

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ceren Özlem GÜRLER

**FARKLI Ca^{+2} DÜZEYLERİNDEKİ SULARDA Cd^{+2} ETKİSİNDE KALAN
TATLISU BALIĞI *Oreochromis niloticus*'un DOKULARINDA ATPaz
TEPKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2013

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI Ca^{+2} DÜZEYLERİNDEKİ SULARDA Cd^{+2} ETKİSİNDE KALAN
TATLISU BALIĞI *Oreochromis niloticus*'un DOKULARINDA ATPaz
TEPKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Ceren Özlem GÜRLER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

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

.....
Prof. Dr. Mustafa CANLI
DANIŞMAN

.....
Doç. Dr. Gülizar ATLI
İKİNCİ DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
ÜYE

.....
Doç. Dr. Ramazan BİLGİN
ÜYE

.....
Doç. Dr. Fatma ÇEVİK
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

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

**Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FEF2012YL2**

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI Ca^{+2} DÜZEYLERİNDEKİ SULARDA Cd^{+2} ETKİSİNDE KALAN TATLISU BALIĞI *Oreochromis niloticus*'un DOKULARINDA ATPaz TEPKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Ceren Özlem GÜRLER

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Mustafa CANLI
Yıl:2013, Sayfa: 60
Jüri : Prof. Dr. Mustafa CANLI
: Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
: Doç. Dr. Gülizar ATLI
: Doç. Dr. Ramazan BİLGİN
: Doç. Dr. Fatma ÇEVİK

Tatlısu balığı (*Oreochromis niloticus*) akut (48 saat, $20 \mu\text{M Cd}^{+2}$) ve kronik (14 gün, $10 \mu\text{M Cd}^{+2}$) süreler ile üç farklı derişimdeki Ca^{+2} için, Cd^{+2} ve $\text{Ca}^{+2}+\text{Cd}^{+2}$ etkisine bırakılmıştır. Deney süreleri sonunda solungaç ve bağırsak dokusunda Na^+/K^+ -ATPaz ve Mg^{+2} -ATPaz ile kas dokusunda Ca^{+2} -ATPaz aktiviteleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre enzim aktivitesinin farklı Cd^{+2} ve Ca^{+2} derişimine, etki süresine ve doku tipine göre değıştiğı gözlenmiştir. Ca^{+2} derişimi arttıkça kontrol balıkların ATPaz aktivitelerinin önemli oranlarda arttığı bulunmuştur. Sadece Ca^{+2} etkisindeki balıklarda genellikle ATPaz aktivitelerinde artış gözlenirken, $\text{Ca}^{+2}+\text{Cd}^{+2}$ etkisinde ise artış yanında azalış da gözlenmiştir. Akut ve kronik süreçte solungaç Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi birbirine zıt tepkiler verirken, Ca^{+2} -ATPaz ve Mg^{+2} -ATPaz genel olarak benzer yönde aktivite göstermiştir. Bu çalışmada, sucul ortamlarda metal toksisitesine Ca^{+2} 'nin etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

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

ABSTRACT

MSc THESIS

DETERMINATION OF THE ATPase RESPONSES IN TISSUES OF FRESHWATER FISH (*Oreochromis niloticus*) EXPOSED TO Cd²⁺ IN WATER WITH DIFFERENT Ca²⁺ LEVELS

Ceren Özlem GÜRLER

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Supervisor : Prof. Dr. Mustafa CANLI
Year: 2013, Page: 60
Jury : Prof. Dr. Mustafa CANLI
: Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
: Assoc. Prof. Dr. Gülizar ATLI
: Assoc. Prof. Dr. Ramazan BİLGİN
: Assoc. Prof. Dr. Fatma ÇEVİK

Freshwater fish (*Oreochromis niloticus*) was individually exposed to Ca²⁺, Cd²⁺ and Ca²⁺+Cd²⁺ in three different concentrations Ca²⁺ for acute (48 h , 20 µM Cd²⁺) and chronic (14 days, 10 µM Cd²⁺) exposure periods. At the end of exposure periods, Na⁺/K⁺-ATPase and Mg²⁺-ATPase activities in the gills and intestine and Ca²⁺-ATPase activity in the muscle were measured. Results showed that enzyme activities depend on Cd²⁺ and Ca²⁺ concentration, exposure duration and tissue type. As long as Ca²⁺ concentration increase ATPase activities of control fishes increased, also. Generally, ATPase activities increased in fish exposed to only Ca²⁺ concentration, while they showed both increases and decreases after exposure to Ca²⁺+Cd²⁺. While gill Na⁺/K⁺-ATPase activity showed opposite reactions, Mg²⁺-ATPase and Ca²⁺-ATPase showed similar trend in acute and chronic periods. The aim of this study was to investigate the effects of Ca²⁺ on metal toxicity.

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

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca çalışmalarında bana yol gösteren ikinci tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Gülizar ATLI'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Bu süre içerisinde dostluğu ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan değerli arkadaşım Zehra DOĞAN, değerli hocam Dr. Tüzün AYTEKİN YÜZEREROĞLU ve tüm diğer bölüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca maddi ve manevi anlamda desteklerini benden esirgemeyen çok sevdiğim annem Günseli GÜRLER ve babam İdris GÜRLER'e son olarak da sevgili kardeşim Ali GÜRLER'e sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
1. GİRİŞ	1
1.1. Kadmiyum	3
1.2. Kalsiyum	4
1.3. Adenozin Trifosfataz (ATPaz) Enzimleri	5
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	9
3. MATERYAL VE YÖNTEM	13
3.1. Materyal	13
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	13
3.1.1.1. Metaller	13
3.1.1.2. ATPaz Aktivite Ölçümünde Kullanılan Kimyasallar	13
3.1.1.3. Protein Analizinde Kullanılan Kimyasallar	14
3.1.2. Kullanılan Aletler	14
3.2. Yöntem	14
3.2.1. Doku Homojenatlarının Hazırlanışı	16
3.2.2. ATPaz Enzim Aktivitelerinin Ölçümü	16
3.2.3. İnorganik Fosfat Tayini	18
3.2.4. Total Protein Analizi	19
3.2.5. ATPaz Aktivitesinin Hesaplanması	22
3.2.6. İstatistik	22
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	23
4.1. Bulgular	23
4.1.1. Akut (48 saat) Deneyler	23
4.1.1.1. Kontrol Grubu Balıklarda ATPaz Aktiviteleri	23

4.1.1.2. Kadmiyum Etkisinde ATPaz aktiviteleri	24
4.1.2. Kronik (14 gün) Deneyler.....	27
4.1.2.1. Kontrol Grubu Balıklarda ATPaz Aktiviteleri	27
4.1.2.2. Kadmiyum Etkisinde ATPaz aktiviteleri	29
4.1.3. İn vitro Ca^{+2} Etkisi	32
4.2. Tartışma.....	33
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	41
5.1. Sonuçlar.....	41
5.2. Öneriler.....	42
KAYNAKLAR.....	43
ÖZGEÇMİŞ	55
EKLER	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1. Akvaryum sularının fizikokimyasal özellikleri (Art. Ort. $\pm$ S.D. N=54.....	13
Çizelge 3.2. Dokularda en yüksek ATPaz enzim aktivitesinin ölçüldüğü ortam koşulları ve inkübasyon ortamındaki iyonların son iyon derişimleri.....	17
Çizelge 4.1. İn vitro Ca^{+2} etkisinde solungaç, bağırsak ve kas dokusu ATPaz aktiviteleri	33

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1. Na^+/K^+ -ATPaz enziminin yapısı.....	6
Şekil 3.1. Fosfat derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki.....	18
Şekil 3.2. Sığır albumininden hazırlanan standart derişimler ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki	21
Şekil 4.1. Kadmiyumun farklı kalsiyum derişimlerinde <i>O. niloticus</i> 'un solungaç Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesine etkileri.....	25
Şekil 4.2. Kadmiyumun farklı kalsiyum derişimlerinde <i>O. niloticus</i> 'un solungaç Mg^{+2} -ATPaz aktivitesine etkileri.....	25
Şekil 4.3. Kadmiyumun farklı kalsiyum derişimlerinde <i>O. niloticus</i> 'un bağırsak Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesine etkileri	26
Şekil 4.4. Kadmiyumun farklı kalsiyum derişimlerinde <i>O. niloticus</i> 'un bağırsak Mg^{+2} -ATPaz aktivitesine etkileri	26
Şekil 4.5. Kadmiyumun farklı kalsiyum derişimlerinde <i>O. niloticus</i> 'un kas Ca^{+2} -ATPaz aktivitesine etkileri	27
Şekil 4.6. Kadmiyumun farklı kalsiyum derişimlerinde <i>O. niloticus</i> 'un solungaç Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesine etkileri.....	30
Şekil 4.7. Kadmiyumun farklı kalsiyum derişimlerinde <i>O. niloticus</i> 'un solungaç Mg^{+2} -ATPaz aktivitesine etkileri.....	30
Şekil 4.8. Kadmiyumun farklı kalsiyum derişimlerinde <i>O. niloticus</i> 'un bağırsak Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesine etkileri	31
Şekil 4.9. Kadmiyumun farklı kalsiyum derişimlerinde <i>O. niloticus</i> 'un bağırsak Mg^{+2} -ATPaz aktivitesine etkileri	31
Şekil 4.10. Kadmiyumun farklı kalsiyum derişimlerinde <i>O. niloticus</i> 'un kas Ca^{+2} -ATPaz aktivitesine etkileri	32

1. GİRİŞ

Son yıllarda hızlı nüfus artışı ve hızlı endüstrileşme sonucu özellikle sucul ortamda toksik ağır metal seviyesinin arttığını gösteren birçok çalışma vardır. Kirleticilerin bir bölümünü oluşturan ağır metaller, metal bileşikleri ve çeşitli mineraller göl, nehir, körfez ve okyanuslar ile bunların sedimentlerinde geniş yayılım gösterirler. Bu mineraller doğal olarak o yapının bir parçası olmaları veya insan faaliyetleri sonucunda yoğun olarak üretilip bir şekilde o ortama taşınmaları sonucu orada bulunurlar (Kalay, 2004; Yazkan, 2004). Metaller sucul ortamlarda daha çok karışım halinde bulunmalarına karşın bu alanda yapılan çalışmalar daha çok metallerin tek başına yaptıkları etkiler ile ilgilidir (Heath, 1987; Lange, 2002). Kirlenmiş bölgelerde metaller bulunduklarından ve bunların birikim ve toksik etkisi metal tipine ve maruz kalma zamanına göre değiştiğinden metal karışımlarının balıklar üzerine etkisini aydınlatmak gereklidir. Doku ve organlardaki metal birikimi sadece metal tipi ve konsantrasyonu, maruz kalma zamanı, suyun fiziksel ve kimyasal parametreleri (sıcaklık gibi), tuzluluk ve sertliğe bağlı olmayıp aynı zamanda türe, yaşa ve metabolik aktiviteye de bağlıdır (Pelgrom ve ark., 1995). Metallerin, sadece önemli bir ekosistem bileşeni değil aynı zamanda önemli bir besin kaynağı olan balıkta, biyokimyasal ve fizyolojik mekanizmaların bütünlüğünü bozduğu bilinmektedir (Heath, 1987; Hogstrand ve ark., 1999; Grosell ve ark., 2003). Vücuda alınan metallerin toksik etkileri, metabolik, depolama ve detoksifikasyon mekanizmalarının alınımlarına yetemedikleri durumda ortaya çıkmaktadır. Etki derecesi metal tipi, kimyasalın etki zamanı (Ezemonye ve ark., 2008), alkalinite, sertlik, pH (Carvalho ve Fernandes, 2006), organik karbon miktarı, yükseltgenme-ingirgenme durumu ve sıcaklığa bağlıdır. Balığın biyolojik sistemlerinde Hg^{+2} , Cd^{+2} ve Pb^{+2} gibi ağır metallerin rolünün olduğu gösterilmediği halde, Cu^{+2} , Zn^{+2} ve Fe^{+2} gibi ağır metallerin balık metabolizması için gerekli olduğu bilinmektedir (Heath, 1987; Ay ve ark., 1999).

Su sertliği bilindiği gibi balıklar üzerine ağır metallerin toksik etkilerini azaltmaktadır (Ebrahimpour ve ark., 2010b; Pyle ve ark., 2002). Metal toksisitesi genellikle solungaç epitelyumlarındaki Ca^{+2} kanallarının yarışmalı olarak bloke olması sonucunda balıklarda aktif Ca^{+2} transferinin bozulması ile ilgilidir (Galvez ve

ark., 1998). Ağır metaller yumuşak suda sert suya göre daha toksiktir çünkü ağır metaller yumuşak suda daha çok çözünür ve bu çözünmüş formlar aktif toksik ajanlardır (Rathor ve Khangarot, 2003). Doğal ortamlarda Ca^{+2} ve Mg^{+2} ağır metallerden daha fazla oranda bulunur. Ca^{+2} derişimi azaldıkça metal iyonlarının solungaç membranlarından pasif geçişi artar. Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarının hücre membranlarından alımı dengenin sağlanmasına neden olur ve bu durum metal iyonlarına karşı geçirgenliği azaltır (Penttinen ve ark., 1998; Kim ve ark., 2001).

Cd^{+2} ağır metaller arasında toksik etki bakımından ilk sıralarda yer alan önemli bir metaldir. Su yoluyla alınan Cd^{+2} sucul organizmalarda ekotoksikolojik ve fizyolojik birçok zarara neden olabilir. Cd^{+2} omurgalıların biyolojik fonksiyonları için gerekli bir element değildir ve çoğunlukla solungaç iyonositleri (klorid hücreleri) yoluyla alınmakla birlikte (Torreblanca ve ark., 1989) genellikle balıkların böbrek, karaciğer ve solungaç dokularında birikim göstermektedir (Rainbow ve ark., 2000). Yüksek su derişimlerinde Cd^{+2} balıklar için toksiktir (Rainbow, 1985). Buna ek olarak solungaçlara doğrudan fiziksel zarar verdiğinden (Gardner ve Yevich, 1970) Cd^{+2} akut toksisiteye neden olarak Ca^{+2} dengesini bozmaktadır (Verbost ve ark., 1987). Cd^{+2} , $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz gibi solungaçlarda iyon taşınmasında görev alan enzimleri inhibe ederek solungaçlarda iyon geçirgenliğine neden olmaktadır (De la Torre ve ark., 2000; Silvestre ve ark., 2005).

$\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz ve Mg^{+2} -ATPaz birçok hayvan hücresinin plazma membranından iyon geçişinin aktif transferini sağlayan membrana bağlı enzimlerdir. Metal iyonlarının büyük bir kısmı konsantrasyona bağlı olarak ATPaz aktivitesini değiştirir. Na^{+} - K^{+} -ATPaz, 3 Na^{+} iyonunu hücre dışına, 2 K^{+} iyonunu ise hücre içine transfer etmek için ATP'nin hidrolizi ile açığa çıkan enerjiyi kullanmaktadır. Böylece hücre hacminin düzenlenmesi, iyon taşınımı, elektrokimyasal gradientin korunması gibi temel fonksiyonlarda önemli görevlere sahiptir (Grosell ve ark., 2003). Sarkoplazmik retikulum tübüllerinde lokalize olan Ca^{+2} -ATPaz, hücre membranının stabilizasyonu için gerekli olan Ca^{+2} 'nin nM düzeylerindeki miktarlarında aktive olabilmekte ve ATP hidrolizinden açığa çıkan enerjiyi kullanarak sitoplazmadan Ca^{+2} 'nin uzaklaştırılmasında ve böylece düşük hücresel Ca^{+2} içeriğinin korunmasında görev almaktadır (Wong ve Wong, 2000). Hücre

zarının bütünlüğü ve permeabilitenin stabilizasyonunda önemli göreve sahip Mg^{+2} 'nin taşınmasında görev alan Mg^{+2} -ATPaz ise iyon regülasyonunda önemli bir göreve sahiptir (Canlı ve Stagg, 1996). Ağır metallerin ATPaz enzimleri üzerine olan etkiler çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir (De la Torre ve ark., 2000; Atli ve Canlı, 2007). Özellikle Cu^{+2} , Ag^{+2} , Cd^{+2} , Zn^{+2} ve Hg^{+2} gibi ağır metallerin kemikli balıklarda ATPaz inhibisyonu sonucu osmoregülasyonda bozulmalara neden oldukları görülmüştür (Bianchini ve Wood, 2003; Bianchini ve ark., 2005; Garcia-Santos ve ark., 2006).

ATPazlar gibi osmoregülatör enzimler üzerinde ağır metallerin inhibitör etkileri sucul organizmalarda yararlı belirteçler olarak kullanılabilir (Blanchard ve Grosell, 2006). Bu proje ile balık (*Oreochromis niloticus*) osmoregülasyon sisteminde çok önemli yer tutan solungaç ve bağırsak dokularında ve metal birikiminin gözlemlendiği kas dokusunda metallerin tek başına ve farklı Ca^{+2} derişimine sahip sulardaki etkilerine ATPaz enzim aktivitelerinin cevabı ve buna bağlı olarak bir “erken uyarı sistemi” olarak kullanılabilme potansiyeli belirlenecektir.

1.1. Kadmiyum

Cd^{+2} geniş yayılıma sahip, artan antropojenik aktiviteler ile giderek toksik hale gelen ve esansiyel olmayan bir metaldir (Atli ve Canlı, 2011). Bununla birlikte tatlı su balıklarında büyük oranda ekolojik ve fizyolojik etkileri olan bir kirleticidir (WHO, 1992). Sucul hayvanlar Cd^{+2} 'nin sub - akut düzeylerine maruz kaldıklarında hematolojik etkiler, Ca^{+2} dengesinde bozukluk, böbrek, solungaç ve bağırsak dokularında histolojik ve morfolojik değişiklikler, osmoregülasyon kapasitesinin değişiminde ve ekstraselüler sıvı iyon konsantrasyonunda dengesizlik gözlemlenmektedir.

Cd^{+2} hem balıklarda hem de memelilerde Ca^{+2} homeostazisini bozucu etki yapar (Giles, 1984; Verbost ve ark., 1989). Su yoluyla ve besinsel Cd^{+2} etkisine bırakılan hem tatlı su hem de tuzlu su balıklarında Cd^{+2} toksisitesi hipokalsemiye neden olmuştur (Pratap ve ark., 1989; Hwang ve Yang, 1997). Balıklarda, sudan

solungaçlar yolu ile alınan Cd^{+2} kan plazmasındaki taşıyıcı proteinlere bağlanır ve dolaşım yoluyla farklı dokulara dağılan Cd^{+2} 'nin doku hasarlarına, omurga rahatsızlıklarına, solunum değişimine ve ölüme neden olduğu belirtilmiştir (De Smet ve Blust, 2001). Canlılar için eser düzeyde bile gerekli olmayan Cd^{+2} , yüksek kompleks oluşturma yeteneğinden dolayı hücre membranlarına hemen bağlanmakta ve Ca^{+2} , Mg^{+2} gibi fizyolojik elementlerin benzer kimyasal özelliklerini kullanarak hücreye girmektedir (Gagnon ve ark., 1998).

Ca^{+2} ve Cd^{+2} solungaçlarda aynı taşınım yollarını paylaşırlar (Verbost ve ark.; 1989; Playle ve ark., 1993; Niyogi ve Wood, 2006) ve sonuç olarak su yoluyla alınan Ca^{+2} 'deki bir yükseliş Cd^{+2} alınımını düşürür (Hollis ve ark., 2000) ve birçok balık türünde Cd^{+2} toksisitesini azaltır (Pratap ve ark., 1989; Pratap ve Wendelaar Bonga, 1993; Diaz ve ark., 1998).

1.2. Kalsiyum

Ca^{+2} balık türlerinin ekolojisinde çok önemli bir faktördür. Tatlı sularda yüksek düzeydeki Ca^{+2} 'nin suyun kalitesinde ve bitki ile hayvanlarda verimliliğinin artmasında çok önemli bir iyon olduğu belirtilmiştir (Berntssen ve ark., 2003). Yapısal olarak hem iskelet dokularında (kemik, diş ve pul) hem de yumuşak dokularda (membran akıcılığı, bütünlüğü ve hücre adhezyonu) önemli işlevi bulunmaktadır. Tatlı su balıklarında solungaçlar, bağırsak ve böbrekler iç ve dış ortam arasında Ca^{+2} değişiminde çok önemli organlardır (Hwang ve Yang, 1997). Ca^{+2} solungaçların apikal membranlarında Ca^{+2} kanallarıyla alınmakta ve basolateral plazma membranlarında Ca^{+2} -ATPazlarla kanın içerisine taşınmaktadırlar (Verbost ve ark., 1989; Baldisserotto ve ark., 2004a).

Çoğunlukla solungaçlar yoluyla alınan Ca^{+2} yavru balıklarda büyüme için yaşamsal öneme sahiptir (Flik ve ark., 1993; Reader ve ark., 1988). Su yoluyla alınan ağır metaller gibi birçok zehirli madde Ca^{+2} transportu gibi bir veya birden fazla fizyolojik mekanizma ile birincil toksik etkilerini solungaç epitelyumları üzerinde göstermektedir (Playle ve ark., 1992; Viarengo, 1994). Daha önceki çalışmalar Cd^{+2} 'nin öncelikle ve en çok Ca^{+2} homeostazisine zarar verdiğini gösterirken,

Cu^{+2} 'nin balıklarda Na^+ dengesi üzerine negatif etkisi olduğunu ve Ca^{+2} dengesini çok az etkilediğini göstermektedir (Varanasi ve ark., 1978; Verbost ve ark., 1987; Reid ve McDonald, 1988).

Tatlı su balıklarında akut toksisiteyi ve Cd^{+2} alınımını önlemenin sudaki Mg^{+2} iyonundan çok Ca^{+2} derişimi ile ilgili olduğu ve Ca^{+2} 'nin sert suyun koruyucu etkisinde başlıca katyon olduğu gösterilmiştir (Carrol ve ark., 1979; McDonald ve ark., 1988; Part ve ark., 1985). Ca^{+2} 'nin bu koruyucu etkisi solungaç geçirgenliğindeki değişimler veya solungaçtaki bağlayıcı alanlar için Ca^{+2} ve Cd^{+2} arasındaki yarış ile ilgili olabilmektedir (McDonald ve ark., 1980; Part ve ark., 1985; Meyer 1999).

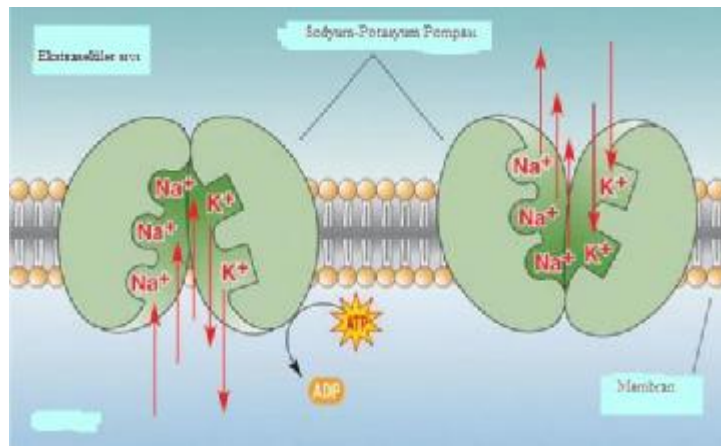
Su sertliği tatlı su balıklarındaki akut Cd^{+2} toksisitesinin yanı sıra kronik Cd^{+2} toksisitesinde de koruyucu etkiye sahiptir (Part ve ark., 1985). Su sertliğinin gökkuşağı alabalığında Cd^{+2} alınımı ve toksisitesine karşı azaltıcı bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (McDonald ve ark., 1980; Pagenkoph, 1983; Part ve ark., 1985; Pascoe ve ark., 1986; Hollis ve ark., 1999, 2000; Richards ve Playle, 1999).

Su sertliği başka bir deyişle (CaCO_3 'e karşılık gelen Ca^{+2} ve Mg^{+2} konsantrasyonlarının toplamı Wetzel, 1983) arttıkça akut Cd^{+2} toksisitesi azalır (Carrol ve ark., 1979; Pascoe ve ark., 1986; Davies ve ark., 1993). Temel sertlik katyonu Ca^{+2} solungaç yüzeylerindeki Cd^{+2} bağlayan alanlarla yarışarak solungaç geçirgenliğini değiştirmekte ve toksisiteyi azaltmaktadır (McDonald ve ark., 1980; Pagenkopf, 1983; Hunn, 1985; Part ve ark., 1985; Hollis ve ark., 1997).

1.3. Adenozin Trifosfataz (ATPaz) Enzimleri

ATPazlar membrana bağlı enzimler olup biyolojik membranlar aracılığıyla iyon transferinde, osmotik basıncı ve membran geçirgenliğini düzenlemede görevlidir (Sancho ve ark., 2003). Metaller, moleküler yapı ve enzimlerin fonksiyonel gruplarının etkinliğine bağlı olarak enzim sistemlerine bağlanabilmektedir. Enzim molekülü üzerindeki aktif bölgelere metallerin bağlanması, enzim aktivitelerinde inhibisyon veya uyarılma ile sonuçlanmaktadır (Watson ve Beamish, 1981).

Solungaç epitelyal hücrelerinin basolateral membranında bulunan Na^+/K^+ -ATPaz, elektrolitlerin solungaçlardan aktif olarak geçişinden sorumludur. Mg^{+2} -ATPaz oksidatif fosforilasyon ve iyon transferinde önemli rol oynar ve Mg^{+2} iyonlarının transepitel regülasyonunda görev almaktadır (Parvez ve ark., 2006). Mg^{+2} , Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi için gerekli olmasına rağmen bu iyonun yüksek konsantrasyonları enzim aktivitesini inhibe etmektedir (Wheeler ve Whittam, 1962; Dunham ve Glynn, 1961; Bond ve Hudgins, 1979).



Şekil 1.1. Na^+/K^+ -ATPaz enziminin yapısı

Ca^{+2} -ATPaz ise önemli bir diğer ATPaz olup düşük Ca^{+2} düzeyini korumak için Ca^{+2} iyonlarını stoplazmadan uzaklaştırmada görev almaktadır (Watson ve Beamish, 1981). Ouabaine duyarlı Na^+/K^+ -ATPaz ve ouabaine duyarlı olmayan Mg^{+2} -ATPaz hayvan hücrelerinin nöronlar dahil birçok bölgesinde özellikle sinaptik plazma mebranlarında bol miktarda bulunan zar enzimleridir. Na^+/K^+ -ATPaz'ın fonksiyonu membranlardan geçen Na^+ ve K^+ yoğunluğunu dengelemek iken, Mg^{+2} -ATPaz pürin nükleotidlerinin ekstraselüler metabolizması ile ilişkilidir. Bu enzimler ATP'den hidrolizlenen kimyasal enerjiyi elektrokimyasal iyon yoğunluğundan kaynaklı potansiyel enerjiye dönüştürür. Bunun yanında Mg^{+2} -ATPaz aktivitesinin mekanizması hakkında çalışmalar ve veriler çok yetersizdir.

Metal toksisitenin ana mekanizması solungaç ve böbrek gibi osmoregülatör dokularda Na^+/K^+ -ATPaz inhibisyonuyla birlikte osmoregülasyonda gerçekleşen bozulmadır (McGeer ve Wood, 1998). Genellikle balık dokularında ATPaz

aktivitelerinin inhibisyonu, bazı enzim aktivitelerinde artış olmasına rağmen özellikle kronik metal etkilerinden sonra gözlemlenmiştir. Bu durum ise olası adaptasyon mekanizmalarından kaynaklanabilmektedir (Atlı ve Canlı, 2007). ATPaz'ların çevresel kirleticiler tarafından osmoregülatör hasardan önce gerçekleşen inhibisyonu, ATPaz'ların iyonik ve osmoregülatör sistemlerdeki bozuklukların erken uyarılmasındaki kullanımlarını işaret etmektedir (Stagg ve ark., 1992, Sancho ve ark., 2003).

Bu çalışmada; 15, 30 ve 60 mg/L derişimindeki Ca^{+2} ve 20 μM ile 10 μM derişimindeki Cd^{+2} 'nin tek ve birlikteki etkilerine bırakılan tatlı su balığı *O. niloticus*'un solungaç, bağırsak ve kas dokusunda $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz, Mg^{+2} -ATPaz ve Ca^{+2} -ATPaz aktivitelerinin akut (48 saat) ve kronik (14 gün) süreçler sonucunda verdiği tepkilerin ölçülmesi amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Shephard ve Simkiss (1978), tatlısu balığı *Rutilus rutilus*'un solungaç Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi ile ilgili çalışmalarında enzimin 2 mM Ca^{+2} ve Mg^{+2} etkisinde en yüksek düzeyde aktivite gösterdiğini; Na^{+} , K^{+} veya ouabain tarafından ise etkilenmediğini göstermişlerdir. Ayrıca araştırmacılar 10 μM derişiminin altındaki Cu^{+2} , Pb^{+2} , Zn^{+2} ve Hg^{+2} 'nin in vitro etkilerinde enzimin inhibe olduğunu, 0,2 μM altındaki in vivo Cu^{+2} etkisinde ise solungaç Ca^{+2} -ATPaz enzim aktivitesinin artış gösterdiğini kaydetmişlerdir.

Shephard (1980), farklı sulara adapte edilmiş *Cyprinus carpio* solungacında plazma Ca^{+2} derişimini ve Ca^{+2} -ATPaz aktivitesini belirlemiştir. Bu balıklarda plazma Ca^{+2} derişiminin sudaki kalsiyum derişiminden yüksek olmasının Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi ve suyun Ca^{+2} derişimi ile doğrudan bağlantılı olduğunu belirtmişlerdir.

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

Wright ve ark. (1985), Cd^{+2} 'nin etkisine bırakılan *Morone saxatilis*'de düşük Ca^{+2} düzeyine sahip ortamlarda mortalite gözlenirken, yüksek Ca^{+2} derişimlerinde ise mortalite gözlenmemiştir. Bunun sonucu olarak toksisitenin azaltılmasında, Ca^{+2} 'nin doğrudan biyolojik bir fonksiyonunun olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Pratap ve ark. (1993), tatlı su balığı *Oreochromis mossambicus*'un solungaç dokularında normal ve yüksek Ca^{+2} derişimli sularda 35 gün süreyle Cd^{+2} etkisini çalışmışlardır. Balıklar su ve besin yoluyla Cd^{+2} etkisine bırakılmış ve solungaç $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz aktivitesindeki değişimler belirlenmiştir. Yüksek Ca^{+2} derişiminin su yoluyla alınan Cd^{+2} düzeyini azalttığını fakat besinsel Cd^{+2} alınımı üzerine olumlu

bir etkisi olmadığını gözlemlemişlerdir. Bunun yanında klorit hücrelerinin sayısının artmaması ile birlikte iyon değişim kapasitesinin azaldığı gözlemlenmiştir.

Lemairegony ve Mayergostan (1994), tuzlu ve tatlı suya adapte olabilen bir yılan balığı türü *Anguilla anguilla*'nın solungaç dokularında *in vitro* Cd^{+2} etkisinde Na^{+}/K^{+} -ATPaz ve Mg^{+2} -ATPaz aktivitelerini ölçmüşlerdir. Bazal Mg^{+2} -ATPaz aktivitesi tuzlu suda %40, tatlı suda ise %25 azalmıştır. Na^{+} - K^{+} ATPaz aktivitesi K^{+} sitümlasyonu veya ouabain inhibisyonu ile belirlenmiştir. Buna göre enzim aktivitesinin doza bağlı Cd^{+2} etkisi ile inhibe olduğunu belirtmişlerdir.

Lionetto ve ark. (1998), bir yılan balığı türü olan *A. anguilla*'nın solungaç ve bağırsak dokularında Na^{+}/K^{+} -ATPaz aktivitesi üzerine Cd^{+2} etkisini *in-vitro* olarak analiz etmişlerdir. Cd^{+2} 'nin artan derişimlerinde (0.5-50 μM) 1 saat inkübasyondan sonra bağırsak ve solungaç enzim aktivitesindeki en yüksek inhibisyonun sırasıyla 5 μM ve 50 μM Cd^{+2} derişimlerinde görüldüğünü belirtmişlerdir. Sonuç olarak Na^{+}/K^{+} -ATPaz aktivitesinin Cd^{+2} tarafından inhibe edilmesinin asit-baz dengesini değiştirdiğini ve dolayısıyla osmoregülasyonu bozduğunu bildirmişlerdir.

De la Torre ve ark. (2000), bir sazan türü olan *C. carpio*'yu 1.6 mg Cd^{+2}/L 'nin 14 günlük etkisine bırakmalarının ardından balıkları Cd^{+2} içermeyen suda 19 gün süreyle bekletmişlerdir. Na^{+}/K^{+} -ATPaz aktivitesinin etki sonunda %30 düzeyinde azalırken, Mg^{+2} -ATPaz aktivitesi %70 artış göstermiştir. Subletal Cd^{+2} etkisinin sazanda osmotik ve iyonik dengeyi sağlayan solungaç enzimlerini önemli ölçüde değiştirerek strese neden olduğu bildirilmiştir.

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

McGeer ve ark. (2000), *Oncorhynchus mykiss*'i Cd^{+2} (3 mg/L), Cu^{+2} (75 mg/L) ve Zn^{+2} 'nin (250 mg/L) 100 günlük etkisine bırakmışlardır. Deney sonunda metallerin iyon dengesi ve Na^{+}/K^{+} -ATPaz aktivitesine olan etkilerini incelemişlerdir.

Solungaç Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinin Cu^{+2} etkisinde artış gösterdiğini ve tüm vücuttaki Na^+ ve Ca^{+2} düzeylerinin 2 gün içerisinde bozulduğunu gözlemişlerdir. Cd^{+2} etkisinde Ca^{+2} kaybının daha uzun süreli olduğu ve fizyolojik tepkilerin Cu^{+2} etkisinde metabolik gereksinimle ilişkili mekanizmaları içerdiği belirtilirken, kronik Cd^{+2} etkisinin ise uzun süreli metabolik gereksinimle ilişkili olmadığı gösterilmiştir.

Zohouri ve ark. (2001), gökkuşağı alabalığı *O. mykiss*'te su yoluyla alınan Cd^{+2} 'nin (0.05-2.56 $\mu\text{g/L}$) ve besin yoluyla alınan Ca^{+2} 'nin (52.8 mg/Ca/g) tek başlarına ve birlikteki etkilerini 40 gün süreyle incelemişlerdir. Cd^{+2} 'nin solungaçlar yoluyla sudan Ca^{+2} alınımını inhibe ettiğini ve 35. günde hipokalsemiye neden olduğunu bildirmişlerdir. Besinle alınan Ca^{+2} 'nin ise solungaç, böbrek ve karaciğerde Cd^{+2} birikimine karşı koruyucu olduğunu fakat büyümenin hiçbir grupta etkilenmediğini belirtmişlerdir.

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

Grosell ve ark. (2004), 12.8 ve 55.2 μM Cu^{+2} 'nin 30 günlük etkisi sonrasında deniz balığı *Opsanus beta*'da metal birikimi ve Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesini incelemişlerdir. Araştırmacılar, solungaç ve böbrek dokusundaki Cu^{+2} birikimine karşın Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinde inhibisyon gözlememişlerdir.

Garcia-Santos ve ark. (2006), *O. niloticus*'u 5 ve 25 mg Cd^{+2}/L etkisine 24, 48 ve 96 saat süreyle bırakmışlardır. Deney sonunda plazma Na^+ düzeyi değişiklik göstermezken, Ca^{+2} düzeyi uygulanan doza bağlı olmaksızın azalmış ve solungaç Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi ise değişiklik göstermemiştir.

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

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

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

Christopher ve ark. (2009), *O. mykiss*'i 21 ve 11 mg/L CaCO_3 içeren sırasıyla yumuşak ve çok yumuşak suya adapte etmişler ve 96 saat süreyle Cd^{+2} ve Zn^{+2} karışımının etkisine bırakmışlardır. Sertlik derecesi daha yüksek olan suya adapte edilen balıkların düşük olanlara göre daha dirençli olduklarını gözlemlemişlerdir. Çok yumuşak suya adapte edilen balıkların homeostasisi devam ettirebilmek için iyon regülasyonunu inhibe eden Cd^{+2} ve Zn^{+2} gibi metallere karşı daha duyarlı olduklarını belirtmişlerdir.

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

Mansouri ve Baramaki (2011), farklı sertlik düzeyine (0,118, 0,154 ve 0,180 mg/L) sahip sulara adapte edilen *C. fusca*'da akut Hg^{+2} toksisitesini incelemişler ve artan su sertliği ile Hg^{+2} toksisitesinin azaldığını belirtmişlerdir.

Mansouri ve Baramaki (2011), *C. fusca*'yı farklı sertlik derecelerine (50, 150, 275 mg/L CaCO_3) sahip sulara Hg^{+2} 'nin farklı derişimlerinin (0.5-1mg/L) akut süreli (96 saat) etkisine bırakmışlardır. Su sertliği arttıkça Hg^{+2} toksisitesinde azalma gözlemlemişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

3.1.1.1. Metaller

Kadmiyum klorür monohidrat ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Merck)

3.1.1.2. ATPaz Aktivite Ölçümünde Kullanılan Kimyasallar

Trizma-Base (Tris [hidroksimetil] aminometan); $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$, Sigma)

Sukroz (α -D-Glukopiranozil β -D-fruktofuranosid; $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$, Sigma)

EDTA (Etilendiamintetraasetikası, Merck)

Sodyum klorür (NaCl , Merck)

Potasyum klorür (KCl , Merck)

Magnezyum klorür ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Merck)

Kalsiyum klorür (CaCl_2 , Merck)

EGTA [Etilen glikol-bis (2-aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetra asetikası, Sigma]

Polioksietilen 10 Lauril eter (Sigma)

Amonyum molibdat $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$, Merck]

Sülfirik asit (H_2SO_4 % 98, Merck)

Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4 , Merck)

Disodyum Adenozin trifosfat (Na_2ATP , Sigma)

Ouabain ($\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{O}_{12}$, Sigma)

3.1.1.3. Protein Analizinde Kullanılan Kimyasallar

Sodyum karbonat (Na_2CO_3 , Fluka)

Sodyum hidroksit (NaOH , Merck)

Potasyum sodyum tartarat tetrahidrat ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Merck)

Bakır(II) sulfat penta hidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Merck)

Folin Ciocalteu Fenol Ayırıcı (Sigma)

Bovin Albumin %35 (Sigma)

3.1.2. Kullanılan Aletler

Spektrofotometre: Shimadzu UV-1800

Derin dondurucu (-80°C): Revco Ultima II

Hassas Terazî: Sartorius Analytic ATL-224-I

Santrifüj: Sigma 2-16 K

Homojenizatör: Janke&Kunkel Ultra Turrax T25

Su Banyosu: Wise Bath WSB-30

pH metre: Hanna HI 8314 membran pH metre

Manyetik Karıştırıcı: Janke&Kunkel IKAMAG RH

Karıştırıcı: Vortex S0 200

Çoklu ölçüm cihazı: ThermoOrionstar 5

3.2. Yöntem

Deneylerde Ç.Ü. Su Ürünleri Fakültesi balık yetiştirme havuzlarından alınan tatlı su balığı *O. niloticus* kullanılmıştır. Balıklar sıcaklığın $20 \pm 1^\circ\text{C}$ olduğu ve 12 saat aydınlatma periyodunun uygulandığı laboratuvar ortamında $40 \times 40 \times 100$ cm ölçülerindeki 120 L çeşme suyu içeren akvaryumlarda yeni koşullara adapte olmaya bırakılmıştır. Akvaryum sularının fizikokimyasal özellikleri Çizelge 3.1.'de gösterilmiştir.

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

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

Balıklara günde bir defa olmak üzere ağırlıklarının %2-3'ü kadar hazır Pınar Sazan yavru yemi verilmiştir. Kullanılan balık yemindeki mikro elementlerin miktarları sırasıyla 70 mg Zn⁺²/kg, 25 mg Mn⁺²/kg, 25 mg Mg⁺²/kg, 2 mg Fe⁺²/kg, 0.7 mg I⁻/kg, 1 mg Cu⁺²/kg, 0.2 mg Co⁺³/kg, 0.03 mg Se⁻/kg; makro elementlerin miktarları ise en az %2-en çok %2,5 Ca⁺², en az %0,2-en çok %1 Na⁺, en az %1 P⁺ ve yem içeriğindeki ham protein ise en az %40'tır. Deney sırasında akvaryumlardaki sert ve yumuşak su ortamının kalitesini belirlemek amacıyla çoklu ölçüm cihazıyla (Thermo Orionstar 5) ölçümler yapılmıştır. Deneylerde Pınar Gökçe ağaç marka hazır su (15 mg Ca⁺²/L) kullanılmıştır ve ayrıca bu hazır su üzerine belirli miktarlarda CaCl₂ eklenerek farklı sertlik değerlerine (30 ve 60 mg Ca⁺²/L) sahip sular hazırlanmıştır.

Deney aşamasında balıklar 8 adet olacak şekilde 33x33x40 cm boyutlarındaki akvaryumlarda 15, 30 ve 60 mg Ca⁺²/L ve ayrıca bu derişimlerdeki Ca⁺² ile 10 ve 20 mM derişimlerindeki Cd⁺²'nin birlikteki etkisine akut (20 mM-48 saat) ve kronik (10 mM-14 gün) süreyle bırakılmıştır. Deney sırasında akvaryumların cam yüzeylerine tutunma, akvaryum suyunun buharlaşması gibi nedenlerle akvaryumlardaki metal derişimleri değışiceğinden akvaryum suları 2 günde bir taze hazırlanan çözeltilerden yapılan uygun seyreltmelerle değıştirilmiştir. Metallerin balık yemine yapışmasını önlemek amacıyla su değışiminden 1 saat önce yem verilmiştir. İn vitro olarak ise, *O. niloticus*'un

solungaç, bağırsak ve kas dokusu homojenatlarında 15, 30, 60 ve 120 mg/L derişimlerdeki Ca^{+2} 'nin doğrudan etkisindeki ATPaz aktiviteleri ölçülmüştür.

3.2.1. Doku Homojenatlarının Hazırlanışı

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

3.2.2. ATPaz Enzim Aktivitelerinin Ölçümü

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

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

	Total-ATPaz (- Ouabain)	Mg⁺²-ATPaz (+ Ouabain)	Ca⁺²-ATPaz
Ouabain (mM)	-	1	-
NaCl (mM)	100	100	-
KCl (mM)	20	20	-
MgCl₂ (mM)	4	4	4
CaCl₂ (mM)	-	-	1
EGTA (mM)	-	-	1
Tris (mM)	40	40	40
ATP (mM)	3	3	3
pH	7.7	7.7	7.7
°C	37	37-40	37

Enzim aktivitelerinin saptanması için iki tekrarlı olmak üzere her tüpe son iyon derişimleri çizelgede verilen 870 µL inkübasyon ortamı ve 30 µL örnek konarak sıcak su banyosunda 37 °C'de 5 dk inkübe edildikten sonra tüplerin üzerlerine 100 µL 3 mM Na₂ATP konmasıyla reaksiyon başlatılmıştır. Reaksiyon, 30 dk inkübasyon süresinin ardından su banyosundan alınıp tüplere konan 500 µL soğuk saf su (+4 °C) ile sonlandırılmıştır. Tüm bileşenler dışında ATP içermeyen tüpler ATP körü, sadece örnek içermeyen tüpler ise Örnek körü olarak kullanılmıştır. Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesi, Total-ATPaz (ouabain içermeyen) aktivitesinden Mg⁺²-ATPaz (ouabain içeren) aktivitesinin çıkarılması ile hesaplanmıştır. Ca⁺²-ATPaz aktivitesi ise CaCl₂ varlığında ve yokluğunda ölçülen enzim aktiviteleri arasındaki farka dayanarak hesaplanmıştır. Enzim aktiviteleri, µmol Pi/mg prot./sa. cinsinden verilmiştir.

3.2.3. İnorganik Fosfat Tayini

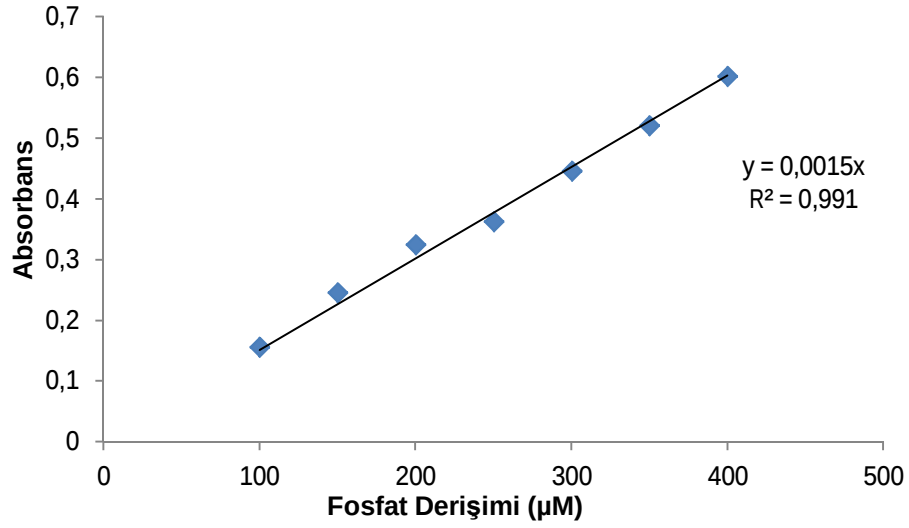
Prensip: İnorganik fosfat tayini, ATP'den açığa çıkan inorganik fosfatın (Pi) Polioksietilen 10 Lauril eter ile fosfomolibdatın oluşturduğu sarı renkli bileşiğin absorbansının 390 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır. (Atkinson ve ark., 1973).

Ayıraçlar:

1. % 5 Polioksietilen 10 Lauril eter: 5 g Polioksietilen eter tartılarak saf su ile çözülmüş ve 100 ml'ye tamamlanmıştır. Kullanılmadan önce oluşan bulanıklığın giderilmesi için 37 °C'de 30-40 dk bekletilmiştir.
2. % 2 Molibdik asit: 2 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O tartılarak 1,8 M H₂SO₄ çözeltisinde çözülmüştür.
3. Ana ayıraç: 10 mL % 5 Polioksietilen eter, 25 mL % 2 Molibdik asit ve 65 mL saf su karıştırılarak hazırlanmıştır.

Deneyin Yapılışı:

1. 1,5 mL örnek üzerine 3 mL ana ayıraçtan konmuştur.
2. Oda sıcaklığında 10 dk kompleks oluşumu için bekletilmiştir.
3. Absorbans değerleri 390 nm'de ölçülmüştür.
4. Sonuçlar 100, 150, 200, 250, 300, 350 ve 400 µM KH₂PO₄ çözeltisinden hazırlanarak elde edilen standart eğri üzerinden değerlendirilmiştir (Şekil 3.1.)



Şekil 3.1. Fosfat derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki.

3.2.4. Total Protein Analizi

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

Prensip:

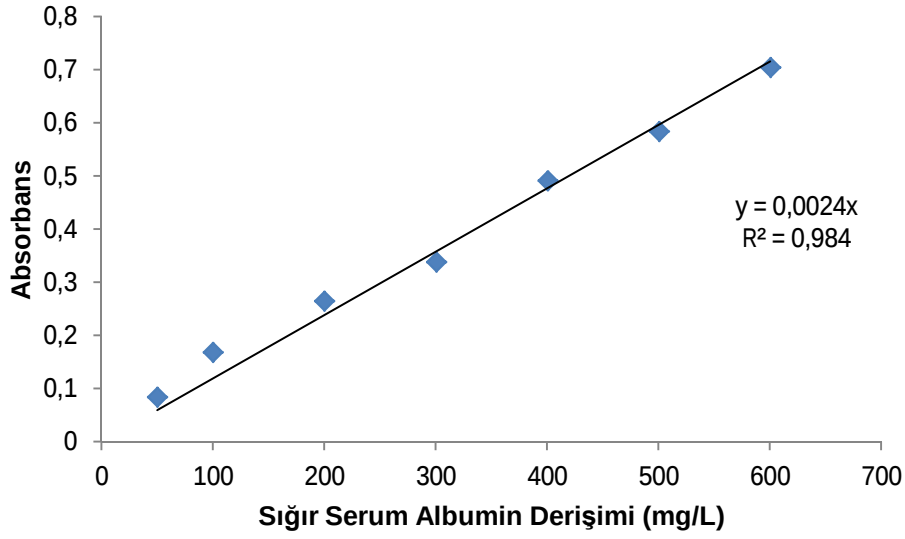
Proteinlerin alkali bakır sülfat ve fosfotungstik asit ile mavi renkli kompleks oluşturması temeline dayanır. Oluşan bu renkli bileşimin spektrofotometrede 750 nm dalga boyunda absorbansı ölçülerek nicel olarak protein miktarı belirlenir. Proteinlerin çoğunda tirozin veya triptofan veya her iki aminoasit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

Ayıraçlar:

1. Ayıraç A: %2 Na_2CO_3 (0,1 N NaOH içinde) 2 g Na_2CO_3 tartılarak 0,1 N NaOH içinde çözünmesi sağlanmıştır.
2. Ayıraç B₁: %1 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ tartılıp, 100 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır.
3. Ayıraç B₂: %2 Na-K-Tartarat. 2 g Na-K-Tartarat tartılıp 100 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır.
4. Ayıraç C: 50 hacim ayıraç A + $\frac{1}{2}$ hacim B₁ + $\frac{1}{2}$ hacim B₂ eşit oranda karıştırılarak tamamlanmıştır.
5. Folin-Ciocalteu Çözeltilisi: Kullanılırken 1'e 1,5 oranında saf su ile seyreltilmelidir.
6. Standart BovinAlbumin Çözeltilisi: 1 mL'de 1 mg (1000 mg/L) bovin albumin olacak şekilde stok bovin albumin çözeltisi hazırlanmıştır ve bundan yapılan uygun seyreltmelerle 50-100-200-300-400-500-600 mg/L olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmıştır.

Deneyin Yapılışı:

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



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

Buna göre 20 μM Cd^{+2} etkisinde 15 mg/L Ca^{+2} derişimindeki hazır suda kalan balıklardan 1 numaralı olan *O.niloticus*'un solungaç dokusunda 48 saat sonunda (akut) toplam protein düzeyi;

$$y = 0,0024x$$

$$\text{Absorbans: } y = 0,546$$

$$\text{Derişim (x)} = \frac{0,546}{0,0024}$$

$$\text{Derişim} = 0,227 \text{ mg prot./mL}$$

Doku homojenatı tamponla 10 mL 'ye seyreltildiği için

$$\text{Derişim} = 0,227 \times 10$$

$$\text{Derişim} = 2,27 \text{ mg prot./g yaş ağırlık (y.a)}$$

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

3.2.5. ATPaz Aktivitesinin Hesaplanması

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

$$= \mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$$

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

20 μM Cd^{+2} ile 15 mg/L Ca^{+2} etkisinde kalan balıklardan 1 nolu *O. niloticus*'un solungacında 48 saat sonunda Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi:

$$\text{Absorbans: } y = 0,075$$

$$\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPaz aktivitesi} = \frac{0,075/0,0015 \times 4,5 \text{ (mL)}}{1000 \times 0,03 \text{ (mL)} \times 0,5 \text{ (sa.)} \times 2,27 \text{ mg prot./mL}}$$

$$\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPaz aktivitesi} = 6,63 \mu\text{mol Pi/mg prot./sa}$$

3.2.6. İstatistik

Bu çalışmadaki istatistiksel analizler, SPSS yardımıyla “Regresyon Analizi” ve “One-way ANOVA” kullanılarak yapılmıştır. Kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel bir ayırım gözlemlendiğinde ($P < 0.05$), hangi grup veya grupların farklı olduğu post-hoc testlerinden Duncan-test kullanılarak belirlenmiştir. Grafik çizimleri ise Microsoft Excel programı kullanılarak çizilmiştir. Veriler aritmetik ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Akut (48 saat) Deneyler

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

4.1.1.1. Kontrol Grubu ATPaz Aktiviteleri

15 mg Ca^{+2}/L etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunda $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz ile Mg^{+2} -ATPaz aktiviteleri $9,97\pm3,30$ ve $18,2\pm1,63$, bağırsak dokusunda $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz ile Mg^{+2} -ATPaz aktiviteleri $15,1\pm1,01$ ve $21,7\pm1,92$, kas dokusunda Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi ise $15,6\pm1,12$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$ olarak ölçülmüştür. Bu değerlere göre yapılan karşılaştırma sonucunda 30 ve 60 mg Ca^{+2}/L etkisinde elde edilen veriler aşağıda belirtilmiştir.

30 mg Ca^{+2}/L etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunda $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz aktivitesi kontrole göre %120 ($21,57\pm2,06$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P<0,05$) (Şekil 4.1.), Mg^{+2} -ATPaz aktivitesi ise %4 ($18,9\pm3,02$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) artmıştır ($P>0,05$) (Şekil 4.2.). Aynı koşullarda bağırsak $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz aktivitesi kontrole göre %47 ($21,9\pm0,71$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P<0,05$) (Şekil 4.3.), Mg^{+2} -ATPaz aktivitesi ise %37 ($30,1\pm1,50$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) artmıştır ($P<0,05$) (Şekil 4.4.). Kas Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi de kontrole göre %59 ($37,8\pm4,15$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) artış göstermiştir ($P<0,05$) (Şekil 4.5.).

60 mg Ca^{+2}/L etkisinde kalan balıkların solungaç $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz aktivitesi kontrole göre %25 ($12,49\pm0,10$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) artarken ($P>0,05$) (Şekil 4.1.), Mg^{+2} -ATPaz aktivitesi %7 ($16,9\pm1,20$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) azalmıştır ($P>0,05$) (Şekil 4.2.). Aynı koşullarda bağırsak dokusunda $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz aktivitesi kontrole göre %100 ($29,8\pm1,60$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P<0,05$) (Şekil 4.3.), Mg^{+2} -ATPaz

aktivitesi ise %86 artmıştır ($40,9 \pm 2,34$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P < 0,05$) (Şekil 4.4.). Kas Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi de benzer şekilde kontrole göre %80 artmıştır ($28,9 \pm 1,01$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P < 0,05$) (Şekil 4.5.).

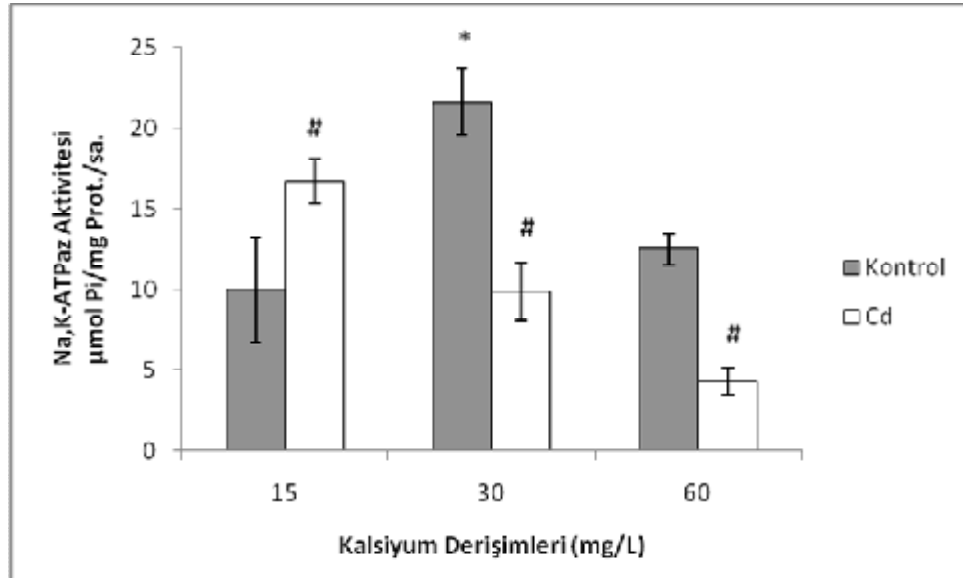
4.1.1.2. Kadmiyum Etkisinde ATPaz aktiviteleri

15 mg Ca^{+2} /L etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunda $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz aktivitesi Cd^{+2} etkisinde kontrole göre %70 ($16,6 \pm 1,36$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P < 0,05$) (Şekil 4.1., EK.1) artış göstermiştir, Mg^{+2} -ATPaz aktivitesi de %40 ($25,5 \pm 1,96$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) oranında artış göstermesine karşın istatistiksel bir fark gözlenmemiştir ($P > 0,05$) (Şekil 4.2., EK.2). Aynı koşullarda bağırsak dokusunda $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz aktivitesi Cd^{+2} etkisinde kontrole göre %80 ($26,5 \pm 2,61$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P < 0,05$) (Şekil 4.3.), Mg^{+2} -ATPaz aktivitesi ise %32 artmıştır ($28,7 \pm 1,58$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P < 0,05$) (Şekil 4.4.). Kas dokusunda Cd^{+2} etkisinde Ca^{+2} -ATPaz aktivitesinin kontrole göre %6 artışı anlamlı bulunmamıştır ($16,5 \pm 1,94$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P > 0,05$) (Şekil 4.5., EK.1).

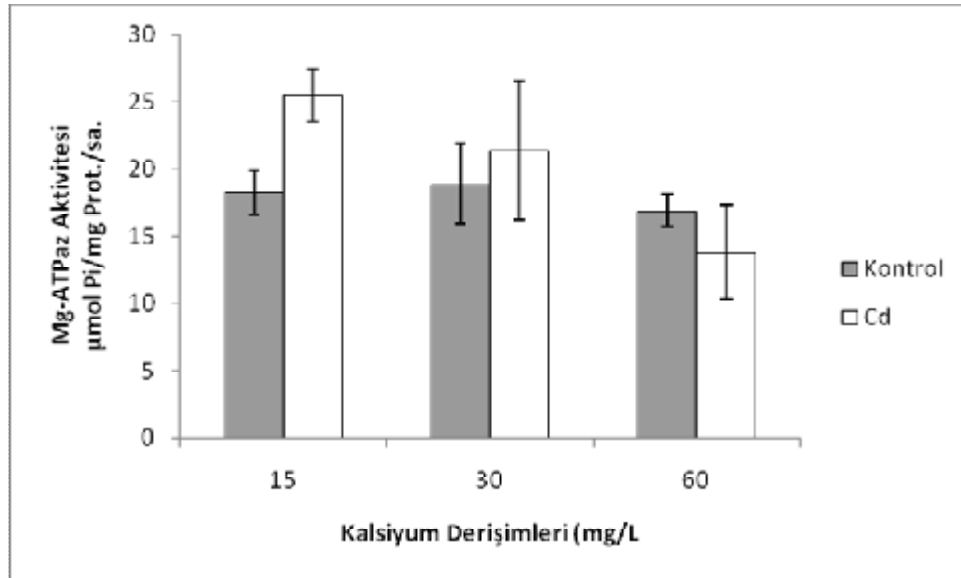
30 mg Ca^{+2} /L etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunda $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz aktivitesi Cd^{+2} etkisinde kontrole göre %54 azalırken ($9,8 \pm 1,77$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P < 0,05$) (Şekil 4.1., EK.1), Mg^{+2} -ATPaz aktivitesi %13 artmıştır ($21,4 \pm 5,15$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P > 0,05$) (Şekil 4.2., EK.2). Aynı koşullarda bağırsak dokusunda $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz aktivitesi Cd^{+2} etkisinde kontrole göre %27 ($27,9 \pm 4,4$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P < 0,05$) (Şekil 4.3., EK.1), Mg^{+2} -ATPaz aktivitesi ise %23 artmıştır ($36,9 \pm 2,35$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P < 0,05$) (Şekil 4.4., EK.2). Kas dokusunda Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi Cd^{+2} etkisindeki kontrole göre %91 azalmıştır ($3,5 \pm 3,18$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P < 0,05$) (Şekil 4.5., EK.1).

60 mg Ca^{+2} /L etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunda $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz aktivitesi Cd^{+2} etkisinde kontrole göre %66 ($4,3 \pm 0,81$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P < 0,05$) (Şekil 4.1., EK.1), Mg^{+2} -ATPaz aktivitesi %18 azalmıştır ($13,8 \pm 3,52$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P > 0,05$) (Şekil 4.2., EK.2). Aynı koşullarda bağırsak dokusunda $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz aktivitesi Cd^{+2} etkisinde kontrole göre %28 ($21,9 \pm 1,30$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) artarken ($P > 0,05$) (Şekil 4.3., EK.1), Mg^{+2} -ATPaz aktivitesi %8 azalmıştır

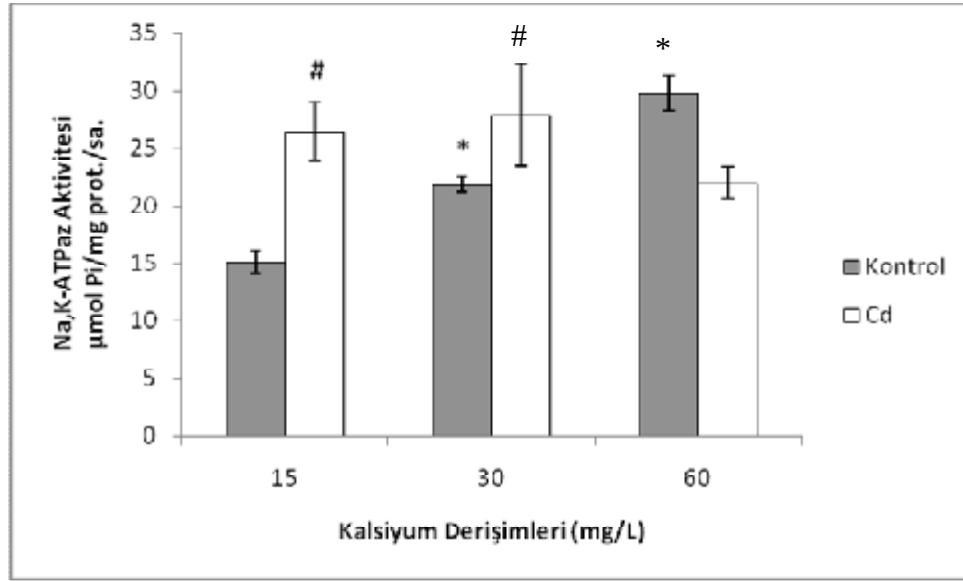
($37,7 \pm 2,27$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P > 0,05$) (Şekil 4.4., EK.2). Kas dokusunda Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi kontrole göre %59 azalmıştır ($11,5 \pm 0,85$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P < 0,05$) (Şekil 4.5., EK.1).



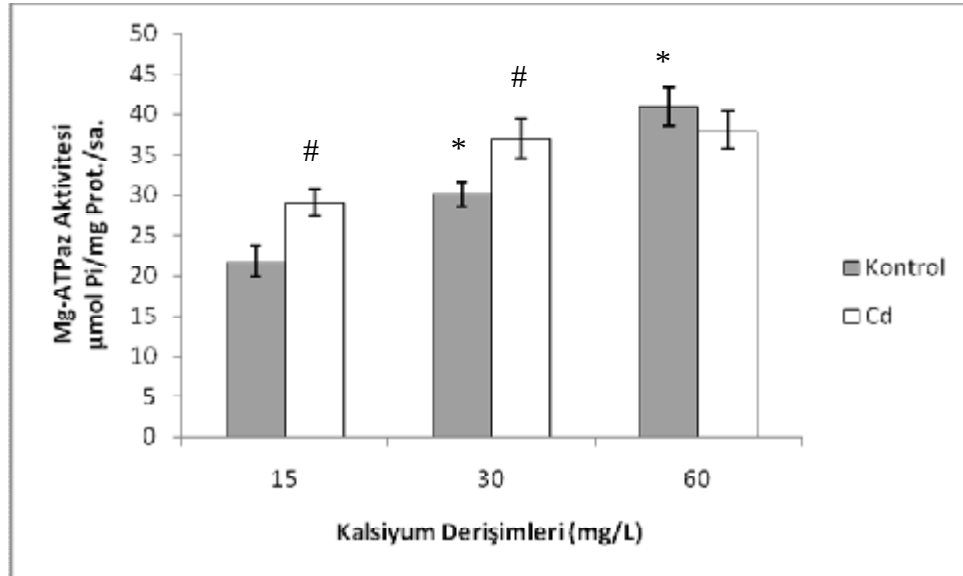
Şekil 4.1. Kadmiyumun farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un solungaç Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesine akut etkileri. (*: Kontrol- Ca^{+2} gruplarının 15 mg Ca^{+2}/L 'ye göre istatistiksel farklılıkları, #: $\text{Ca}^{+2}+\text{Cd}^{+2}$ etkisindeki grupların kendi kontrollerine göre istatistiksel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



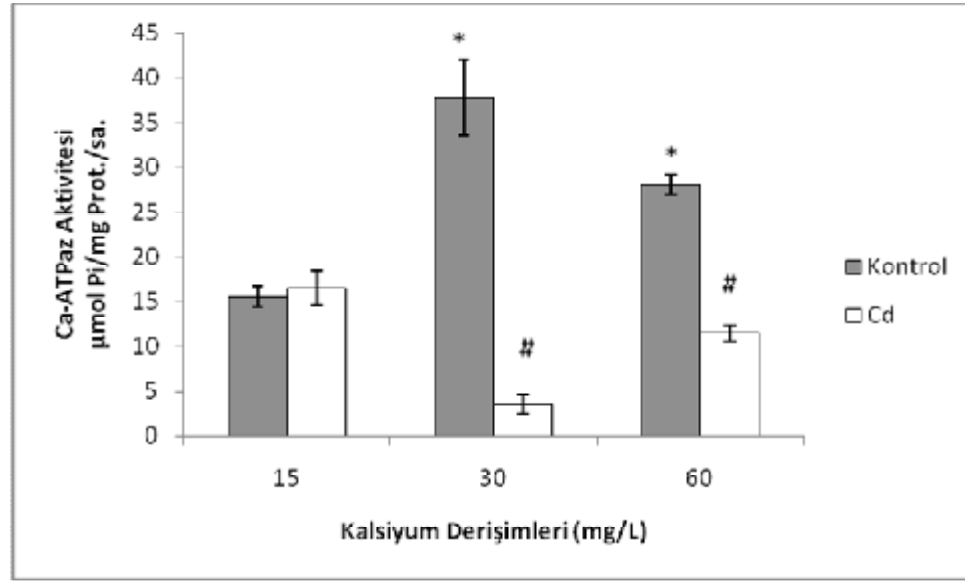
Şekil 4.2. Kadmiyumun farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un solungaç Mg^{+2} -ATPaz aktivitesine etkileri. Ayrıntılar Şekil 4.1.'de verildiği gibidir.



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



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



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

4.1.2. Kronik (14 gün) Deneyler

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

4.1.2.1. Kontrol Grubu Balıklarda ATPaz Aktiviteleri

15 mg Ca^{+2}/L etkisinde kalan balıkların solungaç $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz ile Mg^{+2} -ATPaz aktiviteleri sırasıyla $15,9\pm1,23$ ve $20,8\pm3,22$, bağırsak $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz ile Mg^{+2} -ATPaz aktiviteleri $7,81\pm1,31$ ve $7,85\pm1,18$, kas Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi ise $10,8\pm2,83$ µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçülmüştür. Bu değerlere göre yapılan karşılaştırma sonucunda 30 ve 60 mg Ca^{+2}/L etkisinde elde edilen veriler aşağıda belirtilmiştir.

30 mg Ca^{+2}/L etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunda $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz aktivitesi kontrole göre %31 ($10,95\pm0,95$ µmol Pi/mg prot./sa.) azalmıştır (($P<0,05$) (Şekil 4.6.)), Mg^{+2} -ATPaz aktivitesi ise %24 artmasına karşın istatistiksel olarak bir fark gözlenmemiştir ($25,8\pm2,50$ µmol Pi/mg prot./sa.) ($P>0,05$) (Şekil 4.7.). Aynı

koşullarda bağırsak dokusunda Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi kontrole göre %33 ($10,3 \pm 1,14$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P > 0,05$) (Şekil 4.8.). Mg^{+2} -ATPaz aktivitesi ise %93 artmıştır ($15,1 \pm 1,43$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P < 0,05$) (Şekil 4.9.). Kas dokusunda Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi kontrole göre %30 artmıştır ($14,2 \pm 4,30$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P > 0,05$) (Şekil 4.10.).

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

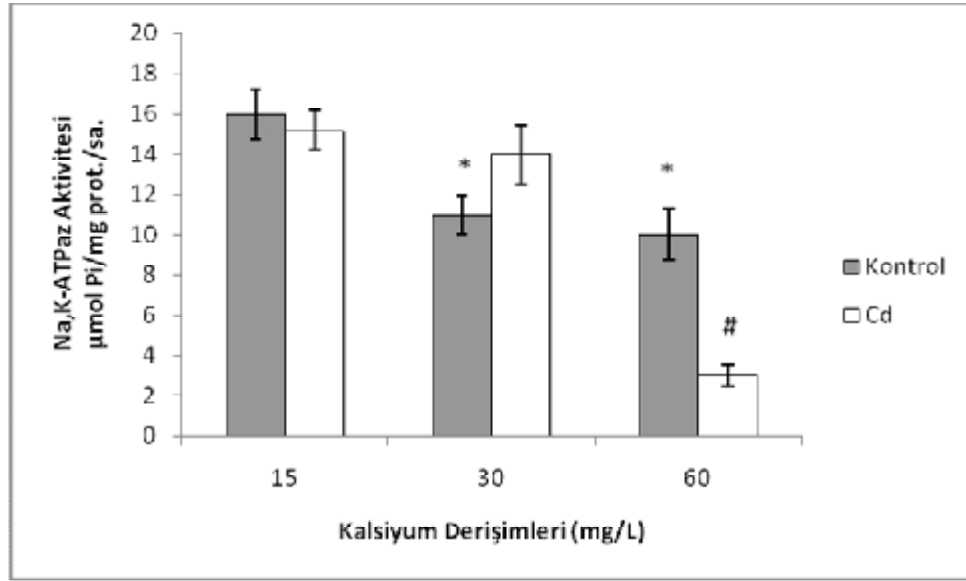
Kronik süreçte Ca^{+2} etkisinde kalan kontrol grubu balıkların solungaç ve bağırsak dokularında Na^+/K^+ -ATPaz ile Mg^{+2} -ATPaz ve kas dokusunda Ca^{+2} -ATPaz aktiviteleri, akut süreçteki kendi kontrollerine göre de karşılaştırılmıştır (EK.3-EK.4). Kronik 15 ve 60 mg Ca^{+2}/L etkisindeki balıkların solungaç Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinde akut süreçle karşılaştırıldığında değişiklik görülmezken, 30 mg Ca^{+2}/L etkisindeki balıkların solungaç Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi %50 ($11,0 \pm 0,95$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) azalmıştır ($P < 0,05$). Bağırsak Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi ise 15 mg Ca^{+2}/L etkisinde %48 ($7,81 \pm 1,31$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$), 30 mg Ca^{+2}/L etkisinde % 52 ($10,4 \pm 1,14$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ve 60 mg Ca^{+2}/L etkisinde %65 ($10,5 \pm 1,62$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) azalmıştır ($P < 0,05$). Çalışılan üç derişimde de solungaç Mg^{+2} -ATPaz aktivitesinde bir değişiklik görülmemesine karşın, bağırsak Mg^{+2} -ATPaz aktivitesi 15 mg Ca^{+2} etkisinde %64 ($7,85 \pm 1,18$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$), 30 mg Ca^{+2}/L etkisinde %50 ($15,1 \pm 1,43$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ve 60 mg Ca^{+2}/L etkisinde %72 ($11,5 \pm 1,65$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) azalmıştır ($P < 0,05$). 15 mg Ca^{+2}/L etkisinde kas Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi değişiklik göstermezken, 30 mg Ca^{+2}/L etkisinde %62 ($14,2 \pm 4,30$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) azalış ve 60 mg Ca^{+2}/L etkisinde %75 ($49,1 \pm 8,18$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) artış göstermiştir ($P < 0,05$).

4.1.2.2. Kadmiyum Etkisinde Kalan Balıklar

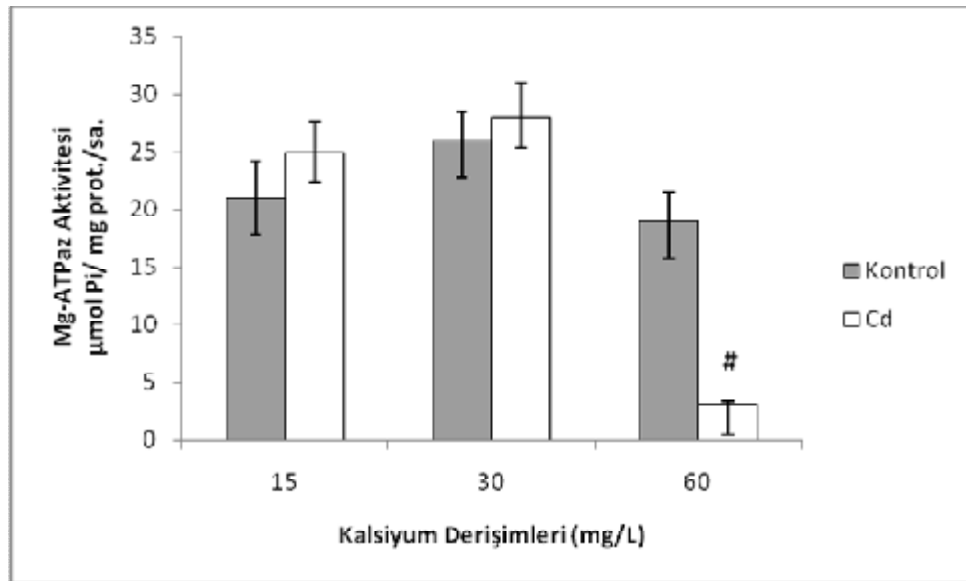
15 mg Ca^{+2}/L etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunda $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz aktivitesi Cd^{+2} etkisinde kontrole göre %4 azalmış ($15,2 \pm 0,98$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P > 0,05$) (Şekil 4.6.), Mg^{+2} -ATPaz aktivitesi ise %18 oranında artmıştır ($24,7 \pm 2,56$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P > 0,05$) (Şekil 4.7.). Aynı koşullarda bağırsak dokusunda $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz aktivitesi Cd^{+2} etkisinde kontrole göre %1 ($7,9 \pm 1,57$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P > 0,05$) (Şekil 4.8.), Mg^{+2} -ATPaz aktivitesi ise %23 artmıştır ($9,6 \pm 1,04$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P > 0,05$) (Şekil 4.9.). Kas dokusunda Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi Cd^{+2} etkisindeki kontrole göre %7 azalmıştır ($10,05 \pm 2,17$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P > 0,05$) (Şekil 4.10.).

30 mg Ca^{+2}/L etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunda $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz aktivitesi Cd^{+2} etkisinde kontrole göre %25 ($13,7 \pm 1,46$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P > 0,05$) (Şekil 4.6.), Mg^{+2} -ATPaz aktivitesi %6 artmıştır ($27,5 \pm 2,97$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P > 0,05$) (Şekil 4.7.). Aynı koşullarda bağırsak dokusunda $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz aktivitesi Cd^{+2} etkisinde kontrole göre %51 ($4,5 \pm 0,46$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P < 0,05$) (Şekil 4.8.), Mg^{+2} -ATPaz aktivitesi ise %54 azalmıştır ($6,9 \pm 0,90$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P < 0,05$) (Şekil 4.9.). Kas dokusunda Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi Cd^{+2} etkisindeki kontrole göre %30 artmıştır ($18,4 \pm 3,15$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P > 0,05$) (Şekil 4.10.).

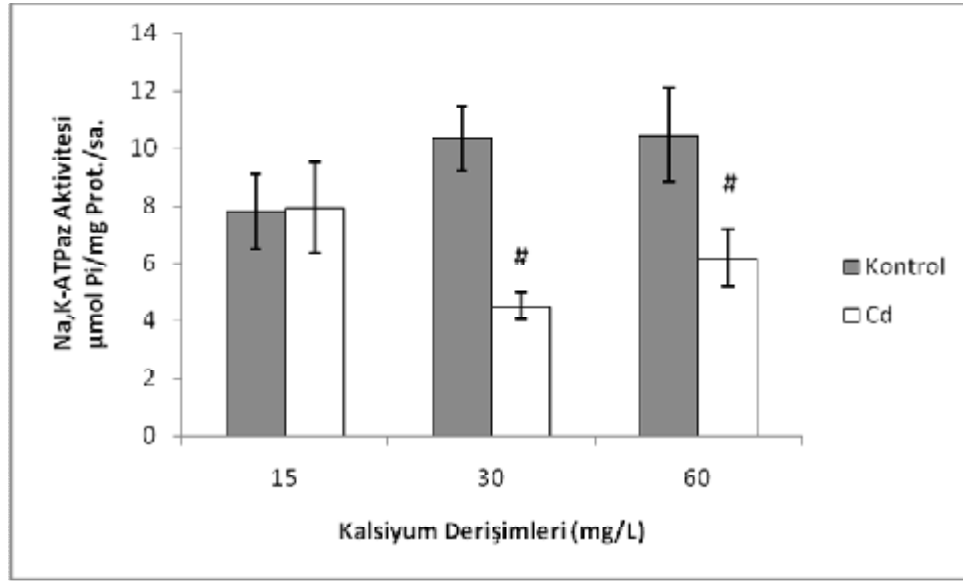
60 mg Ca^{+2}/L etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunda $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz aktivitesi Cd^{+2} etkisinde kontrole göre %70 ($3,02 \pm 0,53$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P < 0,05$) (Şekil 4.6.), Mg^{+2} -ATPaz aktivitesi ise %83 azalmıştır ($3,08 \pm 0,32$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P < 0,05$) (Şekil 4.7.). Aynı koşullarda bağırsak dokusunda $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz aktivitesi Cd^{+2} etkisinde kontrole göre %40 ($6,2 \pm 0,99$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P < 0,05$) (Şekil 4.8.), Mg^{+2} -ATPaz aktivitesi ise %12 azalmıştır ($10,11 \pm 1,29$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P > 0,05$) (Şekil 4.9.). Kas dokusunda Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi Cd^{+2} etkisindeki kontrole göre %45 azalmıştır ($26,6 \pm 2,86$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P < 0,05$) (Şekil 4.10.).



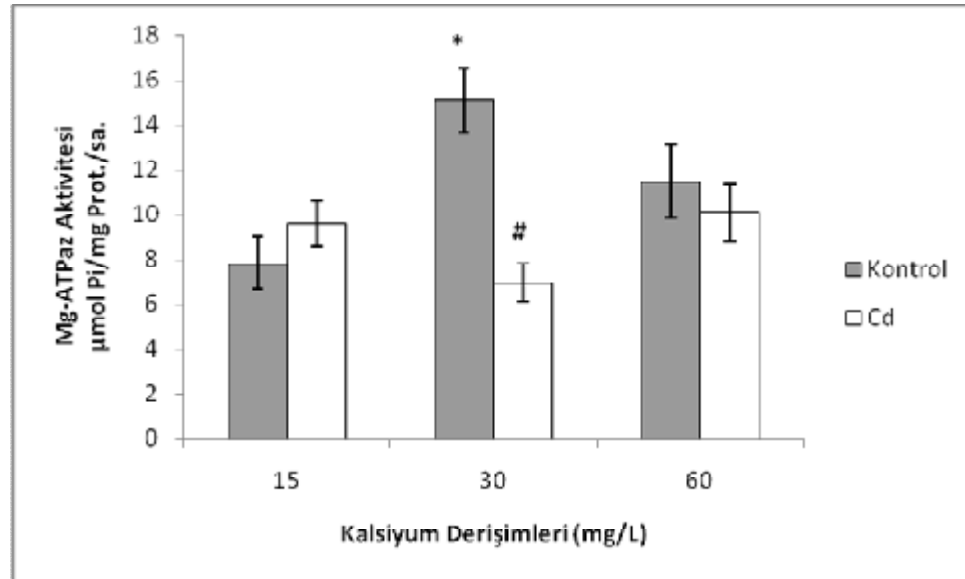
Şekil 4.6. Kadmiyumun farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un solungaç Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesine kronik etkileri. (*: Kontrol- Ca^{+2} gruplarının 15 mg Ca^{+2}/L 'ye göre istatistiksel farklılıkları, #: $\text{Ca}^{+2}+\text{Cd}^{+2}$ etkisindeki grupların kendi kontrollerine göre istatistiksel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



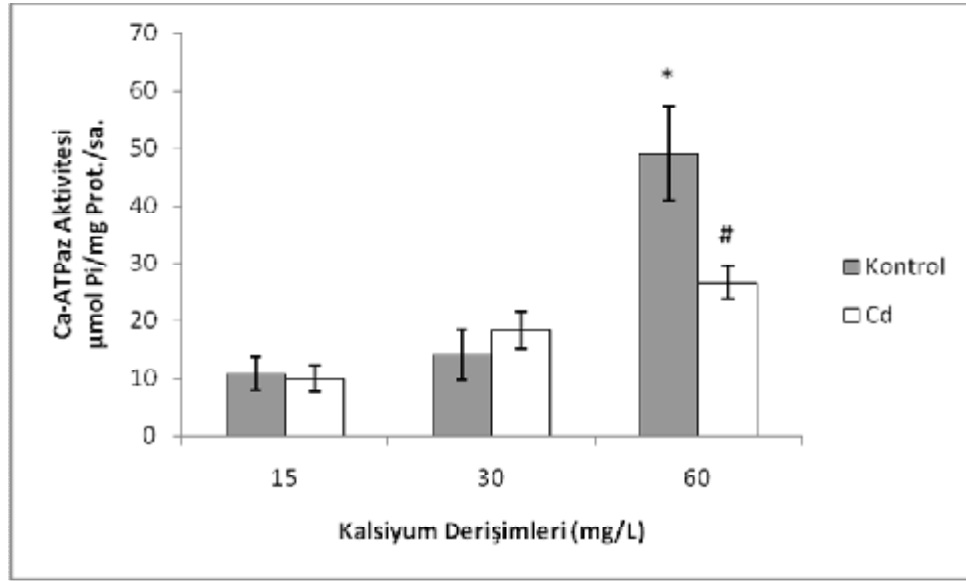
Şekil 4.7. Kadmiyumun farklı kalsiyum derişimlerinde *O. niloticus*'un solungaç Mg^{+2} -ATPaz aktivitesine etkileri. Ayrıntılar Şekil 4.6.'da verildiği gibidir.



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



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



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

4.1.3. İn vitro Ca^{+2} Etkisi

O. niloticus'un solungaç, bağırsak ve kas dokusu homojenatlarında 15, 30, 60 ve 120 mg/L derişimlerdeki Ca^{+2} 'nin ATPaz aktivitelerine doğrudan etkisi Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir. Ca^{+2} derişimi arttıkça bağırsak ve solungaç $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ ATPaz aktivitesi kontrole göre (15 mg Ca^{+2} /L) azalmış, Mg^{+2} -ATPaz aktivitesinde önemli bir değişiklik olmamıştır ($p>0,05$). Kas Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi ise en yüksek Ca^{+2} derişiminde tamamen inhibe olmuştur.

Çizelge 4.1. İn vitro Ca^{+2} etkisinde solungaç, bağırsak ve kas dokusu ATPaz aktiviteleri. (*: Kontrol- Ca^{+2} gruplarının 15 mg Ca^{+2}/L 'ye göre istatistiksel farklılıkları)

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

4.2. Tartışma

II. Dünya Savaşı'ndan sonra organik kimyadaki gelişmeler sonucunda plastik maddeler, deterjanlar, insektisit ve pestisitler ile ağır metaller gibi çeşitli yeni maddeler kullanıma girmiştir. Bunun sonucunda çevre kirliliği ilk defa kentsel yaşamın başlaması sonucu ortaya çıkmış ve endüstrinin gelişimine paralel olarak artış göstermiştir.

Sucul ortamları tehdit eden en önemli unsurlardan biri ağır metallerdir. Metallerin sucul ortamlara insan kaynaklı girişi endüstriyel ve tarımsal aktiviteler gibi farklı yollarla olabilmektedir. İnsan kaynaklı aktivitelerin birçok zararlı etkisi tatlı su balık türlerinde incelenmiştir (Shephard, 1980; Atlı ve Canlı, 2007a). Balıklar ağır metallerin letal ve subletal etkilerinin belirlenebilmesi için çevresel toksikolojide önemli test modelleridirler (Baldisserotto ve ark., 2004). Cu^{+2} , Zn^{+2} , Hg^{+2} ve Cd^{+2} sucul ortamlardan balıklara genellikle besin yoluyla geçmektedir (Verbost ve ark., 1988). Genellikle Zn^{+2} , Cu^{+2} ve Pb^{+2} gibi kimi metallerin üretiminde bir alt ürün olarak çevreye yayılan Cd^{+2} , çeşitli endüstri kollarında da giderek artan miktarlarda kullanılmaktadır. Endüstriyel kirlenme sonucu açığa çıkan ve ortama karışan Cd^{+2}

kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi toplum sağlığı açısından önemli rahatsızlıklara da neden olabilmektedir (Bebianno ve Machado, 1997).

Metaller ekosistemin önemli bir parçası olan ve besin kaynağı olarak kullanılan balıklarda fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmaların bütünlüğünü bozabilmektedir (Hogstrand ve ark., 1999; Basha ve Rani, 2003). Metallere maruz kalan balıklarda hidrojen peroksit, süperoksit radikali ve oksidatif strese neden olan hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türleri artmakta, ATPaz aktivitesinin inhibisyonu ile birlikte osmoregülatör sistemde fonksiyon bozukluğu ve doku hasarı meydana gelebilmektedir (Radi ve Matkovics, 1998; Roche ve Boge, 1993; Canlı ve Stagg, 1996; Wong ve Wong, 2000; Ribeiro ve ark., 2002; Dautremepuits ve ark., 2004).

Yapılan birçok çalışmada metale maruz kalan hayvanlarda enzim cevapları hem laboratuvar hem de doğal alanlarda incelenmiş ve aktivitelerdeki artış ile azalışın doza, türe, etki süresine ve suyun fizikokimyasal özelliklerine bağlı olduğu görülmüştür (Wong ve Wong, 2000; Atlı ve Canlı, 2011). ATPazlar balıklarda hücrelerden iyon geçişini gerçekleştiren ve osmotik dengeyi sağlayan önemli enzimlerdendir. Balıklarda osmoregülatör sistemlerin metale bağlı inhibisyonunun belirlenmesinde ATPazlar duyarlı belirteçler olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada tatlisu balığı *O. niloticus*'un solungaç ve bağırsak dokularında Na^+/K^+ -ATPaz ve Mg^{+2} -ATPaz ile kas dokusunda Ca^{+2} -ATPaz aktivitelerinin, 15, 30 ve 60 mg Ca^{+2} /L derişimlerinde metal toksisitesine verdiği tepkiler akut (48 saat) ve kronik (14 gün) olmak üzere iki farklı süreçte incelenmiştir.

Elde edilen verilere göre, akut etki sonucunda kontrole göre (15 mg Ca^{+2} /L) 30 ve 60 mg Ca^{+2} /L etkisindeki kontrol gruplarının ATPaz aktivitelerinde artış görülmüştür. Aynı süreçte Cd^{+2} etkisinde ise Ca^{+2} derişimi arttıkça solungaç Na^+/K^+ -ATPaz ve kas Ca^{+2} -ATPaz aktivitesinde azalış görülmüştür. Bağırsak Na^+/K^+ -ATPaz ve Mg^{+2} -ATPaz aktiviteleri düşük Ca^{+2} düzeyinde artış gösterirken, en yüksek Ca^{+2} düzeyinde sadece Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi azalış göstermiştir. Kronik süreçte kontrol gruplarında solungaç Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinde azalış gözlenirken, bağırsak Mg^{+2} -ATPaz ve kas Ca^{+2} -ATPaz aktiviteleride artış gözlenmiştir. Bu süreçte Cd^{+2} etkisinde ise en yüksek Ca^{+2} derişiminde solungaç ve bağırsak Na^+/K^+ -ATPaz, Mg^{+2} -ATPaz ve

kas Ca^{+2} -ATPaz aktiviteleri azalış göstermiştir. Genel olarak akut ve kronik süreçte, sadece Ca^{+2} etkisindeki balıkların ATPaz tepkilerinde artış gözlenirken, $\text{Ca}^{+2}+\text{Cd}^{+2}$ etkisinde hem artış hem de azalış gözlenmiştir (EK.1-EK.2). Ayrıca genel olarak $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz Mg^{+2} -ATPaz enziminden daha hassas olduğu için Ca^{+2} etkisinde kalan balıkların solungaç $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz aktivitesi Mg^{+2} -ATPaz aktivitesine göre daha çok etkilenmiştir. Akut süreç kronik süreçle karşılaştırıldığında bağırsak $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz ve Mg^{+2} -ATPaz inhibisyonu en fazla en yüksek Ca^{+2} derişiminde gözlenmiştir. Kas Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi ise 30 mg Ca^{+2}/L içeren ortamda azalmış, 60 mg Ca^{+2}/L içeren ortamda artmıştır (EK.3-EK.4).

En toksik çevresel kirleticilerden biri olan Cd^{+2} 'nin düşük konsantrasyonlarda bile su canlıları için son derece zararlı etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Cd^{+2} 'nin özellikle kirlilik düzeyi yüksek denizlerde organizmaların vücuduna alınarak birikim gösterdiği ve enzimlerin tiyol grubuna bağlanarak yapılarında bozulmalara yol açma gibi değişik seviyelerde zararlı toksik etkiler meydana getirdiği görülmüştür (Katalay ve Parlak, 2004; Yazkan, 2004). Cd^{+2} gibi çeşitli çevre kirleticilerine karşı ATPaz aktivitesinin duyarlı olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Watson ve Benson, 1987; Canlı ve Stagg, 1996; Kamunde ve Wood, 2003; Atlı ve Canlı, 2007, 2008, 2011). Peles ve ark., (2012), bir balık türü olan *Notemigonus crysoleucas*'u 4 farklı Cd^{+2} (500, 800, 1100 ve 1400 $\mu\text{g}/\text{L}$) derişiminin etkisine 24 saat süreyle bıraktıktan sonra solungaç $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz aktivitesini belirlemişlerdir. Cd^{+2} derişimi arttıkça $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz aktivitesinde kontrole göre azalma gözlemlenmiştir. Balıklarda fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmaların bütünlüğünü sağlamak için çeşitli sistemler geliştirilmiştir. Solungaç ve bağırsak gibi osmoregülatör dokular için önemli olan $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz sistemi 3 Na^{+} iyonunu hücre dışına, 2 K^{+} iyonunu ise hücre içine transfer ederek hücre ile hücre dışı arasında iyon taşınımı ve elektrokimyasal gradientin korunmasını sağlamaktadır (Heath, 1987; Canlı ve Stagg, 1996; Grosell ve ark., 2003). Hayvansal hücrelerde hücre içi K^{+} derişimi 140 mM iken, hücre dışında 5 mM'dır. Na^{+} iyonu ise hücre içinde 5 mM, hücre dışında 145 mM derişiminde bulunmaktadır. Bu dengeyi ise $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz enzim sistemi sağlamaktadır (Köksoy, 2002). İntegral bir zar proteini olan $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz enzimi alfa ve beta olarak adlandırılan iki alt ünitelerden oluşan bir tetramerdir. Alfa alt ünitesi

ATP hidrolizini gerçekleştirirken daha küçük olan beta alt ünitesi fonksiyonu tam olarak bilinmeyen bir glikoproteindir. Na^+/K^+ -ATPaz, ouabain gibi spesifik bir inhibitör olan kardiyak glikozitleri için iyi bir reseptördür ve ouabain tarafından inhibe olmaktadır (Lionetti ve ark., 1998). Diğer bir sistem olan Ca^{+2} -ATPaz ise sarkoplazmik retikulum tübüllerinde bulunan ve hücrelerdeki düşük Ca^{+2} düzeyini korumak için sitoplazmadan Ca^{+2} taşıyan önemli bir enzimdir (Watson ve Beamish, 1981, Saxena ve ark., 2000). Ca^{+2} -ATPaz, Ca^{+2} metabolizmasındaki önemi ve yapısındaki fonksiyonel -SH gruplarına bağlı olarak ağır metal etkisinde inhibe olması ile, kirlilik çalışmalarında büyük önem kazanmaktadır (Wong ve Wong, 2000). Daha önce yapılan çalışmalarda balık dokularında Cd^{+2} 'nin Ca^{+2} -ATPaz'ı bloke ederek Ca^{+2} taşınmasını inhibe ettiği görülmüştür (Wong ve Wong, 2000). Mg^{+2} hücre zarının bütünlüğü ve geçirgenliğinin stabilizasyonunda önemli göreve sahiptir. Mg^{+2} -ATPaz oksidatif fosforilasyon ve iyon taşınmasında önemli rolü olan ve Mg^{+2} 'nin transepitelyal regülasyonundan sorumlu bir enzimdir (Parvez ve ark., 2006). Bu enzim divalent katyonlar (Ca^{+2} ve Mg^{+2}) varlığında çalışan, metal iyonlarına duyarlı fakat ouabaine duyarlı olmayan bir integral zar proteinidir ve fonksiyonu Na^+/K^+ -ATPaz kadar iyi bilinmemektedir (Wong ve Wong, 2000).

Enzimlerin metal toksisitesine duyarlılığını etkileyen faktörlerin metal derişimi, pH, su sertliği, tuzluluk, etki süresi, sıcaklık ve tür gibi faktörler olduğu belirtilmiştir (Heath, 1987; Canlı ve Atlı, 2003; Atlı ve Canlı, 2008a, 2008c, 2011). Ca^{+2} , sert suların koruyucu etkisinden sorumlu katyonların başında gelmektedir. Balıklarda Ca^{+2} ve Mg^{+2} gibi iyonların ortamdaki artışının metal toksisitesini azalttığı saptanmıştır (Pagenkopf, 1983; Pratap ve ark., 1989). Balıklarda Cd^{+2} toksisitesinin yumuşak sularla kıyaslandığında sert sularda azaldığı belirtilirken (Pagenkopf, 1983; Pascoe ve ark., 1986; Winner ve Gauss, 1986), benzer sonuçlar Zn^{+2} , Cu^{+2} ve Pb^{+2} gibi diğer metallerde de saptanmıştır (Diamond ve ark., 1992; Playle ve ark., 1992; Barron ve Albeke, 2000). Cd^{+2} , Zn^{+2} , Pb^{+2} ve Mn^{+2} gibi bir çok metalin balıklarda Ca^{+2} kanallarıyla taşındığı belirtilmiştir (Baldisserotto ve ark., 2004a). Ca^{+2} ve iki değerlikli metaller arasında solungaç yüzeyleri üzerindeki bağlanma yerleri için oluşan rekabet, balıklarda metal alınımını etkilemektedir (Pagenkopf, 1983; Hunn, 1985). Genellikle tatlı sularda su sertliği arttıkça ağır metal toksisitesinin azalmasının

nedeni organizmaların Ca^{+2} ve Mg^{+2} gibi iyonları almak için metallerle yarışmasıdır (Kim ve ark., 2001; Pyle ve ark., 2002; Javid ve ark., 2007).

Cd^{+2} 'nin Ca^{+2} ile birlikte hücreye girişinin apikal membranlarda Ca^{+2} kanalları, hücre içi Ca^{+2} tamponlayıcı sistemler ve basolateral membranlarla olmak üzere üç şekilde olduğu belirtilmiştir (Verbost ve ark., 1989). Bununla birlikte balıklar Cd^{+2} etkisine sadece su ortamıyla değil besin yoluyla da maruz kalabilirler. Önceki çalışmalarda Pratap ve ark., (1993), normal ve yüksek Ca^{+2} içeren ortamda *O. mossambicus*'u su ve besin yoluyla Cd^{+2} etkisine 35 gün süreyle bıraktıktan sonra Cd^{+2} alınıminin yüksek Ca^{+2} derişiminde azaldığını gözlemlemişlerdir. Başka bir çalışmada ise, *O. mykiss*'de su yoluyla alınan Cd^{+2} 'nin ve besin yoluyla alınan Ca^{+2} 'nin tek başlarına ve bir aradayken olan etkileri 40 gün süreyle incelenmiş ve Cd^{+2} 'nin solungaçlar yoluyla sudan Ca^{+2} alınıminin inhibe ettiği, besinle alınan Ca^{+2} 'nin ise dokularda Cd^{+2} birikimine karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (Verbost ve ark., 1989). Bu bilgiler ışığında Cd^{+2} 'nin Ca^{+2} analogu olarak Ca^{+2} kanallarına ilgisinin yüksek olduğu ve yumuşak sularda bu metalin toksisitesinde artış olduğu, sert sularda ise Cd^{+2} toksisitesinin Ca^{+2} kanalları için Ca^{+2} ile büyük yarış nedeniyle azalış gösterdiği belirtilmiştir (Verbost ve ark., 1989; Pratap ve Wendelaar-Bonga, 1993; Hollis ve ark., 2000). Cd^{+2} 'nin düşük derişimleri balıklarda solungaç anormalliklerine (Glynn ve ark., 1992), anormal yüzme hareketlerine (Pascoe ve ark., 1986), iyon regülasyonunun bozulmasına (McGeer ve ark., 2000; De La Torre ve ark., 2000) ve hipokalsemiye (Pratap ve ark., 1989; Hwang ve Yang, 1997; Baldisserotto ve ark., 2004a) neden olmaktadır. Örneğin, *S. gairdneri*'de Cd^{+2} toksik etkisini, solungaçlarda Ca^{+2} alınıminin engelleyerek, hipokalsemiye neden olarak ve Ca^{+2} -ATPaz gibi enzimlere yüksek ilgisi nedeniyle gerekli taşıyıcı enzimleri inhibe ederek göstermektedir (Verbost ve ark., 1989). Baldisserotto ve ark. (2004b), *O. mykiss*'de sadece Cd^{+2} etkisinde hipokalseminin görüldüğünü, yüksek Ca^{+2} derişimlerinin bulunduğu ortamdaki balıklarda ise görülmediğini belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada da Cd^{+2} , *S. salar*'ın böbrek ve solungaç dokularında yüksek düzeyde birikerek Ca^{+2} -ATPaz'ı inhibe etmiş ve Ca^{+2} homeostazisini bozmuştur (Berntssen ve ark., 2003).

Balıklarda ağır metaller solungaçlarla alındığından metaller için ilk hedef doku olarak kabul edilmektedir (De La Torre ve ark., 2000). Balık solungaçlarının; gaz transferinde, azotlu atıkların uzaklaştırılmasında ve iyon dengesinin düzenlenmesinde önemli bir rolü olduğu belirtilmiştir (Claiborne ve ark., 2002; Marshall, 2002). Bu fonksiyonları nedeniyle solungaçlar, sekonder lamellerin bulunduğu bir çift primer filament içeren 4 çift solungaç yayından oluşan oldukça karmaşık bir epitel dokudur. Su canlılarında biriken ağır metaller insanlara besin zinciri yoluyla ulaştığı için balıkların kas dokusu metal toksisitesinin belirlenmesinde önemli bir belirteç olabilmektedir. Yapılan çalışmalar kasların Ca^{+2} -ATPaz aktivitesinin en yüksek aktivite gösteren doku olduğunu belirtmiştir (Heath, 1987; De La Torre ve ark., 2007). Osmoregülasyonda önemli görevi olan dokulardan biri olan bağırsaklar tuz taşınmasında görevlidir. Bu nedenle bu dokuda transepitelyal tuz hareketleri için gerekli iyonik ve elektriksel gradienti düzenlemek amacıyla $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz enzimi yüksek düzeyde bulunmaktadır. Bu bilgiler ışığında, ATPaz enzimlerinin doku tipine bağlı olarak farklılık gösterdiği söylenebilir. Örneğin, Lionetto ve ark., (2000), *in vitro* Cd^{+2} etkisindeki yılan balığı *A. anguilla*'nın solungaç ve bağırsak dokusunda $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz ve Mg^{+2} -ATPaz aktivitelerini incelemişlerdir. $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz aktivitesinin Cd^{+2} 'nin etkisinde inhibe olduğu ve solungaç dokusunun bağırsak dokusuna göre Cd^{+2} etkisine daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. Buna karşılık, Mg^{+2} -ATPaz aktivitesinin *in vitro* Cd^{+2} etkisinde her iki dokuda da değişiklik göstermediği gözlenmiştir. Atlı ve Canlı (2007), farklı derişimlerdeki Cd^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} ve Pb^{+2} etkisinde kalan *O. niloticus*'un solungaç ve bağırsak dokularında $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz aktivitesinin azalmasına karşın, yüksek Pb^{+2} derişimi etkisinde solungaç enzim aktivitesinde artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada Cd^{+2} etkisinde kalan *O. niloticus*'un solungaç ve bağırsak $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz aktivitesinde genel bir azalış gözlemlenmesi önceki çalışmaları desteklemektedir.

Genel olarak metal etkileri ATPaz aktivitesinde azalışa neden olurken, artışa bağlı tepkiler ise çok açık olmamakla birlikte metallerin doğrudan etkilerine bağlı olduğu kadar, enzimlerin miktar ve telafi edici homeostatik mekanizmalarıyla da ilişkili olabilmektedir (Atlı ve Canlı, 2007, 2008c, 2011). Buna göre, solungaç enzim aktivitesindeki azalma metallerin enzim üzerinde bulunan -SH gruplarına olan

yüksek bağlanma ilgisinden ve bu bağlanma sonucu enzimin inhibe olmasından, iyon homeostazisinin ve membran yapısının bozulmasından kaynaklanabilmektedir. Solungaç Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesindeki artış yönündeki tepkiler ise devam eden metal etkisine karşı iyon dengesinin sağlanması için geliştirilen bir adaptasyon olabilir. Daha önce yapılan çalışmalarda da metallerin solungaç ve bağırsak gibi osmoregülatör organlarda iyon dengesini inhibe ederek zararlı etkilere yol açtığı belirtilmiştir (Larsson ve ark., 1985; Canlı ve Stagg, 1996; Ay ve ark., 1999; Grosell ve ark., 2003). Akut ve kronik sürecin her ikisinde de Ca^{+2} -ATPaz aktivitesinde görülen azalmalar, Ca^{+2} homeostazisinin bozulmasından dolayı membran geçirgenliğindeki değişikliklerden ve aktif taşıma mekanizmasının fonksiyonunu kaybetmesinden kaynaklanabilmektedir. Bunun yanında enzim aktivitesindeki azalmanın diğer bir sebebi Ca^{+2} ile Cd^{+2} 'nin alımın mekanizmalarının aynı olması ve Cd^{+2} 'nin Ca^{+2} ile enzimin yapısındaki $-\text{SH}$ gruplarına bağlanmak için yarışması olabilmektedir. Kas dokusunda olduğu gibi bağırsak dokusunda da enzim aktivitelerinde azalış gözlemlenmiştir. Mg^{+2} -ATPaz aktivitesinde gözlenen azalmanın nedeni, metal toksisitesinin membranların yapısını bozarak Mg^{+2} alımını inhibe etmesi ve bu enzimin geçişi sağlayabilmesi için bu iyonun ihtiyacı duyması olabilmektedir (Atlı ve Canlı, 2011).

Genel olarak bakıldığında, ATPaz aktivitelerinde görülen inhibisyonlar akut süreçte, artışlar ise kronik süreçte görülmektedir (Atlı ve Canlı, 2007). Örneğin; akut süreçte Cu^{+2} ve Zn^{+2} etkisine bırakılan *O. niloticus*'un solungaç Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinde azalış olmasına karşın, kronik süreçte Mg^{+2} -ATPaz aktivitesinde artış gözlenmiştir (Atlı ve Canlı, 2011). Fakat bu çalışmada enzim aktiviteleri genellikle kronik süreçte azalış göstermiştir. Bu durumda uzun süreli metal etkisinde enzimlerin fonksiyonlarını kaybederek adaptasyon mekanizmalarının yeterli olmamasından kaynaklanabilir. Akut ve kronik stres altındaki sucul organizmalarda çeşitli ekolojik tepkiler gözlenmektedir. Bu tepkilerin morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik etkiler sonucu olduğu söylenebilmektedir. Yapılan çalışmalar ışığında sucul organizmaların uzun süreli metal etkisinde kaldığı düşünülürse ekotoksikolojik çalışmalara ışık tutması açısından metallerin akut etkilerinden çok kronik etkilerinin değerlendirilmesi daha uygun olacaktır.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, metal toksisitesinde suyun fizikokimyasal özelliklerinin ve ağır metal etkisinde kalan sucul organizmaların osmoregülasyon mekanizmasının biyoindikatör olarak kullanılma potansiyelinin belirlenmesinde önemli bir yeri olduğunu vurgulamaktadır. Sucul ortamlarda yaşayan organizmaların sistemlerinde metallerin yol açtığı hasarın önceden saptanması doğal çevre dengesinin korunmasında yaşamsal role sahiptir. Bu nedenle bu çalışmada elde edilen veriler, geri dönüşümsüz hasarların oluşumundan önce metabolizmada oluşabilecek değişikliklerin belirlenmesi açısından “erken uyarıcı sistemler” olarak kullanılabilir. Ayrıca suyun diğer tamamlayıcı pH, çözünmüş organik madde ve sıcaklık gibi fizikokimyasal özellikleri ve antioksidan enzimler gibi parametreler çalışılarak ağır metallerin sucul organizmaları ne kadar ve ne şekilde etkilediği araştırılıp ekotoksikoloji alanındaki çalışmalara ışık tutulabilir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

1. Tatlı su balığı *O. niloticus* 15, 30 ve 60 mg Ca^{+2}/L ve ayrıca 20 μM (akut) ve 10 μM (kronik) derişimlerdeki kadmiyumun ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) tek ve birlikteki etkisine akut olarak 48 saat ve kronik olarak 14 gün süreyle bırakılmıştır
2. Akut ve kronik deneyler süresince balıklarda mortalite gözlenmemiştir.
3. Akut süreçte sadece Ca^{+2} etkisinde Na^+/K^+ -ATPaz, Mg^{+2} -ATPaz ve Ca^{+2} -ATPaz aktiviteleri artış göstermesine karşın, Cd^{+2} etkisinde azalış göstermiştir. Kronik süreçte ise kontrol gruplarının solungaç Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi azalış gösterirken, bağırsak Na^+/K^+ -ATPaz ve Mg^{+2} -ATPaz aktiviteleri ile kas Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi artış göstermiştir. Cd^{+2} etkisinde ise ATPaz aktiviteleri azalış göstermiştir.
4. Kronik süreçte Ca^{+2} etkisinde kalan kontrol grubu balıkların dokularında ATPaz aktiviteleri, akut süreçteki kendi kontrollerine göre karşılaştırıldığında ise solungaç Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi sadece 30 mg Ca^{+2}/L içeren sularda azalış gösterirken, Mg^{+2} -ATPaz aktivitesi denenen üç derişimde de değişiklik göstermemiştir. Bağırsak Na^+/K^+ -ATPaz ve Mg^{+2} -ATPaz aktivitesi Ca^{+2} derişimi arttıkça daha fazla inhibe olmuştur. Kas Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi ise Ca^{+2} derişimi arttıkça önce azalmış daha sonra artmıştır.

5.2. Öneriler

1. Suyun sertlik özelliği dışında diğer fizikokimyasal özelliklerinin ATPazlar üzerine etkisi çalışılarak karşılaştırmalı sonuçlar elde edilebilir.
2. Tatlı suların farklı kimyasal özelliklerinin metal toksisitesindeki etkilerinin karşılaştırmalı olarak araştırılmasıyla tatlı suların doğal koşullarına daha uygun sonuçların elde edilmesi ve bunun sonucunda daha anlamlı yorumlar yapılabilmesi sağlanabilir.
3. ATPaz enzimleri gibi metal toksisitesinin önemli bir belirteci olan antioksidan enzimlerinin çalışılması ekotoksikoloji alanındaki çalışmalara yol gösterebilir.
4. Metal toksisitesinin ayrıca doku yapısında yol açabileceği hasarı gözlemlemek amacıyla histolojik düzeyde çalışmalar da yapılabilir.

KAYNAKLAR

- ATKINSON, A., GATEMBY, A.O., and LOWE, A.G., 1973. The Determination of Inorganic Orthophosphate in Biological Systems. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 320: 195–204.
- ATLI, G., and CANLI, M., 2007. Enzymatic Responses to Metal Exposures in a Freshwater Fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 145: 282–287.
- ATLI, G., and CANLI, M., 2007a. Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd,Cu,Cr,Zn,Fe) exposures. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73 (2010): 1884–1889.
- ATLI, G., CANLI, M., 2008. Responses of Metallothionein and Reduced Glutathionein a Freshwater Fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 145: 282-287.
- ATLI, G., CANLI, M., 2008a. Characterization of Branchial Na,K-ATPase from Three Freshwater Fish Species (*Oreochromis niloticus*, *Cyprinus carpio*, and *Oncorhynchus mykiss*). *Turkish Journal of Zoology*, 32: 299-304.
- ATLI, G., and CANLI, M., 2011. Essential metal (Cu, Zn) exposures alter the activity of ATPases in gill, kidney and muscle of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology* 20: 1861–1869.
- AY, Ö., KALAY, M., TAMER, L., and CANLI, M., 1999. Copper and Lead Accumulation in Tissues of a Freshwater Fish *Tilapia zillii* and Its Effects on the Branchial Na,K-ATPase Activity. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 62: 160-168.
- BALDISSEROTTO, B., KAMUNDE, C., MATSUO, A. and WOOD, C. M., 2004. A protective effect of dietary calcium against acute waterborne cadmium uptake in rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 67: 57-73.
- BALDISSEROTTO, B., KAMUNDE, C., MATSUO, A. and WOOD, C. M., 2004a. Acute Waterborne Cadmium Uptake in Rainbow Trout is Reduced by dietary Calcium Carbonate. *Comparative Biochem. And Physiology, Part C* 137: 363-372.

- BALDISSEROTTO, B., KAMUNDE, C., MATSUO, A. and WOOD, C. M., 2004b. A Protective Effect of Dietary Calcium Against Acute Waterborne Cadmium Uptake in Rainbow Trout. *Aquat. Toxicol.* 67, 55-73.
- BARRON, M. G. and ALBEKE, S., 2000. Calcium Control of Zinc Uptake in Rainbow Trout. *Aquat. Toxicol.* 50: 257-264.
- BASHA, P.S., and RANI, A.U., 2003. Cadmium-induced Antioxidant Defense Mechanism in Freshwater Teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56: 218–221.
- BEBIANNO, M.J., MACHADO, M., 1997. Concentrations of metals and metallothioneins in *Mytilus galloprovincialis* along the South Coast of Portugal. *Marine Pollution of Bulletin*. Vol:34(8): 666-670.
- BERNTSEN, M.H.G., WAAGBO, R., TOFTEN, H., and LUNDEBYE, A.K., 2003. Effects of Dietary Cadmium on Calcium Homeostasis, Ca Mobilization and Bone Deformities in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Parr. *Aquaculture Nutrition*, 9: 175-183.
- BIANCHINI, A., and WOOD, C.M., 2003. Mechanism of Acute Silver Toxicity in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22 (6): 1361–1367.
- BIANCHINI, A., PLAYLE, R.C., WOOD, C.M., and WALSH, P.J., 2005. Mechanism of Acute Silver Toxicity in Marine Invertebrates. *Aquatic Toxicology*, 72: 67–82.
- BLANCHARD, J., and GROSELL, M., 2006. Copper Toxicity across Salinities from Freshwater to Seawater in the Euryhaline Fish *Fundulus heteroclitus*: Is Copper an Ionoregulatory Toxicant in High Salinities? *Aquatic Toxicology*, 80: 131–139.
- BOND, H., and HUDGINS, P.M., 1979. Kinetics of Inhibition of Na^+ and K^+ Stimulated ATPase by Mg^{2+} , K^+ and Vanadate. *Biochemistry*, 1979, 18:325–331.

- CANLI, M., and STAGG, R.M., 1996. The Effects of In Vivo Exposure to Cadmium, Copper, and Zinc on the Activities of Gill ATPases in the Norway Lobster *Nephrops norvegicus*. *Archive of Environmental Contamination and Toxicology*, 31: 491–501.
- CANLI, M., and ATLI, G., 2003. The Relationships Between Heavy Metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) Levels and the Size of Six Mediterranean Fish Species. *Environmental Pollution*, 121: 129–136.
- CARVALHO, C.S., FERNANDES, M.N., 2006 Effect of Temperature on Copper Toxicity and Hematological Responses in the Neotropical fish *Prochilodus scrofa* at Low and High pH, *Aquaculture*, 251, 109-17.
- CLAIBORNE, J. B., EDWARDS, S. L. and MARRISON-SHETLAR, A. I., 2002. Acide-Base Regulation in Fishes: Cellular and Molecular Mechanisms. *J.Exp. Zool.* 293, 302-319.
- CRAIG, P.M., WOOD, C.M. and McCLELLAND, G.B., 2007. Gill membrane remodeling with soft-water acclimation in zebrafish (*Danio rerio*). *Physiol. Genomics* 30: 53-60.
- DAUTREMEPUITS, C., PARIS-PALACIOS, S., BETOULLE, S., and VERNET, G., 2004. Modulation in Hepatic and Head Kidney Parameters of Carp (*Cyprinus carpio* L.) Induced by Copper and Chitosan. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 137: 325–333.
- DAVIES, P. H., GORMAN, W. C., CARLSON, C. A. and BRINKMAN, S. R., 1993. Effect of Hardness on Bioavailability and Toxicity of Cadmium to Rainbow Trout. *Chem. Speciat. Bioavailab.* 5, 67-77.
- DE LA TORRE, F.R., SALIBIAN, A., and FERRARI, L., 2000. Biomarkers Assessment in Juvenile *Cyprinus carpio* Exposed to Waterborne Cadmium. *Enviromental Pollution*, 109: 277-282.
- DE LA TORRE, F.R., SALIBIAN, A , 2007. Assessment of the Pollution Impact on Biomarkers of Effect of a Freshwater Fish. *Chemosphere*, 68: 1582-1590.
- DE SMET, H. and BLUST, R., 2001. Stress Responses and Changes in Protein Metabolism in carp *Cyprinus Caprio* During Cadmium Exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 48, 255-262.

- DIAMOND, J. M., WINCHESTER, E. L., MACKLER, D. G., RASNAKE, W. J., FANELLI, J. K. and GRUBER, D., 1992. Toxicity of Cobalt to Freshwater Indicator Species as a Function of Water Hardness. *Aquatic toxicology*. 22: 163-180.
- DIAZ, M., COZZI, S., ALMANSA, E., CASARIEGO, M., BOLANOS, A., CEJAS, J., and LORENZO, A., 1998. Characterization of Intestinal Na⁺-K⁺-ATPase in the Gilthead Seabream (*Sparus aurata* L.). Evidence for a Tissue-Specific Heterogeneity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 121: 65-76.
- DUNHAM, E.T., and GLYNN., I.M., 1961. Adenosinetriphosphatase Activity And The Active Movements Of Alkali Metal Ions. *J. Physiol.* 156:274-293.
- EBRAHIMPOUR, M., ALIPOUR, H., and RAKHSHAH, S., 2010. Influence of water hardness on acute toxicity of copper and zinc on fish.
- EZEMONYE, 2008. Lethal toxicity of industrial chemicals to early life stages of *Tilapia guineensis*.
- FLIK, G., VAN DER VELDEN, J. A., DECHERING, K. J., VERBOST, P. M., SCHOENMAKERS, T. J. M., KLAR, Z. I. and WENDELAAR BONGA, S. E., 1993. Ca²⁺ and Mg²⁺ Transport in Gills and Gut of Tilapia; *Oreochromis mossambicus*: A Review. *J. Exp. Zool.*, 265: 356-365.
- GAGNON C., VAILLANCOURT, G. and PAZDERNIK, L., 1998. Influence of Water Hardness on Accumulation and Elimination of Cadmium in Two Aquatic Mosses Under Laboratory Conditions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* Jan; 34 (1): 12-20.
- GALVEZ, F., WEBB, N., HOGSTRAND, C. and WOOD, C. M., 1998. Zinc Binding to the Gills of Rainbow Trout: the Effect of Long Term Exposure to Sublethal Zinc. *J. Fish Biol.* 52, 1089-1104.
- GARCIA-SANTOS, S., FONTAINHAS-FERNANDES, A., and WILSON, J.M., 2006. Cadmium Tolerance in the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Following Acute Exposure: Assessment of Some Ionoregulatory Parameters. *Environment Toxicology*, 21: 33-46.

- GARDNER G. R. and YEVICH, P. P., 1970. Histological and Hematological Responses of Eustuarine Teleost to Cadmium. Journal of The Fisheries Research Board of Canada. 27: 2185-2196.
- GILES, M. A., 1984. Electrolyte and Water Balance in Plasma and Urine of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) During Chronic Exposure to Cadmium. Can J Fish Aquat Sci. 41:1678-1685.
- GLYNN, A., NORRGREN, L. and MALMBORG, O., 1992. The Influence of Calcium and Humic Substances on Aluminium Accumulation and Toxicity in the Minnow, *Phoxinus phoxinus* at Low pH. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 102 C. No 3, 427-432.
- GROSELL, M., WOOD, C.M., and WALSH, P., 2003. Copper Homeostasis and Toxicity in the Elasmobranch *Raja erinacea* and the Teleost *Myoxocephalus octodecemspinosus* during Exposure to Elevated Water-borne Copper. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 135: 179–190.
- HEATH, A.G., 1987. Water Pollution and Fish Physiology. CRC press, Florida, USA, 245s.
- HOGSTRAND, C., FERGUSON, E.A., GALVEZ, F., SHAW, R., WEBB, N.A., and WOOD, C.M., 1999. Physiology of Acute Silver Toxicity in the Starry Flounder (*Platichthys Stellatus*) in Seawater. Journal of Comparative Physiology B, 169: 461-473.
- HOLLIS, L., McGEER, J. C., McDONALD, D. G. and WOOD, C. M., 1999. Cadmium Accumulation Gill Cd Binding, Acclimation, and Physiological Effects During Long Term Sublethal Cd Exposure in Rainbow Trout. Aquat. Toxicol. 46, 101-119.
- HOLLIS, L., McGEER, J.C., McDONALD, D.G., and WOOD, C.M., 2000. Effects of Long Term Sublethal Cd Exposure in Rainbow Trout during Soft Water Exposure: Implications for Biotic Ligand Modelling. Aquatic Toxicology, 51: 93–105.
- HUNN, J. B., 1985. Role of Calcium in Gill Function in Freshwater Fishes. Comp. Biochem. Physiol. 82A: 543-547.

- HWANG, P. P. and YANG, C. H., 1997. Modulation of Calcium Uptake in Cadmium-Pretreated Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) larvae. Fish Physiology and Biochemistry 16: 403-410.
- JAVÍD A., JAVED M., and ABDULLAH S., 2007. Nickel bio-accumulation in the bodies of Catla catla, Labeo rohita and Cirrhina mrigala during 96-hr LC₅₀ exposures. International Journal of Agriculture and Biology, 9: 139-142.
- KALAY, M., KOYUNCU, A.E. DÖNMEZ, 2004. Comparison of Cd levels in the muscle and liver tissues of *Mullus barbatus* and *Sparus aurata* caught from the Mersin Gulf. (in Turkish). Ekoloji Dergisi. 13(52):23-27.
- KAMUNDE, C., and WOOD, C.M., 2003. The Influence of Ration Size on Copper Homeostasis during Sublethal Dietary Copper Exposure in Juvenile Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquatic Toxicology, 62: 235-254.
- KATALAY, S., PARLAK, H., 2004. The effects of cadmium on erythrocyte structure of Black goby (*Gobius niger* L.1758). (in Turkish). E.Ü. Su Ürünleri Dergisi. 21(1-2):99-102.
- KİM A.D., GU M.B., ALLEN H.E., and CHA D., 2001. Physiochemical factors affecting the sensitivity of Ceriodaphnia bulba to copper. Environmental Monitoring and Assessment, 70: 105-106.
- KÖKSOY, A.A., 2002. Na⁺, K⁺-ATPase: A Review. Journal of Ankara Medical School, 24 (2): 73-82.
- LANGE, A., AUSSEIL, O., and SEGNER, H., 2002. Alterations of Tissue Glutathione Levels and Metallothionein Mrna in Rainbow Trout during Single and Combined Exposure to Cadmium and Zinc. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 131: 231–243.
- LARSSON, A., HAUX, C., and SJOBECK, M., 1985. Fish Physiology and Metal Pollution: Results and Experiences from Laboratory and Field Studies. Ecotoxicology and Environmental Safety, 9: 250-281.
- LIONETTO, M.G., MAFFIA, M., CAPPELLO, M.S., GIORDANO, M.E., STORELLI, C., SCHETTINO, T., 1998. Effect of Cadmium on Carbonic Anhydrase and Na⁺-K⁺-ATPase in ELL, *Anguilla anguilla*, Intestine and Gills. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 120: 89-91.

- LIONETTO, M.G., GIORDANO, M.E., VILELLA, S., and SCHETTINO, T., 2000. Inhibition of Eel Enzymatic Activities by Cadmium. *Aquatic Toxicology*, 48:561–571.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARRA, N.J., and RANDALL, R.J., 1951. Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- MANSOURİ, B. AND BARAMAKİ, R., 2011. Influence of water hardness and pH on acute toxicity of Hg on freshwater fish *Capoeta fusca* *World Journal of Fish and Marine Sciences* 3 (2): 132-136.
- MARSHALL, W. S., 2002. Na^+ , Cl^- , Ca^{+2} and Zn^{+2} Transport by Fish Gills: Retrospective Review and Prospective Synthesis. *J. Exp. Zool.* 293, 264-283.
- McDONALD, D.G., HOBE, H. and WOOD, C. M., 1980. The influence of environmental calcium on the physiological responses of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, to low environmental pH. *J. Exp. Biol.* 88: 109-131.
- McDONALD, D.G., and WOOD, C.M., 1993. Branchial Mechanisms of Acclimation to Metals in Freshwater Fish (J.C. RANKIN and F.B. JENSEN editör). *Fish Ecophysiology*, Chapman and Hall, London, s. 297–332.
- McGEER, J.C., and WOOD, C.M., 1998. Protective Effects of Water Cl^- on Physiological Responses to Waterborne Silver in Rainbow Trout. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55 (11): 2447–2454.
- McGEER, J.C., SZEBEDINSZKY, C., McDONALD, D.G., and WOOD, C.M., 2000. Effects of Chronic Sublethal Exposure to Waterborne Cu, Cd or Zn in Rainbow Trout. 1: Iono-regulatory Disturbance and Metabolic Costs. *Aquatic Toxicology*, 50: 231–243.
- MEYER, J. S., 1999. A Mechanistic Explanation for the $\ln(\text{LC}_{50})$ vs $\ln(\text{hardness})$ adjustment equation for metals. *Environ Sci Technol.* 33: 908-912.
- NİYOĞİ, S., WOOD, C.M., 2006. Interaction between dietary calcium supplementation and chronic waterborne zinc exposure in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. C.* 143: 93–102.

- 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.
- PART, P., SVANBERG, O. and KJESSLJNG, A., 1985. The Availability of Cadmium to Perfused Rainbow Trout Gills in Different Water Qualities. *Water Res.* 19, 427-434.
- PARVEZ, S., SAYEED, I., and RAISUDDIN, S., 2006. Decreased Gill ATPase Activities in the Freshwater Fish *Channa punctata* (Bloch) Exposed to a Diluted Paper Mill Effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65: 62–66.
- PASCOE, D., EVANS, S. A. and WOODWORTH, J., 1986. Heavy Metal Toxicity to Fish and Influences of Water Hardness. 15: 481-487.
- PELES, J.D., PISTOLE, D.H., MOFFE, M., 2012. Influence of cadmium concentration and length of exposure on metabolic rate and gill Na⁺/K⁺ ATPase activity of golden shiners (*Notemigonus crysoleucas*). *Comp. Biochem. Physiol C.* 156: 24-8.
- PELGROM, S.M.G.J., LOCK, R.A.C., BALM, P.H.M., and WENDELAAR BONGA, S.E., 1995. Effects of Combined Waterborne Cd and Cu Exposures on Ionic Compositions and Plasma Cortisol in Tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 2: 227-235.
- PENTTINEN, S., KOSTAMO, A., and KUKKONEN, J.V.K., 1998. Combined effects of dissolved organic material and water hardness on toxicity of cadmium to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17: 2498-2503.
- PLAYLE, R. C., GENSEMER, R. W and DIXON, D. G., 1992. Copper Accumulation on Gills of Fathead Minnows: Influence of Water Hardness, Complexation and pH of the Gill Micro-Environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 11, pp. 381-391.
- PLAYLE, R. C., DIXON, D. G., and BURNISON, K., 1993. Copper and Cadmium Binding to Fish Gills: Modification by Dissolved Organic Carbon and Synthetic Ligands. *Can J. Fish . Aquat. Sci.* 50: 1-11.

- PRATAP, H. B., LOCK, R. A. C. and WENDELAAR BONGA, S. E., 1989. Effect of Waterborne and Dietary Cadmium on Plasma Ions of the Teleost *Oreochromis mossambicus* in Relation to Water Calcium Levels. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 18, 568-575.
- PRATAP, H.B., and WENDELAAR BONGA, S.E., 1993. Effect of Ambient and Dietary Cadmium on Pavement Cells, Chloride Cells, and Na⁺/K⁺-ATPase Activity in the Gills of the freshwater Telesot *Oreochromis mossambicus* at Normal and High Calcium Levels in the Ambient Water. Aquatic Toxicology, 26: 133-150.
- PYLE G.G., SWANSON S.M., and LEHMKUHT D.M., 2002. The influence of water hardness, pH, and suspended solids on nickel toxicity to larva fathead minnows (*Pimephales promelas*). Water , Air, and Soil Pollution, 133: 215-226.
- RADI A.A.R., MATKOVICS B., 1998. Effects of metal ions on the antioxidant enzyme activities, protein contents and lipid peroxidation of carp tissues. Comp. Biochem. Physiol. C 90: 69-72.
- RAINBOW, P. S., 1985. The Biology of Heavy Metals in the Sea. Intern. J. Environmental Studies, 25: 195-211.
- RAINBOW, P. S., AMIARD-TRIQUET, C., AMIARD, J. C., SMITH, B. D. And LANGSTON, W. J., 2000. Observation on the Interaction of Zinc and Cadmium Uptake Rates in Crustaceans (Amphipods and Crabs) from Coastal Sites in UK and France Differentially Enriched With Trace Metals. Aquatic Toxicology, 50: 189-204.
- RATHOR R.S., KHANGAROT BS., 2003. Effects of water hardness and metal concentration on a fresh water Tubifex tubifex muller. Water, Air, and Soil Pollution 142:341-356.
- READER, J.P., and MORRIS, R., 1988. Effects of Aluminium and pH on Calcium Fluxes, and Effects of Cadmium and Manganese on Calcium and Sodium Fluxes in Brown Trout (*Salmo Trutta L.*), Comp.Biochem. and Physiol.

- REID, S.G., and MCDONALD, D.G., 1988. Effects of Cadmium and Copper and Low Ph on Ion Fluxes in Rainbow Trout, *Salmo Gairdneri*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 45:244-253.
- RIBEIRO, M.G.L., PEDRENHO, A.R., and HASSON-VOLOCH, A., 2002. Electrocyte Na^+/K^+ -ATPase Inhibition Induced by Zinc is Reverted by Dithiothreitol. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 34: 516–524.
- ROCHE, H., BOGE, G., 1993. Effects of Cu, Zn and Cr salts on antioxidant enzyme activities in vitro of red blood cells of a marine fish *Dicentrarchus labrax*. Toxicol. In vitro 7: 623-629.
- ROGERS, J.T., WOOD, C.M., 2004. Characterization of branchial lead-calcium interactions in the freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Exp. Biol. 207: 813-825.
- SANCHO, E., FERNANDEZ-VEGA, C., FERRANDO, M.D., and ANDREU-MOLINER, E., 2003. Eel ATPase Activity as Biomarker of Thiobencarb Exposure. Ecotoxicology and Environmental Safety, 56: 434–441.
- SAXENA, T.B., ZACHARIASSEN, K.E., and JORGENSEN, L., 2000. Effects of Ethoxyquin on the Blood Composition of Turbot, *Scophthalmus maximus* L. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 127: 1–9.
- SHEPHARD, K., and SIMKISS, K., 1978. The Effects of Heavy Metal Ions on Ca^{+2} ATPase Extracted from Fish Gills. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 61: 69-72.
- SILVESTRE, F., TRAUSCH, G., and DEVOS, P., 2005. Hyper-osmoregulatory Capacity of the Chinese Mitten Crab (*Eriocheir sinensis*) Exposed to Cadmium; Acclimation during Chronic Exposure. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 140: 29–37.
- STAGG, R., GOKSOYR, A., and RODGER, G., 1992. Changes in Branchial Na^+,K^+ -ATPase, Metallothionein and P450 1A1 in Dab *Limanda limanda* in 194 the German Bight: Indicators of Sediment Contamination? Marine Ecology Progress Research, 91: 105-115.

- TORREBLANCA, A., RAMO, J.D., ARNAU, J.A., and DIAZ-MAYANS, J., 1989. Cadmium, Mercury, and Lead Effects on Gill Tissue of Freshwater Crayfish *Procambarus clarkii* (Girard). *Biological Trace Element Research*, 21: 343-347.
- VARANASI, U., GMUR, D.J., 1978. Influence of water-borne and dietary calcium on the uptake and retention of lead by coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 46: 65-75.
- VERBOST, P. M., FLIK, G., LOCK, R. A. C. and WENDELAAR BONGA, S. E., 1987. Cadmium Inhibition of Ca^{2+} Uptake in Rainbow Trout Gills. *Am. J. Physiol.* 253, 216-221.
- VERBOST, P.M., FLIK, G., LOCK, R.A.C., and WENDELAAR BONGA, S.E., 1988. Cadmium Inhibits Plasma Membrane Calcium Transport. *Journal of Membrane Biology*, 102: 97-104.
- VERBOST, P. M., FLIK, G., LOCK, R. A. C., and WENDELAAR BONGA, S. E., 1989. The Movement of Cadmium Through Freshwater Trout Branchial Epithelium and Its Interference With Calcium Transport. *J. Exp. Biol.* 145: 185-197.
- VIARENGO, A., 1994. Heavy Metal Cytotoxicity in Marine Organism: Effects on Ca^{2+} Homeostasis and Possible Alteration of Signal Transduction Pathways. In: Gilles, R. (Ed.), *Comp. and Environ. Physiol.* Springer, Berlin, 85-110.
- VIARENGO, A , 1981. The Effects of Zinc on Branchial Adenosine Triphosphatase Enzymes In Vitro from Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 68: 167-173.
- WATSON, C.F., and BENSON, W.H., 1987. Comparative Activity of Gill ATPase in Three Freshwater Teleosts Exposed to Cadmium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 14: 252-259.
- WHEELER, K.P., WHITTAM. R., 1962. Some properties of a kidney adenosine triphosphatase relevant to active cation transport. *Biochem J.*, 85:495–507.
- WHO, 1992. Cadmium Environmental aspects. *Environmental Health Criteria No. 135*. World Health Organisation (WHO), The International Programme on Chemical Safety (IPCS), Geneva.

- WINNER, R. W., and GAUSS, J. D., 1986. Relationship Between Chronic Toxicity and Bioaccumulation of Copper, Cadmium and Zinc As Affected by Water Hardness and Humic Acid. *Aquatic Toxicology*, 8: 149-161.
- WONG, C.K.C., and WONG, M.H., 2000. Morphological and Biochemical Changes in the Gills of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to Ambient Cadmium Exposure. *Aquatic Toxicology*, 48: 517–527.
- YAZKAN, M., ÖZDEMİR, F., GÖLÜKÇÜ, M., 2004. Cu, Zn, Pb and Cd contents in some molluscs and crustacea caught in the Gulf of Antalya. (in Turkish). *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 28:95-100.
- ZOHOURİ, M.A., PYLE, G.G., WOOD, C.M., 2001. Dietary Ca^{2+} inhibits water-borne Cd uptake in Cd-exposed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 130: 347-356.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Antalya’da doğdu. İlköğretime Alanya’da başlayıp, Mersin Bahçelievler İlköğretim okulunda tamamladı. Lise öğrenimini Mersin 19 Mayıs Anadolu Lisesi’nde tamamladıktan sonra 2006 yılında kazandığı Çukurova Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2010 yılında mezun oldu.

2010 yılı Eylül ayında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde Yüksek Lisans eğitime başladı.

EKLER

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

Gün	Doku	Solungaç	Bağırsak	Kas
Akut	15 mg/L Ca^{+2}	-	-	-
	30 mg/L Ca^{+2}	120 ↑*	47 ↑*	59 ↑*
	60 mg/L Ca^{+2}	25 ↑	100 ↑*	80 ↑*
	15 mg/L $\text{Ca}^{+2} + \text{Cd}^{+2}$	70 ↑#	80 ↑#	6 ↑
	30 mg/L $\text{Ca}^{+2} + \text{Cd}^{+2}$	54 ↓#	27 ↓#	91 ↓#
	60 mg/L $\text{Ca}^{+2} + \text{Cd}^{+2}$	66 ↓#	28 ↑	59 ↓#
Kronik	15 mg/L Ca^{+2}	-	-	-
	30 mg/L Ca^{+2}	31 ↓*	33 ↑	30 ↑
	60 mg/L Ca^{+2}	37 ↓*	34 ↑	345 ↑*
	15 mg/L $\text{Ca}^{+2} + \text{Cd}^{+2}$	4 ↓	1 ↑	7 ↓
	30 mg/L $\text{Ca}^{+2} + \text{Cd}^{+2}$	25 ↑	51 ↓#	30 ↑
	60 mg/L $\text{Ca}^{+2} + \text{Cd}^{+2}$	70 ↓#	40 ↓#	45 ↓#

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

Gün	Doku	Solungaç	Bağırsak
Akut	15 mg/L Ca^{+2}	-	-
	30 mg/L Ca^{+2}	4 ↑	37 ↑*
	60 mg/L Ca^{+2}	7 ↓	86 ↑*
	15 mg/L $Ca^{+2} + Cd^{+2}$	40 ↑	32 ↑#
	30 mg/L $Ca^{+2} + Cd^{+2}$	13 ↑	23 ↑#
	60 mg/L $Ca^{+2} + Cd^{+2}$	18 ↓	8 ↓
Kronik	15 mg/L Ca^{+2}	-	-
	30 mg/L Ca^{+2}	24 ↑	93 ↑*
	60 mg/L Ca^{+2}	9 ↓	47 ↑
	15 mg/L $Ca^{+2} + Cd^{+2}$	18 ↑	23 ↑
	30 mg/L $Ca^{+2} + Cd^{+2}$	6 ↑	54 ↓#
	60 mg/L $Ca^{+2} + Cd^{+2}$	83 ↓#	12 ↓

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

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

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

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