



T.C.
İSKENDERUN TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
MÜHENDİSLİK ve FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİBRİT TİLAPİA (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*)'NİN BAZI
DOKULARINDA KURŞUN BİRİKİMİNE ASKORBİK ASİTİN ETKİSİ VE
HİSTOPATOLOJİSİNİN BELİRLENMESİ**

Alper YANAR

SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY
TEMMUZ-2016



T.C.
İSKENDERUN TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
MÜHENDİSLİK ve FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİBRİT TİLAPİA (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*)'NİN BAZI
DOKULARINDA KURŞUN BİRİKİMİNE ASKORBİK ASİTİN ETKİSİ VE
HİSTOPATOLOJİSİNİN BELİRLENMESİ**

Alper YANAR

SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HATAY
TEMMUZ-2016**

T.C.
İSKENDERUN TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
MÜHENDİSLİK ve FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİBRİT TİLAPİA (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*)'NİN BAZI
DOKULARINDA KURŞUN BİRİKİMİNE ASKORBİK ASİTİN ETKİSİ VE
HİSTOPATOLOJİSİNİN BELİRLENMESİ**

ALPER YANAR

SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Ayşe Bahar YILMAZ danışmanlığında hazırlanan bu tez **14/07/2016** tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **OYBİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ayşe Bahar YILMAZ
Başkan

Doç. Dr. Fatma ÇEVİK
Üye

Doç. Dr. Yasemin BİRCAN YILDIRIM
Üye

Kod No:

Doç. Dr. Mustafa DEMİRCİ
Enstitü Müdür V.

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 13260

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

14/07/2016

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

Alper YANAR

ÖZET

HİBRİT TİLAPİA (*Oreochromis niloticus x Oreochromis aureus*)'NİN BAZI DOKULARINDA KURŞUN BİRİKİMİNE ASKORBİK ASİTİN ETKİSİ VE HİSTOPATOLOJİSİNİN BELİRLENMESİ

Bu çalışma ile çevresel kirlilikle sucul ortama girebilecek kurşunun, belirli doz ve sürede tilapia'nın farklı dokularında oluşturabileceği birikimin olumsuz etkilerini azaltmak amacıyla su ortamına verilen askorbik asidin kurşun birikimine etkisi ve birikimin etkilerinin histopatolojik olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Kurşun (10 mg/l Pb²⁺) ve kurşun + askorbik asit (10 mg/l Pb²⁺ + 10mg/l askorbik asit) içeren ortamlara maruz bırakılan hibrit tilapialar (*Oreochromis niloticus x Oreochromis aureus*), 14. ve 28. günlerde örneklenerek solungaç, karaciğer, bağırsak, gonad ve kas dokularında kurşun birikim düzeyleri ve meydana gelen histopatolojik değişimler belirlenmiştir.

Dokularda kurşun birikim düzeylerinin zamana bağlı olarak arttığı ve dokulara göre farklılık gösterdiği (bağırsak > solungaç > karaciğer > gonad > kas) tespit edilmiştir. Kurşun ve askorbik asit içeren ortamlarda bulunan balıkların dokularındaki kurşun birikiminin, yalnız kurşun içeren ortamlardakilere göre daha yavaş ve daha az miktarda gerçekleştiği saptanmıştır.

Kurşun iyonlarına maruz kalan balıkların gonad ve kas dokuda patolojik bulgulara rastlanmazken, solungaçlarda; epitel ayrılma, hiperplazi, anevrizma, lamellar füzyon, ödem, karaciğerde; bozuk şekilli nükleuslar, vakuolar dejenerasyon, piknotik nükleus, karyorektik nükleus, nekroz ve bağırsakta; EGC sayısında artış gözlemlenirken, ortamda askorbik asidin bulunmasının, kurşunun hücrese düzeyde meydana getirdiği bu hasarları azalttığı, geciktirdiği ve olumlu sonuçlar verdiği tespit edilmiştir.

2016, 79 sayfa

Anahtar Kelimeler: Tilapia, Ağır Metal, Kurşun Toksikitesi, Askorbik Asit, Histopatoloji

ABSTRACT

EFFECTS of ASCORBIC ACID ON LEAD ACCUMULATION IN SOME TISSUES of HYBRID TILAPIA (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) and DETERMINATION of IT'S HISTOPATHOLOGY

Lead may be entered into an aquatic ambient by an environmental pollution and will may be accumulate in different tissues of tilapia in a certain time and dose. This study aimed that lead bioaccumulation on different tissues of tilapia with regard to histopathology and determining effects of ascorbic acid which added into the water medium in order to reduce of negative effects of lead.

Accumulated lead levels and histopathological changes of gill, liver, intestine, gonad and muscle tissues of hybrid tilapias (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) which exposed to mediums containing lead (10 mg/l Pb²⁺) and lead + ascorbic acid (10 mg/l Pb²⁺ + 10 mg/l ascorbic acid) identified by sampling tissues on 14th and 28th days of experiment.

It was found that the lead accumulation levels of tissues exhibit differences depending on time and type of tissues (intestine > gill > liver > gonad > muscle). It was detected that lead accumulation levels and velocities of tissues of fishes in mediums containing lead + ascorbic acid are lower and slower than in mediums containing only lead.

On the contrary of gonad and muscle tissues, there many pathological finding in gills due to lead accumulation; epithelial lifting, hyperplasia, aneurism, lamellar fusion, oedema, in liver; degenerative nucleus, vacuolar degeneration, piknotic nucleus, karyorrhectic nucleus, necrosis and in intestine; increase in number of EGC was detected and it was found that existance of ascorbic acid in mediums reduce and retard the cellular damages.

2016, 79 pages

Keywords: Tilapia, Heavy Metal, Lead Toxicity, Ascorbic Acid, Histopathology

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince fikir ve görüşleriyle bana hep destek olan, yol gösteren, kendisiyle çalışmaktan her zaman onur duyduğum danışmanım Prof. Dr. Ayşe Bahar YILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Lisans eğitimimden bu yana desteğini her zaman hissettiğim, tecrübesi ve değerli fikirleriyle bana yön veren değerli hocam Doç. Dr. Argun A. ÖZAK'a içten bir teşekkürü borç bilirim.

Histoloji çalışmalarında desteğini esirgemeyen ve katkılarını gördüğüm M.K.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim dalı Başkanı Prof. Dr. Mehmet YALDIZ'a, Patoloji Laboratuvarı çalışanlarından Işıl KÜNEFECİ ve Metin ÖZÇELİK'e, histopatoloji çalışmaları sırasında bana destek olan ve katkılarını gördüğüm, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Öğretim üyeleri Prof. Dr. Ahmet NAZLIGÜL'e, yorum ve önerileri ile katkı sağlayan Prof. Dr. Serap BİRİNCİOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Ağır metal analizlerinde yardımlarını gördüğüm Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma Merkezi müdürü Doç. Dr. Kazım OCAKOĞLU'na ve Uzm. Sevda İLDAN ÖZMEN'e teşekkürlerimi sunarım.

İstatistiksel değerlendirme aşamasında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Yavuz MAZLUM hocama, tezimin denemelerinin yürütülmesi ve laboratuvar çalışmalarında katkıları ve değerli dostluklarıyla her zaman yanımda olan arkadaşlarım Arş. Gör. Ece KILIÇ, Arş. Gör. Emrah ŞİMŞEK, Arif ALKAN ve Ela Nur MERT'e teşekkür ederim.

Oğulları olmakla her zaman gurur duyduğum annem Hatice YANAR ve babam İbrahim YANAR'a, her zaman yanımda olan kardeşim Osman YANAR'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	VII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	10
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	17
3.1. Materyal.....	17
3.1.1. Hibrit Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i> x <i>Oreochromis aureus</i>).....	17
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar.....	19
3.1.3. Kullanılan Alet ve Ekipmanlar.....	19
3.2. Yöntem.....	20
3.2.1. Denemenin Kurulması ve Yürütülmesi.....	20
3.2.1.1. Akvaryum ve Deney Düzenekleri.....	20
3.2.1.2. Deney Ortamlarında Kullanılan Stok Çözeltilerin Hazırlanması.....	21
3.2.1.3. Deneme Grupları ve Denemenin Yürütülmesi.....	21
3.2.2. Ağır Metal Analizi ve Histolojik İnceleme İçin Hazırlık Aşaması.....	22
3.2.2.1. Ağır Metal Analizine Hazırlık Aşaması.....	22
3.2.2.2. Histopatolojik İnceleme İçin Hazırlık Aşaması.....	22
3.2.3. Ağır Metal Analizi.....	25
3.2.4. Histopatolojik İnceleme.....	25
3.2.5. İstatistik Analizler.....	25
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	26
4.1. Dokularda Kurşun Birikimi.....	28
4.2. Histopatolojik İncelemeler.....	40
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	59
KAYNAKLAR.....	61
ÖZGEÇMİŞ.....	79

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Kurşunun kimyasal ve fiziksel özellikleri.....	2
Çizelge 3.1 Deneme ortamında kullanılan suyun fizikokimyasal özellikleri	19
Çizelge 4.1 Deneme ortamlarının fizikokimyasal parametrelerinin ortalamaları	26
Çizelge 4.2 Deneme süresince gerçekleşen mortalitenin günlere ve gruplara göre dağılımı.....	28
Çizelge 4.3 kurşun (10 mg/l Pb ²⁺) ve kurşun + askorbik asit (10 mg/l Pb ²⁺ + 10 mg/l AA) gruplarındaki balıkların dokularında Pb birikim düzeyleri (µg g ⁻¹ / y.a.)*	29
Çizelge 4.4 Dokularda meydana gelen histopatolojik değişimlere ait kalitatif değerlendirme çizelgesi*	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 Hibrit tilapia (<i>O. niloticus</i> x <i>O. aureus</i>).....	17
Şekil 3.2 Deney düzeneği.....	21
Şekil 3.3 Doku gömme aşamasında kullanılan parafin gömme istasyonu.....	23
Şekil 3.4 Mikrotomda kesilmek üzere hazırlanan parafin blokları ve içerisine gömülmüş dokular	24
Şekil 3.5 Doku boyama cihazı ve doku kesitlerinin boyanması	25
Şekil 4.1 Tilapia solungaç dokularında Pb birikim düzeylerinin zamana göre değişimi.....	30
Şekil 4.2 Tilapia karaciğer dokularında Pb birikim düzeylerinin zamana göre değişimi.....	32
Şekil 4.3 Tilapia bağırsak dokularında Pb birikim düzeylerinin zamana göre değişimi.....	35
Şekil 4.4 Tilapia gonad dokularında Pb birikim düzeylerinin zamana göre değişimi.....	37
Şekil 4.5 Tilapia kas dokularında Pb birikim düzeylerinin zamana göre değişimi.....	38
Şekil 4.6 Kontrol grubu solungaç histolojisi.....	42
Şekil 4.7 10 mg/l Pb ²⁺ 'ye 28 gün boyunca maruz bırakılan balıkların (B grubu) solungaç dokusunda belirlenen yoğun epitel ayrılma	43
Şekil 4.8 Solungaç doku hiperplazi oluşumu.....	44
Şekil 4.9 Solungaç dokuda meydana gelen anevrizmalar	45
Şekil 4.10 Solungaç dokuda gözlemlenen lamellar füzyon.....	46
Şekil 4.11 Solungaç dokuda ödem oluşumu	47
Şekil 4.12 Kontrol grubu sağlıklı karaciğer histolojisi	48
Şekil 4.13 Karaciğer dokusu bozuk şekilli nükleuslar;	49
Şekil 4.14 Karaciğer dokusu vakuolar dejenerasyon	51
Şekil 4.15 Karaciğer dokusu piknotik nükleuslar	51
Şekil 4.16 Karaciğer dokusu karyorektik nükleuslar	52
Şekil 4.17 Karaciğer dokusu nekroz oluşumu	54
Şekil 4.18 Kontrol grubu bağırsak dokusu ve yapısı	55
Şekil 4.19 Bağırsak dokusu EGC artışı.....	56

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
°C	: Santigrad Derece
µg	: Mikrogram
µS	: Mikro Siemens
AA	: Askorbik asit
ATPaz	: Adenozin Tri Fosfataz enzimi
Ca²⁺	: Kalsiyum
CaCO₃	: Kalsiyum Karbonat
Cd	: Kadmiyum
cm	: Santimetre
cm³	: Santimetre-küp
Co	: Kobalt
Cr	: Krom
Cu	: Bakır
Ç.Ü.	: Çukurova Üniversitesi
dk.	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DPTA	: Dietilentriamin Pentaasetik Asit
DSİ	: Devlet Su İşleri
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
EGC	: Eozinofilik granül hücreleri
FAO	: Dünya Tarım Örgütü
Fe	: Demir
g	: Gram
Hg	: Civa
K	: Kontrol
k.a.	: Kuru ağırlık

K+	: Potasyum
Kg	: Kilogram
l	: Litre
Lc50	: Lethal Konsantrasyon 50
M.K.Ü.	: Mustafa Kemal Üniversitesi
M.Ö.	: Milattan Önce
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
Mn	: Mangan
Mo	: Molibden
MS222	: Trikainmetan sülfonat
Na+	: Sodyum
NBF	: Nötral buffered formalin
NTA	: Nitritotriasetik asit
Pb	: Kurşun
pH	: Power of Hydrogen – Asitlik bazlık derecesi
ppb	: Milyarda bir birim
ppm	: Milyonda bir birim
ppt	: Binde bir birim
RNA	: Reoksibonükleik Asit
ROS	: Reaktif oksijen türü
Sa.	: Saat
Se	: Selenyum
Sn.	: Saniye
V	: Vanadyum
W	: Watt
y.a.	: Yaş ağırlık
Zn	: Çinko

1. GİRİŞ

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde ağır metallerin gereksiniminin ve buna bağlı olarak üretiminin sürekli artış göstermesi, bunların çevreye yayılımını artırmaktadır. Bir element, gerek maden cevheri halindeyken gerekse işlenirken doğaya karışabilmektedir. Ancak ağır metallerin insan faaliyetleri sebebiyle doğaya yayılma oranı doğal yollara göre oldukça yüksektir. Bu durum doğadaki ağır metal döngülerini arttırmaktadır. Atmosfere salınan ağır metaller besin zinciri yoluyla karasal ekosisteme, su döngüsü yoluyla da sucul ekosisteme geçer, ayrıca karasal canlılar tarafından “aerosol” olarakta solunurlar (Kürkçü, 2001). İnsan kaynaklı ağır metal kirliliği ekolojik sistemlerin bozulmasına yol açarken insan sağlığını da önemli ölçüde olumsuz etkilemekte, birçok psikolojik, fizyolojik ve nörolojik rahatsızlığın ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (Duffus ve Howard, 1996; Nordberg ve ark., 2007).

Periyodik tablodaki 105 elementin 80’i metal yapısında olup, bu metallere bir kısmı ağır metal olarak adlandırılır ve canlılar için toksik etki gösterir. Bugün 30 civarında metalin canlılarda toksisite oluşturduğu bilinmektedir (Özdemir, 1981; Anonim, 2013).

Metallerin bir grubunun ‘ağır metal’ olarak adlandırılması, genelde bu metallerin atom ağırlıklarının ve/veya özgül ağırlıklarının yüksek (5g/cm^3 ten büyük) olmasındandır. Ağır metaller elementler tablosundaki; titanyum, hafnium, arsenik ve bizmut tarafından köşelenen, fakat selenyum ve telleryumu da içeren grup olarak tanımlanmaktadır (Anonim, 2013).

Canlıların vücutlarında Cu, Co, Fe, Mn, Mo, V, Se ve Zn gibi bazı ağır metaller çok az miktarlarda bulunurlar ve enzimlerin yapısına katılırlar. Ancak Cd, Cr, Hg, **Pb** gibi ağır metaller canlıların vücutlarında bulunmadığı gibi enzimleri inhibe ederek toksik etki gösterirler (Kennish, 1992; Anonim, 2002).

Canlılar için oldukça toksik olan ve ekosisteme zarar veren başlıca ağır metallere biri de kurşun (Pb)’dur. Kurşun insan faaliyetleri ile ekolojik sisteme önemli zararlar veren ilk metal olma özelliğini taşımaktadır. M.Ö. 2500 yıllarında antik uygarlıklar tarafından gümüş üretimi sırasında yan ürün olarak keşfedilmiş ve tarih boyunca üretim ve kullanımı giderek artış göstermiştir (Kahvecioğlu ve ark., 2006).

Kurşun periyodik tabloda IV A grubunda yer alır ve mavimsi-gri bir renge sahiptir

(Çizelge 1.1). Kurşun asetat ve kurşun nitrat formundaki tuzları suda çözünürken, kurşun sülfat, kurşun halojenürler, kurşun karbonat, kurşun fosfat, kurşun hidroksit ve kurşun sülfürler suda çözünmez (Özdemir, 1981; Kürkçü, 2001).

Çizelge 1.1 Kurşunun kimyasal ve fiziksel özellikleri

Sembol	Pb	Sınıflandırma	Ağır Metal
Atom Numarası	82	Proton ve elektron sayısı	82
Atom Ağırlığı	207.2 A.K.B.	Nötron sayısı	125
Erime Noktası	327.5 °C	Yoğunluk	11.34 g/cm ³
Kaynama Noktası	1740 °C	Renk	Mavimsi

Kurşun temel olarak pil üretiminde, akümülatörlerde kullanılmakla birlikte, kâğıt endüstrisi, boya üretimi, petrokimya, klor-alkali üretimi, savunma sanayi, gübre sanayi ve demir çelik endüstrisi atıklarının önemli bir bölümünü oluşturur (Rether, 2002).

Kurşunun canlılarda; beyin, böbrek, kemik doku, merkezi sinir sistemi ve hematopoetik sistemde fonksiyon bozukluklarına ve biyokimyasal aktivitelerin olumsuz etkilenmesine yol açtığı, kurşun toksisitesinden etkilenen hayvanlarda üreme bozuklukları, nörofizyolojik, histopatolojik ve teratojenik yapısal anomaliler görüldüğü bildirilmiştir (Förstner ve Wittmann, 1983; Papanikolaou ve ark., 2005).

Kurşunun akuatik ortama girdiğinde sucul canlılar üzerindeki toksik etkilerinin belirlenebilmesi için özellikle balıklar üzerinde çalışılmalar yapılmış, kurşunun yüksek miktarda birikimlerinin balıkta anemiye neden olduğu, kuyruk yüzgecin de hasarlara sebep olduğu ve balıklarda morfolojik değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (Ruparelia ve ark., 1989).

Kurşunun balıklarda hem büyümeyi hem de eritrositlerin sentezinde görev alan aminolevulinik asit dehidretaz enzimini inhibe ettiği (Burden ve ark., 1998), lipidperoksidasyon enzimine etki ettiği (Campana ve ark., 2003), Na⁺, K⁺-ATPaz enzim aktivitesini inhibe ettiği ve hücreler arası biyokimyasal düzenlemelerde önemli rol oynayan alaninaminotransferaz ve aspartataminotransferazların doku ve organlardaki düzeylerinde değişikliğe sebep olduğu gözlenmiştir (Blasco ve Puppo, 1999).

Kurşun toksisitesi balıkların solungaç, karaciğer ve bağırsak dokularında hücresel düzeyde hasarların meydana gelmesine neden olmaktadır (Zeitoun ve Mehana, 2014).

Solungaçlar balıklarda solunum, boşaltım ve osmoregülasyondan hayati öneme sahip organlardan biridir (Sarihan ve Cengizler, 2006). Doğrudan su ortamıyla temas halinde bulunması nedeniyle suda bulunan maddelerin vücuda ilk giriş yaptığı ve bu maddelerden ilk etkilenen organ olma özelliği taşımaktadır. Dolayısı ile ortamda bulunan zararlı maddelere ilk tepki veren organ olduğu için solungaçlarda meydana gelen histopatolojik bulgular büyük önem arz etmektedir (Mishra ve Mohanty, 2008).

Kemikli balıklarda (Teleostei), solungaçlar farinks bölgesinde solungaç cebi olarak adlandırılan cepçikler içinde yer alır. Ağız boşluğunun tabanından tavanına doğru uzanan 4 çift solungaç yayı vardır. Solungaç yayları kemik doku ile desteklenmiştir. Her bir solungaç yayı bir çift solungaç filament (primer lamel) ve filamentleri ayıran bir septumdan meydana gelir. Su ile temas eden yüzey alanını arttırmak üzere, her primer lamelin alt ve üst her iki yüzünde, primer lamel eksenine dikey olarak oluşmuş sekonder lameller yer alır. Solungaç filamentleri üzerinde afferent ve efferent arterioller ve geniş bir kılcal damar ağı bulunur. Lameller ince bir epitel tabaka ile sarılmıştır ve pillar hücreleri olarak adlandırılan destekleyici hücrelerce çok sayıda sinüsoide ayrılmıştır. Her sinüsoid lümende bir ya da iki eritrosit bulunabilir ve sekonder lamelin bazı kısımları mukus ve klorid hücrelerinden oluşur (Sarihan ve Cengizler, 2006; Mumford ve ark., 2007).

Balıkların ağır metallere maruz kalması durumunda solungaçlarda epitel ayrılma, hiperplazi, anevrizma, lamellar füzyon ve ödem sıklıkla karşılaşılan bulgular olmaktadır (Figueiredo-Fernandes ve ark., 2007).

Epitel ayrılma, su ortamına giren kimyasal kirleticilerin varlığı sebebiyle solungaç dokuda görülen ilk tepkilerden biridir. Sekonder lamel üzerinde meydana gelen ödemin ardından, epitel katmanının bulunduğu yerden ayrılmasının gözlemlenmesi ile karakterize edilir. Epitel ayrılmanın görüldüğü durumlarda lamellerin yüzey alanı azalır ve solungaç dokunun temel görevi olan gaz alışverişi sekteye uğrar (Winkaler ve ark., 2001). Birçok araştırmacı, epitel ayrılmanın su ortamında bulunan toksikant madde ile kan damarları arasındaki mesafeyi arttırarak, toksikant maddenin difüzyonunu engellemeye yarayan bir savunma mekanizması olduğunu öne sürmektedir (Laurén ve McDonald, 1985; Arellano ve ark., 1999; Fernandes ve Mazon, 2003; Van Heerden ve ark., 2004)

Hiperplazi organ ya da dokunun kendini meydana getiren hücrelerin kontrolsüz olarak sayıca artış göstermesi sebebiyle boyut olarak büyümesi olarak tanımlanmaktadır (Mumford ve ark., 2007). Bakteriyel ve viral enfeksiyonlar, hormonal uyarıcılar, su sıcaklığının çok düşük olması ve kimyasal kirleticiler hiperplaziye sebep olan temel etkenlerdir (Roberts, 2012).

Anevrizma, sekonder lameller üzerinde bulunan sinüsoidleri destekleyen pillar hücre sisteminin çökmesi ve kılcak damarlarda bulunan kan hacminin artmasıyla çok miktarda kanın lamel epitelini dışarı itmesi sonucu, kanın sekonder lamellerde birikmesi olarak tanımlanan bir dolaşım bozukluğudur (Rejeki ve Rahmat, 2005). Anevrizma dokulardaki katabolitlerin birikmesine, hipoksiya, ödem oluşumuna ve çok şiddetli seyretmesi durumunda nekroz oluşumuna sebep olmaktadır (Anonymous, 2015).

Lamellar füzyon, sekonder lamellerdeki epitel hücrelerde meydana gelen yoğun hiperplazinin devam etmesi sonucunda ortaya çıkmaktadır. Yoğun hiperplazi ile birlikte epitel hücreleri kontrolsüz olarak çoğalmaya devam ettikçe, sekonder lameller kalınlaşır, bir süre sonra lameller arasındaki boşluk ortadan kalkar ve lameller birleşir. Bu durumda solunum yüzey alanı daralır ve hipoksia görülür (Roberts, 2012).

Hücrelerin dışında bulunan doku sıvısının hücreler arası boşlukta ya da vücut boşluğunda aşırı miktarda birikimi olarak tanımlanan ödem, hidrostatik ve ozmotik basıncı etkileyerek damarların geçirgenliğini arttırarak hipoproteinemi ve inflamasyona sebep olur (Mumford ve ark., 2007). Lamellar ödem, ortamdaki toksikantların uzaklaşması ve su kalitesinin yükseltilmesi ile iyileşmesi mümkün olan patolojik bir değişimdir (Fukuda, 1983). Ancak dokularda ödemin devam etmesi halinde nekroz, epitel ayrılma ve hiperplazi ortaya çıkmaktadır (Yang ve Albright, 1992; Cerqueira ve Fernandes, 2002).

Karaciğer detoksifikasyon organı olmasının yanı sıra sindirim (safra), depolama (lipid, karbonhidrat, vitamin A), bağışıklık (retikulo-endotelial sistem), üreme (vitellogenin sentezi) görevlerini yerine getiren, önemli anabolizma ve katabolizma olaylarının gerçekleştiği hayati öneme sahip organlardan biridir. Ayrıca, besinler, toksinler, kirleticiler, parazitler ve mikroorganizmalar karaciğerin yapısında ve metabolizmasında değişikliğe sebep olabildiğinden karaciğer birçok biyolojik ve çevresel parametreler için hedef organ olarak kabul edilmektedir (Hinton ve ark., 2001). Dolayısıyla balığın vücuduna giriş yapan ve birikim gösteren toksinlerin etkilerini

yansıtması bakımından histopatolojik açıdan incelenmesi önem arz etmektedir.

Endodermden köken alan karaciğer hepatik hücrelerden oluşan nispeten büyük bir organdır. Karaciğerde bulunan hepatik arter ve portal ven, mide ve bağırsaktan karaciğere bağlanır. Venöz kan taşıyan portal ven dallanarak sinüsoid olarak adlandırılan geniş kapillar ağı oluşturur. Sinüsoidler ile sarılmış hepatik parankima iki hücre katmanından meydana gelir ve oldukça homojendir. Hepatositler bazofilik, poligonal şekilli hücrelerdir ve küresel bir nükleus içerirler (Brusle ve Anadon, 1996).

Bozuk şekilli nükleuslar, vakuolar dejenerasyon, apoptozis ve nekrozis karaciğerde ağır metal toksisitesinin bir sonucu olarak sıklıkla gözlemlenen bulgulardır (Mishra ve Mohanty, 2008; Younis ve ark., 2013).

Toksik özellik gösteren maddelerin canlılardaki ilk etkileri hücresel veya daha alt seviyelerde görülmektedir (Orrenius ve ark., 2011). Ağır metal toksisitesinin sebep olduğu hücresel hasarlar artmaya başladığında, metallothionein gibi metal-bağlayıcı proteinler hepatosit hücrelerinin nükleusunda yoğunlaşır (De-Smet ve Blust, 2001). Hasar gören hücrelerin nükleusları yuvarlak şekillerini kaybeder, küçülür ve çöker (Fanta ve ark., 2003). Bozuk şekilli nükleuslar hücresel düzeyde hasarın ilk göstergesi olduğundan görülme sıklığı dokunun aldığı hasar düzeyinin bilinmesi açısından önemlidir.

“Hidrofik değişim” ya da “hücresel ödem” olarak bilinen vakuolar dejenerasyon; iyon ve sıvı dengesinin devamlılığını sağlayan hücrelerin yetersizliğinden dolayı suyun intrastoplazmik olarak toplanmasından kaynaklanan, geri dönüşümü mümkün bir doku hasarıdır (Anonymous, 2009).

Geri dönüşümü mümkün olmayan doku hasarı olan hücre ölümü ise apoptozis ve nekrozis olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleşmektedir;. Planlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan apoptozis, hücrenin belirli bir ömrü tamamlaması sonucu, bir dizi moleküler işlemin ardından ortadan kaldırılmasıdır (Vaux ve ark., 1994).

Apoptoz sinyali alan bir hücrenin kromatini ve sitoplazması yoğunlaşmaya başlar ve hücrenin boyutları küçülür. Hücre bir süre sonra apoptotik cisimcik olarak tanımlanan küçük parçalara bölünür. Bu küçük parçacıkların içerdiği uyarıcı yapılar komşu hücreleri uyarır ve apoptotik cisimcikler komşu hücrelerce fagosite edilerek ortadan kaldırılır (Wyllie ve ark., 1980; Lipponen ve ark., 1994).

Apoptozis, organizmanın ihtiyaç duyulmayan ya da anormalleşmiş hücrelerden kurtulması ve yaşam döngüsünün devamı için gerekli bir işlemdir. Ancak apoptozis

sadece ömrünü tamamlamış ve ya anormalleşmiş hücrelerde ortaya çıkmaz. Bazı durumlarda dokunun bütünlüğünü ve konak canlıyı korumaya yönelik olarak da ortaya çıkabilir. Örneğin bir hücre tek bir bakteriyi algıladığında onu kendisi yok edebilir, ancak çok sayıda bakteri ile karşılaştığında komşu hücreleri uyarır ve bu hücre grubu o hücrenin kendisini yok eder (Vaux ve ark., 1994). Benzer şekilde hücre ya da hücrelerin apoptozise uğramasına sebep olan etkenlerden birinin de ağır metal toksisitesi olduğu bildirilmiştir (Hamada ve ark., 1997).

Apoptozise giden bir hücrede piknozis, karyorekzis ve karyolizis evreleri gözlemlenir (Mumford ve ark., 2007). Piknozis evresinde koyulaşan, küçülen ve çöküş gösteren piknotik bir nükleus gözlemlenir. Piknozis evresini takiben ortaya çıkan karyorekzis evresinde, yoğunlaşmış olan nükleusun membranı parçalanır ve nükleusun içerdiği kromatin, hücre sitoplazması içerisine düzensiz olarak dağılır (Zamzami ve Kroemer, 1999). Son aşama olan karyoliziste ise DNAaz ve RNAaz enzimleri genetik materyalin çözülüp, kromatinlerin kaybolmasına neden olur (Cotran ve ark., 1999).

Nekroz; enfeksiyon, travma ya da toksik maddeler gibi dış kaynaklı etkiler sonucunda hücrelerin ölümü olarak tanımlanmaktadır (Kasper ve Zaleznik, 2001). Önceleri nekrozun programlanmış hücre ölümü olan apoptozise alternatif bir hücre ölümü şekli olduğu düşünülmüşse de, daha sonra yapılan çalışmalar nekrozun farklı morfolojik ve fizyolojik özellikler gösterdiğini ve apoptozisten farklı olduğunu ortaya koymuştur (Proskuryakov ve ark., 2003). Nekrozdan kaynaklanan bir hücre ölümünde apoptotik sinyal mekanizması takip edilmez, hücre zarı bütünlüğünü kaybeder ve hücre içeriği kontrolsüz bir şekilde hücreler arası boşluklara dağılır. Apoptoziste ölen hücrenin içeriği komşu hücrelerce fagosite edilerek ortadan kaldırılırken, nekroz sonucu ölen hücrenin içeriği komşu hücrelerde inflamasyon oluşmasına sebep olur. Apoptozis canlıya fayda sağlayan bir mekanizma iken, nekroza uğrayan hücre kalıntıları ortadan kaldırılmadığı için nekroz canlıya zarar verir, hatta canlıyı ölüme götürebilir (Kasper ve Zaleznik, 2001; Proskuryakov ve ark., 2003).

Temel olarak sindirim görevini üstlenmiş olan bağırsak, fonksiyonel işleyişi bakımından anteriyor ve posteriyor bağırsak olarak iki bölümde incelenir. Anteriyor bağırsak; mideden gelen besinleri peristaltik hareketlerle posteriyor bağırsağa iletmek, bağırsak duvarı ve yardımcı bezlerden enzim salgılayarak besinleri sindirmek, sindirim sonucu oluşan son ürünleri kan damarları ve lenf kanallarına iletmek, sekretin gibi belirli

hormonları salgılamak ile görevlidir. Posteriyor bağırsağın görevi ise; sıvıları absorbe etmek ve mukus salgılamaktır (Mumford ve ark., 2007). Anteriyor bağırsakta besinlerin kan damarlarına iletilmesi ve posteriyor bağırsakta sıvıların emilimi sırasında besinlerde bulunan ağır metaller dolaşım sistemine girerek balığın dokularında birikime sebep olmaktadır (Levander, 1979). Ağır metallerin vücuda besinler yoluyla değil de su ortamından solungaçlar ve deri vasıtasıyla alınması durumunda da en yüksek ağır metal birikimi bağırsakta gerçekleşmekte ve eozinofilik granül hücrelerindeki artış, ağır metal birikiminin bir göstergesi olmaktadır (Gardner ve Yevich, 1970; Mohamed, 2008, Dai ve ark., 2009; Kaya, 2012). Dolayısıyla bağırsak, ağır metal birikiminin ve toksisitesinin izlenmesi açısından önemli bir organdır.

Bir tüp şeklinde olan bağırsak dıştan içe doğru adventitia, muskularis, submukoza ve mukoza olmak üzere 4 ana katman içerir. Adventitia katmanı tüm bağırsak yüzeyini saran yoğun bağ doku ve areolar (halka formunda) bağ dokudan meydana gelir. Kan damarları, sinirler ve lenf kanalları bu katmanda yer alır. Muskularis katmanı düz kaslardan oluşmaktadır. Enzimlerin besinlerle karışması ve peristaltik hareketler muskularis katmanı sayesinde gerçekleşir. Submukoza katmanında ise areolar bağ doku, kan damarları ve sinirler bulunmaktadır. Mukoza katmanının hareketliliğini sağlar. İçteki katman olan mukoza kas tabakası, lamina propia (bağ doku) ve epitel tabakaları içerir. Lamina propiada eozinofilik granül hücreleri (Eosinophilic Granuler - Cell EGC) yer alırken, epitel tabakada ince ve uzun kolumnar epitel hücreleri, goblet hücreleri, lenfositler bulunur (Mumford ve ark., 2007).

İşlevi tam anlamıyla henüz anlaşılammış olan EGC'nin asıl görevinin organizmayı helminitik parazitlere karşı korumak olduğu düşünülmektedir (Kato ve ark., 1998; Straumann ve Simon, 2004). Helminitik parazit enfeksiyonu, alerjik reaksiyonlar ve ağır metale maruz kalma durumlarında EGC'nin artış gösterdiği bildirilmiştir (Begam ve Sengupta, 2015).

Tilapia kültür koşullarında bakım ve beslenmeye uygun olmaları, üremelerinin kolay olması, kirlenme ve çeşitli hastalıklara karşı dirençli olmaları sebebiyle iyi biyolojik model olarak tanınan balıkların başında gelmektedir (Almedia, 2002).

Tilapia, Güney Afrika'dan Madagaskar'a ve Kuzey Suriye'ye kadar geniş bir alanda tatlı su, acı su ve bazı denizel alanlarda dağılım gösterir (Tekelioğlu, 2005). Ekolojik valansı oldukça yüksek olan tilapia 8-42 °C arası sıcaklıklarda, 0,5 ppm

çözünmüş oksijen içeren oldukça fakir ve bulanık sularda, % 0,75 tuzlulukta yaşayabilir ve gelişim gösterir. Bentik canlılar ve alglerle beslenir (Tekelioğlu, 2005).

Kötü çevresel koşulları tolere edebilen, hastalıklara dirençli, yoğun stoklamaya elverişli, kolayca üreyebilen ve hızlı büyüyen bir tür olması sebebiyle tilapia yetiştiricilikte oldukça tercih edilen türlerden biridir (Altun ve ark., 2006).

Son yıllarda Nil tilapiası (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) ve mavi tilapia (*Oreochromis aureus* Steindachner, 1864) başta olmak üzere tilapia türleri akuatik çevredeki kirleticilerin biyolojik etkilerini incelemek için indikatör organizmalar olarak kullanılmaktadır (Almedia ve ark., 2002).

Ağır metal toksisitesini önlemek, etkilerini azaltmak ya da detoksifikasyonu amacı ile uzun yıllardır zeolit (Brook, 1953), DPTA, NTA (Pollard, 1966; Sprague, 1968; Wallace ve ark., 1971) ve EDTA (Nishikawa ve Tabata, 1968) gibi sentetik şelatlar kullanılmaktadır (Muramoto, 1980). Bununla birlikte birçok canlı tarafından vücuda alınması zorunlu maddelerden biri olan askorbik asit (AA) de ağır metal toksisitesinin etkilerini azaltmada kullanılan önemli bir antioksidandır (Jiraungkoorskul ve ark., 2008).

Askorbik asit ($C_6H_8O_6$) suda kolayca çözünebilmesine karşın, eter benzen kloroform ve yağlarda çözünmeyen, renksiz kristallerden oluşan bir monosakkarit türevidir. Askorbik asit balıklarda dahil olmak üzere bir çok canlıda önemli fizyolojik süreçlerin devam ettirilebilmesi için alımı zorunlu olan nutrientlerden biridir (Gouillou-Coustans ve Kaushik, 2000). Askorbik asit vücutta demir metabolizmasının düzenlenmesinde, D vitamini aktivasyonunda, stres durumunda adrenal bezler tarafından salgılanan hormonların zararlı etkilerini azaltmada; deri, pul, mukus, kıkırdak ve kemik dokunun yapısına katılan önemli bileşenlerden biri olan kollajen sentezinde görev alır (McDowell, 1989; Navarre ve Halver, 1989; Lovell, 1989). Ayrıca membranlar ve biyolojik sıvılarda reaktif oksijen türü (ROS) üzerindeki antioksidan özelliği (Lee ve Dabrowski, 2003) sebebiyle, farklı çevresel stres faktörlerine maruz kalan birçok balık türünde stres toleransını arttırdığı bildirilmiştir (Marchie ve ark., 1996; Gapasin ve ark., 1998). Askorbik asidin önemli özelliklerinden biride şelatlama özelliğidir. Yapılan çalışmalar askorbik asidin bazı ağır metaller ile kompleks oluşturduğu ve ağır metallerin toksik etkilerini azalttığını göstermiştir (Kalia ve Flora, 2005).

Tilapia da dahil olmak üzere bir çok balık türü askorbik asit sentezinden sorumlu olan L-glunolakton oksidaz enzimine sahip olmadıkları için, askorbik asidi dışarıdan

almak zorundadırlar (Gouillou-Coustans ve Kaushik, 2000). Balıklar askorbik asit ihtiyacını doğal ortamlarında doğal besinlerinden alabilmektedir, ancak intensif kültür koşullarında bu ihtiyacın karşılanması yem katkısı ile sağlanmakta ve önem arz etmektedir.

Yapılan araştırmalarda yüksek dozda askorbik asit alımının immün sistemi ciddi oranda desteklediği; hastalık, çevresel koşullar ve çeşitli toksikantlardan kaynaklı stresi ve ağır metaller de dahil bir çok toksik maddenin etkilerini önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir (Agrawal ve ark., 1978; McDowell, 1989; Navarre ve Halver, 1989; Marchie ve ark., 1996; Abdel-Tawwab ve ark., 2004). Balıklar üzerinde yapılan önceki çalışmalar çoğunlukla askorbik asidin beslenme ile alımı uygulamaları olup, su ortamına verilen askorbik asidin etkinliğini konu alan çalışmalar sınırlı sayıdadır.

Sublethal ve kronik dozlarda kirleticilerin balıklar üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde histolojik inceleme de yararlı bir yöntemdir (Bernet ve ark., 1999). Fakat kurşunun histopatolojik etkilerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar sınırlı sayıdadır. Bu çalışmanın amacı herhangi bir antropojenik faaliyetle sucul ortama girebilecek olan kurşunun belirli doz ve sürede tilapia'da oluşturabileceği birikim, bu birikimin dokular arası farklılığı, su ortamına verilen askorbik asidin kurşun birikimine etkisi, dokularda oluşabilecek ve askorbik asit tarafından engellenebilecek hasarların histopatolojik verilerle desteklenerek ortaya konulmasıdır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Tao ve ark. (1999), kurşunun balık vücuduna giriş mekanizmasının belirlenebilmesi için yaptıkları çalışmada kırmızı balığın (*Carrasius auratus* Linnaeus, 1758) bulunduğu ortama serbest kurşun (0,1 ppm) ve gibbsit (alüminyum içeren mineral) üzerine adsorblanmış partikül kurşun (0,4 ppm, 0,8 ppm, 1,2 ppm, 2 ppm ve 4 ppm) ilave etmiş, 5-10 gün sonunda ortamda bulunan balıkları incelemiş, solungaçlar ve bağırsaklarda kurşun ve alüminyum partiküllerine rastlamışlardır. Solungaçlardaki alüminyum ve kurşun partiküllerinin diğer partiküllere oranla daha fazla olduğunu gözlemlemiş, kurşun alım mekanizmasının; kurşun partiküllerinin mukusa tutunması ve tutunan partiküllerden kurşunun solungaç mikro-çevresi koşulları altında desorbsiyonu olmak üzere iki basamaktan oluştuğunu rapor etmişlerdir.

Wong ve Wong (2000), kadmiyumun solungaçlarda bulunan klorid hücrelerinin hücresel fonksiyonlarına etkisini belirlemek üzere Mozambik tilapiası (*Oreochromis mosambicus* Peters, 1852) ile yaptıkları çalışmalarında, 7 gün boyunca balıkları 40, 80 ve 160 ppb kadmiyuma maruz bırakmışlar ve solungaç dokuyu taramalı ve geçirimli elektron mikroskobu ile incelemişlerdir. Adaptasyonel modifikasyon gösteren morfolojik yapıların gazların transferinde rol oynayan pavement hücrelerinde şişmelere ve Ca^{2+} alımı ile görevli klorid hücrelerinde yoğunlukta artışa neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca her klorid hücresi başına düşen Ca^{2+} taşıma kapasitesinin ciddi miktarda azaldığını, bunun sonucu olarakta klorid hücrelerinin balıkta hipokalsemiye neden olan kadmiyumun ana hedefi haline geldiğini rapor etmişlerdir.

Karataş ve Kalay (2002), farklı kurşun derişimlerinin ve etkide kalma sürelerinin *Tilapia zilli* Gervais, 1848'de kurşun birikimine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada 1, 7, 15, 30 gün boyunca 1 ppm, 2,5 ppm ve 5 ppm kurşun nitrat içeren ortamlara maruz bıraktıkları balıkların dokularındaki kurşun birikim düzeylerini böbrek > beyin > solungaç > karaciğer (sırasıyla % 52,87 , % 25,56 , % 15,47 ve % 6,10) olarak tespit etmiş, böbrek dokuda kurşun birikiminin yüksek miktarda olmasını; böbrek dokunun kurşun bağlayıcı proteinler içermesi ve metal atılımının önemli oranda bu doku üzerinden sağlanması olarak açıklamışlardır.

Ruparelia ve ark. (1989), kurşunun *O. mosambicus*'un kan değerlerinde meydana getirdiği biyokimyasal değişimleri belirlemek için yaptıkları çalışmada; balıkları 18, 24

ve 33 mg/l kurşun içeren ortamlarda 7, 14 ve 21 gün süre ile tutmuş ve glukoz seviyesinde tüm gruplarda önemli bir düşüş olduğunu ve kurşunun balıklarda hipoglisemiye sebep olduğunu rapor etmişlerdir.

Kaya (2012) 'nın, 14 gün boyunca 0,5- 2,5 ve 5 ppm kurşun içeren ortamlara maruz bırakılan *O. mossambicus*'da kurşun toksisitesinin sebep olduğu oksidatif stres ve buna bağlı olarak değişen bazı fizyolojik parametrelerini belirlemek üzere yaptığı çalışmada; Na^+/K^+ - ATPaz, enzim aktivitesinin solungaç, bağırsak ve beyin dokusunda inhibasyona uğradığını, hematolojik parametrelerden hemoglobin, hematokrit, eritrosit ve nötrofil sayılarında azalma olduğunu belirlemiştir.

Mishra ve Mohanty (2008), 96 saat boyunca lethal dozda (41,75 mg/l) hexavalent kroma maruz bıraktıkları *Channa punctata* (Bloch, 1793)'un solungaç, böbrek ve karaciğerinde meydana gelen histopatolojik değişimleri ortaya koymuşlar; solungaçlarda; epitel hiperplazi, lamellar füzyon, ödem, epitel ayrılmalar nekroz ve aneurizm, böbrekte; küçülen lümenlerle birlikte renal tübüllerde epitel hücrelerde hipertrofi ve atrofi, hematopoetik dokuda nekroz oluşumu, karaciğerde; hepatositlerde sitoplazmik vakuoluzasyon, atrofi ve sinüsoidal boşluklarda artış gözlemlediklerini rapor etmişlerdir.

Martinez ve ark. (2004) yaptıkları çalışmalarında *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1837)'u 96 saat boyunca 24 ve 71 mg/l kurşun konsantrasyonlarına maruz bırakmışlardır. Çalışma sonucunda kurşunun solungaç epitel hücrelerinde hiperplaziye, solungaç lamellerinde kopmaya neden olurken, $Na^2+/K^+/ATPaz$ aktivitesini inhibe ederek osmoregülasyonda bozulmaya neden olduğunu bildirmişlerdir.

Olojo ve ark. (2005) farklı kurşun derişimlerinin (0,06-0,08 mg/l) 3 hafta süreyle karabalığın (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) solungaç ve karaciğer dokularında meydana getirdiği patolojileri ortaya koymuşlardır. Solungaçların kıkırdak dokudaki kitlesel büzülme sebebiyle boyut olarak küçüldüğünü, hücrelerin lizize uğramasından dolayı epitel hücrelerinin zarar gördüğünü, ödem başlangıcının bir belirtisi olarak hücre içi vakuol oluşumlarına rastladıklarını, pillar hücrelerinin boyutlarının küçüldüğünü gözlemlemiştir. Ayrıca karaciğerde; damar tıkanıklığının kan dolaşımını engellemesinden dolayı doku iskemilerinin oluştuğunu, akut ve yoğun olarak karaciğer hücrelerinde nekroz görüldüğünü, kan damarlarında hemarojilere rastlandığını rapor etmişlerdir.

Mobarak ve Sharaf (2011), 96 saat süresince sublethal konsantrasyonda (0,8 mg/l)

kurşun asetat içeren ortama maruz kalan yelken kuyruk moli'nin (*Poecilia latipinna*, Lesueur, 1821) solungaç ve sindirim sisteminde meydana gelen histopatolojik değişimleri incelemişler, solungaçlarda; hiperplazi, hipertrofi, lamellar yapıda bozulmalar ve lamellar füzyona, karaciğerde; hepatositlerde daralma, sinüsoidlerde genişleme ve hepatopankreasta; hepatositler ve pankreasit'ler arasındaki bağlantı kayıplarının olduğunu gözlemlemişlerdir.

Lamchumchang ve ark. (2007), *O. niloticus*'da kalsiyumun kurşun alımına etkisini araştırdıkları çalışmalarında, kurşunun LC50 (96 saat) değerini 182,38 mg/l olarak belirlemişlerdir. 30 gün süren çalışma sonucunda kalsiyum ilaveli yem ile beslenen balıklarda kurşun alımının önemli oranda daha düşük miktarda gerçekleştiğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca solungaçlarda; ödem, lamellar hiperplazi, epitel ayrılma, lamellar füzyon ve anevrizmalara, karaciğerde sinüsoidlerde daralma, vakuolizasyon ve nekroz bulgularına rastladıklarını bildirmişlerdir.

Jiraungkoorskul ve ark. (2007), *O. niloticus*'da kurşunun LC50 (96 saat) değerini 182,12 mg/l olarak belirlemişlerdir. Yalnız 45 ppm kurşun derişiminde bulunan gruba göre, kurşuna ilave olarak *Thunbergia laurifolia* bitkisinin ekstraktını içeren ortamlardaki balıklarda genotoksisitenin çok daha az gerçekleştiğini rapor etmişlerdir.

Yıldırım ve ark. (2006), fingerling *O. niloticus*'da deltamethrinin akut toksisitesinin dokularda meydana getirdiği histopatolojik değişimleri ortaya koymak için yaptıkları araştırmada, balıkları 96 saat boyunca 5µg/l deltamethrine maruz bırakmıştır. Sonuç olarak solungaçlarda; hiperemi ve sekonder lamellerde füzyon, telangiektazis karaciğerde; hidrofik dejenerasyon gözlemlediklerini rapor etmişlerdir.

Van Dyk ve ark. (2007), *O. mosambicus*'u Cd+Zn karışımının etkisine 24 ve 672 saat süreyle bıraktıkları çalışmalarında; metal karışımının etkisinde karaciğerde meydana gelen histopatolojik değişimleri incelemişlerdir. Çalışma sonucunda hiyalinizasyon, hepatositlerde vakuol oluşumu, hücresel hiperplazi ve kan damarlarındaki kan akışının aşırı şekilde arttığını saptamışlardır.

Figueiredo-Fernandes ve ark. (2007) *O. niloticus*'da 21 gün süreyle 0,5 – 0,1 ve 2,5 mg/l Cu derişimi bulunan ortamlarda meydana gelen patolojileri incelemişler, yüksek konsantrasyonlarda solungaçlarda; ödem, lamellar epitelde gerilme ve lamellar vasküler eksende yoğun vazodilasyon, karaciğerde; nekroze alanlar gözlemlemişlerdir.

Mohammed (2008) Nasser Gölü'nde yaptığı bir çalışmada, sudaki ve *O. niloticus*

ve Nil levreğinin (*Lates niloticus* Linnaeus, 1758) dokularındaki bazı ağır metallerin (Fe, Zn, Cu, Pb) düzeylerini belirlemiş ve histopatolojik değişimleri incelemiştir. Yapılan çalışmada karaciğerde; nekroze odaklar, vakuolar dejenerasyon, intestinal mukozada; nekrotik alanlar, kas dokuda; atrofi tespit edilmiştir.

El-Naggar ve ark. (2009) Nil Nehri'nden örnekledikleri *O. niloticus*'taki bazı ağır metal (Fe, Mn, Cu, Zn, Cd ve Pb) birikimlerini ve bu ağır metallerin karaciğerde meydana getirdiği histopatolojik değişimleri incelemişler, karaciğerdeki ağır metal düzeylerini Fe> Cu> Zn> Mn> Pb> Cd olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca yaptıkları histopatolojik incelemede dokuda dejenerasyonlara, damar tıkanmalarına, hemorajilere, nekroze alanlara ve ödeme rastladıklarını rapor etmişlerdir.

Dai ve ark. (2009), *O. niloticus* 'u 60 gün boyunca 100, 400 ve 800 µg/g kuru ağırlık dozunda Pb içeren yem ile beslemiş; kurşunun birikimi, histopatolojisi ve sindirim sistemi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. En yüksek miktarda birikimin bağırsakta olduğunu (dozlara göre sırasıyla 6,762 – 24,890 – 31,750 µg Pb/g), bunu mide (dozlara göre sırasıyla 2,047 – 8,873 – 11,680 µg Pb/g) ve karaciğerin (dozlara göre sırasıyla 0,988 – 2,981 – 4,163 µg Pb/g) izlediğini, karaciğer dokusunda lezyonlara, düzensiz olarak dağılmış hepatositlere, hücrel hipertrofiye ve sitoplazmik vakoulyasyona rastladıklarını, kurşun birikim miktarına bağlı olarak sindirim enzimlerinin inhibe olduğunu ve bu inhibasyonun tilapia'da diyetle bağlı kurşun kontaminasyonunun potansiyel biomarkeri olabileceğini bildirmişlerdir.

Kaoud ve El-Dashan (2010), balık çiftliklerinden örnekledikleri *O. niloticus*'lardaki ağır metallerin birikimi ve histopatolojik etkilerini araştırmışlardır. Solungaçlarda; primer lamellada ödem, sekonder lamellada hiperplazi, lamellar füzyona, karaciğerde; hepatosit hücrelerinde ve kan damarlarında dejenerasyona, böbrekte; nekroze alanlara, kas dokuda; nekroze odaklara, atrofi ve ödemlere rastladıklarını bildirmişlerdir.

Abdel-Warith ve ark. (2011) çinko toksisitesinin karaciğerde sebep olduğu histolojik değişimleri incelemiş, *O. niloticus*'u 2-4 hafta boyunca 2, 4 ve 6 ppm çinko klorür içeren ortamlara maruz bırakmışlardır. Sonuç olarak karaciğerde hepatosit dejenerasyonu, nükleer piknozis, hücrel şişmeler ve kan damarlarında tıkanıklar gözlemlendiğini rapor etmişlerdir.

James ve Sampath (2000), *Heteropneustes fossilis* Bloch, 1794 'i 60 gün boyunca 5 ppm kadmiyum içeren su ortamına maruz bırakırken bu ortamlara 0,5, 2 ve 4 g/l zeolit

eklemişlerdir. Çalışma sonunda su, sediment, balıkta birikim gösteren Cd miktarlarını karşılaştırmışlar, balıktaki RNA: DNA oranlarını incelemişler ve 2 g/l zeolit ortamına maruz bırakılan grubun en iyi performansı gösterdiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca 2 g/l zeoliti optimum doz olarak önermişlerdir.

James (2000), 5, 15, 30 ve 45 gün boyunca *O. mosambicus*'da 6 ppm kadmiyum ile 0,5, 2 ve 4 g/l zeolit karışımı etkisinde hematolojik kan değerlerini incelemiş, kadmiyumun kan parametrelerine etkisinin zeolitle azaldığını saptamıştır.

Muramoto (1980), Pb ve Pb-EDTA karışımlarına maruz bırakılan sazanların (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) solungaç ve kas dokularında birikimi karşılaştırmış, doğrudan Pb'nin etkisine bırakılan balıklara oranla Pb-EDTA karışımına bırakılan balıkların solungaç ve kas dokularındaki kurşun birikiminin oldukça azaldığını saptamıştır.

H. fosillis üzerine yapılan bir çalışmada 35, 60, 90 ve 120 gün boyunca 20, 50 ve 60 mg/l/gün subletal konsantrasyonlarda, kurşun nitratın balıklarda karaciğerde hücresel metabolizmayı ve enzimleri inhibe ettiği, çözünebilir protein, RNA ve glikojen içeriğinin azalmasına neden olduğu belirlenmiştir. Zeolit uygulamasının kurşun nitrat kaynaklı etkileri azalttığı, yem alımını arttırdığı tespit edilmiş, zeolitın biyolojik sistemlerde güvenle kullanılabileceği önerilmiştir (Jain, 1999).

Mishra ve Jain (2009), *H. Fosillis*'te 60, 90, 120, 150 ve 180 gün boyunca subletal dozda (10 mg/l) kurşun, kabazit ve kurşun+kabazitin beyin, karaciğer, böbrek ve solungaç dokulardaki protein içeriklerine etkisini ortaya koymak için yaptıkları çalışmalarında; kurşunun tüm dokularda protein içeriğini azalttığını, kurşun + kabazitin sadece kurşuna göre protein içeriğini daha yüksek oranda muhafaza ettiğini, kurşunun toksisitesini önemli lde azalttığını ve tek başına kabazitin kontrol grubuna göre protein içeriğini daha da yükselttiğini, bu nedenle kabazitin yem katkısı olarak kullanılmasının tavsiye edilebileceğini bildirmişlerdir.

şahin (2011), *O. niloticus*'da kurşun toksisitesinin azalmasında zeolitın etkisini belirlemek üzere yaptığı çalışmasında, 0,1 mg/l Pb, 0,1 mg/l Pb+0,1 g/l zeolit, 0,1 mg/l Pb+0,2 g/l zeolit ortamlarına 10, 20 ve 30 gün süre ile maruz bıraktığı balıklarda, en yüksek kurşun birikiminin böbrek dokuda olduğunu bunu solungaç, karaciğer ve kas dokunun izlediğini, tüm deney gruplarında zeolitın böbrek ve karaciğer dokuda kurşun birikimini önemli lde azalttığını göstermiştir.

Thomas ve ark. (1982), 10 ppm kadmiyuma 6 hafta boyunca maruz bıraktıkları has kefal (*Mugil cephalus* Linnaeus, 1758) ile yaptıkları çalışmada; karaciğer, solungaç, beyin ve böbrek dokudaki askorbik asit rezerv seviyelerinin, balığın kadmiyuma maruz kalması durumunda değişimini incelemişlerdir. Böbrek doku hariç diğer dokularda askorbik asit seviyesinin önemli oranda azaldığını bildirmişlerdir.

Lanno ve ark. (1985), gökkuşığı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss* Linnaeus, 1758) yeme eklenen bakırın toksisitesi üzerine askorbik asidin etkilerini araştırdıkları çalışmalarında; balıkları 16 hafta boyunca sadece bakır eklenmiş (800 mg/kg) ve bakır + askorbik asit (sırasıyla 800 mg/kg bakır + 100/ 1000/ 10000 mg/kg askorbik asit) eklenmiş yemlerle beslemişlerdir. Sonuç olarak bakır eklenen yem ile beslenen grupta canlı ağırlık artışında önemli bir azalma, bakır + askorbik asit eklenen yem ile beslenen gruplarda canlı ağırlıkta artış olduğunu fakat askorbik asitin bakır metabolizmasını ve birikimini etkilemediğini rapor etmişlerdir.

Abdel-Tawwab ve ark. (2004) *O. niloticus* ile yaptıkları çalışmada, balıkları 60 gün boyunca ½ LC50 ve ¼ LC50 civa klorür içeren (0,250 ve 0,125 ppm) ortamlara maruz bırakmış normal yemlerle ve 500 mg/kg askorbik asit içeren yemlerle beslemişlerdir. Çalışma sonucunda sublethal dozda civa klorüre maruz bırakılan grupta ağırlık kazancında ve kas dokuda toplam protein içeriğinde azalma olurken, askorbik asit içeren yem ile beslenen grupta ağırlık kazancının ve toplam protein içeriğinin artış gösterdiğini tespit etmiş, hayatta kalma oranlarının bu grupta daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Korkmaz (2007), *O. niloticus*'da histopatolojik değişimlere neden olan pestisit toksisitesi üzerine askorbik asidin koruyucu ve iyileştirici etkilerini ortaya koymak üzere yaptığı çalışmasında; 0,22 ve 0,44 µg/l alfacypermethrin içeren ortamlara 10 ve 20 gün boyunca maruz bıraktığı grupların bir kısmını askorbik asit ilaveli, diğer kısmını askorbik asit ilavesiz yem ile beslemiş, çalışma sonunda gruplar arasındaki histopatolojik değişimleri ve farklılıkları incelemiştir. Deneme sonunda askorbik asit ilavesiz yem ile beslenen alfacypermethrin ortamlarına maruz kalan gruplarda solungaçlarda; sekonder lamellerde epitel hipertrofi ve hiperplazi, epitel ayrılma ve ödem, aneurizm, sekonder lamellerde füzyon gibi lezyonlar karaciğerde; sinüsoidlerde tıkanma, bulanık şişme, piknotik çekirdek, vakuoler dejenerasyon ve nekroz gibi lezyonlar böbrekte; bulanık şişme, vakuol oluşumu, glomerulusta atrofi, hemapoetik dokuda piknotik çekirdek,

hiyalin damla dejenerasyonu, Bowman mesafesinde genişleme ve nekroz gibi lezyonlar gözlemlendiğini bildirmiştir. Ancak askorbik asit ilaveli yem ile beslenen grupta (10. gün) hiperplazi, deskuamasyon, nekroz, sekonder lamellerde kaynaşma ve pillar hücre sisteminin kırılması lezyonlarının görülmediğini, bunun sebebinin süreye bağlı olarak çok etkilenmemiş solungaç dokularında askorbik asidin koruyucu olarak etkili olması olabileceğini rapor etmiştir.

Jiraungkoorskul ve ark. (2008), 50 ppm kurşunun *O. niloticus*'da 7, 14 ve 21 günlük periyotlarda kan, solungaç ve karaciğer dokularında meydana getirdiği hücresel düzeyde nükleer anomalileri ve 50 ppm kurşun + askorbik asidin etkisini incelemişler, kurşunun balıkta sebep olduğu genotoksisiteyi askorbik asidin önemli ölçüde azalttığını ortaya koymuşlardır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Araştırmada balık (hibrit tilapia) materyali, akvaryum ortamlarında, kurşun metali (10 mg/l Pb^{2+}) ve kurşun + askorbik aside (10 mg/l Pb^{2+} + 10 mg/l askorbik asit), 28 gün süreyle maruz bırakılmıştır. Kronik ve ortamı yenilenen biyodenei tipi uygulanmıştır (Ünsal, 1998). Tilapia'nın farklı dokularındaki birikimler ve bu birikimlere askorbik asidin etkisi tespit edilmiş, veriler histopatolojik incelemeler ile desteklenmiştir.

3.1. Materyal

3.1.1. Hibrit Tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*)

Tilapia ismi Cichlidae familyası üyelerine verilen genel isimdir ve yaklaşık 1608 tür içerdiği bildirilmiştir (Eschmeyer ve Fong, 2015). Bu familyaya ait olan Nil Tilapiası *O. niloticus* (Linnaeus, 1758) ve Mavi Tilapia *O. aureus* (Steindachner, 1864) 'ya ait taksonomik sınıflandırma aşağıda verildiği gibidir (Şekil 3.1).

Alem	: Animalia
Şube	: Chordata
Sınıf	: Actinopterygii
Takım	: Perciformes
Familya	: Cichlidae
Cins	: Oreochromis
Tür	: <i>O. niloticus</i> (Linnaeus, 1758) <i>O. aureus</i> (Steindachner, 1864)



Şekil 3.1 Hibrit tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*)

Bu çalışmada isimleri geçen balık türlerinin Latince ve Türkçe güncel isimleri Froese ve Pauly (2016) referans alınarak kullanılmıştır.

Tilapia düşük maliyetle yetiştirilebilen bir balık olmasının yanısıra yüksek yoğunlukta stoklanabilmesi, ekstansif üretime uygun olması, polikültür veya ikincil ürün olarak üretilmesi sebebiyle üretim maliyeti daha da aşağıya çekilebilmektedir. Bu yüzden FAO (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü) tarafından birçok ülkeye insanların zorunlu hayvansal protein ihtiyacı probleminin çözümü olarak sunulmuştur (Tekelioğlu, 2005; Altun ve ark., 2006).

Günümüzden 4500 yıl önce yetiştiriciliğinin yapıldığı tahmin edilen tilapia (Balarin ve Hatton, 1979; Balarin ve Haller, 1982) ait kesin bilimsel kayıtlar 1924 yılında Kenya 'da yetiştiriciliğinin yapıldığı, buradan tüm Afrika'ya dağıldığını göstermektedir (Meschkat, 1967). 1939 yılında ilk kez doğal dağılım alanları dışına Endonezya'nın Java Adaları'na nakledilen tilapialar yıllar içinde birçok ülkeye dağılmıştır (Tekelioğlu, 2005). 1970'li yıllarda DSİ (Devlet Su İşleri) ve Çukurova Üniversitesi (Ç.Ü.) tarafından İsrail, İngiltere ve Suriye'den Türkiye'ye getirilen tilapialar, üretilmiş ve bölgeye adaptasyon çalışmaları yürütülmüştür (Sarıhan ve Toral, 1980; Tekelioğlu, 1991). Ç.Ü. İç Su Balıkları Üretim İstasyonu'nun tahliye kanallarından kaçan tilapialar Seyhan Nehri'nin Akdeniz'e yakın bölümlerinde bir populasyon oluşturmuş ve yıllar içinde bölgeye dağılmışlardır (Dikel ve Çelik, 1998).

Deneme materyali olarak kullanılacak $9,8 \pm 0,8$ cm boyunda $14,5 \pm 3,1$ g ağırlığında Hibrit Tilapia'lar (*O. niloticus* x *O. aureus*) Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Tatlı Su Araştırma ve Üretim İstasyonundan temin edilerek, anestezi altında (20 mg/l MS 222) Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi Tatlı Su ve Deniz Balıkları Araştırma Ünitesi'ne nakledilmiş ve çalışmanın gerçekleştirileceği akvaryumlara stoklanmıştır. Balıklar adaptasyon için 20 gün bekletilmiş, bu süre içerisinde canlı ağırlığın % 2'si oranında ticari pelet yem ile beslenmiştir. Balık yemlerinin içeriğindeki maddeler ile sudaki metal iyonları ve kimyasallar arasında öngörülemeyen etkileşimlerin oluşabileceği ihtimali düşünülerek, sağlıklı sonuçlar elde edilebilmesi adına denemenin başlatılmasından 24 saat önce yemleme kesilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Denemede kullanılan balıkların naklinde ve sakrifiye edilmesinde Sigma-Aldrich E10521 MS 222 ($H_2NC_6H_4CO_2C_2H_5 \cdot CH_3SO_3H$) anestezik madde kullanılmıştır. Akvaryumlar fizikokimyasal özellikleri Çizelge 3.1’de verilen doğal kaynak suyu ile doldurulmuştur. Deneme ortamlarına Merck Milipore 107398 Kurşun Nitrat ($Pb(NO_3)_2$), Sigma-Aldrich A92902 L-Askorbik asit, Merck Milipore 106448 tri-sodyum sitrat-dihidrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) ilave edilmiştir. Neutral buffered formalin (NBF)’nin hazırlanmasında, Merck Milipore 104003 Formaldehit çözeltisi, Merck Milipore 567547 Sodyum fosfat dibasic (Na_2HPO_4), Merck Milipore 106342 Sodyum fosfat monobasic (NaH_2PO_4); dokuların histopatolojik incelemeye hazırlanması aşamasında Merck Milipore 107017 Etanol, Merck Milipore 108661 Ksilen, Merck Milipore 107151 Blok Parafin, Sigma-Aldrich hematoksilin solüsyonu, Sigma-Aldrich eozin Y solüsyonu, Merck Milipore 107961 entellan kullanılmıştır. Ağır metal analizlerine hazırlık aşamasında Merck Milipore 100456 nitrik asit kullanılmıştır.

Çizelge 3.1 Deneme ortamında kullanılan suyun fizikokimyasal özellikleri

Parametre	Değer
Amonyum	- mg/l*
İletkenlik	79,3 $\mu S/cm$
pH	7,3
Oksitlenebilirlik	- mg/l*
Sülfat	- mg/l*
Sodyum	- mg/l*
Klorür	1,47 mg/l
Toplam Sertlik	50 mg/l $CaCO_3$

*Değerler ölçülebilir limitlerin altında kaldığından tespit edilememiştir.

3.1.3. Kullanılan Alet ve Ekipmanlar

Denemede akvaryumlarda Resun marka havalandırma motoru, Xilong AT-700 300 W cam akvaryum ısıtıcısı; suyun fiziksel ve kimyasal parametrelerini belirlemek için YSI

550A oksijenmetre, WTW ph330i pH metre; örneklemeler ve analizlere hazırlık aşamasında Denver TP214 0.001 hassas terazi, SandH Labware 103 slow 125mm filtre kâğıdı; histopatolojik incelemeye hazırlık aşamasında Leika EG 1160 parafin gömme istasyonu, Thermo Scientific Shandon Finesse ME+ mikrotom, Medite Tissue Stainer TST44C marka doku boyama cihazı; ağır metal analizinde Agilent Technology, 4100 MP-AES cihazı, histopatolojik inceleme sırasında Olympus BX51 marka ışık mikroskobu kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

Çalışmada 0 (kontrol) , 10 mg/l Pb²⁺ ve 10 mg/l Pb²⁺ + 10 mg/l askorbik asit içeren ortamlarda balıklar 28 gün süreyle tutulmuş, 14. ve 28. günlerde örneklenerek karaciğer, bağırsak, solungaç, gonad ve kas dokularında biriken Pb²⁺ miktarları belirlenmiş ve bu dokular histolojik olarak incelenmiştir.

Çalışma 5 aşamadan oluşmaktadır:

- Denemenin kurulması ve yürütülmesi
- Ağır metal analizine ve histopatolojik incelemeye hazırlık
- Ağır metal analizi
- Histopatolojik inceleme
- İstatistikî analizler

3.2.1. Denemenin Kurulması ve Yürütülmesi

3.2.1.1. Akvaryum ve Deney Düzenekleri

Denemede 9 adet 80 litrelik cam akvaryumlar kullanılmıştır. Akvaryumlarda havalandırma motoru ve hava taşları kullanarak havalandırma yapılmış, ortam sıcaklığı ise her akvaryumda bulunan cam ısıtıcılar kullanılarak sabitlenmiştir (Şekil 3.2). Deneme süresince 12 saat aydınlık/ 12 saat karanlık olacak şekilde foto periyod uygulanmış ve sıcaklık, çözünmüş oksijen ve pH parametreleri günlük olarak takip edilmiştir.



Şekil 3.2 Deney düzeneği (orijinal)

3.2.1.2. Deney Ortamlarında Kullanılan Stok Çözeltilerin Hazırlanması

Belirlenen konsantrasyonları hazırlamak için ultra saf su kullanılarak ana stok çözeltiler hazırlanmış ve buradan uygun seyreltmeler yapılarak deneme konsantrasyonları elde edilmiştir. Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi'nin yer aldığı İskenderun (Hatay) bölgesinin musluk suyunun kalsiyum ve toplam sertlik derecesinin çok yüksek olmasından dolayı, Pb^{2+} iyonlarının kurşun sülfat, kurşun karbonat, kurşun fosfat vb. metal tuzları formunda çökmemesi için, yumuşak sular sınıfına giren doğal kaynak suyu kullanılmıştır. Ayrıca yine çökelmeyi önlemek amacıyla tüm ortamlara 1,8 ppt trisodyumsitratdihidrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) ilave edilmiştir.

3.2.1.3. Deneme Grupları ve Denemenin Yürütülmesi

Denemede kontrol (0), (10 mg/l Pb^{2+}) ve (10 mg/l Pb^{2+} + 10 mg/l askorbik asit) olmak üzere 3 tekerrürlü 3 farklı muamele grubu oluşturulmuş, toplam 9 akvaryum kullanılmıştır. Her bir akvaryuma 12 adet balık stoklanmıştır. Denemenin 7, 14 ve 21. günlerinde akvaryumlarda % 100 su değişimi yapılarak ortamlar yeniden hazırlanmıştır. Mortalite sürekli olarak takip ve kayıt edilmiş, ölen balıklar derhal ortamdan uzaklaştırılmıştır. Tüm uygulamalar etik kurallara uygun olarak uzman kişilerce gerçekleştirilmiştir.

Denemenin 14 ve 28. günlerinde her bir akvaryumdan 4'er adet balık (3 adet ağır metal birikiminin belirlenmesi için, 1 adet histopatolojik inceleme için) örneklenmiştir.

3.2.2. Ağır Metal Analizi ve Histolojik İnceleme İçin Hazırlık Aşaması:

14 ve 28. günlerde örneklenen balıklar, yüksek dozda anestezi kullanılarak (200 ppm MS 222) sakrifiye edilmiş, havlu ile kurularak boy ve ağırlık ölçümleri yapılmış ve bekletilmeden disekte edilerek solungaç, karaciğer, bağırsak, gonad ve kas dokuları örneklenmiştir.

3.2.2.1. Ağır Metal Analizine Hazırlık Aşaması

Ağır metal analizine hazırlık aşamasında yaş yakma yöntemi kullanılmıştır (Yılmaz, 2005). Örnekleme takiben disekte edilen dokuların yaş ağırlıkları (y.a.) hassas terazi ile tartılarak, 50 ml'lik falkon tüplere aktarılmış, üzerlerine 10 ml % 65'lik nitrik asit ilave edilmiştir. Falkon tüpler sıcak su banyosunda 80°C sıcaklıkta homojen bir şekilde yakılmış, filtre kâğıdı ile süzölmüş ve örnekler ultra saf su ile 50 ml'ye tamamlanmıştır.

3.2.2.2. Histopatolojik İnceleme İçin Hazırlık Aşaması

Histopatolojik inceleme için dokular; fiksasyon, dehidrasyon, şeffaflaştırma, parafin infiltrasyonu, doku gömme, kesit alma, boyama ve daimi preparat hazırlanması olmak üzere toplam sekiz basamaklı bir işlemde geçirilmiştir (Bancroft ve Gamble, 2008).

Örneklenen dokular fikse olmaları için 1:25 hacim oranında (örnek hacmi: fiksatif hacmi) % 10'luk Neutral Buffered Formalin (NBF)'e aktarılmış ve en az 48 saat fiksatifte bekletilmiştir. NBF'nin hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve miktarları aşağıda verildiği gibidir:

- 250 ml 37% Formaldehit
- 2250 ml Distile su
- 16.25 g Sodyum fosfat dibasic (Na_2HPO_4)
- 10 g Sodyum fosfat monobasic (NaH_2PO_4)

Dehidrasyon aşaması, doku içerisinde bulunan suyun ya da fiksatifin dışarı çıkartılması amacıyla uygulanır. Bu aşamada NBF fiksatifinden çıkartılan dokular bir dizi formalin ve alkol serilerinden geçirilmiştir. Dehidrasyon işlemi aşağıda verilen oranlarda

ve sürelerde uygulanmıştır:

a) %10	Formalin	1 sa.
b) %60	Etanol	2 sa.
c) %70-80	Etanol	2 sa.
d) %96	Etanol	1 sa.
e) %100	Etanol	1 sa.

Şeffaflaştırma aşaması, dokuda bulunan alkol gibi dehidrant maddelerin uzaklaştırılması için uygulanır. Zira dehidrantlar bir sonraki basamak olan sertleştirme (parafin infiltrasyonu) aşamasında kullanılan maddelerle uyum göstermezler. Fakat şeffaflaştırmada kullanılan ksilen gibi maddeler her iki madde ile karışma özelliğindedir ve geçiş görevi görürler. Şeffaflaştırma aşamasında 3 saat süreyle ksilen uygulanmıştır.

Dokuların mikrotomda kesilebilmesi için sertleşmesi gerekmektedir. Bu amaçla sertleştirme (parafin infiltrasyonu) için dokular 4 saat süreyle parafinde bekletilmiştir.

Doku gömme aşamasında dokular parafin gömme istasyonu (Şekil 3.3) kullanılarak plastik kasetlerin üzerine parafin bloklar (Şekil 3.4) içerisine gömülmüştür.



Şekil 3.3 Doku gömme aşamasında kullanılan parafin gömme istasyonu (orijinal)



Şekil 3.4 Mikrotomda kesilmek üzere hazırlanan parafin blokları ve içerisine gömülmüş dokular (orijinal)

Parafin bloklara gömülen dokulardan mikrotom ile 4µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Alınan kesitler 48°C sıcaklıktaki su banyosuna alınmış, buradan lam üzerine aktarılmıştır.

Boyama işlemi hematoksilin ve eozin boyama yöntemi (Naiper, 2012) ile doku boyama cihazı ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5). Boyama işlemi sırasında uygulanan prosedür aşağıda verilmiştir:

a) Kurutma	3 dk.	ğ) Etanol	1 dk.
b) Ksilen	5 dk.	h) Eozin	7 dk. 30 sn.
c) Ksilen	5 dk.	ı) Su banyosu	1 dk.
ç) Etanol	1 dk.	i) Etanol	30 sn.
d) Etanol	2 dk.	j) Etanol	30 sn.
e) Su banyosu	1 dk.	k) Etanol	1 dk.
f) Hematoksilin	1 dk. 25 sn.	l) Ksilen	30 sn.
g) Su banyosu	2 dk.	m) Ksilen	1 dk.



Şekil 3.5 Doku boyama cihazı ve doku kesitlerinin boyanması (orijinal)

Daimi preperat hazırlama işleminde entellan kullanılarak, lam üzerine tespit edilip boyanmış olan kesitler lamel ile kapatılarak kurumaya bırakılmıştır.

3.2.3. Ağır Metal Analizi

Dokularda biriken Pb miktarlarının belirlenebilmesi için analizler Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvarı'nda bulunan Agilent Technology 7500ce indüktif olarak eşleştirilmiş plazma kütle spektrometresi (Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometer ICP-MS) cihazında yapılmıştır.

3.2.4. Histopatolojik İnceleme

Balıklardan elde edilen dokulara ait histolojik preparatlar ışık mikroskobu ile histopatolojik olarak incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

3.2.5. İstatistik Analizler

Araştırma sonunda, dokular arasındaki ortalama farklılıklar istatistik olarak analiz edilmiştir. Hesaplanan değerlerin istatistik analizi SPSS 17.0 programı kullanılarak, gruplar içi ve arası farklılıklar tek ve çift yönlü ANOVA analizi ile karşılaştırılmıştır. Farklılıklar Tukey ve LSD testleri ile hesaplanmıştır ($p < 0,05$).

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Deneme süresince ortamların takip edilen sıcaklık, pH ve çözülmüş oksijen parametrelerinin haftalık ortalama değerleri Çizelge 4.1’de sunulmuştur. Üç tekerrürlü olarak çalışılan ortamlarda akvaryumlar arasındaki fizikokimyasal değerlerdeki farklılıkların istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$).

Çizelge 4.1 Deneme ortamlarının fizikokimyasal parametrelerinin ortalamaları

	Parametre	Akvaryum	Gün				Ortalama
			0-7	7-14	14-21	21-28	
Kontrol	Sıcaklık (°C)	I. Akvaryum	24,5	25,1	25,6	24,7	24,9
		II. Akvaryum	25,2	24,5	25,4	25,3	25,1
		III. Akvaryum	25	24,9	24,7	24,8	24,8
		Ortalama	24,9	24,8	25,2	24,9	24,9
	Çözülmüş Oksijen (ppm)	I. Akvaryum	6,8	6,7	7,0	6,5	6,7
		II. Akvaryum	6,2	6,9	5,4	5,7	6,0
		III. Akvaryum	7,0	5,8	6,3	6,6	6,4
		Ortalama	6,6	6,4	6,2	6,2	6,3
	pH	I. Akvaryum	5,93	6,72	6,83	7,19	6,67
		II. Akvaryum	6,42	6,38	7,11	6,68	6,65
		III. Akvaryum	5,98	6,54	6,23	6,79	6,39
		Ortalama	6,11	6,54	6,72	6,88	6,56
10 mg/l Pb ²⁺	Sıcaklık (°C)	I. Akvaryum	24,4	25	25,3	25	24,9
		II. Akvaryum	25,5	24,8	25,5	24,7	25,1
		III. Akvaryum	25,2	25,1	24,9	25	25,0
		Ortalama	25	24,9	25,2	24,9	25,0
	Çözülmüş Oksijen (ppm)	I. Akvaryum	6,7	7	6,5	5,9	6,5
		II. Akvaryum	5,3	6,4	6,5	5,2	5,8
		III. Akvaryum	7,1	6,1	5,7	6,6	6,3
		Ortalama	6,3	6,5	6,2	5,9	6,2
	pH	I. Akvaryum	7,18	6,87	6,51	7,11	6,92
		II. Akvaryum	6,14	6,25	7,09	6,93	6,60
		III. Akvaryum	6,84	7,02	6,79	6,45	6,78
		Ortalama	6,72	6,71	6,79	6,83	6,76

Çizelge 4.1 (Devam) Deneme ortamlarının fizikokimyasal parametrelerinin ortalamaları

	Parametre	Akvaryum	Gün				Ortalama
			0-7	7-14	14-21	21-28	
10 mg/l Pb ²⁺ + 10 mg/l AA	Sıcaklık (°C)	I.Akvaryum	24,2	25,3	25,7	24,6	24,9
		II. Akvaryum	25,5	24,7	24,8	25	25,0
		III. Akvaryum	24,7	25,4	25,1	24,8	25,0
		Ortalama	24,8	25,1	25,2	24,8	24,9
	Çözülmüş Oksijen (ppm)	I.Akvaryum	6,8	6,7	6,5	5,9	6,4
		II. Akvaryum	5,2	5,8	6,4	7,2	6,1
		III. Akvaryum	5,3	5,7	6,3	6,5	5,9
		Ortalama	5,7	6,0	6,4	6,5	6,1
	pH	I.Akvaryum	6,89	6,12	7,06	6,41	6,62
		II. Akvaryum	6,65	6,44	6,64	6,66	6,60
		III. Akvaryum	6,13	5,98	6,45	6,38	6,24
		Ortalama	6,55	6,18	6,71	6,48	6,48

Deneme süresince akvaryumlardaki balıkların davranışları incelenmiş; ilk 3 günde çalışılan tüm ortamlarda balıkların davranışlarında stresli görünmeleri dışında bir anormallik olmadığı saptanmış olup, 4. günün sonunda kurşuna maruz bırakılan balıkların aniden hareket edip aniden durdukları, kontrol grubuna göre daha hareketli oldukları ve mukus salgısının arttığı gözlemlenmiştir. Kurşun ve askorbik asit içeren ortamda bulunan balıkların hareketlerinin kontrol grubundaki balıkların davranışlarına benzer olduğu bireylerin toplu bir şekilde durduğu fakat mukusta belirgin bir artış olduğu görülmüştür. 10. günde kurşun içeren akvaryumdaki balıkların hareketlerinde yavaşlama olduğu, birbirlerinden ayrı bir şekilde durdukları, ağızlarını uzun süre açık tuttıkları, bazı bireylerin dengesiz bir şekilde yüzdüğü, kurşun ve askorbik asit içeren akvaryumlardaki balıkların ise solungaç kapaklarını çok sık açıp kapadığı, hareketlerinde belirgin bir yavaşlama olduğu, saklanmaya çalıştıkları gözlemlenmiştir. Balıkların davranışlarında 17. güne kadar değişim gözlenmemiş ancak 17. günde kurşun grubunda bulunan bazı balıkların solungaçlarında kanama olduğu, renklerinin koyulaştığı neredeyse hareket etmedikleri, kurşun ve askorbik asit içeren gruptaki balıklarda renk koyulaşması ile

birlikte dengesiz yüzme hareketi gözlemlenmiştir. Balıkların bu belirlenen davranışları dışında denemenin sonuçlandırıldığı 28. güne kadar bir değişiklik tespit edilmemiştir.

Balıklarda kurşun birikimi ve toksik etkilerini belirlemek üzere yapılan önceki çalışmalarda birçok araştırmacı, balıkların kaçma hareketi, mukus salgısında artış, ağzın uzun süre açık kalması, durgunluk, dengesiz yüzme ve solungaçlarda kanama bulguları gibi anormallikleri tespit ettiklerini bildirmişlerdir (Karataş ve Kalay, 2002; Mobarak ve Sharaf, 2011; Şahin, 2011; Kaya, 2012). Bu çalışmada kurşun toksisitesine maruz bırakılan balıklarda da benzer davranışlar gözlemlenmiştir.

Deneme süresince kontrol grubunda hiç ölüm gözlenmezken, kurşun içeren akvaryumlarda toplam 5, kurşun ve askorbik asit içeren akvaryumlarda ise toplam 3 mortalite gerçekleşmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Deneme süresince gerçekleşen mortalitenin günlere ve gruplara göre dağılımı

Ortamlar	Günler							TOPLAM
	7	11	12	13	20	22	26	
10 mg/l Pb ²⁺	2	-	1	-	1	1	-	5
10 mg/l Pb ²⁺								
10 mg/l AA	-	1		1	-	-	1	3

Cearley ve Coleman (1974), balıklarda ağır metal toksisitesine bağlı mortalitenin; metal alım mekanizmasının uyarılması ve eliminasyon hızının biriktirme hızından düşük olması sebebiyle hızlı bir şekilde alınarak fazla miktarda biriktirilmesiyle gerçekleştiğini rapor etmişlerdir. Lacroix ve ark. (1985) ve Heath (1995), balığı ölüme götüren ağır metal birikiminin etkilerini; iyon regülasyonunun bozulması, solungaçlarda oksijen alımının bloke olmasıyla hipoksiyanın oluşması olarak açıklamışlardır. Viarengo (1989), mortalitenin oluşmasında; ağır metaller tarafından enzim aktivitelerinin engellenmesinin de etkili olduğunu bildirmiştir.

4.1. Dokularda Kurşun Birikimi

Dokularda kurşun birikimi ve askorbik asidin kurşun birikimine olan etkisi kontrol (K), kurşun (10 mg/l Pb²⁺) ve kurşun + askorbik asit (10 mg/l Pb²⁺ + 10 mg/l AA)

ortamlarında çalışılmış, 14. gün ve 28. günde alınan balık örneklerinin dokuları (solungaç, karaciğer, bağırsak, gonad ve kas) kurşun birikim düzeylerinin tespit edilmesi için analiz yapılmıştır. Kontrol grubunda bulunan balıkların çalışılan tüm dokularında kurşun ölçülebilir limitlerin altında kaldığından tespit edilememiştir. (Pb) ve (Pb + AA) grubundaki balıkların çalışılan dokularında farklı değerlerdeki kurşun düzeyleri Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3 kurşun (10 mg/l Pb²⁺) ve kurşun + askorbik asit (10 mg/l Pb²⁺ + 10 mg/l AA) gruplarındaki balıkların dokularında Pb birikim düzeyleri (µg g⁻¹ / y.a.)*

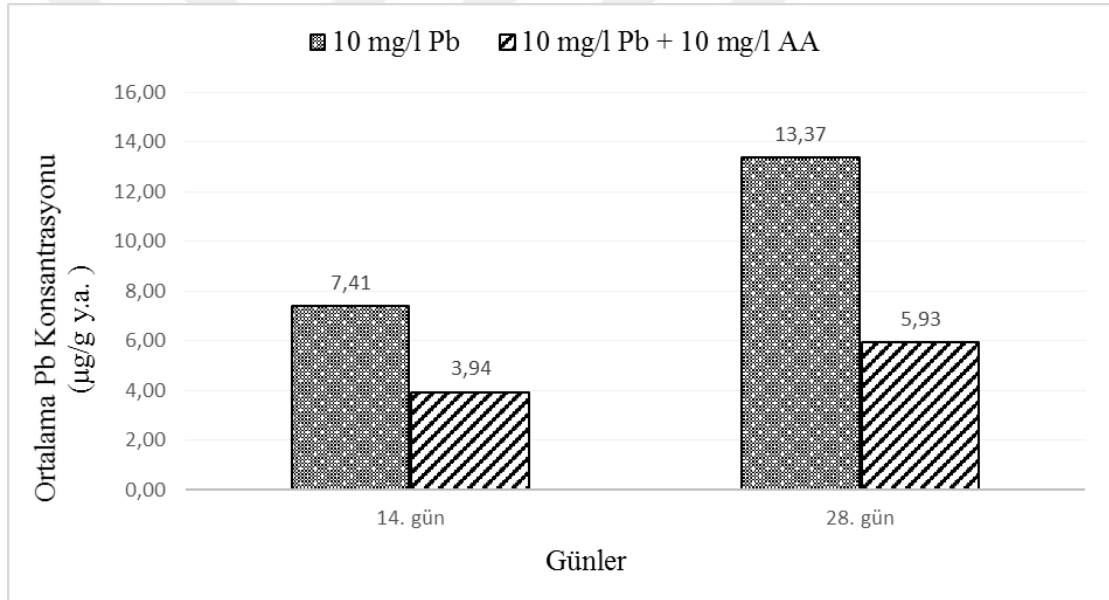
Dokular	Gruplar			
	10 mg/l Pb ²⁺		10 mg/l Pb ²⁺ + 10 mg/l AA	
	14. gün	28. gün	14. gün	28. gün
Solungaç	7,408 ± 0,63 ^{Aa}	13,367 ± 1,93 ^{Ab}	3,937 ± 0,53 ^{Ac}	5,934 ± 1,26 ^{Ad}
Karaciğer	2,025 ± 0,45 ^{Ba}	5,0811 ± 0,99 ^{Bb}	1,43 ± 0,4 ^{Bc}	2,344 ± 0,59 ^{Ba}
Bağırsak	49,136 ± 5,54 ^{Ca}	274,679 ± 43,21 ^{Cb}	33,384 ± 3,59 ^{Cc}	46,017 ± 6,22 ^{Ca}
Gonad	0,343 ± 0,05 ^{Da}	1,952 ± 0,15 ^{Db}	0,0451 ± 0,04 ^{Dc}	0,357 ± 0,07 ^{Da}
Kas	0,248 ± 0,14 ^{Da}	1,173 ± 0,56 ^{Eb}	0,188 ± 0,14 ^{Ec}	0,418 ± 0,26 ^{Dd}

*Çizelgede yer alan üstel büyük harfler dokular arasındaki (aynı sütunda yer alan satırlar arasında), küçük harfler ise gruplar arasındaki (aynı satırda yer alan sütunlar arasında) karşılaşmayı göstermekte olup, farklı harfler istatistiksel açıdan farklılığın önemli olduğunu ifade etmektedir (P<0,05).

Solungaçlar balığın içinde bulunduğu su ortamı ile doğrudan temas halinde bulunması, solunum, boşaltım ve iyon dengesinin sağlanması görevlerini üstlenmiş olması sebebiyle önemli bir organdır. Solungaçlar balığın çevresi ile doğrudan bağlantısını sağlayan bir diğer yapı olan deriye oranla 10-60 kat daha geniş bir yüzey alanına sahiptir. Bu yüzden gaz ve iyon değişimine ek olarak ortamda bulunan toksikantlarla etkileşimi başta deri olmak üzere diğer organ ve dokulara kıyasla oldukça yüksek bir oranda gerçekleşmektedir (Flik ve Verbost, 1993). Yapılan çalışmalar su ortamında kurşun bulunması durumunda, kurşun alımının ve biriktirilmesinin önemli bir oranda solungaçlar üzerinden gerçekleştirdiğini göstermektedir (Tao ve ark., 1999; MacDonald ve ark., 2002; Dai ve ark., 2009).

Çalışmamızda solungaçta biriken kurşun miktarı zamana bağlı olarak artış göstermiş; 10 mg/l Pb²⁺'ye maruz bırakılan gruplarda 14. günde tespit edilen birikim

düzeyi ($7,408 \pm 0,63 \mu\text{g g}^{-1} / \text{y. a.}$) olup 28. günde ($13,367 \pm 1,93 \mu\text{g g}^{-1} / \text{y. a.}$) yaklaşık 1,8 kat artmıştır. Kurşunun ilk 14 gündeki birikim hızı ikinci 14 günlük periyotta yaklaşık %20 azalmıştır. $10 \text{ mg/l Pb}^{2+} + 10 \text{ mg/l AA}$ 'ya maruz bırakılan gruplarda ilk 14 günde biriken kurşun miktarının ($3,937 \pm 0,53 \mu\text{g g}^{-1} / \text{y. a.}$) 28. günde ($5,934 \pm 1,26 \mu\text{g g}^{-1} / \text{y. a.}$) yaklaşık 1,5 kat arttığı tespit edilmiştir. Bu gruplardaki birikim hızları kıyaslandığında ilk 14 gündeki birikim hızının ikinci 14 günlük periyotta yaklaşık %50 azaldığı belirlenmiştir. Yalnızca kurşun içeren ortamlarda 14 gün boyunca tutulan balıkların solungaçlarındaki kurşun birikiminin, kurşun ve askorbik asit içeren ortamlarda 14 gün tutulan balıklara oranla 1,8 kat ve yalnızca kurşun içeren ortamlarda 28 gün boyunca tutulan balıkların solungaçlarındaki kurşun birikiminin kurşun ve askorbik asit içeren ortamlarda 28 gün tutulan balıklara oranla 2,2 kat fazla olduğu görülmektedir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Tilapia solungaç dokularında Pb birikim düzeylerinin zamana göre değişimi

Balık dokularında kurşun birikimini konu alan çok sayıda çalışma solungaçlarda kurşun birikiminin zamana bağlı olarak artış gösterdiği rapor edilmiştir (Ay ve ark., 1999; Kalay ve Canlı, 2000; Çoğun, 2008; Dai ve ark., 2008; Ahmed ve Bibi, 2010; Şahin, 2011; Kaya, 2012). Araştırmada hem kurşun içeren ortamlarda hem de kurşun ve askorbik asit içeren ortamlardaki birikim değerleri ve zaman ilişkisinin önceki çalışmalarla paralellik gösterdiği tespit edilmiştir.

Brezonik ve ark. (1991), akuatik organizmalarda, metalin doku yüzeyine ilk

tutunduğu anda hızlıca absorbe edilmesinin ardından, metallerin epitel dokudaki taşınımının, bazı sınırlayıcı faktörler tarafından yavaşlatıldığını bildirmişlerdir. Bazı araştırmacılar, solungaçta metal birikimi zamana bağlı olarak artmaya devam ederken, birikim hızının azalma eğiliminde olmasının sebebinin solungaçta biriken metalin kan dolaşımı ile diğer organlara taşınma oranının artışı ve mukus salgısının artmasıyla metal alımının engellenmesi olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Varanasi ve Markey, 1978; Pärt ve Lock, 1983).

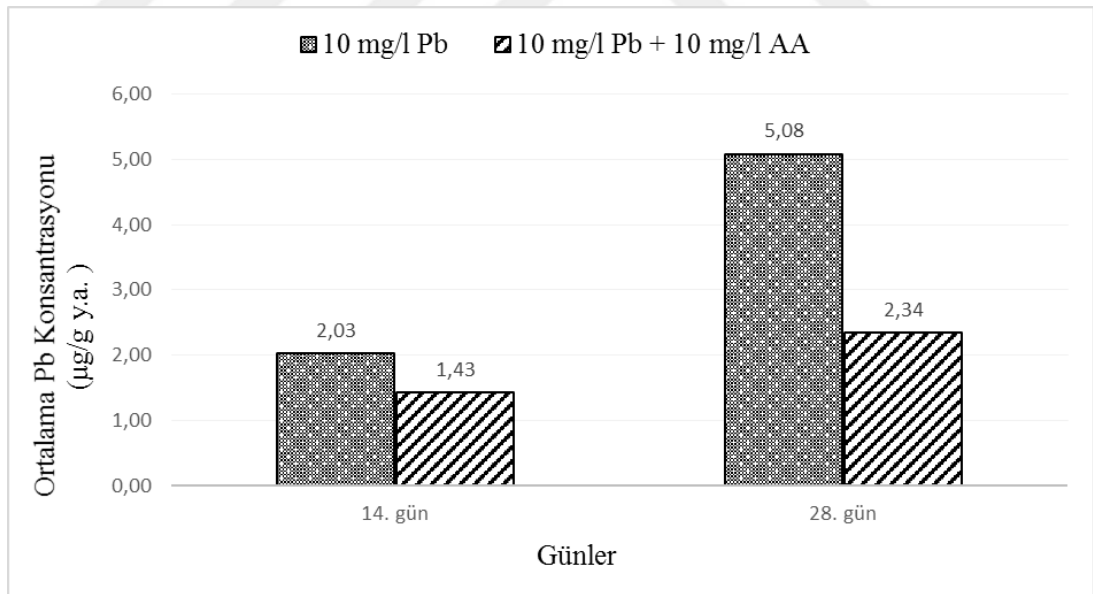
Yapılan bazı çalışmalarla, yeme karıştırılan askorbik asidin *O. mykiss*'in solungaç dokusunda kurşun (Hodson ve ark.,1980) ve bakır (Lanno ve ark., 1985) birikimine etkisinin olmadığı rapor edilmiştir. Ancak bu alanda yapılan bazı çalışmalar ise askorbik asidin EDTA kadar etkili şelatlama özelliği olan bir antioksidan olduğunu, kurşunla antagonistik bir etkileşimi olduğunu, kurşunun toksik etkilerini azalttığını ve kurşun alımını inhibe ettiğini göstermektedir (Flora ve Tandon 1986; Dhawan ve ark., 1988; Eisler, 1988; Fischer ve ark., 1988; Goyer ve ark., 1995; Kalia ve Flora, 2005). Araştırma bulgularımız askorbik asidin kurşun birikimini azalttığını bildiren bu çalışmaların bulguları ile paralellik göstermektedir.

Solungaç dokuda biriken kurşun miktarı zamanla artmaya devam ederken, bu birikim hızının zamanla azalma eğilimi gösterdiği, kurşun ortamına askorbik asidin ilavesiyle balıkların solungaçlarında kurşun birikim miktarının sadece kurşun içeren ortamlara kıyasla önemli ölçüde daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmamızdaki bulgular; ortamda askorbik asidin varlığı ile solungaçta kurşun alımının azaldığını ve birikim hızının yavaşladığını göstermektedir.

Birçok hayati biyokimyasal işlevi (sindirim, depolama, bağışıklık vb.) yerine getiren karaciğerin önemli görevlerinden biri de detoksifikasyon mekanizmasını düzenlemesidir (Roesijadi ve Robinson, 1994; Brusle ve Anadon, 1996; Ali ve ark., 2003). Karaciğer ağır metallerin hedef organlarının başında gelmektedir (Kargın ve Coğun, 1999; Hollis ve ark., 2001). Biriktirmiş olduğu ağır metalleri, sentezlediği metallothionein gibi metal-bağlayıcı proteinlerle bağlayarak metallo-protein kompleksi formunda vücuttan atılımını sağlamaktadır (Heath, 1995; Canlı ve ark., 1997; Ay ve ark., 1999). Birçok metalin vücutta en çok birikim gösterdiği organ olan karaciğer, kurşun birikim çalışmalarında kas dokudan sonra en az kurşun birikimi gösteren organ olarak rapor edilmiştir (Coğun, 2008; Şahin, 2011; Kaya, 2012). Bunun sebebinin diğer

metallerin aksine, kurşunun karaciğerde metallothionein sentezlenmesini sağlayan mekanizmayı uyardırmamasından ve kurşunun metallothionein'e bağlanmamasından kaynaklanıyor olabileceği bildirilmiştir (Reichert ve ark., 1979; Roesijadi ve Robinson 1994; Linde ve ark., 1999).

Bu çalışmada, ilk 14 günde karaciğerde birikim gösteren kurşun miktarı ($2,025 \pm 0,45 \mu\text{g g}^{-1} / \text{y.a.}$), ikinci 14 günlük periyotta zamana bağlı olarak yaklaşık 2,5 kat artış gösterirken (28. Gün: $5,0811 \pm 0,99 \mu\text{g g}^{-1} / \text{y.a.}$) birikim hızı yaklaşık % 50 oranında artmıştır. Kurşun ve askorbik asidin bulunduğu ortamlardaki balıkların karaciğerinde ilk 14 günde gerçekleşen kurşun birikim düzeyi ($1,43 \pm 0,4 \mu\text{g g}^{-1} / \text{y.a.}$) 28. günde ($2,344 \pm 0,59 \mu\text{g g}^{-1} / \text{y.a.}$) yaklaşık 1,6 kat artış göstermiştir. Birikim hızı ise yaklaşık % 40 oranında azalmıştır. Yalnızca kurşun içeren ve kurşuna ilave olarak askorbik asit içeren ortamlarda tutulan balıklardaki birikim düzeyleri karşılaştırıldığında; yalnızca kurşun içeren ortamlarda karaciğerde gerçekleşen birikimin kurşun ve askorbik asit içeren ortamlara göre ilk 14 günde yaklaşık 1,4 kat, ikinci 14 günde yaklaşık 2,17 kat fazla gerçekleştiği tespit edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Tilapia karaciğer dokularında Pb birikim düzeylerinin zamana göre değişimi

Önceki çalışmalarda karaciğerde biriken kurşun düzeyinin maruz kalma süresine bağlı olarak artış gösterdiği bildirilmiştir (Ay ve ark., 1999; Kalay ve Canlı, 2000; Çoğun, 2008; Dai ve ark., 2008; Ahmed ve Bibi, 2010; Şahin, 2011; Kaya, 2012). Önceki çalışmalara ait birikim düzeyi ve zaman ilişkisi bulguları çalışmamızda, hem kurşun hem

de kurşun ve askorbik asit içeren ortamlarda bulunan balıkların karaciğerindeki kurşun birikim düzeylerinde gözlemlenmiş olduğumuz artış bulgularımızı desteklemektedir.

Yapılan çalışmalar solungaç doku ile karaciğerde meydana gelen metal birikiminin bir biri ile ilişkili olduğunu göstermektedir: Solungaç dokuda metal birikim hızı zamanla azalırken, karaciğerde artış göstermesi çeşitli araştırmacılar tarafından solungaç dokuda biriken metalin dolaşım sistemine geçerek karaciğerdeki birikimi hızlandırması ile açıklanmıştır (Varanasi ve Markey, 1978; Pärt ve Lock, 1983). Kalay ve Canlı (2000), yaptıkları eliminasyon çalışmasında bir süre kurşuna maruz bıraktıkları balıkları kurşun içermeyen ortamlara naklettikten bir süre sonra solungaç dokuda kurşun miktarında azalma gözlemlediklerini, karaciğerde ise aksine birikimin arttığını rapor etmişlerdir. Çalışmamızda yalnızca kurşun içeren ortamlarda tutulan balıkların solungaç dokusundaki kurşun birikim hızı, ikinci 14 günlük periyotta azalma eğiliminde iken aynı periyotta karaciğerde artma eğiliminde olması, araştırma bulgularımızın önceki çalışmalarla paralellik gösterdiğini işaret etmektedir.

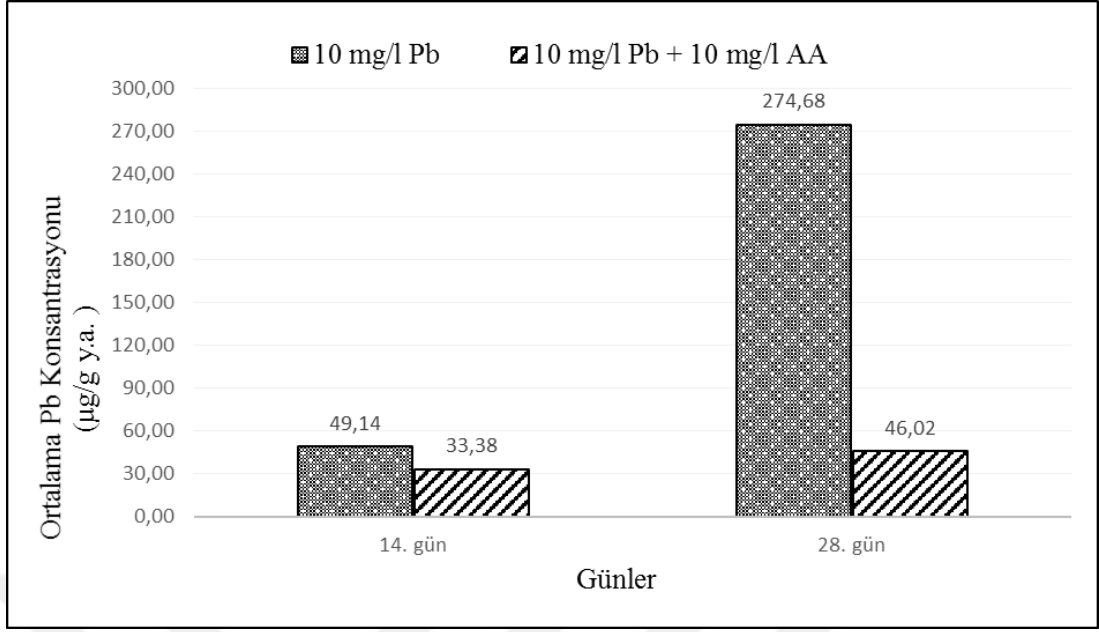
Askorbik asidin, kurşunun ve diğer metallerin karaciğerde gösterdiği birikimin bir sonucu olarak ortaya çıkan genotoksik (Jiraungkoorskul ve ark., 2008), biyokimyasal ve histopatolojik (Wang ve ark., 2007; Kumar ve ark., 2014) hasarları önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir. Ayrıca askorbik asit, şelatlama özelliği gösterdiğinden metalleri bağlayabildiği bildirilmiştir (Flora ve Tandon 1986; Eisler, 1988; Kalia ve Flora, 2005). Kumar ve ark. (2009), *Clarias batrachus* Linnaeus, 1758'un bulunduğu kadmiyum içeren ortamlara askorbik asidin ilave edilmesi durumunda, askorbik asit içeren ortamlarda, karaciğerdeki kadmiyum birikiminin yalnızca kadmiyum içeren ortamlara göre önemli ölçüde daha az gerçekleştiğini rapor etmişlerdir. Çalışmamızda yalnızca kurşun içeren ortamlardaki balıkların karaciğerinde ikinci 14 günlük periyotta birikim hızı artış gösterirken, aynı periyotta kurşun ve askorbik içeren ortamlarda bulunan balıkların karaciğerinde kurşun birikim hızının azalma göstermesinin muhtemel sebebinin askorbik asidin yukarıda bahsedilen özelliklerinden kaynaklandığı, askorbik asidin karaciğerde koruyucu etki yapmış olabileceği düşünülmektedir. Askorbik asidin karaciğerde kurşun birikim miktarını ve hızını etkilediğine işaret eden araştırma bulgularımız önceki çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

Bu çalışmada, tüm ortamlardaki balıkların karaciğer dokusunda kurşun birikiminin zamana bağlı olarak artış gösterdiği, yalnızca kurşun içeren ortamlardaki birikim

düzeşinin kurşun ve askorbik asit içeren ortamlardaki birikim düzeyine göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca araştırma bulgularımız yalnızca kurşun içeren ortamlarda bulunan balıkların karaciğerindeki kurşun birikim hızının ikinci 14 günlük periyotta artış gösterdiğini, kurşun ve askorbik asit içeren ortamlardaki balıkların karaciğerindeki birikim hızının aynı sürede daha az olduğunu göstermekte dolayısıyla askorbik asidin kurşun birikimini engelleyen bir ortam oluşturduğu görüşünü kuvvetlendirmektedir.

Temel olarak sindirimle görevli olan bağırsak aynı zamanda belirli hormonların salgılanması, sıvı emilimi ve detoksifikasyon gibi önemli fonksiyonların yerine getirilmesinde rol oynar (Mumford ve ark., 2007; Allen, 1994). Bağırsakta sindirime uğramış olan besinlerin; kan damarlarına iletilmesi ve sıvıların emilimi sırasında besinlerde bulunan ağır metallerin dolaşım sistemine girerek balığın dokularında birikime sebep olduğu bildirilmiştir (Eisler, 1988). Ağır metallerin vücuda besinler yoluyla değil de su ortamından solungaçlar ve deri vasıtasıyla alınması durumunda da metal birikiminin bağırsakta gerçekleştiği bilinmektedir (Ay ve ark., 1999; Mohamed, 2008, Dai ve ark., 2009; Kaya, 2012).

Çalışmamızda bağırsak dokuda gerçekleşen kurşun birikimi tüm ortamlarda zamana bağlı olarak artmış; kurşuna maruz bırakılan balıkların bağırsaklarında 14. günün sonunda tespit edilen kurşun düzeyi ($49,136 \pm 5,54 \mu\text{g g}^{-1} / \text{y.a.}$) 28.günün sonunda ($274,679 \pm 43,21 \mu\text{g g}^{-1} / \text{y.a.}$) 5,6 kat artarken, kurşun ve askorbik asit içeren ortamlardaki balıklarda 14. günün sonunda belirlenen kurşun düzeyi ($33,384 \pm 3,59 \mu\text{g g}^{-1} / \text{y.a.}$) 28.günün sonunda ($46,017 \pm 6,22 \mu\text{g g}^{-1} / \text{y.a.}$) 1,4 kat artış göstermiştir. İlk ve ikinci 14 günlük periyotlar arasındaki birikim hızları kıyaslandığında yalnızca kurşun içeren ortamlardaki balıkların bağırsak dokusunda birikim hızı yaklaşık %450 artarken, kurşun ve askorbik asit içeren ortamdaki birikim hızı % 65 azalmıştır. İlk 14 günlük periyodun sonunda yalnızca kurşun içeren ortamlardaki balıkların bağırsak dokusunda gerçekleşen birikim düzeyi, kurşun ve askorbik asit içeren ortamlardaki balıklarınkinin yaklaşık olarak 1,5 katı olarak gerçekleşmiştir. İkinci 14 günlük periyottaki birikim düzeyleri kıyaslandığında ise yalnızca kurşuna maruz bırakılan balıklarda gerçekleşen birikim düzeyi, kurşun ve askorbik aside maruz bırakılan balıklardaki birikimin 5,9 katı olarak tespit edilmiştir (Şekil 4,3).



Şekil 4.3 Tilapia bağırsak dokularında Pb birikim düzeylerinin zamana göre değişimi

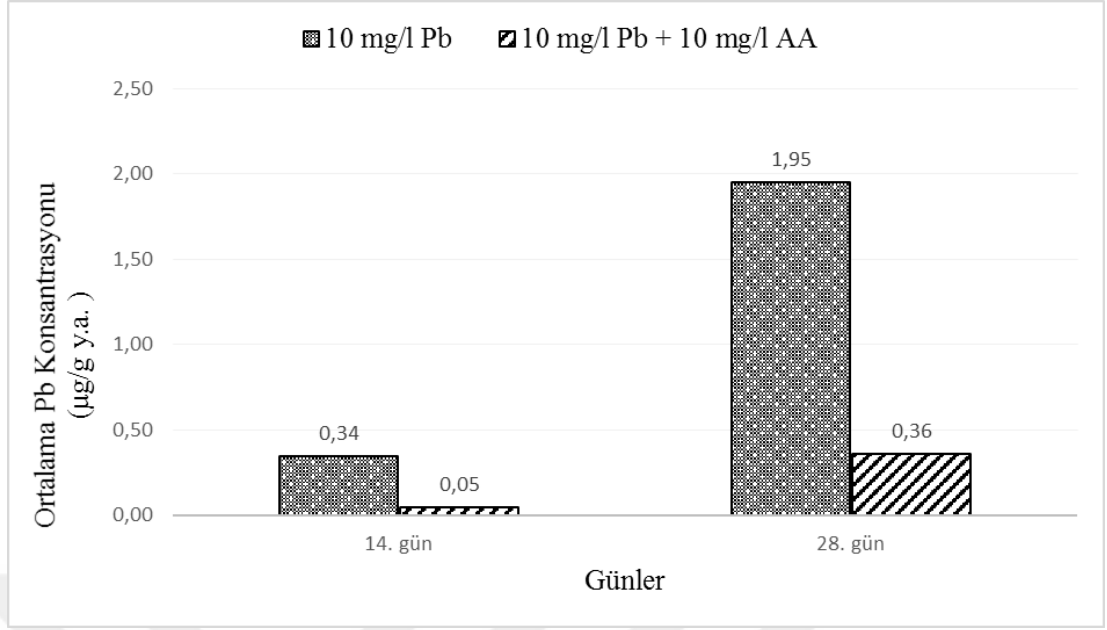
Önceki çalışmalar bağırsakta gerçekleşen kurşun birikiminin zamana bağlı olarak artış gösterdiğini ve diğer dokularla kıyaslandığında en yüksek birikimin bu dokuda meydana geldiğini bildirmektedir (Dai ve ark., 2009; Ahmed ve Bibi, 2010; Kaya 2012). Bazı araştırmacılar metallerin bağırsakta ki birikim düzeyinin çok yüksek olmasının sebebini, bağırsağın metallothionein gibi metal bağlayıcı proteinlerin sentezlenmesi ve detoksifikasyonla görevli organlardan biri olmasıyla açıklamışlardır (Kaya, 2012). Bu çalışmamızın birikim düzeyi ve zaman ilişkisi bulguları önceki çalışmaların bulguları ile benzerlik göstermektedir.

Yalnızca kurşuna maruz bırakılan balıkların bağırsak dokusunda birikim gösteren kurşun birikim hızının, ikinci 14 günlük periyotta katlanarak artış göstermesi, yukarıda bahsedilen solungaç ve karaciğer arasındaki ilişkinin bir benzerinin solungaç ve bağırsak arasında da olduğunu düşündürmektedir. İlk 14 günde solungaçlarda birikim gösteren kurşunun, dolaşım sistemi ile geniş bir damar ağına sahip olan ve metal bağlayıcı proteinlerin sentezlendiği yerlerden biri olan bağırsağa kan yoluyla taşınmış olması muhtemel görülmektedir.

Askorbik asit varlığında kandaki ve bağırsaklarda ki kurşun birikiminin yaklaşık olarak yarı yarıya azaldığı ve toksik etkilerinin zayıfladığı bildirilmiştir (Levander, 1979; De Michelle, 1984; Forbes ve Sanderson, 1978; Hodson ve ark., 1980; Suzuki ve Yoshida 1979; Simon ve Hudes, 1999 ; Eisler, 1988). Araştırma bulgularımız da kurşuna ilave

olarak askorbik asit içeren ortamlarda tutulan balıkların bağırsak dokusunda birikim gösteren kurşun miktarının yalnızca kurşun içeren ortamlardaki balıklara göre ilk 14 günlük periyotta yaklaşık 1,5 kat, ikinci 14 günlük periyotta ise yaklaşık 5,9 kat daha düşük olduğunu göstermektedir. Ayrıca 28 günün sonunda, yalnızca kurşuna maruz bırakılan balıkların bağırsak dokusunda, kurşun birikim hızı artış gösterirken, aynı sürede kurşun ve askorbik aside maruz bırakılan balıkların bağırsak dokularında kurşun birikim hızının azalma göstermesinin, askorbik asidin koruyucu etki yapmış olmasından ve hem solungaç hem de bağırsaktaki absorpsiyonu azaltmış olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Dolayısıyla önceki çalışmaların sonuçları araştırma bulgularımızı desteklemektedir.

Çalışmamızda kurşun ve kurşuna ilave olarak askorbik asit içeren ortamlarda bulunan balıkların gonadlarında kurşun birikimi zamana bağlı olarak artış göstermiş; yalnızca kurşuna maruz bırakılan balıkların gonad dokusunda 14 günde kurşun birikim miktarı ($0,343 \pm 0,05 \mu\text{g g}^{-1} / \text{y.a.}$) 28. günde ($1,952 \pm 0,15 \mu\text{g g}^{-1} / \text{y.a.}$) yaklaşık 5,7 kat artarken, birikim hızı yaklaşık olarak %350 oranında yükselmiştir. Kurşun ve askorbik asit içeren ortamlarda bulunan balıkların gonad dokusunda ise ilk 14 günde biriken kurşun düzeyi ($0,0451 \pm 0,04 \mu\text{g g}^{-1} / \text{y.a.}$) 28. günde ($0,357 \pm 0,07 \mu\text{g g}^{-1} / \text{y.a.}$) yaklaşık 7,9 kat artarken, birikim hızı yaklaşık %690 oranında artış göstermiştir. Yalnız kurşuna maruz bırakılan balıklara ait gonadlardaki kurşun birikiminin kurşun ve askorbik asit içeren ortamlardakilere göre 14. günün sonunda 7,6 kat ve 28.günün sonunda 5,4 kat yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.4).

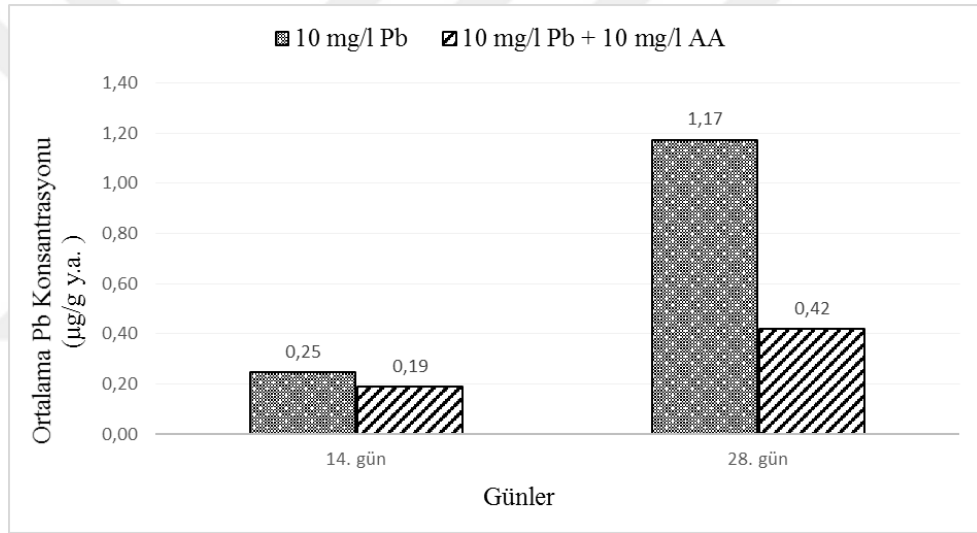


Şekil 4.4 Tilapia gonad dokularında Pb birikim düzeylerinin zamana göre değişimi

Araştırma bulgularımız gonadlarda kurşun birikiminin zamana bağlı olarak arttığını; yalnız kurşun içeren ortamlardaki balıkların gonadlarında biriken kurşun miktarının, kurşun ve askorbik asit içeren ortamlardaki balıkların gonadlarındaki birikim düzeyine göre daha yüksek olduğunu, ancak askorbik asit ilaveli ortamlarda birikim hızının zamanla daha hızlı olarak artmaya devam ettiğini göstermektedir. Adeyemo (2008), kurşuna maruz bırakılan *C. gariepinus* 'un gonadlarında ilk 4 haftada patolojik bir değişime rastlamadığını rapor etmiştir. Allen (1994), gonadların geç gelişim göstermesi durumunda birikimin normalden düşük tahmin edilebileceğini, ortaya çıkan bireysel farklılıkların gonadlardaki birikim düzeylerini güvenilir kılacağını bildirmiştir. Araştırma bulgularımız her ne kadar askorbik asidin gonadlarda koruyucu etki yapmış olabileceğine işaret ediyor olsa da, diseksiyon esnasında gonadların gelişim aşamalarının bireylere göre farklılık gösterdiği tespit edildiğinden; gruplar arası birikim farklılığının, askorbik asit kaynaklı mı olduğu yoksa kurşun ve askorbik aside maruz bırakılan balıkların gonadları geç geliştiği için mi oluştuğundan emin olunamayacağı için gonadların bu çalışma için bir gösterge olamayacağı düşünülmektedir. Çalışma bulgularımız önceki çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

Önceki çalışmalar kas dokunun metal biriktirmede aktif bir doku olmadığını, diğer organlara göre en az metal birikiminin bu dokuda gerçekleştiğini bildirmektedir (Atlı ve Canlı, 2007; Çoğun, 2008; Yılmaz ve ark., 2010; Şahin, 2011).

Diğer dokularla benzer şekilde kas dokuda biriken kurşun miktarı zamana bağlı olarak artış göstermiştir: Yalnız kurşun içeren ortamlardaki balıkların kaslarında 14. günde biriken kurşun düzeyi ($0,248 \pm 0,14 \mu\text{g g}^{-1} / \text{y.a.}$), 28. günde ($1,173 \pm 0,56 \mu\text{g g}^{-1} / \text{y.a.}$) 4,7 kat artarken, birikim hızı yaklaşık % 370 yükselmiştir. Kurşun ve askorbik aside maruz bırakılan balıkların kas dokularında ise ilk 14 günlük periyotta biriken kurşun düzeyi ($0,188 \pm 0,14 \mu\text{g g}^{-1} / \text{y.a.}$) 28. günde ($0,418 \pm 0,26 \mu\text{g g}^{-1} / \text{y.a.}$) 2,2 kat artış gösterirken, birikim yaklaşık olarak % 120 oranında hızlanmıştır. Yalnız kurşun içeren ortamlarda bulunan balıkların kas dokusundaki birikim düzeyi, kurşun ve askorbik asit içeren ortamlardakilere göre ilk 14 günlük periyotta yaklaşık 1,3 kat, ikinci 14 günlük periyotta yaklaşık 2,8 kat yüksek olarak gerçekleşmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Tilapia kas dokularında Pb birikim düzeylerinin zamana göre değişimi

Kas dokuda kurşun birikimini inceleyen birçok araştırmacı, birikimin zamana bağlı olarak artış gösterdiğini bildirmiştir (Blevins ve Pancorbo, 1986; Çoğun, 2008; Şahin, 2011; Kaya, 2012). Önceki çalışmalar, su ortamında bulunan metallerin vücuda solungaçlar ve deri yoluyla alındığını, bu dokulardan zamanla kana geçerek dolaşım sistemine girdiğini ve diğer doku ve organlara kan yoluyla taşındığını göstermektedir (Varanasi ve Markey, 1978; Pärt ve Lock, 1983). Birikim ve eliminasyon çalışmalarında kas dokunun diğer dokulara göre metalleri hem daha az hem de daha yavaş biriktirmesinin yanı sıra, eliminasyonunun da diğer dokulara oranla daha yavaş ve düşük oranlarda gerçekleştiği rapor edilmiştir (Cousins, 1985; Larsson ve ark., 1985; de Conto Cinier ve ark., 1999; Kalay ve Canlı, 2000). Dokulardaki birikim oranlarını belirleyen etmenin

dokunun kanlanma oranı (hematopoetik organ olup olmaması) ve metal bağlayıcı protein sentezleyip sentezlememesi olduğu, kas dokudaki kurşun birikiminin diğer dokulara göre çok daha az gerçekleşmiş olmasının sebebinin ise, kas dokunun diğer dokulara oranla kanlanmasının daha az olması ve metal bağlayıcı proteinlerin sentezlendiği dokulardan biri olmaması olabileceği düşünülmektedir. Araştırma bulgularımız, hem yalnızca kurşuna maruz bırakılan hem de kurşun ve askorbik aside maruz bırakılan balıkların kas dokularında kurşunun zamana bağlı olarak artış göstermesi ve diğer organlara göre daha az birikmesi yönünden önceki çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Heat (1995), esansiyel olmayan metallerin dokulardaki birikiminin, esansiyel metallere göre daha yüksek düzeyde gerçekleştiğini bildirmiştir. Birçok araştırmacı esansiyel olmayan metallerin dokularda daha yüksek oranda birikim göstermesini, balığın bu metallerin seviyesini metabolik olarak ayarlayamamasının bir sonucu olarak açıklamışlardır (Larsson ve ark., 1985; Langston, 1990; Bryan ve Langston, 1992; Heat, 1995). Ağır metallerin farklı dokulardaki birikim oranlarının farklılık göstermesi, her doku için metal metabolizmasının spesifik bir rol geliştirmiş olması (de Conto Cinier ve ark., 1999) ve dokuların fizyolojik işlevlerinin farklı olmasından kaynaklandığı rapor edilmiştir (Stripp ve ark., 1990; Kargin ve Erdem, 1992; Anderson ve ark., 1997). Çoğun (2008), yaptığı bir çalışma sonucunda *O. niloticus* ve *C. carpio*'da bakır birikim sıralaması karaciğer > solungaç > kas iken, kurşun birikiminin solungaç > karaciğer > kas olarak gerçekleştiğini bildirmiştir. Kaya (2012), *O. mosambicus*'un dokularındaki kurşun birikiminin bağırsak > solungaç > karaciğer > kas sıralamasına göre gerçekleştiğini tespit etmiştir.

Askorbik asitin koruyucu etkilerini ortaya koymak için yapılan çok sayıda çalışmada, askorbik asit balıklara genellikle beslenme yoluyla uygulanmış (Eisler, 1988; Wang ve ark., 2007; Dai ve ark., 2009; Mirmazloomi ve ark., 2015), ancak balığın bulunduğu su ortamına askorbik asit eklenerek az sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir (Parihar ve Dubey, 1995; Kumar ve ark., 2009,2014). Askorbik asitin besin yoluyla vücuda alım mekanizması bilinmesine rağmen (Dabrowski, 2000), su ortamından solungaçlar ve deri yolu ile vücuda alınıp alınmadığını net bir şekilde bildiren bir literatüre rastlanmamıştır. Ancak yapılan bazı çalışmalarda analiz edilen solungaç dokuda askorbik asitin bulunduğu, balığın toksikanta maruz kalması durumunda dokudaki askorbik asit rezervinin azaldığı bildirilmiş, askorbik asitin ortamda bulunmasının toksik

maddelerin etkilerini azalttığı rapor edilmiştir (Parihar ve Dubey, 1995; Abdel-Tawwap ve ark., 2004; Kalia ve Flora, 2005). Ayrıca balıklarda da memelilerdeki alım yoluna benzer şekilde askorbik asitin (beslenme yoluyla alınan) epitel hücrelerin mebranlarından absorbe edilerek alındığı bildirilmiştir (Maffia ve ark., 2000). Bu bilgiler ışığında su ortamına eklenen askorbik asitin solungaç ve/veya deri epiteli yoluyla vücuda alınımının ihtimal dahilinde olduğu söylenebilir.

Yapılan çalışmalar ortamdaki askorbik asit varlığının kurşun alımını azalttığını göstermektedir (Eisler, 1988; Fischer ve ark., 1988; Goyer ve ark., 1995; Kalia ve Flora, 2005). Araştırma bulgularımızın kurşuna ilave olarak askorbik asit içeren ortamlarda bulunan balıkların kaslarındaki kurşun miktarının hem 14.günde hem de 28. günde yalnızca kurşun içeren ortamlardaki balıklara göre önemli oranda daha düşük olduğunu göstermesi, askorbik asidin koruyucu etki yaptığını işaret etmekte ve önceki çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

4.2. Histopatolojik İncelemeler

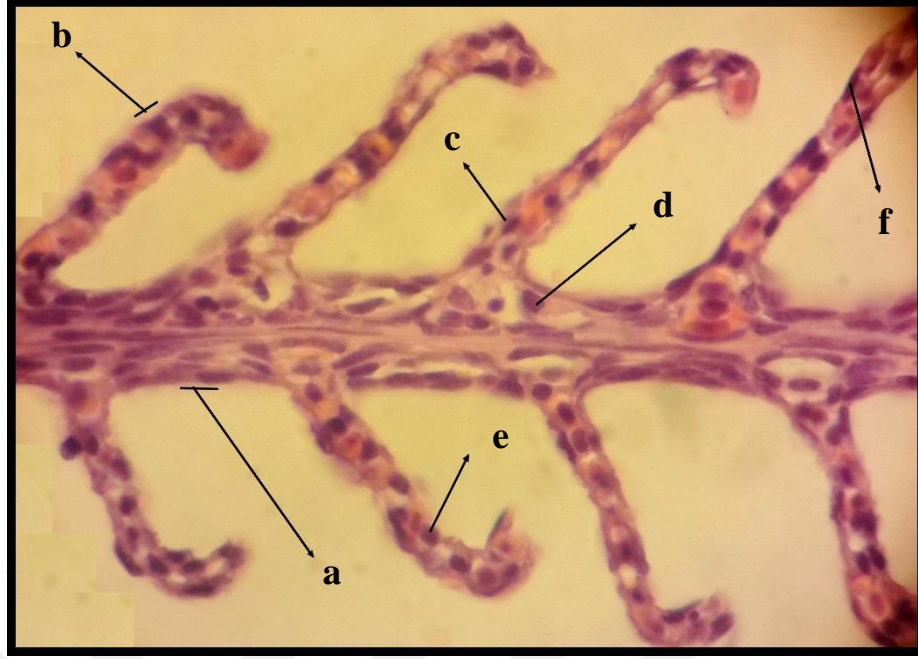
Yapılan bu çalışmada 10 mg/l Pb²⁺'ye 14 gün (A grubu), 28 gün (B grubu), 10 mg/l Pb²⁺ + 10 mg/l AA 'ya 14 gün (C grubu) ve 28 gün (D grubu) maruz bırakılan balıkların solungaç, karaciğer, bağırsak, kas ve gonad dokuları histopatolojik yönden incelenmiştir. Kas doku ve gonadlar hariç diğer dokularda patolojik değişimler meydana geldiği gözlemlenmiş, meydana gelen değişimlere ait kalitatif değerlendirmeler Çizelge 4.4 te verilmiştir.

Çizelge 4.4 Dokularda meydana gelen histopatolojik değişimlere ait kalitatif değerlendirme çizelgesi*

		Gruplar			
		A Grubu	B Grubu	C Grubu	D Grubu
Doku	Histopatolojik Değişim	10 mg/l Pb ²⁺ (14 gün)	10 mg/l Pb ²⁺ (28 gün)	10 mg/l Pb ²⁺ 10 mg/l AA (14 gün)	10 mg/l Pb ²⁺ 10 mg/l AA (28 gün)
Solungaç					
	Epitel Ayrılma	-	+++	-	+
	Hiperplazi	++	+++	+	++
	Anevrizma	++	++	++	++
	Lamellar Füzyon	++	+++	-	-
	Ödem	++	+++	+	++
Karaciğer					
	Bozuk Şekilli Nükleuslar	++	+++	+	-
	Vakuolar Dejenerasyon	+	+++	-	-
	Piknotik Nükleus	+	++	-	-
	Karyorektik Nükleus	+++	+++	-	-
	Nekroz	++	+++	+	+
Bağırsak	EGC Sayısında Artış	+++	+++	+	+
Gonad	Histopatolojik Bulgu Yok	-	-	-	-
Kas	Histopatolojik Bulgu Yok	-	-	-	-

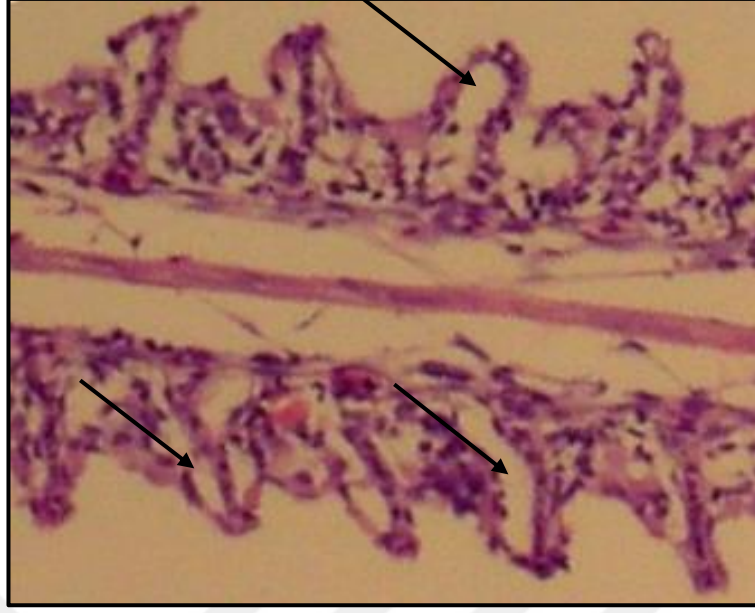
* -,yok; +, düşük; ++, yoğun; +++, çok yoğun

Kontrol grubunda bulunan balıkların solungaç dokuları incelendiğinde sağlıklı ve normal görünümde oldukları gözlemlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 Kontrol grubu solungaç histolojisi (longitudinal kesit) (orijinal): (a) primer lamel; (b) sekonder lamel; (c) eritrosit; (d) klorid hücresi; (e) pilaster hücresi; (f) epitel hücreninin nükleusu

İncelenen histolojik kesitlerde, A ve C gruplarında (Çizelge 4.4) bulunan balıkların solungaçlarında 14. güne kadar epitel ayrılmanın gözlemlenmediği, 14.günde solungaç dokuda ödemlerin oluştuğu, daha sonra ödemli bölgelerde epitel ayrılmanın meydana geldiği belirlenmiştir. Bu nedenle epitel ayrılmanın ödem oluşumunu takiben ortaya çıktığı düşünülebilir. 28 gün Pb^{2+} ortamında bulunan balıklar (B grubu) ile aynı sürede Pb^{2+} + AA ortamında bulunan balıkların (D grubu) solungaç dokuları karşılaştırıldığında, askorbik asit içermeyen ortamlardaki balıkların dokularında epitel ayrılmanın çok daha yoğun olduğu, askorbik asitli ortamda ise epitel ayrılmanın daha az gözlemlendiği, dolayısıyla askorbik asidin epitel ayrılmaya karşı koruyucu etki yaptığı düşünülebilir (Şekil 4.7).

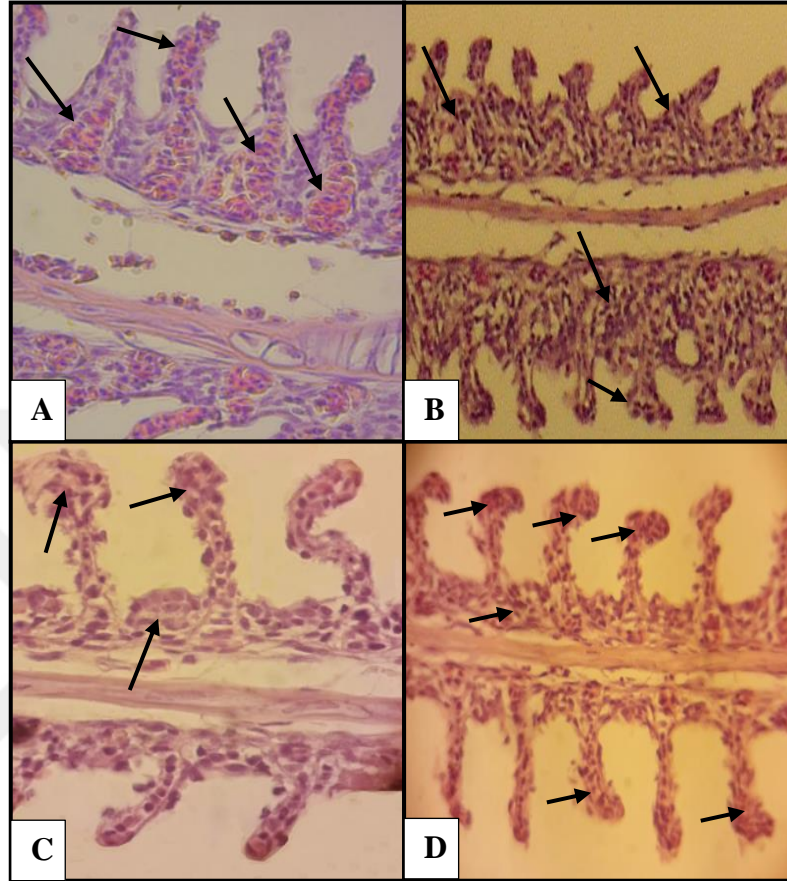


Şekil 4.7 10 mg/l Pb²⁺'ye 28 gün boyunca maruz bırakılan balıkların (B grubu) solungaç dokusunda belirlenen yoğun epitel ayrılma (orijinal)

Bu çalışmada gözlemlenen epitel ayrılma bulgularına benzer şekilde; 96 saat boyunca 24 ve 71 mg/l kurşun konsantrasyonlarına ve 20 ve 40 mg/l hexavalent kroma maruz bırakılan *P. lineatus* ve *C. punctata*'nın solungaç dokularında 4. günde epitel ayrılma gözlemlendiği bildirilmiştir (Martinez ve ark., 2004; Mishra ve Mohanty, 2008). Belirtilen bu iki çalışmada da epitel ayrılma daha erken gerçekleşirken, kurşuna maruz bıraktığımız tilapialarda 14.günde gerçekleşmiştir. Epitel ayrılma süresindeki bu farkın uygulanan metal derişimlerinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Histopatolojik incelemelerde 10 mg/l Pb²⁺ içeren ortamlarda ki balıkların solungaçlarında 14. günde (A grubunda) yoğun hiperplazi gözlemlenmiştir (Şekil 4.8 A). 28 gün aynı derişime maruz kalan balıklarda da (B grubunda) çok yoğun hiperplaziye rastlanması sebebiyle, kurşuna maruz kalma süresi arttıkça hiperplazi yoğunluğunun süreye paralel olarak artış gösterdiği sonucuna varılmıştır (Şekil 4.8 B). En düşük yoğunlukta hiperplaziye 10 mg/l Pb²⁺ ve AA içeren ortamlardaki balıklarda (C grubunda) rastlanmıştır (Şekil 4.8 C). A grubu ile C grubu kıyaslandığında aralarındaki hiperplazi yoğunluğu farkının ortamda bulunan askorbik asitten kaynaklandığı, bu durumda askorbik asidin koruyucu etki yapmış olabileceği düşünülmektedir. 10 mg/l Pb²⁺ ve AA içeren ortamlardaki balıklarda (D grubunda) görülen hiperplazi yoğunluğu (Şekil 4.8 D) A ve B gruplarına göre daha az, C grubuna göre biraz daha fazladır. Bu durum, kurşun

toksisitesinin söz konusu olduğu ortamlarda askorbik asidinde bulunması halinde hiperplazi oluşumunu yavaşlattığını işaret etmektedir (Şekil 4.8).

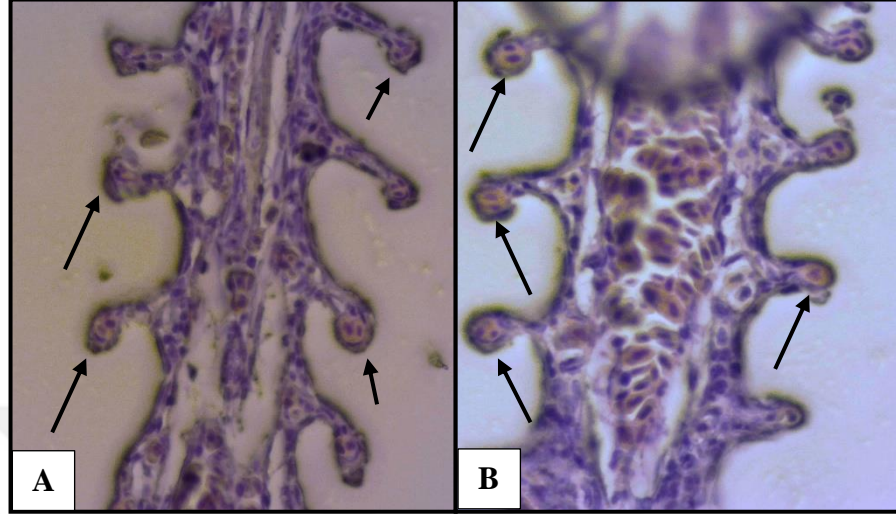


Şekil 4.8 Solungaç doku hiperplazi oluşumu (orijinal); (A) 10 mg/l Pb²⁺'ye 14 gün maruz kalan grup (A grubu), (B) 10 mg/l Pb²⁺'ye 28 gün maruz kalan grup (B grubu), (C) 10 mg/l Pb²⁺ ve 10 mg/l AA'ya 14 gün maruz kalan grup (C grubu), (D) 10 mg/l Pb²⁺ ve 10 mg/l AA'ya 28 gün maruz kalan grup (D grubu)

Kurşun toksisitesinin bir sonucu olarak farklı balık türlerinde hiperplaziye rastlandığı bildirilmiş olup (Abd El-Gawad, 1999; Martinez ve ark., 2004; Palaniappan ve ark., 2008; Mobarak ve Sharaf, 2011), bu durum solungaçlarda gözlemlediğimiz hiperplazi bulgularımızla paralellik göstermektedir. Cruz ve ark. (1988), lamellar füzyon ile sonuçlanan hiperplazinin bazı filamentlerde solunum yüzey alanını önemli ölçüde azalttığını rapor etmişlerdir. Histolojik kesitlerimize ait Şekil 4.8'deki görüntüler incelendiğinde bulgularımız önceki çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Histopatolojik incelemelerimizde kontrol grubu haricindeki tüm gruplarda yoğun

olarak anevrizmalar ve solungaç lamellerinde kıvrımlara rastlanmış (Şekil 4.9), ancak çok şiddetli seyretmediği gözlemlenmiştir.

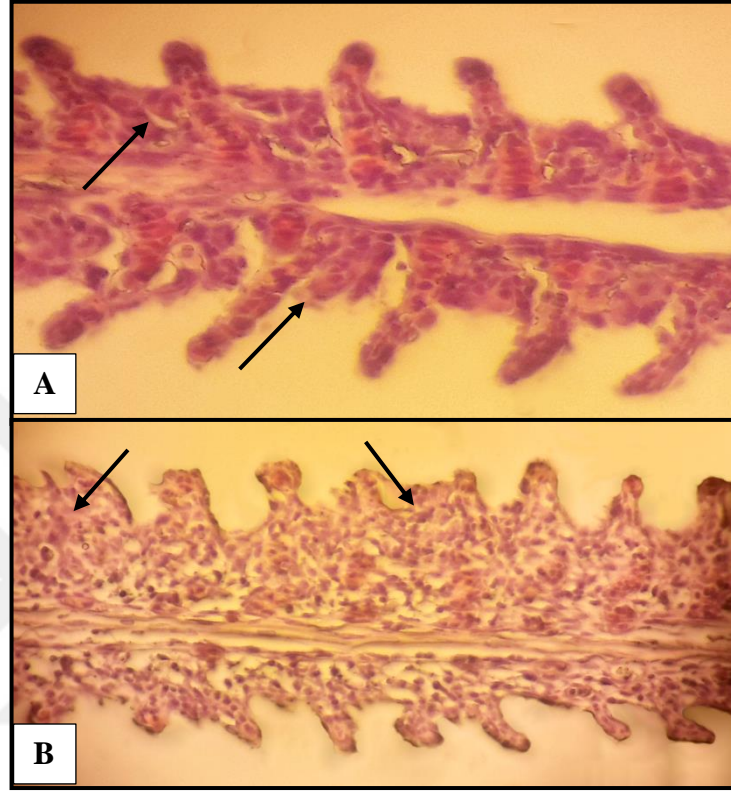


Şekil 4.9 Solungaç dokuda meydana gelen anevrizmalar (orijinal); (A) 10 mg/l Pb²⁺'ye 14 gün maruz kalan grup (A grubu), (B) 10 mg/l Pb²⁺ ve 10 mg/l AA'ya 28 gün maruz kalan grup (D grubu)

Çalışmamızda tüm gruplarda rastladığımız anevrizma, ağır metal toksisitesi çalışmalarında solungaçlarda sıklıkla karşılaşılan bir patolojik değişimdir (Karlsson-Norrgren ve ark., 1986; Randi ve ark., 1996; Arellano ve ark., 1999; Visoottiviseth ve ark., 1999; Van Heerden ve ark., 2004). Figueiredo-fernandes ve ark. (2007) 21 gün boyunca bakıra maruz bıraktıkları *O. niloticus*'un solungaç lamellerinde anevrizmaya rastladıklarını bildirmişlerdir. Benzer bulgular *Lates calcarifer* Bloch, 1790'i kadmiyuma maruz bırakan Tophon ve ark. (2003) ve *O. niloticus*'un kadmiyum toleransını inceleyen Garcia-Santos ve ark. (2006) tarafından da gözlemlenmiştir. Garcia-Santos ve ark. (2006) anevrizmanın oluşmasında pillar hücre sisteminin çökmesine sebep olan etmenin lamellar ekseninde meydana gelen vazodilatasyon olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Kurşun toksisitesinin histopatolojik etkilerinin belirlenmesine yönelik önceki çalışmalarda tespit edilen anevrizmalar ile araştırmamızda belirlenen sonuçlar benzerlik göstermektedir (Martinez ve ark., 2004; Olojo ve ark., 2005).

Histopatolojik incelemelerimizde belirlediğimiz hiperplazinin görülme yoğunluğuna paralellik gösterir biçimde; A grubunda yoğun olarak, B grubunda ise çok yoğun olarak lamellar füzyona rastlanmıştır (Şekil 4.10). Kurşuna maruz kalma süresi

arttıkça lamellar füzyonun şiddeti de artış göstermiştir. Hiperplazinin düşük sıklık ve şiddette görüldüğü C ve D gruplarında lamellar füzyon oluşmadığı gözlemlenmiştir. Ortamda bulunan askorbik asidin C ve D gruplarında hiperplazinin şiddetli seyretmesini önlediği bu yüzden lamellar füzyonun oluşmadığı olarak değerlendirilebilir.

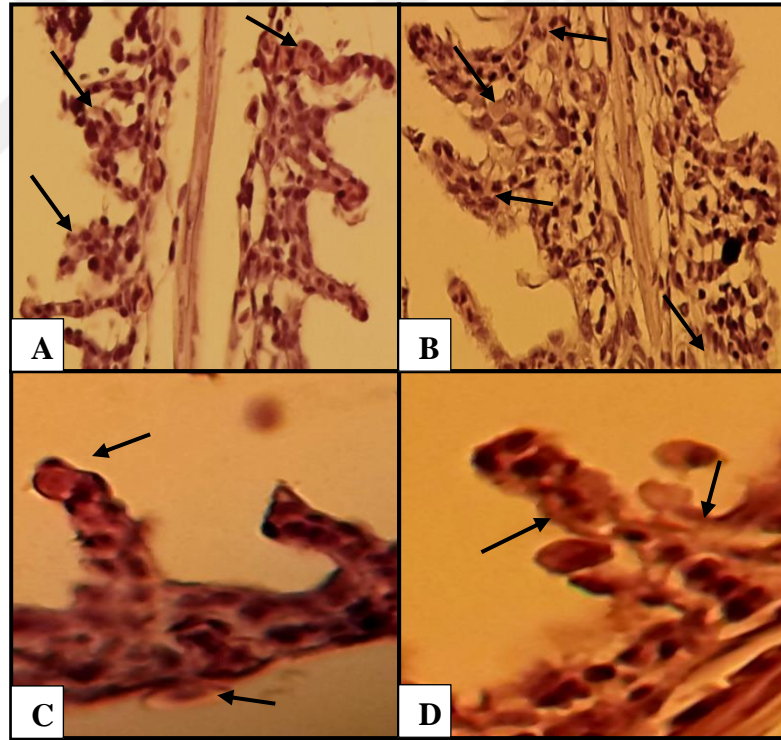


Şekil 4.10 Solungaç dokuda gözlemlenen lamellar füzyon (orijinal); (A) 10 mg/l Pb²⁺'ye 14 gün maruz kalan grup (A grubu), (B) 10 mg/l Pb²⁺'ye 28 gün maruz kalan grup (B grubu)

Alazemi ve ark. (1996) krom metalinin *Gnathonemus petersii* Günther, 1862'nin solungaç dokusunda hiperplaziye sebep olduğunu ve sekonder lameller arasında birkaç hücrenin köprü oluşturarak lamellar füzyonu başlattığını gözlemlemişler, lamellar füzyonun düzensiz bir dağılım gösterdiğini; bazen sadece 2 lameli birleştirdiğini bazen ise birçok lamelin kaynaşmasına sebep olarak solunum yüzey alanının iyice daraldığını tespit etmişlerdir. Krom bileşiklerinin benzer histopatolojik etkileri *O. mykiss* ile yapılan toksisite çalışmalarında da gözlemlenmiştir (Van der Putte ve ark., 1981, Van der Putte ve ark., 1982; Temmink ve ark., 1983; Mishra ve Mohatny, 2008). Bakır bileşiklerinin de lamellar füzyon oluşumuna sebep olduğu Arellano ve ark. (1999) ve Van Heerden ve ark.

(2004) tarafından rapor edilmiştir. Benzer bulgular, kurşun toksisitesinin de bir sonucu olarak bir çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Abd El-Gawad, 1999; Martinez ve ark., 2004; Alvarado ve ark., 2006; Adeyemo, 2008; Palaniappan ve ark., 2008; Mobarak ve Saharaf, 2011). Çalışmamızda hiperplazinin lamellar füzyon oluşumuna neden olduğu ve dolayısıyla solunum yüzey alanını daralttığı önceki çalışmaların benzer bulguları ile desteklenmektedir.

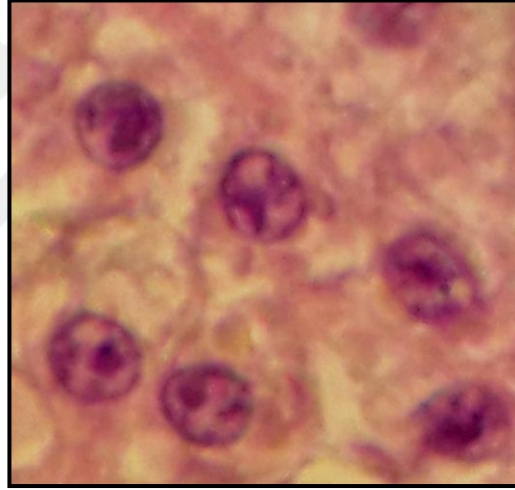
14 gün sonunda A grubunda solungaçlarda yoğun olarak dağılım gösteren ödem oluşumu (Şekil 4.11 A), kurşuna maruz kalma süresinin artmasıyla birlikte artış göstermiş, 28 günün sonunda B grubunda çok yoğun olarak gözlemlenmiştir (Şekil 4.11 B). Ödem oluşumuna A grubunda yoğun olarak rastlanırken C grubunda ödemin düşük yoğunlukta seyretmesi (Şekil 4.11 C), benzer şekilde B grubunda çok yoğun olan ödemin D grubunda daha seyrek görülmesi (Şekil 4.11 D) askorbik asidin ödem oluşumunda olumlu etki yapmış olabileceğini göstermektedir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 Solungaç dokuda ödem oluşumu (orijinal) ; (A) 10 mg/l Pb²⁺'ye 14 gün maruz kalan grup (A grubu), (B) 10 mg/l Pb²⁺'ye 28 gün maruz kalan grup (B grubu), (C) 10 mg/l Pb²⁺ ve 10 mg/l AA'ya 14 gün maruz kalan grup (C grubu), (D) 10 mg/l Pb²⁺ ve 10 mg/l AA'ya 28 gün maruz kalan grup (D grubu)

Tophon ve ark. (2003), solungaç epitelinde ortaya çıkan ödemin çoğu zaman ilk patolojik bulgu olduğunu bildirmişlerdir. Mallat (1985), ödemin ağır metale maruz kalma durumunda ortaya çıkan temel patolojik değişimlerden biri olduğunu rapor etmiştir. Bu çalışma ile tespit edilen ödem bulgusu, önceki çalışmalar ile benzerlik göstermektedir (Alazemi ve ark., 1996; Karan ve ark., 1998; Olojo ve ark., 2005; Figueiredo-fernandes ve ark., 2007; Osman ve ark., 2009). Ayrıca çalışmamızda solungaç epitelinde ödemin görülme sıklığı ile hiperplazinin görülme sıklığının birbirine çok yakın seyretmesi bulgusu Yang ve Albright (1992) tarafından da bildirilmiştir.

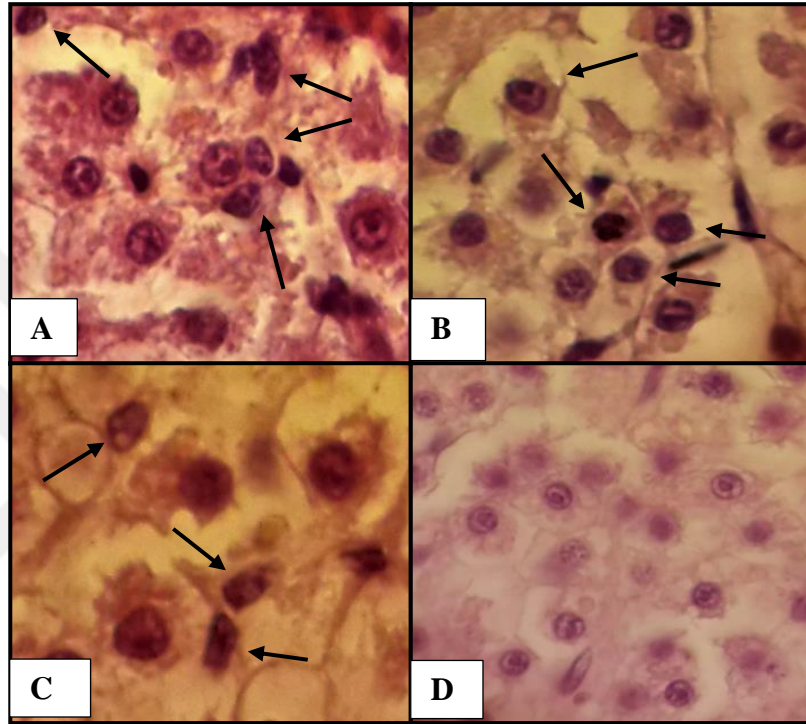
Kontrol grubunda bulunan balıkların karaciğer dokuları incelendiğinde hepatosit hücrelerinin normal ve sağlıklı görünümde olduğu, nükleuslarının yuvarlak ve sentrik olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 Kontrol grubu sağlıklı karaciğer histolojisi; yuvarlak ve sentrik şekilli nükleuslar (orijinal)

Bozuk şekilli nükleuslara 14 gün süreyle kurşun metali iyonlarına maruz kalan A grubu balıkların karaciğer dokularında yoğun, 28 gün sonunda B grubunda çok yoğun olarak rastlanmıştır. Askorbik asitli ortamlarda C grubunda seyrek olarak bozuk şekilli nükleuslara rastlanırken, D grubunda ise bozuk şekilli nükleuslar gözlemlenmemiştir (Şekil 4.13). A ve B grupları karşılaştırıldığında kurşunun hepatosit hücrelerinde sebep olduğu hasarın, maruz kalma süresinin artmasıyla artış gösterdiği görülmektedir. A ve C grupları karşılaştırıldığında ise askorbik asit içeren ortamlarda bulunan balıkların karaciğer hücrelerinde bozuk şekilli nükleuslara daha az rastlanmasının askorbik asidin

hücrelerin hasara uğramasını önleyici rol oynadığını söylemek mümkündür. A ve B grupları kıyaslandığında zamanla hücre hasarlarının arttığı gözlemlenirken, C ve D gruplarında bozuk şekilli nükleusların görülme sıklığının azalma eğiliminde olmasının, askorbik asidin dokunun hasara uğramasını önlediğini aynı zamanda yenilenmesine katkıda bulunmuş olabileceğini işaret etmektedir.

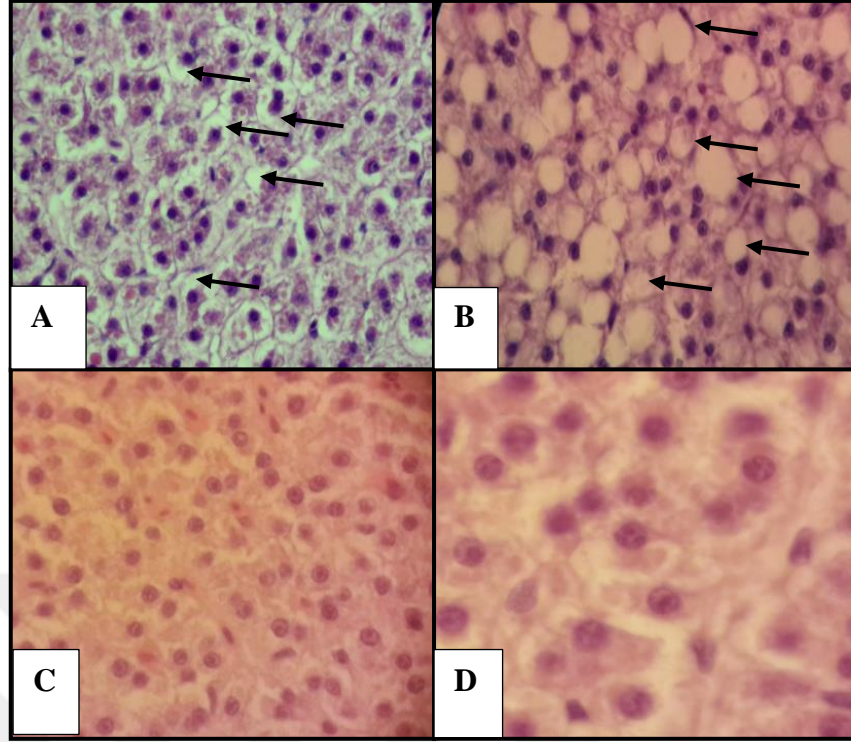


Şekil 4.13 Karaciğer dokusu bozuk şekilli nükleuslar (orijinal); (A) 10 mg/l Pb²⁺’ye 14 gün maruz kalan grup (A grubu), (B) 10 mg/l Pb²⁺’ye 28 gün maruz kalan grup (B grubu), (C) 10 mg/l Pb²⁺ ve 10 mg/l AA’ya 14 gün maruz kalan grup (C grubu), (D) 10 mg/l Pb²⁺ ve 10 mg/l AA’ya 28 gün maruz kalan grup (D grubu)

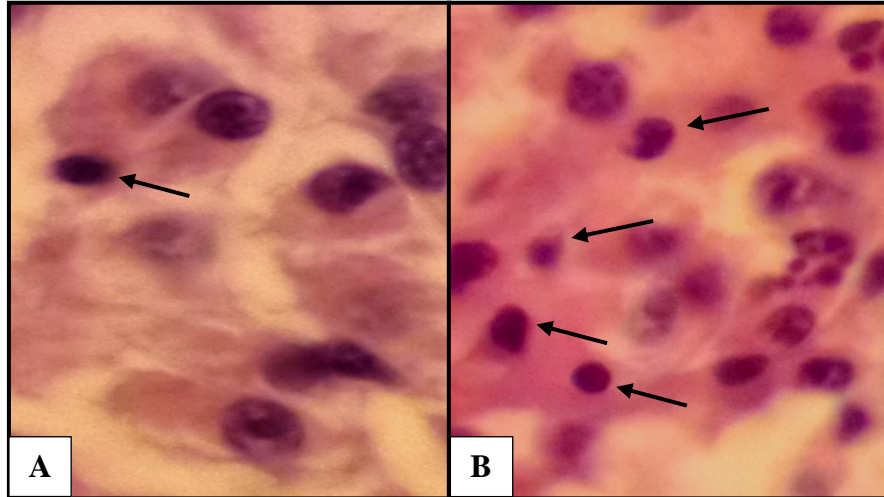
Histopatolojik incelemelerimizde saptanan, karaciğerdeki hepatosit hücrelerinin nükleuslarının küresel şeklini kaybetmesi ve küçülmesi bulguları, organofosfor toksisitesinin meydana getirdiği histopatolojik değişimleri belirlemiş olan Fanta ve ark. (2003), kadmiyumun benzer etkilerini gözlemlediklerini bildiren Morsy ve Protasowicki (1990) ve Younis ve ark. (2013), çinkonun *O. niloticus*’un karaciğerinde meydana getirdiği patolojik değişimleri inceleyen Abdel-Warith ve ark. (2011)’nin araştırma bulguları ile paralellik göstermektedir.

Çalışmamızda kurşun toksisitesine maruz kalan balıkların karaciğer dokularında A grubunda seyrek ve B grubunda çok yoğun olarak vakuolar dejenerasyona rastlanmıştır (Şekil 4.14 A-B). A ve B grupları karşılaştırıldığında kurşunun toksik etkisinden dolayı 14. günde gözlemlenen vakuolar dejenerasyon kurşuna maruz kalma süresinin artmasıyla birlikte artış göstermiştir. Deltamethrinin *O. niloticus* ta meydana getirdiği patolojileri inceleyen Yıldırım ve ark. (2006) da hepatosit hücrelerinde vakuolar dejenerasyona rastladıklarını bildirmişlerdir. Vakuolar dejenerasyonun Nil Nehri'ndeki ağır metal kirliliği çalışmalarında *O. niloticus* (El-Naggar ve ark., 2009) ve *T. zilli* (İbrahim ve Mahmoud, 2005)'de de görüldüğü önceki çalışmalarda rapor edilmiştir. Kurşunun *C. gariepinus* (Ali ve ark., 2003) ve *O. niloticus* (Osman ve ark., 2009)'un karaciğerinde oluşturduğu dokusal hasarı belirlemeyi amaçlayan çalışmalarda da bizim çalışmamıza paralel olarak vakuolar dejenerasyon gözlemlendiği bildirilmiştir. Askorbik asit ilave edilmiş ortamlarda, C ve D gruplarında vakuolar dejenerasyon gözlemlenmemiştir (Şekil 4.14 C-D). Kumar ve Nandan (2014) bakıra maruz bıraktıkları *Anabas testudineus* (Bloch, 1792)'ların karaciğer hücrelerinde vakuolar dejenerasyona rastladıklarını bildirmiş, su ortamına ilave edilen askorbik asidin pozitif etki yaparak dejenerasyonu azalttığını rapor etmişlerdir. Çalışmamızda benzer şekilde C ve D gruplarında vakuolar dejenerasyon gözlemlenmemesinin muhtemel sebebinin askorbik asidin hücrelerin korunmasına katkıda bulunması olabileceği düşünülmektedir.

Piknozis evresinde; koyulaşan, küçülen ve çöküş gösteren piknotik bir nükleus gözlemlenir. Bu çalışmada A grubunda düşük yoğunlukta (Şekil 4.15 A) ve B grubunda daha yoğun olarak piknotik nükleuslara rastlanmıştır (Şekil 4.15 B). Bunun sebebinin kurşuna maruz kalma süresi arttıkça apoptozis belirtisi olarak ortaya çıkan piknozisin artış göstermesi olduğu düşünülmektedir. Askorbik asit içeren ortamlar olan C ve D gruplarında piknotik nükleuslar gözlemlenmemiştir (Şekil 4.15 C-D). Ortamda bulunan askorbik asidin, kurşunun toksik etkilerini azaltarak hücrelerde apoptoz sinyali oluşmasını önlediği bu yüzden piknotik çekirdeklerin görülmemiş olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.14 Karaciğer dokusu vakuolar dejenerasyon (orijinal); (A) 10 mg/l Pb^{2+} 'ye 14 gün maruz kalan grup (A grubu), (B) 10 mg/l Pb^{2+} 'ye 28 gün maruz kalan grup (B grubu), (C) 10 mg/l Pb^{2+} ve 10 mg/l AA'ya 14 gün maruz kalan grup (C grubu), (D) 10 mg/l Pb^{2+} ve 10 mg/l AA'ya 28 gün maruz kalan grup (D grubu)



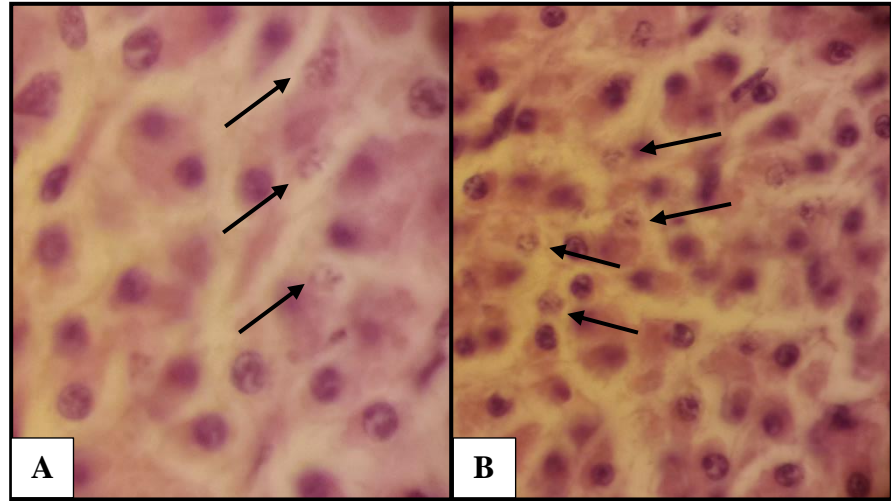
Şekil 4.15 Karaciğer dokusu piknotik nükleuslar (orijinal); (A) 10 mg/l Pb^{2+} 'ye 14 gün maruz kalan grup (A grubu), (B) 10 mg/l Pb^{2+} 'ye 28 gün maruz kalan grup (B grubu)

Balıkların bakır bileşiklerine maruz kalması sonucunda karaciğerde bazı patolojik değişimlerin meydana geldiği önceki çalışmalarda rapor edilmiş, piknotik nükleus

bulgusunun sıklıkla karşılaşılan patolojik değişimlerden biri olduğu bildirilmiştir (Figueiredo-fernandes ve ark., 2007; Osman ve ark., 2009). Bir çok araştırmacı, çinko (Abdel-Warith ve ark., 2011), krom (Mishra ve Mohanty, 2008), kadmiyum (Younis ve ark., 2013) ve kurşun (Rabitto ve ark., 2005; Mobarak ve Sharaf, 2011) ile yaptıkları çalışmalarda hepatosit hücrelerinde piknozise rastladıklarını bildirmişlerdir. Kurşunda dahil olmak üzere bir çok ağır metalin hepatosit hücrelerinde piknotik nükleusların oluşmasına neden olduğunu bildiren önceki çalışmalar, benzer bulguların tespit edildiği bu çalışmamızı desteklemektedir.

Piknozis evresini takiben ortaya çıkan karyorekzis evresinde, yoğunlaşmış olan nükleusun membranı parçalanır ve nükleusun içerdiği kromatin, hücre sitoplazması içerisine düzensiz olarak dağılır (Zamzami ve Kroemer, 1999).

Çalışmamızda kurşun içeren ortamlardaki A ve B gruplarında çok yoğun olarak karyorektik nükleuslara rastlanırken, kurşun ve askorbik asit içeren ortamlardaki C ve D gruplarında karyorektik nükleuslar gözlemlenmemiştir (Şekil 4.16). Bunun nedeni askorbik asidin, kurşunun toksik etkilerini azaltarak, detoksifikasyon organı olan karaciğerde bulunan hepatosit hücreleri üzerinde koruyucu etki yapması olarak düşünülebilir.



Şekil 4.16 Karaciğer dokusu karyorektik nükleuslar (orijinal); (A) 10 mg/l Pb²⁺'ye 14 gün maruz kalan grup (A grubu), (B) 10 mg/l Pb²⁺'ye 28 gün maruz kalan grup (B grubu)

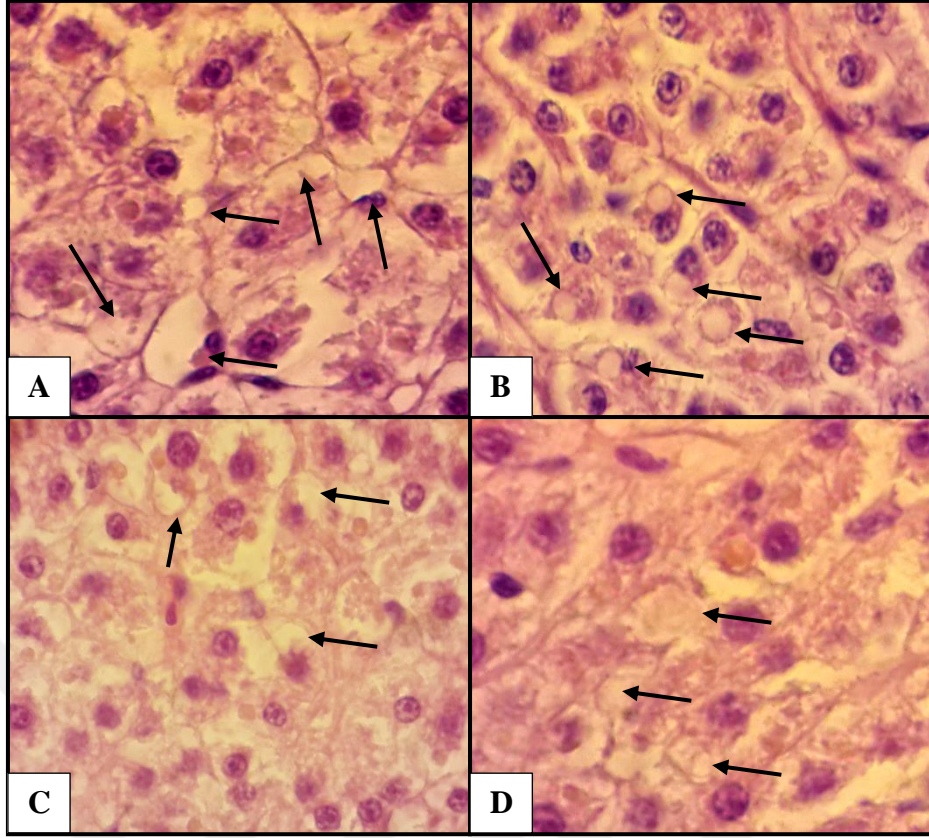
Farklı toksikantların balıklarda hepatosit hücrelerinde karyorekzise neden olduğu

bilinmektedir (Hinton ve ark., 1992; Visoottiviseth ve ark., 1999; Yıldırım ve ark., 2006). Jiraungkoorskul ve ark. (2003) kurşun toksisitesinin de karaciğerde karyorektik nükleusların ortaya çıkmasına yol açtığını rapor etmişlerdir. Kurşunun karyorektik nükleusların oluşumunu tetiklediğini gösteren araştırma bulgularımız önceki çalışmaların bulguları tarafından desteklenmektedir.

Wang ve ark. (2007), balıkların kurşun bileşiklerine maruz kalması durumunda, askorbik asidin karaciğer hücrelerinde apoptozisin görülme sıklığında önemli bir azalma sağladığını bildirmişlerdir. Yapmış olduğumuz bu çalışmada, askorbik asit uygulanan gruplarda apoptozisin piknozis ve karyorekzis aşamalarına rastlanmaması Wang ve ark. (2007)'nin araştırma bulguları ile paralellik göstermektedir.

Bu çalışmada kurşun toksisitesi sonucu A grubunda yoğun olarak nekroz görülürken, B grubunda çok yoğun olarak saptanmıştır. Kurşuna maruz kalma süresi arttıkça nekroz yoğunluğunun artış gösterdiği tespit edilmiştir. Ortama askorbik asit ilave edilmesi sonucunda C ve D grupları incelendiğinde düşük yoğunlukta nekroza rastlanmıştır (Şekil 4.17). A-B ve C-D ortamları arasında ortaya çıkan nekroz yoğunluk farkının ortamda bulunan askorbik asidin nekroz oluşumuna karşı hücrelerde koruyucu etki yapmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Önceki çalışmalarda bakır (Figueiredo-fernandes ve ark., 2007) ve kadmiyumun (Younis ve ark., 2013) *O. niloticus*'un hepatosit hücrelerinde nekroze odaklar meydana getirdiği bildirilmiştir. Bakır ve kadmiyum toksisitesine benzer şekilde kurşununda karaciğerde nekroz oluşumuna neden olduğu *P. latipinna* (Mobarak ve Sharaf, 2011), *C. gariepinus* (Olojo ve ark., 2005), *Hoplias malabaricus* Bloch, 1794 (Rabitto ve ark., 2005) ve *O. niloticus* (Osman ve ark., 2009) ile yapılan çalışmalardan rapor edilmiştir. Önceki çalışmalarda ağır metal toksisitesinin bir göstergesi olarak ortaya çıktığı bildirilen nekroz bulgusu bizim çalışmamızda da gözlemlenmiş olup, araştırma bulgularımız önceki çalışmaların bulguları ile paralellik göstermektedir.



Şekil 4.17 Karaciğer dokusu nekroz oluşumu (orijinal); (A) 10 mg/l Pb^{2+} 'ye 14 gün maruz kalan grup (A grubu), (B) 10 mg/l Pb^{2+} 'ye 28 gün maruz kalan grup (B grubu), (C) 10 mg/l Pb^{2+} ve 10 mg/l AA'ya 14 gün maruz kalan grup (C grubu), (D) 10 mg/l Pb^{2+} ve 10 mg/l AA'ya 28 gün maruz kalan grup (D grubu)

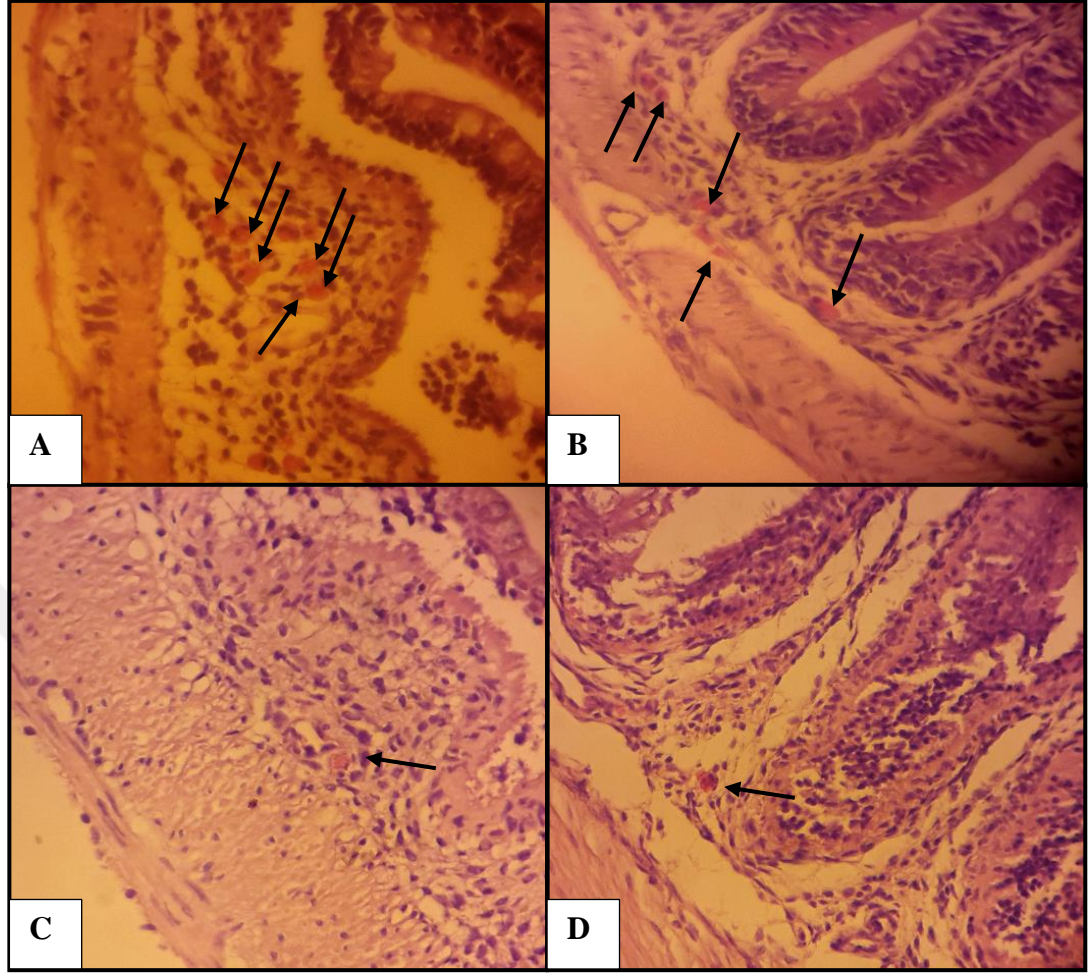
Kontrol grubunda bulunan balıkların bağırsak dokuları incelendiğinde sağlıklı ve normal görünümde oldukları EGC yoğunluğunun normal seviyede olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.18).

Çalışmamızda bağırsak dokuda yapılan incelemelerde A ve B gruplarında çok yoğun olarak gözlemlenen EGC sayısının, C ve D gruplarında normal yoğunlukta olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.19). EGC sayısının C ve D gruplarında A ve B gruplarına göre belirgin biçimde düşük olmasının sebebinin askorbik asidin kurşun toksisitesini azaltıcı etki yapmasından dolayı immün sistemin uyarılmamış olabileceğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.



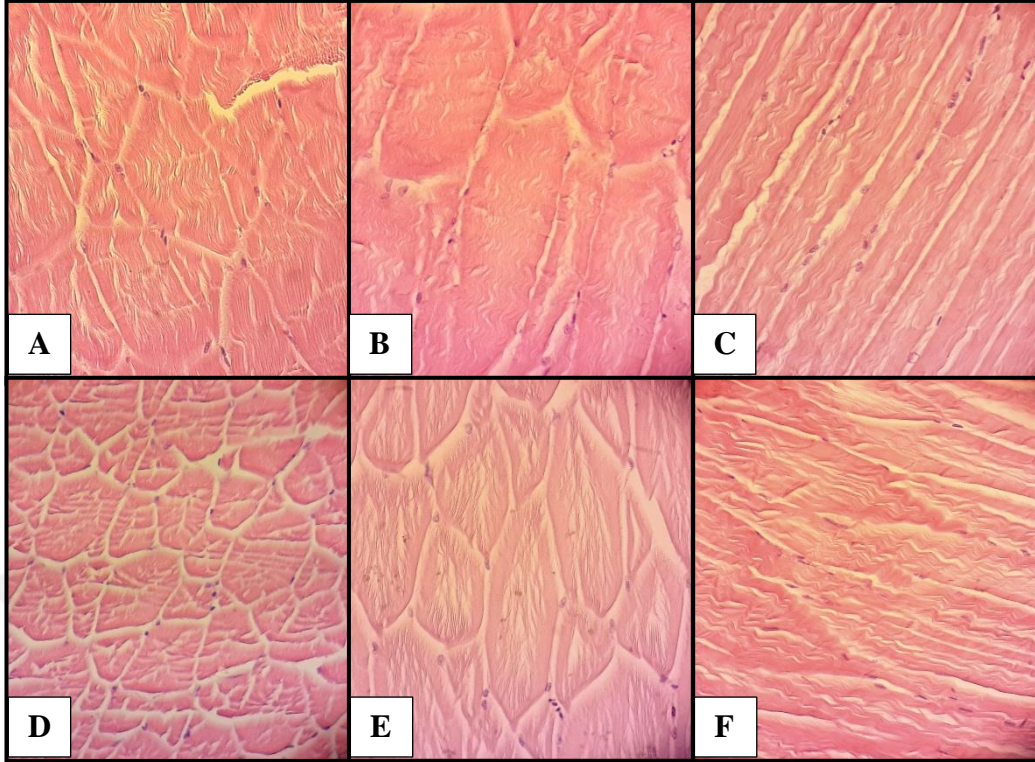
Şekil 4.18 Kontrol grubu bağırsak dokusu ve yapısı (orijinal): (a) lamina epithelialis; (b) lamina propia; (c) stratum kompaktum; (d) EGC; (e) nükleus; (f) goblet hücresi; (g) absorptif enterosit; (h) lenfosit

Begam ve Sengupta, (2015) ağır metal toksisitesinin bağırsak dokuda meydana getirdiği hasarın bir göstergesi olarak savunma mekanizmasının bir parçası olan EGC nin artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda, kurşuna maruz kalmanın bir sonucu olarak gözlemlendiğimiz, bağırsak dokuda EGC yoğunluğunun artış göstermesi, civa toksisitesinin farklı balık türlerinde sebep olduğu histopatolojik değişimleri inceleyen bir çok araştırmacı tarafından da rapor edilmiştir (Kumar ve ark., 2004; Maheswaran ve ark., 2008; Mohamed, 2014). Oliveria ve ark. (2006), kurşunun da civa ile benzer şekilde EGC yoğunluğunu arttırdığını bildirmişlerdir. Çalışmamız yukarıda bahsedilen araştırma sonuçları ile paralellik göstermesine karşın, kurşun ve bakır toksisitesinin EGC sayısını azalttığını ileri süren Oluah ve ark. (2014)'nın çalışması ile çelişmektedir.

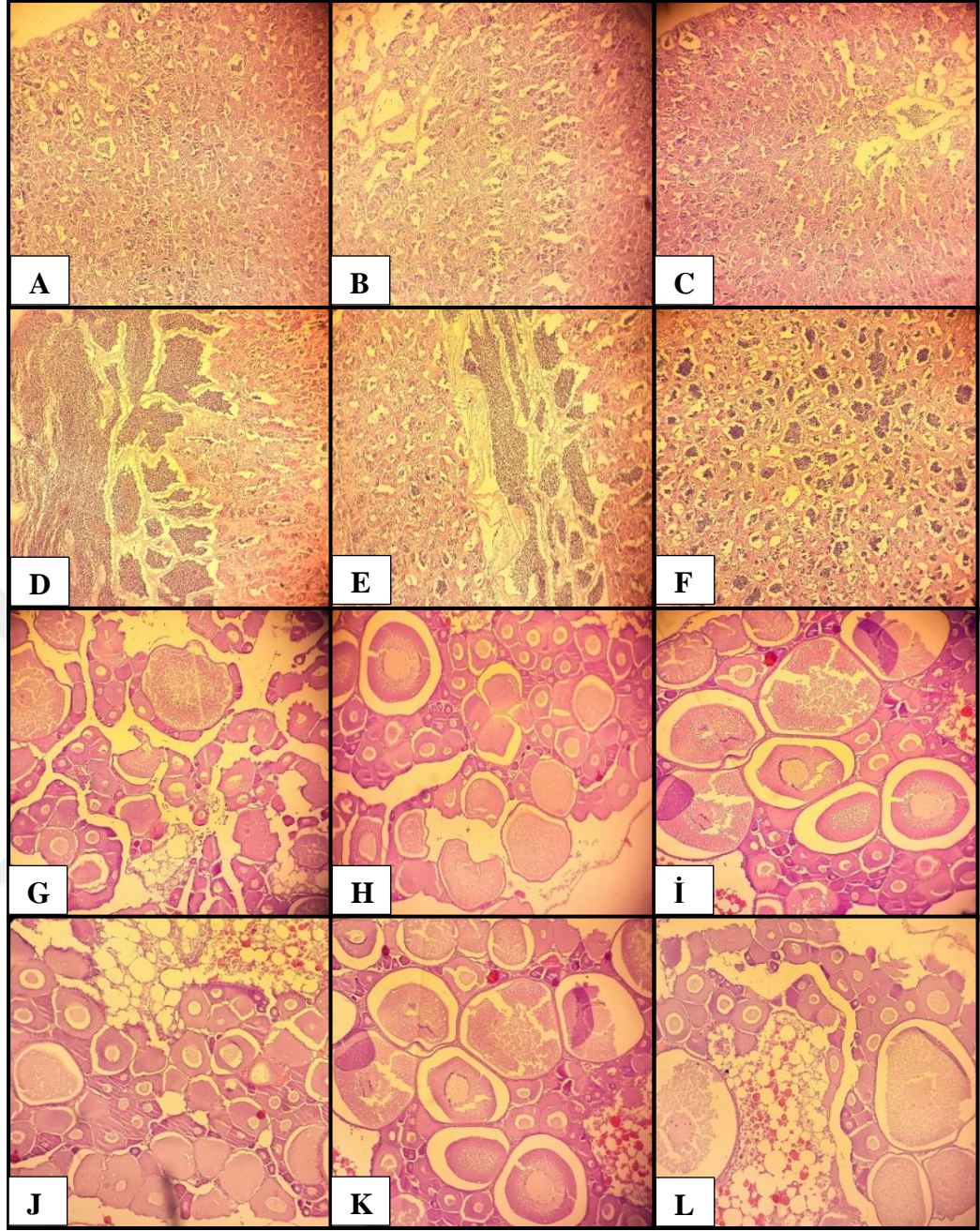


Şekil 4.19 Bağırsak dokusu EGC artışı (orijinal); (A) 10 mg/l Pb²⁺'ye 14 gün maruz kalan grup (A grubu), (B) 10 mg/l Pb²⁺'ye 28 gün maruz kalan grup (B grubu), (C) 10 mg/l Pb²⁺ ve 10 mg/l AA'ya 14 gün maruz kalan grup (C grubu), (D) 10 mg/l Pb²⁺ ve 10 mg/l AA'ya 28 gün maruz kalan grup (D grubu)

Histopatolojik incelemelerde kas dokuda (Şekil 4.20) ve gonadlarda (Şekil 4.21) histopatolojik değişimlere rastlanmamıştır. Adeyemo (2008)'da kurşun toksisitesinin ilk 4 haftada gonadlarda patolojik değişimler meydana getirmediğini, dokudaki ilk değişimlerin 8. haftada gözlemlendiğini rapor etmiştir. Çalışma süresince gonadlarda bir değişim görülmemesinin bu nedenle olduğu düşünülebilir.



Şekil 4.20 Kas doku histolojisi (orijinal) : (A) A grubu, (B) C grubu, (C) kontrol grubu (14. gün), (D) B grubu, (E) D grubu, (F) kontrol grubu (28. gün)



Şekil 4.21 Gonad doku histolojisi (transversal kesit) (orijinal): (A) - (F) testis; (A) 10 mg/l Pb^{2+} 'ye 14 gün maruz kalan grup (A grubu), (B) 10 mg/l Pb^{2+} ve 10 mg/l AA'ya 14 gün maruz kalan grup (C grubu), (C) kontrol grubu (14. gün), (D) 10 mg/l Pb^{2+} 'ye 28 gün maruz kalan grup (B grubu), (E) 10 mg/l Pb^{2+} ve 10 mg/l AA'ya 28 gün maruz kalan grup (D grubu), (F) kontrol grubu (28. gün). (G) – (L) ovaryum; (G) 10 mg/l Pb^{2+} 'ye 14 gün maruz kalan grup (A grubu), (H) 10 mg/l Pb^{2+} ve 10 mg/l AA'ya 14 gün maruz kalan grup (C grubu), (İ) kontrol grubu (14. gün), (J) 10 mg/l Pb^{2+} 'ye 28 gün maruz kalan grup (B grubu), (K) 10 mg/l Pb^{2+} ve 10 mg/l AA'ya 28 gün maruz kalan grup (D grubu), (L) kontrol grubu (28. gün)

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ağır metallerin sucul canlıların farklı dokularında birikim düzeylerinin farklılık göstermesinin; balığın türüne, beslenme şekline, çevresel koşullara, metalin cinsine ve alım mekanizmasına, canlıların metabolik faaliyetlerinin sonuçlarına göre değişim gösterdiği bilinmektedir.

Solungaçların bağırsaktan sonra en çok kurşun biriktiren doku ve kurşunun toksik etkilerinden en çok etkilenen organ olduğu ve solungaçlarda epitel ayrılma, hiperplazi, aneurizm, lamellar füzyon ve ödem olduğu belirlenmiştir.

Karaciğerdeki kurşun birikiminin bağırsak ve solungaca göre önemli derecede daha düşük oranda gerçekleştiği, ancak karaciğerin hücresel düzeyde kurşun toksisitesinden en çok etkilenen organlardan biri olduğu; bunun sonucunda bozuk şekilli nükleuslar, vakuolar dejenerasyon, piknotik nükleuslar, karyorektik nükleuslar ve nekrozun olduğu tespit edilmiştir.

Tilapia'nın kurşunun su ortamından solungaçlar ve deri yoluyla absorbe etmesi durumunda, bağırsağın en çok ve en hızlı kurşun biriktiren, ancak hücresel düzeyde kurşun birikiminden çok az etkilendiği gözlemlenmiş; kurşun toksisitesinin bir göstergesi olarak bağırsaktaki EGC sayısında artış meydana geldiği saptanmıştır.

Gonadların kas dokudan sonra en az kurşun biriktiren doku olduğu ve 28 günde herhangi bir patolojik değişime rastlanmadığı tespit edilmiştir. Ancak gonad gelişim aşamalarının bireylere göre farklılık göstermesi sebebiyle verilerin karşılaştırılmasında gonadların sağlıklı sonuçlar vermeyeceği düşünülmektedir.

Balığın tüketilebilir kısmı olan kas dokunun en az kurşun birikimi gösteren ve kurşun toksisitesinden en az etkilenen doku olduğu, 28 günlük periyotta histopatolojik bir değişimin oluşmadığı tespit edilmiştir. Kurşun toksisitesini azaltmak amacıyla su ortamına katılan askorbik asit gibi kompleks oluşturabilecek maddelerin, olumlu etkisini araştıran önceki çalışmalara benzer şekilde, kurşun birikim düzeylerinin zamana göre arttığını, dokulara göre farklılık arz ettiğini, yalnız kurşun içeren ortamlarda bulunan balıkların dokularındaki birikim düzeylerinin bağırsak > solungaç > karaciğer > gonad > kas sıralamasına göre, kurşun ve askorbik asit içeren ortamlardaki balıklarda ise bağırsak > solungaç > karaciğer > kas > gonad olarak gerçekleştiğini göstermektedir.

Ortama askorbik asidin ilavesinin tüm dokularda kurşun birikimini önemli ölçüde

azalttığı ve kurşun birikim hızını yavaşlattığı; kurşun toksisitesi sebebiyle solungaç (epitel ayrılma, hiperplazi, lamellar füzyon ve ödem), karaciğer (bozuk şekilli nükleuslar, vakuolar dejenerasyon, apoptoz ve nekroz) ve bağırsakta (EGC artışı) meydana gelen hücresel düzeyde hasarların şiddetini azalttığı ve hasarları geciktirdiği belirlenmiştir.

Bu olumlu etkinin;

- Su ortamında bulunan askorbik asidin şelatlama özelliği sebebiyle yine su ortamında bulunan kurşun ile bir kompleks oluşturabileceği; solungaçlar ve deri yoluyla kurşunun vücuda alımını azaltmış olabileceği,
- Su ortamında bulunan askorbik asidin solungaç ve/veya deri epiteli yoluyla vücuda alınmış olabileceği, kan yoluyla dokulara taşınarak, biyokimyasal reaksiyonlara katılabileceği ve kurşunun birikimini ve toksik etkilerini azaltabileceği düşünülmektedir.

Olası kurşun toksisitesinin balıklardaki olumsuz etkisini azaltmak amacıyla ortama askorbik asidin ilavesinin olumlu sonuçlar vereceği, askorbik asitin toksikantlara karşı gösterdiği koruyucu etkinin mekanizmasının tam olarak aydınlatılabilmesi için yeni çalışmalara gereksinim olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abd El-Gawad, A. M., 1999. Histopathological studies on the liver and gills of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) exposed to different concentrations of lead acetate, and zinc sulphate. **Journal-Egyptian German Society of Zoology**, 30, 13-22.

Abdel-Tawwab, M., Shalaby, A. M., Ahmad, M. H., and Khattab, Y. A., 2004. Effect Of Supplemental Dietary L-Ascorbic Acid (Vitamin C) On Mercury Detoxication, Physiological Aspects And Growth Performance Of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Health Management and Disease**. 9, 12-16.

Abdel-Warith, A. A., Younis, E. M., Al-Asgah, N. A., and Wahbi, O. M., 2011. Effect of zinc toxicity on liver histology of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Scientific Research and Assays**. 6(17), 3760-3769.

Adeyemo, O. K., 2008. Histological alterations observed in the gills and ovaries of *Clarias gariepinus* exposed to environmentally relevant lead concentrations. **Journal Of Environmental Health**, 70(9), 48-51.

Agrawal, N. K., Juneja, C. J., and Mahajan, C. L., 1978. Protective role of ascorbic acid in fishes exposed to organochlorine pollution. **Toxicology**, 11, 369-375.

Ahmed, M. S., and Bibi, S., 2010. Uptake and bioaccumulation of waterborne lead (Pb) in the fingerlings of a freshwater cyprinid, *Catla catla* L. **The Journal of Animal and Plant Sciences**. 20(3), 201-207.

Alazemi, B. M., Lewis, J. W., and Andrews, E. B., 1996. Gill damage in the freshwater fish *Gnathonemus petersii* (Family: Mormyridae) exposed to selected pollutants: an ultrastructural study. **Environmental Technology**, 17(3), 225-238.

Ali, A., Al-Ogaily, S. M., Al-Asgah, N. A., and Gropp, J., 2003. Effect of sublethal concentrations of copper on the growth performance of *Oreochromis niloticus*. **Journal of Applied Ichthyology**, 19(4), 183-188.

Allen, P., 1995. Accumulation profiles of lead and the influence of cadmium and mercury in *Oreochromis aureus* (Steindachner) during chronic exposure. **Toxicological and Environmental Chemistry**, 44(1-2), 101-112.

Almedia, J.A, Diniz, Y.S., Marques, S.F.G., Faine, L.A., Ribas, B.O., Burneiko, R.C., Novelli, E.L.B., 2002 . The Use of the Oxidative Stress Responses as Biomarkers

in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) Exposed to İn Vivo Cadmium Contamination. **Environment International**, 27 (8), 673-679.

Altun, T., Tekelioğlu, N., and Danabaş, D., 2006. Tilapia culture and its problems in Turkey. **EUJ Fisheries and Aqua. Sci**, 23(3-4), 473-478.

Alvarado, N. E., Quesada, I., Hylland, K., Marigómez, I., and Soto, M., 2006. Quantitative changes in metallothionein expression in target cell-types in the gills of turbot (*Scophthalmus maximus*) exposed to Cd, Cu, Zn and after a depuration treatment. **Aquatic toxicology**, 77(1), 64-77.

Anderson, M. B., Preslan, J. E., Jolibois, L., Bollinger, J. E., and George, W. J., 1997. Bioaccumulation of lead nitrate in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). **Journal of Hazardous Materials**, 54(1), 15-29.

Anonim, 2002. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms, Fifth Edition, U.S. Environmental Protection Agency Office of Water, Pennsylvania Avenue, NW Washington DC 20460.

Anonim, 2013. http://biltek.tubitak.gov.tr/merak_ettikleriniz/index.php?kategori_id=6andsoru_id=2989 (Erişim: 23.12.2012)

Anonymous, 2009. Atlas of Pathology: 3rd edition (updated 01.30.2009). University of Medicine and Pharmacy, Department of Pathology, Online Access: <http://www.pathologyatlas.ro> (Erişim: 30.11.2015)

Anonymous, 2015. General Pathology Web Lessons, Sessions 1-Disturbances of circulation. The University of Georgia, Collage of Veterinary Medicine, Department of Pathology, Online Access: http://vet.uga.edu/oldvpp/programs/afvet/attachments/disturbances_of_circulation_notes.pdf (Erişim: 30.11.2015)

Arellano, J. M., Storch, V., and Sarasquete, C., 1999. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales sole, *Solea senegalensis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 44(1), 62-72.

Atli, G., and Canli, M., 2007. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, 145(2), 282-287.

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(2), 160-168.

Balarin, J. D., and Haller, R. D., 1982. The intensive culture of tilapia in tanks, raceways and cages. **Recent Advances in Aquaculture.**, 266-355.

Balarin, J. D., and Hatton, J. P., 1979. **Tilapia: A Guide To Their Biology And Culture in Africa**. University of Stirling, Unit of Aquatic Pathobiology, 92-110.

Bancroft, J. D., and Gamble, M., 2008. **Theory And Practice Of Histological Techniques**. Elsevier Health Sciences Churchill Livingstone, London.

Begam, M., and Sengupta, M., 2015. Immunomodulation of intestinal macrophages by mercury involves oxidative damage and rise of pro-inflammatory cytokine release in the fresh water fish *Channa punctatus* Bloch. **Fish and Shellfish Immunology**. 45(2), 378-385.

Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., and Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, 22(1), 25-34.

Blasco, J., Puppo, J., 1999. Effects of heavy metals (Cu, Cd and Pb) on aspartate and alanine aminotransferase in *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia). **Comparative Biochemistry of Physiology Part C.**, 122, 253-263.

Blevins, R. D., and Pancorbo, O. C., 1986. Metal concentrations in muscle of fish from aquatic systems in east Tennessee, USA. **Water, Air, and Soil Pollution**, 29(4), 361-371.

Brezonik, P. L., King, S. O., and Mach, C. E., 1991. The influence of water chemistry on trace metal bioavailability and toxicity to aquatic organisms. IN: Metal Ecotoxicology: Concepts and Applications. **Advances in Trace Substances Research Series**. Lewis Publishers, Inc., Chelsea, Michigan.

Brook, M. J., 1953. Recovery of heavy metals. United State Patent Office, U.S. Patent No 2,653,089, 1953.

Brusle, J., and Anadon, G. G., 1996. The structure and function of fish liver. **Fish Morphology**, 77-93.

Bryan, G. W., and Langston, W. J., 1992. Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries: a review. **Environmental Pollution**, 76(2), 89-131.

Burden, V.M., Sandheinrich, M. B., Caldwell, C. A., 1998. Effects of lead on the growth and aminolevulinic acid dehydratase activity of juvenile Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Environmental Pollution**, 101, 285-289.

Campana, O., Sarasquete, C., Blasco, J., 2003. Effect of lead on ALA-D activity, metallothionein levels, and lipid peroxidation in blood, kidney, and liver of the Toadfish *Halobatrachus didactylus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 55, 116-125.

Canli, M., Stagg, R. M., and Rodger, G., 1997. The induction of metallothionein in tissues of the Norway lobster *Nephrops norvegicus* following exposure to cadmium, copper and zinc: the relationships between metallothionein and the metals. **Environmental Pollution**, 96(3), 343-350.

Cearley, J. E., and Coleman, R. L., 1974. Cadmium toxicity and bioconcentration in largemouth bass and bluegill. **Bulletin Of Environmental Contamination And Toxicology**, 11(2), 146-151.

Cerqueira, C. C., and Fernandes, M. N., 2002. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 52(2), 83-91.

Cotran, R. S., Kumar, V., Collins, T., and Robbins, S. L., 1999. **Robbins pathologic basis of disease**. W.B Saunders Company, Philadelphia.

Cousins, R. J., 1985. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. **Physiological Reviews**, 65(2), 238-309.

Cruz, E. R., de la Cruz, M. C., and Suñaz, N. A., 1988. Hematological and histopathological changes in *Oreochromis mossambicus* after exposure to the molluscicides Aquatin and Brestan. In **The Second International Symposium on Tilapia in Aquaculture. ICLARM Conference Proceedings** (Vol., 15, pp. 99-110).

Çoğun, H.Y., 2008. *Oreochromis niloticus* ve *Cyprinus carpio*'da Bakır ve Kurşun Birikiminin Solungaç, Kas, Karaciğer, Böbrek ve Kan Dokularındaki İyon Dağılımı Üzerine Etkisi. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

Dabrowski, K. (Ed.). (2000). **Ascorbic acid in aquatic organisms: status and perspectives**. CRC press. London New York Washington D.C.

Dai, W., Du, H., Fu, L., Jin, C., Xu, Z., and Liu, H., 2008. Effects of dietary Pb on accumulation, histopathology, and digestive enzyme activities in the digestive system of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Biological Trace Element Research**, 127(2), 124-131.

de Conto Cinier, C., Petit-Ramel, M., Faure, R., Garin, D., and Bouvet, Y., 1999. Kinetics of cadmium accumulation and elimination in carp *Cyprinus carpio* tissues. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, 122(3), 345-352.

De Michele, S. J., 1984. Nutrition of lead. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, 78(3), 401-408.

De-Smet, H., and Blust, R., 2001. Stress responses and changes in protein metabolism in carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, 48(3), 255-262.

Dhawan, M., Kachru, D. N., and Tandon, S. K., 1988. Influence of thiamine and ascorbic acid supplementation on the antidotal efficacy of thiol chelators in experimental lead intoxication. **Archives Of Toxicology**, 62(4), 301-304.

Dikel, S., ve Çelik, M., 1998., Aşağı Seyhan Havzası'nda Yakalanan Tatlı su Çipurası'nın (*Tilapia ssp.*) Yenilebilir ve Yenilemez Bölümlerinin Ağırlık Oranları ile Bazı Besin Öğelerinin Belirlenmesi. **Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences**, 22, 517-520.

Duffus, J. H. and Howard G. J., 1996. **Fundamental Toxicology For Chemists, Cambridge, UK**: Royal Society of Chemistry Information Services.

Eisler, R., 1988. Lead Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review. **U.S. Fish and Wildlife Service Biological Report** 85(1.14), 134 pp.

El-Naggar, A. M., Mahmoud, S., and Tayel, S., 2009. Bioaccumulation of some heavy metals and histopathological alterations in liver of *Oreochromis niloticus* in relation to water quality at different localities along the River Nile, Egypt. **World Journal of Fish and Marine Sciences**, 1(2), 105-114.

Eschmeyer, W. N., and Fong, J. D., 2015. **Species by family/subfamily in the Catalog of Fishes**. Online Version: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp#Cichlidae> (Erişim: 26.07.2015).

Fanta, E., Rios, F. S. A., Romão, S., Vianna, A. C. C., and Freiburger, S., 2003. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 54(2), 119-130.

Fernandes, M. N., and Mazon, A. D. F., 2003. Environmental pollution and fish gill morphology. **Fish adaptation**. Science Publishers, Enfield, 203-231.

Figueiredo-fernandes, A., Ferreira-cardoso, J. V, Garcia-santos, S., Monteiro, S.M., Carrola, J., Matos, P. and Fontainhas-, A., 2007. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia , Or *eochromis niloticus* , exposed to waterborne copper 1 Oreochromis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 27, 103–109.

Fischer, A. B., Hess, C., Neubauer, T., and Eikmann, T., 1998. Testing of chelating agents and vitamins against lead toxicity using mammalian cell cultures. **Analyst**, 123(1), 55-58.

Flik, G., and Verbost, P. M., 1993. Calcium transport in fish gills and intestine. **The Journal of Experimental Biology**, 184(1), 17-29.

Flora, S. J. S., and Tandon, S. K., 1986. Preventive and therapeutic effects of thiamine, ascorbic acid and their combination in lead intoxication. **Acta Pharmacologica Et Toxicologica**, 58(5), 374-378.

Forbes, R. M., and Sanderson, G. C., 1978. Lead toxicity in domestic animals and wildlife. **The Biogeochemistry of Lead in the Environment, Part B. Biological Effects**, Elsevier/North Holland Biom. Press, Amsterdam, 227-277.

Förstner, U., and Wittmann, G. T., 1983. **Metal pollution in the aquatic environment**. Second revised edition, Springer Science and Business Media. , Newyork. 475pp.

Froese, R. and Pauly D. Editors., 2016. **FishBase. World Wide Web electronic publication**. www.fishbase.org, version (01/2016).

Fukuda, Y., 1983. Specific reaction of goldfish gills exposed to linear alkylbenzenesulphonate. **Japanese Journal of Ichthyology**., 30, 268–74.

Gapasin, R. S. J., Bombeo, R., Lavens, P., Sorgeloos, P., and Nelis, H., 1998. Enrichment of live food with essential fatty acids and vitamin C: effects on milkfish (*Chanos chanos*) larval performance. **Aquaculture**, 162(3), 269-286.

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. **Environmental Toxicology**, 21(1), 33-46.

Gardner, G. R., and Yevich, P. P., 1970. Histological and hematological responses of an estuarine teleost to cadmium. **Journal of the Fisheries Board of Canada**, 27(12), 2185-2196.

Gouillou-Coustans, M. F., & Kaushik, S. J. Eds, Dabrowski, K., 2000. Ascorbic acid requirement in fresh water and marine fish: Is there a differences. **Ascorbic Acid In Aquatic Organisms: Status and Perspectives**, 49.

Goyer, R. A., Cherian, M. G., Jones, M. M., and Reigart, J. R., 1995. Role of chelating agents for prevention, intervention, and treatment of exposures to toxic metals. **Environmental Health Perspectives**, 103(11), 1048.

Hamada, T., Tanimoto, A., and Sasaguri, Y., 1997. Apoptosis induced by cadmium. **Apoptosis**, 2(4), 359-367.

Heath, A. G., 1995. **Water Pollution and Fish Physiology**. CRC press. 24 pp.

Hinton, D. E., Baumann, P. C., Gardner, G. R., Hawkins, W. E., Hendricks, J. D., Murchelano, R. A., and Okihira, M. S., 1992. Histopathologic biomarkers. **Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Lewis Publ., Boca Raton, Fl, USA, 157-209.

Hinton, D. E., Segner, H., and Braunbeck, T., 2001. Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts, **Toxic Responses of the Liver**, 1, 224-268.

Hodson, P. V., Hilton, J. W., Blunt, B. R., and Slinger, S. J., 1980. Effects of dietary ascorbic acid on chronic lead toxicity to young rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 37(2), 170-176.

Hollis, L., Hogstrand, C., and Wood, C. M., 2001. Tissue-specific cadmium accumulation, metallothionein induction, and tissue zinc and copper levels during chronic sublethal cadmium exposure in juvenile rainbow trout. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 41(4), 468-474.

Ibrahim, S. A., and Mahmoud, S. A., 2005. Effect of heavy metals accumulation on enzyme activity and histology in liver of some Nile fish in Egypt. **Journal of Aquatic Biology and Fisheries**, 9, 203-219.

Jain, S. K., 1999. Protective role of zeolite on short-and long-term lead toxicity in the teleost fish *Heteropneustes fossilis*. **Chemosphere**, 39(2), 247-251.

James, R., 2000. Effect of zeolite on reduction of cadmium level in water and improvement of haematological parameters in *Oreochromis mossambicus* (Peters). **Indian Journal of Fisheries**. 47(1), 29-35.

James, R., Sampath, K., 2000. Effect of zeolite on the reduction of cadmium level in water and fish body and growth improvement in a catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). **Journal of Aquaculture of the Tropics**., 15(4), 329-338.

Jiraungkoorskul, W., Kosai, P., Kirtputra, P., & Charucharoen, S., 2007. Evaluation of micronucleus test's sensitivity in freshwater fish species. **Research Journal of Environmental Sciences**, 1 (2), 56-63.

Jiraungkoorskul, W., Sahaphong, S., Kangwanrangsan, N. and Zakaria, S., 2008. The protective influence of ascorbic acid against the genotoxicity of waterborne lead exposure in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). **Journal of Fish Biology**. 73, 355–366.

Jiraungkoorskul, W., Upatham, E. S., Kruatrachue, M., Sahaphong, S., Vichasri-Grams, S., and Pokethitiyook, P., 2003. Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Environmental Toxicology**, 18(4), 260-267.

Kahvecioglu, Ö., Kartal, G., Güven, A. ve Timur, S., 2006. Metallerin çevresel etkileri-I. **Metaller Dergisi**, 136, 47-53.

Kalay, M., and Canlı, M., 2000. Elimination of essential (Cu, Zn) and non-essential (Cd, Pb) metals from tissues of a freshwater fish *Tilapia zilli*. **Turkish Journal of Zoology**, 24(4), 429-436.

Kalia, K., and Flora, S. J., 2005. Strategies for safe and effective therapeutic measures for chronic arsenic and lead poisoning. **Journal of Occupational Health**, 47(1), 1-21.

Kaoud, H.A., and El-Dahshan, A. R. 2010. Bioaccumulation and histopathological alterations of the heavy metals in *Oreochromis niloticus* fish. **Nature and science**. 8, 147–156.

Karan, V., Vitorović, S., Tutundžić, V., and Poleksić, V., 1998. Functional enzymes activity and gill histology of carp after copper sulfate exposure and recovery. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 40(1), 49-55.

Karataş, S. ve Kalay, M., 2002. *Tilapia zilli*'nin Solungaç, Karaciğer, Böbrek ve Beyin Dokularında Kurşun Birikimi. **Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences**. 26, 471-477.

Kargın, E., and Erdem, C., 1992. Bakir-Çinko Etkileşiminde *Tilapia nilotica*'nin karaciğer, kas ve solungaç dokularındaki Metal Birikimi. **Doğa Tr. J. Zool**, 16, 343-348.

Kargın, F., and Çoğun, H. Y., 1999. Metal interactions during accumulation and elimination of zinc and cadmium in tissues of the freshwater fish *Tilapia nilotica*. **Bulletin of Environmental Contamination And Toxicology**, 63(4), 511-519.

Karlsson-Norrgren, L., Björklund, I., Ljungberg, O., & Runn, P., 1986. Acid water and aluminium exposure: experimentally induced gill lesions in brown trout, *Salmo trutta* L. **Journal of Fish Diseases**, 9(1), 11-25.

Kasper, D. L., and Zaleznik, D. F., 2001. Gas gangrene, antibiotic-associated colitis, and other clostridial infections. **Harrisons Principles Of Internal Medicine**, 1, 922-926.

Kato, M., Kephart, G. M., Talley, N. J., Wagner, J. M., Sarr, M. G., Bonno, M., McGovern, T. W., and Gleich, G. J., 1998. Eosinophil infiltration and degranulation in normal human tissue. **The Anatomical Record**, 252(3), 418-425.

Kaya, H., 2012. *Tilapia*'da (*Oreochromis mossambicus*) kurşun toksisitesi: Oksidatif stres ve bazı fizyolojik etkiler / Toxicity of lead on tilapia (*Oreochromis mossambicus*): Oxidative stress and some physiological effects. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Çanakkale, 210 s.

Kennish M.J., 1992, **Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects**. CRC Marine Science Series, 3. CRC Press: Boca Raton, FL (USA).

Korkmaz, N., 2007. *Tilapia nilotica* 'da Histopatolojik ve Biyokimyasal Değişikliklere Neden Olan Pestisit Toksikitesi Askorbik Asidin Koruyucu ve İyileştirici Etkileri. Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans tezi, Diyarbakir, 66 s.

Kumar, B. G., Nandan, S. B., Kumari, T. A., and Sajeevan, K., 2014. Curative effect of Vitamin C on the Variation in Biochemical and Histopathological Parameters Induced

by Copper Exposure in the Teleost Fish, *Anabas testudineus* (Bloch, 1792). **Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology**, 8(8): 28-35.

Kumar, G. and Nandan, S. B., 2014. Copper Toxicity: haematological and histopathological changes and prophylactic role of vitamin C in the fish, *Anabas testudineus* (Bloch, 1792). **The Journal of Zoology Studies**, 1(3): 04-13

Kumar, K., Patri, P., and Pandey, A. K., 2004. Haematological and biochemical responses of the climbing perch, *Anabas testudineus*(Bloch), exposed to mercury toxicity. **Journal of Ecophysiology and Occupational Health**, 4(1), 97-108.

Kumar, P., Prasad, Y., Patra, A. K., Ranjan, R., Swarup, D., Patra, R. C., and Pal, S., 2009. Ascorbic acid, garlic extract and taurine alleviate cadmium-induced oxidative stress in freshwater catfish (*Clarias batrachus*). **Science of the Total Environment**, 407(18), 5024-5030.

Kürkçü, Y., 2001. Kursun Nitrat Metal Tuzunun Lepistes (*Poecilia reticulata*) Üzerindeki Akut Toksik Etkisinin Araştırılması ve Davranış Değişimlerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 39s.

Lacroix, G. L., Gordon, D. J., and Johnston, D. J., 1985. Effects of low environmental pH on the survival, growth, and ionic composition of postemergent Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 42(4), 768-775.

Lamchumchang, K., Jiraungkoorskul, W., Sahaphong, S., Tansatit, T., Kosai, P., and Madarasmi, R., 2007. Dietary calcium reducing effects of waterborne lead uptake in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).

Langston, W. J., 1990. Toxic effects of metals and incidence of marine ecosystems In: Furness, RW and Rainbow, PS (ed) **Heavy metals in the Marine Environment**, 256 pp.

Lanno, R. P., Slinger, S. J., and Hilton, J. W., 1985. Effect of ascorbic acid on dietary copper toxicity in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). **Aquaculture**, 49(3), 269-287.

Larsson, Å., Haux, C., and Sjöbeck, M. L., 1985. Fish physiology and metal pollution: results and experiences from laboratory and field studies. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 9(3), 250-281.

Laurén, D. J., and McDonald, D. G., 1985. Effects of copper on branchial ionoregulation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of Comparative Physiology B**, 155(5), 635-644.

Lee, K. J., and Dabrowski, K., 2003. Interaction Between Vitamins C and E Affects Their Tissue Concentrations, Growth, Lipid Oxidation, And Deficiency Symptoms In Yellow Perch (*Perca flavescens*). **Br. J. Nutr.** 89, 589-596.

Levander, O. A., 1979. Lead toxicity and nutritional deficiencies. **Environmental Health Perspectives**, 29, 115.

Linde, A. R., Sánchez-Galán, S., Klein, D., Garcí, E., and Summer, K. H., 1999. Metallothionein and heavy metals in brown trout (*Salmo trutta*) and European eel (*Anguilla anguilla*): a comparative study. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, 44(2), 168-173.

Lipponen, P., Aaltomaa, S., Kosma, V. M., and Syrjänen, K., 1994. Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. **European Journal of Cancer**, 30(14), 2068-2073.

Liver, K., 1973. Evolution and the biosynthesis of ascorbic acid. **Science** 182, 1271-1272.

Lovell, R. T., 1989. Vitamin C (ascorbic acid). **Nutrition and Feeding of fish**. New York: Auburn Univ.

Macdonald, A., Silk, L., Schwartz, M., and Playle, R. C., 2002. A lead–gill binding model to predict acute lead toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology**, 133(1), 227-242.

Maffia, M., Verri, T., and Storelli, C., 2000. In vitro methods and results of ascorbic acid absorption in epithelial tissues of fish. **Ascorbic Acid In Aquatic Organisms: Status and Perspectives**, CRC press.

Maheswaran, R., Devapaul, A., Muralidharan, S., Velmurugan, B., and Ignacimuthu, S., 2008. Haematological studies of freshwater fish, *Clarias batrachus* (L.) exposed to mercuric chloride. **International Journal of Integrative Biology**, 2(1), 49-54.

Mallatt, J., 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 42(4), 630-648.

Marchie, G., Lavens, P., Storch, V., Ubel, U., Nelis, H., DeLeenheer, A., and Sorgeloos, P., 1996. Influence of dietary vitamin C dosage on turbot (*Smaximus*) and European Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) nursery stages. **Comp. Biochem. Physiol. A**, 114, 123-133.

Martinez, C. B. R., Nagae, M. Y., Zaia, C. T. B. V., and Zaia, D. A. M., 2004. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Brazilian Journal of Biology**, 64(4), 797-807.

McDowell, L. R., 1989. **Vitamins in Animal Nutrition**. Academic Press. Inc. San Diego, CA.

Meschkat, A., 1967. The status of warm-water fish culture in Africa. **FAO fish. Rep**, 44(2), 88-122.

Mirmazloomi, S., Shahsavani, D., and Baghshani, H., 2015. Studies on the protective effects of ascorbic acid and thiamine on lead-induced lipid and protein oxidation as well as enzymatic alterations in some tissues of *Cyprinus carpio*. **Comparative Clinical Pathology**, 24(5), 1231-1236.

Mishra, A. K., and Mohanty, B., 2008. Acute toxicity impacts of hexavalent chromium on behavior and histopathology of gill, kidney and liver of the freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 26(2), 136-141.

Mishra, M. and Jain, S.K., 2009. Effect of Natural Ion Exchanger Chabazite for Remediation of Lead Toxicity : An Experimental Study in Teleost Fish *Heteropneustes fossilis*. **Chemosphere**. 23, 39-44.

Mobarak, Y. M. S., and Sharaf, M. M., 2011. Lead acetate induced histopathological changes in the gills and digestive system of silver sailfin molly (*Poecilia latipinna*). **Int J Zool Res**, 7, 1-18.

Mohamed, W. A. M., 2014. Selective Evaluation of Certain Blood and Biochemical Parameters of Egyptian Catfish (*Clarias Lazera*) Exposed to Mercuric Chloride With Particular Reference to Erythrocyte Morphological Anomalies. **International Blood Research & Reviews**, 2(5), 222-234.

Mohammed, F.A.S., 2008. Bioaccumulation of Selected Metals and Histopathological Alterations in Tissues of *Oreochromis niloticus* and *Lates niloticus* from Lake Nasser, Egypt. **Global Veterinaria** 2, 205–218.

Morsy, M., and Protasowicki, M., 1990. Cadmium bioaccumulation and its effects on some hematological and histological aspects in carp, *Cyprinus carpio* L., at selected temperature. **Acta Ichthyologica et Piscatoria** (Poland).

Mumford, S., Heidel, J., Smith, C., Morrison, J., Macconnell, B., and Blazer, V., 2007. **Fish Histology and Histopathology**. US Fish and Wildlife Service–National Conservation Training Center (USFWS–NCTC), p.357.

Muramoto, S., 1980. Effect of complexans (EDTA, NTA and DTPA) on the exposure to high concentrations of cadmium, copper, zinc and lead. **Bulletin of Environmental Contamination And Toxicology**, 25(1), 941-946.

Naiper, D., 2012. Subject: Hematoxylin And Eosin Staining. University of Kentucky Markey Cancer Center Biospecimen Core Program. http://ukhealthcare.uky.edu/uploadedFiles/services/treatments/markey/Researchers/Shared_Research_Facilities/BCP/BSTP%20SRF%20H.2%20Hematoxylin%20and%20Eosin%20Staining.pdf (Erişim: 24.07.2015)

Navarre, O., and Halver, J. E., 1989. Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. **Aquaculture**, 79(1), 207-221.

Nishikawa, K., and Tabata, K., 1968. Studies On The Toxicity Of Heavy Metals To Aquatic Animals And The Factors To Decrease The Toxicity--İii. On The Low Toxicity Of Some Heavy Metal Complexes To Aquatic Animals (Japanese). **Bulletin Tokai Reg. Fish. Res. Lab.** 58, 233.

Nordberg, G.F., B.A. Fowler, M. Nordberg and L. Friberg., 2007. **Handbook on the Toxicology of Metals**. 3rd Edn., Academic Press, Amsterdam, ISBN-10: 0123694132, 1024 pp.

Oliveria Riberio, C. A., Filipak Neto, F., Mela, M., Silva, P. H., Randi, M. A., Rabitto, I. S., and Pelletier, E., 2006. Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses by methylmercury, inorganic lead and tributyltin chloride. **Environ Res**, 101, 74-80.

Olojo, E.A.A., Olurin, K.B., Mbaka, G. and Oluwemimo, A.D., 2005. Histopathology of the gill and liver tissues of the African catfish *Clarias gariepinus* exposed to lead. **African Journal of Biotechnology**, 4, 117–122.

Oluah, N. S., Ulasi, A. M., and Nwani, C. D., 2014. Changes in the Leucocyte and Serum Biochemistry in *Clarias gariepinus* (Burchel) Exposed to Sublethal Lead Chloride. **Journal of Natural Sciences Research**, 4(18), 55-61.

Orrenius, S., Nicotera, P., and Zhivotovsky, B., 2011. Cell death mechanisms and their implications in toxicology. **Toxicological Sciences**, 119(1), 3-19.

Osman, M. M., El-Fiky, S. A., Soheir, Y. M., and Abeer, A. I., 2009. Impact of water pollution on histopathological and electrophoretic characters of *Oreochromis niloticus* fish. **Research Journal of Environmental Toxicology**, 3(1), 9-23.

Özdemir, H. İ., 1981. **İlaveli Genel Anorganik Ve Teknik Kimya**. Teknik Kitaplar. İstanbul.

Palaniappan, P. R., Sabhanayakam, S., Krishnakumar, N., and Vadivelu, M., 2008. Morphological changes due to Lead exposure and the influence of DMSA on the gill tissues of the freshwater fish, *Catla catla*. **Food And Chemical Toxicology**, 46(7), 2440-2444.

Papanikolaou, N. C., Hatzidaki, E. G., Belivanis, S., Tzanakakis, G. N., and Tsatsakis, A. M., 2005. Lead toxicity update. A brief review. **Medical science monitor**, 11(10), 329-336.

Parihar, M. S., and Dubey, A. K., 1995. Lipid peroxidation and ascorbic acid status in respiratory organs of male and female freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* exposed to temperature increase. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, 112(3), 309-313.

Pärt, P., and Lock, R. A. C., 1983. Diffusion of calcium, cadmium and mercury in a mucous solution from rainbow trout. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, 76(2), 259-263.

Pollard, R. R., 1966. Amino acids chelating agents in detergent applications. **Soap and Chem. Specialites** 49(8),58.

Proskuryakov, S. Y., Konoplyannikov, A. G., and Gabai, V. L., 2003. Necrosis: a specific form of programmed cell death?. **Experimental Cell Research**, 283(1), 1-16.

Rabbito, I. S., Costa, J. A., de Assis, H. S., Pelletier, E., Akaishi, F. M., Anjos, A., and Ribeiro, C. O., 2005. Effects of dietary Pb (II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 60(2), 147-156.

Randi, A. S., Monserrat, J. M., Rodriguez, E. M., and Romano, L. A., 1996. Histopathological effects of cadmium on the gills of the freshwater fish, *Macropsobrycon uruguayanae* Eigenmann (Pisces, Atherinidae). **Journal of fish diseases**, 19(4), 311-322.

Reichert, W. L., Federighi, D. A., and Malins, D. C., 1979. Uptake and metabolism of lead and cadmium in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 63(2), 229-234.

Rejeki, S., and Rahmat, A., 2005. Chronic Effects Of Detergent Surfactant (Linear Alkylbenzene Sulfonate I Las) On The Growth And Survival Rate Of Sea Bass (*Lates Calcalifor* Bloch) Larvae. **Journal Of Coastal Development**, 8(3), 207-226.

Rether, A., 2002. Entwicklung und Charakterisierung wasser löslicher Benzoyl thiharnstoffunktionalisierter Polymere zur selektiven Abtrennung von Schwermetallionen aus Abwassern und Prozesslösungen. Ph.D Dissertation, Technische Universität München.

Roberts, R. J., 2012. **Fish Pathology**, John Wiley and Sons., P.571

Roesijadi, G., and Robinson, W. E., 1994. Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation and release. **Aquatic Toxicology**, 102, 125-133.

Ruparelia, S. G., Verma, Y., Mehta, N. S., Salyed, S. R., 1989. Lead-induced biochemical changes in freshwater fish *Oreochromis mossambicus*. **Bulletion of Environmental Contamination Toxicology**, 43, 310-314.

Sarihan, E., and Toral, Ö., 1980. Bir tropik balık türü olan *Tilapia nilotica* (Lin.) 1758'in Çukurova bölgesinde yetiştirilme sorunları üzerine bir araştırma. **TÜBİTAK VII. Bilim Kongresi, Veteriner Ve Hayvancılık Araştırma Grubu Tebliği**, 29.

Sarihan, E., and Cengizler, İ., 2006. **Temel Balık Anatomisi ve Fizyolojisi** S.172. Nobel Kitabevi, Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Adana.

Simon, J. A., and Hudes, E. S., 1999. Relationship of ascorbic acid to blood lead levels. **Jama**, 281(24), 2289-2293.

Sprague, J. B., 1968. Promising anti-pollutant: chelating agent NTA protects fish from copper and zinc. **Nature**, 220:1345-1346

Straumann, A., and Simon, H. U., 2004. The physiological and pathophysiological roles of eosinophils in the gastrointestinal tract. **Allergy**, 59(1), 15-25.

Stripp, R. A., Heit, M., Bogen, D. C., Bidanset, J., and Trombetta, L., 1990. Trace element accumulation in the tissues of fish from lakes with different pH values. **Water, Air, and Soil Pollution**, 51(1-2), 75-87.

Suzuki, T., and Yoshida, A., 1979. Effectiveness of dietary iron and ascorbic acid in the prevention and cure of moderately long-term lead toxicity in rats. **The Journal of Nutrition**, 109(11), 1974-1978.

Şahin, M., 2011. *Oreochromis niloticus*'da kurşun toksisitesinin azalmasına zeolitin etkisi. Kilis 7 Aralık Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans tezi, Kilis, 53 S.

Tao, S., Liu, C., Dawson, R., Cao, J., and Li, B., 1999. Uptake of particulate lead via the gills of fish (*Carassius auratus*). **Archives of environmental contamination and toxicology**, 37(3), 352-357.

Tekelioğlu, N., 1991. **İç Su Balıkları Yetiştiriciliği Ders Notları**. Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Yüksek Okulu Yayınları, No 2. S.243.

Tekelioğlu, N., 2005. **İç Su Balıkları Yetiştiriciliği (Soğuk ve Sıcak İklim Balıkları)**, Nobel Kitabevi. Adana.

Temmink, J. H. M., Bouwmeister, P. J., De Jong, P., and Van Den Berg, J. H. J., 1983. An ultrastructural study of chromate-induced hyperplasia in the gill of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Aquatic Toxicology**, 4(2), 165-179.

Thomas, P., Bally, M., and Neff, J. M., 1982. Ascorbic acid status of mullet, *Mugil cephalus* Linn., exposed to cadmium. **Journal of Fish Biology**. 20(2), 183-196.

Thophon, S., Kruatrachue, M., Upatham, E. S., Pokethitiyook, P., Sahaphong, S., and Jaritkhuan, S., 2003. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environmental Pollution**, 121(3), 307-320.

Ünsal, M., 1998. Yöntemler ve Sonuçların değerlendirilmesi. **Kirlilik Deneyleri**. T.C. Tarım Köy İşleri Bakanlığı Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Seri A, Yayın No: 11, Bodrum. 168 S.

Van der Putte, I., Brinkhorst, M. A., and Koeman, J. H., 1981. Effect of pH on the acute toxicity of hexavalent chromium to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Aquatic Toxicology**, 1(2), 129-142.

Van der Putte, I., Laurier, M. B. H. M., and Van Eijk, G. J. M., 1982. Respiration and osmoregulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) exposed to hexavalent chromium at different pH values. **Aquatic Toxicology**, 2(2), 99-112.

Van Dyk, J. C., Pieterse, G. M., and Van Vuren, J. H. J., 2007. Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 66(3), 432-440.

Van Heerden, D., Vosloo, A., and Nikinmaa, M., 2004. Effects of short-term copper exposure on gill structure, metallothionein and hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, 69(3), 271-280.

Varanasi, U., and Markey, D., 1978. Uptake and release of lead and cadmium in skin and mucus of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, 60(2), 187-191.

Vaux, D. L., Haecker, G., and Strasser, A., 1994. An evolutionary perspective on apoptosis. **Cell**, 76(5), 777-779.

Viarengo, A., 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. **Rev. Aquat. Sci**, 1(2), 295-317.

Visoottiviseth, P., Thamamaruitkun, T., Sahaphong, S., Riengrojpitak, S., and Kruatrachue, M., 1999. Histopathological effects of triphenyltin hydroxide on liver, kidney and gill of Nile tilapia (*Oreochromis nilotica*). **Applied Organometallic Chemistry**, 13(10), 749-763.

Wallace, A., Abou-Zamzam, A. M., Alexander, G., and Brinkerhoff, F., 1971. **Regulation of the Micronutrient Status of Plants By Chelating Agents and Other Factors**, Edwards Brothers, Los Angeles, 309 p.

Wang, C., Liang, J., Zhang, C., Bi, Y., Shi, X., and Shi, Q., 2007. Effect of ascorbic acid and thiamine supplementation at different concentrations on lead toxicity in liver. **Annals of Occupational Hygiene**, 51(6), 563-569.

Winkaler, E. U., Silva, A. G., and Galindo, H. C. e Martinez C.B.R., 2001. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scient**, 23(2), 507-514.

Wong, C. K., and Wong, M. H., 2000. Morphological and biochemical changes in the gills of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to ambient cadmium exposure. **Aquatic Toxicology**, 48(4), 517-527.

Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR., 1980. Cell death: the significance of apoptosis. **Int Rev Cytol**, 68:251-306.

Yang, C.Z. and Albright, L.J., 1992. Effects of the harmful diatom *Chaetoceros concavicornis* on respiration of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Dis. Aquat. Org.**, 14, 105–14.

Yıldırım, M. Z., Benli, A., Selvi, M., Özkul, A., Erkoç, F., and Koçak, O., 2006. Acute toxicity, behavioral changes, and histopathological effects of deltamethrin on tissues (gills, liver, brain, spleen, kidney, muscle, skin) of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fingerlings. **Environmental Toxicology**, 21(6), 614-620.

Yılmaz, A. B., 2005. Comparison of heavy metal levels of grey mullet (*Mugil cephalus* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.) caught in Iskenderun Bay (Turkey). **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, 29(2), 257-262.

Yılmaz, A. B., Sangün, M. K., Yağlıoğlu, D., and Turan, C., 2010. Metals (major, essential to non-essential) composition of the different tissues of three demersal fish species from Iskenderun Bay, Turkey. **Food chemistry**, 123(2), 410-415.

Younis, E. M., Abdel-Warith, A. A., Al-Asgah, N. A., Ebaid, H., and Mubarak, M., 2013. Histological changes in the liver and intestine of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to sublethal concentrations of cadmium. **Pakistan J. Zool**, 45(3), 833-841.

Zamzami, N., and Kroemer, G., 1999. Apoptosis: Condensed matter in cell death. **Nature**, 401(6749), 127-128.

Zeitoun, M. M., and Mehana, E. S. E, 2014. Impact of water pollution with heavy metals on fish health: overview and updates. **Global Veterinaria**, 12(2), 219-231.

ÖZGEÇMİŞ

Alper YANAR, 1987 yılında Aydın'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Aydın'da tamamladıktan sonra 2005-2009 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'nde lisans eğitimini sürdürdü ve 2009 yılında Su Ürünleri Mühendisi ünvanı ile mezun oldu. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Yetiştiricilik Anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladı. Yüksek lisans eğitimi devam ederken 2011-2012 yıllarında ICCAT (Uluslararası Atlantik Ton Balıklarının Koruma Komisyonu)'a bağlı olarak Orkinos Milli Gözlemcisi olarak görev aldı. 2012 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi (M.K.Ü.) Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi'nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başlamasını takiben yüksek lisans eğitimine Şubat 2013'ten itibaren M.K.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Su ürünleri Anabilim Dalı'nda devam etti. 2015 yılında İskenderun Teknik Üniversitesi'nin kurulmasının ardından Araştırma Görevlisi görevini ve lisansüstü eğitimini İskenderun Teknik Üniversitesi'nde sürdürmektedir.