

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ali EROĞLU

**KADMİYUM, ÇİNKO VE KADMİYUM+ÇİNKO ETKİSİNDE KALAN
TATLI SU BALIĞI *Oreochromis niloticus*'da ATPaz TEPKİLERİNİN
BELİRLENMESİ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2011

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KADMIYUM, ÇİNKO VE KADMIYUM+ÇİNKO ETKİSİNDE KALAN
TATLI SU BALIĞI *Oreochromis niloticus*'da ATPaz TEPKİLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Ali EROĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

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

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

.....
Yrd. Doç. Dr. Mehmet SULANÇ
ÜYE

.....
Yrd. Doç. Dr. Gülizar ATLI
ÜYE

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. İlhami YEĞİNGİL
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FEF.2011.YL.7

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

KADMİYUM, ÇİNKO VE KADMİYUM+ÇİNKO ETKİSİNDE KALAN TATLISU BALIĞI *Oreochromis niloticus*'da ATPaz TEPKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Ali EROĞLU

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman :Prof. Dr. Mustafa CANLI
Yıl : 2011, Sayfa: 58
Jüri :Prof. Dr. Mustafa CANLI
:Yrd. Doç. Dr. Mehmet SULANÇ
:Yrd. Doç. Dr. Gülizar ATLI

Bu çalışmada 1 µg/mL derişimindeki Cd⁺² ve Zn⁺² in ayrı ayrı ve birlikte etkilerine farklı sürelerde (0, 7, 14, 21 ve 28 gün) maruz kalan tatlısu balığı *Oreochromis niloticus*'un farklı dokularında ATPaz grubu enzimlerin (Na⁺/K⁺-ATPaz, Mg⁺²-ATPaz ve Ca⁺²-ATPaz) tepkileri incelenmiştir. Deney süreleri sonunda balıklarda solungaç dokusunda Na⁺/K⁺-ATPaz, Mg⁺²-ATPaz ve Ca⁺²-ATPaz aktiviteleri ile kas dokusunda Ca⁺²-ATPaz aktiviteleri ölçülmüştür. Balıklar deney koşullarında 28 gün yaşarken herhangi bir sağlık sorunu gözlenmemiştir. Metallerin ayrı ayrı ve birlikte etkisinde kalan balıklarda solungaç ve kas ATPaz aktivitelerinde bazı önemli değişimler görülmüştür. Buna göre Na⁺/K⁺-ATPaz ve Ca⁺²-ATPaz aktiviteleri metal türü, metallerin ayrı ayrı ve birlikteki etkileri, etki süresi ve doku tipine bağlı olarak genellikle azalış yönünde bir değişim gösterirken, Mg⁺²-ATPaz aktivitelerinde anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Balıkların doku protein düzeylerinde ise genel olarak bir değişim görülmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Metal, Etkileşim, *Oreochromis niloticus*, ATPaz

ABSTRACT

MSc THESIS

DETERMINATION of the RESPONSE OF ATPases in FRESHWATER FISH <i>Oreochromis niloticus</i> EXPOSED to CADMIUM, ZINC AND CADMIUM+ZINC
--

Ali EROĞLU

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

Supervisor :Prof. Dr. Mustafa CANLI

Year : 2011, Page: 58

Jury :Prof. Dr. Mustafa CANLI

:Asst. Prof. Dr. Mehmet SULANÇ

:Asst. Prof. Dr. Gülözar ATLI

In this study the responses of ATPases (Na^+/K^+ -ATPase, Mg^{2+} -ATPase and Ca^{2+} -ATPase) in different tissues of a freshwater fish *Oreochromis niloticus* to 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentration of Cd^{2+} and Zn^{2+} at different periods (0, 7, 14, 21 and 28 days) were investigated. At the end of experimental periods, the activities Na^+/K^+ -ATPase, Mg^{2+} -ATPase in gill tissues and Ca^{2+} -ATPase activity in muscle tissues were measured. While living under the experimental conditions, fish did not have any health problem. There were some significant alterations in ATPase activities in gill and muscle tissues of fish exposed to metals as single or combination. According to the results, there were general declining trends in Na^+/K^+ -ATPase and Ca^{2+} -ATPase activities in regard to metal type, single or combined exposures, period of exposures, and tissues, though there was no significant alteration in Mg^{2+} -ATPase activity. There was also no considerable change in tissue total protein levels of fish.

Keywords: Metal, Interaction, *Oreochromis niloticus*, ATPase

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince fikir ve görüşleriyle desteğini eksik etmeyip bana yüksek lisans yapma fırsatı veren danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa CANLI'ya ve bu süreçte çalışmalarımda bana yol gösteren Sayın Yrd. Doç. Dr. Gülüzar ATLI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Bu süre içerisinde dostluğu ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan değerli arkadaşlarım Ceren Gürler, Zehra Doğan, Emine Baysoy ve Dilek Arslan'a teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca her anlamda beni destekleyen ve yanımda olan sevgili annem Emine EROĞLU, babam İsrail EROĞLU, kardeşlerim Tuğba, Eren ve Mehtap EROĞLU, nişanlım Şerife KINIK ve annesi Hatice KINIK'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kadmiyum.....	3
1.2. Çinko.....	4
1.3. Adenozin Trifosfataz (ATPaz) Enzimleri.....	5
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	11
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	15
3.1. Materyal.....	15
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	15
3.1.1.1. Metaller ve Asitler.....	15
3.1.1.2. ATPaz Aktivite Ölçümünde Kullanılan Kimyasallar.....	15
3.1.1.3. Protein Analizinde Kullanılan Kimyasallar.....	16
3.1.2. Kullanılan Ekipmanlar.....	16
3.2. Yöntem.....	16
3.2.1. Doku Homojenatlarının Hazırlanışı.....	17
3.2.2. ATPaz Enzim Aktivitelerinin Ölçümü.....	18
3.2.3. İnorganik Fosfat Tayini.....	19
3.2.4. Toplam Protein Analizi.....	20
3.2.5. ATPaz Aktivitesinin Hesaplanması.....	23
3.2.6. Metal Değişiminin Hesaplanması.....	23
3.2.7. İstatistik.....	24
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	25
4.1. Bulgular.....	25
4.1.1. ATPaz Aktivitesi.....	25

4.1.1.1. Kadmiyum.....	25
4.1.1.2. Çinko.....	28
4.1.1.3. Kadmiyum+Çinko.....	31
4.1.2. Toplam Protein Düzeyi.....	33
4.1.2.1. Kadmiyum.....	34
4.1.2.2. Çinko.....	35
4.1.2.3. Kadmiyum+Çinko.....	37
4.2. Tartışma.....	38
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	45
5.1. Sonuçlar.....	45
5.2. Öneriler.....	45
KAYNAKLAR.....	47
ÖZGEÇMİŞ.....	57
EKLER.....	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1. Akvaryum sularının fizikokimyasal özellikleri (Art. Ort. $\pm$ S.D. N=44).....	17
Çizelge 3.2. Dokularda en yüksek ATPaz enzim aktivitesinin ölçüldüğü ortam koşulları ve inkübasyon ortamındaki iyonların son iyon derişimleri.....	18
Çizelge 3.3. Metal standartları ile absorbanları arasındaki regresyon eşitlikleri.....	24
Çizelge 3.4. Akvaryum sularındaki Cd^{+2} ve Zn^{+2} düzeyleri (Art. Ort. $\pm$ S.D. N=44).....	24
Çizelge 4.1. Kontrol grubu balıklarda solungaç ve kas ATPaz aktiviteleri (μ mol Pi/mg prot./sa.).....	25
Çizelge 4.2. Kontrol grubu balıklarda solungaç ve kas toplam protein düzeyleri (mg/g y.a.).....	34

Şekil 1.1. Epitelyum hücrelerinde metal transferi.....	5
Şekil 1.2. Na^+/K^+ -ATPaz'ın yapı ve karakteristikleri.....	6
Şekil 1.3. Na^+/K^+ Pompası.....	8
Şekil 1.4. Sarkolemma ve Sarkoplazmadaki kalsiyum (Ca^{+2}) akışının kontrolü.....	9
Şekil 3.1. Fosfat derişiimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki.....	20
Şekil 3.2. Sığır albumininden hazırlanan standart derişimler ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki.....	22
Şekil 4.1. Kadmiyumun (1 $\mu\text{g/mL}$) farklı sürelerde <i>Oreochromis niloticus</i> 'un solungaç Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesine etkileri.....	26
Şekil 4.2. Kadmiyumun (1 $\mu\text{g/mL}$) farklı sürelerde <i>Oreochromis niloticus</i> 'un solungaç Mg^{+2} -ATPaz aktivitesine etkileri.....	27
Şekil 4.3. Kadmiyumun (1 $\mu\text{g/mL}$) farklı sürelerde <i>Oreochromis niloticus</i> 'un solungaç Ca^{+2} -ATPaz aktivitesine etkileri.....	27
Şekil 4.4. Kadmiyumun (1 $\mu\text{g/mL}$) farklı sürelerde <i>Oreochromis niloticus</i> 'un kas Ca^{+2} -ATPaz aktivitesine etkileri.....	28
Şekil 4.5. Çinkonun (1 $\mu\text{g/mL}$) farklı sürelerde <i>Oreochromis niloticus</i> 'un solungaç Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesine etkileri.....	29
Şekil 4.6. Çinkonun (1 $\mu\text{g/mL}$) farklı sürelerde <i>Oreochromis niloticus</i> 'un solungaç Mg^{+2} -ATPaz aktivitesine etkileri.....	29
Şekil 4.7. Çinkonun (1 $\mu\text{g/mL}$) farklı sürelerde <i>Oreochromis niloticus</i> 'un solungaç Ca^{+2} -ATPaz aktivitesine etkileri.....	30
Şekil 4.8. Çinkonun (1 $\mu\text{g/mL}$) farklı sürelerde <i>Oreochromis niloticus</i> 'un kas Ca- ATPaz aktivitesine etkileri.....	30
Şekil 4.9. Kadmiyum+Çinko (1 $\mu\text{g/mL}$ -1 $\mu\text{g/mL}$) etkileşiminin farklı sürelerde <i>Oreochromis niloticus</i> 'un solungaç Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesine etkileri.....	31
Şekil 4.10. Kadmiyum+Çinko (1 $\mu\text{g/mL}$ -1 $\mu\text{g/mL}$) etkileşiminin farklı sürelerde <i>Oreochromis niloticus</i> 'un solungaç Mg^{+2} -ATPaz aktivitesine etkileri.....	32

Şekil 4.11. Kadmiyum+Çinko (1 µg/mL-1 µg/mL) etkileşiminin farklı sürelerde <i>Oreochromis niloticus</i> 'un solungaç Ca^{+2} -ATPaz aktivitesine etkileri.....	32
Şekil 4.12. Kadmiyum+Çinko (1 µg/mL-1 µg/mL) etkileşiminin farklı sürelerde <i>Oreochromis niloticus</i> 'un kas Ca^{+2} -ATPaz aktivitesine etkileri.....	33
Şekil 4.13. Kadmiyumun (1 µg/mL) farklı sürelerde <i>Oreochromis niloticus</i> 'un solungaç protein düzeyine etkileri.....	34
Şekil 4.14. Kadmiyumun (1 µg/mL) farklı sürelerde <i>Oreochromis niloticus</i> 'un kas protein düzeyine etkileri.....	35
Şekil 4.15. Çinkonun (1 µg/mL) farklı sürelerde <i>Oreochromis niloticus</i> 'un solungaç protein düzeyine etkileri.....	36
Şekil 4.16. Çinkonun (1 µg/mL) farklı sürelerde <i>Oreochromis niloticus</i> 'un kas protein düzeyine etkileri.....	36
Şekil 4.17. Kadmiyum+Çinko (1 µg/mL-1 µg/mL) etkileşiminin farklı sürelerde <i>Oreochromis niloticus</i> 'un solungaç protein düzeyine etkileri.....	37
Şekil 4.18. Kadmiyum+Çinko (1 µg/mL-1 µg/mL) etkileşiminin farklı sürelerde <i>Oreochromis niloticus</i> 'un kas protein düzeyine etkileri.....	38

1. GİRİŞ

Sucul ortamlar, insanoğlunun yol açtığı çeşitli aktiviteler sonucu ksenobiyotik kirliliğinden etkilenmektedir. Bunlardan ağır metaller ve pestisitler oldukça zararlı etkiler göstermekte olup bu etkileri biyolojik birikimleri ile artış gösterebilmektedir (De la Torre ve ark, 2000). Endüstri, ziraat ve madencilikte yaygın olarak kullanılan ve ekolojik tehlike oluşturan bakır, civa, kurşun, kadmiyum vb. ağır metalleri içeren çeşitli kimyasalların kullanımlarındaki artışın çevreyi kirlettiği bilinmektedir. Atmosferik depozisyon, atıklar, aerosol presipitasyonu ve yağmurların yıkayıcı etkisiyle ve diğer kaynaklar aracılığı ile çevreye yayılan ağır metallerin çoğu için son durak olması nedeniyle sucul ortamlar hassas olarak kontrol edilmesi gereken biyotoplardır.

Yapılan birçok çalışma ile ağır metallerin yüksek derişimlerde sucul organizmalar için letal olduğu gösterilmiştir (Eisler ve Hennekey, 1977; Mance, 1987; Canlı, 1995). Sucul bir organizma için letal doz, hem metale hem de organizmaya bağlıdır. Metallerin organizmalara olan toksik etkilerinin kimyasal yapıları ile doğrudan ilişkili olduğu ve biyolojik olarak parçalanma özelliği göstermediklerinden ekosistemde uzun süre kalabildikleri bilinmektedir (Tagliari ve ark., 2004). Metallerin toksik etkileri ile ilgili yapılan çalışmalar, metallerin birlikte yaptıkları etkilerden çok tek başına yaptıkları etkileri içermektedir (Lange ve ark., 2002). Metallerin birlikteki etkileri sinerjistik, antogonistik veya toplam etki şeklinde gözlenebilmektedir. Metal etkileşimleri metallerin emilim, dağılım, atılım ve aynı zamanda biyolojik fonksiyonlarını etkileyebilmektedir (Heath, 1987).

Metaller, sadece önemli bir ekosistem bileşeni değil aynı zamanda besin kaynağı olarak da kullanılan balıklarda fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmaların bütünlüğünü bozabilmektedir (Hogstrand ve ark., 1999; Basha ve Rani, 2003). Balıklar ortamdaki ağır metali besin, su ve vücut yüzeyinden absorbsiyon yoluyla, en çok da solungaçlar aracılığıyla almaktadır (Simkiss ve Taylor, 1989; Viarengo, 1989). Balıklarda solungaç gaz alış verişi, asit baz dengesi, iyon (Na^+ , Cl^- ve Ca^{+2}) taşınması ve azotlu atıkların atımında görev alan çok fonksiyonlu bir organdır. Solungaçlar sekonder lamellerin bulunduğu bir çift primer filament içeren 4 çift

solungaç yayından oluşmuştur. Böylece solungaç epitelyumu iyon taşınması ve gaz alış verişini kolaylaştırmak için dış ortamla etkileşecek geniş bir yüzey alanı sağlarlar. Buna karşılık yüksek damarlı yapıya sahip olması nedeniyle epitelyum aynı zamanda toksik maddeler için birincil hedef olmaktadır (Watson ve Benson, 1987; Wong ve Wong, 2000; Garcia-Santos ve ark., 2006).

Cu^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} , Co^{+2} , Se^{+4} ve Mn^{+2} gibi geçiş metalleri, biyolojik fonksiyonlarda görev alan proteinlerin integral bileşenlerini oluşturdıklarından birçok organizma için gerekli olmalarına karşın Hg^{+2} , Cd^{+2} , Pb^{+2} ve Ag^{+} gibi bazı ağır metallerin gerekli olduğuna ilişkin herhangi bir kanıt bulunmamaktadır. Metaller vücutta biriktirildikleri zaman, metabolik yollar bu metalleri besin değerlerine veya toksik özelliklerine dayanarak elimine etmekte, alıkoymakta ya da bu metallerden faydalanabilmektedir (Engel ve Brouwer, 1984). Çevreden alınan metaller genellikle proteinlere bağlanarak kan yoluyla, depo bölgelerine veya transformasyon yada depolama için karaciğere taşınmaktadır. Bir şekilde kontrol edilemeyen metaller, imidazol, karboksil ve özellikle sülfidril grubu içeren proteinler üzerinde çeşitli bölgelere bağlanabilmekte ve bunun sonucunda düzenleyici fonksiyonların kaybına yol açabilecek konformasyonel değişikliklere neden olmaktadır (Heath, 1987).

Sucul organizmalar, akut metal kontaminasyonun etkisinde daha az kalırken, daha çok uzun süreli ve düşük düzeydeki derişimlerinin etkisinde kalırlar. Kronik ve akut stres farklı ekolojik şartları belirtmektedir ve organizmalar bu şartlara özel moleküler, biyokimyasal, fizyolojik veya morfolojik tepkilerle dayanmaktadır. Bu anlamda kronik stresin genellikle letal toksik madde derişimine artan dirençlilik olarak tanımlanan olası uyum mekanizmalarını indüklediği bilinmektedir (Silvestre ve ark., 2005).

1.1. Kadmiyum

Kadmiyum, kömür üretimi, madensel atıklar, çinko rafinerisi, demir ve çelik ürünleri, pestisit ürünleri gibi çeşitli endüstriyel ve insan kaynaklı aktivitelere bağlı olarak doğal ortamlarda düzeyi giderek artan toksik bir elementtir (USEPA, 2001; Garcia-Santos ve ark., 2006). Sucul canlılarda Cd^{+2} etkisi sonrasında hematolojik etkiler, Ca^{+2} homeostazisinde bozulmalar, iyonların düzenlenmesinde görev alan böbrek, solungaç ve bağırsak dokularında histolojik ve morfolojik değişiklikler, hücre dışı sıvılarda iyon derişiminde değişiklikler ve osmoregülatör kapasitede değişimler gözlenebilmektedir (Garcia-Santos ve ark., 2006).

Tatlı sularda Cd^{+2} , 0.1 $\mu g/L$ 'den küçük derişimlerinde bulunurken, insan kaynaklı atıkların karışabildiği su ortamlarında ise bu değer birkaç $\mu g/L$ veya daha yüksek düzeylere çıkabilmektedir (USEPA, 2001; Garcia-Santos ve ark., 2006). Parçalanamayan bir kirletici olan Cd^{+2} 'nin yüzyıllardır besinsel düzeyleri değiştirdiği ve özellikle tatlı su balıklarına yüksek toksisite gösterdiği belirtilmiştir. WHO (1992) tarafından verilen bilgilere göre Cd^{+2} , tatlı su organizmaları üzerinde geniş çaplı ekolojik ve fizyolojik etkilere sahiptir. Kısa süreli (akut) Cd^{+2} etkisi sonrasında sucul canlılarda hematolojik etkiler, Ca^{+2} homeostazisinde bozulmalar, iyonların düzenlenmesinde görev alan böbrek, solungaç ve bağırsak dokularında histolojik ve morfolojik değişiklikler, hücre dışı sıvılarda iyon derişiminde değişiklikler ve osmoregülatör kapasitede değişimler gözlenebilmektedir (Garcia-Santos ve ark., 2006). Cd^{+2} , toksik etki göstermesi, çevrede yaygın dağılımı ve düşük düzeylerde bile organizmalarda yan etkilere yol açması nedeniyle ekolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan bir metaldir. Ayrıca Cd^{+2} etkisinin karaciğer, beyin, sinir sistemi, böbrek, dalak ve kemikte patolojik lezyonlara neden olduğu bilinmektedir. Balıklarda Cd^{+2} etkisi sonrasında büyümede gerilik, solungaçlarda Ca^{+2} alımında inhibisyon ve karaciğer fonksiyonlarında değişiklik gözlenebilmektedir. Balıklar önemli bir besin kaynağı ve ekosistem bileşeni olduğundan, Cd^{+2} 'nin balıklardaki biyokimyasal ve fizyolojik etkilerin değerlendirilmesi önemlidir (Almeida ve ark., 2002). Bununla birlikte Cd^{+2} , Na^{+}/K^{+} -ATPaz gibi solungaçlarda iyon taşınmasında görev alan enzimleri inhibe ederek solungaçlarda iyon geçirgenliğinde artışa neden

olmaktadır (De la Torre ve ark., 2000; Silvestre ve ark., 2005). Cd^{+2} alınımı daha çok yüksek affiniteli Ca^{+2} kanallarıyla gerçekleşmektedir. Cd^{+2} etkisi ile azalan Ca^{+2} akışı, bazolateral Ca^{+2} -ATPazların inhibisyonu ile açıklanabilmektedir (Foulkes, 1980; George, 1991). Bu inhibisyon, hücre içi Ca^{+2} artışı ve hücre yüzeyinden Ca^{+2} girişinin engellenmesi sonucu hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır. Hücrelerdeki enzim havuzlarından Zn^{+2} ve Cu^{+2} ile yer değiştirebilen Cd^{+2} , Cu^{+2} ve Zn^{+2} homeostasisini bozmaktadır (Bay ve ark., 1990). Cd^{+2} bağırsaktan absorbe edilerek depo bölgelerine öncelikle de karaciğere taşınmakta ve karaciğerde metallothioneine bağlanarak böbreklere taşınmaktadır (Roesijadi, 1992).

Sucul ortamlarda erken safhada Cd^{+2} 'nin zararlı etkilerinin saptanmasında yeni yöntemlerin geliştirilmesi ve çeşitli belirteçlerin kullanılması oldukça önem kazanmaktadır (Almeida ve ark., 2001).

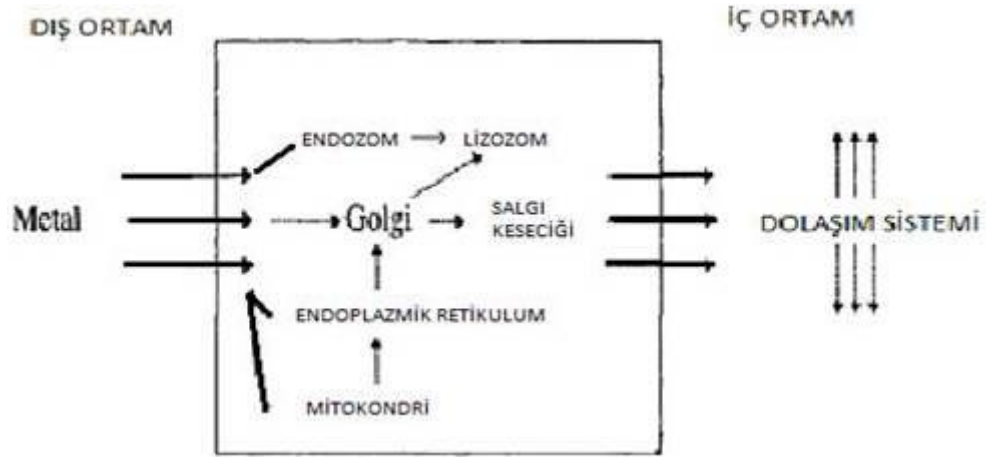
1.2. Çinko

Çinko; büyüme, hücre bölünmesi, metabolizma, bağışıklık, üreme gibi çeşitli fizyolojik mekanizmalar için gerekli olan divalent geçiş elementidir. Oksidoredüktaz, transferaz, hidrolaz, liyaz, izomeraz ve ligazları içeren 300'den fazla enzim üzerinde önemli biyokimyasal rolü vardır. Zn^{+2} içeren enzimler, genetik materyalin replikasyonu, transkripsiyonu ve translasyonunda görev almaktadır (Ohnesorge ve Wilhelm, 1991). Kemik oluşumu, hücreler arası bağışıklık ve doku gelişiminde de fonksiyon gören Zn^{+2} 'nin, taşınması homeostatik olarak kontrol edilmekte ve özel taşıyıcı sistemler tarafından düzenlenmektedir. Zn^{+2} , pasif taşıma, amino asitlerle bileşik oluşturma veya $\text{Zn}^{+2}/\text{Ca}^{+2}$ antiportu ile taşınabilmektedir.

Toksik olarak kabul edilmemesine karşın Zn^{+2} , yüksek düzeylerde çeşitli hasarlara neden olabilmektedir. Balıkta letal Zn^{+2} düzeyleri yapılan çalışmalara göre çeşitlilik göstermekle birlikte, subletal derişimlerinde balıkta büyümeyi inhibe ettiği, yüzme hareketlerini, davranış ve kan kimyasını değiştirdiği ve doğurganlık ile osmoregülatör kapasiteyi bozduğu belirtilmiştir (Watson ve Beamish, 1981). Cd^{+2} gibi Zn^{+2} de Ca^{+2} bağlayan bölgelerde doğrudan Ca^{+2} ile yarışabilmekte ve sonuçta hipokalsemi ve balık ölümlerine neden olabilmektedir (Rogers ve ark., 2003). Zn^{+2}

etkisinde *Tilapia zillii*'de serum asit fosfataz (ACP) ve karaciğer alkale fosfataz (ALP) düzeylerinde azalma görüldüğü belirtilmiştir (Hilmy ve ark., 1988; Heath, 1987). Bunun yanında artan Zn^{+2} derişimlerinin sazanda, katalaz gibi antioksidan enzimler ve kanda çeşitli biyokimyasal parametrelerde değışikliğe neden olduğı bildirilmiştir (Akahori ve ark., 1999., Atli ve ark., 2006., Atli ve Canli., 2010).

Cd^{+2} ve Zn^{+2} kimyasal olarak benzer metaller olduklarından benzer taşıma yollarıyla vücuda alınabilmektedir. Bununla birlikte Cd^{+2} alımının Zn^{+2} varlığında çeşitli hücre modellerinde baskılandığı belirtilmiştir (Heath, 1987; Chen ve ark., 2008). Zn^{+2} derişimindeki artışa bağı Cd^{+2} alımının baskılanması Cd^{+2} ve Zn^{+2} arasında taşıma bölgelerindeki $-SH$ grupları için yarışmalarından kaynaklanabilmektedir (Chen ve ark., 2008). Bununla birlikte araştırmacılar Cd^{+2} 'nin Zn^{+2} alım kinetikleri üzerinde çok az etkisinin olduğunu belirtmişlerdir. Cd^{+2} ve Zn^{+2} 'nin çoğunlukla $-SH$ aracılığında taşıma mekanizmalarıyla taşındığı ve bu mekanizmanın da Zn^{+2} 'den çok Cd^{+2} için önemli olduğu belirtilmektedir.

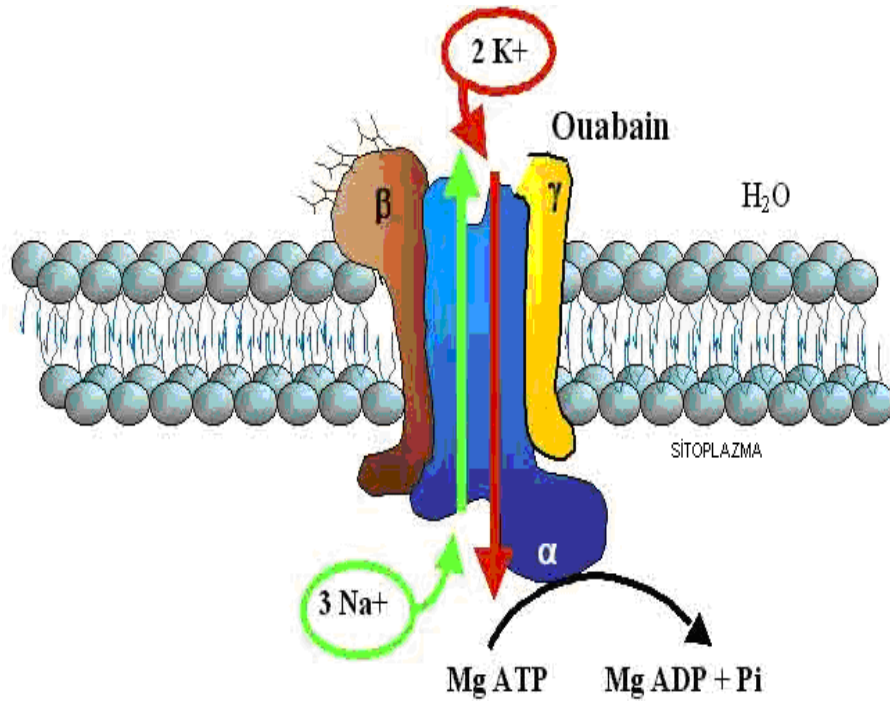


Şekil 1.1. Epitelyum hücrelerinde metal transferi

1.3. Adenozin Trifosfataz (ATPaz) Enzimleri

Adenozin trifosfataz (ATPaz) enzimleri hücre içi fonksiyonlarda iyon pompası olarak önemli rol oynayan membrana bağı bir enzim grubudur. ATPaz'lar

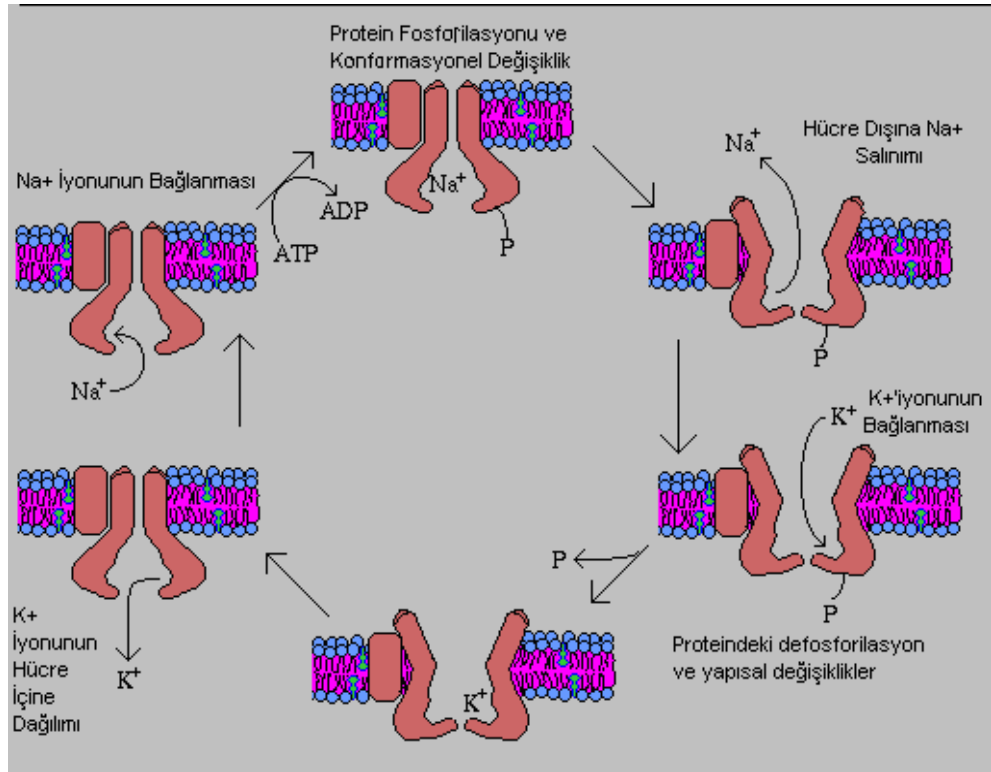
dokulardaki iyon hareketleri, osmotik basınç, membran geçirgenliği üzerinde ve yüksek enerjili metabolik transformasyonların kontrolünde önemli görevlere sahiptir. Bu enzimler yüksek elektronegatif özellik göstermeleri nedeniyle geçiş metallerine oldukça duyarlıdır (Riedel ve Christensen, 1979; Watson ve Beamish, 1981; Thaker ve ark., 1996). Bunlar arasında, Na^+/K^+ -ATPaz, Ca^{+2} -ATPaz ve Mg^{+2} -ATPaz'lar iyi bilinen ATPaz'lardandır. Bu enzim aktivitelerinin Cr^{+6} , Cu^{+2} , Pb^{+2} , Hg^{+2} ve Zn^{+2} gibi metaller tarafından etkilenebildiği belirtilmiştir (Shephard ve Simkiss, 1978, Watson ve Beamish, 1980).



Şekil 1.2. Na^+/K^+ -ATPaz'ın yapı ve karakteristikleri
(<http://www.bioscience.org/2001/v6/d/watson/figures.htm>'den)

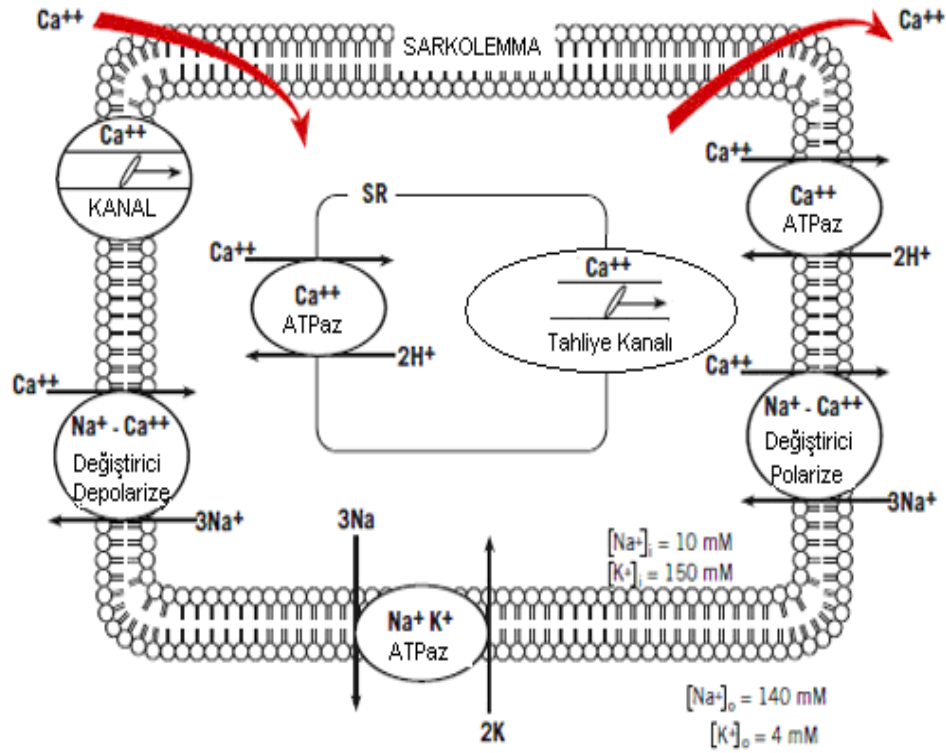
Na^+/K^+ -ATPaz enzimi, hücre içi üç Na^+ 'yı hücre dışı iki K^+ ile değiştirir (Şekil 1.2.). Bu ATP bağımlı elektriksel değişim, hücre içini polarize ederek apikal membrandan Na^+ girişi için elektrokimyasal gradient oluşturur. Na^+/K^+ -ATPaz enziminin kemikli balıkların solungaç epitellerinde çoğunlukla mitokondrice zengin hücrelerde yer aldığını göstermiştir. Na^+/K^+ -ATPaz enzimi, P tipi ATPaz grubunda olup heterodimerik integral membran proteinidir. Enzim 100 kDa moleküler

ağırlığında α alt ünitesi ile 60 kDa moleküler ağırlığındaki glikozitlenmiş β alt ünitesinden oluşmaktadır. Sucul organizmalar dikkate alındığında Na^+/K^+ -ATPaz'ın iyon düzenlenmesinde yaşamsal bir öneme sahip olduğu bilinmektedir ve Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesindeki olası değişikliklerin doğal stres kaynaklarında olduğu gibi çeşitli çevresel kirleticilere tepki olarak geliştiği gözlenmiştir. Cu^{+2} , Ag^+ , Cd^{+2} , Zn^{+2} ve Hg^{+2} ; tatlı su ve deniz balıklarında Na^+/K^+ -ATPaz inhibisyonu ile bağlantılı osmoregülasyonda bozulmalara neden olan metaller arasındadır (Bianchini ve Wood, 2003; Bianchini ve ark., 2004, 2006). Mg^{+2} -ATPaz enzimi, solungaç epitelyumundan hücre membran bütünlüğü, solungaç geçirgenliğinin stabilizasyonu için gerekli olan Mg^{+2} 'nin taşınmasında ve oksidatif fosforilasyonda görev görmektedir (Parvez ve ark., 2006). Ca^{+2} -ATPaz ise sarkoplazmik retikulum tübüllerinde lokalize olmakta ve ATP hidrolizinden açığa çıkan enerjiyi kullanarak sitoplazmadan Ca^{+2} 'nin uzaklaştırılmasında ve böylece düşük hücrel Ca^{+2} içeriğinin korunmasında görev almaktadır (Watson ve Beamish, 1981; Saxena ve ark., 2000) (Şekil 1.4.). Ca^{+2} -ATPaz, Ca^{+2} metabolizmasındaki önemi ve yapısındaki fonksiyonel -SH gruplarına bağlı olarak ağır metal etkisinde inhibe olması ile kirlilik çalışmalarında büyük önem kazanmaktadır (Shephard ve Simkiss, 1978; Wong ve Wong, 2000).



Şekil 1.3. Na⁺/K⁺ Pompası
(<http://life.nthu.edu.tw/~b830473/Na-Kpump.html>'den)

Metal varlığında solungaç ATPaz aktiviteleri inhibe olabilmekte veya uyarılabilmektedir (Watson ve Beamish, 1980, Watson ve Benson, 1987; Alves ve Wood, 2006). Örneğin, Kuhnert ve ark. (1976), in vivo Cr⁺⁶ etkisindeki alabalık *Salmo gairdneri*'nin solungaç dokusunda Mg⁺²-ATPaz'ın aksine Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesinde inhibisyon gözlemiştir (Kuhnert ve ark., 1976). Buna karşın, alabalığın solungaç dokusunda in vitro Zn⁺²'nin Mg⁺²-ATPaz, Ca⁺²-ATPaz ve Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitelerinde inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir (Watson ve Beamish, 1980). Çoğunlukla klorit hücrelerde bulunan Ca⁺²-ATPaz'ın inhibisyon bölgesinin Ca⁺² bağlayan bölge olduğu ve klorit hücrelerin Cd⁺² toksisitesi için birincil hedef olduğu belirtilmiştir (Flik ve ark., 1985, Verbost ve ark., 1988). Bununla birlikte, *O. niloticus*'da kas Ca⁺²-ATPaz aktivitesinin Cd⁺², Zn⁺² ve Pb⁺²'nin 14 günlük etkisi sonunda azalış gösterdiği kaydedilmiştir (Atli ve Canli, 2007).



Şekil 1.4. Sarkolemma ve Sarkoplazmadaki kalsiyum (Ca^{+2}) akışının kontrolü (http://www.heartandmetabolism.org/dictionnary_mo.asp'den)

Balıklar, sucul ekosistemlerin durumunu ve toksikolojik olarak gelişen patolojiyi değerlendirmede yaygın olarak kullanılan önemli bir biyoindikatördür. Nil tilapyası *O. niloticus*, elde edilişi, kültürü, laboratuarda çalışılması ve toksikolojik araştırmalarda kirleticilere verdiği tepkilerden dolayı iyi bir biyolojik modeldir (Almeida ve ark., 2002; Garcia-Santos ve ark., 2006). Kolayca üreyebilmesi ve beslenme problemi olmaması nedeniyle önemli bir kültür balığı olan *O. niloticus*, çevresel kirliliğe ve hastalıklara karşı da oldukça dirençlidir (Sarıhan ve Toral, 1982; Canlı ve Erdem, 1994). Buna karşılık, ağır metal toksisitesine dirençlilik bu balığın besin kaynağı olarak kullanılmasında istenilen bir özellik değildir, çünkü toksik metallerle kontamine olmuş balıkları tüketen insanlar metal birikiminde hedef olabilmektedir.

Bu çalışmada; 1 $\mu\text{g/mL}$ derişimindeki Cd^{+2} ve Zn^{+2} 'nin tek tek ve birlikteki etkileri sonunda *O. niloticus*'un solungaç Na^+/K^+ -ATPaz, Ca^{+2} -ATPaz ve Mg^{+2} -

ATPaz ile kas Ca^{+2} -ATPaz aktivitesinin ve bu dokulardaki protein düzeylerinin farklı süreler (0, 7, 14, 21 ve 28 gün) sonunda verdiği tepkilerin ölçülmesi amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Shephard ve Simkiss (1978), tatlı su balığı *Rutilus rutilus*'un solungacındaki Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi üzerindeki çalışmalarında enzimin 2 mM Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarının etkisinde en yüksek oranda aktive olduğunu; Na^{+} , K^{+} iyonları veya ouabain tarafından 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 derişiminin altındaki in vivo Cu^{+2} etkisinde ise solungaç Ca^{+2} -ATPaz enzim ünitelerinin artış gösterdiğini kaydetmişlerdir.

Lauren ve McDonald (1987), gökkuşağı alabalığı *Salmo gairdneri*'de 28 gün boyunca 55 μg Cu^{+2}/L etkisini gözlemlemişlerdir. Gözlemler sonucunda solungaçlarda Cu^{+2} birikiminin yanı sıra $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz aktivitesinin 24 saat içerisinde % 33 inhibe olmasına karşın, 14 günden başlayarak mikrozomal proteindeki artış sonucunda total $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz aktivitesinin normal düzeye yaklaştığını bildirmişlerdir.

Li ve ark. (1998), *O. niloticus*'un solungaç dokusunda 3.2 mM Cu^{+2} 'nin 28 günlük etkisinin ardından yapısal değişikliklerle birlikte klorit hücre sayısında farklılıklar gözlemişlerdir. Bu çalışma, solungaç $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz aktivitesi ve plazma Na^{+} düzeyinin Cd^{+2} etki süresi ile azalış gösterdiğini ve $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz aktivitesi ile solungaç Cu^{+2} içeriği arasında ters bir bağıntı olmasının bu enzimin Cu^{+2} 'ya oldukça duyarlı olduğunu göstermiştir.

Akahori ve ark. (1999), *Cyprinus carpio L.*'nin eritrositlerini 20 saat süreyle in vitro 0.1, 0.5 ve 1.0 mM derişimlerdeki Zn^{+2} 'nin etkisine bıraktıktan sonra $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz aktivitesinin ve thiol grup içeriklerinin etkilenmediğini gözlemlemişlerdir. Ancak Zn^{+2} 'nin daha yüksek düzeylerde toksik etki gösterebileceğini belirtmişlerdir.

Ay ve ark. (1999), Cu^{+2} ve Pb^{+2} (0.5-4.0 mg/L) etkisinde 14 gün sonunda *Tilapia zillii*'nin kas, solungaç ve karaciğer dokularında Cu^{+2} ve Pb^{+2} 'nin birikim gösterdiğini, kas dokusunda Cu^{+2} düzeyinin kontrole göre farklı olmadığını bildirmişlerdir. Solungaç $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz aktivitesinin hem Cu^{+2} hem de Pb^{+2} etkisinde derişime bağlı inhibisyon gösterdiği kaydedilmiştir.

McGeer ve ark. (2000), *Oncorhynchus mykiss*'in Cd^{+2} (3 mg/L), Cu^{+2} (75 mg/L) ve Zn^{+2} 'nin (250 mg/L) 100 günlük etkisi sonrasında metallerin balıklarda iyon dengesi ve Na^{+}/K^{+} -ATPaz aktivitesi üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Balıklarda solungaç Na^{+}/K^{+} -ATPaz aktivitesinin Cu^{+2} etkisinde artış gösterdiğini ve Na^{+} ile Ca^{+2} dengesinin tüm vücutta 2 gün içerisinde bozulduğunu belirtmişlerdir. Cd^{+2} etkisinde Ca^{+2} iyon kaybının daha uzun süreli olduğu ve fizyolojik tepkilerin Cu^{+2} etkisinde metabolik gereksinimle ilişkili mekanizmaları içerirken, kronik Cd^{+2} etkisinin ise ilişkili olmadığı gösterilmiştir.

De la Torre ve ark. (2000), sazan *C. carpio*'nun solungaç ATPaz aktivitelerini 14 günlük 1.6 mg Cd^{+2} /L etkisine ve ardından Cd^{+2} içermeyen suda 19 gün süreyle bırakılmalarının ardından ölçmüşlerdir. Na^{+}/K^{+} -ATPaz aktivitesi etki sonunda % 30 inhibe olurken, Mg^{+2} -ATPaz aktivitesi % 70 artış göstermiştir. Mg^{+2} -ATPaz aktivitesinin Cd^{+2} içermeyen suda 19 gün kaldıktan sonra kontrol düzeyine yaklaştığı görülmüştür. Subletal Cd^{+2} etkisinin sazanda osmotik ve iyonik dengeyi sağlayan solungaç ATPaz enzimlerini önemli düzeyde etkileyerek strese neden olduğu belirtilmiştir.

Wong ve Wong (2000), Cd^{+2} 'nin 40, 80 ve 160 ppb derişimlerinin 3 ve 7 günlük etkileri sonunda *O. mossambicus*'un solungaç dokusunda Cd^{+2} birikiminin arttığını, Ca^{+2} -ATPaz aktivitesinin ise Cd^{+2} birikimi ile ters orantılı olarak azalış gösterdiğini bildirmişlerdir.

Cicik ve ark. (2004), *O.niloticus*'un 7-15 gün süreyle Cd^{+2} , Pb^{+2} ve bu iki metalin karışımına maruz kalması sonucunda kas, böbrek, karaciğer, dalak ve solungaç dokularında metal birikim düzeylerini ölçmüşlerdir. Kontrollerle karşılaştırıldığında 7-15 gün süreyle Pb^{+2} , Cd^{+2} ve bu iki metalin karışımında bu dokulardaki metal birikiminin önemli derecede arttığını belirlemişlerdir. En düşük metal birikim düzeyi kas dokularında gözlenirken, 7 günlük etki sonunda böbrek ve kas dokusunun dışındaki dokularda Cd^{+2} birikimi bakımından istatistiksel bir fark olmadığını kaydetmişlerdir. Buna karşın 15. gün sonunda doku ve organlardaki Cd^{+2} birikim düzeyleri böbrek > karaciğer > dalak > solungaç > kas şeklinde sıralanmıştır. Bununla birlikte 15. gün sonunda böbrek ve karaciğerdeki Cd^{+2} birikimi, Cd^{+2} ve

Pb⁺² karışımında artarken, solungaçlarda azalmış, dalak ve kas dokularında ise değişmemiştir.

Sancho ve ark. (2003), yılan balığı *Anguilla anguilla*'nın 0.22 mg/L derişimindeki tiyobenkarb'ın (herbisit) 96 saatlik etkisi sonrasında solungaç ve kas dokularında Na⁺/K⁺-ATPaz ve Mg⁺²-ATPaz aktivitelerini ölçmüşlerdir. Solungaç Na⁺/K⁺-ATPaz, Mg⁺²-ATPaz ve Total-ATPaz aktivitelerinin 2-12 saatlik herbisit etkisinde inhibe olduğu ve kas dokusunda da benzer şekilde ATPaz aktivitelerinin düştüğü gösterilmiştir. Elde edilen veriler tiyobenkarbın iyonik mekanizma üzerinde önemli etkilere sahip olduğunu göstermiştir.

Berntssen ve ark. (2003), Atlantik somon balığı *Salmo salar* L.'yi besin yoluyla 0.5-250 mg/kg derişimindeki Cd⁺² etkisinde bırakmışlardır. Elde ettikleri verilere göre en yüksek orandaki Cd⁺² birikimi bağırsak dokusunda gözlenirken, bunu böbrek ve solungaç dokusu izlemiştir. Araştırmacılar bu dokulardaki Na⁺/K⁺-ATPaz ve Ca⁺²-ATPaz aktivitelerinin özellikle yüksek dozdaki Cd⁺² etkisinde azaldığını göstermişlerdir.

Eroğlu ve ark. (2005), 14 gün süreyle 1 µg/mL Cd⁺², Cu⁺² ve Zn⁺² ile bu metallerin ikili ve üçlü karışımlarının *O. niloticus*'un karaciğerindeki metallothionein benzeri proteinlere olan etkilerini gözlemlemişlerdir. Elde edilen veriler sonucunda, metal birikiminin yalnız Cd⁺² etkisinde en yüksek düzeyde olduğu, ardından Cd⁺²-Zn⁺² etkileşiminde olduğunu, metallothionein benzeri proteinlerin de Cd⁺² etkisinde en yüksek düzeye çıkarken, metal etkileşimlerinin de bu proteinler üzerinde etkili olduğu gözlenmiştir.

Garcia-Santos ve ark. (2006), *O. niloticus* ile yaptıkları çalışmada bu türün yüksek derişimdeki Cd⁺² düzeylerine dayanıklı olduğunu ve 96 saatlik en yüksek LD50 değerlerine (14.8 mg Cd⁺²/L) sahip tatlı su türlerinden biri olduğunu vurgulamışlardır. Bu çalışmada balıklar 5 ve 25 mg Cd⁺²/L etkisinde 24, 48 ve 96 saat süreyle bırakılmış ve deney sonunda plazma Na⁺ düzeyi değişiklik göstermezken, Ca⁺² düzeyi uygulanan doza bağlı olmaksızın 96 saat sonunda azalmış ve solungaç Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesi ise değişiklik göstermemiştir.

Atli ve Canli (2007), *O. niloticus* ile yaptıkları çalışmada 5, 10 ve 20 µM derişimlerindeki Cu⁺², Cd⁺², Zn⁺² ve Pb⁺²'nin 14 günlük etkileri sonunda karaciğerde

katalaz, alkalen fosfataz gibi bazı enzimlerle solungaç ve bağırsak dokusunda Na^+/K^+ -ATPaz, kas dokusunda ise Ca^{+2} -ATPaz aktivitesini ölçmüşlerdir. Çalışılan tüm enzimlerin metaller tarafından etkilendiği belirtilirken, Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinin bütün metal etkilerinde inhibe olduğu yalnızca solungaçta $20 \mu\text{M Pb}^{+2}$ etkisinde artış gösterdiği, kas Ca^{+2} -ATPaz enziminin ise Cu^{+2} dışındaki diğer metal etkilerinde inhibe olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda araştırmacılar enzim tepkilerinin metal tipi ve derişimlerine bağlı olarak değişiklik gösterdiğini ve enzimatik tepkilerin ekotoksikoloji alanında sucul ortamlardaki metal kirliliğine duyarlı belirteçler olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Komjarova ve Blust (2008), uygun izotop tekniği kullanarak ilgili konsantrasyonlarda esansiyel (Cu^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2}) ve esansiyel olmayan (Cd^{+2} , Pb^{+2}) metallere eş zamanlı maruz kalma süresince *Daphnia magna*'da metal etkileşim etkilerini araştırmışlardır. Metallerin uygulanan derişim oranları Cd^{+2} için 0,0125-0,2 μM , Cu^{+2} ve Pb^{+2} için 0,025-0,25 μM , Ni^{+2} ve Zn^{+2} için 0,1-1,25 μM şeklindedir. Cd^{+2} ve Cu^{+2} karışımında mevcut tüm metallerin, emilim oranı üzerine baskın etki gösterdiğini, bu etkinin düşük Cd^{+2} ve Cu^{+2} derişimlerinde gerçekleştiğini ve daha yüksek derişimlerde ise en yüksek orana ulaştığını bildirmişlerdir. Ni^{+2} ve Zn^{+2} , Cu^{+2} ve Pb^{+2} emilimi üzerine etkisi olmamasına karşın birbirleriyle ve Cd^{+2} ile daha zayıf etkileşim göstermiştir. Mevcut çalışmalar metal etkileşimlerinin önemli olduğunu ve hem toksik hem de esansiyel metallerin biyolojik açıdan verimliliğini etkileyen düşük derişimlerde gerçekleştiği örneklenmiştir.

Issartel ve ark. (2010), tatlı su kabuklusu *Gammarus fossarum*'da 3 ve 7 gün için $15 \mu\text{g Cd}^{+2}$ 'nin hemolenf osmolaritesi (HO), solungaç yapısı, solungaçlardaki Na^+/K^+ -ATPaz (NKA) lokalizasyonu ve ilgili etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada Cd^{+2} etkisindeki *G. fossarum*'larda ortalama HO, kontrol gruplarına göre önemli derecede azalmıştır. Bu değerler çok etkilenmiş, hafif etkilenmiş ve etkilenmemiş olarak ayrılmıştır. Solungaç organizasyonları etkilenmeyen bireyler, kontrollerden daha kalın bir epitelyum göstermişlerdir. Daha ince bir epitelyuma sahip hafif etkilenmiş bireylerde solungaçlar hafifçe çökmüştür. Solungaç yapısının dramatik olarak değiştiği etkilenen bireylerde ise solungaç yapısının çöktüğü ve hemolenfatik kanalların ortadan kaybolduğu belirlenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

3.1.1.1. Metaller ve Asitler

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

Çinko klorür (ZnCl_2 , Merck)

Nitrik asit (HNO_3 % 65, Merck)

Perklorik asit (HClO_4 % 60, 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 (Etilendiamintetraasetik asit, 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'-tetraasetik asit, 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 pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Merck)

Folin Ciocalteu Fenol Ayracı (Sigma)

Bovin Albumin (Sigma)

3.1.2. Kullanılan Ekipmanlar

Spektrofotometre: Shimadzu UV-1800

Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi: Perkin Elmer 3100-SpectrAA 220 FS

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

Hassas Terazisi: Sartorius Analytic ATL-224-I

Santrifüj: Sigma 2-16 K

Homojenizatör: Janke & Kunkel Ultra Turrax T25

Su Banyosu: Wise Bath WSB-30

pH metre: Hana HI 8314 membran pH metre

Manyetik Karıştırıcı: Janke & Kunkel IKAMAG RH

Karıştırıcı: Vortex SO 200

3.2. Yöntem

Deneylerde kullanılmak üzere Ç.Ü. Su Ürünleri Fakültesi balık yetiştirme havuzlarından alınan *O. niloticus*, sıcaklığın $20 \pm 1^\circ\text{C}$ olduğu ve 12 saat aydınlatma periyodunun uygulandığı laboratuvar ortamında $40 \times 40 \times 100$ cm ölçülerindeki 100 L çeşme suyu içeren akvaryumlarda yaklaşık 4 ay süreyle yeni koşullara adapte olmaya bırakıldı. Akvaryum sularının fizikokimyasal özellikleri Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Akvaryum sularının fizikokimyasal özellikleri (Art ort. $\pm$ S.D., N=44).

pH	Oksijen mg O ₂ /mL	İletkenlik μ S/cm	Sertlik mg CaCO ₃ /mL	Alkalinite mg CaCO ₃ /mL
7,97 $\pm$ 0,20	6,94 $\pm$ 0,40	593,5 $\pm$ 12,3	344,6 $\pm$ 41,1	262,1 $\pm$ 15,9

Balıklara günde bir defa olmak üzere ağırlıklarının % 2-3'ü kadar hazır balık yemi (Pınar Sazan Yavru yemi, İzmir) verildi. Kullanılan balık yemindeki mikro elementlerin miktarları sırasıyla 70 mg Zn/kg, 25 mg Mn/kg, 25 mg Mg/kg, 2 mg Fe/kg, 0.7 mg I/kg, 1 mg Cu/kg, 0.2 mg Co/kg, 0.03 mg Se/kg; makro elementlerin miktarları ise en az % 2-en çok % 2.5 Ca, en az % 0.2-en çok % 1 Na, en az % 1 P ve yem içeriğindeki ham protein ise en az % 40'dır.

Deney aşamasında balıklar 6 adet olacak şekilde 1 μ g/mL derişimlerindeki kadmiyum (CdCl₂.H₂O) ve çinko (ZnCl₂) ile aynı oranlardaki (1 μ g/mL:1 μ g/mL) kadmiyum+çinko etkisine 0, 7, 14, 21 ve 28 gün süreyle bırakıldı. Deney sırasında akvaryumların cam yüzeylerine tutunma, akvaryum suyunun buharlaşması gibi nedenlerle akvaryumlardaki metal derişimleri değişeceğinden akvaryum suları 2 günde bir taze hazırlanan stok çözeltilerden yapılan seyreltmelerle değiştirildi ve metallerin balık yemine yapışmasını önlemek amacıyla su değişiminden 1 saat kadar önce yem verildi.

3.2.1. Doku Homojenatlarının Hazırlanışı

Deney süreleri sonunda balıklar akvaryumlardan alındıktan sonra spinal yapılarak öldürüldü. Kurutma kağıdıyla kurulan balıkların boyları en yakın cm ve ağırlıkları en yakın g cinsinden ölçüldü. Balıkların ortalama boy (13,9 $\pm$ 0,79 cm) ve ağırlıklarının (42,4 $\pm$ 6,96 g) farklı deney grupları arasında istatistiksel olarak bir ayırım göstermediği gözlemlendi (P>0,05). Steril aletler kullanılarak solungaç ve kas dokuları alındı ve homojenize edilinceye kadar -80 °C'de saklandı. 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 edildi.

Eppendorf tüplerine aktarılan homojenatlar 13.000 g'de 20 dk +4 °C'de santrifüj edildi ve elde edilen supernatantlar enzim analizlerinde ve protein tayininde kullanıldı.

3.2.2. ATPaz Enzim Aktivitelerinin Ölçümü

Bu çalışmadaki ATPaz aktivite ölçümünde, laboratuvarımızda daha önce yapılan ATPaz karakterizasyon çalışması sonucu (Atli ve Canli, 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.

	Toplam-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 edildi. Reaksiyon, tüplerin üzerlerine 100

μL 3 mM Na_2ATP konmasıyla başlatıldı. Reaksiyon, 30 dk inkübasyon süresinin ardından tüplere konan 500 μL soğuk saf su ($+4^\circ\text{C}$) ile sonlandırıldı. Tüm bileşenler dışında ATP içermeyen tüpler ATP körü, sadece örnek içermeyen tüpler ise Örnek körü olarak kullanıldı. Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi, Toplam-ATPaz (ouabain içermeyen) aktivitesinden Mg^{+2} -ATPaz (ouabain içeren) aktivitesinin çıkarılması ile hesaplandı. Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi ise CaCl_2 varlığında ve yokluğunda ölçülen enzim aktiviteleri arasındaki farka dayanarak hesaplandı. Enzim aktiviteleri, $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$ cinsinden verildi.

3.2.3. İnorganik Fosfat Tayini

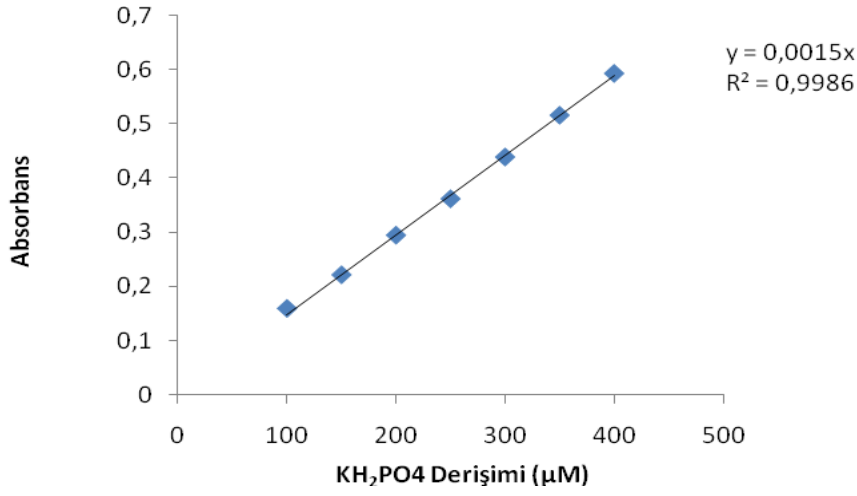
Prensip: İnorganik fosfat tayini, ATP'den açığa çıkan Pi'nin Polioksietilen 10 Lauril eter ile fosfomolibdatın oluşturduğu sarı renkli bileşiğin absorbansının 390 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Atkinson ve ark., 1973).

Ayırıcılar:

1. % 5 Polioksietilen 10 Lauril eter: 5 g Polioksietilen eter tartılarak saf su ile çözülmüş ve 100 ml'ye tamamlandı. Kullanılmadan önce oluşan bulanıklığın giderilmesi için 37°C 'de 30-40 dk bekletilir.
2. % 2 Molibdik asit: 2 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ tartılarak 1.8 M H_2SO_4 çözeltisinde çözüldü.
3. Ana ayırıcı: 10 mL % 5 Polioksietilen eter, 25 mL % 2 Molibdik asit ve 65 mL saf su karıştırılarak hazırlandı.

Deneyin Yapılışı:

1. 1.5 mL örnek üzerine 3 mL ana ayırıcıtan kondu.
2. Oda sıcaklığında 10 dk kompleks oluşumu için bekletildi.
3. Absorbans değerleri 390 nm'de ölçüldü.
4. Sonuçlar 100, 150, 200, 250, 300, 350 ve 400 μM KH_2PO_4 çözeltisinden hazırlanarak elde edilen standart eğri üzerinden değerlendirildi (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Fosfat derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki.

3.2.4. Toplam Protein Analizi

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

Prensip: Proteinlerin alkali bakır sülfat ilavesiyle, fosfotungstik asit ile mavi renkli kompleks oluşturması temeline dayanır. Oluşan bu renkli bileşiğin ise spektrofotometrede 750 nm dalga boyunda absorbansı ölçülerek kantitatif olarak protein miktarı belirlenir. Proteinlerin çoğunda tirozin veya triptofan veya her iki aminoasit eşit oranlarda bulunmaktadır. Bu aminoasitler, fosfotungstik-fosfo molibdik 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 sağlandı.
- 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 tamamlandı.
- 3- Ayıraç B₂: % 2 Na-K-Tartarat. 2 g Na-K-Tartarat tartılıp 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.
- 4- Ayıraç C: 50 hacim ayıraç A + 1 hacim eşit oranda karıştırılan ayıraç B₁ ve B₂.
5. Folin-Ciocalteu Çözeltisi: Kullanılırken 1'e 1.5 oranında saf su ile seyreltilmelidir.
6. Standart Bovin Albumin Çözeltisi: 1 mL'de 1 mg (1000 µg/mL) bovin albumin olacak şekilde stok bovin albumin çözeltisi hazırlandı ve bundan yapılan uygun seyreltmelerle 100-200-300-400-500-600 µg/mL olacak şekilde standart çözeltiler hazırlandı.

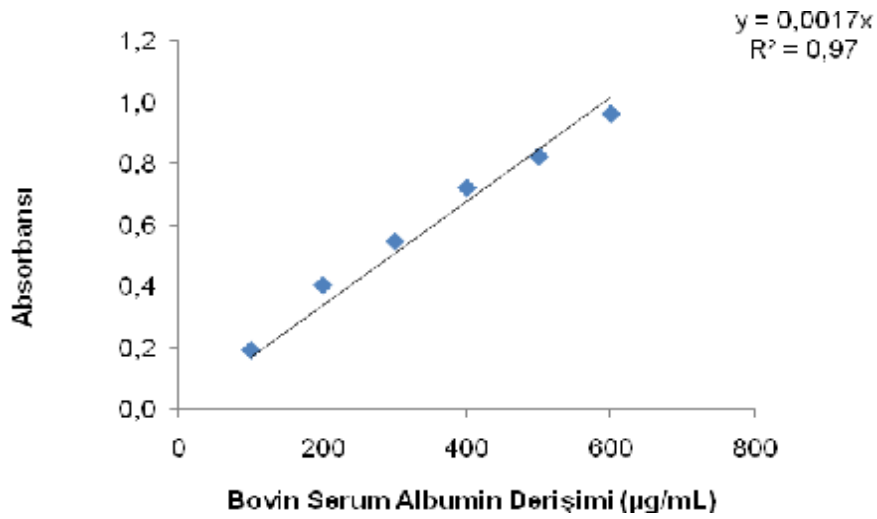
Standart Çözeltilerin Hazırlanması

- Standart 1 = 100 µg : 0.1 mL stok bovin albumin + 0.9 mL distile su
Standart 2 = 200 µg : 0.2 mL stok bovin albumin + 0.8 mL distile su
Standart 3 = 300 µg : 0.3 mL stok bovin albumin + 0.7 mL distile su
Standart 4 = 400 µg : 0.4 mL stok bovin albumin + 0.6 mL distile su
Standart 5 = 500 µg : 0.5 mL stok bovin albumin + 0.5 mL distile su
Standart 6 = 600 µg : 0.6 mL stok bovin albumin + 0.4 mL distile su

Deneyin Yapılışı:

1. Deney tüplerine hazırlanan standart çözeltilerden ve örneklerden 0.3 mL konuldu.
2. Tüplerin üzerine 3 mL ayıraç C eklendi.
3. Tüpler vortexle karıştırılarak 15 dk oda sıcaklığında bekletildi.
4. Tüplere 0.3 mL Folin-Ciocalteu konarak tüpler iyice karıştırıldı.

5. Oda sıcaklığında 30 dk bekletildi.
6. Absorbans değerleri 750 nm’de okundu.
7. Sonuçlar 100, 200, 300, 400 ve 500 µg/mL sığır serum albumini çözeltisinden hazırlanarak elde edilen standart eğri üzerinden değerlendirildi (Şekil 3.2.).



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

Buna göre 1 µg/mL Cd⁺² etkisinde 1 nolu *O. niloticus*’un solungaç dokusunda 7. gün sonunda total protein düzeyi:

$$y = 0,0017x$$

$$\text{Absorbans: } y = 0,614$$

$$\text{Derişim (x)} = \frac{0,614}{0,0017}$$

$$\text{Derişim} = 0,361 \text{ mg/mL}$$

Doku homojenatı ve doku tamponla 10 ‘ar mL’ye seyreltildiği için

$$\text{Derişim} = 0,361 \times 10 \times 10$$

$$\text{Derişim} = 36,1 \text{ mg prot./g y.a.}$$

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

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 ($y = 0,0015x$)

1 $\mu\text{g/mL}$ Cd^{+2} etkisinde 1 nolu *O. niloticus*'un solungacında 7. gün sonunda Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi:

$$\text{Absorbans: } y = 0,065$$

$$\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPaz aktivitesi} = \frac{0,065/0,0015 \times 4,5 \text{ (mL)}}{1000 \times 0,03 \text{ (mL)} \times 0,5 \text{ (sa.)} \times 3,61 \text{ mg prot./mL}}$$

$$\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPaz aktivitesi} = 3,55 \mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$$

3.2.6. Metal Derişiminin Hesaplanması

Cd^{+2} ve Zn^{+2} etkisinde kalan deney gruplarında ve kontrol gruplarında, metal standartları ile absorbansları arasındaki doğrusal ilişkiyi gösteren standart grafikler (Çizelge 3.3.) kullanılarak akvaryum sularındaki metal düzeyleri belirlendi (Çizelge 3.4.).

Çizelge 3.3. Metal standartları ile absorbansları arasındaki regresyon eşitlikleri.

Metal	Derişim ($\mu\text{g/mL}$)	Regresyon eşitliği
Cd^{+2}	0.5, 1.0, 1.5, 2	$y = 0.1593x$
Zn^{+2}	0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0	$y = 0.2245x$

Çizelge 3.4. Akvaryum sularındaki Cd^{+2} ve Zn^{+2} Düzeyleri (Art ort. $\pm$ S.D., N=25).

Metal	Derişim ($\mu\text{g/mL}$)
Zn^{+2}	$0,87 \pm 0,23$
Cd^{+2}	$0,85 \pm 0,18$
Zn^{+2} (Zn^{+2} - Cd^{+2})	$0,80 \pm 0,20$
Cd^{+2} (Zn^{+2} - Cd^{+2})	$0,91 \pm 0,23$
Zn^{+2} (Kontrol)	$0,03 \pm 0,04$
Cd^{+2} (kontrol)	$0,0 \pm 0,0$

3.2.7. İstatistik

Bu çalışmadaki istatistiksel analizler, SPSS yardımıyla “Regresyon Analizi” ve “One-way ANOVA” kullanılarak yapıldı. Kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel bir ayırım gözlendiğinde ($P < 0,05$), hangi grup veya grupların farklı olduğu post-hoc testlerinden Duncan-test kullanılarak belirlendi. Grafik çizimleri ise Microsoft Excel programı kullanılarak çizildi. Veriler aritmetik ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. ATPaz Aktivitesi

O. niloticus 1 µg/mL derişimindeki Cd⁺² ve Zn⁺² ile bire bir oranlarındaki (1 µg/mL-1 µg/mL) Cd⁺²-Zn⁺² karışımının etkisine 0, 7, 14, 21 ve 28 gün süreyle bırakıldı. Bu süreler sonunda solungaç ve kas dokusunda ATPaz aktiviteleri ölçüldü. Elde edilen verilere göre kontrol grubu balıklarda solungaç Na⁺/K⁺-ATPaz, Mg⁺²-ATPaz ve Ca⁺²-ATPaz aktivitesi ile kas Ca⁺²-ATPaz aktivitesi değerleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Kontrol grubu balıklarda solungaç ve kas ATPaz aktiviteleri (µmol Pi/mg prot./sa.)(Art ort .± S.D., N=29)

Gün	SOLUNGAÇ			KAS
	Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz	Mg ⁺² -ATPaz	Ca ⁺² -ATPaz	Ca ⁺² -ATPaz
0	8,31±0,83	13,0±0,55	2,29±0,26	1,83±0,53
7	6,01±0,28	13,3±0,83	0,71±0,04	1,80±0,42
14	4,66±0,59	9,17±0,30	2,21±0,44	2,32±0,50
21	9,29±0,43	14,5±0,81	0,99±0,28	2,47±0,78
28	17,0±1,58	4,17±0,18	1,35±0,18	3,25±0,50

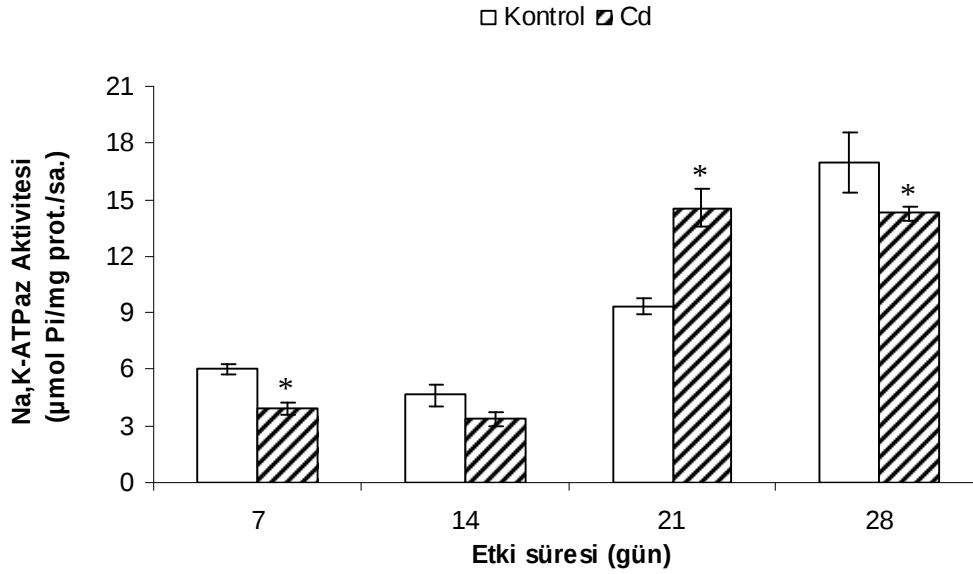
4.1.1.1. Kadmiyum

Solungaç Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesinin, 1 µg Cd⁺²/mL’nin farklı sürelerdeki etkisinde kontrole göre 7 ve 28. günlerde zamana bağlı bir azalış gösterdiği ve en düşük düzeyini % 35 değeri ile 7. gün sonunda gösterdiği gözlenmiştir (3,93±0,31 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,05) (Şekil 4.2.). Fakat 21. günde kontrole göre % 57 oranında artış göstermiştir (14.6±0.99 µmol Pi/mg prot./sa.) (P<0,05) (Şekil 4.5.).

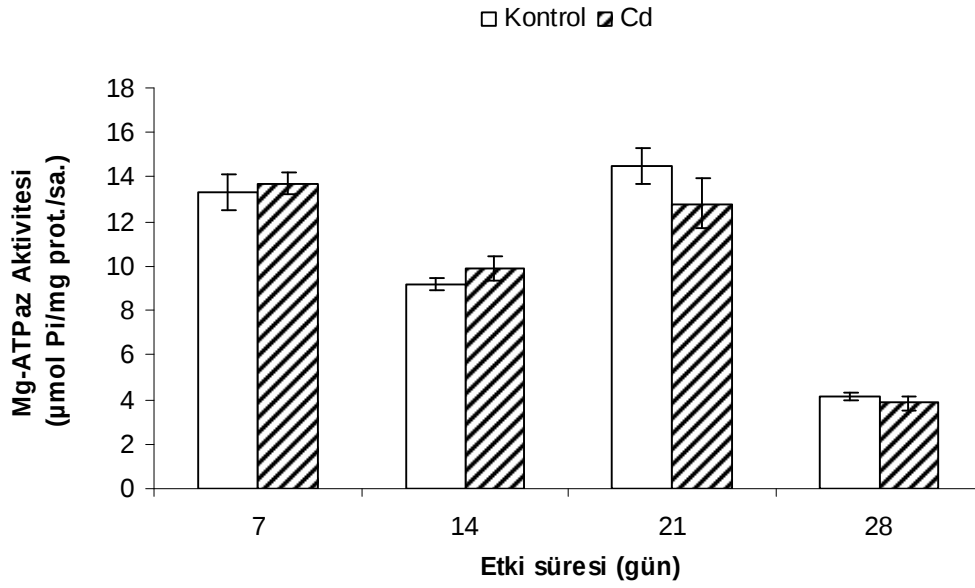
Mg²⁺-ATPaz aktivitesi ise Cd²⁺ etkisinde denenen tüm süreler için kontrole göre herhangi bir ayırım göstermemiştir (P>0,05) (Şekil 4.2.).

Solungaç dokusunda, Ca²⁺-ATPaz aktivitesi denenen tüm günlerde bir azalış göstermiş ve en düşük düzeyi % 70 ile 21. (0,29±0,09 µmol Pi/mg prot./sa.) ve 28. (0,40±0,05 µmol Pi/mg prot./sa.) gün sonunda gözlenmiştir (P<0,05) (Şekil 4.3.).

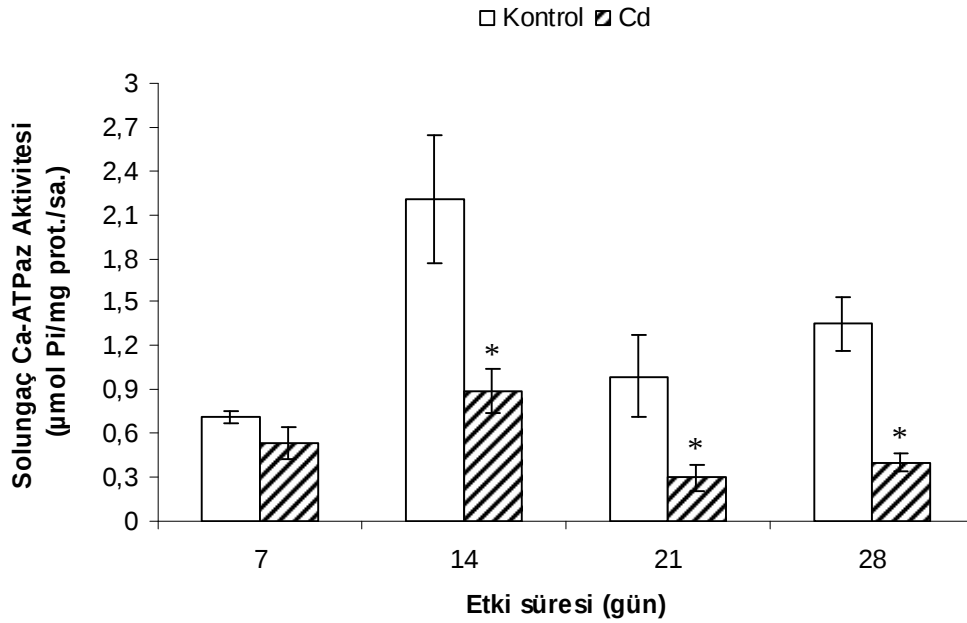
Kas dokusunda, Ca²⁺-ATPaz aktivitesi günlere bağlı olarak artış veya azalış göstermiştir. En fazla azalış % 25 (2,45±0,45µmol Pi/mg prot./sa.) ile 28. günde gözlemlenmiştir (P>0,05) (Şekil 4.4.).



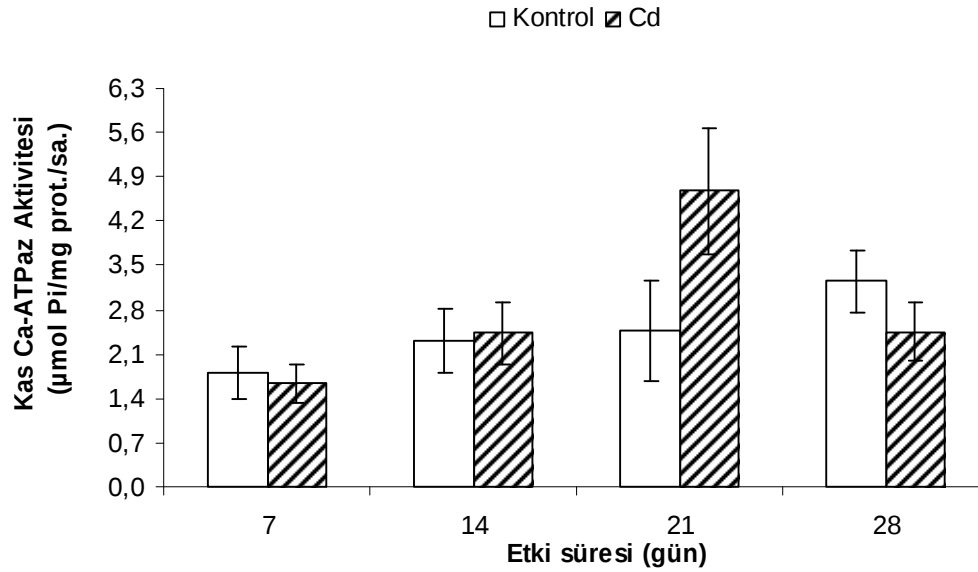
Şekil 4.1. Kadmiyumun (1 µg/mL) farklı sürelerde *Oreochromis niloticus*'un solungaç Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesine etkileri.



Şekil 4.2. Kadmiyumun (1 µg/mL) farklı sürelerde *Oreochromis niloticus*'un solungaç Mg^{+2} -ATPaz aktivitesine etkileri.



Şekil 4.3. Kadmiyumun (1 µg/mL) farklı sürelerde *Oreochromis niloticus*'un solungaç Ca^{+2} -ATPaz aktivitesine etkileri.



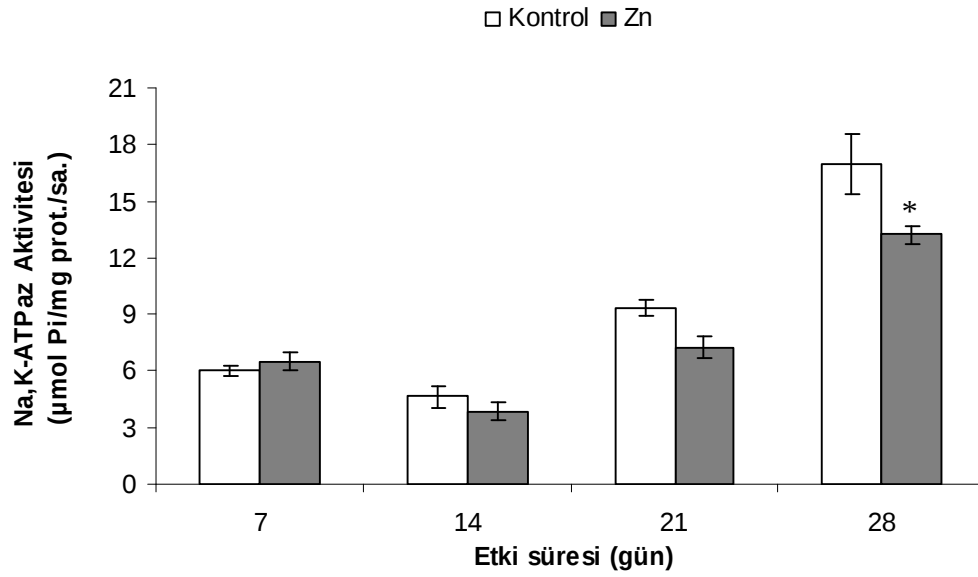
Şekil 4.4. Kadmiyumun (1 µg/mL) farklı sürelerde *Oreochromis niloticus*'un kas Ca^{+2} -ATPaz aktivitesine etkileri.

4.1.1.2. Çinko

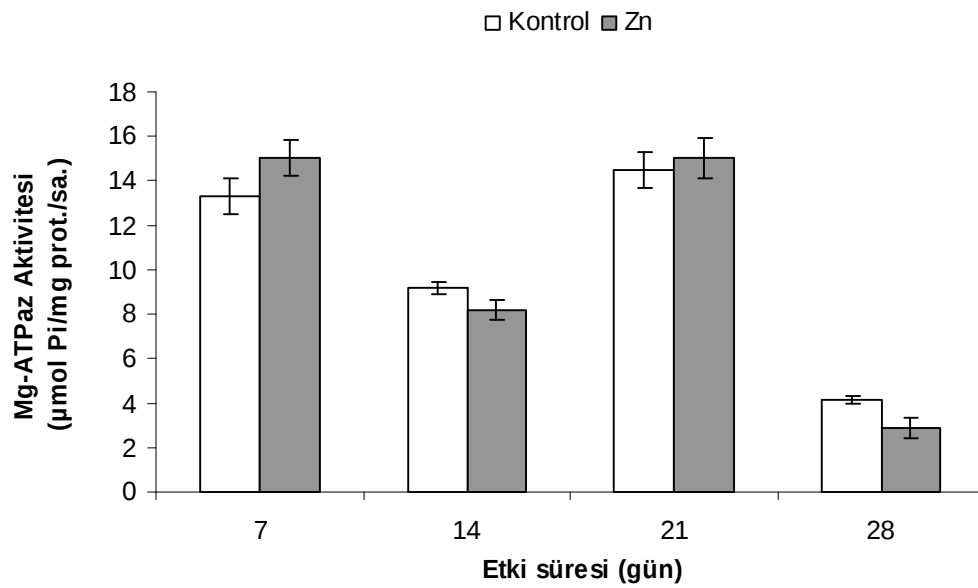
Solungaç $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz aktivitesinin, 1 µg Zn^{+2} /mL'nin farklı sürelerdeki etkisinde kontrole göre zamana bağlı bir azalış gösterdiği ve en düşük düzeyini % 22 azalış ile 28. gün sonunda gösterdiği gözlenmiştir ($13,2 \pm 0,44$ µmol Pi/mg prot./sa.) ($P < 0,05$) (Şekil 4.5). Mg^{+2} -ATPaz aktivitesi ise Zn^{+2} etkisinde denenen tüm süreler için kontrole göre herhangi bir ayırım göstermemiştir ($P > 0,05$) (Şekil 4.6.).

Solungaç dokusunda, Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi genel olarak bir azalış göstermiş ve en düşük düzeyini 14. gün sonunda % 72 oranında göstermiştir ($0,62 \pm 0,15$ µmol Pi/mg prot./sa.) ($P < 0,05$) (Şekil 4.7.).

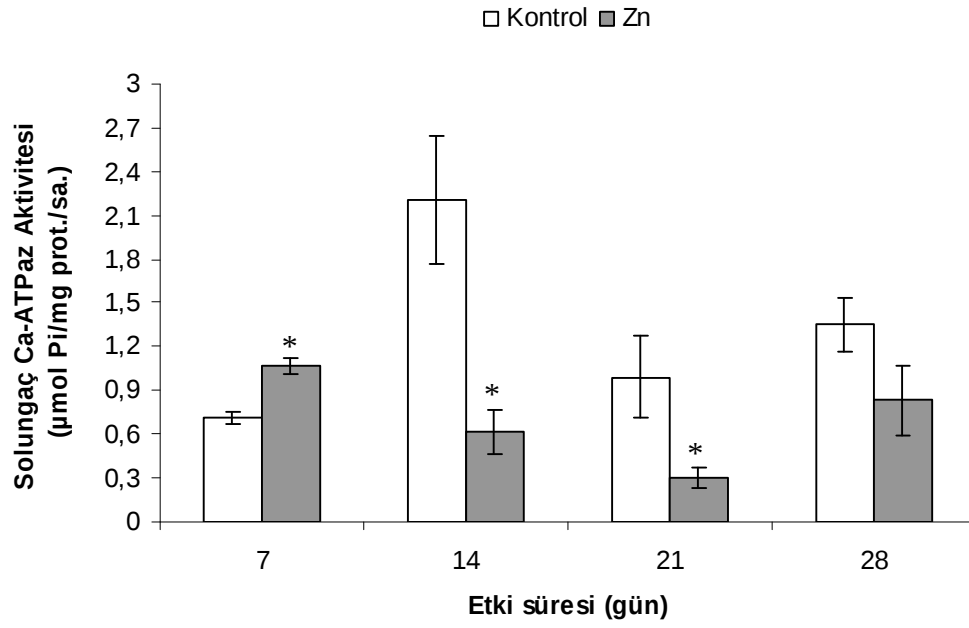
Kas dokusunda, Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi kısa süreli etkilerde % 3 ile % 21 oranında artış göstermiş ($P > 0,05$) fakat 28. gün sonunda kontrole göre % 82 azalış göstermiştir ($0,58 \pm 0,18$ µmol Pi/mg prot./sa.) ($P < 0,05$) (Şekil 4.8).



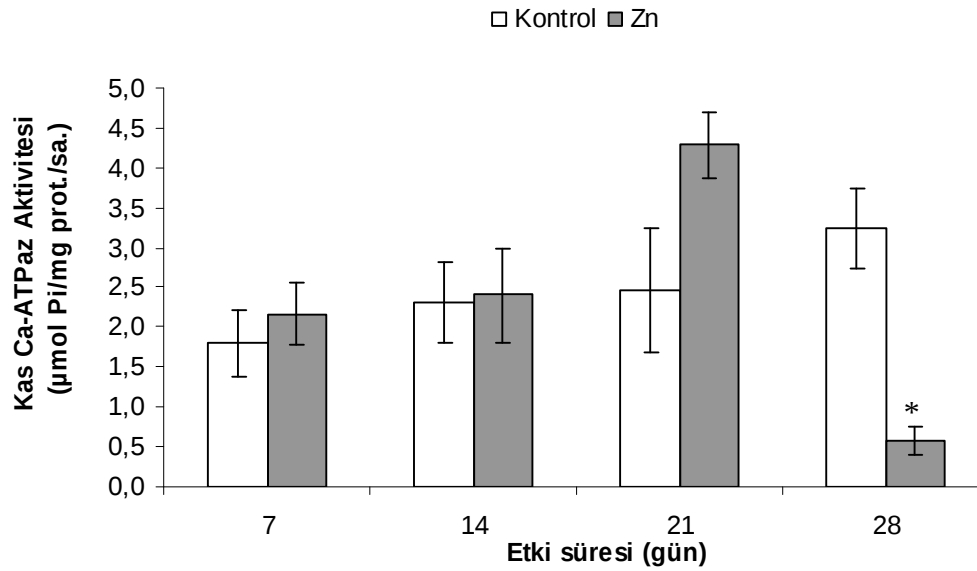
Şekil 4.5. Çinkonun (1 µg/mL) farklı sürelerde *Oreochromis niloticus*'un solungaç Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesine etkileri.



Şekil 4.6. Çinkonun (1 µg/mL) farklı sürelerde *Oreochromis niloticus*'un solungaç Mg²⁺-ATPaz aktivitesine etkileri.



Şekil 4.7. Çinkonun (1 µg/mL) farklı sürelerde *Oreochromis niloticus*'un solungaç Ca^{+2} -ATPaz aktivitesine etkileri.



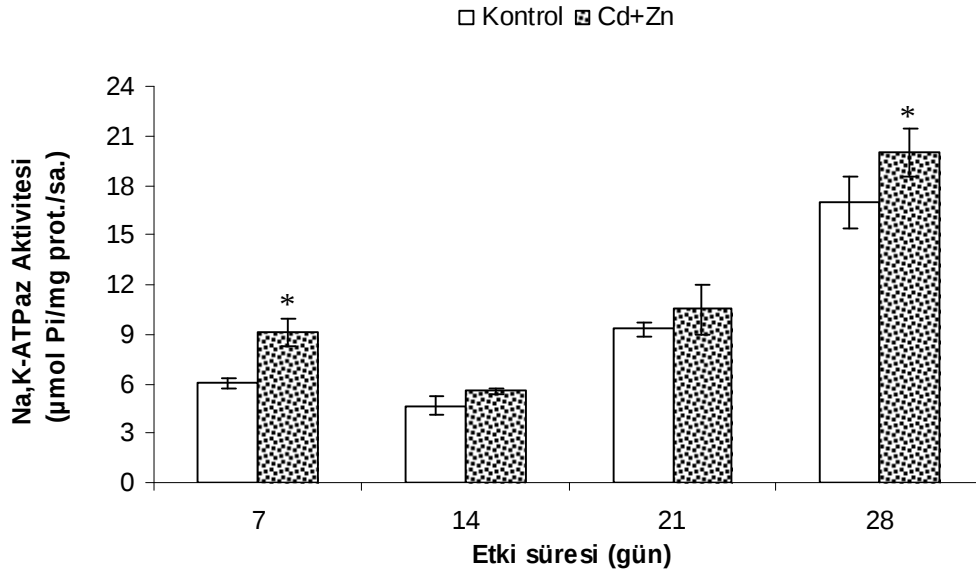
Şekil 4.8. Çinkonun (1 µg/mL) farklı sürelerde *Oreochromis niloticus*'un kas Ca^{+2} -ATPaz aktivitesine etkileri.

4.1.1.3. Kadmiyum+Çinko

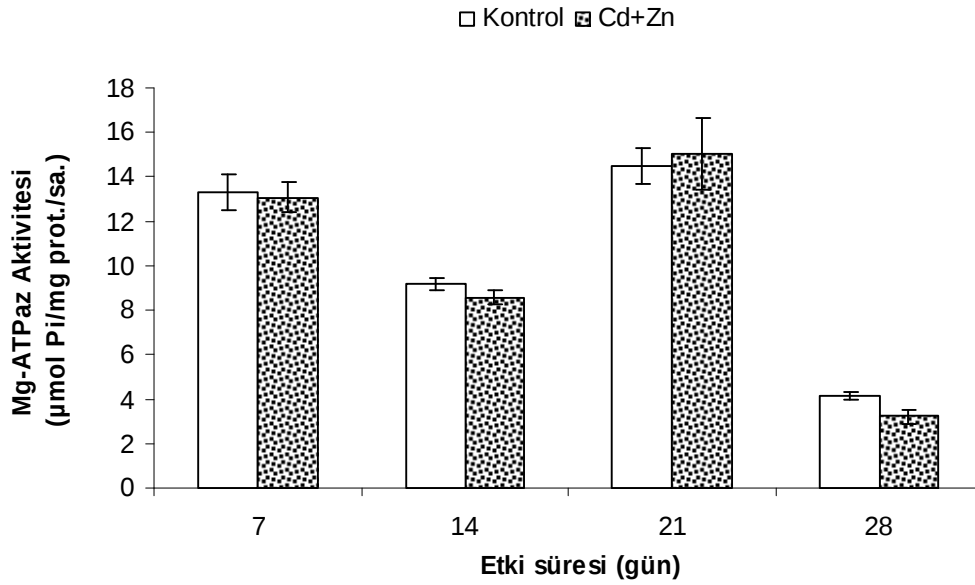
Solungaç Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinin, 1 μg $\text{Cd}^{+2}+\text{Zn}^{+2}/\text{mL}$ 'nin farklı sürelerdeki etkisinde kontrole göre zamana bağlı bir artış gösterdiği ve en yüksek düzeyini % 52 değeri ile 7. gün sonunda gösterdiği gözlenmiştir ($9,14\pm0,84\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P<0,05$) (Şekil 4.9). Mg^{+2} -ATPaz aktivitesi ise $\text{Cd}^{+2}+\text{Zn}^{+2}$ etkisinde denenen tüm süreler için kontrole göre herhangi bir ayırım göstermemiştir ($P>0,05$) (Şekil 4.10).

Solungaç dokusunda, Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi denenen tüm günlerde bir azalış göstermiş ve en düşük düzeyini 28. gün sonunda % 100 oranında göstermiştir ($0\pm0\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P<0,05$) (Şekil 4.11).

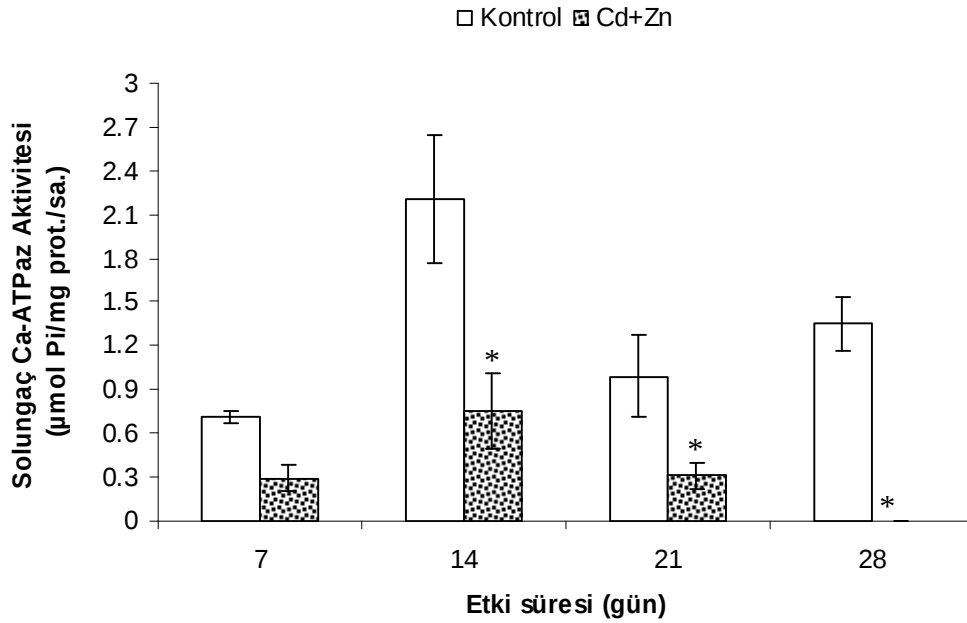
Kas dokusunda, Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi genel olarak azalış göstermiş ve 28. gün sonunda % 78 ile en düşük düzeyde ölçülmüştür ($0,7\pm0,24\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P<0,05$) (Şekil 4.12.).



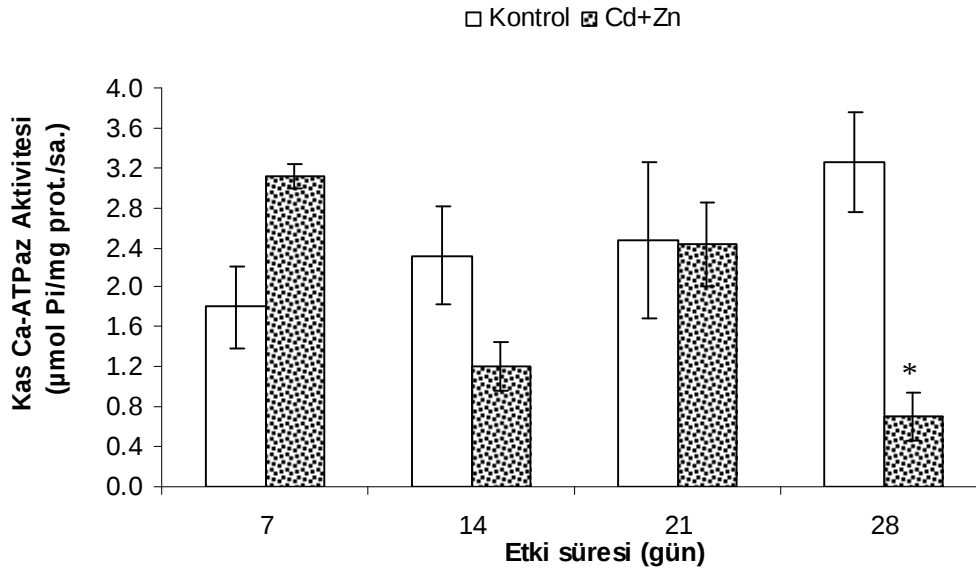
Şekil 4.9. Kadmiyum+Çinko (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) etkileşiminin farklı sürelerde *Oreochromis niloticus*'un solungaç Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesine etkileri.



Şekil 4.10. Kadmiyum+Çinko (1 µg/mL-1 µg/mL) etkileşiminin farklı sürelerde *Oreochromis niloticus*'un solungaç Mg^{+2} -ATPaz aktivitesine etkileri.



Şekil 4.11. Kadmiyum+Çinko (1 µg/mL-1 µg/mL) etkileşiminin farklı sürelerde *Oreochromis niloticus*'un solungaç Ca^{+2} -ATPaz aktivitesine etkileri.



Şekil 4.12. Kadmiyum+Çinko (1 µg/mL-1 µg/mL) etkileşiminin farklı sürelerde *Oreochromis niloticus*'un kas Ca^{+2} -ATPaz aktivitesine etkileri.

4.1.2. Toplam Protein Düzeyi

O. niloticus 1 µg/mL derişimlerindeki Cd^{+2} ve Zn^{+2} ile bire bir oranlarındaki (1 µg/mL;1 µg/mL) $\text{Cd}^{+2}+\text{Zn}^{+2}$ karışımının etkisine 0, 7, 14, 21 ve 28 gün süreyle bırakıldı. Bu süreler sonunda solungaç ve kas dokusunda protein miktarları ölçüldü. Elde edilen verilere göre kontrol grubu balıklarda solungaç protein değerleri ile kas protein değerleri Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

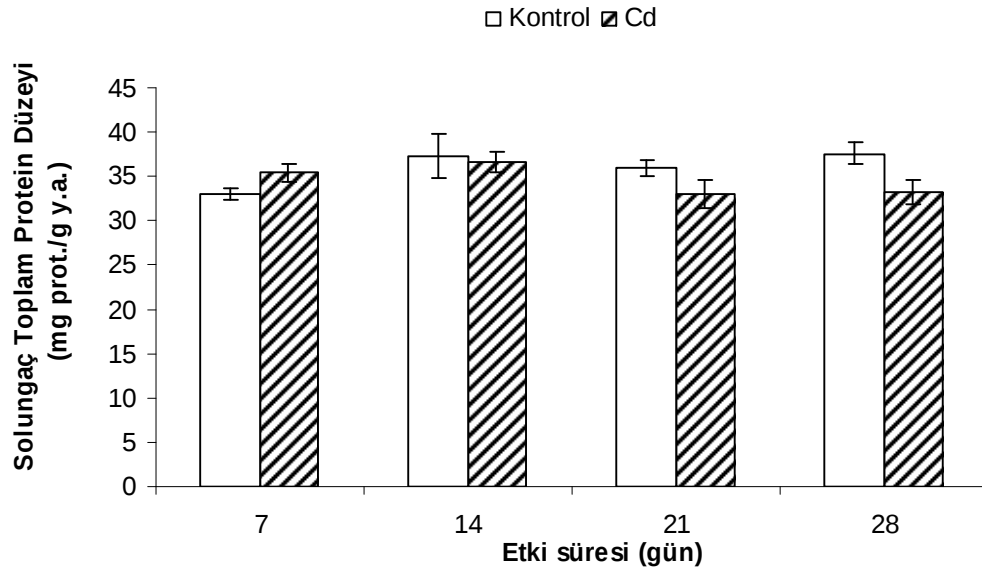
Çizelge 4.2. Kontrol grubu balıklarda solungaç ve kas toplam protein düzeyleri (mg/g y.a.) (Art ort. $\pm$ S.D., N=29)

Gün	SOLUNGAÇ	KAS
0	37,3 $\pm$ 0,70	24,7 $\pm$ 2,29
7	33,1 $\pm$ 0,70	18,6 $\pm$ 1,32
14	37,3 $\pm$ 2,49	23,6 $\pm$ 1,90
21	36,0 $\pm$ 0,94	27,5 $\pm$ 1,08
28	37,6 $\pm$ 1,34	25,9 $\pm$ 1,09

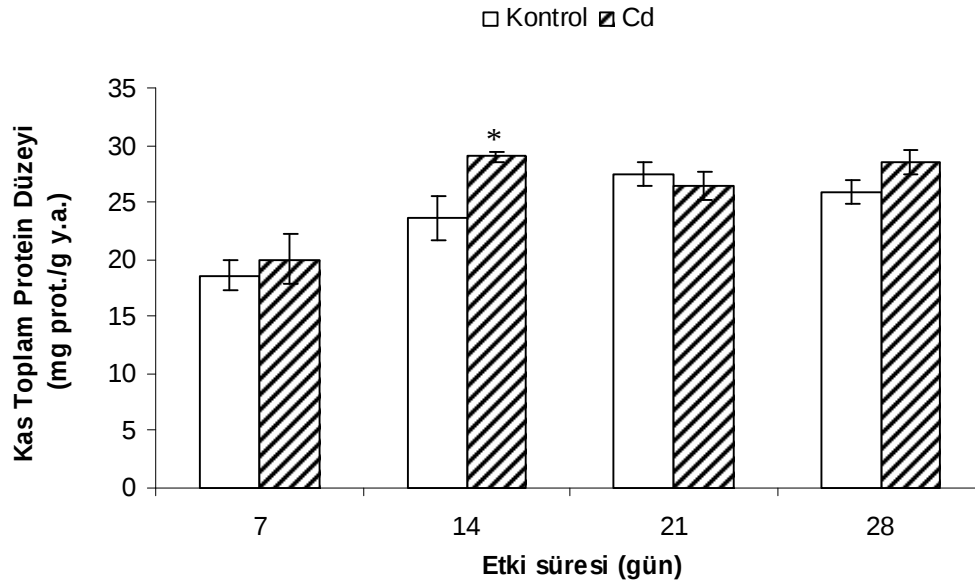
4.1.2.1. Kadmiyum

Solungaç protein değerleri, 1 $\mu\text{g Cd}^{+2}/\text{mL}$ 'nin farklı sürelerdeki etkisinde kontrole göre anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($P>0,05$) (Şekil 4.13.).

Kas protein değerleri, 1 $\mu\text{g Cd}^{+2}/\text{mL}$ 'nin farklı sürelerdeki etkisinde kontrole göre genel olarak bir artış gösterirken en fazla artış %23 oranı ile 14. gün sonunda gözlemlenmiştir ($29,0\pm0,42 \text{ mg/g y.a.}$) ($P<0,05$) (Şekil 4.14.).



Şekil 4.13. Kadmiyumun (1 $\mu\text{g/mL}$) farklı sürelerde *Oreochromis niloticus*'un solungaç protein düzeyine etkileri.

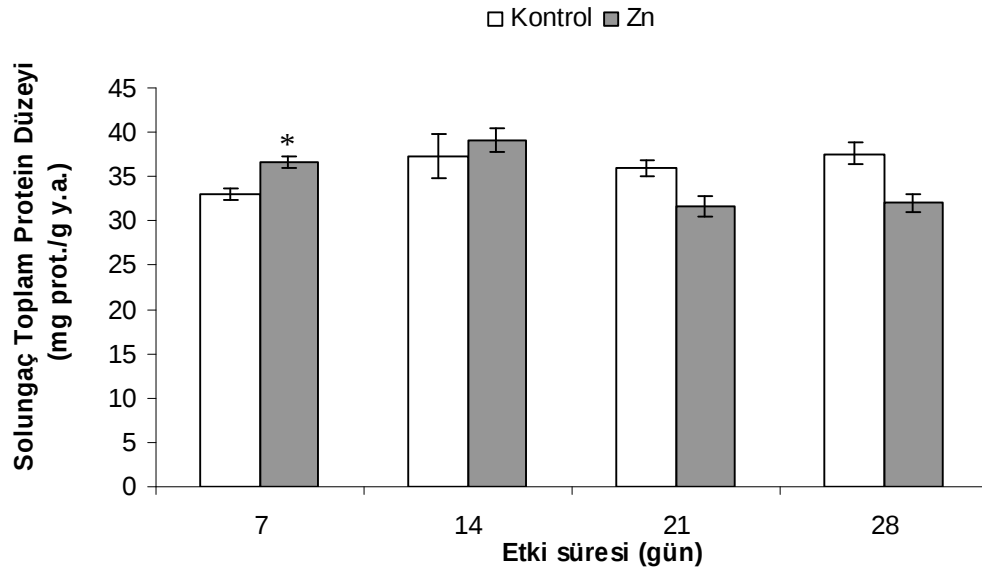


Şekil 4.14. Kadmiyumun (1 µg/mL) farklı sürelerde *Oreochromis niloticus*'un kas protein düzeyine etkileri.

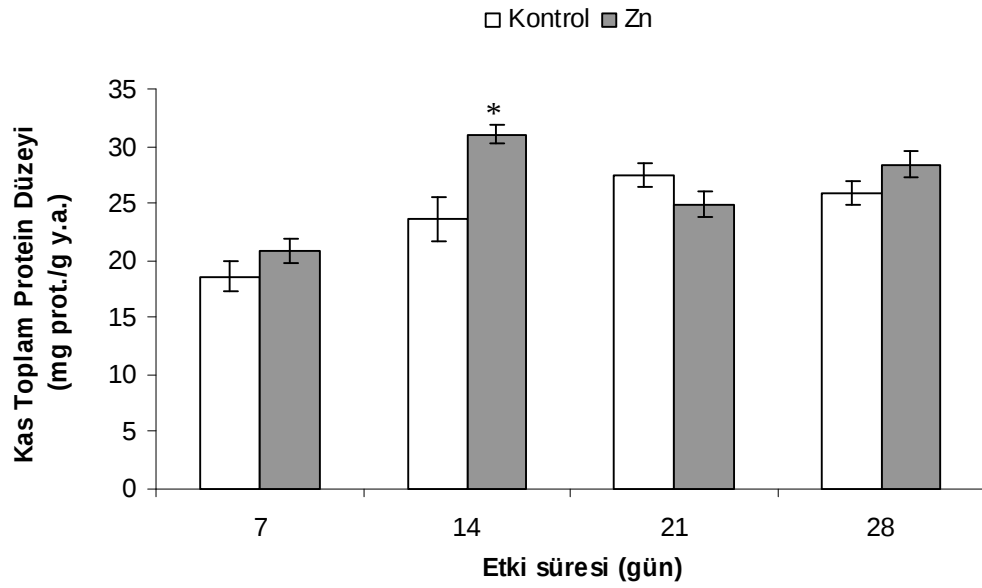
4.1.2.2. Çinko

Solungaç protein değerleri, 1 µg Zn²⁺/mL'nin farklı sürelerdeki etkisinde kontrole göre 7. ve 14. günlerde artış gösterirken 21. ve 28 günlerde azalış göstermiştir (P>0,05). En fazla artış % 11 ile 7. gün sonunda gözlemlenmiştir (36,6±0,6 mg/g y.a.) (P<0,05) (Şekil 4.15.).

Kas protein değerleri, 1 µg Zn²⁺/mL'nin farklı sürelerdeki etkisinde kontrole göre genel olarak bir artış gösterirken en fazla artış % 31 oranı ile 14. gün sonunda gözlemlenmiştir (31±0,79 mg/g y.a.) (P<0,05) (Şekil 4.16.).



Şekil 4.15. Çinkonun (1 µg/mL) farklı sürelerde *Oreochromis niloticus*'un solungaç protein düzeyine etkileri.

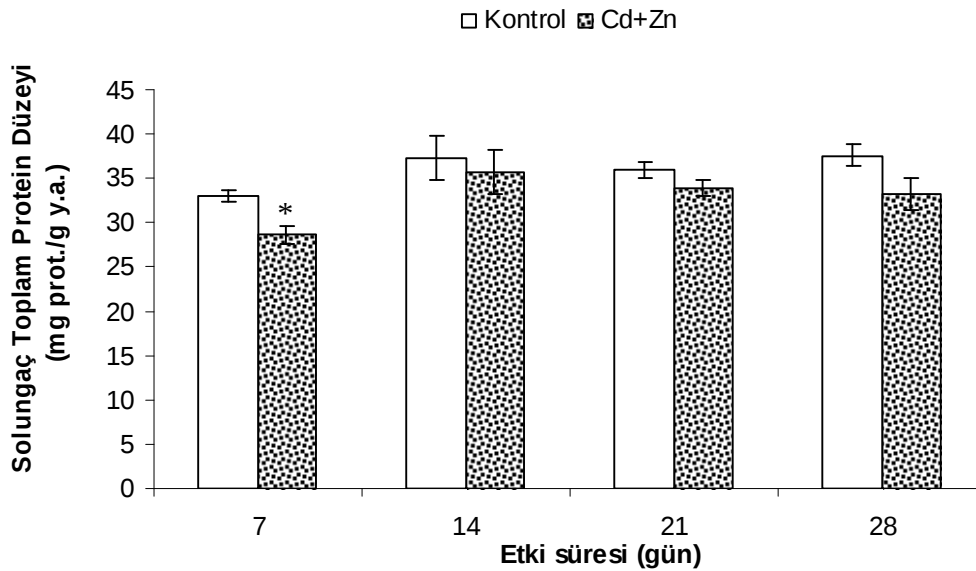


Şekil 4.16. Çinkonun (1 µg/mL) farklı sürelerde *Oreochromis niloticus*'un kas protein düzeyine etkileri.

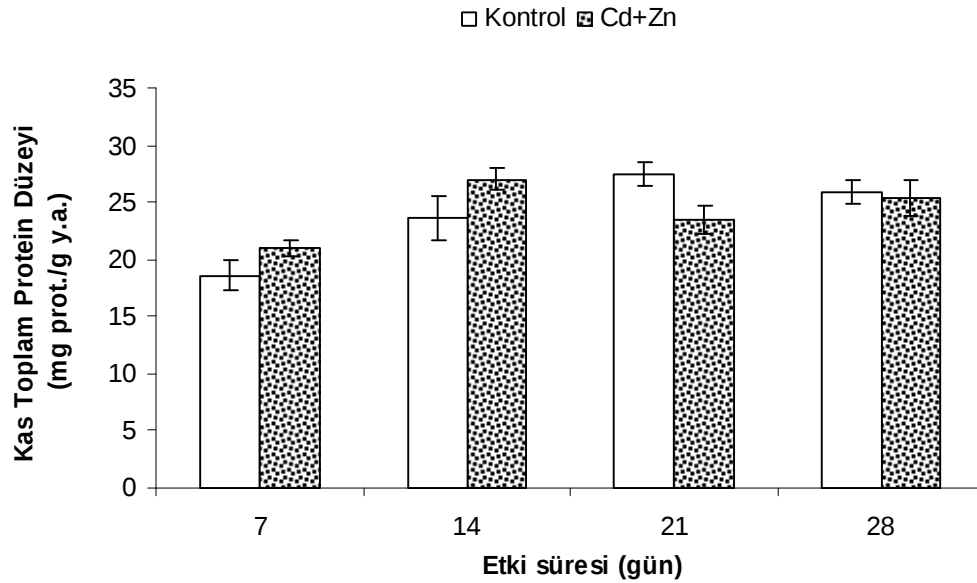
4.1.2.3. Kadmiyum+Çinko

Solungaç protein değerleri, 1 μg $\text{Cd}^{+2}+\text{Zn}^{+2}/\text{mL}$ 'nin farklı sürelerdeki etkisinde kontrole göre bir azalış göstermiş ve en fazla azalış %13 ile 7.gün sonunda gözlemlenmiştir ($28,7\pm 1$ mg/g y.a.) ($P<0,05$) (Şekil 4.17.).

Kas protein değerleri, 1 μg $\text{Cd}^{+2}+\text{Zn}^{+2}/\text{mL}$ 'nin farklı sürelerdeki etkisinde kontrole göre 7. ve 14. günlerde artış gösterirken 21. ve 28 günlerde azalış göstermiş fakat bu değişikliklerin hiçbiri anlamlı olmamıştır ($P>0,05$) (Şekil 4.18.).



Şekil 4.17. Kadmiyum+Çinko (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) etkileşiminin farklı sürelerde *Oreochromis niloticus*'un solungaç protein düzeyine etkileri.



Şekil 4.18. Kadmiyum+Çinko (1 µg/mL-1 µg/mL) etkileşiminin farklı sürelerde *Oreochromis niloticus*'un kas protein düzeyine etkileri.

4.2. Tartışma

Bu çalışmada 1 µg/mL derişimindeki Zn^{+2} ve Cd^{+2} 'nin tek tek ve birlikteki etkilerinin *O. niloticus* dokularında Na^+/K^+ -ATPaz, Ca^{+2} -ATPaz ve Mg^{+2} -ATPaz aktiviteleri ile bu dokulardaki toplam protein düzeylerine olan etkileri incelenmiştir.

Elde edilen verilere göre, en fazla Ca^{+2} -ATPaz'ın ardından da Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinin etkilendiği buna karşın, Mg^{+2} -ATPaz aktivitesinin ise değişmediği gözlenmiştir. Enzim aktivitelerinin bazı durumlar dışında genel olarak azalış göstermesine karşın özellikle Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi metallerin tek tek etkilerinde azalış, birlikteki etkisinde ise artış göstermiştir. Dokular arasında Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi bakımından bir karşılaştırma yapıldığında ise solungaç dokusunun kas dokusuna göre daha duyarlı olduğu gözlenmiştir. Dokulardaki toplam protein düzeyi kısa süreli metal etkilerinde değişiklik gösterirken genel olarak kontrole göre herhangi bir ayırım göstermemiştir (EK 1.). ATPaz aktivitelerinin metal türü, etki süresi ve doku tipine göre değişiklik gösterdiği sonucu diğer çalışmalarla da uygunluk göstermektedir (Ay ve ark., 1999; Morgan ve ark., 2004; Silvestre ve ark., 2005; Atlı ve Canlı, 2007). Çeşitli çevresel kirleticilere cevap olarak ATPaz aktivitesinde değişikliklerin olduğu ve enzimin metallerin etkisine duyarlı olduğu

gösterilmiştir (Watson ve Benson, 1987; Canlı ve Stagg, 1996; Kamunde ve Wood, 2003).

Bu sonuçlar ışığında enzim aktivitesinde gerçekleşen azalışlar, osmoregülasyon sistemindeki bozulmalardan veya hücre zarında oluşan yapısal hasarın sonucunda zar geçirgenliğinin değişmesinden kaynaklanabilmektedir. Bununla birlikte metallerin tek ve iki değerlikli iyonlarla yarışması veya enzim yapısındaki -SH gruplarına bağlanarak konformasyonel değişikliklere neden olması da aktivitede azalmaya neden olabilmektedir. Enzim aktivitesindeki artışlar ise bozulan düzenin tekrar onarılabilmesi için telafi mekanizmaları ile açıklanabilmektedir. De La Torre ve ark. (2007), balıkta Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinin su kaynaklı kirleticilerin akut veya kronik etkileri sırasında artış veya azalış göstermesinin yanında herhangi bir değişiklik göstermeyebileceğini de belirtmiştir. Bu tepkilerin de kirleticilerin yoğun etkilerine, epitelyal taşınmanın fonksiyonel ve morfolojik bütünlüğünün bozulmasına doğrudan kirleticilerin etkisi veya dolaylı olarak endokrin sistemin hasar görmesine bağlı olarak geliştiğini vurgulamışlardır.

Balıklarda solungaç dokusu solunum gazları, elektrolitler, su ve azotlu atıkların taşınmasının ve asit-baz dengesinin gerçekleştiği biyolojik ortamdaki tartışmasız en karmaşık epitel dokulardan biridir. Bu karmaşık fonksiyonları yerine getirebilmek için yüzlerce filament ile binlerce lameller yapıdan oluşan bu epitel doku balığın tüm yüzey alanının yaklaşık % 50'sini oluşturmaktadır. Bu anlamda da metallerin toksik özelliklerinin gözlemlendiği birincil hedef organlardan biridir. Kas dokusu da balıkta besin zincirinde önemli bir besin kaynağı oluşturması nedeniyle ve Ca^{+2} -ATPaz aktivitesinin en yüksek aktivite gösterdiği doku olmasından dolayı metal toksisite çalışmalarında önemli bir belirteç doku olarak çalışılmaktadır (Heath, 1987; De La Torre ve ark., 2007).

Garcia-Santos ve ark., (2006) *O. niloticus*'un 96 saatlik akut Cd^{+2} (5, 15 ve 25 $\mu\text{g/mL}$) etkisi sonrasında solungaç Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinde herhangi bir değişim gözlemlemişlerdir. Plazma Na^+ düzeyinde de anlamlı bir değişiklik olmamasına karşın plazma Ca^{+2} düzeyinin etki süresi sonunda derişime bağlı bir azalış gösterdiği belirtilmiştir. Balıklar, homeostasiyi sağlamak için gerekli iyonları solungaçlar aracılığıyla sudan almaktadırlar. Solungaçlarda aktif iyon alımı ve organlardan iyon

akışından sorumlu klorit hücrelerinin metal etkilerinde hasar gördüğü ve bu hücrelerde elektrolit kaybının gözlemlendiği gösterilmiştir (Lauren ve McDonald, 1987; Tkatcheva ve ark., 2004; Garcia-Santos ve ark., 2006). Birincil toksik etkiler arasında sayılan ve Cd^{+2} 'nin Ca^{+2} iyonu ile yüksek ilgili Ca^{+2} bağlayan bölgeler için yarışarak Ca^{+2} alımını bloke ettiği ve böylece klorit hücrelerin bazolateral membranında bulunan Ca^{+2} pompasını inhibe ettiği bilinmektedir (Pelgrom ve ark., 1997). Bununla ilgili olarak yapılan analizler sonucunda tüm dokularda Cd^{+2} etkisinde gözlenen Ca^{+2} -ATPaz inhibisyonu ve Ca^{+2} iyon akışının bozulması bu durumu desteklemektedir. Metallerin dokulardaki elektrolit düzeylerine olan etkilerindeki farklılıkların balık ve metal türlerine, metal derişimleri ve suyun kimyasına bağlı olabileceği belirtilmiştir (Morgan ve ark., 1997; Rogers ve ark., 2003; Garcia-Santos ve ark., 2006). Zn^{+2} , Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonları arasındaki kimyasal benzerlik, Mg^{+2} -ATPaz ve Ca^{+2} -ATPaz'ın aktif bölgelerindeki bağlanma yerleri için Zn^{+2} , Mg^{+2} ve Ca^{+2} iyonları arasında yarışa neden olmaktadır. Hogstrand ve ark. (1996), Zn^{+2} 'nin solungaç klorit hücre membranını Ca^{+2} ile benzer yolla geçtiğini belirtirken, 100 pM serbest Zn^{+2} varlığında alabalık solungaç Ca^{+2} -ATPaz enziminin bloke olduğunu belirtmişlerdir. Metal birikiminde solungaçların birincil hedef ve metal alımının gerçekleştiği organ olması ve nefrotoksik etkilerin gözlemlendiği böbreklerin ise metaller için seçici olmaları nedeniyle önem kazandığı bilinmektedir (Heath, 1987; Canlı ve Atlı, 2003). Chhaya ve ark. (1997), ağır metal ve çeşitli organik bileşikler içeren yüksek pH'lı endüstriyel atıkların çeşitli derişimlerinin 2-6 günlük etkilerinde *Periophthalmus dipes*'in farklı dokularında ATPaz aktiviteleri üzerine etkilerini incelemişlerdir. Buna göre karaciğer, beyin ve kas $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPaz, Total-ATPaz, Ca^{+2} -ATPaz ve Mg^{+2} -ATPaz aktivitelerinde etkiye bağlı genel bir inhibisyon gözlenmesine karşın, en düşük aktivitenin en uzun etki süresinde gözlemlendiği ve çoğunlukla bazı yüksek derişim etkilerinde enzim aktivitelerinde artış görüldüğünü belirtmişlerdir. Ca^{+2} -ATPaz inhibisyonuna neden olan metaller toksisitelerine göre sıralandığında, sıralama $\text{Hg}^{+2} > \text{Pb}^{+2} > \text{Cu}^{+2} > \text{Cd}^{+2} > \text{Zn}^{+2}$ şeklindedir (Viarengo ve ark., 1993).

Doğal su ortamlarında genellikle subletal düzeylerde bulunan metallerin kronik etkilerine verilen tepkiler beslenme kaybı, büyümede gerilik, iyon kaybı,

solunum yetersizliği ve ölüm gibi çeşitli fizyolojik ve davranışsal değişiklikler olabilmektedir (Heath, 1987; Hogstrand ve Wood, 1996). McGeer ve ark. (2000), *O. mykiss*'de kronik metal etkileri sonrasında hasar-onarım mekanizmalarının geliştiğini, onarım fazının Cd^{+2} 'ye göre Cu^{+2} ve Zn^{+2} 'de daha kısa zamanda gerçekleştiğini belirtmiştir. Atlı ve Canlı (2007), 14 günlük 5, 10 ve 20 μM derişimlerdeki Zn^{+2} ile birlikte Cd^{+2} , Cu^{+2} ve Pb^{+2} etkisinde kalan *O. niloticus*'un çeşitli dokularında Na^{+}/K^{+} -ATPaz ve Ca^{+2} -ATPaz'ın da dahil olduğu farklı biyokimyasal parametreleri incelemişlerdir. Buna göre solungaç ve bağırsak Na^{+}/K^{+} -ATPaz ile kas Ca^{+2} -ATPaz aktivitesinin önemli düzeyde azalış gösterdiğine ilişkin bulguları bu çalışma ile de genellikle uygunluk göstermektedir. Sonuç olarak araştırmacılar metal tipi ve derişimlerine bağlı olarak değişiklik gösteren tepkileri ve duyarlılıkları nedeniyle ATPaz enzimlerinin çevre kirliliği çalışmalarında önemli birer belirteç olabileceklerini vurgulamışlardır. Benzer şekilde 100 günlük 3 mg Cd^{+2}/L , 75 mg Cu^{+2}/L ve 250 mg Zn^{+2}/L etkisinden sonra *O. mykiss*'de metallere göre farklı tepkiler gözlenmesinin yanında Cu^{+2} etkisinde solungaç Na^{+}/K^{+} -ATPaz aktivitesinde artış ve tüm vücutta metal etkilerinde Na^{+} ve Ca^{+2} dengesinde hasar gözlenmiştir (McGeer ve ark., 2000). Lorz ve McPherson (1976), akut (6 gün) ve kronik (172 gün) Cu^{+2} ve Zn^{+2} etkisinde bıraktıkları *Onchorhynchus kisutch*'da kısa süreli 5-80 μg Cu^{+2}/L etkisinde solungaç Na^{+}/K^{+} -ATPaz aktivitesinin derişime bağlı azalış göstermesine karşın 100-6000 μg Zn^{+2}/L etkisinin ise anlamlı etki göstermediğini belirtmiştir. Alabalık *Salmo gairdneri* ile yapılan farklı sıcaklık koşullarındaki 30 günlük in vivo Zn^{+2} (0.3-2.0 mg/L) etkisinde enzim aktivitesi genellikle artış göstermiştir. Araştırmacılar Zn^{+2} 'nin solungaç epitel hücre membranlarında Ca^{+2} ve Mg^{+2} bağlama bölgeleri için yarışarak solungaç geçirgenliğinde artışa neden olabileceğini bildirmişlerdir. Böylece genel solungaç ATPaz aktivitesindeki değişikliklerin sonucunda solungaç geçirgenliğindeki artışa bağlı iyon kaybının gözlenebileceği belirtilmektedir. Na^{+}/K^{+} -ATPaz, özellikle katalitik α alt ünitesinde yoğun olarak bulunan -SH gruplarınca zengin olması nedeniyle metallerin sülfidril gruplarına olan yoğun ilgi göstermeleri sonucu metallere oldukça duyarlılık göstermektedir. Bir çok biyokimyasal mekanizmada enzimlerle birlikte yaşamsal öneme sahip birinci serideki geçiş metalleri (Fe^{+2} , Zn^{+2} ,

Co^{+3} ve Cu^{+2}) yüksek derişimlerde ATPaz kofaktörleri (Na^+ , K^+ ve Mg^{+2}) ile yarışmakta ve enzim fonksiyonel grupları olan $-\text{SH}$, $-\text{NH}_2$ veya $-\text{COOH}$ ile kompleks oluşturmaktadır. Bununla birlikte metabolizmada herhangi bir rol üstlenmeyen metaller (Cd^{+2} , Hg^{+2}) de bu fonksiyonel gruplara bağlanarak enzim aktivitesinde değişikliklere neden olmaktadır. Vasic ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada bu metallerin in vitro etkilerinin artan derişimle doğru orantılı olarak ATPaz aktivitesinde inhibisyona neden olduğunu göstermişlerdir. Bununla birlikte araştırmacıların denenen tüm metaller için Na^+/K^+ -ATPaz'ın Mg^{+2} -ATPaz'a göre bu metallere daha duyarlı olduğu sonucu bu çalışmanın sonucunu da desteklemektedir.

Metal birikiminin genel mekanizması, sırasıyla şok, onarım ve uyum olmak üzere üç fazda gerçekleşen hasar-onarım modeli ile açıklanmaktadır (McDonald ve Wood, 1993). Buna göre ilk aşama olan şok fazında gözlenen fiziksel hasar öncelikle solungaç dokusunda gözlenmektedir ve fizyolojik homeostazi hasarı ile ilişkili olan bu faz genellikle kısa sürelidir (birkaç gün). İkinci aşama olan onarım fazının fizyolojik hasarı onarmak için mitoz, artan protein sentezi gibi biyosentetik mekanizmaların artışı içermesinin yanında metallothionein gibi metal bağlayan proteinlerle, metallerin zararlı etkilerinden korunmak için iyon düzenlenmesi ile ilgili diğer sistemlerin aktive olması da bu faz içerisinde gerçekleşmektedir. Üçüncü aşama olan uyum fazı ise uzun süreli metal etkilerinde artan dirençlilik olarak tanımlanmakta ve organizmaların iç fizyolojilerinin etki öncesi durumuna dönmesi veya yeni bir denge oluşturmalarını kapsamaktadır (Lauren ve McDonald, 1987; Pelgrom ve ark., 1995; McGeer ve ark., 2000). Buna karşın bu çalışmanın uzun süreli metal etkilerinde gözlenen sonuçlar genel olarak onarım ve uyum mekanizmalarının *O. niloticus* dokularında indüklenemediğini göstermesi aynı türle çalışan Monteiro ve ark. (2005)'nın sonuçları ile de vurgulanmıştır. Dokularda metal birikimlerinin erken fazda daha hızlı olmasının, dokularda metal bağlayan ligantların hızla doyuma ulaşmasından kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Wong ve Wong, 2000). Cd^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} ve etkileşimlerinin *O. niloticus* karaciğerine olan etkilerinin incelendiği çalışmada metallerin tek tek veya birlikte etkilerinin birikim düzeylerinde değişikliğe neden olması ile birlikte yüksek Cd^{+2} birikiminin yanında Zn^{+2} düzeyindeki azalışın balıkta Zn^{+2} düzenlemesinin varlığına işaret ettiği bildirilmiştir

(Heath,1987; Lange ve ark., 2002; Eroğlu ve ark., 2005). Total protein düzeyindeki azalma, karaciğer hasarına bağlı protein sentezinin zarar görmesi, emilimin indirgenmesi veya protein kaybından kaynaklanabilmektedir. *O. niloticus* ile yapılan çalışmada uzun süreli Cd^{+2} etkisine karşın serum total protein içeriğinde herhangi bir değişimin olmadığı gözlemlenmiştir (Öner ve ark., 2008). Canli (1995), 0.01 ve 0.1 mg/L derişimindeki Hg^{+2} ile 2.0 ve 20 mg/L derişimindeki Cr^{+6} ve Ni^{+2} 'nin 7 gün süreyle etkisinde kalan *C. carpio*'da serum protein düzeyinin önemli oranda değişmediğini göstermiştir. Bu çalışmada da toplam protein düzeyi birkaç etki dışında çok fazla değişiklik göstermemiştir.

Metallerin canlı organizmalara taşınması, yaşadıkları ortamdan biyolojik yüzeylere difüzyonu, organizmadaki yüzeylere bağlanma ve hücre içine özgün taşıyıcılarla alınmasını içermektedir. Metal koordinasyon bölgeleri hiçbir zaman tek bir metale özgün olmadığından metabolizma için gerekli metalleri bağlayan metal bölgeleri aynı zamanda benzer iyonik çap ve koordinasyon geometrisi gösteren başka metalleri de bağlayabilmektedir. Bunlar arasında yüksek toksik etkiye sahip ve metabolizma için gerekli olmayan Cd^{+2} ile buna karşın metabolizma için gerekli ve yüksek düzeylerinde toksik özellik gösterebilen Zn^{+2} , kimyasal olarak benzer olduklarından benzer taşınma yollarını kullanmaktadır. Cd^{+2} ve Zn^{+2} arasındaki yarışın çoğunlukla $-SH$ içeren bölgeler için gerçekleştiği söylenebilir. Bazı araştırmacılar çeşitli su organizmalarında Zn^{+2} varlığının Cd^{+2} alımını baskıladığını bildirmişlerdir (Sunda ve Huntsman, 2000; Chen ve ark., 2008). Metal etkileşimleri, balık ve diğer sucul organizmaların dokularında metal birikimini etkileyebilmektedir ve genel olarak metal birikimleri metal etkileşimlerinden çok tek başına olan etkilerinde daha yüksek olmaktadır (Mance, 1987). Brzoska ve Moniuszko-Jakoniuk (2001), Cd^{+2} ve Zn^{+2} etkileşiminin Cd^{+2} toksisitesinde oldukça önemli olduğunu vurgulamışlar ve Cd^{+2} 'nin toksik etkisinin Zn^{+2} eksikliğinde önemli düzeyde arttığını belirtmişlerdir. Eroğlu ve ark. (2005), *O. niloticus* karaciğerinde Zn^{+2} birikiminin Cd^{+2} - Zn^{+2} etkileşiminde en yüksek düzeyde olmasını, Cd^{+2} toksisitesini önlemek adına gerçekleştiğini kaydetmişlerdir. Pelgrom ve ark. (1995) da metal karışımlarının etkisinde organizmalarda karmaşık etkileşim mekanizmalarının devrede olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada da metal etkileşimlerinin dokulardaki metal

birikimlerine olan etkilerine benzer sonuçlar özellikle Na^+/K^+ -ATPaz ve Ca^{+2} -ATPaz aktivitelerinde de gözlenmiştir. Buna göre özellikle en uzun etki süresinde Cd^{+2} ve Zn^{+2} 'nin tek başına etkilerinde Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi azalış gösterirken bu metallerin birlikteki etkilerinde olası etkileşim mekanizmaları ve metallerin birbirleriyle enzimin bağlanma bölgeleri için yarışmalarına bağlı olarak artış göstermiştir. Buna karşın solungaç Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi ise genellikle azalış göstermiş, Cd^{+2} - Zn^{+2} karışımlarının sinerjistik etki göstermelerine bağlı olarak da metallerin tek tek olan etkilerine göre enzim aktivitesinde daha fazla azalışa neden olmuştur. Bu veriler, ATPaz aktivitelerinin metal tipi ve etki sürelerinin yanında metallerin birlikteki etkilerinde de önemli düzeyde değiştiğini ve çevre kirliliği çalışmalarında dikkate alınması gerektiğine işaret etmektedir.

Günümüzde, tatlı su kirliliği ile ilgili geleneksel çalışmaların yanında, doku ve vücut sıvılarındaki kimyasal maddeler, toksik metabolitler, enzim aktiviteleri veya diğer biyokimyasal değişiklerin analizleri gibi toksik maddelerin biyolojik sistemleri nasıl etkilediğini gösteren belirteçlerin kullanımı daha da önem kazanmaktadır. Molekül derişimlerinin ölçümü ile saptanan değışiklikler olarak tanımlanan toksisite belirteçleri, kirletici etkisi ile risk değerlendirme mekanizmalarını birbirine bağlamaktadır (De La Torre ve ark., 2007). Elde edilen sonuçlar enzim aktiviteleri ile diğer ölçülen parametrelerin metallere verdikleri tepkilerinin, derişim ve süresi ile metal tipi ve doku tipine bağlı olarak değıştiğini göstermiştir. Buna göre enzim aktivitesindeki azalışlar, metal birikimi, iyon ve protein düzeyindeki değışiklikler, enzim yapısındaki -SH gruplarına metallerin bağlanması, dokudaki yapısal farklılıklar ile bunlara bağlı gelişen iyon ve osmoregülatör sistem bozukluklarından kaynaklanabilmektedir. Buna benzer şekilde daha önce enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmalarda görev alan parametrelerle yapılan çalışmalar bu durumu desteklemektedir (Atli ve ark., 2006; Atli ve Canli, 2008). Bu çalışma ile metallerle ATPaz'lar arasında, enzim aktivitesinde değışikliklere yol açan kimyasal mekanizmanın anlaşılmasının önemi vurgulanmaktadır. Aynı zamanda toksik maddelerin saptanmasında ATPaz aktivite değışimini temel alan analizler basit, kullanışlı ve hızlı ölçüm sağladığından ekotoksikoloji çalışmalarında uyarıcı sistem olarak kullanılabilmektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

1. *O. niloticus* 1 µg/mL derişimlerdeki Cd^{+2} ve Zn^{+2} ile $Cd^{+2}+Zn^{+2}$ karışımının (1:1) etkisine 0, 7, 14, 21 ve 28 gün süreyle bırakılmıştır.
2. Bu süreler sonunda balıklarda solungaç Na^{+}/K^{+} -ATPaz, Mg^{+2} -ATPaz ve Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi ile kas Ca^{+2} -ATPaz aktiviteleri ölçülmüştür.
3. Metal etkileri sonunda balıklarda solungaç ve kas ATPaz aktiviteleri önemli oranda değişmiştir. Buna göre Na^{+}/K^{+} -ATPaz ve Ca^{+2} -ATPaz aktiviteleri metal türü, tek ve birlikteki etkileri, etki süresi ve doku tipine bağlı olarak genellikle azalış gösterirken, Mg^{+2} -ATPaz aktivitelerinde anlamlı bir değişiklik görülmemiştir.
4. Solungaç Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi metallerin tek tek ve birlikteki etkilerinde azalış gösterirken, solungaç Na^{+}/K^{+} -ATPaz aktivitesi metallerin tek tek etkisinde azalış, birlikteki etkisinde ise artış göstermiştir.
5. Toplam protein düzeyleri ise genel olarak herhangi bir değişiklik göstermemiştir.

5.2. Öneriler

1. Metallerin toksik etkilerinin belirlenmesinde duyarlı belirteçler olan ATPaz enzimlerinin yanında oksidatif hasarın tanısında önemli olan antioksidan enzimler de kullanılabilir.
2. ATPaz aktivite analizleri uzun süreli aralıklarla saha çalışmalarına da uygulanırsa doğal ortamdaki metal etkilerini gözlemlemede çok daha doğru sonuçlar elde edilebilir.
3. Farklı sucul organizmalarda ATPaz'lar gibi duyarlı metal toksisite belirteçleri kullanılarak metal etkileri incelenebilir.
4. Metal türü yanında suyun farklı fizikokimyasal özellikleri de göz önünde bulundurularak ATPaz aktivitelerin verdiği tepkiler araştırılabilir.

KAYNAKLAR

- AKAHORI, A., GABRYELAK, T., JOWIAK, Z., and GONDKO, R., 1999. Zinc-Induced Damage to Carp (*Cyprinus carpio* L.) Erythrocytes *In Vitro*. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 47 (1): 89-98.
- ALMEIDA, J.A., NOVELLI, E.K.B., SILVA, M.D.P., and JUNIOR, R.A., 2001. Environmental cadmium Exposure and Metabolic Responses of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Environmental Pollution*, 114: 169-175.
- ALMEIDA, J.A., DINIZ, Y.S., MARQUES, S.F.G., FAINE, L.A., RIBAS, B.O., BURNEIKO, R.C., and NOVELLI, E.L.B., 2002. The Use of The Oxidative Stres Responses as Biomarkers in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Exposed to In Vivo Cadmium Contamination *Environment International*, 27: 673-679.
- ALVES, L.C., and WOOD, C.M., 2006. The Chronic Effects of Dietary Lead in Freshwater Juvenile Rainbow Trout (*Onchorhynchus mykiss*) Fed Elevated Calcium Diets. *Aquatic Toxicology*, 78: 217-232.
- ATLI, G., and CANLI, M., 2003. Natural Occurrence of Metallothionein-like Proteins in the Liver of Fish *Oreochromis niloticus* and Effects of Cadmium, Lead, Copper, Zinc, and Iron Exposures on Their Profiles. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70: 619-627.
- ATLI, G., ALPTEKİN, Ö., TÜKEL, S., and CANLI, M., 2006. Response of Catalase Activity to Ag^+ , Cd^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} in Five Tissues of Freshwater Fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 143: 218-224
- ATLI, G., and CANLI, M., 2007., Enzymatic Responses to Metal Exposures in a Freshwater Fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 145: 282–287.
- ATLI, G., and CANLI, M., 2008a. Responses of Metallothionein and Reduced Glutathione in a Freshwater Fish *Oreochromis niloticus* Following Metal Exposures. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 25: 33–38.

- ATLI, G., and CANLI, M., 2008b. Characterization of Branchial Na,K-ATPase from Three Freshwater Fish Species (*Oreochromis niloticus*, *Cyprinus carpio*, and *Oncorhynchus mykiss*). Turkish Journal of Zoology, 32: 299-304.
- ATLI, G., and CANLI, M., 2010. Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. Ecotoxicology and Environmental Safety 73: 1884–1889.
- 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.
- 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.
- BAY, S., GREENSTEIN, D., SZALAY, P., and BROWN, D., 1990. Exposure of Scorpionfish (*Scorpaena guttata*) to Cadmium: Biochemical Effects of Chronic Exposure. Aquatic Toxicology, 16: 311.
- 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., MARTINS, S.E.G., and BARCAROLLI, I.F., 2004. Mechanism of Acute Copper Toxicity in Euryhaline Crustaceans: Implications for the Biotic Ligand Model. International Congress Series, 1275: 189–194.
- BIANCHINI, A., MARTINS, S.E.G., and BARCAROLLI, I.F., 2006. Mechanism of Acute Copper Toxicity in Euryhaline Crustaceans: Implications for the Biotic Ligand Model. International Congress Series, 1275: 189–194.

- BRZOSKA, M, M., and MONIUSZKO-JAGONIUK, J., 2001. Interactions between cadmium and zinc in the organism. *Food and Chemical Toxicology* 39 (2001) 967-980.
- CANLI, M., and ERDEM, C., 1994. Mercury Toxicity and Effects of Exposure Concentration and Period on Mercury Accumulation in Tissues of a Tropical Fish *Tilapia nilotica* (L.). *Turkish Journal of Zoology*, 18: 233-239.
- CANLI, M., 1995. Effects of Mercury, Chromium and Nickel on Some Blood Parameters in the Carp *Cyprinus carpio*. *Turkish Journal of Zoology*, 19: 305-311.
- CANLI, M., and 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
- CİCİK, B., AY, Ö., KARAYAKAR, F., 2004, Effects of Lead and Cadmium Interactions on the Metal Accumulation in Tissue and Organs of the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Bulletin of Enviromental Contamination and Toxicology* 72:141-148
- CHEN, D., QIAN, P,-Y., and WANG, W,-XIONG., 2008, Biokinetics of Cadmium and Zinc in Marine Bacterium: Influences of Metal Interaction and Pre- Exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 27, No. 8, pp. 1794-1801
- CHHAYA, J., THAKER, J., MITTAL, R., NUZHAT, S., MANSURI, A.P., and KUNDU, R., 1997. Influence of Textile Dyeing and Printing Industry Effluent on ATPases in Liver, Brain, and Muscle of Mudskipper, *Periophthalmus dips*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 58: 793-800.

- DE LA TORRE, F.R., SALIBIAN, A., and FERRARI, L., 2000. Biomarkers Assessment in Juvenile *Cyprinus carpio* Exposed to Waterborne Cadmium. *Environmental Pollution*, 109: 277-282.
- DE LA TORRE, F.R., SALIBIAN, A., and FERRARI, L., 2007. Assessment of the Pollution Impact on Biomarkers of Effect of a Freshwater Fish. *Chemosphere*, 68: 1582-1590.
- EISLER, R., and HENNEKEY, R.J., 1977. Acute Toxicities of Cd^{2+} , Cr^{+6} , Hg^{2+} , Ni^{2+} and Zn^{2+} to Estuarine Macrofauna. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 6: 315-323.
- ENGEL, D.W., and BROUWER, M., 1984. Trace Metal-binding Proteins in Marine Molluscs and Crustaceans. *Marine Environmental Research*, 13: 177-194.
- EROGLU, K., ATLI, G., and CANLI, M., 2005. Effects of Metal (Cd, Cu, Zn) Interactions on the Profiles of Metallothionein-like Proteins in the Nile Fish *Oreochromis niloticus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 75: 390-399.
- FLIK, G., VAN RIJS, J.H., and WENDELAAR BONGA, S.E., 1985. Evidence for High-affinity Ca^{2+} -ATPase Activity and ATP-driven Ca^{2+} -transport in Membrane Preparations of the Gill Epithelium of the Cichlid Fish *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Experimental Biology*, 119: 335-347.
- FOULKES, E.C., 1980. Some Determinants of Intestinal Cadmium Transport in the Rat. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, 3: 471-481.
- 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.
- GEORGE, S.G., 1991. Cell Biochemistry and Transmembrane Transport of Some Metals (E. MERIAN editor). *Metals and Their Compounds in the Environment*, New York, s.511-521.

- HEATH, A.G., 1987. Water Pollution and Fish Physiology. CRC press, Florida, USA, 245s.
- HILMY, A.M., ABD EL-HAMID, N.F., and GHAZALY, K.S., 1988. Variation of Zinc and Copper Levels with Sex and Size in Different Tissues of the Crab *Portunus pelagicus* (Linnaeus). *Folia Morphologica*, 2: 160-166.
- HOGSTRAND, C., and WOOD, C.M., 1996. The Physiology and Toxicology of Zinc in Fish (E.W. TAYLOR editor). *The Toxicity of Silver to Marine Fish*, University Press, Cambridge, s.61–84.
- 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.
- ISSARTEL, J., BOLUO, V., WALLON, S., GEFFARD, O., CHARMANTIER, G., 2010, Cellular and molecular osmoregulatory responses to cadmium exposure in *Gammarus fossarum* (Crustaceae, Amphipoda). *Chemosphere* 81: 701-710
- 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.
- KOMJAROVA, I., BLUST, R., 2008, Multi-metal interactions between Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in water flea *Daphnia magna*, a stable isotope experiment. *Aquatic Toxicology* 90:138-144
- KUHNERT, P.M., KUHNERT, B.R., and STOKES, R.M., 1976. The Effect of In Vivo Chromium Exposure on Na/K- and Mg-ATPase Activity in Several Tissues of the Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 15 (4): 383-390.
- LANGE, A., AUSSEIL, O., and SEGNER, H., 2002. Alterations of Tissue Glutathione Levels and Metallothionein Mrna in Rainbow Trout during Single and Combined Exposure to Cadmium and Zinc. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 131: 231–243.

- LAUREN, D.J., and McDONALD, D.G., 1987. Acclimation to Copper by Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*: Biochemistry. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 44: 105-111.
- LORZ, H.W., and McPHERSON, B., 1976. Effects of Copper or Zinc in fresh Water on the Adaptation to sea Water and ATPase Activity, and the Effects of Copper on Migratory Disposition of Coho Salmon (*Onchorhynchus kisutch*). Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 33: 2023-2030.
- 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.
- MANCER, G., 1987. Pollution Threat of Heavy Metals in Aquatic Environment. Elsevier, London, 363s.
- McDONALD, D.G., and WOOD, C.M., 1993. Branchial Mechanisms of Acclimation to Metals in Freshwater Fish (J.C. RANKIN and F.B. JENSEN editor). Fish Ecophysiology, Chapman and Hall, London, s.297–332.
- McGEER, J.C., SZEDEDINSZKY, 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.
- MONTEIRO, S.M., MANCERA, J.M., FONTAINHAS-FERNANDES, A., and SOUSAC, M., 2005. Copper Induced Alterations of Biochemical Parameters in the Gill and Plasma of *Oreochromis niloticus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 141: 375 – 383.
- MORGAN, I.J., HENRY, R.P., and WOOD, C. M., 1997. The Mechanism of Acute Silver, Nitrate Toxicity in Freshwater Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) is Inhibition of Gill Na⁺ and Cl⁻ Transport. Aquatic Toxicology, 38: 145-163.

- MORGAN, T.M., GROSELL, M., PLAYLE, R.C., and WOOD, C.M., 2004. The Time Course of Silver Accumulation in Rainbow Trout during Static Exposure to Silver Nitrate: Physiological Regulation or an Artifact of the Exposure Conditions? *Aquatic Toxicology*, 66: 55–72.
- OHNESORGE, F.K., and WILHELM, M., 1991. Zinc (E. MERIAN editör). *Metals and Their Compounds in the Environment*, New York, s.1309-1342.
- ÖNER, M., ATLI, G., and CANLI, M., 2008. Changes in Serum Biochemical Parameters of Freshwater Fish *Oreochromis niloticus* Following Prolonged Metal (Ag, Cd, Cr, Cu, Zn) Exposures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27: 360–366.
- 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.
- 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.
- PELGROM, S.M.G.J., LOCK, R.A.C., BALM, P.H.M., and WENDELAAR BONGA, S.E., 1997. Calcium Fluxes in Juvenile Tilapia, *Oreochromis mossambicus*, Exposed to Sublethal Waterborne Cd, Cu or Mixtures of These Metals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16: 770-774.
- RIEDEL, B., and CHRISTENSEN, G., 1979. Effect of Selected Water Toxicants and Other Chemicals upon Adenosine Triphosphatase Activity *In Vitro*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 23: 365-368.
- ROESIJADI, G., 1992. Metallothioneins in Metal Regulation and Toxicity in Aquatic Animals. Review. *Aquatic Toxicology*, 22: 81-114.
- ROGERS, J.T., RICHARDS, J.G., and WOOD, C.M., 2003. Ionoregulatory Disruption as the Acute Toxic Mechanism for Lead in the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 64: 215-234.

- SANCHO, E., FERNANDEZ-VEGA, C., FERRANDO, M.D., and ANDREU-MOLINER, E., 2003. Eel ATPase Activity as Biomarker of Thiobencarb Exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56: 434–441.
- SARIHAN, E., and TORAL, Ö., 1982. Bir Tropikal Balık Türü Olan *Tilapia nilotica* (L.) 1758'in Çukurova Bölgesi'nde Yetiştirme Sorunları Üzerine Bir Tartışma. *Tübitak 7. Bilim Kongresi* (9 Eylül- 3 Ekim 1980). Veteriner ve Hayvancılık Araştırma Grubu Tebliği, Ankara, 33-44.
- 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.
- SIMKISS, K., and TAYLOR, M.G., 1989. Metal Fluxes Across the Membranes of Aquatic Organisms. Review. *Aquatic Sciences*, 1 (1): 173-188.
- SUNDA, W, G., and HUNTSMAN, S, A., 2000. Effect of Zn, Mn, and Fe on Cd accumulation in phytoplankton: Implications for oceanic Cd cycling. *The American Society of Limnology and Oceanography*, 45 (7): 1501-1516.
- TAGLIARI, K.C., VARGAS, V.M.F., ZIMIANI, K., and CECCHINI, R., 2004. Oxidative Stress Damage in the Liver of Fish and Rats Receiving an Intraperitoneal Injection of Hexavalent Chromium as Evaluated by Chemiluminescence. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 17: 149–157.
- THAKER, J., CHHAYA, J., NUZHAT, S., MITTAL, R., MANSURI, A.P., and KUNDU, R., 1996. Effects of Chromium (VI) on Some Ion-dependent ATPases in Gills, Kidney and Intestine of a Coastal Teleost *Periophthalmus dips*. *Toxicology* 112: 237–244.

- TKATCHEVA, V., HYVARINEN, H., KUKKONEN, J., RYZHKOV, L.P., and HOLOPAINEN, J., 2004. Toxic Effects of Mining Effluents on Fish Gills in a Subarctic Lake System in NW Russia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57: 278–289.
- USEPA, 2001. Update of Ambient Water Quality Criteria for Cadmium. EPA-822-R-01-001. United States Environmental Protection Agency (USEPA). Washington, DC, USA.
- VASIĆ, V, M., ČOLOVIĆ M, B., KRSTIĆ, D, Z., 2009. Mechanism of Na^+/K^+ ATPase and Mg^{2+} -ATPase Inhibition by Metal Ions and Complexes. *Society of Physical Chemists of Serbia*, 63 (5a): 499-509.
- 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.
- VIARENGO, A., 1989. Heavy Metals in Marine Invertebrates. Mechanism of Regulation and Toxicity at the Cellular Level. *Aquatic Sciences*, 1 (2): 295-317.
- VIARENGO, A., MANCINELLI, G., PERTICA, M., FABBRI, R., and ORUNESU, M., 1993. Effects of Heavy Metals on the Ca^{2+} -ATPase Activity Present in Gill Cell Plasma-membrane of Mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 106 (3): 655-660.
- WATSON, T.A., and BEAMISH, F.W.H., 1980. Effects of Zinc on Branchial ATPase Activity In Vivo in Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 66: 77-82.
- WATSON, T.A., and BEAMISH, F.W.H., 1981. The Effects of Zinc on Branchial Adenosine Triphosphatase Enzymes In Vitro from Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 68: 167-173.
- WATSON, 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.

- WHO, 1992. Cadmium—Environmental aspects. Environmental Health Criteria No. 135. World Health Organisation (WHO), The International Programme on Chemical Safety (IPCS), Geneva.
- 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.

ÖZGEÇMİŞ

Ali Eroğlu 1984 yılında Adana’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana’da tamamladıktan sonra 2003 yılında kazandığı Selçuk Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliğinden 2008 yılında mezun oldu.

2008 yılı Eylül ayında Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Yüksek Lisans eğitime başladı. Yüksek Lisans eğitimini, 2011 yılında yatay geçiş ile Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde başarıyla tamamladı.

EK 1. *Oreochromis niloticus* dokularında metal etkilerinde ATPaz aktivitelerinin kontrole göre yüzde (%) değişimleri.
 * Anlamlı istatistiksel farklılıkları göstermektedir.

Metal	Gün	SOLUNGAÇ					KAS	
		Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz	Mg ²⁺ -ATPaz	Ca ²⁺ -ATPaz	Protein	Ca ²⁺ -ATPaz	Protein	
Zn ²⁺	7	8 ↑	13 ↑	51 ↑*	11 ↑*	21 ↑	12 ↑	
	14	17 ↓	11 ↓	72 ↓*	5 ↑	3 ↑	31 ↑*	
	21	22 ↓	4 ↑	70 ↓*	12 ↓	74 ↑	9 ↓	
	28	22 ↓*	30 ↓	39 ↓	15 ↓	82 ↓*	10 ↑	
Cd ²⁺	7	35 ↓*	3 ↑	24 ↓	7 ↑	9 ↓	8 ↑	
	14	28 ↓	8 ↑	60 ↓*	2 ↓	5 ↑	23 ↑*	
	21	57 ↑*	11 ↓	70 ↓*	8 ↓	89 ↑	4 ↓	
	28	16 ↓*	7 ↓	70 ↓*	11 ↓	25 ↓	10 ↑	
Cd ²⁺ +Zn ²⁺	7	52 ↑*	2 ↓	59 ↓	13 ↓*	73 ↑	13 ↑	
	14	19 ↑	6 ↓	66 ↓*	4 ↓	48 ↓	14 ↑	
	21	13 ↑	4 ↑	69 ↓*	6 ↓	2 ↓	15 ↓	
	28	18 ↑*	23 ↓	100 ↓*	12 ↓	78 ↓*	2 ↓	