesque ve ark. 2002; Gravato ve ark. 2006). Öte yandan metallerin yüksek afiniteye sahip olduğu sülfidril grup düzeylerinin ve toplam protein düzeylerinin belirlenmesi metal toksisitesinin tahmin edilmesinde bir gösterge olarak kullanılabilir (Gravato ve ark. 2006).

Ağır metaller sucul ortamlar dahil her türlü ekosistemde yaygın olarak bulunan kirleticilerden olup, ciddi kirliliğe neden olurlar. Organizmalarda birikebildiklerinden dolayı besin zinciri yoluyla daha yüksek trofik seviyelere aktarılabilirler ve bunun sonucu olarak büyük ekolojik problemlere neden olurlar (Dallinger ve ark., 1987; Chen ve Folt, 2000; Naser, 2013). Ağır metallerin risk değerlendirmeleri bağlamında, biyolojik etkileri ve etki biçimleri onlarca yıldır en fazla araştırılan ekotoksikolojik konular arasında yer almaktadır (Garrick ve ark., 2006; Wu ve ark., 2016; Wang ve Tan, 2019). Sucul ortamlarda ağır metaller

karişimlar halinde bulunsa da, risk değerlendirmeleri ve su standartları esas olarak tek maddelerle yapılan çalışmalara dayanmaktadır (ECB, 2003).

Bazı metaller, rneğin Cu, Zn ve Fe balık metabolizması için gerekli olmasına karşın, Hg, Cd ve Pb gibi metallerin biyolojik sistemlerde bilinen bir rolü yoktur. Balıklarda normal metabolizması için gerekli metaller su, yiyecek veya sediment kaynaklı olmaktadır. Hem esansiyel metalle hem de esansiyel olmayan metaller benzer yollarla vcoda alınmaktadır. Laboratuvar deneyleri ve doğal örneklemelerden elde edilen veriler balık dokularında metal birikimi esas olarak konsantrasyona, etkide kalma süresine, suyun fiziksel ve kimyasal özelliklerine (sıcaklık, sertlik, pH, tuzluluk v.s.) bağlı olduğunu göstermiştir. Bunun yanında, hayvanların beslenme gereksinimleri, cinsiyeti ve boyutu gibi biyolojik özelliklerinin de dokularındaki metal birikimini etkilediği belirtilmiştir (Heath, 1987; Langston, 1990; Canlı ve Furness, 1993; Roesijadi ve Robinson, 1994; Kalay ve ark., 1999; Kalay ve Canlı, 2000). Su sertliğinin metal toksisitesinde önemli bir etken olduğu ve sert sularda toksisitenin azaldığı bilinmektedir. Sert sulardaki koruyucu etkiden sorumlu katyonların başında Ca^{+2} gelmektedir (Pagenkopf, 1983). Hayvan boyutunun da metal birikiminde önemli olduğu gösterilmiştir. Özellikle cıva gibi metallerde hayvan boyutu ile birikim arasında pozitif bir ilişki olduğu, ancak diğer metallerde böyle bir ilişkinin varlığı gösterilmemiştir (Barak ve Mason, 1990; Monteiro ve Lopes, 1990); Law ve ark., 1991; Canlı ve Furness, 1993a,b). Hatta, deniz besin zincirinin en st zinciri olan eniz kuşlarında biriken cıva miktarı ile hayvan boyutları arasında pozitif bir ilişki göstermiştir (Furness ve ark., 1986). Su ile temas ettiğinde rahatça çözünmeleri, yok edilememeleri, canlı vücudunda birikebilmeleri ve vücuttan atılmalarının zor olması gibi nedenlerden dolayı ağır metaller suda yaşayan canlılar için son derece toksik olan ksenobiyotiklerdendir (Van Dyk ve ark., 2007).

Hücresel detoksifikasyon, antioksidan savunma sistem ve stres cevapları hayvanlarda ana savunma mekanizmalarını meydana getirmektedir. ROT üretimine karşılık enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan elemanları oksidatif stres ve

oksidatif zarara karşı hücresele seviyede savunma yapmaktadır. Oksidatif stres, ROT üretimindeki artış sonucunda antioksidan koruma düzeyinin geçilmesi sonucunda meydana gelir ve hücrenin potansiyel olarak hasar görmesine ve hatta yok olmasına neden olabilir (Kubrak ve ark., 2013; Narra, 2016). Normal şartlar altında sağlıklı hayvanlarda ROT üretimi ve elemine edilmesi denge halinde bulunmaktadır. Katalaz (CAT), glutatyon S transferaz (GST), süperoksit dismutaz (SOD) gibi enzim yapılı antioksidanlar biyotransformasyonda rol oynayan önemli enzimlerdir (Limon- Pacheco ve Gonsebatt, 2009). Hücre içindeki ve hücre dışındaki vücut sıvılarında ROT düzeyleri, enzim yapısında olan ve enzim yapısında olmayan antioksidan sistem elemanları tarafından denetlenir. CAT ve SOD gibi enzim yapılı olan antioksidanlar, antioksidan savunma sistemi (ASS) elemanlarıdır ve serbest radikalleri ortadan kaldırma kabiliyetleri vardır (Van der Oost ve ark., 2003). Balıklarda tıpkı diğer omurgalılar gibi enzim yapısında olan ve enzim yapısında olmayan antioksidan savunma sistemleri içermektedirler (Trenzado ve ark., 2006). Stresin bir seri biyokimyasal, fizyolojik ve davranışsal farklılıklara neden olduğu ve buna bağlı olarak vücudun homeostazisini bozduğu net olarak bilinmektedir (Tsigos ve ark., 2016).

Birçok ksenobiyotik maddenin sucul canlıların hücrelerinde ve dokularında çeşitli toksik etkilere neden olan ROT artışına neden olduğu bilinmektedir. Yapılan değişik çalışmalarda süperoksit anyonu, singlet oksijen, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit gibi ROT'ları metal ve benzeri ksenobiyotiklerin meydana getirdiğine ilişkin literatür verileri bulunmaktadır (Fırat ve ark., 2011; Fridin ve ark., 2015). Ağır metaller, oksidatif stresin sebebi olan ROT'ların oluşmasına neden olan ksenobiyotikler arasında önemli bir yer tutmaktadır. Cu, Fe, Hg, Pb Cd ve Zn gibi metallerin, enzim yapılı antioksidan etkinliğinde farklılıklara, yağların, proteinlerin ve DNA'nın oksidasyonuna neden olabilmektedirler. Bunun sonucu doğrudan veya dolaylı olarak hücre ölümüne neden oldukları bilinmektedir (Hu, 2000).

Hücrelerin oksidatif stresin üstesinden gelebilmek ve zarara uğrayan büyük yapılı moleküllerini onarabilmek adına değişik mekanizmaları bulunmaktadır. Bunlar arasında ROT'ları ortadan kaldıran ya da engelleyen enzim yapılı olan ve enzim yapılı olmayan antioksidanlardır (Verma ve ark., 2007). Enzim yapısında olan antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi enzimlerden oluşurken; enzim yapısında olmayanlar ise glutatyon, metallothionein, E vitamini ve C vitamini gibi yapılardan oluşmaktadır. Balıklarda tıpkı diğer omurgalıları gibi oksidatif stresin üstesinden gelebilmek için enzimatik veya enzimatik olmayan savunma sistemleri bulundurulur. Enzim yapısında olan ve enzim yapısında olmayan antioksidanlar balıkların hücrelerindeki redoks durumunun korunmasında faydalıdır ve biyolojik açıdan oksidatif stresin oluşumuna karşı korumada önemlidir (Monteiro ve ark., 2009). Glutatyon metabolizmasında yer alan GPX, GST, GR, indirge glutatyon (GSH) ve okside glutatyon (GSSG), metallerin neden olduğu oksidatif stres ve diğer çevresel stres faktörleri ile baş etmede önemli antioksidanlar arasında yer almaktadır (Pinto ve ark. 2003; Tripathi ve ark. 2006).

1.1. Sucul Canlılarda Metal Düzeyleri

Sucul ortamdaki ağır metallerin balıklar tarafından bünyelerine alınması en fazla solungaçlar, vücut yüzeyi ve sindirim sistemi ile olmaktadır. Bunun nedeni ağır metal içeren solunum suyunun en geniş yüzey alanına sahip olan solungaç lamelleri ile etkileşmesidir. Solungaç epitelinde çevresel kirlenmeye fizyolojik tepki olarak görülebilecek hiperplazi (organ ve dokuda, ihtiyacı karşılamak için bölünebilme kabiliyeti olan hücre sayısındaki artış), mukoz hücrelerin fazla aktif olması, primer lamellerin ayrılması gibi defektler biyolojik yanıtların sadece bazılarıdır. Değişik yollardan canlı bünyesine alınan ağır metaller her organ ve dokuda farklı düzeyde birikirler. Canlı bünyesinde çeşitli metabolik yollara katıldıktan sonra vücut dışına atılabilen metallerden fizyolojik öneme sahip olanlar

depolanır. Eğer bunlar toksik metallerden biri ise, enzimlerin yapısını bozabilmektedir (Yazkan ve ark., 2004). Balıklarda kas dokusu ağır metal bağlamada fazla etkili olan bir organ değildir (cıva gibi metaller hariç). Bununla birlikte, insanlar tarafından tüketildiği ve sağlık riski taşıdığı için kas dokusu analizlerinin yapılması da gereklidir (Flos ve ark., 1979).

Sucul organizmalarda stres sonrası gelişen primer yanıt süresince açığa çıkan faktörlerin fizyolojik etkilerinden sekonder yanıtlar gelişir (Şekil 1.1). Sekonder yanıtlar bazı histolojik, histopatolojik, biyokimyasal ve hematolojik parametrelerdeki değişimlerle saptanabilmektedir. Balıklarda çevresel etkiler sonucu gelişen stres sonrasında homeostazisi sağlamak amacıyla, hematolojik, osmolalitik, hormonal ve enerji metabolizmasını düzenleyen bazı fizyolojik değişiklikler şekillenir (Donmez ve ark., 2006, Acerete ve ark., 2004, Yavuzcan Yıldız ve Pulatsu, 1999). Bazı ağır metallerin sucul canlılar üzerindeki etkileri farklı açıklanabilir. Örneğin; arseniğin (As) etki mekanizması kükürt ihtiva eden enzimlerle reaksiyona girmesine bağlanmaktadır. As özellikle karaciğer, kemik doku, deri ve tırnakta birikmektedir (Francesconi ve ark., 1999, Şener ve Yıldırım, 2000, Clowes ve Francesconi, 2004, Kayhan, 2007). Deniz ürünlerinde arsenik miktarı tolerans sınırları üzerine çıkabilir. Örneğin Morina'nın karaciğer yağında, yengeçte ve planktonik organizmalarda yüksek oranda As saptandığı bazı çalışmalar vardır (Yagmur ve Hanci, 2002). As' in organizmalardaki birikimi ve etkileri, As bileşiğinin özelliklerine bağlıdır ve embriyolarda kronik etkilere, DNA hasarlarına veya kanserlere sebep olabilir (Dons ve Beck, 1993, Berg ve ark., 1997).



Şekil 1.1 Toksik elementlerin organizmadaki fizyolojik yolları ve biyolojik yanıtları (Kayhan ve ark., 2009)

1.2. Ağır Metallerin Detoksifiye Mekanizmaları

Ağır metaller; 5 g/cm^3 'ün üzerinde yoğunluğa sahip olan ve parçalanamayan metalik bileşenlerdir. Demir (Fe), bakır (Cu) ve çinko (Zn) gibi bazı ağır metaller temel iz elementler iken cıva (Hg), kadmiyum (Cd) ve kurşun (Pb) gibi ağır metaller yararlı biyolojik etkileri olmayan ve çok düşük miktarlarda bile toksik etki gösteren elementlerdir. Cd, Pb, Hg ve As en toksik ağır metaller olarak kabul edilmektedir. Ağır metal kirliliği, insan sağlığını tehdit etmesinin yanı sıra doğada doğal olarak parçalanmayarak, tehlikeli ve toksik olmaları nedeniyle çevresel açıdan da ciddi sorunlara yol açmaktadır (Gerbino ve ark., 2011; Bhakta ve ark., 2012). Ağır metallerin detoksifikasyonu genelde; nükleoprotein bileşikleri

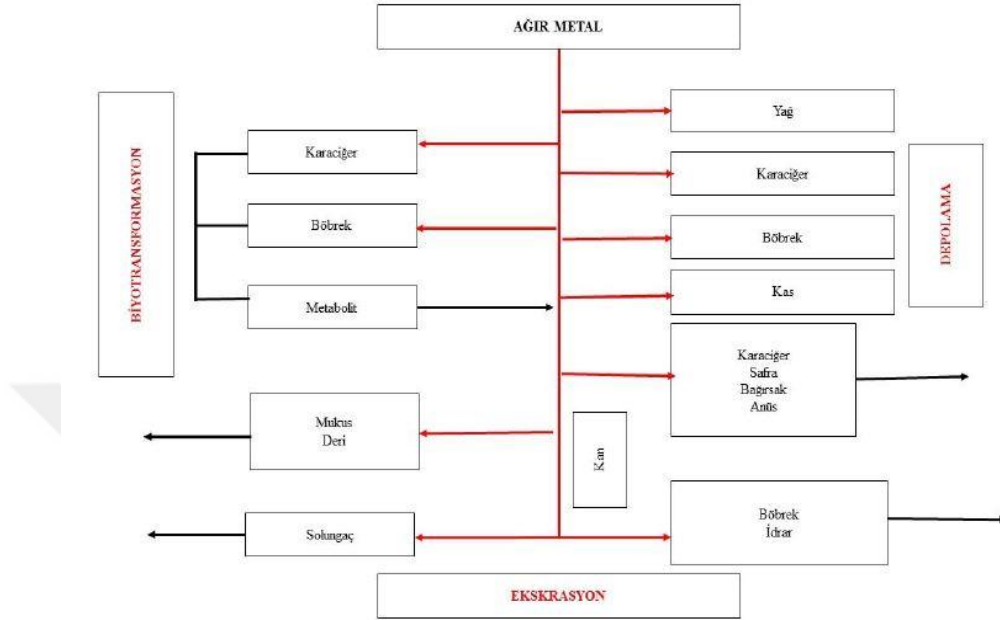
(Hg ve metil Hg, Cd), fosfolipid bileşikleri (As), lipofuskin tanecikleri (As, Au, Cd, Cu, Fe, Hg, Pb, Pu, Th, Zn), fosfat tanecikleri (Fe, Zn, Al, Cu, Sr), O₂ taşıyıcı proteinleri ve metallothionein gibi özgün metal bağlayan proteinler şeklinde olmaktadır (George, 1982).

1.3. Tarihte Meydana Gelen Bazı Ağır Metal Felaketleri

Japonya'nın 50.000 nüfuslu Minamata ilçesinde yaşayan halkın temel geçim ve besin kaynağı balıklardır. 1932-1968 seneleri arasında yüksek yoğunlukta (100 mg/l civarı) cıva içerikli atıklar Minamata Körfezi'ne boşaltılmış ve bunun sonucunda hem suda yaşayan canlılarda hem de geçimini ve besinini bu sulardan sağlayan Minamata halkında bazı belirtiler görülmeye başlamıştır. Çok sayıda insan özellikle balıkçılıkla uğraşan kişiler yüksek cıva derişiminden kaynaklı cıva zehirlenmesi sonucunda ya engelli kalmış ya da yaşamını yitirmiştir. Cıva zehirlenmesi olan kişilerde görülen belirtiler genellikle görmede bozukluk, beyinde hasarlar, sinir sisteminde bozukluk ve felçtir. 1975 yılına kadar Minamata'da görülen bu felaketteki kurban sayısı 800'e kadar çıkmış, bunlar arasından 107 kişi yaşamını yitirmiştir. Fakat bu felaketten etkilenen insan sayısının binlerle ifade edilebileceği bildirilmiştir (Salvatore ve ark., 1977; Mance, 1987). Buna benzer bir başka olay yine Japonya'da 1965 senesinde Agamo nehri civarlarında yaşayan halkta görülmüştür. Burada da temel neden yine cıvadır. İnsanlar cıvadan etkilenmiş balıkları tükettikleri için ya metabolik faaliyetleri bozulmuş ya da yaşamlarını yitirmişlerdir (Clark, 1989). Yine Japonya' nın bu kez Jintsu nehri civarlarında üretilen pirinçler çinko dökümhanesinden boşaltılan yüksek seviyede kadmiyum ile kirlenmiş bu pirinçleri tüketen insanlarda "itai itai" hastalığı ortaya çıkmıştır. Yüksek seviyedeki kadmiyumun neden olduğu bu hastalık tıpkı cıva zehirlenmesinde olduğu gibi yüzlerce insanın yaşamını yitirmesine binlercesinin de farklı şekillerde etkilenmelerine neden olmuştur (Goyer, 1991).

1.4. Sucul Canlılarda Metaller ile Yapılan Toksisite Çalışmaları

Yüksek depolama potansiyeline sahip solungaçlar ağır metal birikiminde önemli rol oynamaktadır (Shah, 2002). Solunum için balıklar tarafından alınan sudaki çözünmüş oksijen solungaçlar aracılığıyla vücuda alınırken, solungaçlardaki lameller vasıtasıyla vücuda sulara bulunan ağır metaller de girmektedir (Heath, 1987). Yüzey alanı geniş olan solungaç lamelleri ile etkileşime giren ağır metal içeren solunum suyu, solungaçlar ve lameller vasıtasıyla sürekli olarak vücuda ağır metal alınmasına neden olmaktadır (Kalay ve ark., 2004). Ayrıca balıklarda en çok meydana gelen zehirlenmeler ağız yolu ile alınan ağır metal atıkları tarafından ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla sindirim ile emilimi bir hayli önem arz etmektedir. Ağız aracılığıyla alınan ağır metal emiliminin gerçekleştiği yer ince bağırsaklardır. Sindirim yoluyla emilen ağır metaller, kan yolu ile vücudun her yerine dağılarak bir zehirlenme durumu meydana getirir. Bu durum, vücutta emilen zehirli maddenin miktarına ve türüne bağlıdır. Balıkların derileri de sucul ortamda zehirli maddelere maruz kalmakta bu durum deriden emilimini arttırmaktadır (Dökmeci, 1988). Balıklarda vücuda alınan ağır metallerin dolaşım sisteminde izleyebileceği yol şeması aşağıda (Şekil 1.2) verilmiştir. Dış ortamdan alınan ağır metaller çoğunlukla proteinlere bağlanarak kan vasıtasıyla, depo bölgelerine veya transformasyon ya da depolama için karaciğere iletilmektedir. Karaciğer tarafından transforme edilen ağır metaller burada depolanmakta veya safraya gönderilmekte ya da böbrekler tarafından atılmak üzere kana geri gönderilmektedir (Kıvrakdal, 2010).



Şekil 1.2 Balık dolaşım sistemine alınan ağır metallerin izleyebileceği yollar (Heath, 1987).

Araştırmacılar metal karışımının balıklardaki etkilerinin tek tek verilmelerine göre farklı olup olmadığını araştırmışlardır. Bunlardan bir tanesinde Sağlamtimur ve ark. (2003) *Oreochromis niloticus*'da bakır+kadmiyum karışımının çeşitli dokularda (solungaç, karaciğer, böbrek, kas) meydana getirdiği etkileri incelemişlerdir. Öncelikle bakır birikiminin, tek başına bakır verildiğinde ve kadmiyum ile karışımında çok farklı etkiler gösterdiğini gösterirken, aynı zamanda metal birikiminin de farklı olduğunu belirtmişlerdir. Diğer yandan dokularda metallerin etkisiyle metal bağlayıcı proteinlerin sentezinde artış olduğunu da rapor etmişlerdir. Diğer yandan, metal birikiminin akut ve kronik süreçlerde farklılık gösterdiği de bazı çalışmalarda vurgulanmıştır. Örneğin farklı derişimlerdeki kadmiyumun *Cyprinus carpio*'nun karaciğer ve böbrek gibi metabolik olarak aktif organlarda kısa süre içerisinde hızla birikmesine karşın, kas dokusundaki metal birikimi ancak 106 günlük bir maruziyetten sonra anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir. Bunun nedeni olarak, kas dokusunun karaciğer ve böbreğe oranla

metabolik olarak daha yavaş olması gösterilmiştir. Kas dokusu besin kaynağı olarak önemli olmakla beraber, çevresel ölçümlerde sadece kas dokusunun değerlendirilmesi yanıltıcı sonuçlar verebilir. Zira balık sağlığı için diğer dokular daha önemli olabilir (De Conto ve ark., 1999). Benze şekilde, omurgasız hayvanlarda da metal birikimi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Örneğin Venedik Lagünü'nden (İtalya) toplanan midyelerde (*Mytilus galloprovincialis*) arsenik birikimi ve dokular arasındaki dağılımının incelendiği bir çalışmada en fazla arsenik birikiminin midyenin hepatopankreasında olduğu gösterilmiştir (Argese ve ark., 2005). Midyeler beslenme şartları nedeniyle suyun fiziksel ve kimyasal değişiminden çabuk etkilenirler ve bu nedenle iyi bir indikatör hayvan olarak kabul edilirler. Varlık (1991) midyelerin hassa olduğunu ve çok düşük derişimlerde bile toksik etkiler ortaya çıktığını belirtmiştir. Araştırmacı midye larvalarının düşük derişimlerde kadmiyum ve kurşun bulunan ortamlarda midye larvalarının %97'sinde anormallik olduğunu gözlemlemiştir. Aynı zamanda kadmiyumun kurşuna göre daha toksik olduğu da vurgulanmıştır. Benzer şekilde, teke karidesinde (*Palaemon serratus*) yapılan bir çalışmada metal birikimi incelenmiş ve hayvan boyutunun kadmiyum birikimi açısından çok önemli olduğu ve küçük bireylerin büyüklere göre daha fazla kadmiyum biriktirdiği gözlenmiştir. Araştırmacılar yaptıkları yorumda, bu durumun nedeni olarak küçük karideslerin büyüklere göre daha fazla aktif olmasını göstermişlerdir (Egemen ve Sunlu, 2003). Balıklardaki durum bir miktar farklı olmakla beraber temelde aynı sayılabilir. Bilindiği gibi balıklar suda bulunan metali farklı yollardan vücutlarına alsa da temel alınımları yolu solungaçlardır. Buradan da kan yoluyla bütün vücuda dağılmaktadır (Hollis ve ark., 1999, Wong ve Wong, 2000). Metallerin balıkların hematolojik parametreleri üzerine olan etkileri konusunda çok sayıda araştırma vardır. Bazı araştırmacılar metallerin Kadmiyumun, Japon balıklarında (*Carassius auratus*) eritrosit oluşumuna zarar verdiğini ve bu etkinin çinko ve bakır eklenen ortamlarda daha da kötüleştiğini belirtirken, doğada metal karışımları etkisinde kalan balıklarda yaşanan strese dikkat çekmişlerdir (Houston ve Keen, 1984,

Atamanalp ve ark., 2003). Akut süreçte kadmiyum etkisinde kalan somonlarda (*Salmo gairdneri*) kan glikoz düzeyi ve karaciğerde glikojen miktarında azalmanın yanında olduğu, karaciğerde büyüme olduğu gözlenmiştir. Kadmiyuma maruz kalan balıklarda (*Perca fluviatilis*) çeşitlik anemi tiplerinin ortaya çıkabileceği belirtilmiştir (Lowe-Jinde ve Nimi, 1986, Larsson ve ark., 1985). Benzer şekilde kadmiyum etkisinde kalan Kaya balıklarında (*Gobius niger*) yüksek düzeyde kadmiyum birikimini takiben, histopatolojik bulgular olduğu, immatüre ve dejenere olmuş eritrosit sayısının da arttığı bildirilmiştir (Katalay ve Parlak, 2004). Benze etkiler sazan balıklarında da görülmüştür. Kadmiyum etkisinde kalan ballıklarda (*Cyprinus carpio*) hemoglobin ve hematokrit düzeylerinin önemli oranda azaldığı ve anemik durumların ortaya çıktığı belirtilmiştir. Aynı zamanda karaciğer dokularında çeşitli patolojik durumların olduğu gözlemlenmiştir (Koyana ve Ozaki, 1984). Doğal sucul örneklemelerinde de benze etkiler ortaya çıkmaktadır. Ege Denizi'nde Kırmızı Mercanın (*Pagellus erythrinus*) organlarında metal derişimleri ölçülmüş ve en fazla birikimin karaciğerde olduğunu belirlemişlerdir Uluturhan (2004). Bu çalışma da diğer örnekler gibi karaciğerde metal birikimini ve karaciğerin detoksifikasyondaki rolünü göstermesi açısından önemlidir. Bunun da temel nedeni karaciğerin metabolik aktivitesinin fazla olmasıdır.

1.5. Halk Sağlığı Standartları

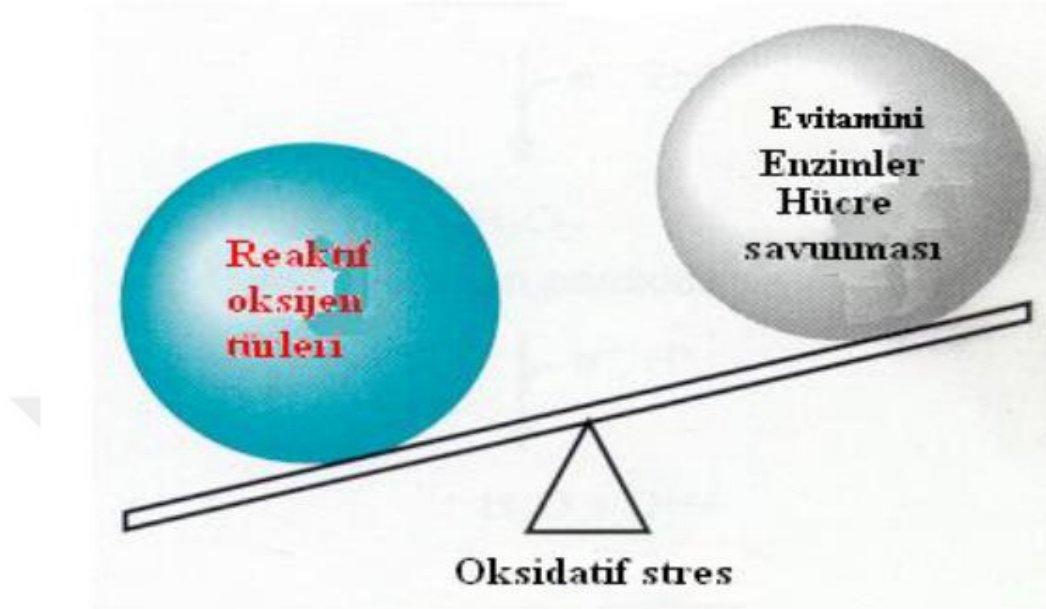
Dünya sağlık örgütü (DSÖ) geçmişte yaşanmış olan çok sayıdaki metal toksisitesi felaketinden sonra besinlerde bulunabilecek maksimum ağır metal seviyelerini belirlemiştir. Buna göre DSÖ cıvanın haftalık bazda tolere edilebilir düzeyini; metil cıva için 0.02 mg, inorganik cıva için 0.3 mg olması gerektiğini bildirmiştir. DSÖ kadmiyumun haftalık tolere edilebilir değerinin ise 0.1-0.25 mg arası olması gerektiğini bildirmiştir (Clark, 1989; Hapke, 1991). Kurşun besin zincirinde etkin bir dolaşıma sahip değildir. Bu nedenle önemli bir sağlık sorununa yol açmamakla birlikte haftalık 4 mg kurşun zararsız olarak kabul edilmekle birlikte daha yüksek miktarlarda kurşun ciddi sağlık problemlerine neden

olabilmektedir (Hapke,1991). İnsanlarda 100 mg bakır alınımlı bakır zehirlenmesine neden olmaktadır. Ancak 5-6 mg/kg arasında bakır bulunduran gıdaların tatları insanlarca alınabildiği ve bu tadın tiksindirici olması sebebiyle insanlarda bakır zehirlenmesi ve buna bağlı olarak önemli sağlık sorunları çok fazla görülmemektedir (Clark, 1989).

1.6. Antioksidan Sistem

1.6.1. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Yörüngesinde bir ya da daha çok sayıda eşlenmemiş elektron bulunduran yapılara serbest radikal denilmektedir. Bu açıklamaya göre hidrojen atomu oksijen ve çok sayıda geçiş elementi serbest radikal olarak tanımlanmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1990). Serbest radikaller kısa ömürlü reaktif atom, iyon ya da moleküller olup büyük hücresel hasarlara, mutasyonlara, kansere ve biyolojik yaşlanmaya neden olduğu bilinmektedir (Buyukguzel, 2013). Oksijenli solunum yapan canlılar için oksijen her ne kadar vazgeçilmez bir molekül olsa da moleküler oksijen (O_2) süper oksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($HO^{\cdot}$) ve hidrojen peroksit' e (H_2O_2) dönüşebildiğinden dolayı öldürücü etkilere de sahip olabilmektedir (Fridovich, 1995). Özellikle $O_2^{\cdot-}$ metabolik faaliyetler ve çevre etkileriyle oluşup enzimli ve enzimsiz tepkimelere etki ederek işleyişi bozar ve toksik etki gösterebilir. İlk olarak $O_2^{\cdot-}$ radikali oluşur daha sonra bir dizi tepkimelerle diğer serbest radikallerin meydana gelmesine sebep olabilir (Kelly ve ark., 1998). Şekil 1.3' te de görüldüğü gibi canlılardaki ROT üretimi ile antioksidan sistem arasındaki dengenin oksidanlar yönünde bozulmasına oksidatif stres denir (Radak ve ark., 2011).



Şekil 1.3. Reaktif oksijen türleri üretilmesi ve giderilmesi arasındaki dengenin bozulması (Cheung ve ark., 2001).

1.6.1.1. Süperoksit Anyon Radikali

Moleküler oksijenin dıştaki katmanlarından her biri birer elektron daha alabilir. Bu katmanların bir elektron almasıyla süperoksit anyonu (süperoksit radikali, O_2^-), iki elektron almasıyla da peroksi anyonu (O_2^{2-}) oluşur (Halliwell ve Gutteridge, 1990). Daha sonra peroksi anyonu iki proton alıp H_2O_2 radikalini oluşturur. O_2^- ise aldığı elektronu farklı elektron alıcısına aktararak indirgeyici rol oynayıp oksijenin oksitlenmesine neden olabilir (Nordberg ve Arner, 2001). Bu tepkimelerin sonucunda O_2^- yok edilmiş olur bu olaya da dismutasyon tepkimesi adı verilir. Canlılarda O_2^- oluşmasına sebep olan reaksiyonların başında şunlar gelmektedir.

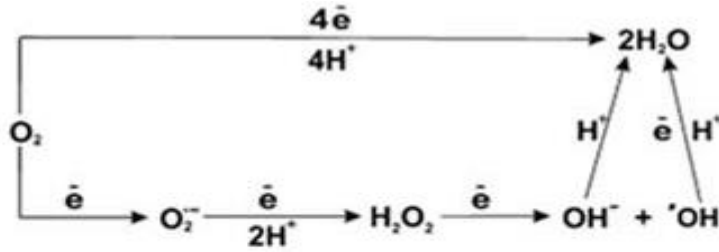
a) Farklı indirgenmiş boyalar, ferrodoksin, tetrahidropteridinler ve hemoprotein otooksidasyonu sonucunda O_2^- oluşabilir.

b) Ksantin oksidaz, dihidroorotat dehidrojenaz ve flavoprotein dehidrojenaz gibi bir takım enzim tepkimeleri sonucunda O_2^- meydana gelebilir.

c) Oksidaz ve hidroksilaz gibi enzim tepkimelerinde ara ürün olarak O_2^- oluşabilir.

d) Fagositoz yapabilen hücreler de (makrofajlar, nötrofil eozinofil gibi) önemli miktarda O_2^- oluşturabilirler ancak sulu ortamlarda O_2^- fazla miktarda birikemez ve dismutasyona uğrayarak kendi kendine temizlenir.

Oksijenli solunum yapan canlılarda mitokondri kristalarında bulunan elektron taşıma sistemi (ETS) moleküler oksijenin kullanıldığı en önemli kısımdır. Bundan dolayı da mitokondri bu canlılarda O_2^- üretildiği en önemli organeldir. Mitokondri kristasında bulunan ETS’de hareket eden elektronu son olarak tutan molekül oksijendir. Kristada meydana gelen bu olayda elektronlar önce koenzim Q’ya (ubikinin), sonra sitokromlara aktarılır. Daha sonra, sitokrom a_3 ’e bağlı oksijen ETS tarafından aktarılan bu elektronları yakalar. Mitokondride ETS’de O_2^- oluşmasına neden olan iki bölge olduğu bilinmektedir. Mitokondride oluşan O_2^- nin 1/3’ ü flavoprotein olan NADH dehidrojenazdır. Oluşan O_2^- nin 2/3’ lük kısmı ise koenzim Q- sitokrom b kısmıdır. Doğal koşullarda ETS’de kullanılan oksijenin % 1.5 gibi küçük bir miktarı O_2^- oluşumu ile neticelenir. Hangi nedenle olursa olsun oluşan O_2^- birtakım reaksiyonlarla diğer oksijen radikallerinin oluşmasına sebep olabilir (Şekil 1.4). Öncelikle belirtilen tepkimelerle kendi kendine dismutasyona uğrayabilir, bulunduğu bölgeden bir adet proton (H^+) alıp perhidroksi radikalın, (HO_2) oluşturabilir, H_2O_2 ile tepkimeye girip hidroksil radikali ($OH\cdot$) ve singlet oksijeni (1O_2) oluşturabilir (Kılınç, 1985).



$\text{O}_2 + \text{e}^- \rightarrow \text{O}_2^{\bullet-}$ Süperoksit Anyonu

$\text{O}_2^{\bullet-} + \text{e}^- + 2\text{H}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$ Hidrojen Peroksit

$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{e}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{OH}^\bullet$ Hidroksil Radikali

$\text{OH}^\bullet + \text{e}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}$ Su

Şekil 1.4. Organizmalardaki oksijen metabolizması ve reaktif oksijen türleri arasındaki dönüşüm (Akbulut ve ark., 2014).

1.6.1.2. Hidroksil Radikali

İlk olarak 1934 senesinde $\text{O}_2^{\bullet-}$ 'nin hidrojen peroksit (H_2O_2) ile tepkimeye girmesi sonucu hidroksil radikalinin ($\text{OH}^\bullet$) olduğu Haber ve Weiss tarafından bildirilmiştir. Sonraki çalışmalarda redoks katalizörü olarak görev yapan şelat yapmış demir gibi bir geçiş metalinin Haber-Weiss reaksiyonunun biyolojik sistemlerde de oluşabildiği ve bu şekilde $\text{OH}^\bullet$ olduğu gösterilmiştir (Ahmad, 1995). Diğer taraftan $\text{O}_2^{\bullet-}$ 'nin bir kısmı dismutasyona uğrayıp kendi kendine H_2O_2 oluşturur. Biriken H_2O_2 $\text{O}_2^{\bullet-}$ ile etkileşime girip $\text{OH}^\bullet$ meydana getirir. Fenton tepkimesi in vivo ortamda $\text{OH}^\bullet$ neden olan önemli bir tepkime olarak gösterilse de Haber-Weiss tepkimesinin aynı ortamda $\text{OH}^\bullet$ üretiminde en önemli reaksiyon olduğu gösterilmiştir. Oksijen radikalleri içinde en reaktif olan $\text{OH}^\bullet$ ' dir. Bu özelliğinden dolayı da en çok toksik etki gösteren oksijen radikalidir (Halliwell ve Gutteridge, 1990).

1.6.1.3 Singlet Oksijen

Ortamdaki O_2^- ve H_2O_2 birikimine bağlı olarak Singlet oksijen (1O_2) oluşur (Khan ve Kasha, 1994). O_2^- nin kendi kendine dismutasyonu, O_2^- ve OH^- etkileşimi ve Haber-Weiss reaksiyonu gibi çeşitli reaksiyonlar 1O_2 oluşmasına neden olabilir (Ahmad, 1995).

1.6.2. Oksidatif Stresten Korunma Mekanizmaları

1.6.2.1. Antioksidanlar

Antioksidanlar, oksijenin tahrip edici reaksiyonuna (oksidasyon) karşı koruyucu özellik gösteren maddelerdir. Organizmalar gerek iç (sindirim, solunum, hastalık, yaralanma vb.), gerekse dış (çevresel faktörler) etkenlerin uyarılarıyla sürekli zorlanmaktadır. Bu zorlanmalar sırasında ve sonrasında oluşan oksidan moleküller hücrelere ve dokulara saldırarak tahribata neden olur (Quiles ve ark., 2002)

Organizmada, reaktif oksijen türlerini ve diğer prooksidanları, düşük molekül ağırlıklı serbest radikal gidericiler ve antioksidan enzimlerle sürekli etkisizleştiren bir sistem mevcuttur. Reaktif oksijen türlerine karşı hücre içi ve hücre dışı enzim ve nonenzim (enzim olmayan) savunma mekanizmasına antioksidan savunma sistemi denilmektedir (Ritola ve ark., 2002, McLean ve ark., 2005). Antioksidan savunma sistemi ROT'u ortadan kaldırır; bu nedenle, sucul organizmaların metal maruz kaldıktan sonra oluşan etkilerinin biyobelirteçleri olarak kullanılması önerilmiştir (Li ve ark. 2009; Atli ve Canli 2010).

Balıklarda özellikle karaciğer ve böbrek, metallerin neden olduğu oksidatif stresten korumak için katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) vb.'den oluşan antioksidan savunma sistemleri ile donatılmıştır (Basha ve Rani, 2003). Antioksidan enzimler, Cu^{2+} ve/veya Fe^{3+} varlığında süperoksit radikali ve hidrojen peroksit arasındaki Haber-Weiss reaksiyonu yoluyla üretilen reaktif ve zararlı hidroksil radikalının nispeten düşük bir seviyesinin korunmasına katkıda bulunur

(Hidalgo ve ark., 2002; Sanchez ve ark., 2005). Antioksidanlar 4 farklı mekanizma ile oksidanların zararlarını önlerler (Wang ve ark., 2006).

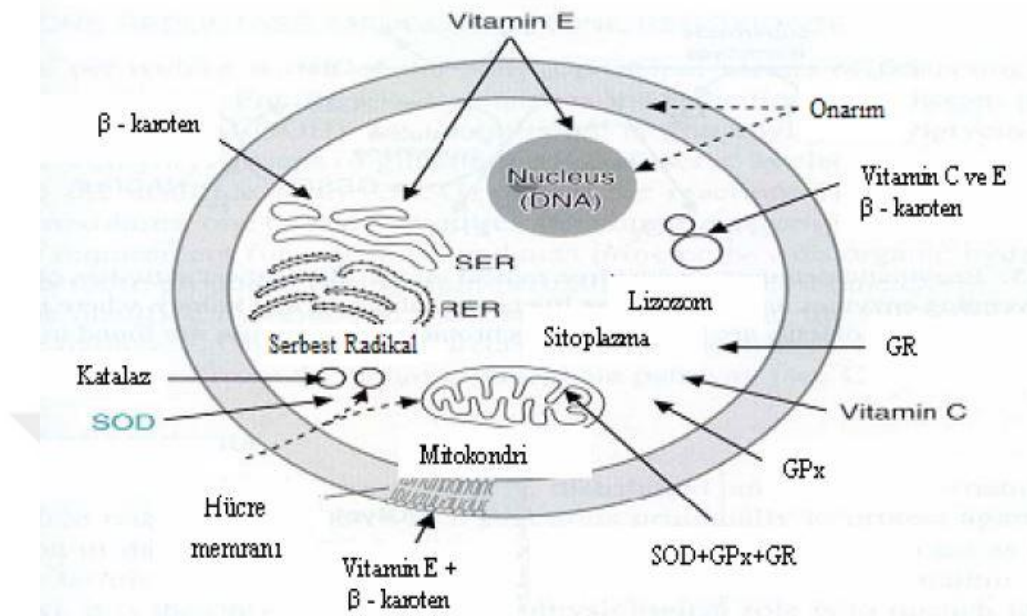
a. Temizleme etkisi: Enzimler tarafından oksidan molekülleri zayıf hale getirilmesi ve oksijen ile reaksiyona girerek ya da onun yerini alıp lokal oksijen konsantrasyonunu azaltabilmeleri,

b. Baskılama etkisi: Oksidanlara bir hidrojen molekülü verilerek hidroksil radikali yapısında yer alan hidrojen atomları ile bağ oluşturabilecek yapıdaki ürünleri temizleyip peroksidasyonun başlamasını önleyebilmeleri,

c. Onarma etkisi: Serbest radikallerin oluşturduğu hasarları onarabilmeleri,

d. Zincir koparma etkisi: Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyen bu etki hemoglobin, seruplazmin ve E vitamini tarafında yapılır. Zincir kırıcı antioksidanlar arasında fenoller, aromatik aminler ve en yaygın olan α - tokoferoller yer almaktadır.

Balıklarda hücre içi enzim yapısına sahip antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon-S-transferaz, glutatyon redüktaz (GR) enzimleridir (Heiske, 2005, Filho, 2007). Hücre içi nonenzim lipid faz antioksidanlar; vitamin E (α - tokoferol formu), β -karoten (vitamin A'nın ön maddesi)'dir. Vitamin C (askorbik asit), ürat, sistein, bilirubin, albumin, transferrin, flavanoidler, glutatyon hücre içi sıvı faz nonenzim antioksidanlardır (Quiles ve ark., 2002). Hücrenin antioksidan savunma mekanizması Şekil 1.5'te görülmektedir (Jhonsson, 2003).

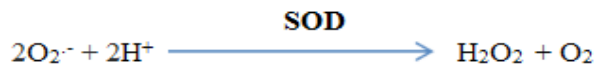


Şekil 1.5. Hücresin antioksidan savunma mekanizması (Tuna Keleştemur ve Özdemir, 2011).

1.6.3. Antioksidan Sistem Enzimleri

1.6.3.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Reaktif oksijen türlerine karşı ilk savunma hattını oluşturur (Sen ve ark., 2010, Sen ve Chakraborty, 2011). Süperoksit dismutaz, süperoksit radikalini ($O_2^{\cdot-}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) katalizleyen enzimatik bir antioksidandır. Hidrojen peroksit daha sonra, katalaz (CAT) ya da glutatyon peroksidaz (GPx) ile ortamdan uzaklaştırılır (Young ve Woodside, 2001).



İnsanlarda SOD'un üç formu bulunur. Bunlardan bakır (Cu) ve çinko (Zn) içeren süperoksit dismutaz (Cu/Zn SOD) sitozolde, manganez (Mn) içeren

süperoksit dismutaz (Mn SOD) mitokondride ve ekstrasellüler süperoksit dismutaz (EC SOD) hücre dışı sıvılarda bulunur (Sen ve Chakraborty, 2011, Young ve Woodside, 2001).

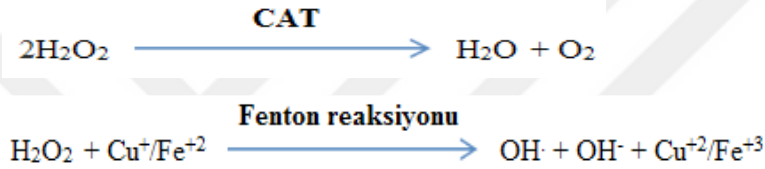
Süperoksit dismutaz izoenzimlerinden sitozolik dimerik Cu/Zn SOD, 32 kDa molekül ağırlığına sahiptir ve iki eşit alt ünitelerden oluşur. Her bir alt ünitesinde bir Cu ve bir Zn atomu içerir. Hücrelerde en bol bulunan SOD formudur (Mruk ve ark., 2002, Nordberg ve Arner, 2001). Bir diğer SOD izoenzimi olan Mn SOD, 80 kDa molekül ağırlığına sahiptir. Mitokondriyal bir enzim olup dört eşit alt üniteye sahiptir. Aktif bölgesinde Mn^{+3} bulundurmaktadır. Farklılıklara rağmen Cu/Zn SOD ile aynı reaksiyonu katalizlemektedir (Fridovich, 1995, Orbea ve ark., 2000).

Ekstrasellüler süperoksit dismutaz (EC SOD), 135,000 kDa moleküler ağırlığa sahiptir. Organizmalarda öncelikli olarak homotetramer formda bulunmasına rağmen, tetramer, dimer ya da multimer formlarda da bulunabilir. Ekstrasellüler süperoksit dismutaz, her bir alt ünitesinde bir Cu ve bir Zn atomu içerir. Bakır ve çinko enzimatik aktivite için gereklidir. Ekstrasellüler süperoksit dismutazın öncelikli yeri ekstrasellüler matriks ve hücre yüzeyleridir. Bu bölgelerde plazmada bulunandan daha yüksek yoğunlukta bulunur. Ekstrasellüler süperoksit dismutaz, fibroblast hücreleri, glia hücreleri ve endotel hücreleri tarafından salgılanmakta ve sentezlenmektedir. Akciğer dokusunda tip II epitel hücrelerinin ve solunum yolları ile kan damarlarını çevreleyen düz kas hücrelerinin yoğunluğuna bağlı olarak EC SOD seviyeleri yüksektir. Ekstrasellüler düzeyde enzimatik olarak $O_2^{\cdot-}$ leri etkisizleştirebilen tek antioksidan olması sebebiyle, EC SOD oksidan hasarı, yangı ve fibrozis gibi birçok akciğer hastalıklarından korunmada çok önemli bir role sahiptir (Gao ve ark., 2008)

1.6.3.2. Katalaz (CAT)

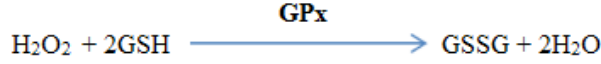
Katalaz, dört protein alt birimden meydana gelir. Her bir alt birim, bir hem grubu ve bir NADPH molekülü içerir (Young ve Woodside, 2001, Kirkman ve ark., 1987). Birçok katalazda NADPH molekülü yüzeye yakın ve sıkıca bağlıdır

(Zamocky ve Koller, 1999). Katalaz, büyük ölçüde peroksisomlar gibi hücre içi organellerde ve daha az olarak mitokondri ve endoplazmik retikulumda bulunur. Hidrojen peroksitin, H_2O ve O_2 'ye dönüşümünü katalize eder (Limon-Pacheco ve Gonsebatt, 2009). Süperoksit radikali, SOD aracılığıyla H_2O_2 dönüştürülür. Hidrojen peroksit bir radikal olmamasına ve biyolojik önemi olan moleküllerin çoğu ile reaksiyona girmemesine rağmen, Cu ve Fe iyonlarının katalizörlüğünde Fenton reaksiyonu ile en reaktif oksijen türü olan hidroksil radikali ($OH\cdot$) oluşumunda bir ön madde olarak rol oynamaktadır (Cheung ve ark., 2001, Larson, 1988).



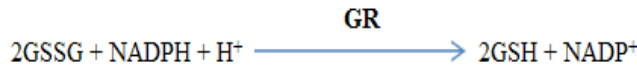
1.6.3.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx)

Glutasyon peroksidaz, hücrelerin sitoplazmasında bulunup H_2O_2 'den kaynaklanan oksidatif hasara karşı hücreleri korur. Böylece H_2O_2 'den $OH\cdot$ 'nin oluşmasını engeller. Glutasyon peroksidaz, dört protein alt biriminden oluşur. Her bir alt birim bir selenyum atomu içerir (Sen ve Chakraborty, 2011). Glutasyon peroksidaz, elektron kaynağı olarak glutasyonu (GSH) kullanarak H_2O_2 'yi ve organik hidroperoksitleri (lipit hidroperoksitler, DNA hidroperoksitler) metabolize eden bir enzimdir. Glutasyon peroksidaz enziminin iki ana tipi saptanmıştır. Bunlardan biri aktif bölgesinde selenyum içeren selenyuma bağımlı glutasyon peroksidaz (Se-GPx)'dir. Selenyuma bağımlı glutasyon peroksidaz, H_2O_2 ve organik hiperoksitlere karşı etkilidir. Selenyuma bağımlı olmayan glutasyon peroksidaz (GST) ise daha çok organik hidroperoksitlerin metabolize edilmesinde faaliyet gösterir (Cnubben ve ark., 2001, Reiter ve ark., 1995). Bu metabolize etme reaksiyonları sırasında GSH, hidrojen verici olarak hareket ettiğinden dolayı H_2O_2 ve hidroperoksitler indirgenirken GSH okside olur (Reiter ve ark., 1995).



1.6.3.4. Glutasyon Redüktaz (GR)

Glutasyon redüktaz, flavin adenin dinükleotid (FAD) içeren flavoprotein bir enzimdir. Glutasyon redüktaz, NADPH'nin bir elektronunu okside glutasyonun disülfid bağlarına aktararak yeniden GSH'ye dönüştürülür. Bu nedenle NADPH serbest radikal hasarını engellemek için gereklidir ve en önemli kaynağı heksoz monofosfat (pentoz fosfat) yoludur (Sen ve ark., 2010, Özkan ve Fışkın, 2004). Okside glutasyon, glutasyon disülfittir (GSSG). Glutasyon redüktaz (GR) enzimi varlığında okside glutasyon redükte glutasyon haline geri indirgenir. Bu indirgenme reaksiyonu esnasında GR elektron vericisi olarak NADPH'yi kullanır (Sen ve Chakraborty, 2011, Reiter ve ark., 1995).



1.6.3.5. Glutasyon-S-Transferaz (GST)

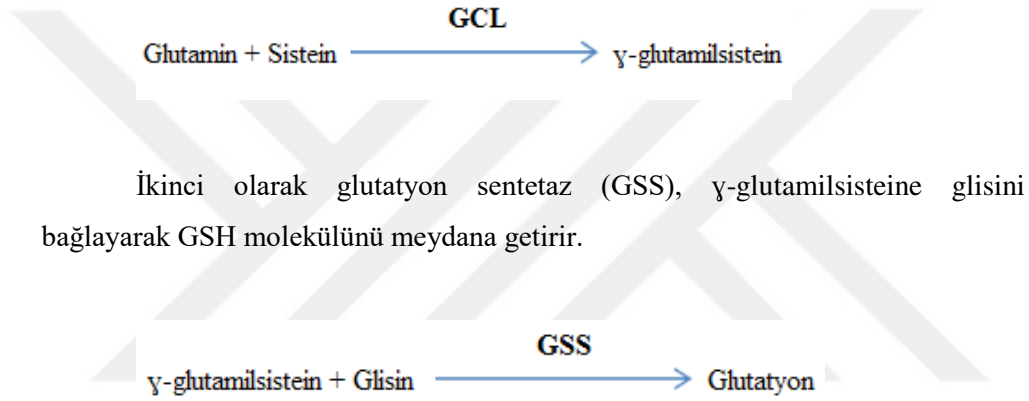
Glutasyon S-transferazlar çeşitli izoformları (örn., GST-mu, GST-teta, GST-kappa ve GST-sigma) içeren bir hücrel antioksidan enzim grubudur. GST'ler, glutasyonu (GSH) birleştirerek ksenobiyotikleri detoksifiye eder ve lipid hipoperoksitler, yağ asidi hipoperoksit ve kolesterol hidropereksit gibi endojen bileşikler detoksifiye ederek hücrel ROT'ları azaltabilir (Hayes ve ark., 2005).

1.6.4. Glutasyon Metabolizması ve Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Glutasyon, hemen hemen bütün ökaryotik hücrelerde sentezlenir. Bundan dolayı yüksek yoğunluklarda bulunur. Glutasyon bir antioksidan olarak hareket eder ve ayrıca hücrenin redoks durumunu korumada, detoksifikasyon sisteminin çalışmasında, eikosanoidlerin sentezlenmesinde, hücre sinyal mekanizmasının

düzenlenmesinde, gen ekspresyonunda ve apoptozisde de antioksidan olarak faaliyet gösterir (Townsend ve ark., 2003). Glutatyonun yaklaşık olarak %85-90'ı sitoplazma da bulunur. Fakat bazen GSH sitoplazmada sentezlendikten sonra mitokondri, çekirdek, peroksizomlar ve endoplazmik retikulumda da bulunabilir (Green ve ark., 2006, Kalinina ve ark., 2014).

Glutatyonun sentezlenmesi iki önemli aşamada olur. İlk olarak glutamin-sistein ligaz (GCL), glutamin ve sisteini bağlayarak γ -glutamilsisteini oluşturur.



Glutamin-sistein ligaz, katalitik (GCLC) ve düzenleyici (GCLM) alt birimlerden oluşmaktadır. Glutamin-sistein ligazın katalitik alt birimi, katalitik aktivite için sistein ve glutaminin bağlanmasından sorumludur. Glutamin-sistein ligazın düzenleyici alt birimi ise GCLC'nin etkisini artırır (Lagman ve ark., 2015, Pei ve ark., 2013).

GSH, glutatyon peroksidaz tarafından yönetilen peroksitlerin indirgenmesinde bir elektron donörü görevi görerek GSH disülfid (GSSG) oluşumuna yol açar. GSSG, GR vasıtasıyla elektron donörü olarak NADPH tüketimi ile GSH'ye dönüştürülür. GSH/GSSG oranı genellikle hücre ve dokulardaki oksidatif stresi belirtmek ve bir hücrenin redoks durumunu ifade etmek için kullanılır (Sevgiler ve ark. 2007).

Toplam GSH seviyeleri, GSH-S-konjugatlarının oluşumu sırasında veya hücrelerden GSH metabolitlerinin salınmasıyla düşer. GPX, katalizi yoluyla peroksit veya hidroperoksitleri deaktive eden bir enzimdir. Oksidasyon indirgeme işlemi sırasında peroksitler suya, hidroperoksitler ise hidroksil bileşiklerine indirgenir (Pinto ve ark. 2003; De Zoysa ve ark. 2009). Diğer antioksidan bileşikler tükendiğinde, toksik maddelerin neden olduğu oksidatif strese karşı koyma çabasında glutasyon metabolizması çok önemlidir (Radi ve Matkovics 1988; Martinez-Alvarez ve ark. 2005).

GSH plazma membranından aminoasit transportunu sağlar, bazı önemli antioksidanları yeniden oluşturur. Vitamin E ve vitamin C GSH tarafından düzenlenir. Örneğin GSH direkt olarak vitamin E'nin tokoferol radikalini, dolaylı olarak da askorbatı semidehidroaskorbata indirgeyebilir (Sen ve Chakraborty, 2011).

1.6.5. Reaktif Oksijen Türlerinin Homeostazisi ve Hücre Bileşenlerine Zararları

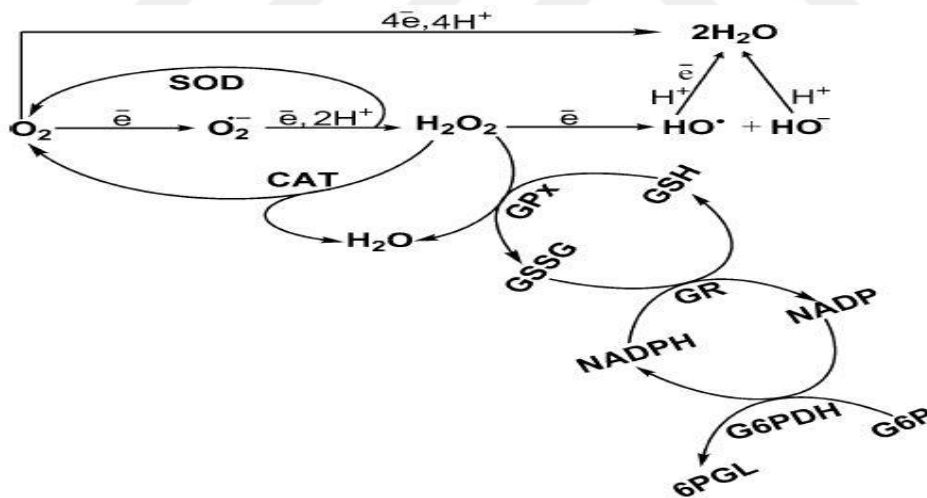
1.6.5.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Homeostazisi

Ökaryotlarda aerobik koşullar altında kullanılan oksijenin %90'ından fazlası mitokondrideki elektron taşıma sisteminde (ETS) reaktif oksijen türleri (ROT) üretimi olmadan dört elektronlu mekanizmalar kullanılarak sitokrom oksidaz tarafından direkt olarak suya indirgenir (Ott et al. 2007; Skulachev 2012).

Organizmalar tarafından oksijenini %90'dan fazlası Adenozin tri fosfat (ATP) şeklindeki enerjiyi üretmek için kullanılmasına rağmen (ETS'nin oksidatif fosforilasyonla birleşme yoluyla), kullanılan oksijenin %10'dan çok daha azı moleküler oksijenin süperoksit anyon radikaline (O_2^-) çevirimi ile başlayan tek elektronlu sıralı yollarla indirgenir (Şekil1.6). Tek elektronlu mekanizma yoluyla art arda hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($HO\cdot$) ve son olarak su (H_2O) oluşturmak için daha da indirgenebilir. Oluşan ara maddelerden O_2^- ve $HO\cdot$ dış elektron orbitallerinde eşleşmemiş elektronlara sahiptir ve bu nedenle serbest

radikaller olarak adlandırılırlar. H_2O_2 bu çeşit elektronlara sahip olmadığı için serbest radikal değildir. O_2^- , H_2O_2 , $HO\cdot$ her üç tür de moleküler oksijenden daha aktiftir ve topluca ROT adını alırlar. ROT'lerin reaktivitesinin $HO\cdot > O_2^{\cdot-} > H_2O_2$ şeklinde azaldığı bilinmektedir (Halliwell ve Gutteridge 1989).

Birçok ROT, mitokondri elektron taşıma sisteminden moleküler oksijene kaçan elektronların sonucunda üretilir. Kaçan bu elektronlar moleküler oksijen ile etkileşime girerek süperoksit anyon radikalini ($O_2^{\cdot-}$) üretir sonrasında kendi kendine ya da enzimatik yollarla hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikaline ($HO\cdot$) dönüşürler. ETS' den kaçan elektron miktarı canlının fizyolojisine ve ortamdaki oksijen varlığına bağlı olarak değişmektedir. Belirli bir miktarda ROT, endoplazmik retikulum (ER), plazma ve çekirdek membranlarında bulunan ETS'de de üretilmektedir. Bazı karbohidratlar, aminoasitler, heterosiklik ve diğer bileşikler üzerinde etkili olabilen farklı oksidazlarda ROT üretir (Bartosz 2009).



Şekil 1.6. Moleküler oksijenin bir elektron ve dört elektronla indirgenmesi ve birinci ve ikinci sıra antioksidan enzimler (Lushchak, 2016)

1.6.5.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Hücre Bileşenlerine Zararları

ROT'un lipidler, karbohidratlar, proteinler, nükleik asitler v.s. gibi neredeyse bütün hücresel bileşenlerle etkileşime girebildiği iyi bilinmektedir.

ROT'nin modifiye ettiği lipitler ile karbonhidratlar, toksik son ürünlere dönüştürülebilir. Birkaç istisna dışında benzer bir durum, oksitlenmiş proteinler belirli sistemler tarafından indirgendiğinde de meydana gelir (Lushchak 2007). ROT'nin etkilediği RNA bozulmakla birlikte, hasar çok büyük değilse, spesifik onarım sistemleri aracılığıyla DNA onarılır.

1.7. Deneyde Kullanılan Ağır Metallerin Özellikleri ve Kullanım Alanları

1.7.1. Cıva

Cıva; kimyasal, atom numarası 80 özgül ağırlığı 13,6 gr/cm³ olan bir elementtir. Cıva normal şartlarda element formundadır ve normal sıcaklık değerlerinde sıvı olan tek metaldir. Cıvanın rengi gümüşidir. Isıtıldığında da, oda sıcaklığında da buharlaşabilir ve cıvadan çıkan buhar zehirlidir. Zehirliliğin ölçülmesindeki en önemli etken cıvanın yapısıdır. Toksisite açısından büyük öneme sahip olan ve cıvanın en toksik hali olan metil cıva kolayca çevrede ve hayvan dokularında birikebilir (Vural, 1993). Metil cıva ve diğer yapay ve organik cıva bileşikleri 1900' lerin ilk yıllarında mantarlara karşı tahıl tohumlarını korumada kullanılmış fakat sonradan alkil cıva bileşiklerinin tohumlarda kullanılması dünyada yasaklanmıştır.

Cıva dünyada bulunan en zehirli yirmi madde arasında gösterilmektedir (ATSDR, 2018). Cıva kloralkali endüstrisinde ve tarımsal çalışmalarda, mantarlarla mücadelede, elektrikli aletlerin üretiminde, ilaç endüstrisinde, selüloz ve plastik imalatında sıklıkla kullanılan bir elementtir. Cıva ister inorganik isterse organik formda olsun bütün canlılarda eser miktarı dahi çok zehirli olan bir elementtir (Plessi ve ark. 2001). Cıvanın akuatik ortamlardaki kalıcılıklarının uzun, hareketliliğinin yüksek olmasından dolayı sucul canlılarda birikerek besin zinciri yoluyla insanlarda dahil besin zincirinin üst basamaklarına geçiş yapmaktadır. İnsanlar için nörotoksik bir ajan olan cıvanın diğer canlılar içinde nörotoksik etki gösterdiği iyi bilinmektedir (Diez, 2008). Bunun dışında cıva serbest oksijen radikallerinin meydana gelmesine ve oksidatif strese sebep olarak hücreler için

önemli olan savunma mekanizmalarını bastırabilmekte ve lipid peroksidasyonuna sebep olabilecek etkiler göstermektedir (Berntssen ve ark. 2003). Biyomoleküllerde bulunan sülfhidril (–SH) gruplarına Hg büyük ilgi göstermektedir. Bundan dolayı Hg vücuda girdikten sonra molekül ağırlığı düşük olan sistein ile glutatyon gibi tiyoller iletiyol içerikli proteinlere tutunup dokularda ve organlarda uzun zaman kalarak protein, yağ ve DNA oksidasyonuna sebebiyet veren serbest radikallerin meydana gelmesine sebep olabilmektedir (Perottoni ve ark. 2004).

Cıva; hava, su ve toprakta farklı şekillerde bulunur. Maden filizi olarak ve kömür, petrol gibi fosil yakıtlarda doğal olarak bulunur. Bunlar, elementel cıva, inorganik ve organik cıva bileşikleri şeklindedir (Bahçebaşı, 2011). Gelişmiş teknolojide cıva ve bileşenleri, tarımsal ilaçlarda, boya, kâğıt ve diğer endüstri kollarında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır.

Diş hekimlerinin diş dolgusunda kullandığı amalgamda cıva bulunmaktadır ve amalgamdaki cıva, ağızda yemekler çiğnenirken ve sıcak ya da pH' ı yediden düşük besinlerin etkisiyle ağız içinde cıva buharı meydana gelir (Pehlivan ve ark., 1993; Bahçebaşı, 2011). Gıda Sağlık Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) gıdalardaki cıva düzeyinin en fazla 0,05 ppm (mg/kg) olması gerektiğini bildirmiştir.

Fosil yakıt kullanımı, madencilik alanında cıva bulunduran kayaların parçalanması, katı atıkların biriktirildiği bölgelerde oluşan sızıntılar, atık bataryaların gelişi güzel atılması, diş hekimlerinin kullandığı amalgam diş dolguları ve cıva içeren ev aletlerinin kırılması gibi insan etkenleriyle senede 20 bin ton cıva doğaya geçmektedir. Bu da hem havada hem de suda cıva seviyesinin artmasına neden olmaktadır. Cıva ile kirletilmemiş yer üstü sularında belirlenen cıva seviyesi 0,1 mg/L' den azdır. Fakat cıva ile kirlenmiş olanlardaki cıva değeri 0,03 mg/L' den fazla olduğu görülmüştür (Gray, 2008).

1.7.2. Krom

Tabiatta her ortamda rastlanabilen bir metal olan krom, kirlenmemiş sulara yaklaşık 1 µg/L düzeyinde bulunurken, havada bu oran $>0,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ şeklindedir. Vücuttaki insülin dolaşımını gerçekleştirerek karbonhidrat, su ve protein metabolizmasına etki eder. Çoğu toprakta eser miktarda (2-60 mg/kg) bulunurken, krom kirliliği olmayan topraklarda bu 4 g/kg'a kadar yükselmektedir.

İçinde bulunduğumuz dönemde krom alaşım elementi şeklinde kullanılır. Krom bulunduran mineral maddelerin endüstri alanındaki oksidasyonu ile petrol, kömür gibi fosil yakacakların, ağaç ve kâğıt mamullerinin yanması sonucunda tabiatta krom meydana gelmektedir (Kahvecioğlu ve ark. 2004).

1.7.3. Nikel

Nikel yirmi sekiz atom numarasına sahiptir. Kayaçların aşınması ile oluşan toprağın yapısında iz element olarak bulunur. Nikel toprakta Fe ve Al silikatlarının kristal yapısında bulunur. Nikele genellikle sülfat ile oksitler şeklinde rastlanır. Taşkürede rastlanma sıklığı bakımından yirmi dördüncü sıradadır. Ortalama yoğunluğu %0,008 Ni' nin miktarı 100 mg/kg' i geçtiğinde toksik tesir yaratmaktadır (Yıldız, 2001). Kadmiyum gibi pil ve akü üretiminde, metal para, elektronik, çelik ve besin endüstrisinde kullanılır. Bununla beraber nikelin nebati yağların hidrojenle doyurulmasında katalitik görevi vardır. Ni en büyük kirlilik kaynakları arasındadır. Organik şekli inorganik şeklinden daha toksiktir. Deriyi tahriş eder bununla birlikte dolaşım sistemine zararı büyüktür ve kansere neden olan bir metaldir. Bunca zararlı etkisine karşılık Ni ve Ni tuzlarıyla zehirlenmeye ender şekilde rastlanır (Kartal ve ark., 2004). Buna ek olarak Ni' nin gelişmiş yapılı bitkilere gerekli olduğu anlaşılmıştır.

1.7.4. Çinko

Çinko, rengi maviye benzer açık gri olan kırılabilen bir metaldir. Periyodik cetvelde geçiş elementleri arasında bulunur. Dikkat edilmesi gereken

özelliklerinden birisi kaynama noktasının düşük olmasıdır. Zn' nin toksik etkisi diğer ağır metallere göre daha düşüktür. Zn tuzlarının toksisitesi Zn kısmından daha fazla, birlikte bulunduğu bileşiğin anyonik tarafının toksisitesine bağlıdır. Örneğin; $ZnCrO_4$ ' ün (çinko kromat) yüksek toksik ve kanser yapıcı özelliği çinkodan değil anyonik CrO_4^{2-} (kromat) kısmı nedeniyledir (Habashi, 1997).

Ağır metaller arasında çinko çeşitli biçimlerde kullanılır ve sonunda nehir veya denize ulaşır. Fazla miktarda çinko, madencilik, kurşun ve kadmiyum cevherlerinin arıtılması, kömürün yakılması ve atıkların yakılması gibi insan faaliyetleri sonucunda çevreye girer. Normal gelişim ve metabolizma için küçük miktarlarda çinko gerekli olsa da (Srivastava ve Kaushik, 2001), seviyesi fizyolojik gereksinimleri aşarsa, toksik madde olarak hareket edebilir. Bu, balıklarda genel halsizlik, büyüme geriliği ile sonuçlanır ve vücutta çeşitli organlarda metabolik ve patolojik değişikliklere neden olabilir. (Ambrose ve ark., 1994; Sharma ve Sharma, 1994; Singh ve Gaur, 1997). Ağır metallerin ilgili tüm parametreler üzerinde olumsuz etkisi olduğu ve balıklarda histopatolojik değişikliklere neden olduğu kaydedilmiştir. Çinko vücuttaki en önemli eser elementlerden biridir ve çeşitli protein ve enzimlerin biyolojik işlevine katılır (Maity ve ark., 2008). Çinko, temel bir eser element olmasına rağmen, belirli konsantrasyonların üzerinde çoğu organizma için toksiktir (Ho, 2004).

1.8. *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758)

Tilapialar, Cichlidae ailesine ait tatlı su balıklarıdır ve özellikle Afrika ve Orta Doğu ile ilişkilidir (Trewaves, 1983). Çevreyi olumsuz yönde etkileyen kirleticilere karşı güçlü bir tür olan *Oreochromis niloticus* sucul kirlilik değerlendirilmesi deneylerinde çok sık kullanılan elverişli bir biyoindikatör türüdür (Pathiratne ve ark., 2009; Fırat ve Şahin İnandı, 2016). Çevresel değişimlere dayanıklı ve kolayca kültürü yapılabilen *Oreochromis niloticus* önemli bir tatlı su kültür balığıdır. (Ueng ve ark.,1996). Nil tilapiası (*Oreochromis niloticus*), dünyada kültürü yapılan ilk balık türlerinden biridir. Mısır mezarlarından alınan

çizimler, Nil tilapialarının 4.000 yıldan daha uzun bir süre önce, yani sazanın Çin'e tanıtılmasından yaklaşık 1000 yıl önce kültürlendiğini ileri sürülmüştür (Balarin ve Hatton, 1979). Pillay (1990), tilapiaların 20. yüzyılın ikinci yarısında dünyanın birçok tropikal, subtropikal ve ılıman bölgesine adapte edildiğini bildirmiştir. Tilapialar dünya çapında en çok kültürü yapılan balıklar arasındadır. Aslında, tilapiaların üretimi, balığı, 100'den fazla ülkede ticari olarak da yükselen 21. yüzyıl su ürünleri yetiştiriciliği için en önemli türlerden biri haline getirdi (Fitzsimmons, 2000).

2000 yılı için tahmini küresel tilapia üretimi, 1970 yılında sadece 28.260 metrik tona kıyasla 1.5 milyon metrik ton idi. Benzer şekilde, çiftlikte yetiştirilen tilapiaların değeri de 1984'te yaklaşık 154 milyon ABD dolarından 2002'de 1.800,7 milyon ABD dolarına yükseldi (FAO, 2004). Çin tek başına 706.585 metrik ton çiftlik tilapisi üretti (toplam dünya üretiminin %50'sini temsil ediyor), onu Mısır (167,7 metrik ton), Filipinler (122,4 metrik ton), Endonezya (109,8 metrik ton), Tayland (100,6 metrik ton), Tayvan (85,1 metrik ton) izledi. Diğer ülkelerden Brezilya (42 metrik ton), Kolombiya (24 metrik ton), Malezya (20,8 metrik ton) ve Laos (20,8 metrik ton) tilapya üretimim ile bilinmektedir. Çiftlikteki tilapialar 2004 yılında dünya çapında 2 milyon metrik tonu aşmıştı (FAO, 2004; El-Sayed, 2006).

Tilapialar dayanıklıdır ve çok çeşitli çevresel koşulları tolere edebilir; bu nedenle, tilapiaların kültürlenmesi için düşük teknoloji sistemi ile çok az çevresel değişiklik gereklidir (Pullin ve LoweMcConnell, 1982; Welcomme, 1988; Beveridge ve McAndrew, 1998; Nandlal ve Pickering, 2004).

Başlangıçta, tilapiaların diğer kültür balık türlerine kıyasla bakteriyel, parazitik, mantar ve viral hastalıklara karşı daha dirençli olduğu düşünülüyordu. Bununla birlikte, daha yakın zamanlarda, tilapiaların hem bakteriyel hem de paraziter hastalıklara duyarlı olduğu bulunmuştur. Yaygın tilapia patojenleri arasında *Streptococcus sp.*, *Flavobacterium columnare*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Ichthyophthirius multifiliis*, *Tricodhina sp.* ve *Gyrodactylus niloticus* bulunur (Klesius ve ark., 2008). Streptokok enfeksiyonlarının tilapia

yetiştiriciliğinde önemli bir sorun haline geldiğini ve ciddi ekonomik kayıplara neden olduğunu belirtmek önemlidir (Shoemaker ve Klesius, 1997).

1.9. Karaciğer

Karaciğer dokusu ağır metallerin taşınmasında ve detoksifikasyonunda görev yapan metal bağlayıcı proteinler ve buna benzer proteinlerin başlıca sentez yerlerinden biri olduğu için, kadmiyum detoksifikasyonundaki işlevi oldukça fazladır (De Conto ve ark., 1999, De Smet ve Blust, 2001, Serafim ve ark., 2002). Karaciğer, ksenobiyotik metabolizmanın birincil organıdır ve oksitlenebilen substratlar bakımından zengin oldukları için peroksidatif hasara karşı duyarlıdır (Mudipalli, 2007).

Balıkların karaciğeri, genel boşluğun kraniyal bölgesinde ventral olarak bulunan yoğun bir organdır. Boyutu, şekli ve hacmi, diğer iç organlar arasındaki boşluğa uyarlanmıştır. Birçok teleostei türünde karaciğer üç loba bölünmüştür. Ancak, bazı teleosteilerde lobülasyon ayırt edilmemiştir (Bruslé ve Anadon, 1996). Balık karaciğeri diğer omurgalılarıdaki gibi çok sayıda yaşamsal fonksiyonları denetleyen önemli bir organ olup yapım ve yıkım tepkimelerinde rol oynadığından balık fizyolojisi çalışmalarında kilit bir önemi bulunmaktadır (Brusle ve Anadon, 1996). Balıklarda başlıca metal depolama ve atılım yeri olan karaciğere, metabolizmadaki önemli rolü ve çevredeki metallere duyarlılığının bir sonucu olarak, toksikolojik araştırmalarda özel önem verilmiştir (Parvez ve ark. 2006).

1.9.1. Karaciğerin Görevleri

a. Yeni Alyuvarları Yapar ve Yaşlılarını Yıkar: Yaşlanan alyuvarlar karaciğerde tahrip edilerek hemoglobinden safra pigmentleri ve yeni alyuvarların hemoglobini yapılır. Kansızlık halinde alyuvarları meydana getirir. Sinüslerin çeperindeki retikulo-endotel hücreleri ile yeni alyuvarları yapar, kupfer hücreleri ile parçalar.

b. Safrayı Üretir ve Salgılar: Karaciğer sağ lobunun alt yüzeyinde safra kesesi (öd kesesi) bulunur. Karaciğer kanalı, karaciğerden çıktıktan sonra ikiye ayrılır. Bir kol fazla salgıyı safra kesesine götürür. Koledok kanalı adını alan diğer kol ise safrayı 12 parmak bağırsağındaki water kabarcığına akıtır.

c. Karbonhidrat Metabolizmasını Düzenler: İnsülin yardımıyla kandaki glikozu glikojen şeklinde depolar, gerektiğinde glukagon yardımıyla glikojeni tekrar yıkarak kana verir. Glikozun depolanandan da fazlasını başka besinlere (yağ) dönüştürür.

ç. Vitamin Üretir ve Depolar: Provitamin halindeki karoteni A vitaminine dönüştürür (Kupfer hücrelerinde yapar). A, D, E ve K vitaminleri ile demir ve bakır gibi bazı minareleri depolar.

d. Protein Metabolizmasını Düzenler: Proteinlerin yapısında yer alan 20 çeşit amino asidin 12 çeşidini sentezler ve depolar. Fazla proteini yağlara çevirir.

e. Yağ Metabolizmasını Düzenler: Karbonhidrat ve proteinlerin fazlasını yağa çevirir, yağları depolar.

f. Üre Sentezini Gerçekleştirir: Dokularda aminoasitlerin yıkımıyla oluşan ve çok zehirli bir madde olan NH_3 (amonyak) daha az zararlı üreye dönüştürülür. NH_3 , CO_2 ile birleşir.

g. Pıhtılaşmada Rol Oynar: Kanama sırasında pıhtılaşmayı sağlayan protrombin ve fibrinojeni üreterek kana verir. Kanın damar içerisinde pıhtılaşmasını engelleyen heparini meydana getirir.

ğ. Toksik Maddeleri Etkisiz Hale Getirir: Besinlerle ve kanla gelen toksik (zehirli) maddeleri parçalar (Kupfer hücreleri). Bunlardan en önemlilerinden ikisi H_2S ve H_2O_2 dir. Hidrojen peroksit katalaz enzimi ile su ve oksijene parçalanır.

h. Vücut Isısının Düzenlenmesine Etkisi: Karaciğer ısı üreterek kana verirler.

ı. Savunmaya Katkısı: Karaciğer hücreleri lenf yapımında da görevlidirler. Aynı zamanda antikorların büyük bir kısmını da yaparlar.

1.10. Amaç

Hızlı nüfus artışına bağlı olarak endüstrileşme de hızlanmaktadır. Bunun neticesinde de çevre kirliliği artmakta ve özellikle sucul ekosistemlerin ve bu ekosistemlerde yaşayan canlıların sağlığı bozulmaktadır. Oluşan bu kirliliğin sucul ekosistemlere olumsuz etkilerinin neler olduğu bu olumsuz etkilerin geri dönüşümünün imkansız hale gelmeden ya da onarılması çok güç hasarlar bırakmadan önce nasıl önüne geçilebileceği son zamanlarda tüm dünyada önemli araştırma konularından birisi haline gelmiştir.

Yaptığımız bu çalışmanın amacı farklı kalsiyum derişimlerinde (30, 60, 120 mg Ca/L) farklı metal türlerine (Cr^{+6} , Ni^{+2} , Zn^{+2} ve Hg^{+2}) maruz bırakılan model organizma *Oreochromis niloticus*'un karaciğerinde SOD, CAT, GPx, GR, GST ve GSH gibi enzimatik ve enzimatik olmayan (GSH) antioksidan sistem biyobelirteçlerinin tepkilerini belirlemektir. Bu deneylerin bulgularından yola çıkarak farklı sertlik değerlerine sahip doğal sularda metal etkisinde kalan balıkların yaşamış olduğu stres hakkında yorum yapmak ta bu çalışmanın amaçları arasındadır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Lopes ve ark. (2001), bakır madeni bölgesinde yakalanan İber endemik *Leuciscus alburnoides* de komple karaciğer dokusundaki antioksidan enzimler olan süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon S-transferazların (GST) çeşitleri üzerine ağır metaller ve selenyumun etkisini araştırmışlardır. İlkbahar mevsimi hariç olmak üzere kirletilmiş bölgeden getirilen balıkların GST etkinliğinin daha yüksek olduğunu ve iki bölge karşılaştırıldığında da GST'deki bu değişikliğin selenyum ve bakır seviyeleriyle ilişkili olduğunu, SOD aktivitesinin ise karşılaştırılan bölgelerde önemli bir değişiklik göstermediğini bildirmişlerdir.

Parvez ve Raisuddin (2006), 10 ppb bakır maruziyetinin 0,75 µg/L deltametrin ile indüklenen oksidatif sters üzerindeki modülatör etkisini tatlı su balığı *Channa punctata* (Bloch)' da araştırmışlar ve bakıra maruz kalan grubun karaciğerinde deltametrine maruz kalan grupla kıyaslandığında glutatyon düzeyinin önemli seviyede azaldığını tespit etmişler.

Atli ve ark. (2006), tatlı su balığı *Oreochromis niloticus* u 96 saat boyunca oksidatif strese neden olduğu bilinen gümüş (Ag^+), kadmiyum (Cd^{+2}), krom (Cr^{+6}) ve çinkonun (Zn^{+2}) farklı konsantrasyonlarına maruz bırakmışlar ve sonrasında karaciğer, böbrek, solungaç, barsak ve beyindeki katalaz (CAT) etkinliğini ölçmüşlerdir. İn vivo çalışmalarda katalazın gümüş dışında diğer tüm metallerle uyarıldığını, en fazla artışın (% 183) 1,0 mg Cd^{+2} /L maruziyetinde olduğunu buna karşılık 0,5 mg Ag^+ /L de keskin bir azalışın (% 44) olduğunu belirtmişlerdir. Kadmiyum ve çinkonun Tilapia böbreğindeki CAT etkinliğine önemli bir etkisinin olmadığını fakat 0,1 mg Cr^{+6} /L maruziyetinin katalaz etkinliğinde azalmaya (% 44) sebebiyet verdiğini açıklamışlardır. Solungaçtaki katalaz etkinliğini kadmiyum ve çinkonun önemli derecede etkilemediğini ancak 0,5 mg Ag^+ /L maruziyetinde katalaz etkinliğinin artış (% 66), 1,5 mg Cr^{+6} /L maruziyetinde ise azalış (% 97) olduğunu bildirmişlerdir. Bağırsakta bakır dışındaki tüm metallerde katalaz aktivitesinde büyük düşüşler görüldüğü, beyinde ise 1,0 mg Zn^{+2} /L' de katalaz

aktivitesinde (%126), 1,5 mg Ag⁺/L' de bir azalmanın (%54) olduğu bildirmişlerdir. İn vitro çalışmalarda ise böbrekte gümüş ve bakır dışında tüm metaller çalışılan bütün dokularda katalaz etkinliğini önemli ölçüde azalttığını belirtmişlerdir. Sonuç olarak katalazın antioksidan savunma mekanizmasının duyarlı bir biyobelirteci olarak kabul edilebileceğini vurgulamışlardır.

Vutukuru ve ark. (2006), 96 saat boyunca bakırın subletal (0.55 mg/L) ve letal (5.5 mg/L) dozlarına maruz bıraktıkları *Esomus danricus*'un süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktivitesi gibi biyokimyasal stres cevaplarını ölçmüşler ve bakırın balıklar için son derece toksik olduğunu, çalıştıkları tüm biyokimyasal parametrelerde önemli düşüslere neden olduğunu bulmuşlardır. Sonuç olarak su ortamındaki bakır kirliliğine karşı *E. danricus*' un antioksidan cevaplarının oksidatif stresin biyomarkırları olarak kullanılabileceğini açıklamışlardır.

Fırat ve Kargın (2009), 7 ve 14 gün boyunca 5,0 mg/L çinko (Zn), 1,0 mg/L kadmiyum (Cd) ve 5,0 mg/L çinko (Zn) + 1,0 mg/L kadmiyum (Cd) karışımlarına bırakılan *Oreochromis niloticus*'un alyuvar antioksidan sistemlerine etkisini belirlemek için indirgenmiş glutatyon (GSH), katalaz (CAT) ve glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) etkinliklerini araştırmışlar ve alyuvar GSHdüzeyi ile CAT ve G6PD enzim etkinliklerinin hem tek hem de kombine Zn ve Cd'da artış gösterdiğini belirlemişlerdir. CAT etkinliğindeki artışın tek Zn' de tek Cd ve Cd+Zn karışımından daha düşük olduğunu belirlemişler. Sonuç olarak metallerin balıkların alyuvarlarında oksidatif strese sebep olduğunu ve buna karşı koruma amacıyla CAT ve G6PD etkinlikleri ile GSH düzeyinde artış olduğunu bildirmişlerdir.

Jos ve ark. (2009) balık hücre hatlarında pro-oksidan kaynaklı GSH içeriklerindeki değişimleri ölçmek amacıyla üç floresan boyanın (monoklorobiman (mBCI), 5-klorometilfloresein diasetat (CMFDA) ve 7-amino-4-klorometilkumarin (CMAC- Mavi) hassasiyetini ve özgüllüğünü ölçmeyi hedefledikleri çalışmada EPC ve BF-2 olmak üzere iki hücre dizisi incelemişlerdir EPC dizisini *Cyprinus*

carpio'nun deri tümöründen, BF-2 hücre dizisini *Lepomis macrochirus*'un yüzgeçlerinden oluşturmuşlardır. Hücreleri 6 ile 24 saat süresince hidrojen peroksit (H_2O_2), parakuat (PQ), bakır ve GSH sentez inhibitörü L-butyonin-SR-sülfoksimin (BSO) dahil olmak üzere düşük sitotoksik pro-oksidan yoğunluklarına bırakmışlar ve sonuçta EPC ve BF-2 hücreleri arasındaki GSH cevabındaki farklılığın orta seviyede olduğunu ama dört pro-oksidan için GSH cevabının farklılıklarının belirgin büyüklükte olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, GSH boyasının seçimi, CMFDA'nın GSH için mBCl ve CMAC-mavi'den daha az spesifik olduğu ortaya çıkarmışlar ve bunun sonuçları kritik bir şekilde etkileyeceğini belirtmişlerdir.

Monteiro ve ark. (2009), tatlı su balığı *Brycon amazonicus*'un karaciğer, solungaç, çizgili kas ve kalp dokusunda, öldürücü olmayan 0.15 mg/L $HgCl_2$ 'ye (civa klorür) 96 saat bırakılmasının oksidatif stres biyoindikatörleri ile biyolojik birikimi üzerindeki etkilerini çalışmışlardır. Sonuç olarak; çizgili kas GR etkinliği ile GPx hariç $HgCl_2$ 'ye maruz kalan dokularda SOD, CAT, GPx, GST ve GR' de artışların görüldüğünü bununla beraber karaciğer ve solungaçta da indirgenmiş glutatyonda (GSH) önemli artışların gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Diğer taraftan $HgCl_2$ maruziyeti çizgili kasta GSH düzeylerinde belirgin bir düşüşe, yükseltgenmiş glutatyonda (GSSG) ise artışa sebep olurken kalp kasında GSH ve GSSG'nin her ikisinin düzeylerinin önemli derecede artışa neden olmuştur.

Mieiro ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada klor alkali endüstri atıklarından etkilenen bir nehir ağzı bölgesinden (Laranjo havzası, Ria de Averio, Portekiz) yakalanan vahşi Avrupa levreklerinin (*Dicentrarchus labrax*) beyin pro-oksidan durumunu belirleyerek bu balıkların civa nörotoksitesine karşı direncini değerlendirmişlerdir. Bunun için katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon S-transferaz (GST) etkinliklerini ve toplam glutatyon (GSHt) gibi beyin antioksidan tepkilerini ölçmüşlerdir. Hem civa birikimi hem de oksidatif stres üzerinde mevsimsel değişikliklerini etkisini belirlemek için çalışmalarını sıcak ve soğuk zamanlarda yürütmüşlerdir. Sıcak dönemde civa ile kirlenmiş bölgelerde yakalanan balıkların beyinde GR

etkinliğinin artması CAT etkinliğinin azalması gibi düzensiz antioksidan tepkilerin olduğunu belirlemişler ve bunu da koruyucu bir uyum işareti ve oksidatif stres tehdidine karşı artan bir hassaslık olarak kabul etmişler. Soğuk dönemde hiçbir bölgede oksidatif stres değişikliği tespit edememişler ve böylece sıcak dönemin oksidatif stresin sıcak dönemde kritik olduğunu belirlemişler.

Sevcikova ve ark. (2011), derleme çalışmalarında metallerin sucul canlılarda oksidatif stresin önemli indükleyicisi olduğunu ve iki yolla reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olduğunu belirtmişlerdir. Redoks aktif metaller, reaktif oksijen çeşitlerini redoks döngüsüyle üretirken, redoks kuvveti bulunmayan metaller, özellikle tiyol içerikli antioksidanların ve enzimlerin antioksidan defansını bozacağını belirtmişlerdir.

Sampaio ve ark. (2012), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) üzerine bakır (Cu) ve yüksek sucul karbondioksitin (hiperkarbi) tek veya kombine halde verebileceği potansiyel zararlı etkilerini araştırmışlar, bakırın sudaki CO₂ düzeyine bağlı olmaksızın karaciğer süperoksit dismutaz etkinliğinde artışa neden olduğunu, diğer taraftan bakırın karaciğer glutatyon peroksidaz etkinliğinin sudaki CO₂ düzeyine bağlı olduğunu belirtmişler. Bakır ve hiperkarbinin kombinasyonunun karaciğer katalaz etkinliğini etkilemediğini bildirmişlerdir.

Moteiro ve ark. (2013), inorganik cıvaya beslenme basamağı ve subkronik maruziyetin oksidatif stres biyomarkırları üzerine etkilerini canlı *Brycon amazonicus* yavrularıyla beslenen tatlı su balığı *Hoplias malabaricus*' un karaciğer, solungaç, çizgili kas ve kalpteki biyolojik birikim potansiyelini değerlendirmek için bir çalışma yapmışlar. Elde ettikleri veriler ışığında inorganik cıvanın karaciğer, çizgili kas, ve kalpte süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon-S-transferaz (GSH) ve glutatyon redüktaz (GR) etkinliğinin arttırdığını belirlemişler. Bunlara ek olarak solungaç CAT etkinliğinin değişmediğini GPx ve GR değerlerinin ise önemli ölçüde düştüğünü göstermişlerdir. Karaciğer ve solungaçta cıvanın indirgenmiş GSH ve yükseltgenmiş GSSG içeriğinde önemli derecede artışa sebep olurken GSH/GSSG

oranında önemli derecede bir düşüşe neden olduğunu belirtmişlerdir. Kalp dokusunda ise GSH seviyesinde artış ve buna bağlı olarak da GSH/GSSG oranında yükseliş olduğunu bildirmişlerdir.

Srikanth ve ark. (2013), balıklarda antioksidan savunma sisteminin önemli bir bileşeni olan tripeptit glutatyon (GSH), reaktif oksijen türlerinin (ROT) ve reaksiyon ürünlerinin ortadan kaldırılmasını doğrudan veya dolaylı olarak düzenlediğini ve bununla birlikte, GSH redüktaz, GSH peroksidaz ve GSH sülfotransferaz, glutatyon-S-transferaz (GST) gibi GSH ile alakalı diğer bir takım enzimleri, balıkları kümülatif olarak ROT'a, toksik metallere ve metaloitlere, stres koşullarından dolayı meydana gelen anormalliklere karşı koruduğunu bildirmişlerdir.

Eroglu ve ark. (2014), çalışmalarında metallere (Bakır (Cu), Kadmiyum (Cd), Krom (Cr), Kurşun (Pb), Çinko (Zn)) farklı sürelerde (1, 7, 14 gün) maruz bırakılan tatlı su balığı *Oreochromis niloticus*'un karaciğer dokusundaki glutatyon metabolizmasının cevabını araştırmışlardır. Enzim olan antioksidanlar, metalin çeşidine ve metalde kalma zamanlarına bağlı olarak metal maruziyetlerine farklı tepkiler verdiğini belirtmişlerdir. Sonuç olarak glutatyon peroksidaz (GPx) etkinliği sadece Cd' da yükselirken, glutatyon S transferaz (GST) etkinliğinin tüm metallerde 7 gün sonra arttığını , Glutatyon redüktaz (GR) etkinliğinin ise çoğu durumda değişmediğini gözlemlemişlerdir. Toplam GSH ve GSH/GSSG düzeylerinin, özellikle 7 gün geçtikten sonra genel anlamda azaldığını bildirmişlerdir. Sonuçların metal etkisinin özellikle 7. günde, antioksidan sistem cevabını önemli derecede değiştirdiğini ve 14 gün sonra bir miktar iyileşme olduğunu gösterdiğini belirtmişlerdir.

Hauser-Davis ve ark. (2014), Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) örnekleri ile normoksik ve hipoksik kontrollü deneyler yaparak karaciğer ve safradaki metalotiyoneyin (MT) seviyelerini ölçülmüşlerdir. Çalışmalarında karaciğerde oksidatif stres belirteci olan indirgenmiş glutatyon (GSH) ve lipid peroksidasyonunu belirten tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS)

saptamışlardır. Sonuç olarak, hipoksik balıklarda metallerin düzeylerinin karaciğerde ve safrada önemli seviyede daha düşük olduğu ayrıca glutatyon düzeylerinin karaciğerde daha düşük olduğunu, buna karşılık hipoksik balıklar ile normoksik balıklar arasında lipid peroksidasyonu açısından belirgin bir farklılık olmadığını belirlemişlerdir.

Hu ve ark. (2014), hidrojen peroksit (H_2O_2) yüklemesi yapıldıktan sonra glutaminin potansiyel tamir rolünü araştırdıkları çalışmada glutaminin, H_2O_2 yüklemesinden sonra balık enterositlerinde onarım aktivitesini iyileştirdiğini göstermişlerdir.

Kanak ve ark. (2014), uzunlukları hemen hemen iki kat ağırlıkları ise hemen hemen beş kat farklı olan *O. niloticus* balıkları arasındaki antioksidan yanıtları karşılaştırmışlar. Bunun için her iki grubu da bakır ve kroma ($1\mu g / ml$) maruz bırakmışlar. Gruplardan birini 48 saat $20\mu M$ değerini ise 6 gün boyunca $10\mu M$ konsantrasyonlara maruz bırakarak süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon S transferaz (GST) ve glutatyon gibi antioksidanların düzeylerini karaciğerde ölçmüşler, küçük olan balıkların büyüklere kıyasla Cu ve Cr'den daha fazla etkilendiğini tespit etmişlerdir. Küçük balıkların akut çalışmalarda bakır ve kromun SOD ve CAT etkinliğinde önemli artışlar olduğunu, 6 günlük çalışma sonucunda ise kroma maruz bırakılan küçük balıklarda CAT, GPx ve GST etkinliklerinde önemli bir artış olduğunu fakat bakıra bırakılanlardaki değişikliğin önemli olmadığını belirlemişlerdir. Büyük balıklarda ise antioksidan düzeyleri genellikle azaldığından dolayı değişik antioksidan yanıtlar verdiğini belirtmişlerdir.

Mela ve ark. (2014), beslenme basamağına bağlı olarak maruziyet sonrası neotropik balık *Hoplias malabaricus*'ta civa dağılımı, civa biyobirikimi ve oksidatif stres parametrelerini inceledikleri çalışmada deney balıklarını beş günde bir on dört doz metilcivaya maruz bırakmışlardır. Çalışma sonunda barsak, karaciğer ve böbrekte doza bağımlı civa dağılımı belirlenmiş buna göre indirgenmiş glutatyon derişimi, glutatyon peroksidaz katalaz ve glutatyon S-

transferaz 1,05 µg/g dozunda karaciğerde önemli ölçüde düştüğünü fakat glutatyon redüktazın arttığını belirtmişlerdir.

Qu ve ark. (2014), Zn ve pH' ın *Carassius auratus*'daki metal birikimi ve oksidatif stres biyomarkırlar üzerine etkisini incelemek için 3, 12 ve 30 günler boyunca 5,0, 7,25 ve 9,0 pH değerlerinde 0,1 ve 1,0 mg Zn / L' ye bırakarak balığın karaciğerinde Zn, Fe ve Cu içeriklerini ölçmüşlerdir. 12 ve 30 gün çinkoda kalan balıkların karaciğerlerinde Zn ve Cu birikiminin arttığını buna karşın Fe içeriğinin azaldığını belirlemişlerdir. Ortamdaki Zn konsantrasyonunun artışına bağlı olarak Zn birikiminin de arttığını gözlemlemişlerdir. 3 günlük çalışma sonucunda SOD, CAT, GPx ve GSH' deki düşüler reaktif oksijen türlerini etkisiz hale getirmede antioksidan savunma mekanizmasının başarısız olduğunu 12 ve 30. gün çalışmalarında ise antioksidanların geri kazanılmasından dolayı bir detoksifiye edildiğini bildirmişlerdir.

Sağlam ve ark. (2014), iki değişik sertlik sınıfındaki su ortamında kadmiyum (Cd) ve bakırın (Cu) (1 mg/L) tatlısu balığı *Oreochromis niloticus*' un antioksidan sistemine toksik etkilerini araştırmışlardır. *O. niloticus* sert su (320 mg CaCO₃/L, iletkenlik 5.80 mS/cm) ve yumuşak suda (80 mg CaCO₃/L, iletkenlik 1.77mS/cm) 1, 7 ve 14 gün boyunca metal etkisine bırakıldıktan sonra antioksidan enzim (süperoksit dismutaz, SOD; katalaz, CAT; glutatyon peroksidaz GPx; glutatyon redüktaz GR ve glutatyon S-transferaz, GST) etkinlikleri ve toplam glutatyon (GSH) seviyelerini spektrofotometrede ölçmüşler. Yapılan ölçümler sonucunda metallerin yumuşak suda sert suya göre antioksidan sistem üzerinde daha çok etkili olduğunu belirtmişlerdir. Duyarlılık açısından CAT, SOD ve GPx gibi bir sıralamanın olduğunu, CAT ile GSH seviyelerinde artış eğilimi gözlenirken SOD ve GPx'te düşüş eğilimi gözlemlendiğini vurgulamışlardır

Brandão ve ark (2015), civa ile kirletilmiş Portekiz'in Aveiro Lagünü' nde bulunan altın kefal (*Liza aurata*) karaciğerinde antioksidan yanıtlarında belirgin değişimlerin gözlemlendiğini ve buna bağlı olarak sağlık durumlarının tehlike altına girdiğini belirtmişlerdir. Yapılan analizler kirletilmiş ve kirletilmemiş

bölgeler arasında farklılığın net olduğunu ve antioksidan savunma mekanizması da dahil olmak üzere birçok parametre üzerine etki ettiğini göstermişlerdir. Oksidatif stres biyomarkırlarından glutatyon S-transferaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz etkinliklerinde azalma,ü buna karşın toplam glutatyon içeriğinde artış görüldüğünü ayrıca civanın antioksidan sistem tepkilerini tetiklediğini göstermişlerdir.

Costa-Silva ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada Brezilya'nın Vacacai Nehri'nde tarımsal ve şehrsel atıklara maruz kalan *Astyanax* sp. ve *Danio rerio* balıklarında potansiyel su kirliliği biyobelirteçlerini incelemişlerdir. Kirlenmiş bölgelerdeki balıklarda kolinesteraz etkinliğinde, metalloprotein ekspresyonunda, antioksidan enzimlerde, glutatyon düzeylerinde ve antioksidan cevabı sinyal yollarının aktivasyonunda önemli değişikliklere neden olan çevresel kontaminasyon belirtileri göstermişlerdir. Bu sonuçlara bağlı olarak, şehrsel ve tarımsal faaliyetlerin, çalışma alanındaki su kaynaklarının çevresel kalitesi için risk oluşturduğu kanıtlamışlardır.

Nunes ve ark. (2015), 96 saat çinko piriton'a maruz bırakılan *Gambusia holbrooki*'de meydana gelebilecek potansiyel ekotoksositeyi değerlendirmek için yaptıkları çalışmada katalaz ve glutatyon-S-transferaz gibi oksidatif stres biyomarkırların hiçbirinde prooksidatif etkilerin meydana gelmediğini bundan dolayı da çinko piriton maruziyetinin temel toksikolojik sonucu olmadığını bildirmişlerdir.

Sevcikova ve ark (2015), Çekya'nın civa ile kontamine olmuş Skalka Rezervuarındaki *Aspius aspius*, *Esox lucius*, *Sander lucioperca*, *Abramis brama* ve *Rutilus rutilus* isimli beş balığın karaciğer, solungaç, böbrek ve beyin gibi organlarındaki antioksidan savunma ve oksidatif hasarını uzun vadede değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak GR, GPx ve GST gibi enzimatik antioksidanların civa kirliliğine önemli derecede yanıt vermediğini buna karşılık toplam glutatyon düzeyleri ile indirgenmiş/yükseltgenmiş glutatyon oranının spesifik organ dağılımlarıyla beraber civa kirliliğinden etkilendiğini bildirmişlerdir.

Srivastava ve ark. (2015), çalışmalarında *Channa punctatus*'un bulunduğu tatlı suda hem tek tek hem de kombine halde kurşun ve civa ile kirletilmesinden kaynaklı stresi değerlendirmişlerdir. Balıkların stres dereceleri ile suyun ağır metal kirliliği sonucunda balıklarda meydana gelen hasarı değerlendirmek için katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), DNA derişimi, lipid peroksidasyonu (LPO) ve indirgenmiş glutatyon (GSH) gibi ölçütleri kullanmışlardır. Sonuç olarak *C. punctatus*' un antioksidan savunma sistemini ağır metallerin etkilediğini balığın karaciğerindeki SOD, CAT ve GSH etkinliklerini azalttığını ($p < 0.05$) gözlemlemişlerdir.

Atli ve ark. (2016), Nil tilapyaşının alyuvarlarında kurşun ve kadmiyumun akut (20 μ M, 2 gün) ve sub-kronik (10 μ M, 20 gün) etkisinde osmoregülasyon (Na^+/K^+ -ATPase, Mg^{+2} -ATPase, Ca^{+2} -ATPase) ve antioksidan sistem parametrelerinin (CAT, SOD, GPx, GR, GST, tGSH, rGSH, GSSG, GSH/GSSG) yanıtını araştırmışlardır. Metalin çeşidine ve etki ettiği zamana göre antioksidan sistem parametrelerinde değişiklikler olduğunu ve bu değişikliklerde Pb'nin daha etkili olduğunu gözlemlemişlerdir. En fazla GSH' ın özellikle sub-kronik Pb'de değiştiğini buna karşılık CAT ile GPx etkinliklerinin azaldığını, akut Pb'de GPx' in düştüğünü, GST etkinliğinin arttığını, akut ve sub-kronik Pb değerleri karşılaştırıldığında GSH/GSSG oranında farklılıkların olduğunu bildirmişlerdir. Akut Cd'de GSSG seviyesi ile GSH/GSSG oranının düşüşü ve sub-kronik Cd'de GST etkinliğindeki düşüşten başka diğer antioksidan sistem parametrelerinde etkili olmadığını raporlamışlardır.

Kim ve Kang (2016), çalışmalarında genç *Sebastes schlegelii*' yi dört hafta boyunca farklı krom (Cr^{+6}) konsantrasyonlarına (0, 30, 60, 120 ve 200 mg/kg) maruz bırakmışlar ve dört haftalık süreç sonucunda karaciğer ve solungaçlardaki süperoksit dismutaz (SOD) etkinliği, glutatyon S transferaz (GST) etkinliği ve glutatyon (GSH) düzeylerini değerlendirmişlerdir. İki haftanın ardından 240 mg/kg derişimde karaciğer ve solungaç SOD'ile GST'etkinliğinde ve ayrıca dört haftanın sonunda 120 mg/kg' ın üzerindeki derişimde yine SOD ve GST etkinliklerinde

önemli derecede artış gözlemlemişlerdir. Buna karşın iki haftanın ardından 240 mg/kg derişimde, dört haftanın sonunda ise 120 mg/kg'ın üzerindeki derişimde GSH düzeyinde önemli bir düşüş olduğunu belirtmişlerdir.

Bano ve ark. (2017), üç farklı ekosistemdeki (Pakistan, Pencap'taki balık çiftliği, kuluçkahane ve Indus Nehri) su ve *Cirrhina mrigala* balığında zehirli maddelerin seviyelerini, biyolojik birikimlerini ve balığın solungaç, karaciğer ve böbrek gibi hayati organlarındaki süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve peroksidaz (POD) gibi antioksidan enzimleri üzerindeki etkilerini çalışmışlardır. Çalışmaları sonucunda nehir suyundaki ağır metallerin (Zn, Cu ve Ni) fazlalığından dolayı nehir balıklarında metal birikiminin en fazla karaciğerde olduğunu bunu ise böbrek ve solungacın izlediğini bildirmişlerdir. İndus nehri balıkları çiftlik ve kuluçkahane balıkları ile karşılaştırıldığında çalışılan bütün organlarda SOD aktivitesinin en çok nehir balıklarında olduğunu ortaya koymuşlar, CAT etkinliğinin ise çiftlik balıklarının böbrek ve solungaçlarında kuluçkahane balıklarının karaciğerine oranla daha fazla olduğunu kaydetmişlerdir. En yüksek POD aktivitesinin ise kuluçkahane balıklarının karaciğer, böbrek ve solungaçlarında olduğunu ortaya koymuşlar bunun sonucunda da antioksidan savunma sisteminin erken uyarı aracı olarak yararlı olabileceğini vurgulamışlardır.

Feng ve ark. (2017), yaptıkları çalışmada 8 hafta boyunca besine eklenerek verilen farklı fenilalanininin (Phe) seviyeleri ($3.4 - 16.8 \text{ g / kg}^{-1}$) içeren altı farklı deney grubundaki genç *Ctenopharyngodon idella* bireylerinin solungaçlarında antioksidan cevaplar, apoptozis ve sıkı bağlantı protein transkripsiyonu üzerindeki olası önleyici etkilerini araştırmışlardır.

Çalışmalarının sonucunda fenilalanin eksikliğinin balık solungaçlarında Cu/Zn süperoksit dismutaz (CuZnSOD), katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve glutatyon içeriğini ve etkinliğini ayrıca mRNA düzeyini düşürerek protein oksidasyonunu ve lipid peroksidasyonunu indüklediğini belirtmişlerdir.

Taju ve ark. (2017) *Lates calcarifer*, *Etroplus suratensis* ve *Catla catla* isimli balık türlerini dört gün süreyle farklı krom derişimlerine (0, 10, 20, 30, 40

ve 50 mg/L) maruz bırakmışlar ve bu süre sonunda kroma maruz bırakılan balıkların incelenen bütün hücre dizilerinde katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon S-transferaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan parametre seviyelerinde kayda değer bir düşüş olmasına karşın lipid peroksidasyonunda yükseliş olduğunu belirtmişlerdir. Sonuç olarak krom maruziyeti deneylerinde oksidatif stresi değerlendirebilmek için balığın tamamı yerine hücre hatlarının kullanılabileceğini yaptıkları çalışma ile doğrulamışlardır.

Wu ve ark. (2017), kolin azlığına bağlı olarak oksidatif hasarın, hepatopankreas ile bağırsakta antioksidan enzim ve Nrf2/Keap1 sinyal moleküllerinin transkripsiyonundaki farklılıklarla alakalı olduğuna dair yeni kanıtlar sunmuşlar ve ayrıca çalışmalarında ilk olarak kolin eksikliğinin farklı GPx ve GST izoformlarının çeşitli değişim modellerini uyardığını göstermişlerdir. Bu arada, bağırsakta kolin azlığının sebep olduğu bazı GPx ve GST izoformlarındaki değişimlerin hepatopankreastakilerin aksine olduğunu sunmuşlardır.

Aliko ve ark. (2018), yaptıkları çalışmada, tatlı su balığı *Carassius auratus*, manganezin (Mn^{+2}) iki farklı dozuna (3.88 ± 0.193 mg/L ve 7.52 ± 0.234 mg/L Mn^{+2}) 96 saat maruz bırakılıp manganezin kan antioksidan tepkisi, bağışıklık durumu ve eritron profili üzerindeki akut letal olmayan etkilerini belirlemişlerdir. Mn^{+2} 'nin farklı iki dozuna maruz bırakılan *C. Auratus*'ta süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon-S-transferaz (GST) gibi kan enzimatik antioksidan etkinliğinde önemli artışlar gözlemlenmiştir.

Li ve ark. (2018), 28 gün boyunca su bazlı selenyum (0, 50, 100, 200 ve 400 μ g/L) bıraktıkları *Channa argus*'un biyobirikim, oksidatif stres, bağışıklık tepkileri ve bağışıklıkla alakalı genlerin dışavurumu üzerindeki toksik etkilerini incelemişlerdir. 28. günün sonunda dokularda Se birikimi sırası ile böbrek, karaciğer, dalak, bağırsak, solungaç, kas şeklinde olduğunu belirlemişlerdir. *C. argus*'un karaciğer ve dalağındaki antioksidan parametreleri, su kaynaklı selenyumda oksidatif strese neden olduğunu göstermişlerdir.

Atli ve ark. (2020), Zn kirliliğinden etkilenen İspanya'daki Osor Nehri'nden alınan *Barbus meridionalis*' in karaciğer antioksidanlarını karakterize etmek ve in vitro ortamda 200 ve 400 ZnSO₄ µg/l etkisini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, çinkonun doğrudan etkisinin antioksidan sisteminde dengesizlik yarattığı ve çoğunlukla çinkonun düşük konsantrasyonuna karşı GPx etkinliğinin azaldığı (% 95-100) buna karşılık CAT, GR ve GST'nin arttığı (%36-1543) sonucuna ulaşmışlardır. GSH sonuçlarının dokulardaki farklılıklardan dolayı uyarıldığını (% 290) ya da inhibe edildiğini (%85-93) bildirmişlerdir.

Li ve ark. (2020), su sıcaklığı ve/veya cıvanın (Hg) *Ctenopharyngodon idella*'nın (ot sazanı) antioksidan parametreler (SOD, süperoksit dismutaz; CAT, katalaz; MDA, malondialdehit; TAOC, toplam antioksidan kapasite), stres proteinleri (HSP70, ısı şoku proteini 70; MTs, metallothionein) ve stres hormonu (COR, kortizol hormonu) üzerine etkilerini incelemişlerdir. Bunun için balıkları (45,37±3,58g) 15, 20, 25, 30 ve 35° C'ye adapte etmişler ve üç grup halinde dört hafta boyunca 0,0 veya 0,039 mg/L HgCl₂'e maruz bırakmışlardır. Süre sonunda antioksidan enzim etkinliklerinin su sıcaklığının 30°C'ye artırılmasıyla önemli ölçüde arttığını 35°C' ye çıkarıldığında ise önemli ölçüde azaldığını belirtmişlerdir. Buna ek olarak HSP70 ve MTs düzeyleri sıcaklığın 35°C'ye yükseltilen suda arttığını fakat Hg'ye maruz bırakılan balıkların Hg'sız sudakıbalık gruplarına göre HSP70 ve MTs' nin düşük seviyeler gösterdiğini bildirmişlerdir.

Moniruzzaman ve ark. (2020), çalışmalarında *Liza persia* (pelajik, hepçil), *Amblypharyngodon mola* (yüzey besleyici, otçul) ve *Mystus gulio* (bentik, etçil) gibi canlıların kas dokusunda niş ve beslenme durumlarına göre metal birikim düzeyindeki değişiklikleri ve bu değişikliklerin canlının kas antioksidanlarını ve glikoz metabolizmasını nasıl etkilediğini bulmaya çalışmışlardır. Çalışma için Hindistan'ın Batı Bengal tarafından Malancha, Diamond, Harbour ve Chandanpiri bölgelerinden balıkları toplamışlar, sudaki, sedimentteki ve balık kaslarındaki Pb, Zn, Cd ve Cr konsantrasyonlarını belirlemişlerdir. Sonuç olarak Malancha ve Chandanpiri bölgelerinden toplanan *L. persia*' da malonaldehit, süperoksit

dismuatz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon S transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR) ve kortizol düzeylerinde artış olduğunu tespit etmişler.

Fadl ve ark. (2021), kurşun asetat toksisitesinin (5-10 mg kurşun asetat/L) *Dunaliella* algi (11 g / kg diyet) eklenmiş besinin etkisini ve bunların Nil tilapia'sındaki etkileşimini 60 günlük bir çalışma ile araştırmışlar ve sonuç olarak Pb'nin serum antioksidan enzim etkinliğini ve karaciğer antioksidan enzimlerinin gen ifadesini düşürdüğünü ortaya koymuşlar.

Seco ve ark. (2021), Güney Okyanusu'ndaki Antarktika krili (*Euphausia superba*), *Electrona antarctica*, *Gymnoscopelus bruaeri* ve *G. nicholsi*' nde civa derişimlerinin bu canlıların biyokimyasal performansını ve olası etkilerini analiz etmişlerdir. *E. superba* miktofıtlarin büyük bir kısmından yüksek metabolik etkinliğe sahip olduğunu, antioksidan enzim etkinliklerinin ise genel olarak *E. superba* 'da miktofıd canlılara göre daha düşük olduğunu değerlendirmişlerdir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Deneyde Kullanılan Kimyasal Malzemeler

3.1.1.1. Deneyde Kullanılan Metaller

Civa (II) Klorür (HgCl_2 , Merck)

Çinko Klorür (ZnCl_2 , Merck)

Nikel (II) Klorür Hexahidrat ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Merck)

Potasyum Kromat (K_2CrO_4 , Merck)

3.1.1.2. Antioksidan Enzim Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Kimyasallar

Hypoxanthine ($\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}$, Sigma)

NADPH (Sigma)

Vinil piridin

Cytochrome c (Sigma)

CHP

Metanol

CDNB (Sigma)

Hidrojen peroksit (H_2O_2 , Merck)

Xanthine oxidase (Sigma)

Sodyum klorür (NaCl , Merck)

Sodyum sitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$, Merck)

Na_2EDTA (Merck)

Glutathion S- transferase (Sigma)

Fosforik asit (H_3PO_4 , Merck)

Potasyum hidroksit (NaOH , Merck)

Redükte glutatyon (Sigma)

Glutathion S- transferase (Sigma)

Beta nikotin amid adenin dinükleotit fosfat ($\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{P}_3^+$, Merck)

Okside glutatyon (Sigma)
Hidroklorik asit (HCl, Merck)
1-kloro-2,4-dinitro benzen (Merck)
Potasyum klorür (KCl, Merck)
Glutatyon redüktaz (Sigma)
Trizma-Base (Tris [hidroksimetil] aminometan); $C_4H_{11}NO_3$, Sigma)
Metafosforik asit (HPO_3 , Merck)
Etanol (C_2H_6O , Merck)

3.1.1.3. Protein Analizinde Kullanılan Kimyasallar

Potasyum sodyum tartarat tetrahidrat ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$, Merck)
Sodyum karbonat (Na_2CO_3 , Fluka)
Sodyum hidroksit (NaOH, Merck)
Folin Ciocalteu Fenol Ayırıcı (Sigma)
Bakır(II) sulfat penta hidrat ($CuSO_4.5H_2O$, Merck)
Bovin Albumin%35 (Sigma)

3.1.1.4. Kalsiyum ve Sertlik Tayininde Kullanılan Kimyasallar

Kalsiyum klorür ($CaCl_2.2H_2O$, Merck)
Kalsiyum karbonat ($CaCO_3$, Merck)
Amonyum klorür (NH_4Cl , Merck)
EDTA (Etilendiamintetraasetikasit, Merck)
Müreksit (Ammonium purpurate, Merck)
Sodyum hidroksit (NaOH, Merck)
Sodyum klorür (NaCl, Merck)
Eriochrome Black T (Merck)
Hidroklorik asit (HCl % 37, Merck)

3.1.2. Kullanılan Aletler

Çoklu ölçüm cihazı (ThermoOrionstar 5)
Hassas Terazı (Sartorius Analytic ATL-224-I)
pH metre (Hanna HI 8314 membran pH metre)
Su Banyosu (Wise Bath WSB-30)
Spektrofotometre (Schimadzu UV-1800)
Karıştırıcı (Vortex S0 200)
Derin dondurucu (- 80 °C) (Revco Ultima II)
Manyetik Karıştırıcı (Janke&Kunkel IKAMAG RH)
Homojenizatör (Janke&Kunkel Ultra Turrax T25)
Santrifüj (Sigma 2-16 K)
Otomatik Büret (0.1 bölmeli)
Erlen Mayer

3.2. Yöntem

Çalışmada kullanılan tatlısu balığı (*Oreochromis niloticus*) Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Tatlısu Araştırma İstasyonu'nda Balık Üretim ve yetiştirme havuzlarından temin edilmiştir. Bu havuzlarından alınan balıklar uygun koşullarda hızlı bir şekilde (30 dk içerisinde) deney akvaryumlarının (40x40x100 cm) bulunduğu laboratuvara getirilmiştir. Balıkların deney koşullarına uyum sağlamaları için sıcaklığı 21.7±0.2 °C olan sularda (Nestle Pure Life marka doğal kaynak suyu) 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık rejimi uygulanarak bir ay süre ile adaptasyonları sağlanmıştır. Deneyde kullanılan suların fiziksel ve kimyasal özellikleri Çizelge 3.1.'de verilmiştir. Balıklar hem adaptasyon döneminde, hem de deneyler esnasında günde bir defa hazır balık yemi (Pınar balık yemi, Pelet no:2, İzmir) ile kütlelerinin % 2-3'ü oranında beslenmişlerdir. Balık yemindeki mikro elementlerin oranları 70 mg Zn⁺²/kg, 25 mg Mn⁺²/kg, 25 mg Mg⁺²/kg, 2 mg Fe⁺²/kg, 0.7 mg I/kg, 1 mg Cu⁺²/kg, 0.2 mg Co⁺³/kg, 0.03 mg Se

/kg, Makro elementlerin oranları Ca^{+2} % 2-2,5, Na^+ % 0,2- % 1, P % olup % 40 ham protein içermektedir.

çizelge 3.1. Deney akvaryumlarındaki suyun fiziksel ve kimyasal özellikleri. Veriler (n=20) aritmetik ortalamayı ve standart sapmayı göstermektedir.

Özellik	Ca₃₀ (30 mg <u>Ca</u> /L)	Ca₆₀ (60 mg <u>Ca</u> /L)	Ca₁₂₀ (120 mg <u>Ca</u> /L)
Ca Sertliği (mg/L CaCO_3)	29.8±0.37	60.1±0.40	117±0.95
pH	7.12±0.05	7.00±0.05	6.91±0.05
İletkenlik ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	165±7.98	328±2.84	670±4.63
Toplam Sertlik (mg/L CaCO_3)	93.9±7.68	185±6.63	365±10.4
Alkalinite (mg/L CaCO_3)	102±3.34	101±3.27	102±3.31
Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	21.7±0.19	21.7±0.19	21.6±0.18
Oksijen (mg/L)	5.30±0.14	5.27±0.15	5.30±0.17

Çalışmalar esnasında akvaryumlardaki suların fiziksel ve kimyasal özelliklerin (sertlik ölçümleri hariç) çoklu ölçüm cihazı (Thermo Orion Star 5) ile ölçülmüştür. Deneylerde Nestle Pure Life marka doğal kaynak suyu kullanılmış olup, deney akvaryumlarının suyu iki güne bir yine aynı marka su ile değiştirilmiştir. Nestle Pure Life marka doğal kaynak suyunun iz element ve iyon

derişimleri alüminyum 4 µg/L, 0.02 mg/L' den az amonyum, 1.2 mg/ L klor, 1 µg/ L' den az demir, 1 µg/ L' den az mangan, 7 mg/ L sülfat, 1.26 mg/ L sodyumdur. Suyunun sertliğı de Calgon titrasyon yöntemi ile 15 mg/L olarak ölçülmüştür. Deney aşamasında kullanılan suların Ca sertlikleri; sırasıyla 30 mg Ca/L (Ca₃₀), 60 mg Ca/L (Ca₆₀) ve 120 Ca mg/L (Ca₁₂₀) şeklinde CaCl₂x2H₂O (Merck) kullanılarak ayarlanmıştır.

Deney aşamasında 33x33x40 cm boyutlarındaki akvaryumlara altışar adet balık rastgele yerleştirilmiştir. Balıklar akut ve kronik süreçler olmak üzere, her dizide 3 farklı kalsiyum (Ca₃₀, Ca₆₀ ve Ca₁₂₀) düzeyleri olacak şekilde metallerin (Hg, Ni, Cr, Zn) farklı derişimlerine maruz bırakılmıştır. Deneyler 40 litre deney ortamı içeren akvaryumlarda sürdürülmüştür. Akut etki deneyleri yetmiş iki saat sürmüş olup Cr, Ni ve Zn için 30 µM derişim, Hg için 0.3 µM derişim kullanılmıştır. Kronik deneyler 30 gün sürmüş olup Cr, Ni ve Zn için 10 µM, Hg için 0.03 µM derişim kullanılmıştır. Hem akut hem de kronik süreçlerde metal içermeyen ve farklı düzeylerde kalsiyum içeren Nestle Pure Life marka doğal kaynak suları kontrol (her kalsiyum düzeyi için ayrı kontrol) olarak kullanılmıştır. Deneylerde toplam 30 adet akvaryum hazırlanmış olup, toplam 180 adet balık kullanılmıştır. Deney ortamları her iki günde bir Nestle Pure Life marka doğal kaynak suyu kullanılarak yenilenmiş olup, kalsiyum ve metal derişimleri de uygun şekilde ayarlanmıştır. Böylece akvaryum yüzeyine metallerin ve kalsiyumun tutunması veya sıcaklıktan dolayı akvaryum suyunun buharlaşması gibi sebepler nedeni ile deney çözeltilerinin değişmesi minimuma indirilmiştir. Laboratuvarımızda *O. niloticus* ile daha önce yapılan bir çalışmada balık büyüklüğünün metal toksisitesinde ve antioksidan sistem tepkisinde önemli olacağı belirtilmiştir (Kanak ve ark., 2014). Bu durum dikkate alınarak çalışmalarda benzer boylardaki balıklar kullanmış olup, kullanılan balıkların ortalama boy (15.56±0.13 cm) ve ağırlıkları (60.26±1.14 gr(?)) arasında istatistiksel olarak anlamlı (p>0.05) fark bulunamamıştır. Akut ve kronik

deney süreçleri sonunda balıklar teker teker akvaryumlarından alınarak su ile yıkanmış ve kurutma kağıdı ile kurulandıktan sonra spinal edilerek öldürülmüştür. Daha sonra steril diseksiyon aletleri kullanılarak her balığın karaciğer dokusu alınmış ve kodlandıktan sonra analize kadar -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.1. Doku Homojenatlarının Hazırlanışı

Homojenizasyona başlamadan önce antioksidan sistem parametrelerinin ölçümüne uygun olan bir homojenizasyon tamponu çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için 100 mM KPO₄, 100 mM KCl ve 1 mM EDTA ile hazırlanan tampon çözeltinin pH değeri 7.4 olarak ayarlanmıştır. Derin dondurucuda saklanan karaciğer örnekleri önce oda sıcaklığında çözündürülmüş ve daha sonra buz üzerinde tutularak homojenizasyon işlemlerine başlanmıştır. Her balıktan yaklaşık 200 mg karaciğer dokusu hassas terazide tartıldıktan sonra cam tüplere aktarılmış ve üzerine ağırlıklarının 9 katı homojenizasyon tamponu ilave edilmiştir. Küçük buz dolu bir beher içine konan bu tüplerde homojenizasyon işlemi homojenizatörde 9500 rpm de 90 saniye kadar süre ile yapılmıştır. Homojenatlar eppendorf tüplere aktararak 10,000 g de (+4 °C) santrifüj edilmiş ve süpernatant kısımları dikkatli bir şekilde alınarak başka eppendorf tüplere aktarılmıştır. Bu süpernatantlar antioksidan sistem parametreleri ve protein ölçümlerinde kullanılmıştır.

3.2.2. Antioksidan Sistem Parametrelerinin Ölçümü

Karaciğer dokusundaki CAT aktivitesi Lartillot ve ark. (1988), SOD aktivitesi McCord ve Fridovich (1969), GST aktivitesi Habig ve ark. (1974), GR aktivitesi Carlberg ve Mannervik (1975), GPX aktivitesi Livingstone ve ark. (1992) ve glutatyon (GSH ve GSSG) düzeyleri Beutler ve ark. (1963)’in kullandıkları yöntemlere göre belirlenmiştir.

3.2.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Ölçümü

SOD süperoksit radikalini (O_2^-) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene (O_2) dönüşümünü sağlayan antioksidan sisteme ait bir enzimdir. Ksantin ve ksantinoksidazın (XOD) bulunduğu durumlarda O_2^- oluşur. Oluşan bu O_2^- 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolyum kloridle tepkimeye girerek kırmızı renkli formazon bileşiğini oluşturur. SOD aktivitesi formazonun inhibisyonunun 550 nm dalga boyunda okunması ile belirlenmektedir (McCord ve Fridovich, 1969). SOD aktivitesi ölçülürken kullanılan materyaller Çizelge 3.2’de verilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 SOD aktivitesi ölçüm tablosu.

Ayıracılar ve Çözeltiler	Kör (µl)	Örnek (µl)
Fosfat tamponu (50 mM; pH 7.4)	911	886
Hipoksantin (1.5 mM)	33	33
Sitokrom C	33	33
Örnek miktarı	---	25
çalkalanır		
XOD (56.6 U/mL)	33	33

Tüpler iyice çalkalanmış ve 30 sn boyunca $37^\circ C$ ’de bekletilip 550 nm’de spektrofotometre cihazında köre karşı kinetik olarak okunmuştur. Sıfırıncı dakikada ilk absorbans (A_1) okunduktan sonra 60 sn boyunca ikinci absorbans (A_2) okunarak, aradaki fark hesaplanmıştır. Bu değer SOD aktivitesinin hesaplanmasında kullanılmıştır.

SOD aktivitesinin hesaplaması;

$$A/\text{dakika cinsinden süre} = OD_1 - OD_0 / 1 = \text{net absorbans}$$

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{\text{kör OD} - (\text{OD}_1 - \text{OD}_0)}{\text{kör OD}}$$

$$V_t = \text{Toplam hacim}$$

$$V_0 = \text{Örnek hacim}$$

Yukarıda verilen formüller sonucu elde edilen % inhibisyon örnekteki total protein miktarına bölünüp normalize edilerek SOD aktivitesi belirlenmiştir. Aktivite U/mg protein olarak verilmiştir.

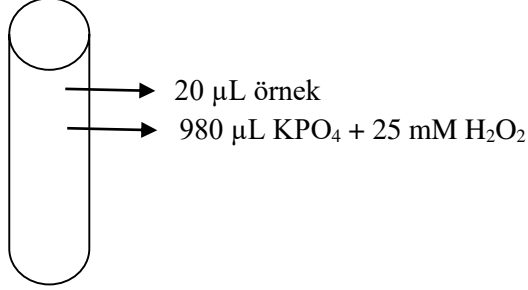
$$\text{SOD aktivitesi} = \frac{\% \text{inh}}{50} \times \frac{1 \text{ U}}{\text{ml}} \times \frac{V_t}{V_0} \times \frac{1}{\text{mg protein/ml}}$$

3.2.2.2. Katalaz (CAT) Aktivitesi Ölçümü

Katalaz H_2O_2 'yi parçalayıp onu suya ve moleküler oksijene dönüştürmektedir. Bu yöntem H_2O_2 'nin H_2O 'ya dönüşme hızının 240 nm dalga boyunda kinetik (0-1 dakika) olarak spektrofotometrede ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bir dakika sonunda absorbanstaki azalma H_2O_2 'nin parçalandığını göstermektedir. Katalaz aktivitesinin hesaplanmasında 240 nm'de H_2O_2 ekstinksiyon katsayısı elde edilmektedir ve bu değer katalaz aktivitesinin hesaplanmasında kullanılmaktadır (Beutler, 1984).

Deneyin yapılışı;

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



CAT aktivitesinin hesaplanması;

OD= 0 ile 1 dakika ölçümleri arasındaki farktır.

V_t= Toplam hacim

V_ø= Örnek hacmi

t= Zaman

0,0392= H₂O₂'nin 240 nm'deki ekstinksiyon katsayısı

CAT aktivitesi hesaplanmasında kullanılan formül;

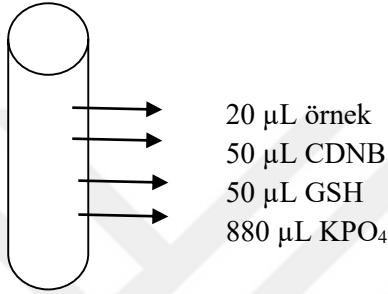
$$\frac{OD (\text{Ör.-Kör}) \times V_t}{0,0392 \times V_{\text{ø}} \times t \times (\text{mg prot.}/\text{mL})} = \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg prot.}/\text{dk}$$

3.2.2.3. Glutatyaon S-Transferaz (GST) Aktivitesi Ölçümü

Glutatyon S-transferaz'ın görevi GSH'a bağlı SH grubunun elektrofilik bileşiklerle tepkimeye girmesini katalizlemektir. GSH ve 1-kloro-2,4-dinitrobenzenin (CDNB) konjugasyonu sırasında meydana gelen absorbansın spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda kinetik olarak okunması ile GST aktivite ölçümü yapılmaktadır (Habig ve ark., 1974). GST aktivitesini ölçümü yapmak için aşağıdaki çözeltiler, kör ve örnek gerekmektedir.

Deneyin yapılışı;

1. 880 µL fosfat tamponu (100mM-pH 7.4 KPO₄) tüplere konur.
2. 50 µL GSH (20mM) eklenir.
3. 50 µL CDNB (20mM) eklenir.
4. 20 µL örnek eklenir.
5. 340 nm’de 0-1 dakika arasında kinetik ölçüm yapılır.



GST aktivitesinin hesaplanması;

GST aktivitesi hesaplamının formülü;

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

OD= 0 ile 1 dakika ölçümleri arasındaki fark

V_o = Örnek hacmi

V_t = Toplam hacim

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

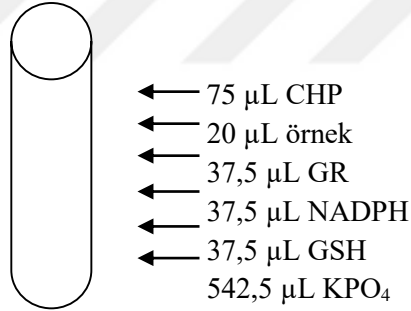
3.2.2.4. Glutasyon Peroksidaz (GP_x) Aktivitesi Ölçümü

T-bütil hidroperoksit bulunan ortamda glutasyonun (GSH) okside glutatyon (GSSG) oksidasyonu gerçekleştiren enzim glutasyon peroksidaz’dır. Okside glutasyonun tekrar GSH’a indirgenmesi için glutasyon redüktaz (GR) ve

NADPH gerekmektedir. Bu yöntemle göre GPx aktivitesinin ölçümü için NADPH'ın NADP⁺ye oksidasyonu gerekmektedir. Bu reaksiyonda meydana gelen kompleksin absorbensinin 340 nm dalga bounda kinetik olarak okunması ile aktivite ölçümü yapılmaktadır (Livingston ve ark., 1992).

Deneyin yapılışı;

1. 542,5 µL fosfat tamponu (100mM-pH 7.4 KPO₄) tüplere konur.
2. 37,5 µL GSH (40mM) eklenir.
3. 37,5 µL NADPH (2.4mM) eklenir.
4. 37,5 µL GR (40 units) eklenir.
5. 20 µL örnek eklenir.
6. 75 µL CHP (30mM) eklenir.
7. 340 nm'de 0-1 dakika arasında kinetik ölçüm yapılır.



GP_x aktivitesinin hesaplanması;

OD= 0 ile 1 dakika ölçümleri arasındaki farktır.

Vö = Örnek hacmi

Vt = Toplam hacim

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

GP_x aktivitesi formülü;

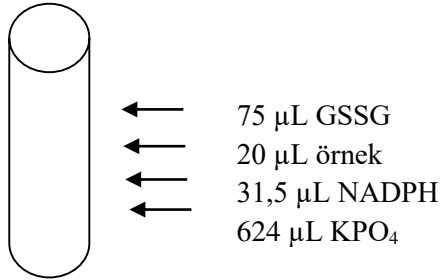
$$\frac{OD (\text{Ör.-Kör}) \times V_t}{6.22 \times V_o \times t \times (\text{mg prot./mL})} = \mu\text{mol /mg prot./dk}$$

3.2.2.5. Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitesi Ölçümü

NADPH bulunan ortamda okside glutasyonun (GSSG) GSH'ye indirgenmesini katalizleyen enzim glutasyon redüktazdır. NADPH'ın NADP⁺'ye yükseltgenmesi sırasında bir absorbans farkı oluşmaktadır. Bu farkın 340 nm dalga boyunda kinetik olarak okunması ile GR aktivitesi ölçülmektedir (Carlberg ve Mannervik, 1975).

Deneyin yapılışı;

1. 624 µL fosfat tamponu (100mM-pH 7.4 KPO₄) tüplere konur.
2. 31,25 µL NADPH eklenir.
3. 20 µL örnek eklenir.
4. 75 µL GSSG eklenir.
5. 340 nm'de 0-1 dakika arasında kinetik ölçüm yapılır.



GR aktivitesinin hesaplanması;

OD= 0 ile 1 dakika ölçümleri arasındaki fark

V_ö = Örnek hacmi

V_t = Toplam hacim

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

GR aktivite hesaplama formülü;

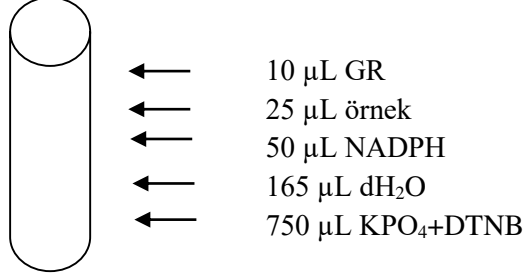
$$\frac{\text{OD (Ör.-Kör)} \times V_t}{6.22 \times V_o \times t \times (\text{mg prot./mL})} = \mu\text{mol /mg prot./dk}$$

3.2.2.6. Total Glutasyon (GSH) Miktarının Ölçümü

Toplam GSH miktarının ölçümü spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda elde edilen absorbans ile yapılmaktadır. Bu yöntem glutasyonun DTNB tarafından okside edilmesi sırasında ortaya çıkan sarı renkli oluşumun (2-nitro-5-tiyobenzoik asit) 412 nm dalga boyunda ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Ortamda bulunan GSSG ve GR NADPH'ın indirgenmesi esnasında GSH'yi meydana getirmektedir (Griffith, 1980).

Deneyin yapılışı;

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



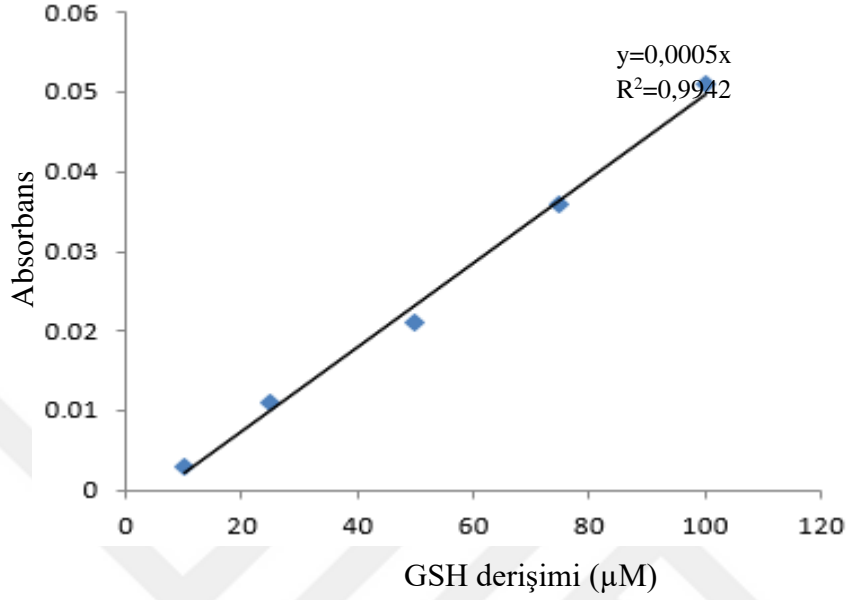
GSH miktarının hesaplanması;

GSH düzeyinin belirlenmesi için öncelikle bir seri GSH standardının hazırlanması gerekmektedir. Hazırlanan bu seri standartların absorbanlarının 412 nm de okunması sonucu elde edilen doğru ile örneklerdeki GSH düzeyleri hesaplanmaktadır.

Standartların Hazırlanması:

GSH ölçümü için öncelikle 1 mM GSH stok çözeltisi hazırlanır ve uygun seyreltmelerle bir seri GSH standardı elde edilir (10, 25, 50, 75, 100 μM). Her GSH derişimine ait absorban değerleri kullanılarak bir regresyon eşitliği ($y=0.0005x$) bulunur. Bu formül kullanılarak örneklerdeki GSH düzeyleri $\mu\text{mol/mg}$ protein/dk olarak ifade hesaplanır.

Çizelge 3.3. GSH standardı absorbans değişim grafiği



3.2.2.7. Okside Glutatyon (GSSG) Miktarının Ölçümü

Okside glutatyon ölçümü de GSH ölçümü ile aynı esaslara uygun olup, aynı çözeltiler ve yöntemler kullanılmaktadır. En önemli fark, GSH'nin bağlanması sağlamak için 5-sülfosalisilik asit içeren homojenatlara 2-vinilpiridin eklenmesidir (NaOH ile pH 7.0). Bu karışım oda sıcaklığında ve karanlıkta 1 saat bekletilerek inkübe edilmektedir. Daha sonra, ortamda kalan GSH miktarının ölçümü ile GSSG düzeyleri belirlenmiş olmaktadır (Griffith, 1980).

Deneyin yapılışı;

1. 750 µL fosfat tamponu (75mM-pH 7.5 KPO₄) + DTNB (6 mM) tüplere konur.
2. 165 µL dH₂O
3. 50 µL NADPH (0.3 mM) eklenir.
4. 25 µL örnek eklenir.
5. 10 µL GR (75 U/mL) eklenir.

6. Bekletmeden hemen 412 nm’de 0-1 dakika arasında kinetik ölçüm yapılır.

3.2.2.8. Redükte Glutasyon (rGSH) miktarının hesaplanması;

Redükte glutasyon miktarının hesaplanması basit olarak toplam GSH miktarından GSSG miktarının çıkarılmasına dayanmaktadır. Bu sayede elde edilen GSH ve GSSG düzeyleri ile GSH/GSSG oranı da hesaplanabilmektedir. Toplam GSH, rGSH ve GSSG düzeylerinin normalize edilmesi için elde edilen değerlerin süpernatant içerisinde bulunan toplam proteine bölünmesi gerekmektedir.

3.2.3. Total Protein Analizi

Balık karaciğer dokusuna ait homojenatlarda protein analizi için Lowry yöntemi (Lowry ve ark., 1951) kullanılmıştır. Bu metot proteinlerin alkali bakır sülfat ve fosfotungstik asit ile mavi renkli bir bileşik meydana getirmesi esasına dayanır. Mavi olan bu bileşik ise 750 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbanısı ölçülüp niceliksel olarak protein düzeyi tayin edilmektedir. Bir çok proteinde tirozin ya da triptofan ya da hem triozin hem de triptofan aminoasitleri denk seviyelerde bulunmaktadır. Aminoasit olan triozin ve triptofan, fosfotungstik-fosfomolibdik asidi (folin-ciocalteu ile) indirgeyerek mavi renk oluşturmaktadır. Lowry yöntemiyle ile proteinler öncelikle bazik ortamda bakır iyonu ile tepkimeye girerek bakır-protein bileşiğini oluşturmakta, daha sonrada ortama fosfotungstik-fosfomolibdik asit çözeltisi ilave edildiğinde bakır-protein bileşiği, tirozin ve triptofanla birleşmektedir.

Ayırıcılar;

1. 2 gr %2’ lik Na_2CO_3 (0,1 N sodyum hidroksit (NaOH) içinde) tartılıp 0,1 N sodyum hidroksitte (NaOH) çözünmesi sağlanarak Ayırıcı A hazırlanmıştır.

2. % 1 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ tartılarak, distile su 100 mL'ye tamamlanarak Ayıraç B₁ hazırlanmıştır.
3. % 2 Na-K-Tartarat. 2 g Na-K-Tartarat tartılarak distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak Ayıraç B₂ hazırlanmıştır.
4. A ayıracından 50 hacim alınıp üzerine 0.5 hacim B₁ ayıracı ve 0.5 hacim B₂ ayıracı konularak karıştırılıp (günlük hazırlandı) Ayıraç C hazırlanmıştır.
5. Folin-Ciocalteu Çözeltisi saf su ile 1' e 1,5 oranında sulandırılmıştır.
6. Standart BovinAlbumin Çözeltisi: 1 ml'sinde 1 mg (1000 µg/ml) bovin albumin bulunduracak şekilde bovin albumin çözeltisi stok olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan bovin albümin stok çözeltisinden uygun sulandırmalar yapılarak mili litresinde 50-100-200-300-400-500-600 µg/ml bulunduran standart çözeltiler oluşturulmuştur.

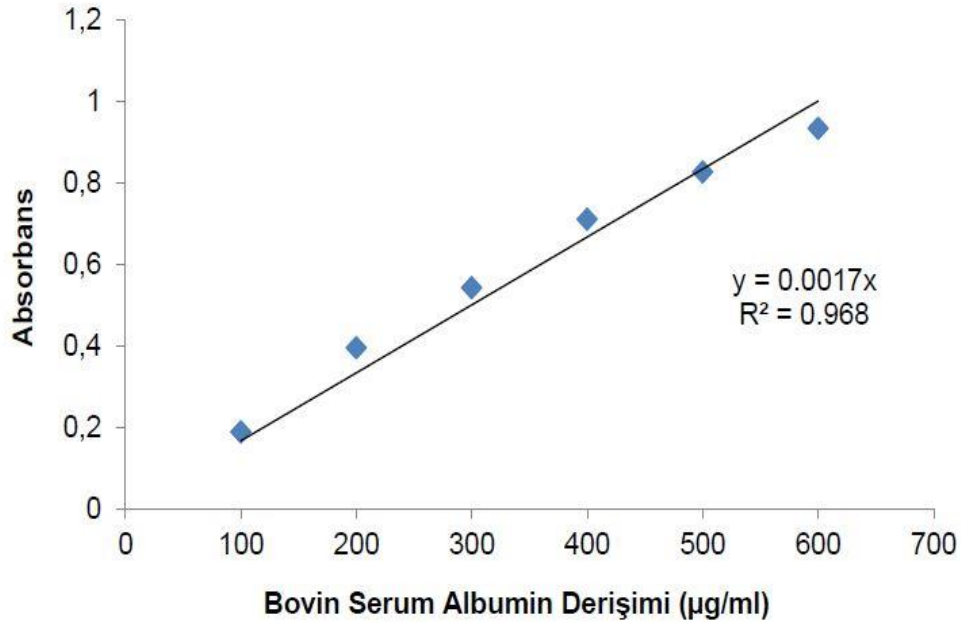
Standartların Hazırlanması

1. Standart 100 µg : 0.1 ml stok bovin albumine 0.9 ml saf su eklenerek hazırlanır.
2. Standart 200 µg : 0.2 ml stok bovin albumine 0.8 ml saf su eklenerek hazırlanır.
3. Standart 300 µg : 0.3 ml stok bovin albumine 0.7 ml saf su eklenerek hazırlanır.
4. Standart 400 µg : 0.4 ml stok bovin albumine 0.6 ml saf su eklenerek hazırlanır.
5. Standart 500 µg : 0.5 ml stok bovin albumine 0.5 ml saf su eklenerek hazırlanır.
6. Standart 600 µg : 0.6 ml stok bovin albumine 0.4 ml saf su eklenerek hazırlanır.

Deneyin Yapılışı;

1. aşamada tüplere 0,3' er ml örnekler ve standart çözeltiler konulur.
2. aşamada ayıraç C'den tüplerin üzerine 3ml eklenir.
3. aşamada vortex ile karıştırılan tüpler oda ısısında 15 dakika bekletilir.
4. aşamada tüplere Folin-Ciocalteu çözeltisinden 0,3 ml eklenerek homojen hal alması için tüpler iyice karıştırılır.
5. aşamada tüpler 30 dakika boyunca oda ısısında bekletilir.
6. aşamada spektrofotometre aletinde 750 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunur.
7. aşamada elde edilen değerler 50, 100, 200, 300, 400, 500 ve 600 µg/ml bovin serum albumini çözeltisinden hazırlanarak bulunan standart eğri sonuçlarına göre değerlendirilir.

Çizelge 3.4. Bovin serum albümininden hazırlanmış olan standart derişimler ve absorbans arasındaki doğrusal ilişkiyi gösteren grafik



Buna göre 0.3 µM etkisinde 1 nolu balığın karaciğer dokusunda akut sonunda total protein düzeyi;

$$y = 0.0017x$$

$$\text{Absorbans: } y = 0.611$$

$$\text{Değişim (x)} = \frac{0.611}{0.0017}$$

$$\text{Değişim} = 0.359 \text{ mg prot./mL}$$

Seyreltme miktarının çarpılması ile elde edilen değerin doku yaş ağırlığına bölünmesi ile protein düzeyi mg protein/g yaş ağırlık olarak verilmektedir.

3.2.4. Kalsiyum ve Sertlik Tayini

3.2.4.1. EDTA Metoduyla Su Sertliğinin Belirlenmesi

EDTA metoduyla su sertliğinin belirlenmesi için kullanılan titrasyon yönteminde etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) çözeltisi kullanılmaktadır. Kalsiyum sertliği ve toplam sertlik bu yöntemle belirlenmiştir. EDTA çözeltisi 1 ml EDTA 1°F'ne yani 10 ppm CaCO₃'e ekivalent olacak şekilde hazırlanır. Bu da 1/50 N veya 0.01 M EDTA çözeltisidir.

Kullanılan Çözeltiler

- a) 0.01 M EDTA çözeltisi
- b) EDTA'nın ayarlanması için standart çözelti: Bu 20 °F sertliğinde standart çözeltidir.
- c) NH₄OH + NH₄Cl tampon çözeltisi (Toplam sertlik için)
- d) 1 M NaOH çözeltisi (Ca sertliği için)

e) Eriochrome black T indikatörü (Toplam sertlik için)

f) Müreksit indikatörü (Ca sertliği için)

Deneyin Yapılışı:

Kalsiyum Sertliği: 25 ml olarak alınan su örneği üzerine 1-2 ml 1 M NaOH çözeltisi ilave edilir. Bunun üzerine 0.1 g müreksit indikatörünün eklenmesinin ardından mevcut olan pembe renk menekşe rengine dönüşüncüye kadar 0.01 M EDTA ile titrasyon işlemi yapılır. Harcanan EDTA miktarı Ca sertliği hesabı için kayıt edilir.

Toplam Sertlik: Su örneğinden 100 ml alınıp üzerine tampon çözeltisinden (NH₄Cl+NH₄OH) 0.5-2.0 ml eklenir. Toplam sertlik belirteci eriochrome black T'den 0.1 g ilave edilir. Oluşan şarap kırmızısı renk mavi rene dönüşüncüye kadar 0.01 M EDTA eklenerek titrasyon işlemi yapılır ve harcanan EDTA miktarı toplam sertlik hesabı için kayıt edilir.

3.2.4.2. Kalsiyum Sertliği ve Toplam Sertliğin Hesaplanması

$$\text{Kalsiyum Sertliği (mg CaCO}_3\text{/L)} = \frac{\text{Harcanan EDTA (ml)} \times 0.01 \times 40}{\text{Örnek (ml)} \times 1/1000}$$

$$\text{Toplam Sertlik (mg CaCO}_3\text{/L)} = \frac{\text{Harcanan EDTA (ml)} \times 1000}{\text{Örnek (ml)}}$$

Akut 30µM Cr⁺⁶ için;

$$M = m/MA \times V \Rightarrow 0.0000003 = m/51.996 \times 1 \Rightarrow m = 0.00155998 \text{ g}$$

$$\text{ppm} = \frac{\text{Çözünen (g)}}{\text{Çözelti (ml)}} \times 10^6$$

$$\text{ppm} = \frac{0.00155998 \text{ g}}{1000 \text{ ml}} \times 10^6 \Rightarrow \text{ppm} = 1.55998$$

3.2.5. İstatistiksel Analizler

Deney sonucu elde edilen sonuçların istatistik değerlendirmeleri, SPSS v15.0 programı aracılığıyla “Regresyon Analizi” ve “One-way ANOVA” ile gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu ile deney grupları arasında istatistiksel bir farklılığın olup olmadığı “One-way ANOVA” ile test edilmiştir. İstatistiksel farkın önemli ($p < 0,05$) olduğu durumlarda, farklılığın hangi grup ya da gruplarda olduğunu belirlemek adına “post-hoc” testlerinden Duncan-test kullanılmıştır. Elde edilen sonuçların grafik çizimlerinin oluşturulmasında Microsoft Excel programından yararlanılmıştır. Veriler aritmetik ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir.

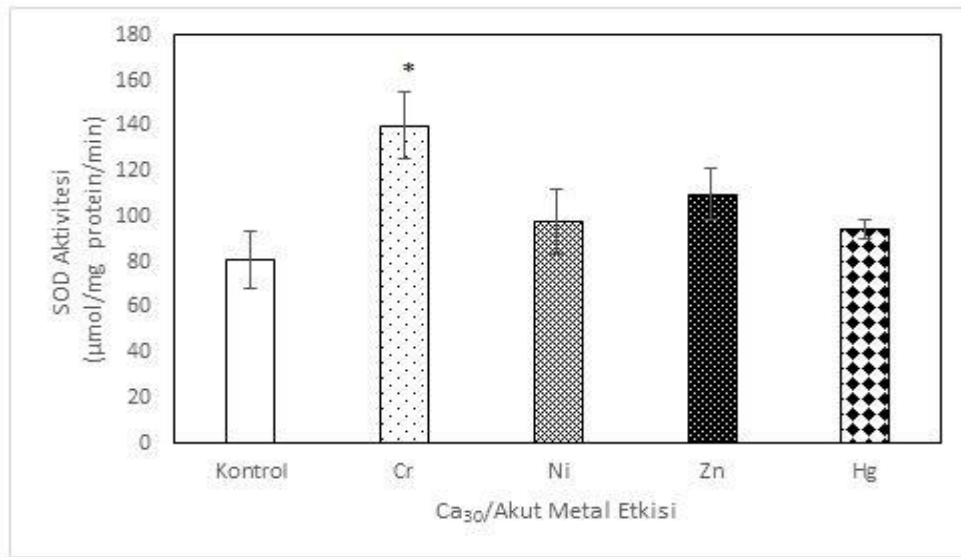


4. BULGULAR VE TARTIŞMA

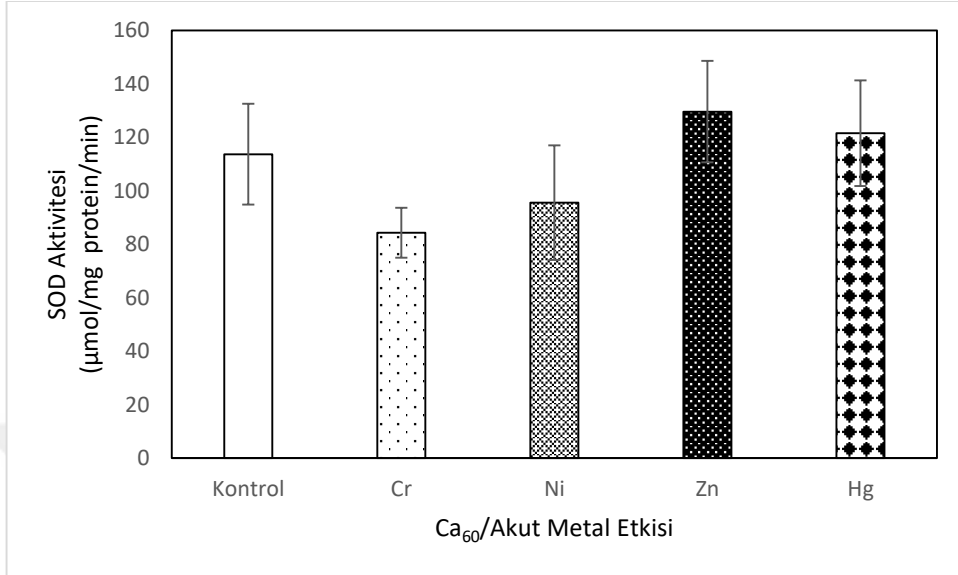
4.1. Bulgular

4.1.1. Akut Etki

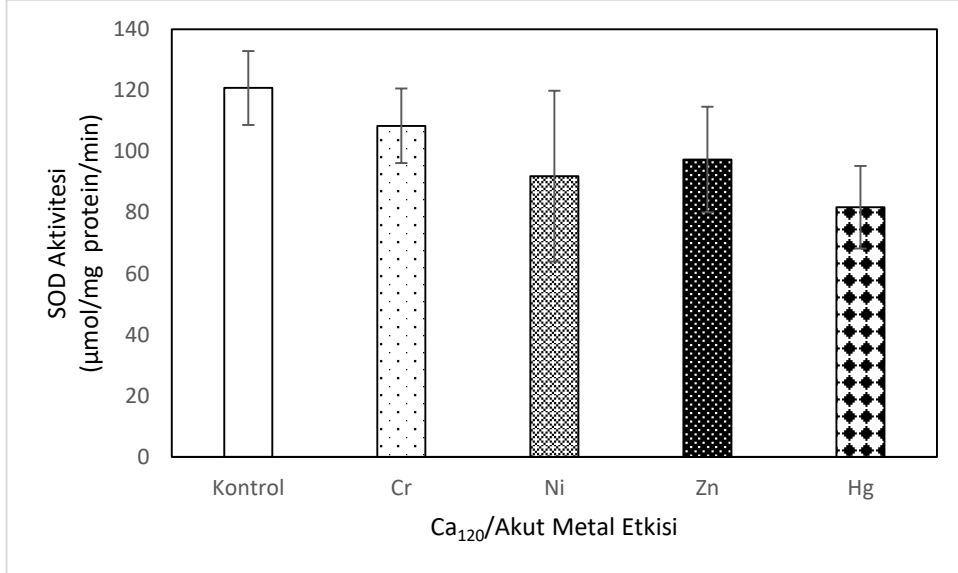
Farklı sertlik (Ca_{30} , Ca_{60} ve Ca_{120}) değerlerine sahip sularda akut olarak Cr^{+6} , Ni^{+2} , Zn^{+2} ve Hg^{+2} ye maruz bırakılan balıkların karaciğerindeki SOD enzim aktiviteleri Şekil 4.1., 4.2., ve 4.3.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Ca_{30} (30 mg Ca^{+2} /L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer SOD aktiviteleri (Veriler ortalama ($n=6$) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkı göstermektedir.)



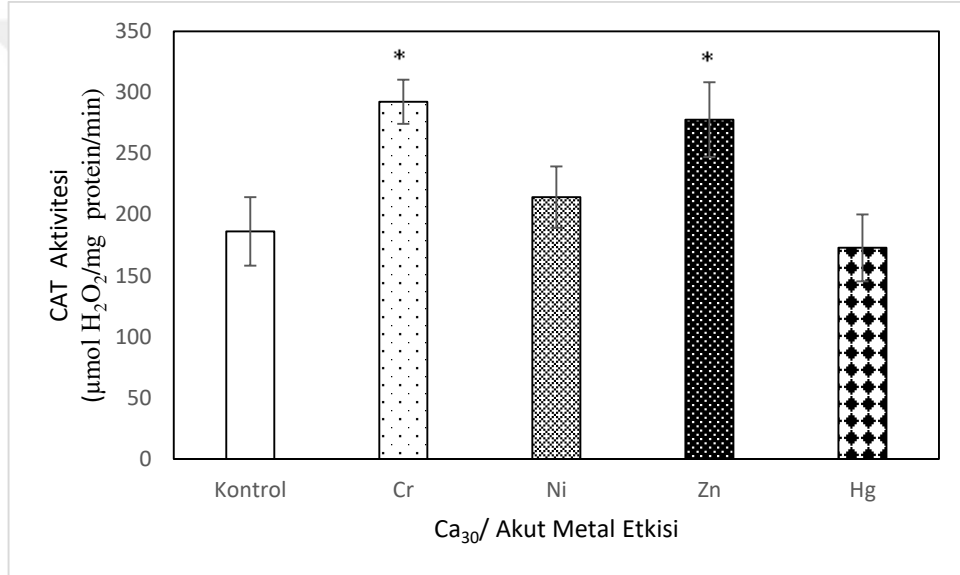
Şekil 4.2. Ca₆₀ (60 mg Ca²⁺/L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer SOD aktiviteleri (Veriler ortalama (n=6) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05) farkı göstermektedir)



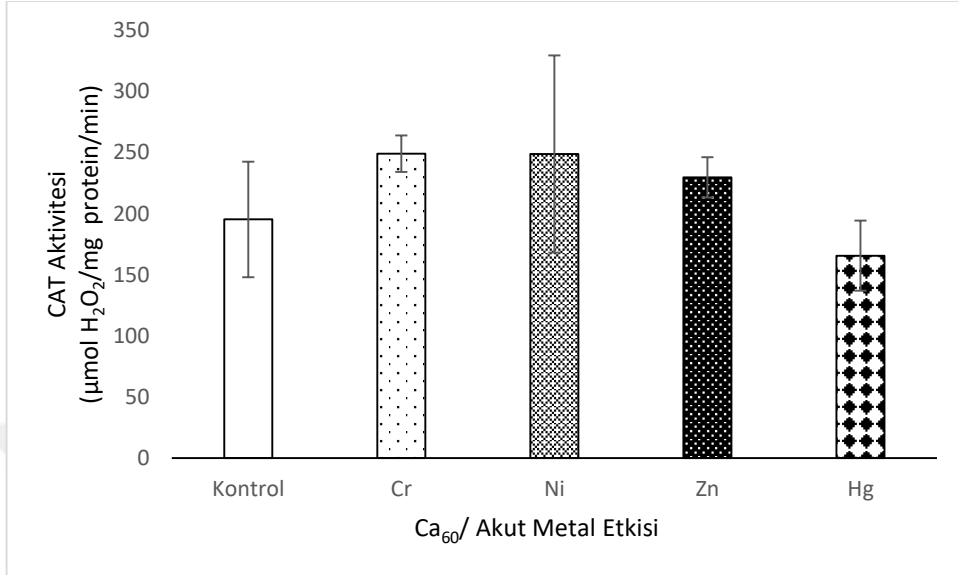
Şekil 4.3. Ca₁₂₀ (120 mg Ca²⁺/L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer SOD aktiviteleri (Veriler ortalama (n=6) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05) farkı göstermektedir)

Ca_{30} , Ca_{60} ve Ca_{120} konsantrasyonlarında SOD aktivitesi yalnızca Ca_{30} sertlik ortamında Cr'a maruz bırakılan balıklarda ($140.1 \mu\text{mol/mg protein/min}$) kontrole göre ($81.16 \mu\text{mol/mg protein/min}$) önemli ölçüde artmış ve bu artış istatistik olarak önemli olmuştur ($p<0.05$).

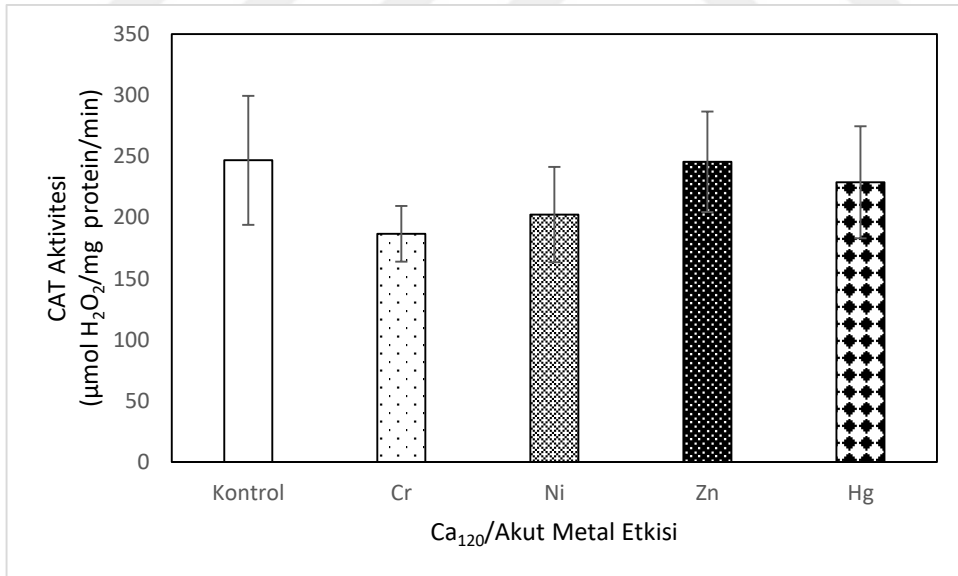
Farklı sertlik (Ca_{30} , Ca_{60} ve Ca_{120}) değerlerine sahip sularda akut olarak Cr^{+6} , Ni^{+2} , Zn^{+2} ve Hg^{+2} ye maruz bırakılan balıkların karaciğerindeki CAT aktiviteleri Şekil 4.4., 4.5 ve 4.6.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Ca_{30} (30 mg Ca^{+2}/L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer CAT aktiviteleri (Veriler ortalama ($n=6$) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkı göstermektedir)



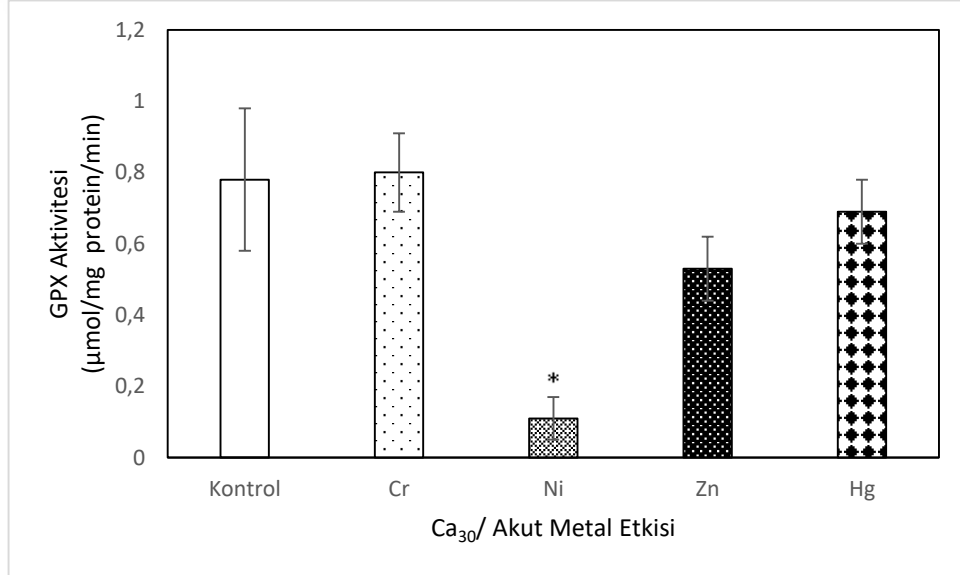
Şekil 4.5. Ca_{60} (60 mg Ca^{+2}/L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer CAT aktiviteleri (Veriler ortalama ($n=6$) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkı göstermektedir)



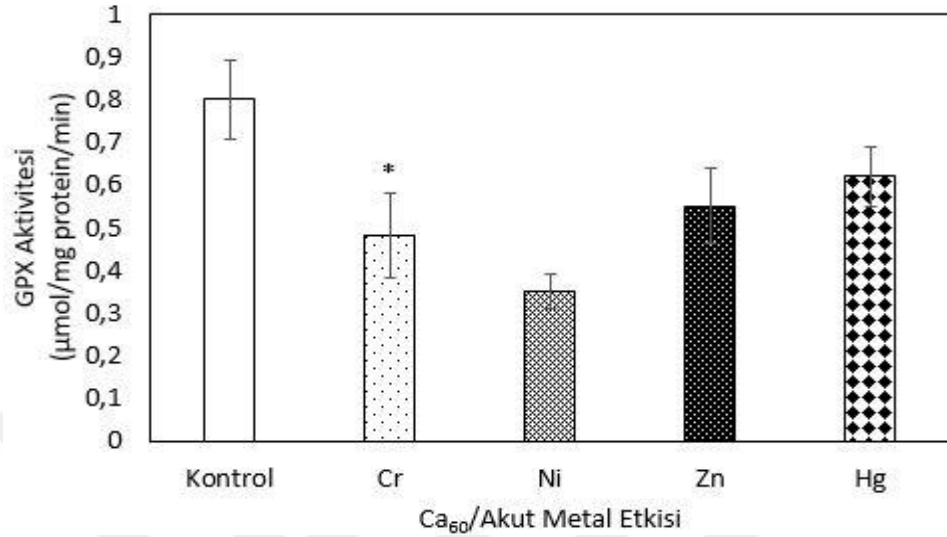
Şekil 4.6. Ca_{120} (120 mg Ca^{+2}/L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer CAT aktiviteleri (Veriler ortalama ($n=6$) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkı göstermektedir)

CAT aktivitesi Ca_{60} ve Ca_{120} gruplarında anlamlı bir değişiklik göstermemekle birlikte ($p>0.05$), su sertliğinin en az olduğu Ca_{30} grubunda Cr (292,31 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg protein/min}$) ve Zn (277,67 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg protein/min}$) etkisinde kalan balıklarda kontrole göre (186,36 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg protein/min}$) anlamlı olarak artmıştır ($p<0.05$).

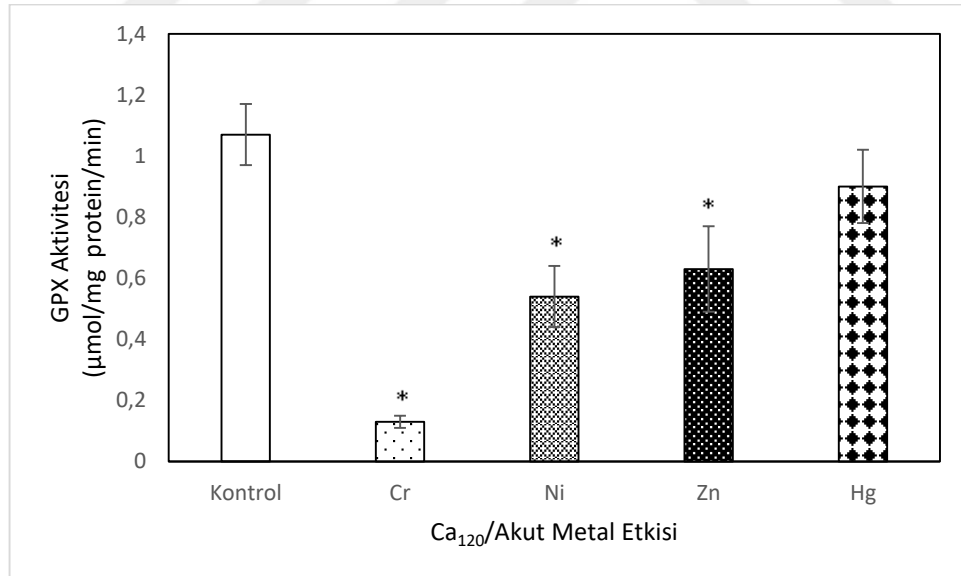
Farklı sertlik (Ca_{30} , Ca_{60} ve Ca_{120}) değerlerine sahip sulara akut olarak Cr^{+6} , Ni^{+2} , Zn^{+2} ve Hg^{+2} ye maruz bırakılan balıkların karaciğerindeki GPx aktiviteleri Şekil 4.7., 4.8. ve 4.9.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Ca_{30} (30 mg Ca^{+2}/L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GPX aktiviteleri (Veriler ortalama ($n=6$) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkı göstermektedir)



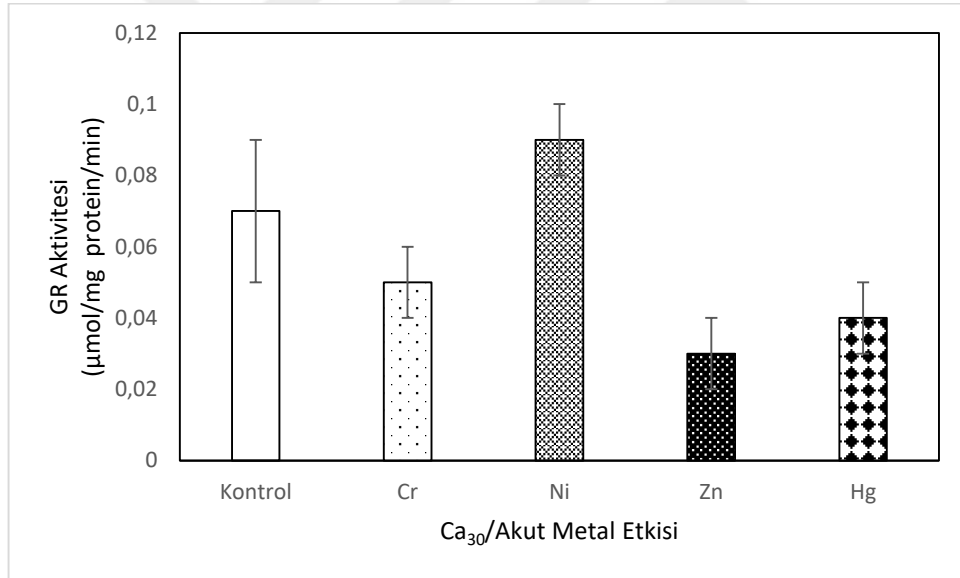
Şekil 4.8. Ca_{60} (60 mg Ca^{+2}/L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GPX aktiviteleri (Veriler ortalama (n=6) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkı göstermektedir)



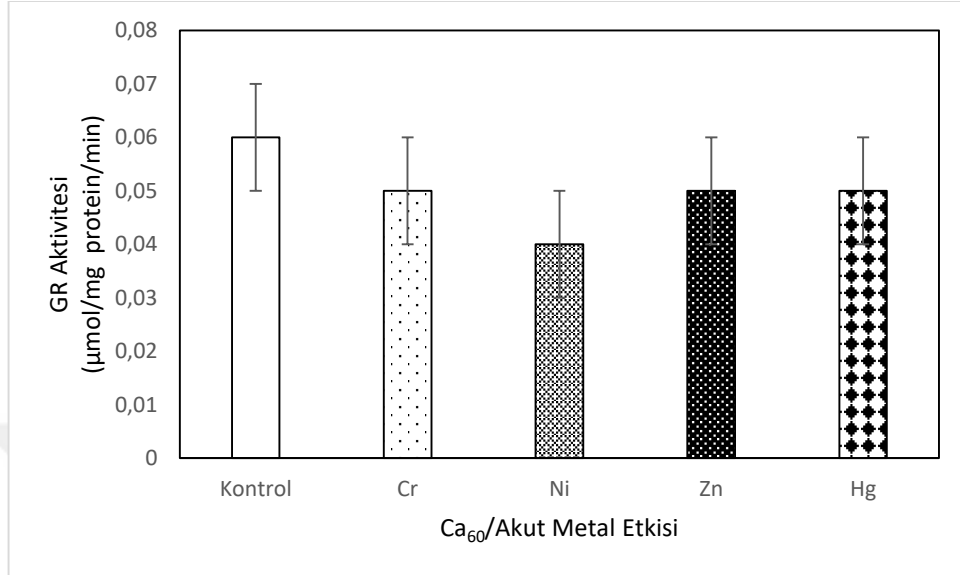
Şekil 4.9. Ca_{120} (120 mg Ca^{+2}/L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GPX aktiviteleri (Veriler ortalama (n=6) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkı göstermektedir)

GPx aktivitesi Ca_{30} grubunda yalnızca Ni'ye maruz bırakılan balıklarda ($0,11 \mu\text{mol /mg protein/min}$) kontrole göre ($0,78 \mu\text{mol /mg protein/min}$) anlamlı azalış göstermiştir. Ca_{60} grubunda bu azalma Cr ($0,48 \mu\text{mol /mg protein/min}$) ve Ni ($0,35 \mu\text{mol /mg protein/min}$) ye maruz bırakılan balıklarda gözlenmiş ve Cr'daki azalış istatistik olarak önemli bulunurken , Ca_{120} grubunda ise Cr, Ni ve Zn'ye maruz bırakılan balıklarda sırasıyla $0,13 \mu\text{mol /mg protein/min}$, $0,54 \mu\text{mol/mg protein/min}$ ve $0,63 \mu\text{mol /mg protein/min}$ olarak gerçekleşmiş ve bu azalışlar istatistiksel olarak önemli olmuştur. ($p<0.05$).

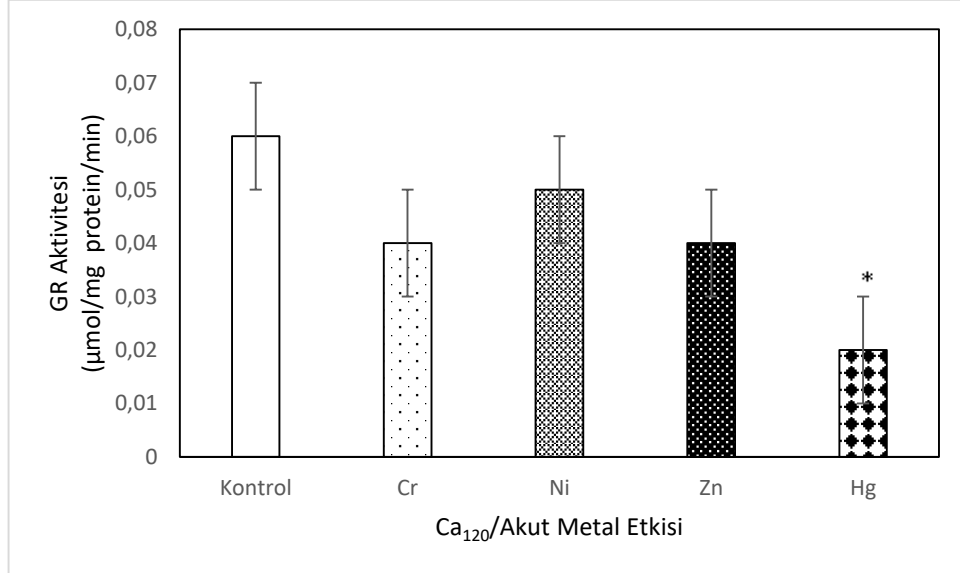
Farklı sertlik (Ca_{30} , Ca_{60} ve Ca_{120}) değerlerine sahip sularda akut olarak Cr^{+6} , Ni^{+2} , Zn^{+2} ve Hg^{+2} ye maruz bırakılan balıkların karaciğerindeki GR aktiviteleri Şekil 4.10., 4.11. ve 4.12' de gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Ca_{30} ($30 \text{ mg Ca}^{+2}/\text{L}$) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GR aktiviteleri (Veriler ortalama ($n=6$) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkı göstermektedir)



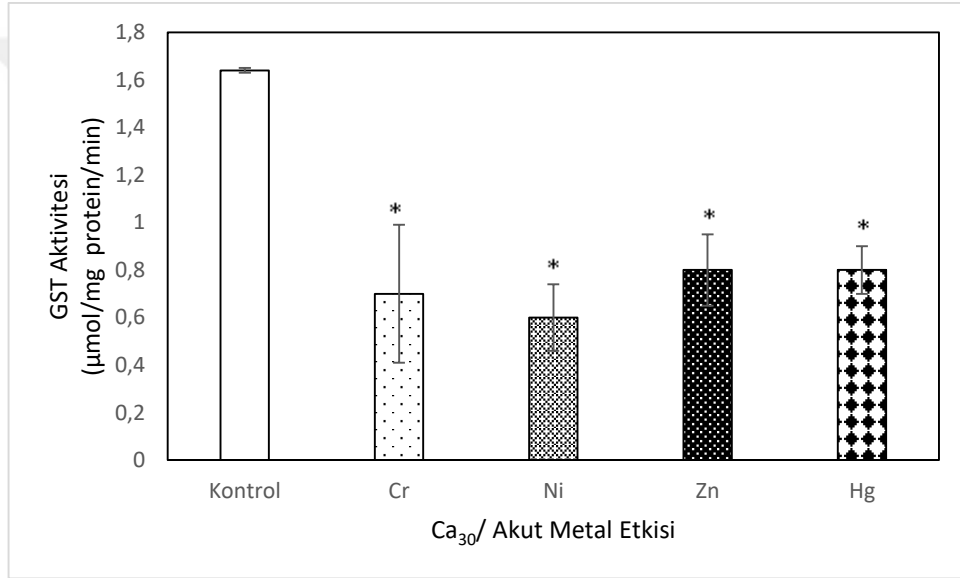
Şekil 4.11. Ca_{60} (60 mg Ca^{+2}/L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GR aktiviteleri (Veriler ortalama (n=6) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkı göstermektedir)



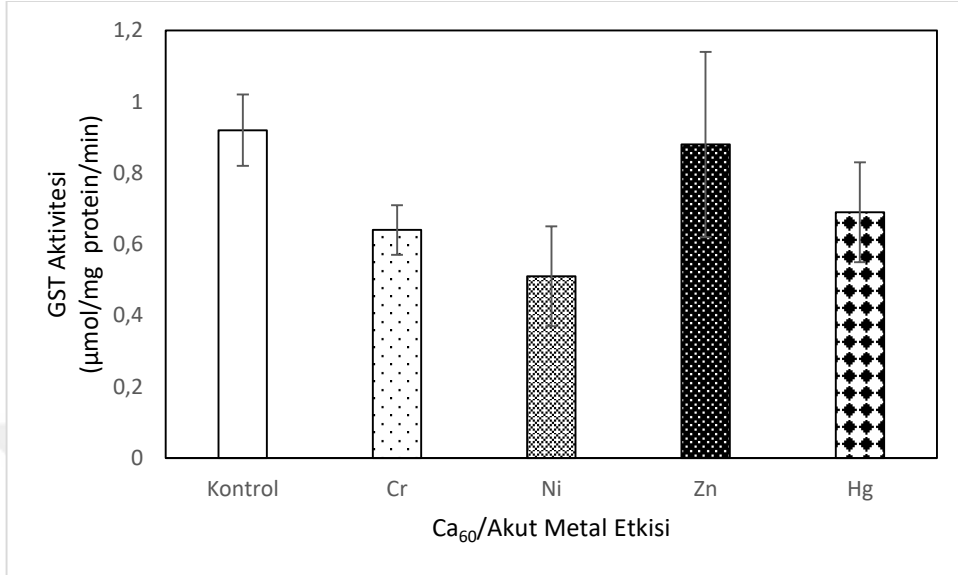
Şekil 4.12. Ca_{120} (120 mg Ca^{+2}/L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GR aktiviteleri (Veriler ortalama (n=6) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkı göstermektedir)

GR aktivitesi Ca_{30} ve Ca_{60} gruplarında hiçbir metalin etkisi ile istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermemiştir ($p>0.05$). Ca_{120} grubunda ise sadece Hg'ye maruz bırakılan balıklarda ($0,02 \mu\text{mol /mg protein/min}$) GR aktivitesi kontrole göre ($0,06 \mu\text{mol /mg protein/min}$) anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.05$).

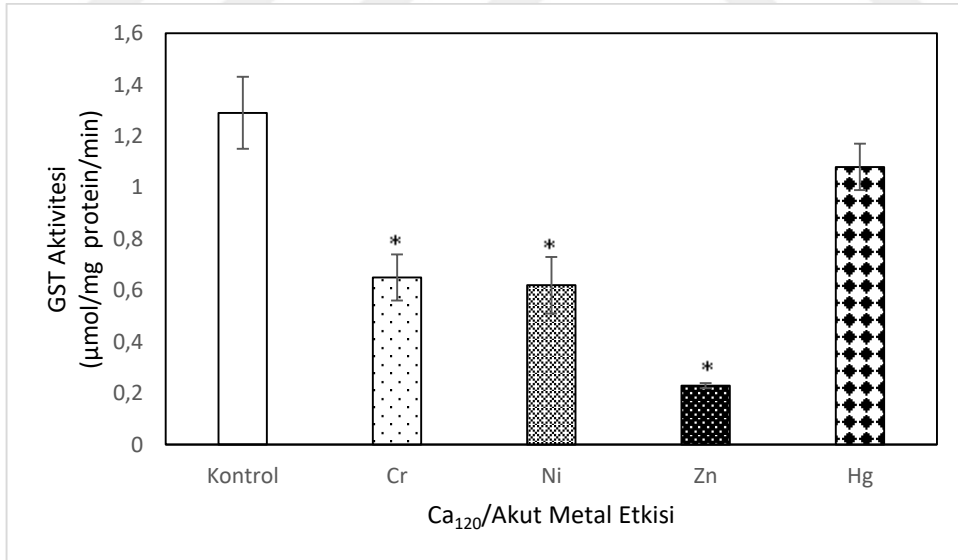
Farklı sertlik (Ca_{30} , Ca_{60} ve Ca_{120}) değerlerine sahip sularda akut olarak Cr^{+6} , Ni^{+2} , Zn^{+2} ve Hg^{+2} ye maruz bırakılan balıkların karaciğerindeki GST aktiviteleri Şekil 4.13, 4.14 ve 4.15' de gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Ca_{30} ($30 \text{ mg Ca}^{+2}/\text{L}$) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GST aktiviteleri (Veriler ortalama ($n=6$) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkı göstermektedir)



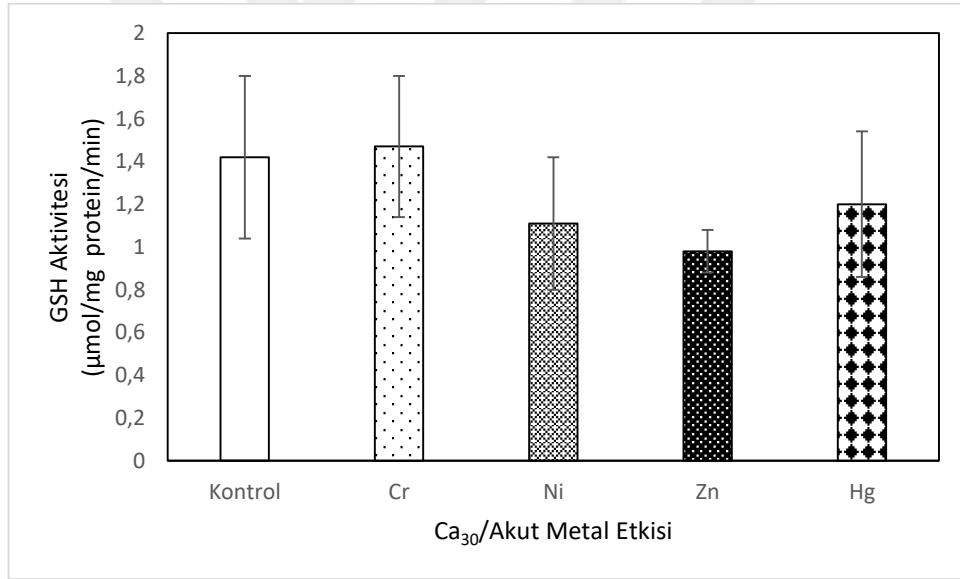
Şekil 4.14. Ca_{60} (60 mg Ca^{+2}/L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GST aktiviteleri (Veriler ortalama (n=6) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkı göstermektedir)



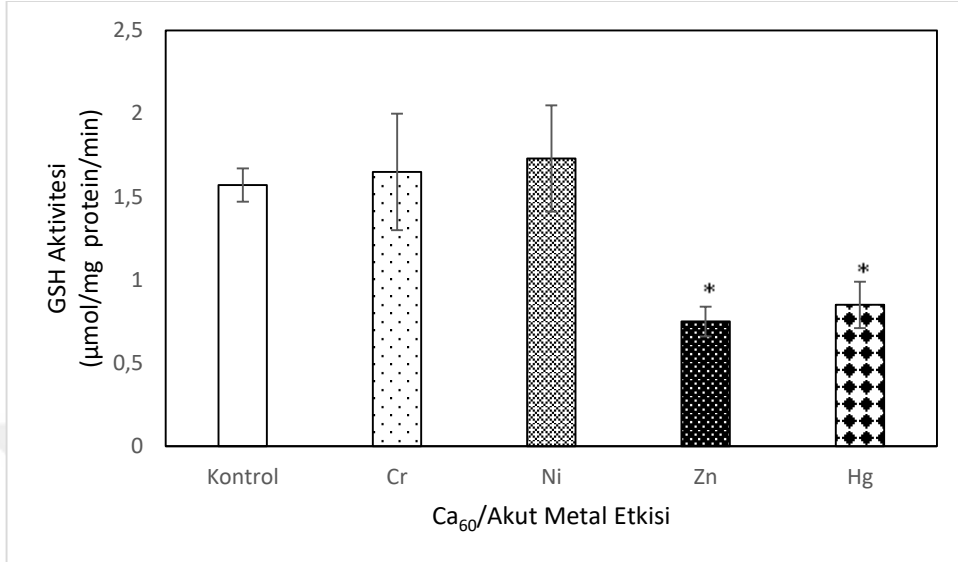
Şekil 4.15. Ca_{120} (120 mg Ca^{+2}/L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GST aktiviteleri (Veriler ortalama (n=6) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkı göstermektedir)

GST aktivitesi Ca_{30} grubunda denenen tüm metallerde kontrole göre önemli ölçüde azalmıştır ($p<0.05$). Ca_{60} grubunda GST aktivitesinde hiçbir metalin etkisine anlamlı bir tepki vermemiş olup ($p>0.05$), Ca_{120} grubunda Cr, Ni ve Zn'ye maruz bırakılan balıklarda GST aktivitesi sırasıyla 0,65 $\mu\text{mol}/\text{mg protein}/\text{min}$, 0,62 $\mu\text{mol}/\text{mg protein}/\text{min}$ ve 0,23 $\mu\text{mol}/\text{mg protein}/\text{min}$ olarak ölçülmüş ve kontrol grubuna göre (1,29 $\mu\text{mol}/\text{mg protein}/\text{min}$) azalışlar istatistiksel olarak önemli olmuştur ($p<0.05$).

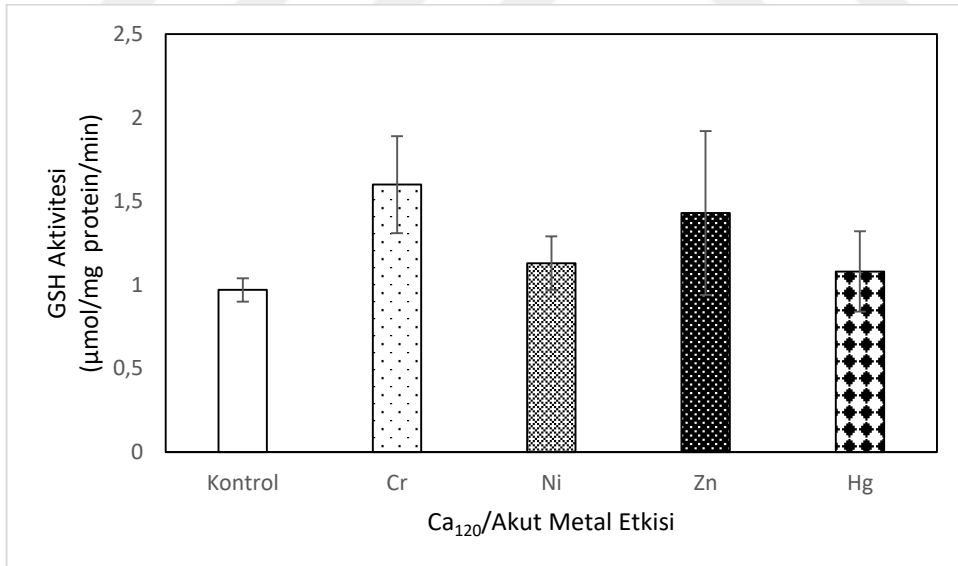
Farklı sertlik (Ca_{30} , Ca_{60} ve Ca_{120}) değerlerine sahip sularda akut olarak Cr^{+6} , Ni^{+2} , Zn^{+2} ve Hg^{+2} ye maruz bırakılan balıkların karaciğerindeki GSH düzeyleri Şekil 4.16, 4.17 ve 4.18'de gösterilmiştir.



Şekil 4.16. Ca_{30} (30 mg Ca^{+2}/L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GSH düzeyleri (Veriler ortalama ($n=6$) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkı göstermektedir)



Şekil 4.17. Ca_{60} (60 mg Ca^{+2}/L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GSH düzeyleri (Veriler ortalama (n=6) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkı göstermektedir)

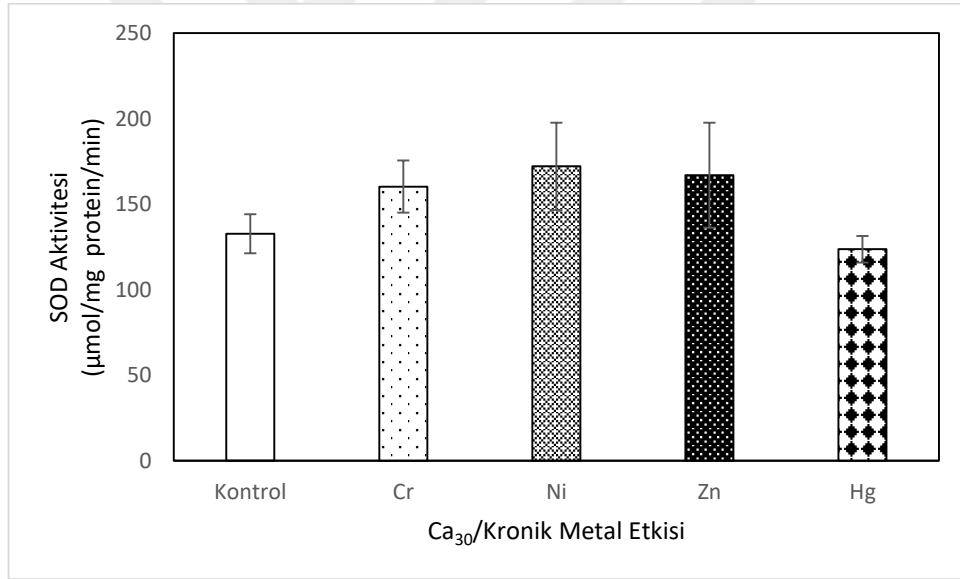


Şekil 4.18. Ca_{120} (120 mg Ca^{+2}/L) ortamında akut (3 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GSH düzeyleri (Veriler ortalama (n=6) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkı göstermektedir)

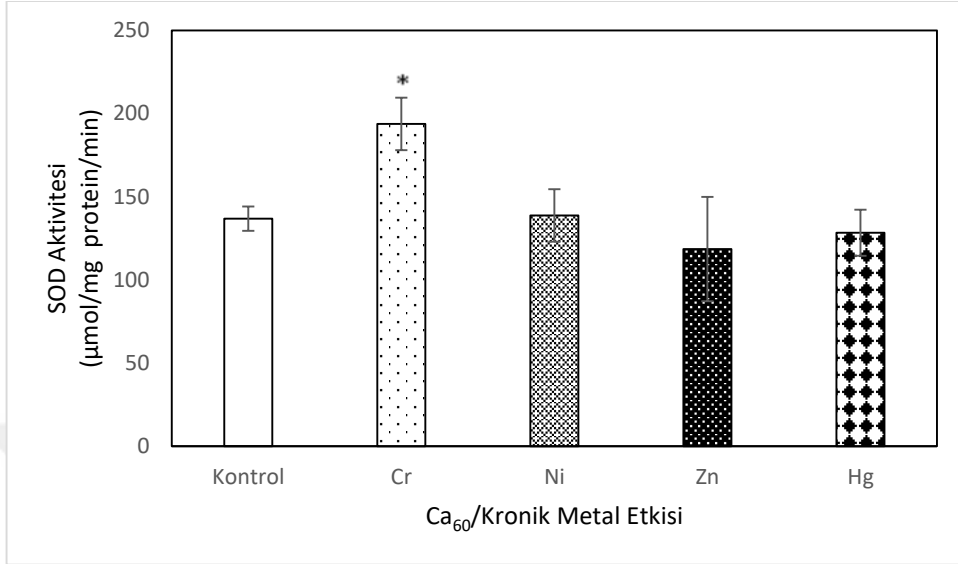
GSH düzeylerinde Ca_{30} ve Ca_{120} gruplarında metallere bağlı olarak herhangi bir önemli değişiklik olmamakla beraber ($p>0.05$), Ca_{60} grubunda Zn ($0,75 \mu\text{mol /mg protein/min}$) ve Hg ($0,85 \mu\text{mol /mg protein/min}$) etkisinde kalma sonucu GSH düzeyi kontrole göre ($1,57 \mu\text{mol /mg protein/min}$) azalışlar istatistiksel olarak önemli olmuştur. ($p<0.05$).

4.1.2. Kronik Etki

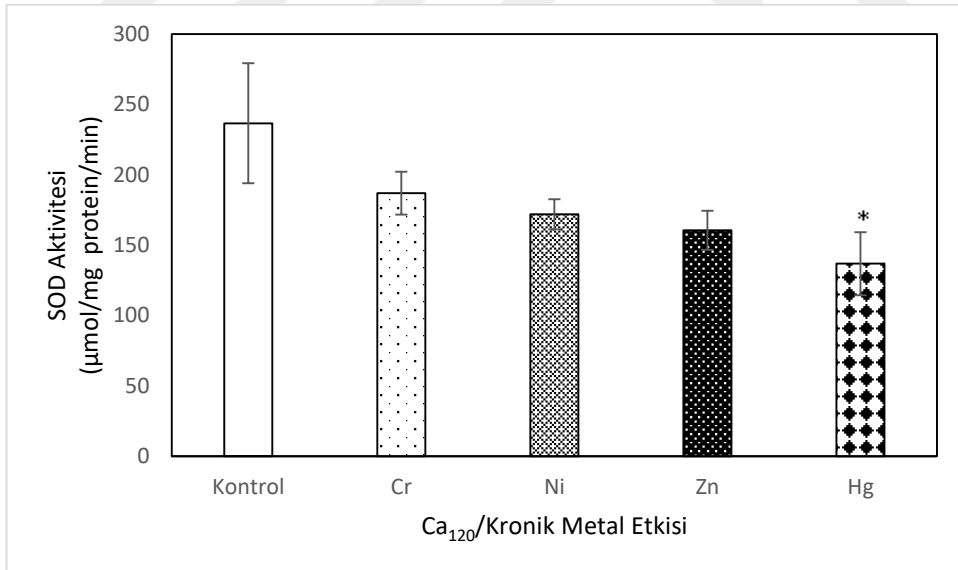
Farklı sertlik (Ca_{30} , Ca_{60} ve Ca_{120}) değerlerine sahip sularda kronik olarak Cr^{+6} , Ni^{+2} , Zn^{+2} ve Hg^{+2} ye maruz bırakılan balıkların karaciğerindeki SOD aktiviteleri Şekil 4.19, 4.20 ve 4.21’ de gösterilmiştir.



Şekil 4.19. Ca_{30} ($30 \text{ mg Ca}^{+2}/\text{L}$) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer SOD aktiviteleri (Veriler ortalama ($n=6$) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkı göstermektedir)



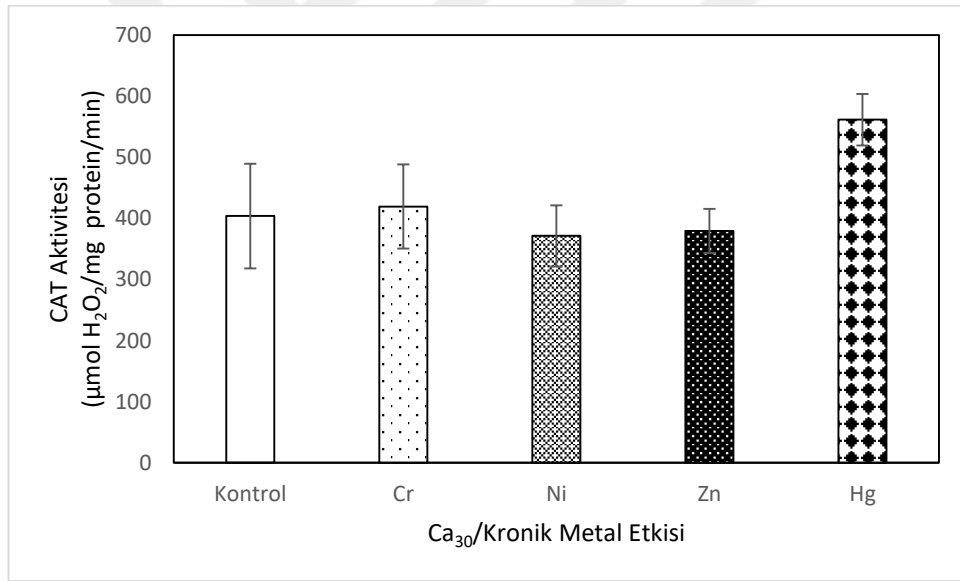
Şekil 4.20. Ca_{60} (60 mg Ca^{+2}/L) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer SOD aktiviteleri (Veriler ortalama (n=6) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkı göstermektedir)



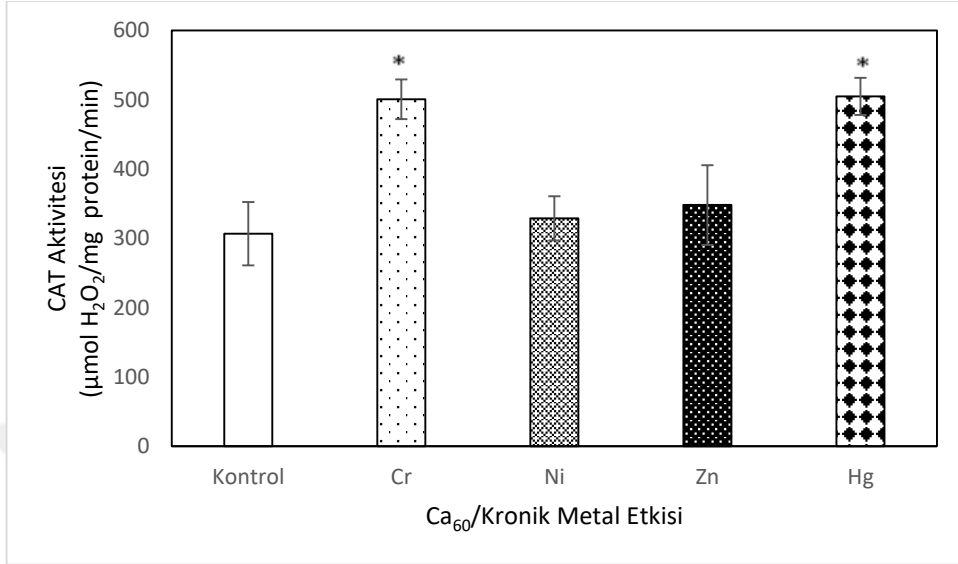
Şekil 4.21. Ca_{120} (120 mg Ca^{+2}/L) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer SOD aktiviteleri (Veriler ortalama (n=6) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkı göstermektedir)

SOD enzim aktivitesi Ca_{30} grubunda metal etkisine bağlı olarak anlamlı bir değişiklik göstermemiştir ($p>0.05$). Ca_{60} grubunda Cr'ye maruz bırakılan balıklarda SOD aktivitesi ($193,79 \mu\text{mol /mg protein/min}$) kontrole göre ($136,84 \mu\text{mol /mg protein/min}$) önemli ölçüde artarken, Ca_{120} grubunda Hg'ye maruz bırakılan balıklarda ($136,83 \mu\text{mol /mg protein/min}$) SOD aktivitesi kontrole göre ($236,67 \mu\text{mol /mg protein/min}$) azalışları istatistiksel olarak önemli olmuştur ($p<0,05$).

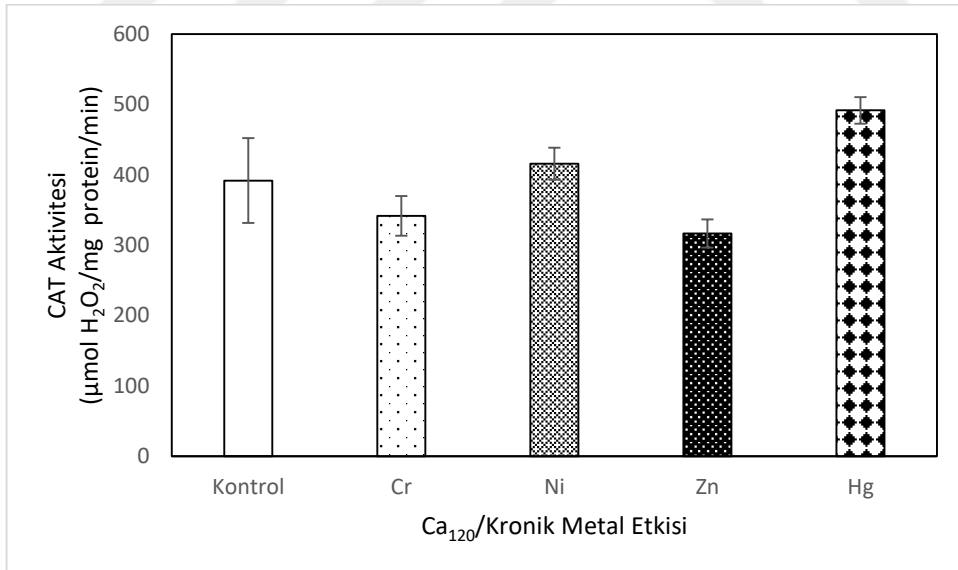
Farklı sertlik (Ca_{30} , Ca_{60} ve Ca_{120}) değerlerine sahip sularda kronik olarak Cr^{+6} , Ni^{+2} , Zn^{+2} ve Hg^{+2} ye maruz bırakılan balıkların karaciğerindeki CAT aktiviteleri Şekil 4.22, 4.23 ve 4.24' de gösterilmiştir.



Şekil 4.22. Ca_{30} ($30 \text{ mg Ca}^{+2}/\text{L}$) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer CAT aktiviteleri (Veriler ortalama ($n=6$) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkı göstermektedir)



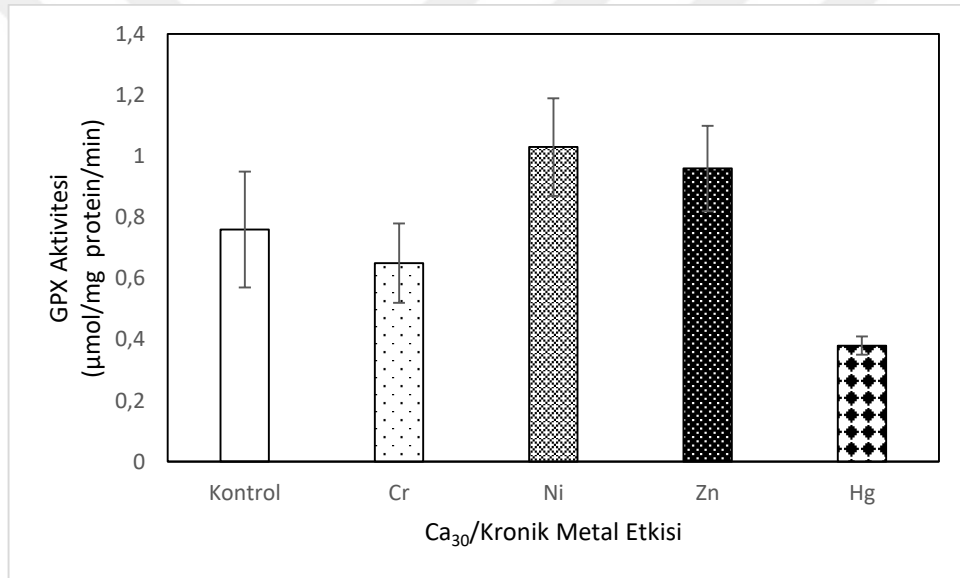
Şekil 4.23. Ca₆₀ (60 mg Ca²⁺/L) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer CAT aktiviteleri (Veriler ortalama (n=6) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05) farkı göstermektedir)



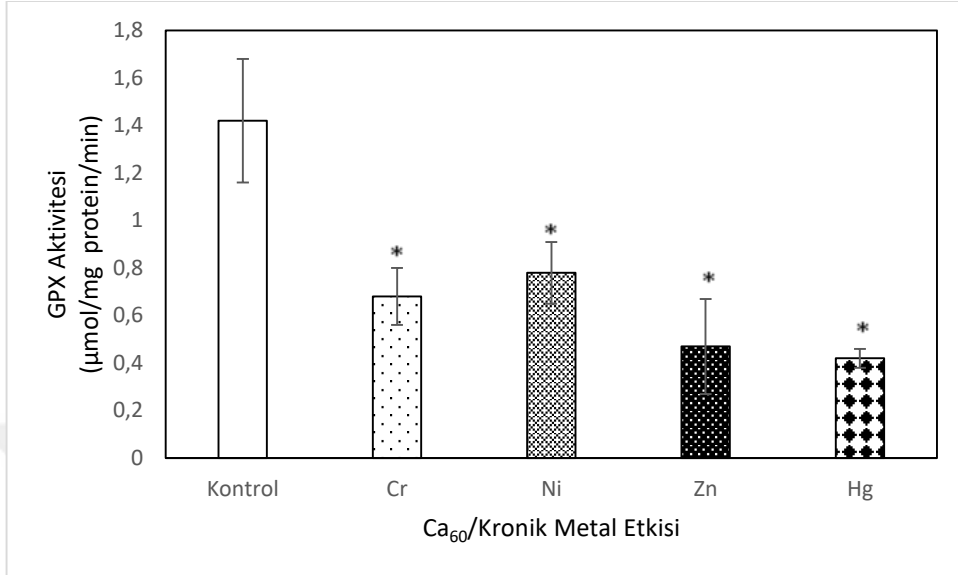
Şekil 4.24. Ca₁₂₀ (120 mg Ca²⁺/L) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer CAT aktiviteleri (Veriler ortalama (n=6) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05) farkı göstermektedir)

CAT aktivitesi Ca_{30} ve Ca_{120} gruplarında metal etkisinde kalan balıklarda anlamlı olarak değişmemiştir ($p>0.05$). Ca_{60} grubunda ise Cr ($500,7 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg protein/min}$) ve Hg ($504,8 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg protein/min}$) etkisinde kalma sonucu CAT aktivitesi kontrol grubuna göre ($306,75 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg protein/min}$) artışlar istatistik olarak önemli olmuştur ($p<0.05$).

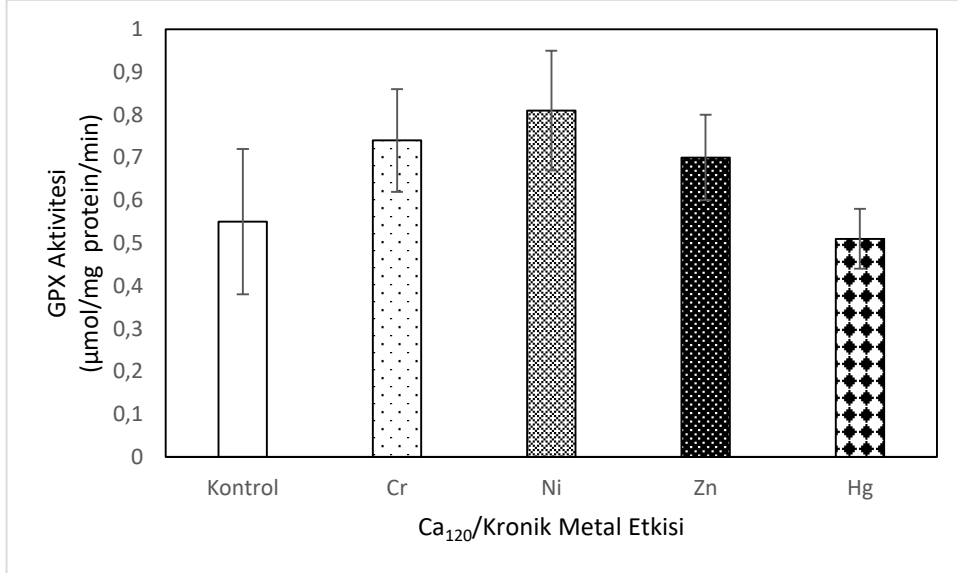
Farklı sertlik (Ca_{30} , Ca_{60} ve Ca_{120}) değerlerine sahip sularda kronik olarak Cr^{+6} , Ni^{+2} , Zn^{+2} ve Hg^{+2} ye maruz bırakılan balıkların karaciğerindeki GPx aktiviteleri Şekil 4.25, 4.26 ve 4.27' de gösterilmiştir.



Şekil 4.25. Ca_{30} ($30 \text{ mg Ca}^{+2}/\text{L}$) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GPX aktiviteleri (Veriler ortalama ($n=6$) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkı göstermektedir)



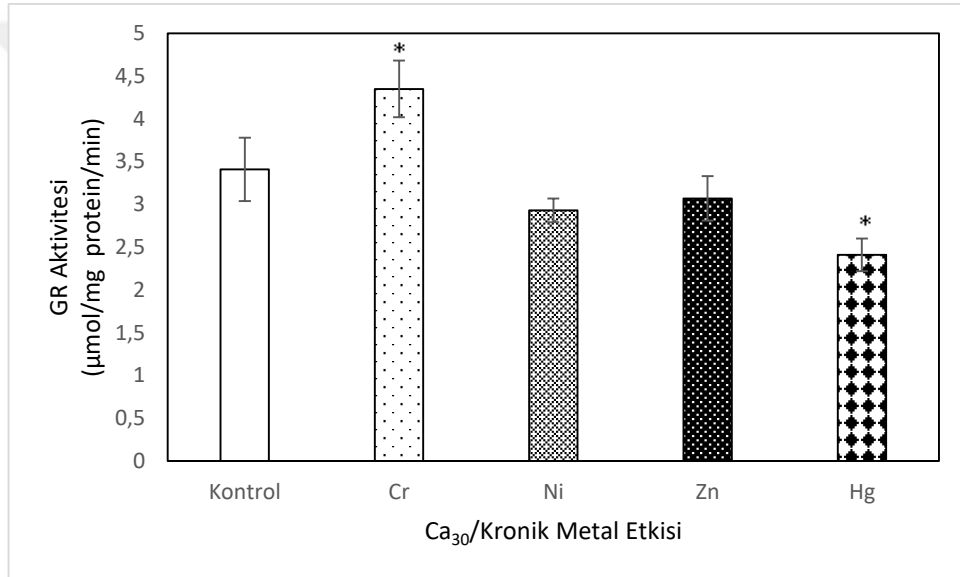
Şekil 4.26. Ca_{60} (60 mg Ca^{+2}/L) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GPX aktiviteleri (Veriler ortalama (n=6) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkı göstermektedir)



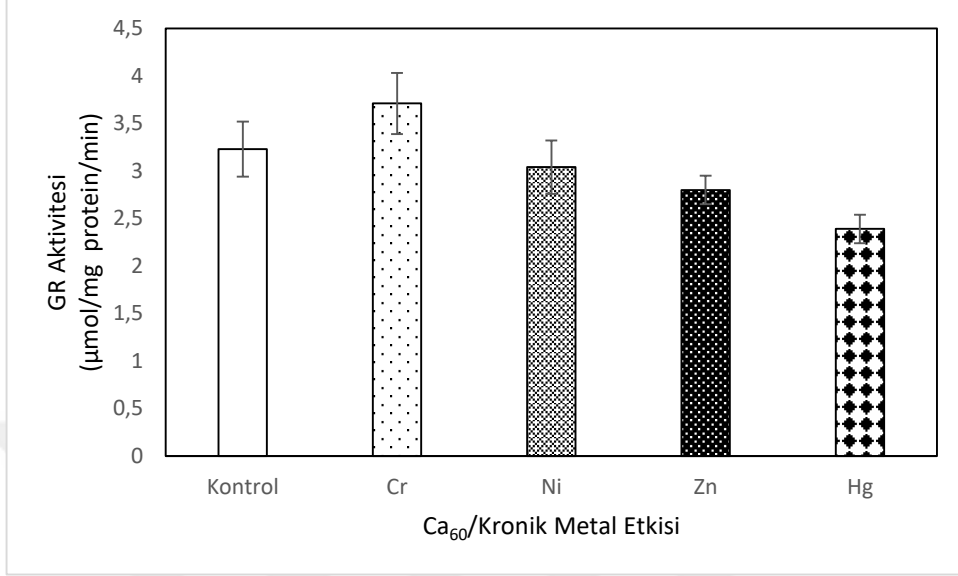
Şekil 4.27. Ca_{120} (120 mg Ca^{+2}/L) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GPX aktiviteleri (Veriler ortalama (n=6) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkı göstermektedir)

Metal etkisinde kalan balıklarda GPx aktivitesinde Ca_{30} ve Ca_{120} gruplarında anlamlı bir değişiklik olmamakla birlikte ($p>0.05$), Ca_{60} grubunda denenen tüm metaller GPx aktivitesinde kontrole göre ($1,42 \mu\text{mol /mg protein/min}$) azalışlar istatistik olarak önemli olmuşlardır ($p<0.05$).

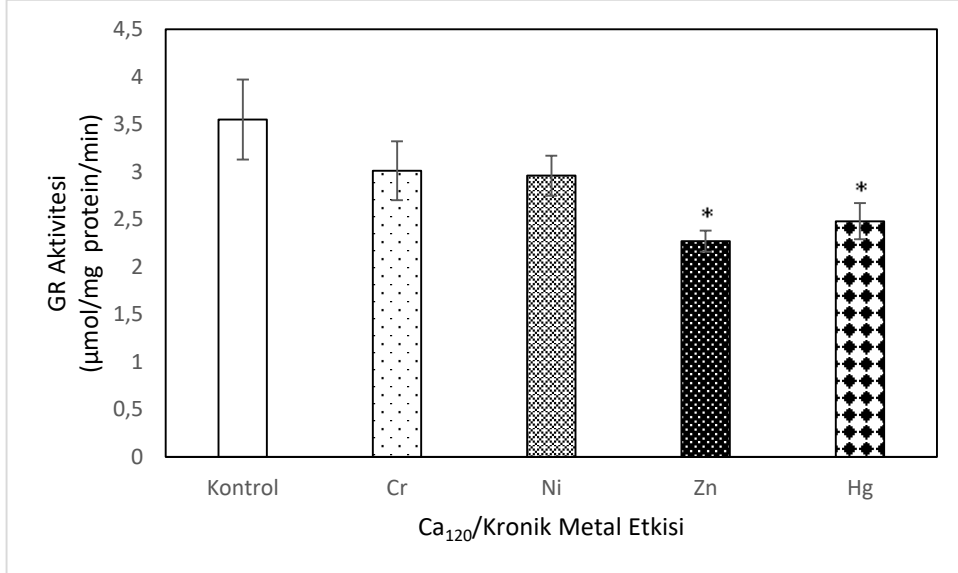
Farklı sertlik (Ca_{30} , Ca_{60} ve Ca_{120}) değerlerine sahip sulara kronik olarak Cr^{+6} , Ni^{+2} , Zn^{+2} ve Hg^{+2} ye maruz bırakılan balıkların karaciğerindeki GR aktiviteleri Şekil 4.28, 4.29 ve 4.30' da gösterilmiştir.



Şekil 4.28. Ca_{30} ($30 \text{ mg Ca}^{+2}/\text{L}$) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GR aktiviteleri (Veriler ortalama ($n=6$) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkı göstermektedir)



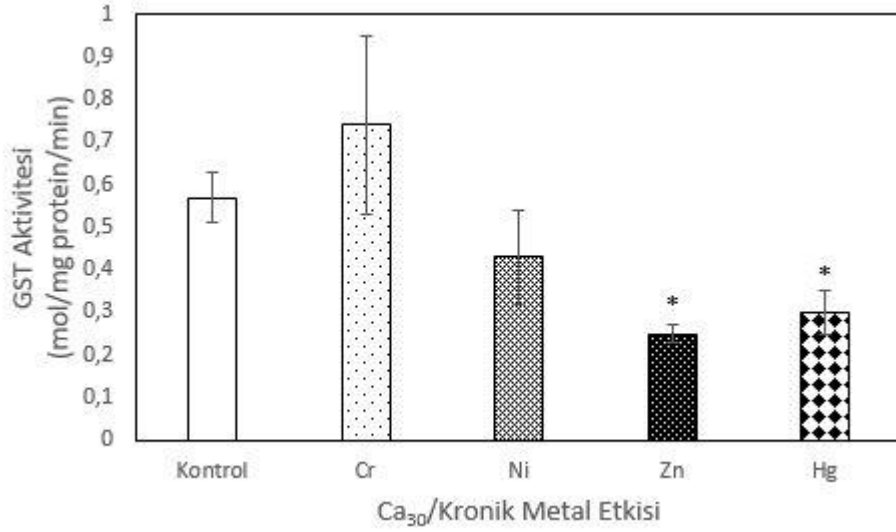
Şekil 4.29. Ca_{60} (60 mg Ca^{+2}/L) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GR aktiviteleri (Veriler ortalama (n=6) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkı göstermektedir)



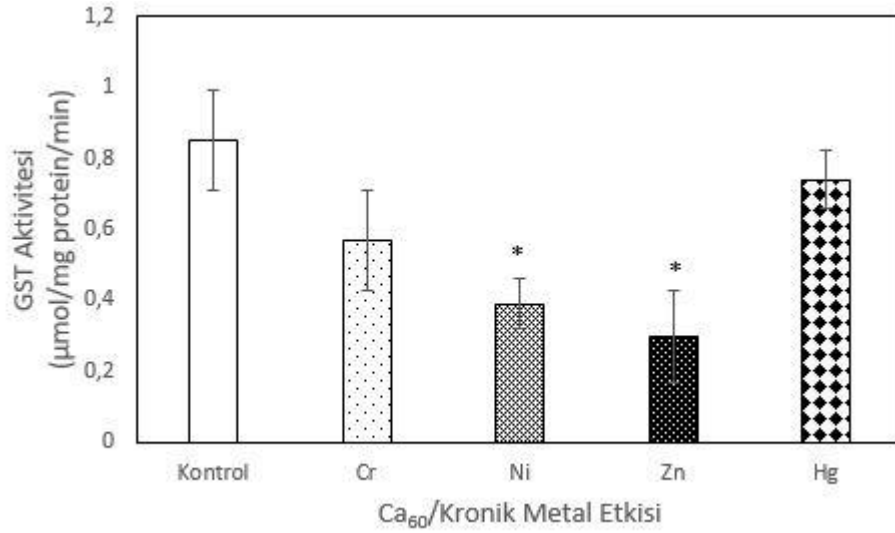
Şekil 4.30. Ca_{120} (120 mg Ca^{+2}/L) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GR aktiviteleri (Veriler ortalama (n=6) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkı göstermektedir)

GR aktivitesi Ca_{30} grubunda Cr etkisi ile ($4,35 \mu\text{mol /mg protein/min}$) kontrole göre ($3,41 \mu\text{mol /mg protein/min}$) artış önem gösterirken ($p<0.05$), Hg etkisinde kalan balıklarda GR aktivitesi ($2,41 \mu\text{mol /mg protein/min}$) kontrole göre anlamlı azalışlar göstermiştir ($p<0.05$). Ca_{60} grubunda ise metal etkisi ile GR aktivitesindeki değişiklik istatistik olarak önemli olmamıştır ($p>0.05$). Ca_{120} grubunda ise Zn ($2,27 \mu\text{mol /mg protein/min}$) ve Hg'ye ($2,48 \mu\text{mol /mg protein/min}$) maruz bırakılan balıklarda GR aktivitesi kontrole göre ($3,55 \mu\text{mol /mg protein/min}$) azalmış ve istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

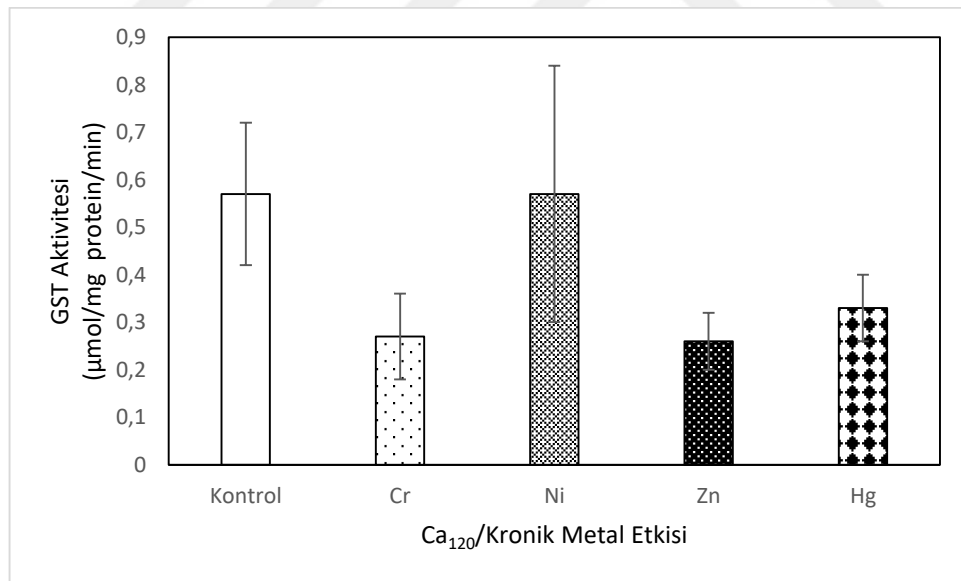
Farklı sertlik (Ca_{30} , Ca_{60} ve Ca_{120}) değerlerine sahip sularda kronik olarak Cr^{+6} , Ni^{+2} , Zn^{+2} ve Hg^{+2} ye maruz bırakılan balıkların karaciğerindeki GST aktiviteleri Şekil 4.31, 4.32 ve 4.33'de gösterilmiştir.



Şekil 4.31. Ca_{30} ($30 \text{ mg Ca}^{+2}/\text{L}$) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GST aktiviteleri (Veriler ortalama ($n=6$) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkı göstermektedir)



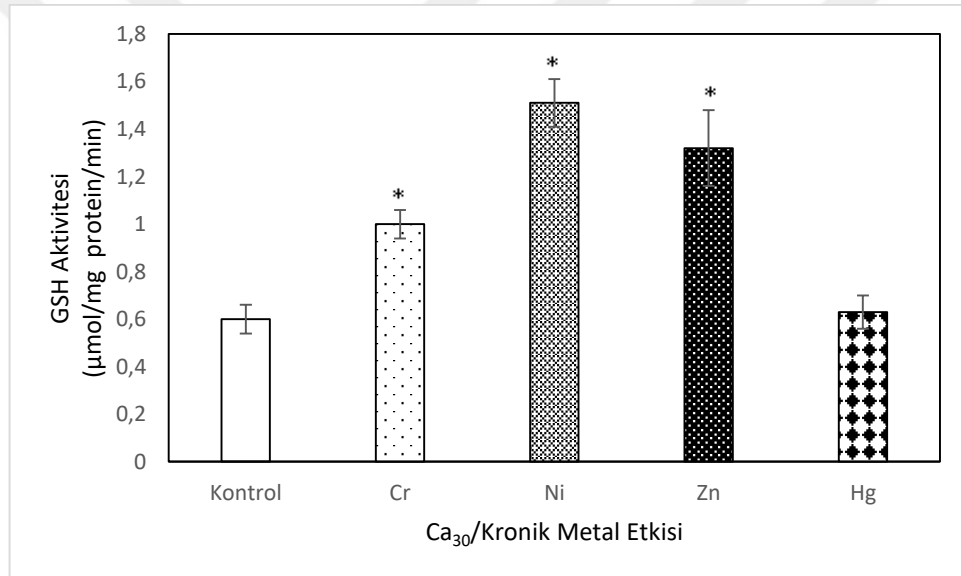
Şekil 4.32. Ca_{60} (60 mg Ca^{+2}/L) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GST aktiviteleri (Veriler ortalama (n=6) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkı göstermektedir)



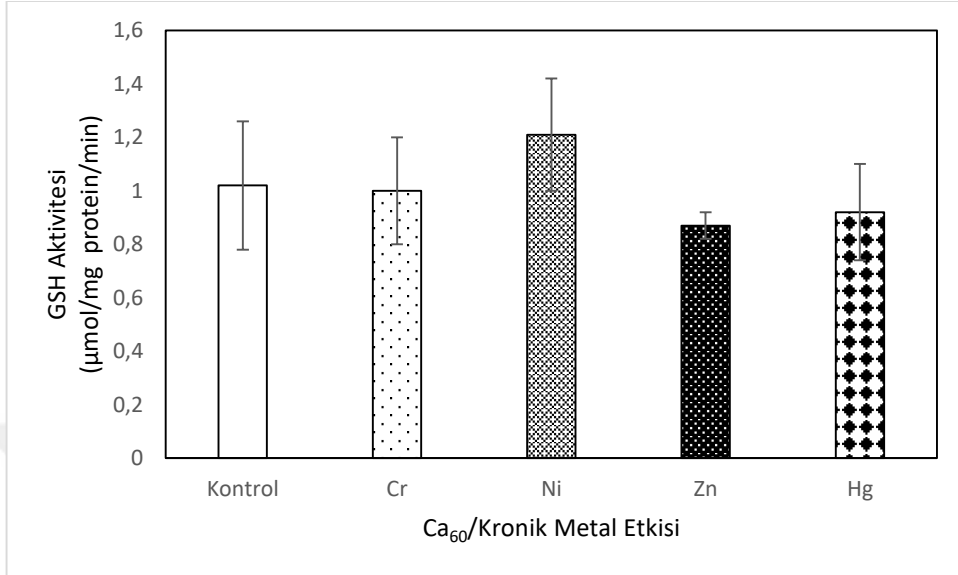
Şekil 4.33. Ca_{120} (120 mg Ca^{+2}/L) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GST aktiviteleri (Veriler ortalama (n=6) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkı göstermektedir)

GST aktivitesi Ca_{120} grubunda metal etkisi sonucu değişiklik istatistik olarak önem göstermemiştir ($p>0.05$). Ca_{60} grubunda ise Ni ($0,39 \mu\text{mol /mg protein/min}$) ve Zn'ye maruz bırakılan balıklarda ($0,30 \mu\text{mol /mg protein/min}$) GST aktivitesi kontrole göre ($0,85 \mu\text{mol /mg protein/min}$) azalış istatistik olarak önemli olmuştur. ($p<0.05$).

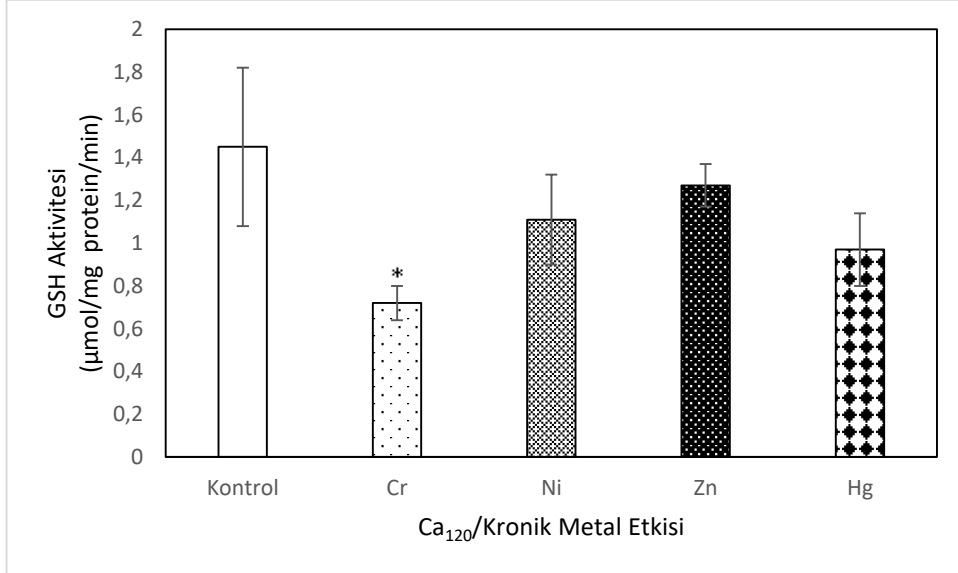
Farklı sertlik (Ca_{30} , Ca_{60} ve Ca_{120}) değerlerine sahip sularda kronik olarak Cr^{+6} , Ni^{+2} , Zn^{+2} ve Hg^{+2} ye maruz bırakılan balıkların karaciğerindeki GSH düzeyleri Şekil 4.34, 4.35 ve 4.36'da gösterilmiştir.



Şekil 4.34. Ca_{30} ($30 \text{ mg } Ca^{+2}/L$) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GSH düzeyleri (Veriler ortalama ($n=6$) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkı göstermektedir)



Şekil 4.35. Ca_{60} (60 mg Ca^{+2}/L) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GSH düzeyleri (Veriler ortalama (n=6) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkı göstermektedir)



Şekil 4.36. Ca_{120} (120 mg Ca^{+2}/L) ortamında kronik (30 gün) olarak metal etkisinde kalan balıkların karaciğer GSH düzeyleri (Veriler ortalama (n=6) ve standart hatayı göstermektedir. *kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkı göstermektedir)

Ca₃₀ grubunda GSH düzeyleri Cr, Ni ve Zn'ye maruz bırakılan balıklarda sırasıyla 1,0, 1,51 ve 1,32 µmol /mg protein/min olarak ölçülmüştür. Bu metallerin etkisinde kalan balıklarda GSH düzeyleri kontrol grubuna göre (0,06 µmol /mg protein/min) artışlar istatistik olarak önemli olmuştur (p<0.05). Ca₆₀ grubunda metal etkisinde kalma sonucu GSH düzeylerinde değişiklikler önemli olmamıştır (p>0,05). Ca₁₂₀ grubunda ise kontrol grubuna göre tek önemli fark Cr'ye maruz bırakılan balıklarda (0,72 µmol /mg protein/min) görülmüştür.

Çizelge 4.1.'de farklı su sertliklerinde akut ve kronik olarak Cr⁺⁶, Ni⁺², Zn⁺² ve Hg⁺² ye maruz bırakılan balıkların karaciğer dokusundaki antioksidanlar kontrol grubuna göre değişim oranları yüzde olarak toplu şekilde gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı su sertliklerinde Cr^{+6} , Ni^{+2} , Zn^{+2} ve Hg^{+2} , ye maruz bırakılan balıkların enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlarında meydana gelen değişikliklerin yüzdelik(%) oranları

Antioksidanlar (Akut Etki)	Krom (Cr)			Nikel(Ni)			Çinko(Zn)			Civa(Hg)		
	Ca ₃₀	Ca ₆₀	Ca ₁₂₀	Ca ₃₀	Ca ₆₀	Ca ₁₂₀	Ca ₃₀	Ca ₆₀	Ca ₁₂₀	Ca ₃₀	Ca ₆₀	Ca ₁₂₀
SOD	↑+73	-26	-10	+21	-16	-24	+36	+14	-19	+17	+7	-32
CAT	↑+57	+27	-24	+15	+27	-18	↑+49	+18	-1	-8	-15	-7
GPx	+3	↓-40	↓-88	↓-86	-56	↓-50	-32	-31	↓-41	-12	-23	-16
GR	-29	-17	-33	+29	-33	-17	-57	-17	-33	-43	-17	↓-67
GST	↓-57	-31	↓-50	↓-63	-45	↓-52	↓-51	-4	↓-82	↓-51	-25	-16
GSH	+4	+5	+65	-22	+10	+16	-31	↓-52	+47	-15	↓-46	+11
Antioksidanlar (Kronik Etki)	Krom (Cr)			Nikel(Ni)			Çinko(Zn)			Civa(Hg)		
	Ca ₃₀	Ca ₆₀	Ca ₁₂₀	Ca ₃₀	Ca ₆₀	Ca ₁₂₀	Ca ₃₀	Ca ₆₀	Ca ₁₂₀	Ca ₃₀	Ca ₆₀	Ca ₁₂₀
SOD	+21	↑+42	-21	+30	+1	-27	+26	-13	-32	-7	-6	↓-42
CAT	+4	↑+63	-13	-8	+7	+6	-6	+13	-19	+39	↑+65	+25
GPx	-14	↓-52	+35	+36	↓-45	+47	+26	↓-67	+27	-50	↓-70	-7
GR	↑+27	+15	-15	-14	-6	-17	-10	-13	↓-36	↓-29	-26	↓-30
GST	+30	-33	-53	-25	↓-54	0	↓-56	↓-65	-54	↓-47	-13	-42
GSH	↑+67	-2	↓-50	↑+152	+19	-23	↑+120	-15	-12	+5	-10	-33

4.2. Tartışma

Bu çalışmada, metal ve/veya kalsiyum hem akut hem de kronik deneylerde herhangi bir balık ölümüne neden olmamıştır. Bu da deney koşullarının balıklar için letal olmadığını göstermektedir. Buna ilave olarak balıklarda herhangi bir anormal yüzme aktivitesi veya beslenme iştahsızlığı belirtisi de görülmemiştir.

Bu çalışma ayrıca farklı kalsiyum seviyelerindeki metallerin *O. niloticus*'ta antioksidan sistem biyobelirteçlerinin tepkisi üzerindeki etkilerini de göstermiştir.

Mevcut veriler, *O. niloticus*'un antioksidan sistem biyobelirteçlerinin, maruz kalma sürelerinden bağımsız olarak tüm kalsiyum seviyelerinde metallere tepki verdiğini göstermiştir. Ayrıca genel olarak, veriler kalsiyumun tek başına biyobelirteçlerin yanıtlarını değiştiremediğini de göstermiştir. Yine de, biyobelirteçlerdeki en yüksek anlamlı değişiklikler, en düşük kalsiyum seviyelerinde meydana gelmiştir. Diğer yandan, hem akut hem de kronik süreçlerde metal maruziyetinden sonra enzimlerin davranışlarında da farklılıklar olduğu göze çarpmıştır. Örneğin CAT ve SOD aktiviteleri her iki sürede de artarken glutatyon metabolizmasına ait enzimlerin aktiviteleri azalmıştır. Cıva, gümüş ve bakır gibi bazı metaller balıklar için son derece toksik olmasına karşın, demir ve nikel gibi bazı metaller daha az toksik olduğu bilinmektedir (Wood ve ark., 2012a ve b). Mevcut veriler ayrıca tüm metallerin biyobelirteçlerin tepkilerini değiştirdiğini, ancak en az değişimin nikel maruz kalan balıklarda meydana geldiğini göstermiştir. Bu, tüm metallerin hayvanlar üzerinde çok ciddi etkilere neden olmadığını ve metaller arasında mekanizmaların veya etki biçimlerinin değişebileceğini düşündürmektedir.

Balıklarda metal birikimi, metallerle etkileşim süresine ve metal konsantrasyonuna ve balıkların beslenme ekolojisine bağlı olmakla birlikte, aynı zamanda suyun tuzluluğuna, sıcaklığına, organik madde miktarına, pH'sına, diğer metallerle etkileşimine ve EDTA gibi kompleks oluşturuca ajanlarla olan ilişkilere bağlıdır (Heath, 1987; Canli ve Furness, 1993). Genel olarak toksisite çalışmalarına göz atıldığında çeşme sularının nispeten sert olduğu görülmektedir. Su sertliği arttıkça solungaçlardan metal alınımının azalması sebebiyle toksisite çalışmalarında nispeten sert olan çeşme suları ile yapılan çalışmalarda metallerin düşük toksisite gösterdiği belirtilmiştir (Heath 1995; Bury ve ark., 2002; Monserrat ve ark., 2007). Kadmiyum ve çinko etkisinde kalan kalan hayvanlarda böbrek ve epidermiste (Somasundaram ve ark., 1985), solungaçlarda (Grobler ve ark., 1989), ve karaciğerde (Morsey ve Protasowicki, 1990; Van Dyk ve ark., 2007) çeşitli tipte doku patolojisi ortaya çıktığı bulunmuştur. Bunlara ek olarak Abdel-Tawwab ve

ark. (2007) bakır etkisinde kalan *Oreochromis niloticus* 'un karaciğer, böbrek ve solungaçlarında histopatolojik bulgular ortaya çıktığını belirtmişlerdir.

Diğer taraftan, Pourkhabbaz ve ark. (2011) yaptıkları bir çalışmada *Gambusia holbrooki* 'de yumuşak, sert ve çok sert (25, 125, 350 mg/L CaCO₃) sulara bakırın ve çinkonun akut toksisitesinin değişik etkiler gösterdiğini vurgulamışlardır. Su sertliğinin azalması ile *G. holbrooki* 'nin Cu ve Zn toksisitesine karşı daha hassas hale geldiği gösterilmiştir. Bakır ve çinkonun yumuşak, sert ve çok sert sulara *G. holbrooki* üzerine etkileri karşılaştırıldığında, bakırın yumuşak sulara balık için çok daha toksik olduğunu gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak su sertliğindeki artışın, 96 saatlik akut deneylerde bakırın ve çinko toksisitesini azalttığı vurgulanmıştır. Diğer yandan, metal karışımlarının etkisinin araştırıldığı birçok çalışma vardır. Sucul çevrede metal karışımlarının etkilerini değerlendirmek için yapılan bir çalışmada farklı zaman dilimlerinde (7, 15 ve 30 gün) Cr, Cd ve Pb karışımına maruz bırakılan sazan balıklarının (*Cyprinus carpio*) kas, solungaç, karaciğer, böbrek ve bağırsak gibi farklı dokularında SOD aktivitesinin kontrol grubuyla kıyaslandığında önemli bir artış gözlemlendiği belirlenmiştir (Rajeshkumar ve ark., 2017).

Metallerin süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi ROT üretimini uyarak oksidatif strese neden olduğu bilinmektedir. Özellikle redoks aktif metaller redoks döngüsüne girerken, redoks aktif olmayan metaller antioksidan kaynakların, özellikle SH içeren moleküllerin tükenmesine neden olmaktadır. ROT üretimini takiben antioksidan enzimlerin tepkisindeki artış, özellikle oksidan ve antioksidan arasındaki denge oksidanlar lehine değiştiğinde oksidatif strese yol açmaktadır. Aşağıda metallerle yapılan literatür çalışmaları tek tek ele alınarak tartışılmış ve yorumlanmıştır.

4.2.1. Krom Etkisi

Doğan ve ark (2014), yaptıkları çalışmada *O. niloticus* 'u 80 ve 320 mg Ca/L sertliğindeki sulara bırakarak Cu ve Cr'un 20 µM ve 10 µM derişimlerinin

etkilerine akut ve kronik maruz bıraktıktan sonra karaciğerde bazı antioksidan enzim aktivitelerini ölçmüşlerdir. Sert ve yumuşak sular karşılaştırıldığında yumuşak suda yaşayan kontrol *O. niloticus*' larda sert suya göre SOD ve CAT aktivitelerinde anlamlı azalmalar olduğunu gözlemlerken, diğer antioksidan enzimlerin aktivitelerinin su sertliğinden etkilenmediği görülmüştür. Bu çalışmada tersi bir durum olarak Cr' nin akut etkisi incelendiğinde Ca₃₀'da SOD ve CAT etkinliğinde kontrol grubuna göre önemli bir artış gözlemlenmiştir. Ca₆₀ ve Ca₁₂₀ su sertliklerinde GPx aktivitesinde, Ca₃₀ ve Ca₁₂₀ su sertliğinde ise GST aktivitesinde önemli bir azalış görülmektedir. GR ve GSH aktivitesinde ise su sertliğine bağlı herhangi bir değişiklik görülmemiştir. Çalışmamızdaki Cr' nin kronik etkisi incelendiğinde Ca₃₀ su sertliğinde GR aktivitesinin arttığını, CAT ve SOD' nin Ca₆₀ su sertliğinde kontrol grubuna göre aktivitesinin arttığını, yine aynı su sertlik derecesinde ise GPx aktivitesinin kontrol grubuna göre önemli bir azalış göstermiştir. GSH aktivitesi incelendiğinde Ca₃₀ su sertliğinde kontrol grubuna göre bir artış, Ca₁₂₀ su sertliğinde ise önemli bir azalış olduğu görülmektedir. GST aktivitesi ise hiçbir su sertliğinden etkilenmemiştir.

Bu çalışmada akut Cr etkisine bağlı olarak düşük su sertliğinde (Ca₃₀) SOD enzim aktivitesindeki artışın oluşan oksidatif strese bağlı olarak bir tepki olduğu düşünülebilir. Cr redoks aktif bir metal olup fenton reaksiyonuna benzer bir reaksiyon sonucu oksidatif strese yol açar (Pinto ve ark. 2003). SOD enziminin aktivitesinde meydana gelen artış, oksidatif stres altında enzimatik antioksidan savunma sistemin ilk reaksiyonu olarak önemlidir (Kayis, ve ark., 2012). Artan su sertliğinde (60 ve 120 mg) ise SOD enzim aktivitesinde kontrole göre herhangi bir değişikliğin olmaması solungaçlarda su sertliğindeki artışa paralel olarak metal alınınının inhibisyonu ile metallerin toksik etkilerinin azaldığı (Heath 1995; Bury ve ark., 2002; Monserrat ve ark., 2007) ile ilgili çalışmalarla örtüşmektedir. Kronik Cr maruziyetinde ise SOD aktivitesi sadece Ca₆₀ grubunda bir artış göstermiştir. Bununla birlikte en yüksek su sertliğinde SOD aktivitesinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Çalışmamızda orta sertlik derecesi olarak kullanılan Ca₆₀

grubundaki bu etkinin Cr'a maruziyet süresindeki artıştan kaynaklandığı düşünülmektedir. Hem akut hem de kronik Cr maruziyeti sonucu CAT enzim aktivitesindeki değişiklikler SOD enzim aktivitesine paralel olarak değişiklik göstermiştir. Bilindiği gibi CAT aktivitesi doğrudan H_2O_2 konsatrasyonu ile düzenlenmektedir (Fornazier ve ark., 2002). Fakat enzimin yüksek Km değerinden dolayı düşük H_2O_2 konsatrasyonlarında CAT çok fazla aktif değildir (Felton ve Duffey 1992). Bu çalışmada Ca30 su sertliğinde artan CAT enzim aktivitesi Cr^{+6} toksisitesi altında artan süperoksit radikallerinin SOD enzimi tarafından ortadan kaldırılması sonucu oluşan H_2O_2 ' nin ortadan kaldırılmasına yönelik bir artış şeklinde yorumlanabilir. SOD enzim aktivitesine benzer şekilde, sert sularda CAT enzim aktivitesinde herhangi bir değişikliğin gözlenmemesi yine metal alınınımının inhibisyonu sonucu gerçekleşmiş olabileceğini düşündürmektedir.

4.2.2. Nikel Etkisi

Metal etkinliklerinin kıyaslandığı bazı deneylerde Ni'in toksik etkisinin oldukça az olduğu bildirilmiştir. Wood ve ark. (2012) raporuna göre, farklı balık türleriyle yaptıkları çalışmalarda Cd, Cu, Ni, Pb ve Zn gibi beş metalin akut toksisite değerlerini karşılaştırmışlar ve Ni'in genel anlamda Cd, Cu ve Pb'ye göre düşük, Zn'ye ise eş bir toksisite gösterdiğini bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada Buhl ve Hamilton (1991), aktif bir şekilde çalışan maden yatakları civarındaki nehirlerde bulunan *Thymallus arcticus*, *Oncorhynchus kisutch* ve *Oncorhynchus mykiss* ile yaptıkları çalışmada sekiz farklı metal (Cd (Kadmiyum) > Ag (Gümüş) > Hg (Civa) > Ni (Nikel) > Au (Altın) > As (Arsenik) > Selenit > Selenat > Cr (Krom)) arasında Ni'in toksisite olarak dördüncü sırada olduğunu bildirmişlerdir. Kronik olarak değişik yoğunluktaki su bazlı Ni'e maruz bırakılan balıklarda karbonhidrat metabolizmasında bazı değişiklikler ortaya çıkabilmektedir. Su bazlı Ni konsantrasyonlarının artması karaciğer ve kastaki glikojen miktarında azalmalara sebep olurken plazmadaki glikoz ve laktik asit

yoğunluklarında artışlar belirlenmiştir (Chaudhry, 1984; Chaudhry ve Nath, 1985; Ghazaly, 1992; Al-Kahem, 1995b; Jha ve Jha, 1995; Canlı, 1996).

Bu çalışmada akut etki incelendiğinde SOD, CAT, GR ve GSH etkinliğinde hiçbir su sertliği derecesinde kontrol grubuna göre herhangi bir değişiklik olmamıştır. Bu durum yukarıda bahsedilen ve Ni'in nispeten düşük toksisitesinden kaynaklanmış olabilir. GPx etkinliğinde tüm su sertliklerinde kontrol grubuna göre önemli azalışlar görülmüştür. Ca₃₀ ve Ca₁₂₀ su sertliğinde GST etkinliği kontrole göre azalış göstermiştir. Kronik etki çalışmalarında ise SOD, CAT ve GR etkinliklerinde kontrol grubuna göre akut etkiye benzer şekilde hiçbir su sertliğinde bir değişiklik olmamıştır. GPx etkinliğinde akut etkiden farklı olarak sadece Ca₆₀ su sertliğinde bir azalış görülmüştür. GST etkinliği tıpkı kronik GPx te olduğu gibi Ca₆₀ su sertliğinde bir düşüş olmuştur. Çalışmamızdaki GSH etkinliği sadece Ca₃₀ su sertliğinde kontrole göre önemli bir artış gösterirken Ca₆₀ ve Ca₁₂₀ su sertliğinde kontrole göre önemli bir değişiklik göstermemiştir. Elde edilen veriler akut maruziyet sonucu GPx aktivitesindeki tüm su sertlik derecelerinde ve GST aktivitesinde 30 ve 120 mgCa/L su sertliklerindeki azalma Ni'in enzimlerin aktif bölgelerindeki -SH gruplarının direkt inhibisyonu sonucu olabileceği şeklinde yorumlanabilir. Kronik etki sürecinde ise akut etkiye benzer şekilde SOD ve CAT aktivitelerinde herhangi bir değişiklik olmazken GPx ve GST aktivitelerinde 60mgCa/L de meydana gelen azalma metale maruziyet süresinin etkisi şeklinde yorumlanmıştır. GSH aktivitesinde kronik maruziyetin bir sonucu olarak GSH aktivitesinin uygulanan en düşük su sertliği olan 30mgCa/L'de artması ve 60 ve 120mgCa/L de ise herhangi bir değişiklik olmaması su sertliği ve metal toksisitesi arasında daha önce bahsedilen ilişkiyi açıklaması bakımından önemlidir.

4.2.3. Çinko Etkisi

Abdel-Warith ve ark. (2011) çalışmalarında *Oreochromis niloticus* türü balıkları iki deney grubuna ayırmış, birinci grubu 2,4 ve 6 mg/L ZnCl₂'e bir hafta (akut) süreyle, ikinci grubu ise yine aynı konsantrasyonlarda dört hafta (kronik)

süreyile $ZnCl_2$ 'e maruz bırakarak *O.niloticus*' un karaciğer dokusu üzerine çinko toksisitesinin etkilerini incelemişlerdir. Metale maruz kalma süresinin önemli bir etkisi olmaksızın doza bağlı bir şekilde mortalite oranının arttığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise çinkonun herhangi bir dozunda mortalite gerçekleşmemiştir. Sonuç olarak karaciğerdeki histolojik değişikliklerin derecesinin balıkların metale maruz kalma süresinden etkilendiğini belirlemişlerdir. Bundan dolayı *O. niloticus* karaciğerinin çinko maruziyetinin biyolojik belirteci olarak kullanılabileceği sonucuna varılabileceğini belirtmişlerdir. Du ve ark. (2019) diet Zn' nin bentik balık *Paramisgurnus dabrynaus*'un gelişimi ve antioksidan kapasitesi üzerine etkisini yaptıkları bir çalışma ile incelemişlerdir. Çalışmalarında besine sırasıyla 0, 20, 40, 80, 120 ve 160 mg/kg çinko metionin (ZnM) ilave ederek sırasıyla 24.38, 28.03, 31.68, 38.98, 46.28 ve 53.58 mg/kg diyet Zn konsantrasyonu elde etmişler ve başlangıçtaki vücut kütleleri $5,21 \pm 0,15$ g olan *P.dabryanus* türü balıkları 8 hafta boyunca Zn katkılı bu diyetle beslemişler. Sonuç olarak plazma GPx, toplam SOD, plazma CAT ve toplam antioksidan kapasitesinde benzer şekilde başlangıçta bir artış 31.58 (ZnM-40 grubu) ve 38.78 mg/kg (ZnM-80 grubu) bir zirve ve daha sonra bir azalış görülmüştür. Bu çalışmada ise Zn' nin akut etkisi incelendiğinde kontrole kıyasla Ca_{30} su sertliğinde CAT aktivitesinde bir artış, GPx etkinliğinde Ca_{120} su sertliğinde, GST etkinliğinde Ca_{30} ve Ca_{120} su sertliğinde, GSH etkinliğinde ise Ca_{60} su sertliğinde bir azalış olduğu görülmüştür. SOD ve GR etkinliğinde herhangi bir su sertliği derecesinde önemli bir değişiklik görülmemiştir. Bu çalışmadaki Zn'nun kronik etkisi incelendiğinde SOD ve CAT etkinliğinde kontrole kıyasla herhangi bir su sertliğinde önemli bir değişiklik olmaz iken Ca_{60} su sertliğinde GPx ve GST etkinliğinde, Ca_{120} su sertliğinde GR etkinliğinde kontrole göre azalış, GSH etkinliğinde ise Ca_{30} su sertliğinde kontrol grubuna göre önemli bir artış gözlemlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada çinko maruziyeti sonucu hiçbir su sertlik derecesinde ve akut ve kronik maruziyete göre SOD enzim aktivitesinde değişiklik meydana gelmemesi ilgi çekicidir. Zn, SOD enzimin yapısında bulunmakla beraber dışardan alınan Zn^{+2} 'nin SOD enzim

aktivitesi üzerine pozitif bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Harris ve ark. 2005). Çinko, demir (Fe^{+3} veya Fe^{+2}) ve bakır (Cu^{+} veya Cu^{+2}) gibi diğer biyoaktif metallerin aksine, iki değerlikli bir katyon (Zn^{+2}) olarak kararlıdır ve doğrudan redoks reaksiyonlarına girmez (Haas ve Franz, 2009). Fakat fazla miktarda Zn^{+2} , elektron taşıma sisteminde inhibisyona yol açarak ROT oluşumun özellikle de H_2O_2 miktarını arttırdığı bilinmektedir (Lee 2018). Elde edilen sonuçlarda Ca_{30} su sertliğinde gözlenen CAT aktivitesindeki artış, çinkonun yukarıda belirtilen özelliğinden kaynaklı olarak H_2O_2 miktarından kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir. Bunun yanında Ca_{60} ve Ca_{120} su sertliklerinde böyle bir artışın meydana gelmemesi su sertliğine bağlı olarak Zn'un alınımının inhibisyonu şeklinde yorumlanmıştır. Çinko hem prooksidan hem de antioksidan özelliklere sahip bir metaldir (Lee, 2018). Bu çalışmada Zn maruziyeti sonucu diğer antioksidan enzim aktivitelerinde ortaya çıkan artma ve azalmalar akut ve kronik maruziyetlere göre oldukça farklılık göstermiştir. Antioksidan enzimlerde meydana gelen bu farklı tepkilerin, maruziyet süreleri yanında farklı su sertliklerine bağlı olarak Zn alınımının inhibisyon derecesine göre Zn'nun proksidan veya antioksidan özelliğinin ortaya çıktığı şeklinde yorumlanmıştır.

4.2.4 Civa Etkisi

İnorganik Hg'nın nörotoksikolojik etkilerinin olduğu bilinmektedir. Bu etkinin sonucu olarak balıklarda denge kaybı, hareketsizlik, solunum bozuklukları görülebilmekte ve hatta yüksek yoğunluklarda ölüme bile sebebiyet verebilmektedir (Wood ve ark., 2012). Yapılan bir çalışmada, 100 $\mu g/l$ Hg etkisinde bir gün maruz kalan sazanların kas, karaciğer ve solungaçlarında %60 oranında O_2 tüketiminin azaldığı tespit edilmiştir (Radhakrishnaiah ve ark., 1993). Yüksek yoğunluktaki Hg balıkların bazı histolojik yapılarını olumsuz etkilemektedir. Bu olumsuz etkilerin bir kısmı solungaç bölgesinde kanlanma, hiperplazi ve nekroz ile derideki mukus üretiminde artış gibi etkiler olduğu belirtilmiştir (Jagoe ve ark., 1996; Ribeiro ve ark., 2000; 2002; Giari ve ark., 2008).

Hg mitokondri zar yapısını olumsuz etkileyip iyon akışı ve mitokondri zarında bulunan elektron taşıma sistemini negatif etkileyerek, oksidatif fosforilasyonun gerçekleşmesini engelleyerek oksidatif metabolizmayı bozduğu belirtilmektedir (Zaman ve Pardini, 1996). Birçok araştırmacı Hg'nin neden olduğu bu yapısal bozukluklar sonucu su bazlı Hg'nin osmoregülasyona hasar verdiğini bildirmişlerdir (Lock ve ark., 1981; Jagoe ve ark., 1996; Oliveira ve ark., 1996). Bizim çalışmamızdaki akut etki çalışmalarında SOD, CAT ve GPx etkinliklerinde hiçbir su sertliğinde kontrole göre bir değişiklik olmamıştır ($p>0.05$). GR etkinliği Ca_{120} su sertliğinde kontrole göre önemli bir azalış görülmüş ($p<0.05$) diğer su sertliklerinde ise önemli bir fark kaydedilmemiştir. GST etkinliği incelendiğinde Ca_{30} su sertliğinde kontrole göre kayda değer bir azalış görülmüş ($p<0.05$), GSH etkinliğinde ise Ca_{60} sertlik derecesinde kontrole göre bir azalış görülmüştür ($p<0.05$). Kronik etki çalışmalarında ise SOD etkinliği Ca_{120} sertlik derecesinde kontrol grubuna göre önemli bir azalış ($p<0.05$) CAT ve GPx etkinlikleri ise Ca_{60} sertlik derecesinde önemli bir artış göstermiştir. GR etkinliği incelendiğinde Ca_{30} ve Ca_{120} sertliklerinde kontrole göre bir azalış görülmektedir ($p<0.05$). GST ve GSH etkinliklerinde ise kontrol grubuna göre önemli bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Civanın antioksidan enzimler üzerine akut etkileri incelendiğinde hiçbir enzim aktivitesinde artış meydana gelmemesi enzim aktiviteleri üzerine direkt inhibisyon etkisine neden olduğunu düşündürmektedir. Redoks inaktif bir metal olan Hg'nin (Pinto ve ark., 2003), bu etkisi enzimlerin SH gruplarına bağlanarak enzim aktivitelerindeki azaltıcı etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak *O. niloticus* karaciğerinde, antioksidan enzim aktivitelerinin maruz kalınan metale ve akut veya kronik maruziyet sürelerine göre önemli değişiklik gösterdiği, bunun yanında suyun sertlik derecesinin muhtemelen metalin vücuda alınımında etkili olması ve dolayısıyla toksik etkisinin ortaya çıkmasında rolünün büyük olduğu ortaya konulmuştur. Ek olarak çalışmamızda araştırılan antioksidan enzimlerin metal toksisite çalışmalarında biyomarkır olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.





5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Çalışmamızda Ca₃₀, Ca₆₀ ve Ca₁₂₀ kalsiyum su sertliklerinde akut 3 gün 30 µM Cr⁺⁶, Ni⁺², Zn⁺² ve 0,3 µM Hg⁺² ile kronik 30 gün 10 µM Cr⁺⁶, Ni⁺², Zn⁺² ve 0,03 µM Hg⁺² nin etkileri ayrı ayrı incelenmiştir. Çalışma süreleri sonunda karaciğer dokusunda SOD, CAT, GPx, GR GST ve GSH gibi antioksidanların aktiviteleri incelenmiştir.

Ca₃₀ su sertliğinde metal türü ve maruz kalma süresine bağlı olarak antioksidan aktivitesinde anlamlı artış ve azalışlar görülmüştür. Anlamlı olan bu değişiklikler akut çalışmada genellikle azalış eğilimi gösterirken kronik çalışmalarda ise değişim artış şeklinde olmuştur.

Ca₆₀ su sertliğinde yine aynı şartlara bağlı olarak anlamlı değişiklikler görülmüştür. Anlamlı olan değişiklikler akut çalışmalarda azalış yönünde iken kronik çalışmalarda hem azalış hem de artış yönlü olmuştur.

Ca₁₂₀ su sertliğinde ise hem akut hem de kronik çalışmalarda antioksidan aktivitesinde anlamlı azalışlar görülmüştür.

5.2. Öneriler

1. Son dönemlerde endüstrileşmenin hızla gelişmesine bağlı olarak çevre kirliliği de artmaktadır. Bu nedenle diğer ağır metallerin de incelendiği araştırmaların yapılması gerekmektedir.

2. Çalışmamızda sadece balık karaciğer dokusundaki enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar kullanılarak değerlendirmeler yapılmıştır. Bu değerlendirmeleri böbrek gibi diğer dokularda hatta farklı canlı türlerinde de yaparak farklı doku ve canlılar üzerindeki etkisinin de araştırılması ağır metallerin etkisinin daha net bir şekilde anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

3. İster doğal ister insan kaynaklı olsun yağmur sularının yıkama etkisinden dolayı ağır metal bileşiklerinin nihai varış noktası sucul ekosistemlerdir.

Bu sebeple ağır metallerin toksik etkilerinin sucul ekosistemlerde incelenmesi hem ekosistemin sağığı hem de çevre kirliliğinin canlılar üzerine etkilerinin anlaşılması bakımından önemlidir. Bu nedenle buna benzer çalışmaların sayısının arttırılması önem arz etmektedir.



KAYNAKLAR

- Abdel-Tawwab, M., Mousa, M.A.A., Ahmed, M.H., and 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: 236-246.
- Abdel-Warith, A.A., Younis, E.M., Al-Asgah, N.A., and Wahbi, O.M., 2011. Effect of Zinc Toxicity on Liver Histology of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Scientific Research and Essays Vol.*, 6(17): 3760-3769.
- Acerete, L., Balasch, J.C., Espinosa, E., Josa, A., and Tort, L., 2004. Physiological responses in Eurasian perh (*Perca fluviatialis*, L.) subjected to stress by transport and handling. *Aquaculture*, 237: 167-178.
- Ahmad, S., 1995. Oxidative stress and antioxidant defenses. in *Biology*. Chapman and Hall, New York, 447 s.
- Akbulut, C., Kaymak, G., Esmer, H. E., Yön, N. D., and Kayhan, F. E., 2014. Oxidative Stress Mechanism Induced by Heavy Metals and Pesticides in Fish. *Ege Su Ürünleri Dergisi*, 31(3): 155-160.
- Al-Kahem, H.F., 1995b. Effects of Nickel on Carbohydrate Metabolism of *Oreochromis niloticus*. *DIRASAT (Pure and Applied Sciences)*, 22B: 83–88.
- Aliko, V., Qirjo, M., Sula, E., Morina, V., and Faggio, C., 2018. Antioxidant Defense System, Immune Response and Erythrone Profile Modulation in Gold Fish, *Carassius auratus*, After Acute Manganese Treatment. *Fish and Shellfish Immunology*, 76: 101-109.
- Almeida, J.A., Novelli, E.L.B., Dal Pai Silva, M., and Alves Junior, R., 2001. Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Environ Pollut*, 114:169–175.
- Ambrose, T., Vincent, S., and Cyril, L., 1994. Susceptibility of the freshwater fish, *Gambusia affinis* (Baird and Giard), *Sarotherodon mossambicus* (Peters)

- and *Cirrhinus mrigala* (Ham.) to zinc toxicity. J. Environ. Toxicol., 4: 29-31.
- Argese, E. C., Bettiol, C., Rigo, S., Bertini, S., Colomban, P., and Ghetti, F., 2005. Distribution of arsenic compound in *Mytilus galloprovincialis* of the Venice Lagoon, Italy. *Science of the Total Environment*, 15: 267- 277.
- Ariyoshi, T., Shiiba, S., Hasegawa, H., and Arizono, K., 1990. Profile of Metal-binding Proteins and Heme Oxygenase in Red Carp Treated with Heavy Metals, Pesticides and Surfactants. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 44: 643-649.
- Atamanalp, M., Bayır, A., Sirkecioğlu, A.N., and Cengiz, M., 2003. The effects of sublethal doses a disinfectant (Malachite Green) on blood parameters of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gazi Üniversitesi, Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 23: 177-187.
- Atli, G., Guasch, H., Rubio-Garcia, F., Zamora, L., and Vila Gisbert, A., 2020. Antioxidant System Status in Threatened Native Fish *Barbus meridionalis* from the Osor River (Iberian Peninsula): I. Characterization and II. In Vitro Zn Assays. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 79: 1-8.
- Atli, G., Canlı, E.G., Eroglu, A., Dogan, Z., and Canlı, M., 2016. Cadmium and Lead Alter the Antioxidant and Osmoregulation Systems in the Erythrocyte of Fish (*Oreochromis niloticus*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 16: 361-369.
- Atli, G., and Canlı, M., 2010 Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. *Ecotoxicol Environ Saf* 73:1884–1889.
- Atli, G., and Canlı, M., 2008. Characterization of Branchial Na, K-ATPase from Three Freshwater Fish Species (*Oreochromis niloticus*, *Cyprinus carpio*, and *Oncorhynchus mykiss*). *Tr. J. Zool.*, 32(3), 299-304.

- Atli, G., and Canli, M., 2007. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comp Biochem Physiol C* 145:282–287.
- Atli, G., Alptekin, O., Tukul, S., and Canli, M., 2006. Response of catalase activity to Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 143: 218-224
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2018). Priority list of hazardous substances, Available at: <http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/05list.html>. Accessed October, 05, 2018.
- Bahçebaşı, T., 2011. Minamata Hastalığı.
- Balarin, J.D., and Hatton, J.P., 1979. *Tilapia: A guide to their biology and culture in Africa*. Stirling, UK.: University of Stirling.
- Bano, Z., Abdullah, S., Ahmad, W., Zia, M.A., and Hassan, W., 2017. Assessment of Heavy Metals and Antioxidant Enzyme in Different Organs of Fish from Farm, Hatchery and Indus River of Pakistan. *Zoological Society of Pakistan Vol.*, 49(6): 2227-2233.
- Barak, N.A., and Mason, C.F., 1990. Mercury, cadmium and lead in eels and roach: the effects of size, season and locality on metal concentrations in flesh and liver. *Sci. Total Environ.* 92, 249–256.
- Bartos, G., 2009. Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochem Pharmacol* 77(8):1303–1315
- Basha, P.S., and Rani, A.U., 2003. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56, 218–221.
- Baykan, U., Atli, G., and Canli, M., 2007. The Effects of Temperature and Metal Exposures on the Profiles of Metallothionein-like in *Oreochromis niloticus*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 23: 33-38.

- Baysoy, E., Atli, G., and Canlı, M., 2013. The Effects of Salinity and Salinity+ Metal (Chromium and Lead) Exposure on ATPase Activity in the Gill and Intestine of Tilapia *Oreochromis niloticus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 64(2): 291-300.
- Baysoy, E., Atli, G., Gurler, C.O., Dogan, Z., Eroglu, A., Kocalar, K., and Canli, M., 2012. The effects of increased freshwater salinity in the bioavailability of metals (Cr, Pb) and effects on antioxidant systems of *Oreochromis niloticus*. Ecotoxicol Environ Saf 84:249–253.
- Berg, V., Erikson, G.S., and Iverson, P.E., 1997. Strategies for monitoring of contaminants in marine organisms in Norwegian harbours and fjords, Norwegian State Food Control Reports. 94: 300-321, Norway.
- Berntssen, M.H.G., Aatland, A., and Handy, R.D. 2003. Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behaviour in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Aquatic Toxicology*, 65, 55-72.
- Beutler, E., Duron, O., and Kelly, B.M., 1963. Improved method for the determination of blood glutathione". J Lab Clin Med 61:882–890.
- Beutler, E., 1984. Red cell metabolism, A Manual of Biochemical Methods Grune and Starton, New York, 160s.
- Beveridge, M.C.M., and McAndrew, B.J., 1998. *Tilapias: Their biology and exploitation*. London: Chapman and Hall.
- Bhakta, J.N., Ohnishi, K., Munekage, Y., Iwasaki, K., and Wei, M.Q., 2012. Characterization of lactic acid bacteria-based probiotics as potential heavy metal sorbents. J. Appl. Microbiol., 112: 1193-1206.
- Brandão, F., Cappello, T., Raimundo, J., Santos, M.A., Maisano, M., Mauceri, A., Pacheco, M., and Pereira, P., 2015. Unravelling the Mechanisms of Mercury Hepatotoxicity in Wild Fish (*Liza aurata*) Through a Triad Approach: Bioaccumulation, Metabolomic Profiles and Oxidative Stress. Metallomics, 7: 1352-1363.

- Brusle, J., and Anadon, G. G., 1996. *The Structure and Function of Fish Liver*. In: Fish Morphology. Science Publishers, pp 77-93.
- Buhl, K.J., and Hamilton, S.J., 1991. Relative Sensitivity of Early Life Stages of Arctic Grayling, Coho Salmon, and Rainbow Trout to Nine Inorganics. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 22: 184–197.
- Bury, N.R., Shaw, J., Glover, C., and Hogstrand, C., 2002. Derivation of a Toxicity-Based Model to Predict How Water Chemistry Influences Silver Toxicity to Invertebrates. *Comp. Biochem. and Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.*, 133(1): 259-270.
- Büyükgüzel, E., 2013. Biochemical and molecular mechanisms of protein oxidation (*in Turkish with English abstract*). *Karaelmas Science and Engineering Journal*, 3(1): 40-51.
- Canlı, M., 1996. Effects of Mercury, Chromium and Nickel on Glycogen Reserves and Protein Levels in Tissues of *Cyprinus carpio*. *Turk. J. Zool.*, 20: 161–168.
- Canlı, M., and Atlı, G., 2003. The Relationship Between Heavy Metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) Levels and the Size of Six Mediterranean Fish Species. *Environ. Pollut.*, 121: 129-136.
- Canlı, M., and Furness, R.W., 1993a. Heavy metals in tissues of the Norway lobster *Nephrops norvegicus*: effects of sex, size and season. *Chem. Ecol.* 8, 19–32.
- Canlı, M., and Furness, R.W., 1993b. Toxicity of heavy metals dissolved in sea water and influences of sex and size on metal accumulation and tissue distribution in the Norway lobster *Nephrops norvegicus*. *Mar. Environ. Res.* 36, 217–236.
- Carlberg, I., and Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 25: 5475–5480.

- Chaudhry, H.S., and Nath, K., 1985. Nickel Induced Hyperglycemia in the Freshwater Fish, *Colisa fasciatus*. Wat. Air Soil Pollut., 24: 173–176.
- Chaudhry, H.S., 1984. Nickel Toxicity on Carbohydrate Metabolism of a Freshwater fish. *Colisa fasciatus*. Toxicol. Lett., 20: 115–121.
- Chen, C.Y., and Folt, C.L., 2000. Bioaccumulation and diminution of arsenic and lead in a freshwater food web. Environ. Sci. Technol. 34 (18), 3878–3884.
- Cheung, C.C.C., Zheng, G.J., Li, A.M.Y., Richardson, B.J., and Lam, P.K.S., 2001. Relationship Between Tissue Concentrations of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Antioxidative Responses of Marine Mussels, *Perna viridis*. Aquat Toxicol. 52(3-4): 189-203.
- Clark, R.B. 1989. Marine pollution, 220 pp. Oxford Scientific Publications, Clarendon Press, Oxford.
- Clowes, L.A., and Francesconi, K.A., 2004. Uptake and elimination of arsenobetaine by the mussel *Mytilus edulis* (L., 1758) is related to salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 137: 35-42.
- Cnubben, N.H.P., Rietjens, I.M.C.M., Wortelboer, H., Van-Zanden, J., and Van Bladeren, P.J., 2001. The Interplay of Glutathione Related Processes in Antioxidant Defense. Environ Toxicol Pharmacol. 10(4): 141- 152.
- Cossa, D., and Rondeau, J.G., 1985. Seasonal, geographical and sizeinduced variability in mercury content of *Mytilus edulis* in an environment: a re-assessment of mercury pollution level in the estuary and gulf of St. Lawrence. Mar. Biol. 88, 43–49.
- Costa-Silva, D.G., Nunes, M.E.M., Wallau, G.L., Martins, I.K., Zemolin, A.P.P., Cruz, L.C., Rodrigues, N.R., Lopes, A.R., Posse, T., and Franco, J.L., 2015. Oxidative Stress Markers in Fish (*Astyanax* sp. and *Danio rerio*) Exposed to Urban and Agricultural Effluents in the Brazilian Pampa Biome. Environ. Sci. Pollut. Res., 22: 15526-15535.

- Dallinger, R., Prosi, F., Segner, H., and Back, H., 1987. Contaminated food and uptake of heavy metals by fish: a review and a proposal for further research. *Oecologia* 73 (1), 91–98.
- Dautremepuits, C., Betoulle, S., and Vernet, G., 2002. Antioxidant response modulated by copper in healthy or parasitized carp (*Cyprinus carpio* L.) by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). *Biochim. Biophys. Acta* 1573, 4–8.
- De Conto Cinier, C., Ramel, M.P. Faure, R. Garin D., and Bouvet, Y., 1999. Kinetics of Cd accumulation and elimination in Carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 122: 345-352.
- De Smet, H., and Blust, R., 2001. Stress responses and changes in protein metabolism in Carp *Cyprinus carpio* during Cd exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 48: 255-262.
- De Zoysa, M., Whang, I., Lee, Y., Lee, S., Lee, J.S., and Lee, J., 2009. Transcriptional analysis of antioxidant and immune defense genes in disk abalone (*Haliotis discus discus*) during thermal, low-salinity and hypoxic stress". *Comp Biochem Physiol B* 154:387–395.
- Diez, S., 2008. Human health effects of methylmercury exposure. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 198, 113–132.
- Dogan, Z., Eroğlu, A., Kanak, E.G., Atlı, G., and Canlı, M., 2014. Response of antioxidant system of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) following exposure to chromium and copper in differing hardness. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 92(6), 680-686.
- Dons, C., and Beck, P.A., 1993. Priority hazardous substances in Norway. Norwegian State Pollution Control Reports, 93: 22-115, Norway.
- Dökmeci, G., 1988. Çevre kirlenmesinde rol oynayan toksik maddeler. 488-489.
- Dönmez, A.E., Kalay, M., Özkan, F., and Koyuncu, C.E., 2006. FMC ve malahat yeşili sağıltım dozlarının *Oreochromis niloticus*'un bazı kan parametrelerinde meydana getirdiği değişimler. *Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Dergisi*, 23:61-64.

- Du, Z., Luo, W., Liu, Y., Xu, H., Wu, J., Wang, T., Yang, L., and Wen A., 2019. The dietary zinc requirement of a benthic fish *Paramisgurnus dabryanus*. *Aquaculture Research*, 51: 1346-1352.
- ECB, 2003. "Technical guidance document (TGD) on risk assessment of chemical substances following European regulation and directives," European Chemical Bureau, Ispra. In: Clerk Maxwell, J. (Ed.), *A Treatise on Electricity and Magnetism*, 3rd ed. vol. 2. Oxford, Clarendon, pp. 68–73.
- Egemen, Ö., and Sunlu, U., 2003. Su Kalitesi. Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi Yayınları 14, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
- El-Sayed A.-F.M.. 2006. *Tilapia culture*. Oceanography Department, Faculty of Science, Alexandria University, Egypt. CABI Publishing.
- Eroglu, A., Dogan, Z., Kanak, E.G., Atli, G., and Canli, M., 2014. Effects of Heavy Metals (Cd, Cu, Cr, Pb, Zn) on Fish Glutathione Metabolism. *Environmental Science and Pollution Research*, 22: 3229-3237.
- Fadl, S.E., El-Habashi, N., Gad, D.M., Elkassas, W.M., Elbially, Z.I., Abdelhady, D.H., and Hegazi, S.M., 2021. Effect of Adding *Dunaliella* Algae to Fish Diet on Lead Acetate Toxicity and Gene Expression in the Liver of Nile Tilapia. *Toxin Reviews*, 40(4): 1155-1171.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2004). *Fishstat plus*. FAO. Rome.
- Felton, G.W. and Duffey, S.S., (1992). Ascorbate Oxidation Reduction in *Helicoverpa zae* as a Scavenging System Against Dietary Oxidants. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 19, 27-37.
- Feng, L., Li, W., Liu, Y., Jiang, W.D., Kuang, S.Y., Wu, P., Jiang, J., Tang, L., Tang, W.N., Zhang, Y.a., and Zhou, X.Q., 2017. Protective Role of Phenylalanine on the ROS-Induced Oxidative Damage, Apoptosis and Tight Junction Damage via Nrf2, TOR and NF-kB Signalling Molecules in the Gill of Fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 60: 185-196.

- Filho, D.W., 2007. Reactive oxygen species, antioxidants and fish mitochondria. *Frontiers in Bioscience* 12 (1): 1229-1237.
- Firat, Ö., A., and Sahin Inandi, A., 2016. Investigation of combined effect of zeolite and mercury toxicity on some serum biochemical parameters of *Oreochromis niloticus*. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 33(3), 251-257.
- Firat, Ö., Cogun, H.Y., Yüzereroğlu, T.A., Gök, G., Firat, Ö., Kargin, F., and Kötemen, Y., 2011. A comparative study on the effects of a pesticide (cypermethrin) and two metals (copper, lead) to serum biochemistry of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37, 657-666.
- Firat, Ö. and Kargin F., 2009. Effects of Zinc and Cadmium on Erythrocyte Antioxidant Systems of a Freshwater Fish *Oreochromis niloticus*. *Biochemistry Molecular Toxicology*, 40: 223-229.
- Fitzsimmons, K., 2000. Tilapia: The most important aquaculture species of the 21st century. In K. Fitzsimmons & J. Carvalho Filho (Eds.), *Tilapia Aquaculture in the 21st Century Fifth International Symposium on Tilapia Aquaculture* (pp. 3-8). Rio de Janeiro, Brazil.
- Flos, R.A., Caritat, A., and Balasch, J., 1979. Zinc content in organs of dogfish subjected to sublethal experimental aquatic zinc pollution. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 63: 77-81.
- Francesconi, K.A., Gailer, J., Edmonds, J.S., Goessler, W., and Irgolic, K.J., 1999. Uptake of arsenic-betaines by the mussel *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 122: 131-137.
- Firidin, G., Kargin, F., Firat, Ö., Cogun, H.Y., Firat, Ö., Firidin, B., and Yüzereroğlu, T.A., 2015. Antioxidant defence systems, lipid peroxidation and acetylcholinesterase activity of *Oreochromis niloticus* exposed to mercury and mercury+selenium. *Fresenius Environmental Bulletin*, 24(5), 1958-1965.

- Fridovich, I., 1995. Superoxide Radical and Superoxide Dismutase. *Annu Rev Biochem.* 64: 97-112.
- Fornazier, R.F., Ferreira, R.R., Pereira, G.J.G., Molina, S.M.G., Smith, R.J., Lea, P.J. and Azevedo, R.A., 2002. Cadmium Stress in Sugar Cane Callus Cultures: Effect on Antioxidant Enzymes. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 71, 125-131.
- Furness, R.W., Muirhead, S.J., and Woodburn, M., 1986. Using bird feathers to measure mercury in the environment: relationships between mercury content and moult. *Mar. Pollut. Bull.* 17 (1), 27–30.
- Gao, F., Kinnula, V.L., Myllärniemi, M., and Oury, T.D., 2008. Extracellular Superoxide Dismutase in Pulmonary Fibrosis. *Antioxid Redox Signal.* 10(2): 343-354.
- Griffith, O.W., 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-Vinylpyridine. *Analytical Chemistry*, 106: 207-212.
- Garrick, M.D., Singleton, S.T., Vargas, F., Kuo, H.C., Zhao, L., Knopfel, M., Davidson, T., Costa, M., Paradkar, P., Roth, J.A., and Garrick, L.M., 2006. DMTI: which metals does it transport? *Biol. Res.* 39 (1), 79–85.
- George, S.G., 1982. Subcellular accumulation and detoxification of metals in Aquatic Animals. In: *Physiological Mechanisms of Marine Pollutant Toxicity*. Edited by Vernberg, W.B., Calabrese, A., Thurberg, F.P. and Vernberg, J.F. London, Academic Press, I-XIII, 564 pp.
- Gerbino, E., Mobili, P., Tymczyszyn, E.E., Frausto-Reyes, C., Araujo-Andrade, C. and Gomez-Zavaglia, A. 2011. Use of Raman spectroscopy and chemometrics for the quantification of metal ions attached to *Lactobacillus kefir*. *J. Appl. Microbiol.* 112: 363-371.
- Gernhofer, M., Pawet, M., Schramm, M., Müller, E., and Triebkorn, R., 2001. Ultrastructural biomarkers tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. *J. Aqua. Ecosyst., Stress Recovery*, 8: 241-260.

- Ghazaly, K.S., 1992. Sublethal Effects of Nickel on Carbohydrate Metabolism, Blood and Mineral Contents of *Tilapia Nilotica*. Wat. Air Soil Pollut., 64: 525–532.
- Giari, L., Simoni, E., Manera, M., and Dezfuli, B., 2008. Histo-Cytological Responses of *Dicentrarchus labrax* (L.) Following Mercury Exposure. Ecotox. Environ. Saf., 70: 400–410.
- Goyer, R.A., 1991. Toxic effects of metals. Pp. 623-680 in Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 4th Ed., M.O. Amdur, editor; J. Doull, editor; and C.D. Klaassen, editor., eds. New York: Pergamon Press.
- Gravato, C., Teles, M., Oliveira, M., and Santos, M.A., 2006. Oxidative stress, liver biotransformation and genotoxic effects induced by copper in *Anguilla anguilla* L. – the influence of pre-exposure to bnapthoflavone. Chemosphere 65:1821–1830.
- Gray, N. F., 2008. Drinking Water Quality: Problems and Solutions. Cambridge University Press; 2 edition (April 21, 2008).
- Green, R.M., Graham, M., O'Donovan, M.R., Chipman, J.K., and Hodges, N.J., 2006. Subcellular compartmentalization of glutathione: correlations with parameters of oxidative stress related to genotoxicity. Mutagenesis. 21(6): 383-390.
- Grobler E., Du Preez H.H., and Van Vuren, J.H.J., 1989. Toxic effects of zinc and iron on the routine oxygen consumption of *Tilapia sparrmanii* (Cichlidae), Comp. Biochem. Physiol., 94(c): 207–214.
- Haas, K. L., and Franz, K. J., 2009. “Application of metal coordination chemistry to explore and manipulate cell biology,” Chemical Reviews, vol. 109, no. 10, pp. 4921–4960.
- Habashi F., 1997. Handbook of Extractive Metallurgy, 4, pp. 1985-2026, WILEY-VCH, Germany.

- Habig, W.H., Pabst, M.J., and Jakoby, W.B., 1974. Glutathione *S*-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249: 7130-7139.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C., 1989. *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press, Oxford.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods in Enzymology*. Packer, L., Glazer, A.N., Eds., 186: 17-75.
- Hapke, H.J. 1991. Metal accumulation in the food chain and load of feed and food. In: *Metals and their compound in the environment. Occurrence, analysis and biological relevance*, Vol II.6, pp.469-479, (ed. Merian, E.), VCH, New York.
- Harris, N., Bachler, M., Costa, V., Mollapour, M., Moradas – Ferreira, P., and Piper P. W., 2005. “Overexpressed Sod1p acts either to reduce or to increase the lifespans and stress resistance of yeast, depending on whether it is Cu²⁺-deficient or an active Cu,Zn-superoxide dismutase,” *Aging Cell*, vol. 4, no. 1, pp. 41–52.
- Hauser-Davis, R.A., Bastos, F.F., Dantas, R.F., Tobar, S.A.L., Bastos Neto, J.C., Bastos, V.L.F.C., Ziolli, R.L., and Arruda, M.A.Z., 2014. Behaviour of the Oxidant Scavenger Metallothionein in Hypoxia-Induced Neotropical Fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 103: 24-28.
- Hayes, D.J., Flanagan, J.U., and Jowsey, I.R., 2005. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45: 51-88.
- Heath, A.G., 1987. *Water Pollution and Fish Physiology*. Florida: CRC Press. 245p.
- Heath, A. G., 1995. *Water Pollution and Fish Physiology*. 2nd edition, CRC Press, New York.
- Heiske, K., 2005. Interaction of oxygen supply, oxidative stress and molecular defence system during temperature stress in fish. *Dem Fachbereich Biologie Der Universität, Brama*, 1-223.

- Hidalgo, M.C., Exposito, A., Palma, J.M., and Higuera, M., 2002. Oxidative stress generated by dietary Zn-deficiency: studies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 183–193.
- Hinton, D.E., and Lauren, D.J., 1993. Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potential biomarkers of exposure. In: Mc Carthy JF, Shugart LR (Eds.). *Biomarkers of Environmental Contamination*. Boca Raton, Lewis Publishers. pp. 51-65.
- Ho, E., 2004. Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. *J. Nutr. Biochem.*, 15: 572–578.
- Hogstrand, C., Ferguson, E.A., Galvez, F., Shaw, R., Webb, N.A., and Wood, C.M., 1999. Physiology of Acute Silver Toxicity in the Starry Flounder (*Platichthys stellatus*) in Seawater. *J. Comp. Physiol. B*, 169(7): 461-573.
- Hollis, L., McGeer, J.C., McDonald, G.D., and Wood, C.M., 1999. Cadmium accumulation, gill cadmium binding, acclimation, and physiological effects during sublethal Cadmium exposure in Rainbow Trout. *Aquatic Toxicology*, 46: 101-119.
- Houston, A.H., and Keen, J.E., 1984. Cadmium inhibition of erythropoiesis in Goldfish (*Carassius auratus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 41: 18-34.
- Hu, H., 2000., Exposure to metals. *Occupational and Environmental Medicine*, 27: 983-996.
- Hu, K., Feng, L., Jiang, W., Liu, J., Jiang, J., Li, S., and Zhou, X., 2014. Oxidative Damage Repair by Glutamine in Fish Enterocytes. *Fish Physiol. Biochem.*, 40: 1437-1445
- Jago, C.H., Shaw-Allen, P.L., and Brundage, S., 1996. Gill Na⁺, K⁺-ATPase Activity in Largemouth Bass (*Micropterus salmoides*) from Three Reservoirs with Different Levels of Mercury Contamination. *Aq. Toxicol.*, 36(3-4): 161-176.

- Jha, B.S., and Jha, M.M., 1995. Biochemical Effects of Nickel Chloride on the Liver and Gonads of the Freshwater Climbing Perch, *Anabas testudineus* (Bloch.). Proc. Natl. Acad. Sci. India, 65: 39–46.
- Jhonsson, G., 2003. Antioxidant intake, plasma, antioxidants and oxidative stres in a randomized, controlled, parellel, mediterranean dietary intervention study on patients with reheumatoid arthritis. Nutrition Journal. 2(5): 81-90.
- Jorgensen, S.W., 2012. Ecotoxicology: a derivative of encyclopedia of ecology”. Academic Press, London, p 390 pp.
- Jos, A., Cameán A.M. Pflugmacher, S., Segner, H., 2009. The Antioxidant Glutathione in the Fish Cell Lines EPC end BCF-2: Response to Model Pro-oxidant as Measured by Three Different Fluorescent Dyes. Toxicology in Vitro, 23: 546-553.
- Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., and Timur, S., 2004. Metallerin Çevresel Etkileri-I. TMMOB Metalurji Mühendisleri Odası Dergisi, Sayı: 136, 47-53.
- Kalay, M., Ay, O., and Canli, M., 1999. Heavy metal concentrations in fish tissues from the Northeast Mediterrenean Sea. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 63, 673–681.
- Kalay, M., Koyuncu, C.E., and Dönmez, A.E., 2004. Mersin Körfezi’nden yakalanan *Sparus aurata* (L. 1758) ve *Mullus barbatus* (L. 1758)’un kas ve karaciğer dokularındaki Kadmiyum Düzeylerinin Karşılaştırılması. Ekoloji. 13 (52): 23-27.
- Kalay, M., and Canli, M., 2000. Elimination of essential (Cu, Zn) and nonessential (Cd, Pb) metals from tissues of a freshwater fish *Tilapia zillii* following an uptake protocol. Tr. J. Zoology. 24, 429–436.
- Kalinina, E.V., Chernov, N.N., and Novichkova, M.D., 2014. Role of Glutathione, Glutathione Transferase, and Glutaredoxin in Regulation of Redox-Dependent Processes. Published in Uspekhi Biologicheskoi Khimii. 54: 299-348.

- Kanak, E.G., Dogan, Z., Eroglu, A., Atlı, G., and Canlı, M., 2014. Effects of Size on the Response of Antioxidant Systems of *Oreochromis niloticus* Following Metal Exposures. *Fish Physiology Biochemistry*, 40: 1083-1091.
- Kartal, G., Güven, A., Kahvecioğlu, Ö., and Timur, S., 2004. Metallerin Çevresel Etkileri-II. TMMOB Metalurji Mühendisleri Odası Dergisi, Sayı: 137:46-531.
- Katalay, S., and Parlak, H., 2004. The effects of cadmium on erythrocyte structure of Black goby (*Gobius niger* L.1758). *Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Dergisi*, 21: 99-102.
- Kayhan, F.E., Muşlu, M.N., and Koç, N.D., 2009. Stress and Biological Responses Seen in Aquatic Organisms due to Some Trace Elements. *Journal of Fisheries Sciences.com*, 3(2): 153-162.
- Kayhan, F.E., 2007. Mercury levels of Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from Bosphorus, İstanbul, Turkey. *Journal of Biological Sciences*, 7: 369-373.
- Kayis, T., Emre, I. ve Coskun, M., 2012. ‘‘Effects of diazinon on antioxidant enzymes and adult emergence of the parasitoid *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae)’’. *Turkish Journal of Entomology*, 36, 463–471.
- Kelly, S.A., Havrilla, C.M., Brady, T.C., Abramo, K.H. Levin, E.D., 1998. Oxidative stress in toxicology: Established mammalian and emerging piscine model systems. *Environmental Health Perspectives*, 106 (7): 375-384.
- Khan, A., and Kasha, M., 1994. Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction. *Proceedings of National Academy of Science USA*, 91: 12365-12367.
- Kilinç, K., 1985. Oksijen radikalleri: üretilmeleri, fonksiyonları ve toksik etkileri. *Biyokimya Dergisi*, 10 (2): 59-89.

- Kim, A.D., Gu M.B., Allen, H.E., and Cha, D., 2001. Physiochemical Factors Affecting the Sensitivity of *Ceriodaphnia bulba* to Copper. *Environ. Monit. and Assess.* t, 70: 105-106.
- Kim, J.H., and Kang, J.C., 2016. Oxidative Stress, Neurotoxicity, and Metallothionein (MT) Gene Expression in Juvenile Rock Fish *Sebastes schlegelii* Under the Different Levels of Dietary Chromium (Cr^{6+}) Exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 125: 78-84.
- Kirkman, H.N., Galiano, S., and Gaetani, G.F., 1987. The function of catalase-bound NADPH. *J Biol Chem.* 262(2): 660–666.
- Kivrakdal, A., 2010. Farklı sertlik değerlerindeki sularda metal (Cu, Cr) etkisinde kalan farklı büyüklükteki balıkların (*Oreochromis niloticus*) ATPaz tepkilerin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Klesius, P.H., Shoemaker, C.A., and Evans, J.J. 2008. Streptococcus: A worldwide fish health problem. *8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture* (pp. 83-107). Cairo.
- Koyana, J., and Ozaki. Y., 1984. Hematological changes of fish exposed to low concentrations of cadmium in the water. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* , 50:199-203.
- Kubrak, O.I., Husak, V.V., Rovenko, B.M., Poigner, H., Kriews, M., Abele, D., and Lushchak, V.I., 2013. Antioxidant system efficiently protects goldfish gills from Ni^{2+} induced oxidative stress. *Chemosphere* 90:971–976.
- Lagman, M., Ly, J., Saing, T., Kaur Singh, M., Vera Tudela, E., and Morris, D., 2015. Investigating the Causes for Decreased Levels of Glutathione in Individuals with Type II Diabetes. *PLoS ONE*. 2015; 10(3): e0118436.
- Langston, W.J., 1990. Toxic effects of metals and the incidence of marine ecosystems. In: Furness, R.W., Rainbow, P.S. (Eds.), *Heavy Metals in the Marine Environment*. CRC Press, New York.

- Larson, R.A., 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*. 27(4): 969-978.
- Larsson, A., Haux, C., and Sjobeck, M.L., 1985. Fish physiology and metal pollution: Results and experiences from laboratory and field studies. *Ecotoxicol Environ Saf* 9:250–281.
- Lartillot, S., Kedziora, P., and Athias, A., 1988. Purification and characterization of a new fungal catalase. *Prep Biochem*. 18:241–246
- Law, R.J., Fileman, C.F., Hopkins, A.D., Baker, J.R., Harwood, J., Jackson, D.B., Kennedy, S., Martin, A.R., and Morris, R.J., 1991. Concentrations of trace metals in the livers of marine mammals (seals, porpoises and dolphins) from waters around the British Isles. *Mar. Pollut. Bull.* 22, 183–191.
- Lee S.R., Critical role of zinc as either an antioxidant or a prooxidant in cellular systems, *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2018 (2018), e9156285, <https://doi.org/10.1155/2018/9156285>
- Levesque, H.M., Moon, T.W., Campbell, P.C.G., and 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, M., Zhu, X., Tian, J., Liu, M., and Wang, G., 2018. Bioaccumulation, Oxidative Stress, Immune Responses and Immune-Related Gene Expression in Northern Sneakhead Fish, *Channa argus*, Exposure to Waterborne Selenium. *Molecular Biology Reports*, 46: 947-955.
- Li, P., Li, Z.H., and Wu, Y., 2020. Interactive Effects of Temperature and Mercury Exposure on the Stress-Related Responses in the Freshwater Fish *Ctenopharyngodon idella*. *Aquaculture Research*, 52: 2070-2077.
- Li, Z.H., Zlabek, V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J., and Randak, T., 2009. Responses of antioxidant status and Na⁺-K⁺-ATPase activity in gill of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, chronically treated with carbamazepine. *Chemosphere* 77:1476–1481.

- Limon-Pacheco, J., and Gonsebatt, M.E., 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res.* 2009; 674(1-2): 137-147.
- Livingstone, D.R., Lips, F., Martinez, P.G., and Pipe, R.K., 1992. Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. *Mar Biol* 112:265–276.
- Lock, R.A.C., Crujisen, P.M.J.M., and Van Overbeeke, A., 1981. Effects of Mercuric Chloride and Methylmercuric Chloride on the Osmoregulatory Function of the Gills in Rainbow Trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 68(2): 151-159.
- Lopes, P.A., Pinheiro, T., Santos, M.C., Mathias M.D.L., Collores-Pereira, M.J., and Viegas-Crespo, A.M., 2001. Response of Antioxidant Enzymes in Freshwater Fish Populations (*Leuciscus alburnoides* complex) to Inorganics Pollutants Exposure. *The Sciences of the Total Environment*, 280: 153-163.
- Lowe-Jinde, L., and Nimi. A.J., 1986. Hematological characteristics of Rainbow trout *Salmo gairdneri* in response to cadmium exposure. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 37: 375-381.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, N.J., and Randall, R.J., 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193:265–275.
- Lushchak, V.I., 2007. Free radical oxidation of proteins and its relationship with functional state of organisms. *Biochemistry (Mosc)* 72:809–827.
- Lushchak, V.I., 2016. Contaminant-Induced Oxidative Stress in Fish: a Mechanistic Approach. *Fish Physiol. Biochem.*, 42: 711-747.
- Maity, S., Roy, S., Chaudhury, S., and Bhattacharya, S., 2008. Antioxidant responses of the earthworm *Lampito mauritii* exposed to Pb and Zn contaminated soil. *Environ. Pollut.*, 151 : 1–7.
- Mance, G., 1987. Pollution threat of heavy metals in aquatic environment. Elsevier, London, p 363.

- Martinez-Alvarez, R., Morales, A., and Sanz, A., 2005. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors". *Rev Fish Biol Fish* 15:75–88.
- Mccord, J.M., and Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase; an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (homocytocryin). *Journal of Biological Chemistry*, 244: 6049- 6054.
- McLean, J.A., Karadas, F., Surai, P.F., McDevitt, R.M., and Speake, B.K., 2005. Lipid-soluble and water-soluble antioxidant activities of the avian intestinal mucosa at different sites along the intestinal tract. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 141:366-372.
- Mela, M., Neto, F.F., Yamamoto, F.Y., Almeida, R., Grotzner, S.R., Ventura, D.F., and Ribeiro, C.A.D.O., 2014. Mercury Distribution in Target Organs and Biochemical Responses After Subchronic and Trophic Exposure to Neotropical Fish *Hoplias malabaricus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40: 245-256.
- Mieiro, C.L., Perira, M.E., Duarte, A.C., and Pacheco, M., 2011. Brain as a Critical Target of Mercury in Environmentally Exposed Fish (*Dicentrarchus labrax*) – Bioaccumulation and Oxidative Stress Profiles. *Aquatic Toxicology*, 103: 233-240.
- Monurizzaman, M., Kumar, S., Das, D., Sarbjna, A., and Chakraborty, S.B., 2020. Enzymatic, Non Enzymatic Antioxidants and Glucose Metabolism Enzymes Response Differently Againsts Metal Stress in Muscle of Three Fish Species Depending on Different Feeding Niche. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 202: 1-12.
- Monserat, J.M., Martinez, P.E., Geracitano, L.A., Amado, L.L., Martins, C.M.G., Pinho, G.L.L., Chaves, I.S.C., Ferreira- Cravo, M., Ventura-Lima, J., and Bianchini, A., 2007. Pollution Biomarkers in Estuarine Animals: Critical Review and New Perspectives. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 146: 221-234.

- Monteiro, D.A., Rantin, F.T., and Kalinin, A.L., 2009. The effects of selenium on oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish matrinxã, *Brycon cephalus* (Gunther, 1869) exposed to organophosphate insecticide Folisuper 600 BR- (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 149C, 40– 49.
- Monterio, L.R., and Lopes, H.D., 1990. Mercury content of swordfish, *Xiphias gladius*, in relation to length, weight, age and sex. *Mar. Pollut. Bull.* 21, 293–296.
- Moteiro, D.A., Rantin, F.T., and Kalinin A.L., 2013. Dietary Intake of Inorganic Mercury: Bioaccumulation and Oxidative Stress Parameters in the Neotropical Fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology*, 22: 446- 456.
- Morsey, M.G., and Protasowicki, M., 1990. Cadmium bioaccumulation and its effects on some hematological and histological aspects in carp, *Cyprinus carpio* (L.) at selected temperature, *Acta Ichthyol. Piscat.* XX Fasc. 1.
- Mruk, D.D., Silvestrini, B., Meng-Yun, M.O., and Cheng, C.Y., 2002. Antioxidant Superoxide Dismutase - a Review: Its Function, Regulation in the Testis, and Role in Male Fertility. *Contraception*. 65(4): 305- 311.
- Mudipalli, A., 2007. Lead hepatotoxicity and potential health effects. *Indian J. Med. Res.* 126, 518–527.
- Nandlal, S., and Pickering, T., 2004. Tilapia fish farming in Pacific Island countries. *Volume 1. Tilapia Hatchery Operation*. Noumea, New Caledonia: Secretariat of the Pacific Community.
- Narra, M.R., 2016. Single and cartel effect of pesticides on biochemical and haematological status of *Clarias batrachus*: a long-term monitoring. *Chemosphere* 144, 966-974.
- Naser, H.A., 2013. Assessment and management of heavy metal pollution in the marine environment of the Arabian Gulf: a review. *Mar. Pollut. Bull.* 72 (1), 6–13.

- Nordberg, J., and Arner, S.J., 2001. Reactive Oxygen Species, Antioxidant, And The Mammalian Thioredoxin System. *Free Radic Biol Med.* 31(11): 1287-1312.
- Nunes, B., Braga, M.R., Campos, J.C., Gomes, R., Ramos, A.S., Antunes, S.C., and Correia, A.T., 2015. Ecotoxicological Effect of Zinc Pyrithione in the Freshwater Fish *Gambusia holbrokii*. *Ecotoxicology*, 24: 1896-1905.
- Oliveira, R.C., Fanta, E., Turcatti, N.M., Cardoso, R.J., and Carvalho, C.S., 1996. Lethal Effects of Inorganic Mercury on Cells and Tissues of *Trichomycterus brasiliensis* (Pisces; Siluroidei). *Biocell: Official J. of the Sociedades Latinoamericanas de Microscopia Electronica*, 20(3): 171-178.
- Orbea, A., Fahimi, H.D., and Cajaraville, M.P., 2000. Immunolocalization of Four Antioxidant Enzymes in Digestive Glands of Molluscs and Crustaceans and Fish Liver. *Histochem Cell Biol.* 114(5): 393-404.
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B., 2007, Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 12:913–922.
- Ozkan, A., and Fışkın, K., 2004. Serbest Oksijen Radikalleri, Karsinogenez ve Antioksidant Enzimler. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi.* 14: 52-60.
- Pagenkopf, G.K., 1983. Gill Surface Interaction Model for Trace-Metal Toxicity to Fishes. Role of Complexation, pH and Water Hardness. *Environ. Sci. Technol.* 17, 342-347.
- Parvez, S., and Raisuddin, S., 2006. Copper Modulates Non-Enzymatic Antioxidants in the Freshwater Fish *Channa punctata* (Bloch) Exposed to Deltamethrin. *Chemosphere*, 62: 1324-1332.
- Parvez, S., Sayeed, I., and Raisuddin, S., 2006. Decreased gill ATPase activities in the freshwater fish *Channa punctata* (Bloch) exposed to a diluted paper mill effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65: 62–66.
- Pathiratne, A., Chandrasekera, L.W.H.U., and Pathiratne, K.A.S. (2009). Use of biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to assess the impacts of

- pollution in Bolgoda Lake, an urban water body in Sri Lanka. *Environmental Monitoring and Assessment*, 156, 361–375.
- Pehlivan, M., Pehlivan, E., and Özler, M.A., 1993. İnsan sağlığı üzerine cıva ve cıva bileşiklerinin etkisi. *Çevre Dergisi*, Sayı 8: 33-35.
- Pei, S., Minhajuddin, M., Callahan, K.P., Balys, M., Ashton, J.M., Neering, S.J., Lagadinou, E.D., Corbett, C., Ye, H., Liesveld, J.L., O'Dwyer, K.M., Li, Z., Shi, L., Greninger, P., Settlemann, J., Benes, C., Hagen, F.K., Munger, J., Crooks, P.A., Becker, M.W., and Jordan, C.T., 2013. Targeting Aberrant Glutathione Metabolism to Eradicate Human Acute Myelogenous Leukemia Cells. *The J Biol Chem*. 288(47): 33542–33558.
- Perottoni, J., Lobato, L.P., Silveira, A., Rocha, J.B.T., and Emanuelli, T., 2004. Effects of mercury and selenite on d-aminolevulinate dehydratase activity and on selected oxidative stress parameters in rats. *Environmental Research*, 95, 166–173.
- Pillay, T.V.R., 1990. *Aquaculture principles and practices*. Fishing News Books, Blackwell Science, Oxford, UK.
- Pinto, E., Sigaud-Kutner, T.C.S., Leitao, M.A.S., Okamoto, O.K., Morse, D., and Colepicolo, P., 2003. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J Phycol* 39:1008–1018.
- Plessi, M., Bertelli, D., and Monzani, A., 2001. Mercury and selenium content in selected seafood. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14, 461-467.
- Pullin, R.S.V., and Lowe-McConnell, R.H., 1982. The biology and culture of tilapias, *ICLRAM Conference Proceeding 7*. Manila: ICLRAM.
- Pyle, G.G., Swanson, S. M., and Lehmkuhl, D.M., 2002. The Influence of Water Hardness, pH, and Suspended Solids on Nickel Toxicity to Larval Fathead Minnows (*Pimephales promelas*). *Wat. Air Soil Pollut.*, 133: 215–226.
- Rainbow, P.S., 1985. The Biology of Heavy Metals in the Sea. *Intern. J. Environmental Studies*, 25: 195-211.

- Qu, R., Feng, M., Wang, X., Qin, L., Wang, C., Wang, Z., and Wang, L., 2014. Metal Accumulation and Oxidative Stress Biomarkers in Liver of Freshwater Fish *Carassius auratus* Following in Vivo Exposure to Waterborne Zinc Under Different pH Values. *Aquatic Toxicology*, 150: 9-16.
- Quiles, J., Huertas, J., Batine, M., Mataix, J., Tortosa, C., 2002. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology*. 180: 79-95
- Pourkhabbaz, A., Ebrahimpour Kasmani, M., Kiyani, V., Hasan Hosynzadeh, M. 2011. Effects of water hardness and Cu and Zn on LC50 in *Gambusia holbrooki*. *Chemical Speciation & Bioavailability* 23(4): 224-228.
- Radak, Z., Zhao, Z., Goto, S., and Koltai, E., 2011. Age-associated neurodegeneration and oxidative damage to lipids, proteins and DNA. *Molecular Aspect of Medicine*, 32, 305-315.
- Radi, A.A.R., and Matkovics, B., 1988. Effects of metal ions on the antioxidant enzyme activities, protein contents and lipid peroxidation of carp tissues. *Comp. Biochem. Physiol. C* 90, 69–72.
- Radhakrishnaiah, K., Suresh, A., and Sivaramakrishna, B., 1993. Effect of Sublethal Concentration of Mercury and Zinc on the Energetics of a Fresh-Water Fish *Cyprinus carpio* (Linnaeus). *Acta Biol. Hung.*, 44: 375–385.
- Rajeshkumar, S., Liu, Y., Ma, J., Duan, H. Y., Li, X. 2017. Effects of exposure to multiple heavy metals on biochemical and histopathological alterations in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Fish & shellfish immunology* 70: 461-472.
- Reiter, R.J., Melchiorri, D., Sewerynek, E., Poeggeler, B., Barlow-Walden, L., Chuang, J., Ortiz, G.G., Acuna-Castroviejo, D., 1995. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res.* 18(1): 1-11.
- Ribeiro, C.A.O., Pelletier, E., Pfeiffer, W.C., and Rouleau, C., 2000. Comparative Uptake, Bioaccumulation, and Gill Damages of Inorganic Mercury in Tropical and Nordic Freshwater Fish. *Environ. Res.*, 83: 286–292.

- Ribeiro, C.A.O., Belger, L., Pelletier, E., and Rouleau, C., 2002. Histopathological Evidence of Inorganic Mercury and Methyl Mercury Toxicity in the Arctic Charr (*Salvelinus alpinus*). Environ. Res., 90: 217-225.
- Ritola, O., Livingstone, D.R., Peters, L.D., and Lind, P.S., 2002. Antioksidant processes are affected in juvenile rinbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to ozone and oxygen-supersaturated water. Aquaculture. 210: 1-19.
- Roche, H., and Bogé, G., 1996. Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical intoxication". Mar Environ Res 41:27-43.
- Roesijadi, G., and Robinson, W.E., 1994. Metal regulation in aquatic animals: mechanism of uptake, accumulation and release. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), Aquatic Toxicology (Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives. Lewis Publishers, London.
- Saglamtimur, B., Cicik, B., and Erdem, C., 2003. Effects of different concentrations of Cu alone and Cu+Cd mixture on the accumulation of Cu in the gill, liver, kidney and muscle tissues of *Oreochromis niloticus*. (In Turkish). Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 27: 813-820.
- Saglam, D., Atli, G., Dogan, Z., Baysoy, E., Gurler, C., Eroglu, A., and Canli, M., 2014. Response of the Antioxidant System of Freshwater Fish (*oreochromis niloticus*) Exposed to Metals (Cd, Cu) in Differing Hardness. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Csiences, 14: 43-52.
- Saglam, D., Atli, G., and Canli, M., 2013. Investigations on the osmoregulation of freshwater fish (*Oreochromis niloticus*) following exposures to metals (Cd, Cu) in differing hardness". Ecotoxicol Environ Saf. 92:79-86.
- Salvatore, J.A.Jr., Bradford, M.J., and Earl, P.G., 1977. Mercury in the North Atlantic lobster of the New York Bight. Proceedings of the Pennsylvania Academy of Science 51: 26-28.

- Sampaio, F.G., Boijink, C.L., Dos Santos, L.R.B., Oba, E.T., Kalinin, A.L., Luiz, A.J.B., and Rantin, F.T., 2012. Antioxidant Defenses and Biochemical Changes in the Neotropical Fish Pacu, *Piaractus mesopotamicus*: Responses to Single and Combined Copper and Hypercarbia Exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 156: 178-186.
- Sampaio, F.G., Boijink, C.L., Oba, E.T., Santos, L.R.B., Kalinin, A.L., and Rantin, F.T., 2008. Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia exposure". *Comp Biochem Physiol C* 147:43– 51.
- Sanchez, W., Palluel, O., Meunier, L., Coquery, M., Porcher, J.M., and Ait-Aissa, S., 2005. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 177–183.
- Seco, J., Freitas, R., Xavier, J.C., Bustamante, P., Coelho, J.P., Coppola, F., Saunders, R.A., Almeida, A., Fielding, S., Pardal, M.A., Stowasser, G., Pompeo, G., Tarling, G.A., Brierley, A.S., and Pereira, E., 2021. *Marine Pollution Bulletin*, 166: 1-7.
- Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y.S.R., and De, B., 2010. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: Current status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 3(1): 91-100.
- Sen, S., and Chakraborty, R., 2011. The Role of Antioxidants in Human Health. American Chemical Society, *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention and Therapy*. Chapter 1: 1-37.
- Serafim, M.A., Bebianno, R.M., and Langstone, W.J., 2002. Effects of temperature and size on metallothionein synthesis and gill of *Mytilus galloprovincialis* exposed to Cd. *Marine Environmental Research*. **54**: 361-365.

- Sevcikova, M., Modra, H., Blahova, J., Dobsikova, R., Kalina, J., Zitka, O., Kizek, R. And Svobodova, Z., 2015. Factors Affecting Antioxidant Response in Fish from a Long-term Mercury-Contaminated Reservoir. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 69: 431-439.
- Sevcikova, M., Modra, H., Slaninova, A., Svobodova, Z., 2011. Metals as a Cause of Oxidative Stress in Fish: a Review. Veterinarni Medicina, 56, 11:537-546.
- Sevgiler, Y., Piner, P., Durmaz, H., and Uner, N., 2007. Effects of N-acetylcysteine on oxidative responses in the liver of fenthion exposed *Cyprinus carpio*". Pestic Biochem Physiol 87:248–254.
- Shah, S.L., 2002. Ağır metallerin (Hg, Cd, Pb) kadife balığı (*Tinca tinca* L. 1758)'nın kan parametreleri üzerine bazı etkileri. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Sharma, A., Sharma, M.S., 1994. Toxic effect of zinc smelter effluent to some developmental stages of fresh water fish, *Cyprinus carpio* (Linnaeus). J. Environ. Biol., 15(3): 221-229.
- Shoemaker, C.A., and Klesius, P.H., 1997. *Streptococcal disease problem and control: A review*. Tilapia Aquaculture Ithaca, NY, USA. Northwest Regional Aquaculture Engineering Service.
- Simkiss, K., and Taylor, M.G., 1989. Metal Fluxes Across the Membranes of Aquatic Organisms. Review. Aquatic Sci., 1(1): 173-188.
- Singh, M., and Gaur, K.K., 1997. Effects of mercury, zinc and cadmium on the proteinic value and their accumulation in trunk muscle of *Channa punctatus* (Bloch.). Adv. Bios., 16(11): 109-114.
- Skulachev, V.P., 2012. Mitochondria-targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases. J Alzheimers Dis 28:283–289.
- Somasundaram, B., King, P.E., and Shackley, S.E., 1985. The effect of zinc on the ultrastructure of the posterior gut and pronephric ducts of the larva of *Clupea harengus* (L.), Comp. Biochem. Physiol., 81(C): 29– 37.

- Srikanth, K., Pereira, E., Duarte, A.C., and Ahmad, I., 2013. Glutathione and its Dependent Enzymes' Modulatory Responses to Toxic Metals and Metalloids in Fish-a Review. *Environmental Science Research*, 20: 2133-2149.
- Srivastava, A., Singh, S., Allen, T., and Dhiman, A., 2015. Heavy Metal Toxicity of Water of the Delhi Segment of River Yamuna to Fresh Water Fish *Channa punctatus*. *Agricultural Research*, 4(4): 405-410.
- Srivastava, N., Kaushik, N., 2001. Use of fish as bioindicator of aquatic pollution In: Abstracts presented at international congress of chemistry and environment. 16th - 18th Dec., India.
- Şener, S., and Yıldırım, M., 2000. Veteriner Toksikoloji, Teknik Yayıncılık, İstanbul.
- Taju, G., Abdul Majjed, S., Nambi, K.S.N., and Sahul Hammed, A.S., 2017. Application of Fish Cell Lines for Evaluating the Chromium Induced Cytotoxicity, Genotoxicity and Oxidative Stress. *Chemosphere*, 184: 1-12.
- Townsend, D.M., Tew, K.D., and Tapiero, H., 2003. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother.* 57(3-4): 145- 155.
- Trenzado, C., Hidalgo, M.C., Garcia-Gallego, M., Morales, A.E., Furne, M., Domezain, A., Domezain, J., and Sanz, A., 2006. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccari* and trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture*, 254, 758-767.
- Trewaves, E., 1983. Tilapia fishes of the Genera *Sarotherodon*, *Oreochromis*. Danakilia. British Museum (Natural History).
- Tripathi, B.N., Mehta, S.K., Amar, A., and Gaur, J.P., 2006. Oxidative stress in *Scenedesmus* sp. during short-and long-term exposure to Cu²⁺ and Zn²⁺. *Chemosphere* 62:538–544.
- Tsigos, C., Kyrou, I., and Kassi, E., 2016. Stress, endocrine physiology and pathophysiology. In: De Groot LJ, et al. (eds) Endotext [Internet]. South Dartmouth, MA: MDText.com, Inc.

- Tuna Kelestemur, G., and Ozdemir, Y., 2011. Antioxidant Defence and Oxidative Stress on the Fishes. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 4(1): 69-73.
- Ueng, Y.F., Liu, C., Lai, C.F., Meng, L.M., Hung, Y.Y., and Ueng, T.H., 1996. Effects of cadmium and environmental pollution metallothionein and cytochrome P450 in tilapia". *Bull Environ Contam Toxicol* 57:125–131.
- Uluturhan, E., 2004. Levels of Heavy Metals in Different organs of *Pagellus erythrinus* (Red Pandora) with Environmental Parameters in the Aegean Sea, *Doktora tezi*, Danışman Cirik, Ş., Dokuz Eylül Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Van der Oost, R., Beyer, J., and Vermeulen, N.P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13(2):57–149.
- Van Dyk, J.C., Pieterse, G.M., and Van Vuren, J.H.J., 2007. Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66, 432–440.
- Varlık, B., 1991. Investigation of effects of some heavy metal (Cd-Pb) to the different development stages of *Mytilus galloprovincialis*, *Yüksek Lisans Tezi*, Danışman Uysal, H., Dokuz Eylül Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Verma, R.S., Mehta, A., and Srivastava, N., 2007. *In vivo* chlorpyrifos induced oxidative stress: Attenuation by antioxidant vitamins. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88, 191–196.
- Vural, H., 1993. Ağır metal iyonlarının gıdalarda oluşturduğu kirlilikler. *Çevre Dergisi* 8: 3-8.
- Vutukuru, S.S., Chintada, S., Madhavi, K.R., Rao, J.V. and Anjaneyulu, Y., 2006. Acute Effects of Copper on Superokside Dismutase, Catalase and Lipid Peroxidation in the Freshwater Teleost fish, *Esomus danricus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 32: 221-229.

- Wang, Y., Chien, Y., and Pan, T., 2006. Effect of dietary supplementation of caretenoids on survival, growth, pigmentation, and antioxidant capacity of characins, *Hypssobrycon callistus*. *Aquaculture*. 261: 641-648.
- Wang, W.-X., and Tan, Q.-G., 2019. Application of dynamic models in predicting the bioaccumulation, transport and toxicity of trace metals in aquatic organisms. *Environ. Pollut.* 252, 1561–1573.
- Welcomme, R.L., 1988. International introductions of Inland aquatic species. FAO Fish. Technical Paper, FAO, Rome.
- Wong, C.K.C., and Wong, M.H., 2000. Morphological and biochemical changes in the gills of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to ambient cadmium exposure. *Aquat Toxicol* 48:517–527.
- Wood, C.M., Farrel, A.P., and Brauner, C.J., 2012. Homeostasis and toxicology of essential metals. *Fish Physiol Vol. 31A*. Academic Press, London, p 497.
- Wu, P., Liu, W.D., Jiang, J., Zhao, J., Zhang, Y.A., Zhou, J., Zhang, Y.A., and ZHOU, X.Q., 2017. A Comparative Study on Antioxidant System in Fish Hepatopancreas and Intestine Affected by Choline Deficiency: Different Change Patterns of Varied Antioxidant Enzyme Genes and Nrf2 Signaling Factors. *Plos One*, 12(1): 1-21.
- Wu, X., Cobbina, S.J., Mao, G., Xu, H., Zhang, Z., and Yang, L., 2016. A review of toxicity and mechanisms of individuals and mixtures of heavy metals in the environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 8244–8259.
- Yagmur, F., and Hanci, H., 2002. Arsenik. *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi* , 11: 250-251.
- Yavuzcan Yıldız, and H., Pulatsü, S., 1999. Evaluation of the secondary stress response in healthy Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L.) after treatment with a mixture of formalin, malachite green and methylene blue. *Aquaculture Research*, 30: 379-383.

- Yazkan, M., Özdemir, F., and Gölükçü, M., 2004. Cu, Zn, Pb and Cd contents in some molluscs and crustacean in the Gulf of Antalya. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28: 95-100.
- Yıldız, N., 2001. Toprak Kirleticisi Bazı Ağır Metallerin (Zn, Cu, Cd, Pb, Co ve Ni) Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. 32 (2): 207-213 Erzurum.
- Young, I.S., and Woodside, J.V., 2001. Antioxidants in Health and Disease. *J Clin Pathol*. 54(3): 176-186.
- Zaman, K., and Pardini, R.S., 1996. An Overview of the Relationship Between Oxidative Stress and Mercury and Arsenic. *Toxic Subst. Mech.*, 15: 151–181.
- Zamocky, M., and Koller, F., 1999. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Prog Biophys Mol Biol*. 72(1): 19-66.

ÖZGEÇMİŞ

Kadir KOCALAR. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimini Adana’da tamamladıktan sonra 1998 yılında, Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde üniversite eğitime başladı ve 2002 yılında mezun oldu. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitime başladı ve 2005 yılında Yüksek Lisans Tezini tamamladı. 2011 yılı Şubat ayında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Doktora eğitime başladı.