

Bakırın *Clarias lazera* (Valenciennes, 1840)'da Doku Glikojen ve Serum Glukoz Düzeyi Üzerine Etkileri

Meryem Arslan, Sahire Karaytuğ, *Bedii Cicik

M.E.Ü. Su Ürünleri Fakültesi, Yenişehir Kampüsü, C Blok, Kat2, 33169 Mersin, Türkiye

*E mail: bcicik@mersin.edu.tr

Abstract: *Effects of copper on tissue glycogen and sera glucose levels of Clarias lazera (Valenciennes, 1840).* Effects of copper on liver and muscle glycogen and sera glucose levels of *Clarias lazera* (Valenciennes, 1840) were determined after exposing the animals to 0.1, 0.5 and 1.0 ppm Cu over 7, 15 and 30 days periods. Anthron and O-tolidine methods were used for the determination of tissue glycogen and sera glucose levels respectively. The studied copper concentrations caused significant alterations in the carbohydrate metabolism of *C. lazera* by effecting tissue glycogen and sera glucose levels during the exposure periods studied.

Key Words: *Clarias lazera*, Copper, Glycogen, Glucose.

Özet: *Clarias lazera* (Valenciennes, 1840) ile yapılan bu çalışmada, balıklar 7, 15 ve 30 gün sürelerle bakırın 0.1, 0.5 ve 1.0 ppm ortam derişimlerinin etkisinde bırakılarak, metalin karaciğer ve kas dokularındaki glikojen düzeyi ile serum glukoz düzeyi üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Doku glikojen düzeyinin belirlenmesinde Antron, serum glukoz düzeyinin belirlenmesinde ise O-Toluidin yöntemi kullanılmıştır. İncelenen bakır derişimlerinin, belirlenen sürelerde *C. lazera*'nın doku glikojen ve serum glukoz düzeylerini etkileyerek karbonhidrat metabolizmasında önemli değişimlere neden olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Clarias lazera*, Bakır, Glikojen, Glukoz.

Giriş

Ağır metaller, normal koşullarda yağmur, rüzgar ve erozyon gibi doğal olaylar sonucunda sucul ekosistemlerde ng/L veya µg/L düzeylerinde bulunur (Nusse ve ark., 1995). Ancak insan nüfusundaki hızlı artış, endüstrileşme, kentleşme ve modern tarım uygulamaları gibi temelde insan aktivitesine dayalı faktörler, ağır metallerin sucul ekosistemlere katılımını arttırmaktadır (Wepener ve ark., 2001).

Hayvansal organizmalar, gelişme ve üreme gibi yaşamsal olaylar için belli bir derişim aralığında bakır, çinko gibi ağır metallere gereksinim duyarlar. Bunların yüksek ve düşük derişimleri, organizmalarda metabolik bozukluklara neden olurken, özellikle yüksek derişimleri akuatik canlılarda mortaliteye neden olmaktadır (Nusse ve ark., 1995).

Bakır hayvansal organizmalarda, kemik oluşumu, omuriliğin miyelinleşmesi, hemoglobin ve metalloenzimlerin sentezinde işlev görmekte, sitokrom oksidaz gibi hücredeki redoks reaksiyonlarına katılan enzimlerin başlıca yapısal bileşenini oluşturur. Bakırın elektrik endüstrisinde, sucul vejetasyonu kontrol etmede, gübre ve pestisidlerin bileşiminde tarımda yaygın bir şekilde kullanımı, sucul ortamlara katılımını artırarak doğal düzeyinin (0.005 µmol/L) aşılmasına neden olur (Nusse ve ark., 1995). Bakırın balıklar tarafından ortamdan alınımı, dokularda birikime, hücresel veya moleküler düzeyde yapısal ve işlevsel bozukluklara neden olmaktadır (Dethloff ve ark., 2001).

Çeşitli balık türleri ile yapılan araştırmalarda bakırın

subletal derişimlerinin uzun süreli etkisinin dokularda birikime (Cicik, 2003) solungaçlarda yapısal bozukluklara, omurgada deformasyonlara, immün sistemin zayıflamasıyla nörolojik bozukluklara (Stagg ve Shuttleworth, 1982), hematolojik ve biyokimyasal parametrelerde değişimlere neden olduğu (Tort ve Torres, 1988) belirlenmiştir.

Glukoz, omurgalı hayvanlarda başlıca yüksek enerjili bileşik olup, kas ve karaciğer dokularında glikojen formunda depo edilir. *Ictalurus nebulosus* (Christensen ve ark., 1972) ve *Oncorhynchus mykiss*'de (Dethloff ve ark., 1999) subletal derişimlerdeki bakırın serum glukoz düzeyini arttırırken, *Salmo trutta*'da (Levesque ve ark., 2002) kas ve karaciğer glikojen derişimini azalttığı saptanmıştır. Glukoz ve glikojen düzeylerindeki değişimlerin ağır metallerin etkisi yanı sıra açlık, hipoksik koşullar ve yoğun stoklama gibi stres faktörlerinin etkisinde de meydana geldiği belirlenmiştir (Vosyliene, 1999). Balıklarda, ağır metal etkisi ve değişen ortam koşullarında karbonhidrat rezervleri çok çabuk değişim gösterdiğinden toksikolojik çalışmalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Araştırmada materyal olarak kullanılan *Clarias lazera*, ülkemizde özellikle Doğu Akdeniz bölgesindeki akarsu ve drenaj kanallarında yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Yaşam ortamları evsel, endüstriyel ve tarımsal aktivitelerin doğrudan etkisi altındadır. Çevresel koşullardaki ekstrem değişimlerle kirleticilere karşı hoşgörüsü yüksek ve protein kaynağı olarak tüketilen bir tür olması bakımından önemlidir.

Ağır metal etkisinde metabolik olaylarla, biyokimyasal

parametrelerdeki değişimler, balığın fizyolojik durumu ile ortamdaki kirlilik düzeyini yansıtaçağından bu araştırmada bakırın 0.1, 0.5 ve 1.0 ppm ortam derişimlerinin 7, 15 ve 30 gün sürelerle *C. lazera*'da doku glikojen ve serum glukoz düzeyleri üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Deneylerde materyal olarak *C. lazera* türü kullanılmıştır. Balıklar Mersin ili, Silifke ilçesinde bulunan özel sektöre ait yetiştirme havuzlarından sağlanmıştır. Deneyler, Mersin Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi uygulama birimlerinde yer alan 25 ± 1 °C durağan sıcaklığa sahip, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık fotoperiyodu uygulanan Temel Bilimler Araştırma Laboratuvarı'nda yürülmüştür. Laboratuvara getirilen balıklar, araştırmaya başlamadan önce her biri 40X120X40 cm boyutlarında olan, içerisinde 120 L dinlenmiş çeşme suyu

bulunan 8 adet cam akvaryum içerisinde 3 ay süreyle bekletilerek laboratuvar koşullarına uyumları sağlanmıştır. Metabolik aktivite ile incelenen parametreler, büyüklüğe bağlı olarak değişim gösterdiğinden deneylerde yaklaşık aynı boy ($25 \pm 0,50$ cm) ve ağırlıkta ($100.62 \pm 4.50g$) balıklar kullanılmıştır.

Deneylerde biri kontrol diğeri deney akvaryumu olmak üzere her biri 40X120X40 cm boyutlarında 4 cam akvaryum kullanılmıştır. İlk üç akvaryuma sırasıyla 120 L 0.1, 0.5 ve 1.0 ppm derişimlerdeki bakır çözeltileri konurken, kontrol olarak kullanılacak akvaryuma belirtilen hacimde dinlenmiş çeşme suyu konmuştur. Başlangıçta her akvaryum içerisinde 18 balık konarak deneyler üç tekrarlı olarak yürütülmüş ve her tekrarda iki balık olmak üzere belirlenen derişimlerde her süre için 6 balık analiz edilmiştir. Akvaryum ortamının bazı fiziksel ve kimyasal parametreleri aşağıda belirtildiği şekilde saptanmıştır.

Sıcaklık	$24 \pm 1^\circ\text{C}$	Toplam Sertlik	230 ± 0.75 ppm CaCO_3
Toplam Alkalinite	326 ± 0.50 ppm CaCO_3	pH	7.40 ± 0.20
Çözünmüş Oksijen	6.4 ± 0.70 mg/l	Bakır Derişimi	± 0.01 ppm

Akvaryumlarda havalandırma, merkezi havalandırma sistemi ile sağlanmıştır. Balıklar günde bir kez toplam biomasın %2'si kadar hazır balık yemi (Pınar yem pelet no.2) ile beslenmiştir. Adsorbsiyon, presipitasyon ve evaporasyon gibi nedenlerle deney çözeltilerinin derişiminde zaman içerisinde değişimler olabileceğinden, deneyler süresince deney ve kontrol akvaryumlarındaki su iki günde bir değiştirilerek ortam yenilenmiştir.

Belirlenen süreler sonunda akvaryumlardan çıkartılan balıklar, doku ve kan örneklemeleri için 75 ppm derişimindeki MS222 (3 amino benzoik asit etil ester) anestezi maddesi ile bayılmıştır. Vücut yüzeyindeki mukus ve metal rezidülerini uzaklaştırmak amacıyla çeşme suyu ile yıkanıp kurulan balıklardan, glukoz analizinde kullanılacak kan örnekleri kaudal pedinkülün kesilmesi ile dorsal aorttan alındıktan sonra glikojen analizinde kullanılacak kas ve karaciğer dokuları ayrı ayrı disekte edilmiştir.

Glukoz analizinde kullanılacak her bir balığın kan örnekleri, içerisinde her hangi bir antikoagülant madde bulunmayan santrifüj tüplerine aktarılarak, 3500 dev/dak. da 10 dakika süreyle santrifüjlenmiştir. Üst faza geçen serum örneklerinde glukoz analizi yapılmıştır. Serum örneklerindeki glukoz derişiminin belirlenmesinde O-toluidin yöntemi kullanılmıştır (Wedemeyer ve Yasutake, 1977). Bu amaçla serum örneklerinden 10 µl alınarak deney tüplerine aktarılmış ve üzerlerine 3.5 ml O-toluidin ayırıcı eklenerek tüpler kaynar su banyosunda 10 dakika süreyle bekletilmiştir. Kaynar su banyosundan çıkartılıp soğutulan örneklerdeki glukoz derişimi spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

Glikojen derişimi belirlenecek kas ve karaciğer dokuları yaş ağırlıkları belirlendikten sonra santrifüj tüplerine aktarılmış ve doku örneklerinden protein ve lipid ekstraksiyonunda Wedemeyer ve Yasutake (1977) tarafından belirlenen yöntem uygulanmıştır. Protein ve lipid bileşenleri uzaklaştırılan örneklerdeki glikojen derişiminin belirlenmesinde antron

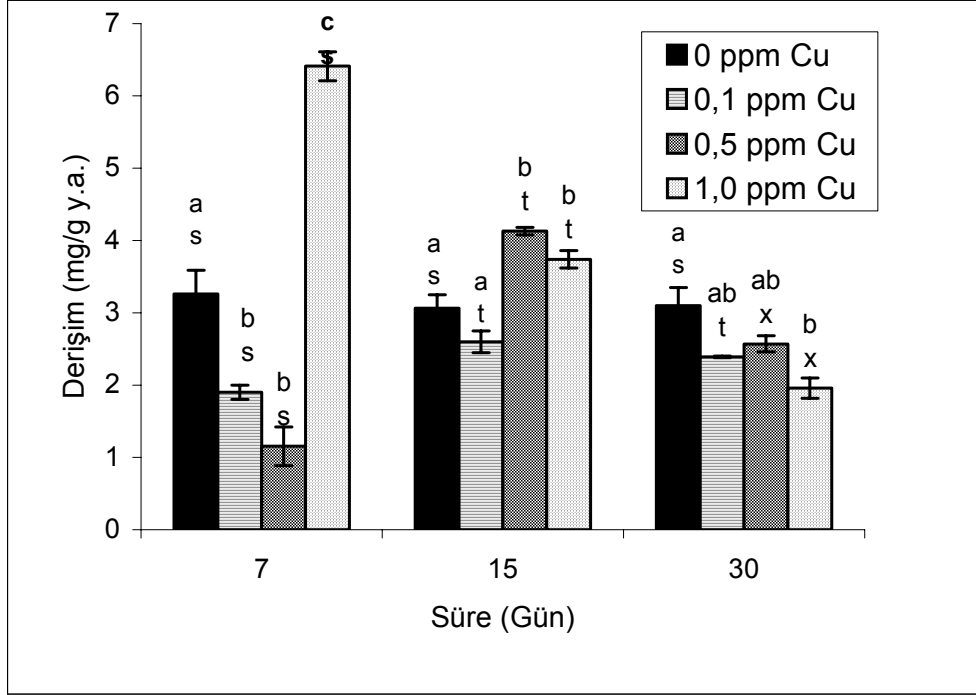
yöntemi uygulanmıştır (Plummer, 1971). Bu amaçla örnek çözeltilerden 2 ml alınarak deney tüpüne aktarılmış, üzerine 4 ml antron ayırıcı eklenerek kaynar su banyosunda 10 dakika süreyle bekletilmiştir. Soğutulan örneklerdeki glikojen absorbans değerleri spektrofotometrede 620 nm dalga boyunda belirlenmiştir. Deney verilerinin istatistik analizinde Student Newman Keul's (SNK) testi uygulanmıştır.

Bulgular

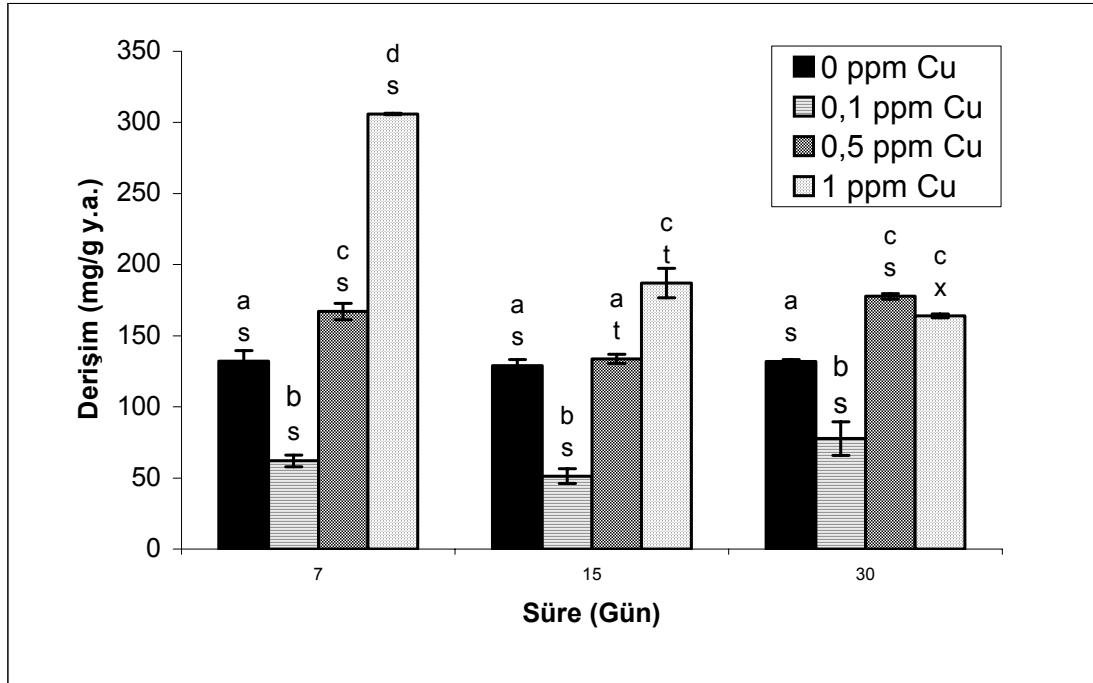
Bakırın belirlenen ortam derişimlerinin 7, 15 ve 30 gün sürelerle etkisi, balıklarda mortaliteye neden olmamıştır. Metal etkisinin başlangıcında balıklarda yüzme hareketlerinde koordinasyon bozukluğu, besin almama, akvaryum yüzeyine yönelme gibi davranış değişiklikleri ile vücut yüzeyinde fazla miktarda mukus gözlenmiştir. Etkide kalma süresinin uzaması ile bu değişikliklerin ortadan kalktığı saptanmıştır.

Bakırın belirlenen süre ve ortam derişimlerinin etkisinde *C. lazera*'nın kas ve karaciğer dokuları glikojen ve serum glukoz düzeylerine ait verilerin aritmetik ortalamaları ile istatistik analiz sonuçları sırasıyla Şekil 1-3'de gösterilmiştir. Bakırın 1.0 ppm dışında incelenen ortam derişimleri 7 ve 30 günlük etki sürelerinde kas glikojen derişimini istatistiksel bakımdan önemli düzeyde ($P < 0.05$) düşürürken, 7. günde denenen en yüksek ortam derişimi ve 15. günde ortam derişimindeki artış kas glikojen düzeyini kontrole göre arttırmıştır (Şekil 1).

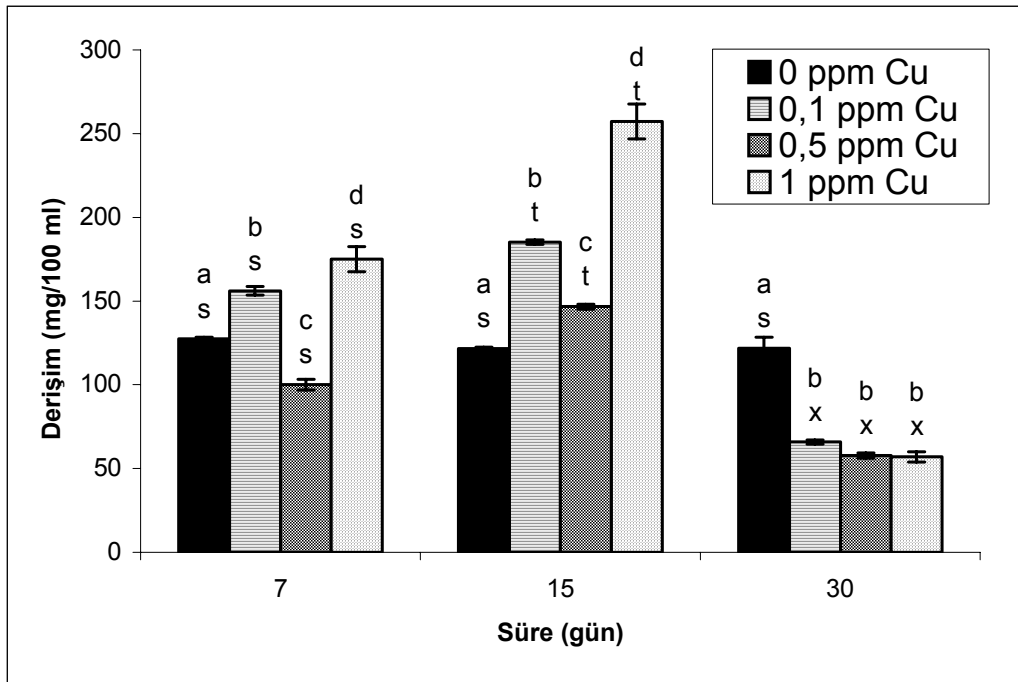
Karaciğer glikojen düzeyi, bakırın 0.1 ppm ortam derişiminin etkisinde, incelenen tüm sürelerde kontrole oranla önemli düzeyde azalırken ($P < 0.05$), metalin ortam derişimindeki artış glikojen düzeyini arttırmıştır ($P < 0.05$) (Şekil 2). *C. lazera*'da 30 gün süreyle bakır etkisi, tüm derişimlerde serum glukoz düzeyini kontrole oranla önemli düzeyde düşürmüştür ($P < 0.05$) (Şekil 3).



Şekil 1. *Clarias lazera*'da Kas Dokusundaki Glikojen Düzeyi (mg/g y.a.) Üzerine Bakır Ortam Derişimlerinin Süreye Bağlı Etkileri. SNK; a, b ve c harfleri belli bir sürede bakır derişimine bağli glikojen düzeyinde meydana gelen değişimleri, s, t ve x harfleri ise belli bir derişimde glikojen düzeyinde süreye bağli değişimleri göstermektedir. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0.05 düzeyinde istatistik ayırım vardır.



Şekil 2. *Clarias lazera*'da Karaciğer Dokusundaki Glikojen Düzeyi (mg/g y.a.) Üzerine Bakır Ortam Derişimlerinin Süreye Bağlı Etkileri. SNK; a, b ve c harfleri belli bir sürede bakır derişimine bağli glikojen düzeyinde meydana gelen değişimleri, s, t ve x harfleri ise belli bir derişimde glikojen düzeyinde süreye bağli değişimleri göstermektedir. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0.05 düzeyinde istatistik ayırım vardır.



Şekil 3. *Clarias lazera*'da Serum Glukoz Düzeyi (mg/100 ml) Üzerine Bakır Ortam Derişimlerinin Süreye Bağlı Etkileri. SNK; a, b ve c harfleri belli bir sürede bakır derişimine bağlı glukoz düzeyinde meydana gelen değişimleri, s, t ve x harfleri ise belli bir derişimde glukoz düzeyinde süreye bağlı değişimleri göstermektedir. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P < 0.05$ düzeyinde istatistik ayırımı vardır.

Bakırın 0.5 ppm ortam derişiminin 7 gün süreyle etkisi serum glukoz düzeyini kontrole oranla azaltırken, incelenen diğer derişimler 7 ve 15 günlük sürelerde glukoz derişimini istatistiksel bakımdan önemli düzeyde arttırmıştır ($P < 0.05$).

Tartışma

Balıklar, ağır metal etkisine genellikle metabolik ve fizyolojik olayların yanı sıra davranışlarını değiştirerek tepki gösterirler. *Channa punctatus* (Ansari, 1984), *Labeo rohita* (Venkataramana ve Radhakrishnaiah, 2001) ve *Oreochromis niloticus* (Ali ve ark., 2003)'da bakır etkisinin başlangıcında yüzmeye performansında düşme, besin almama ve operkulum hareketlerinde artış gibi davranış değişiklikleri gözlemlenmiştir. *C. lazera* ile yürütölen bu araştırmada da bakır etkisinin başlangıcında benzer davranış değişiklikleri belirlenmiş ve etkide kalma süresinin uzaması ile bu değişikliklerin normale döndüğü saptanmıştır.

Belirtilen değişikliklerin metal etkisinde değişen ortam koşullarına tepkiden yada bakırın doğrudan merkezi sinir sistemini etkileyerek spontan kas hareketlerini yavaşlatmasından, yaşamsal olaylar için gereksinim duyulan enerjinin besin maddesi yerine stok rezervlerden karşılanmasından, solungaçlardan metal alınımını önlemek amacıyla oksijen difüzyon kapasitesini azaltmasından kaynaklandığı olasıdır.

Balıklarda üreme, hipoksik koşullar, yoğun stoklama ve açlığın dışında ağır metal etkisi de strese neden olmaktadır (Levesque ve ark., 2002). Balıklarda solungaç dokusu epitel hücrelerinde bakır etkisinin neden olduğu hipertropi, hiperplasi

ve poliferasyon, metalin dolaşım sistemine alınımını engellerken, su ile kan arasındaki difüzyon mesafesini arttırdığından doku düzeyinde hipoksiya ya neden olur (Mazon ve ark., 2002). Hipoksik koşullar, kortizol, epinefrin ve katekolamin gibi glukokortikoidlerin salınımını stimüle ederek glikojenlizi ile kas ve karaciğer glikojen düzeyinde düşmeye ve hiperglisemiye neden olur. *Cyprinus carpio* (Cicik ve Engin, 2005), *Heteropneustes fossilis* (Singh ve Reddy, 1990) ve *O. mykiss* (Dethloff ve ark., 2001)'de bakırın düşük ortam derişimlerinin uzun süreli etkisinin kas ve karaciğer glikojen düzeyini düşürürken, serum glukoz düzeyini arttırdığı belirlenmiştir. Bu araştırmada da bakırın 0.1 ppm ortam derişiminin 7 ve 15 gün süreyle etkisi kas ve karaciğer glikojen düzeyini düşürürken, serum glukoz düzeyini arttırdığı saptanmıştır. Glukoz ve glikojen düzeyindeki bu değişimlerin, bakırın düşük ortam derişimlerinin etkisinde ortaya çıkan hipoksik koşullara adaptasyondan kaynaklandığı olasıdır.

Çeşitli balık türleri ile yapılan araştırmalarda akut bakır etkisinin kas ve karaciğer total protein düzeyini düşürürken, serbest amino asit derişimi ile glukoneogenik enzimlerin aktivitesini arttırdığı saptanmıştır (Singh ve Reddy, 1990; James ve Sampth, 1995). Bu araştırmada da bakırın 0.5 ve 1.0 ppm ortam derişimlerinin 7 ve 15 gün süreyle etkisi *C. lazera*'nın doku glikojen ve serum glukoz düzeyini arttırırken, glikojen düzeyindeki artış 30. günde devam ederken serum glukoz düzeyini düşürmüştür. Bu değişimlerin balığın metal etkisinde enerji kaynaklarını ekonomik kullanım amacıyla karbonhidrat olmayan kaynaklardan sağlamasından kaynaklanabilir.

Sonuç olarak, bakırın belirlenen süre ve ortam

değişimlerinin etkisinde doku glikojen ve serum glukoz düzeyindeki değişimler, bakırın *C. lazera*'da karbonhidrat metabolizmasını etkilediğini gösterir. Bu değişimlerin metalin karbonhidrat metabolizmasının endokrin kontrolünü etkilemesinden kaynaklanabileceği gibi metal etkisinin neden olduğu hipoksik koşullardan da kaynaklanabilir.

Kaynakça

- Ali, A., S.M. Al-Ogaily, N.A. Al-Asghar and J. Gropp, 2003. Effect of sublethal concentrations of copper on the growth performance of *Oreochromis niloticus*. J.Appl. Ichthyol., 19: 183-188.
- Ansari, I.A., 1984. Studies on the toxicity of copper sulphate on *Channa punctatus* and *Mystus vittatus*; determination of LC₅₀ values. Actaciencis India, 10: 154-160.
- Christensen, G.M., J.M. McKim, W.A. Brungs and E.P. Hunt, 1972. Changes in the blood of the Brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*) following short and long term exposure to copper. Toxicol. Appl. Pharmacol., 23: 417-427.
- Cicik, B., 2003. Bakır-çinko etkileşiminin sazan (*Cyprinus carpio*)'nın karaciğer, solungaç ve kas dokularındaki metal birikimi üzerine etkileri. Ekoloji Çevre Dergisi, Cilt 12, Sayı 48: 32-36.
- Cicik, B. and K. Engin, 2005. The effects of cadmium on levels of glucose in serum and glycogen reserves in the liver and muscle tissues of *Cyprinus carpio* (L.,1758). Turk. J. Vet. Anim. Sci., 29: 113-117.
- Dethloff, G.M., D. Schlenk, S. Khan and H.C. Bailey, 1999. The effects of copper on blood and biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Arch. Environ. Contam. Toxicol., 36: 415-423.
- Dethloff, G.M., H.C. Bailey and K.J. Maier, 2001. Effects of dissolved copper on select hematological, biochemical and immunological parameters of wild rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Arch. Environ. Contam. Toxicol., 40: 371-380.
- James, R. and K. Sampath, 1995. Sublethal effects of mixtures of copper and ammonia on selected biochemical and physiological parameters in the catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). Ind. J. Exp. Biol., 30: 496-499.
- Levesque, H.M., T.W. Moon, P.G.C. Campbell and A. Hontela, 2002. Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field. Aquatic Toxicology, 60(3-4): 257-267.
- Mazon, A.F., E.A.S. Monteiro, G.H.D. Pinheiro and M.N. Fernandes, 2002. Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. Braz. J. Biol., 62 (4A): 621-631.
- Nussey, G., J.H.J. Van Vuren and H.H. Du Preez, 1995. Effect of copper on haematology and osmoregulation of the Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae). Comp. Biochem. Physiol., 111 (C): 369-380.
- Plummer, D.T., 1971. Practical biochemistry. Mc Graw Hill Book Company Ltd., England, 369p.
- Singh H.S. and T.V. Reddy, 1990. Effect of copper sulfate on hematology, blood chemistry and hepato-somatic index of Indian catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch), and its recovery. Ecotoxicol. Environ. Safety, 20: 30-35.
- Stagg, R.M. and T.J. Shuttleworth, 1982. The accumulation of copper in *Platichthys flesus* L. and its effects on plasma electrolyte concentrations. J. Fish Biol., 20: 491-500.
- Tort, L. and P. Torres, 1988. The effects of sublethal concentrations of cadmium on haematological parameters in the dog fish. Fish. Biol., 32: 277-282.
- Venkataramana, P. and K. Radhakrishnaiah, 2001. Copper influenced changes in lactate dehydrogenase and G-6-PDH activities of freshwater teleost, *Labeo rohita*. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 67: 247-263.
- Vosyliene, M. Z., 1999. The effect of heavy metals on hematological indices. Acta Zoologica Litvanica Hydrobiologia, 9: 76-82.
- Wedemeyer, G.A. and W.T. Yasutake, 1977. Clinical methods for the assessment of the effects of environmental stress of fish health. U.S. Fish Wildl. Serv., 89: 1-18.
- Wepener, V., J.H.J., Van Vuren, and H.H. Du Preez, (2001). Uptake and distribution of a copper, iron and zinc mixture in gill, liver and plasma of a freshwater teleost, *Tilapia sparrmanii*. Water SA, 27(1): 99-108.