



KLORAMİN-T'NİN GÖKKUŞAĞI ALABALIĞINDA
(Oncorhynchus mykiss)
BAZI ANTIÖKSİDAN ENZİMLERİN
GEN EKSPRESYONUNA ETKİSİ

Esra YILDIRIM

Yüksek Lisans Tezi
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalı
Prof. Dr. Abdulkadir ÇİLTAŞ

2019

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KLORAMİN-T’NİN GÖKKUŞAĞI ALABALIĞINDA
(*Oncorhynchus mykiss*)
BAZI ANTIOKSİDAN ENZİMLERİN
GEN EKSPRESYONUNA ETKİSİ

Esra YILDIRIM

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2019

Her hakkı saklıdır



TEZ ONAY FORMU

KLORAMİN-T’NİN GÖKKUŞAĞI ALABALIĞINDA (*Oncorhynchus mykiss*) BAZI ANTİOKSİDAN ENZİMLERİN GEN EKSPRESYONUNA ETKİSİ

Prof. Dr. Abdulkadir ÇİLTAŞ danışmanlığında, Esra YILDIRIM tarafından hazırlanan bu çalışma, 10/10/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalı’nda yüksek lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Abdulkadir ÇİLTAŞ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Murat AYDIN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Emre İLHAN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu’nun **17./10/2019** tarih ve **...41.../...20...** nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2019-7125

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KLORAMİN-T'NİN GÖKKUŞAĞI ALABALIĞINDA (*Oncorhynchus mykiss*) BAZI ANTIOKSİDAN ENZİMLERİN GEN EKSPRESYONUNA ETKİSİ

Esra YILDIRIM

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Abdulkadir ÇILTAŞ

Kültürü yapılan balıklarda hastalıklardan korunma esastır. Bu amaçla kemoterapötik maddelerin (antibiyotik ve dezenfektanlar gibi) kullanımı oldukça yaygındır. Balık yetiştiriciliğinde kullanılan dezenfektanlardan biri olan Kloramin-T, hedef mikroorganizmalarda oksidatif hasara yol açarak ölümüne neden olurken, balıklarda da neden olabileceği oksidatif hasarın ve bu hasara yanıt olarak antioksidant enzimlerin seviyelerinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Yapılan bu çalışmada gökkuşağı alabalığında hastalıkları kontrol altına almak için tedavi amacıyla kullanılan Kloramin-T maddesinin balıktaki bazı antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Kloramin-T (2mg/L)'ye sub-lethal dozda 60 dakika süreyle maruz bırakılan balıklardan kas ve karaciğer dokuları alınmıştır. Bu dokulardaki SOD, CAT, GST ve G6PD genlerin ekspresyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Genler üzerindeki oksidatif stres düzeyinin araştırılması için yapılan bu çalışmada SOD, CAT, GST ve G6PD genlerinin mRNA transkript seviyeleri qRT-PCR ile ölçülmüştür. Elde edilen verilere göre, Kloramin-T uygulanan gökkuşağı alabalığı karaciğer ve kas dokularındaki SOD, CAT, GST ve G6PD genlerinin kontrol grubuna kıyasla fark önemli bulunmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında karaciğerde Kloramin-T'ye karşı en fazla stres gösteren gen yaklaşık 6,5 kat ile SOD geni olurken en az artış gösteren gen ise yaklaşık 4 kat ile GST geni olmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kas dokusunda Kloramin-T'ye karşı en fazla stres gösteren gen yaklaşık 6,2 kat ile GST geni olurken en az artış gösteren gen ise yaklaşık 0,4 kat ile G6PD geni olmuştur. Sonuç olarak araştırmamızda kullanılan Kloramin-T'nin balıklar üzerinde oksidatif strese yol açtığı ve biyokimyasal değişikliklere neden olduğu kanısına varılmıştır. Bununla birlikte, kültür balıkçılığındaki dezenfektan tedavisini izlemek için bu spesifik biyobelirteçlerin kullanımı hakkında daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır.

2019, 49 sayfa

Anahtar Kelimeler: Gökkuşağı alabalığı, karaciğer, kas, SOD, CAT, GST, G6PD, GAPDH, Kloramin-T

ABSTRACT

Master's Thesis

EFFECTS OF CHLORAMIN-T ON GENE EXPRESSION OF CERTAIN ANTIOXIDANT ENZYMES IN RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*)

Esra YILDIRIM

Ataturk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Agricultural Biotechnology
Department of Animal Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Abdulkadir ÇİLTAŞ

Protection from diseases in cultured fish is essential. The use of chemotherapeutic agents (such as antibiotics and disinfectants) for this purpose is quite common. The use of chemotherapeutic agents (such as antibiotics and disinfectants) for this purpose is quite common. While Chloramine-T, one of the disinfectants used in fish farming, causes oxidative damage and death in target microorganisms, it is important to determine the oxidative damage it can cause in fish and the levels of antioxidant enzymes in response to this damage. In this study, the effect of Chloramine-T, which is used to treat diseases in rainbow trout, on some antioxidant enzyme activities in fish was investigated. It received muscle and liver tissues from fish exposed to Chloramine-t (2mg/L) for 60 minutes. Effects on expression of SOD, CAT, GST and G6PD genes in these tissues have been investigated. mRNA transcript levels of SOD, CAT, GST and G6PD genes were measured with qRT-PCR in this study to investigate the level of oxidative stress on genes. According to the data obtained, the difference in sod, CAT, GST and G6PD gen expression in liver and muscle of rainbow trout administered Chloramine-T was significant compared to the control group. Compared to the control group, the most stressed gene against Chloramine-t in the liver was the SOD gene with about 6.5 times, while the least increased gene was the GST gene with about 4 times. When compared to the control group, the most stressed gene against Chloramine-t in muscle tissue was the GST gene with approximately 6.2 times, while the least increased gene was the G6PD gene with approximately 0.4 times. As a result, it was concluded that Chloramine-t used in our research causes oxidative stress on fish and causes biochemical changes. However, more detailed studies are needed on the use of these specific biomarkers to monitor disinfectant treatment in culture fisheries.

2019, 49 pages

Keywords: Rainbow trout, liver, muscle, SOD, CAT, GST, G6PD, GAPDH, Chloramine-T

TEŞEKKÜR

Tez alıőmamda tecrube, bilgi ve hoőgörösünü hiçbir zaman esirgemeyen danıőmanım Sayın Prof. Dr. Abdulkadir ÇILTAŞ'a içtenlikle teşekkür ederim.

Moleküler çalıőmalarımnda tüm labaratuvar imkân ve desteklerini hiç esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN ve doktora öğrencileri Atena GHASEDAK ve Ekrem SULUKAN'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalıőmasının her aşamasında değerli katkılarından dolayı Sayın Doç. Dr. Murat AYDIN'a içtenlikle teşekkür ederim.

Tez alıőması sırasında bana destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaőım Elif BASTEM'e teşekkür ederim.

Her zaman ve her koőulda yanımda olan, özelliğe manevi desteklerini hep üzerimde hissettiğim sevgili anne ve babama sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Esra YILDIRIM

Ekim, 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	11
3. MATERYAL ve METOT	19
3.1. Materyal.....	19
3.1.1. Araştırma yeri.....	19
3.1.2. Balık materyali	19
3.1.3. Su materyali.....	19
3.1.4. Kullanılan kimyasallar	20
3.1.5. Kullanılan alet ve cihazlar	21
3.1.6. Balıkların beslenmesinde kullanılan yem materyali	22
3.2. Metot	22
3.2.1. Deneme düzeni, balıkların bakımı ve Kloramin-T verilmesi.....	22
3.2.2. Doku örneklerin alınması ve muhafazası	23
3.2.3. Manuel olarak RNA izolasyonu	23
3.2.4. RNA'nın kantitatif tayini.....	24
3.2.5. RNA'nın kalitatif tayini.....	24
3.2.6. RT-PCR ile cDNA kütüphanesinin oluşturulması	25
3.2.7. Genlere spesifik primer ve TaqMan prob dizaynı.....	26
3.2.8. Gen ekspresyon sonuçlarının analizi ve değerlendirilmesi	27
3.2.9. İstatistiksel analiz	28
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	29
4.1. İzole Edilen RNA'ların Nanodrop Spektrofotometre Değerleri	29
4.2. Gen İfadelerinin Analizi	30

5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	36
KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇMİŞ	50



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Santigrat Derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
bç	Baz Çifti
CAT	Katalaz
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
Chl-T	Chloramine-T
CO ₂	Karbondioksit
dak	Dakika
ddH ₂ O	Deiyonize Distile Su
DEPC	Dietil Pirokarbonat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleosid Trifosfat
DYÜ	Dezenfeksiyon Yan Ürünler
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
EtBr	Etidyum Bromür
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FP	Forward Primer
G6PD	Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz
GAPDH	Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz
gr	Gram
GST	Glutasyon S-Transferaz
lt	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogram

nm	Nanometre
O ₂	Oksijen
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
RP	Reverse Primer
Rpm	1Dakikadaki Rotor Devir Sayısı (Rotor Per Minute)
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
RT-PCR	Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SEM	Standart Hata
sn	Saniye
SOD	Süperoksit Dismutaz
SOR	Serbest Oksijen Radikalleri
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UV	Ultraviyole Işın
V	Volt

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Gökkuşığı alabalığı	2
Şekil 4.1. Kloramin-T dezenfektan maddesine maruz bırakılan kas ve karaciğer dokularındaki SOD genine ait mRNA kat değişimi	32
Şekil 4.2. Kloramin-T dezenfektan maddesine maruz bırakılan kas ve karaciğer dokularındaki CAT genine ait mRNA kat değişimleri.....	33
Şekil 4.3. Kloramin-T dezenfektan maddesine maruz bırakılan kas ve karaciğer dokularındaki GST genine ait mRNA kat değişimleri	34
Şekil 4.4. Kloramin-T dezenfektan maddesine maruz bırakılan kas ve karaciğer dokularındaki G6PD genine ait mRNA kat değişimleri.....	35

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. En sık kullanılan dezenfektanların karşılaştırılması	5
Çizelge 1.2. Başlıca enzimatik endojen antioksidanlar	8
Çizelge 1.3. Enzimatik olmayan (nonenzimatik) antioksidanlar	9
Çizelge 3.1. Denemede kullanılan suyun kimyasal ve fiziksel özellikleri	19
Çizelge 3.2. Kullanılan kimyasal maddeler	20
Çizelge 3.3. Kullanılan alet ve ekipmanlar	21
Çizelge 3.4. Deneme süresince alabalıklara verilen yem içeriği	22
Çizelge 3.5. Araştırmada kullanılan genlerin primer ve propların baz dizilimleri	26
Çizelge 3.6. Real time PCR uygulamasında kullanılan maddeler	27
Çizelge 4.1. Total RNA konsantrasyonları (ng/μL) ve 260/280 (nm) oranlarına göre kas ve karaciğer dokusu değerleri	29
Çizelge 4.2. Referans gen ifadesine göre genlerin ifadesi	30
Çizelge 4.3. Kas ve karaciğer dokusundaki SOD, CAT, GST ve G6PD gen ifadelerine ait istatistiksel analizler	31

1. GİRİŞ

Dünyada her geçen gün nüfusun artışına bağlı olarak açlık oranı da artmaktadır. Artan nüfusun dengeli ve kaliteli beslenmesi de son derece önemlidir. Uzmanlar ve araştırmacılar hem ekonomik hem de besin değeri yüksek gıdaların elde edilmesinde çok sayıda çalışma yapmaktadır. Bir gıda maddesinin ekonomik olmasının yanı sıra karbonhidrat, yağ, protein, vitamin ve mineraller gibi önemli gıda bileşenlerini dengeli oranda içermesi gerekmektedir. Bu durumdaki önemli gıda maddelerinin başında su ürünlerinden oluşan gıdalar gelmektedir. Özellikle balıketi, besin değeri ve protein değerinin yüksek olmasının yanı sıra vitamin, mineral gibi besleyici maddeler ve büyümeyi etkileyen bazı besin maddeleri içermesi açısından son derece önemli bir gıda maddesidir (Şeker 2012).

Su ürünleri yetiştiriciliği, tarımın bir formudur ve çoğunlukla kırsal alanlarda gerçekleşen faaliyetleri içerir. Su ürünleri üretimi, diğer tarımsal faaliyetlerde olduğu gibi, yer aldığı ekosistem üzerinde belli bir etkiye sahiptir. Su ürünleri yetiştiriciliği uygulamalarının en başta, küresel gıda güvenliğini sağlayıp, beslenmedeki sorunları çözerek, çevreye minimum olumsuz etki ve topluma maksimum fayda ile ekonomik gelişime katkı sağlaması beklenmektedir (Yavuzcan vd 2019).

2016 FAO (birleşmiş milletler gıda ve tarım örgütü) verilerine göre dünya su ürünleri üretimi yaklaşık 171 milyon ton olarak verilmiştir. 2017 TÜİK verilerine göre ise Türkiye’de su ürünleri üretimi yaklaşık 630 bin ton olarak verilmiştir (Anonim 2019b).

Su ürünlerinde yetiştiriciliği yapılan en önemli türler alabalık, levrek ve çipuradır. Denizlerden yetiştiricilik yoluyla üretilen balıkların %54’ünü levrek, %37’sini çipura, %5’ni alabalık oluşturmaktadır. İç sularda yapılan su ürünleri yetiştiriciliğinde üretilen balıkların büyük bir çoğunluğunu ise alabalıklar oluşturmaktadır (Anonim 2019a).

Kültür balıkçılığı kapsamında ülkemizde de başarılı bir şekilde yetiştiriciliği yapılan alabalık, berrak, soğuk, oksijen oranı çok olan akarsularda, göllerde ve kaynak sularında yaşamaktadır (Demir vd 2018).

Sistematikte *Salmonidae* familyasında yer alan alabalıklar, serin, berrak, temiz ve oksijen yönünden zengin suları tercih ederler. Bu familya içinde *Salmo*, *Salvelinus* ve *Oncorhynchus*; yetiştiriciliği ekonomik olan ve doğal suların balık yetiştiriciliğine uygun hale getirilmesi açısından son derece önemli türlerdir (Anonim 2019c).

Dünyada olduğu gibi ülkemizde de balık yetiştiriciliği giderek büyüyen ve gelişen sektördür. Ülkemizde balık yetiştiriciliği denildiğinde çevre koşullarına son derece iyi bir şekilde adapte olabilmesi, ortam şartlarına dayanıklı olması, aktif yem alma kapasitesinin yüksek ve kolay yemlenmesi, kısa kuluçka devresine sahip olması ve dolayısıyla yetiştiriciliğinin ekonomik olması nedeniyle Gökkuşaağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) en çok tercih edilen balık türüdür (Okumuş 2002).

Ülkemizde ilk gökkuşaağı alabalığı yetiştiriciliği 1969 yılında Zonguldak Yedi Göller Doğal Parkı'nda başlamış ve ilk yetiştiricilik faaliyeti 1970 yılında gerçekleşmiştir (Çantaş 2015).



Şekil 1.1. Gökkuşaağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) (Anonim 2019c)

Metabolik bozukluklar, tümör ve organ dejenerasyonu gibi iç etkenler ile fiziksel, kimyasal ve biyolojik gibi dış etkenler canlılarda hastalıklara neden olur. Balıklarda da bu etkenlerin bir ya da bir kaçının bozulması balıklarda strese sebep olur. Bu aşamada içinde bulunduğu duruma uyum sağlamak için biyokimyasal değişimler geçirir. Balıkta stres seviyesinin yükselmesiyle vücudun genel savunma sistemi baskılanarak balığın bünyesi bu iç ve dış etkenlerle mücadele edemeyecek hale gelir ve dolayısıyla hastalanır (Balta 2016).

Balık yetiştiriciliğinde hastalıklar büyük ekonomik kayıplara yol açar. Bir balıkta başlayan hastalık çok kısa zamanda diğer balıklara da bulaşır ve hızla yayılır. Bu hastalıklar oluşuktan sonra onu tedavi etmek çok zor olup, uzun ve maliyetli bir çalışmayı gerektirmektedir. Bu nedenle kültür balıkçılığında en başından hastalıkların ortaya çıkmasını ve yayılmasını önlemek için çeşitli hijyenik ve profilaktif tedbirler alınmakta, farklı etkilere sahip dezenfektanlar kullanılmaktadır (Yonar *et al.* 2014).

Balıklar, normal koşullar altında, doğal savunma mekanizmaları ile kendilerini hastalık etkenlerine karşı korurlar. Ancak, kültür balıkçılığında, hastalık etmenlerinin yüksek derecede değişken olması, immun sistemin kolaylıkla baskılanmasına neden olmaktadır. İmmun sistemi baskılanmış olan balıklarda, potansiyel hastalık etkenleri aktif hale geçerek enfeksiyonlara neden olabilmektedir (Balık 2016).

Kültürü yapılan balıklarda hastalıklardan korunmak için öncelikle; hastalıklara dirençli türler yetiştirilmeli, temiz, berrak, uygun sıcaklık ve oksijene sahip bir ortam sağlanmalıdır. Ayrıca yeterli besleme yapılmalı ve uygun vitamin takviyesi uygulanmalıdır. Korunma amaçlı aşı ve kemoterapötik maddeler kullanılmalıdır (Balta 2016).

Kültür balıkçılığında çeşitli amaçlarla ve en sık kullanılan kemoterapötik maddeler; dezenfektanlar, antibiyotikler ve anestezipler gibi kimyasal maddelerdir (Balık 2016).

Kemoterapi, 19. yüzyılın sonlarında Alman araştırmacı Paul Ehrlich tarafından ortaya atılan bir terimdir. Kemoterapide amaç konakçıya zarar vermeden ya da çok az zarar vererek vücudunda bulunan bakteri, iç ve dış parazit, virüs, protozoa gibi zararlıların gelişmesini engellemek ya da tamamen ortadan kaldırmaktır (Anonim 2019d).

Bakteri hastalıklarını kontrol altına almak amacıyla enfekte olan balıklar antibiyotik ilaveli yemlerle beslenir. Ancak bu uygulama hasta balıkların yemi almaması durumunda etkisiz olabilmektedir. Ayrıca, antibiyotik başta olmak üzere çeşitli dezenfektanların sıklıkla kullanımı balıkların bağışıklık sistemini olumsuz bir şekilde etkilemektedir. Özellikle yumurtadan yeni çıkan balıklarda bu ilaçların yan etkileri belirgin bir şekilde görülmektedir. İmmünolojik olarak anaçlardan gelen bağışıklıktaki yetersizlik, balığın kolaylıkla hasta olmasına, hastalıktan kurtulma süresinin uzamasına, kullanılan ilacın etkisiz olmasına ve etkenin patojenitesinin artmasına neden olmaktadır. Bu durum, antibiyotik dirençli bakterilerin neden olduğu hastalıkların tedavisini güçleştirmektedir (Kurtoğlu ve Korun 2018).

Diğer bir kemoterapötik yöntem olan dezenfektanlar çoğunlukla banyo şeklinde uygulanmaktadır. Dezenfektanların kullanım alanları oldukça geniştir; içme sularından yüzme havuzlarına, alet ve malzemelerin dezenfeksiyonundan balıklarda görülen biyolojik enfeksiyonlara kadar etkin bir şekilde kullanılır. Dezenfeksiyon yöntemleri ile sulara gerekli standartlara uygunluğunun sağlanması ve içerisinde bulunan patojen mikroorganizmaların giderilmesi sağlanmaya çalışılır (Bilgin 2014).

Ancak kullanılan dezenfektana ve suda bulunan öncü madde varlığına bağlı olarak değişen, çeşitli dezenfeksiyon yan ürünleri (DYÜ) oluşur. Bu nedenle ideal bir dezenfektanda olması gereken özellikler; kısa sürede patojenleri yok etmesi, suya tat, renk ve koku vermemesi, kullanımının kolay, fiyatının ekonomik olması, etkili bir dezenfeksiyon uygulaması, suya verilmeden önceki ve suya verildikten sonraki konsantrasyonu kolayca tayin edilebilir olmasıdır (Karadağ 2011).

Çizelge 1.1. En sık kullanılan dezenfektanların karşılaştırılması (Karadağ 2011)

Dezenfektan	Dezenfeksiyon etkinliği	DYÜ oluşumu	Renk giderici özelliği	Koku giderici özelliği
Klor	İyi	Normal miktarda	İyi	İyi
Kloraminler	Orta iyi	Az miktarda	Yok	Çok iyi
Klor dioksit	Çok iyi	Normal miktarda	İyi	İyi
Ozon	Çok iyi	Az miktarda	Mükemmel	Mükemmel
Ultraviyole	İyi	Yok	Yok	Yok

Klor, gaz ve sıvı olarak birçok alanda ve üründe dezenfektan olarak kullanılan ancak zararlı etkileri olan bir elementtir. Klor, azotla yani amonyakla reaksiyona girerek kimyasal bileşikler oluşturur bunlara kloramin denir. (Cengiz 2016).

Kloraminler, oda sıcaklığında sarı-yeşil renkli zehirli bir gazdır ve suya eklendiği zaman suyla birlikte hipokloröz asit ve daha sonra iyonlarına ayrışarak hipoklorit iyonuna dönüşür. Eğer suda amonyak varsa klor suya eklendiği zaman inorganik bileşik olan kloraminleri (monokloramin, dikloramin, trikloramin) oluşturur (Karadağ 2011).

Kloramin-T, dezenfektan ve antiseptik olarak kullanılan bir kimyasaldır. İnaktif bileşenleri olmayan saf bileşenlerden oluşan beyaz, şeffaf ve kristalimsi bir toz olan kloramin-T suda çözündüğünde hipoklorit formdadır. Hipoklorit iyonlar güçlü bir oksidandır ve hızlıca hücreyi tahrip eder. Mikrop, zamanla oksidana direnç geliştiremez ve bu nedenle antimikrobiyal direnç kloramin-T için bir sorun değildir. Son zamanlarda

balık solungaçlarında meydana gelen bakteriyel hastalıkların tedavisi için de birçok kez uygulanmıştır (Bowker *et al.* 2011).

Bir antimikrobiyal etken olarak kloramin-T, tarım, tıp, veterinerlik ve gıda üretimi gibi geniş çaplı uygulamalarda yaygın olarak kullanılmıştır. Ayrıca bir dezenfektan olarak yüzey ve araçların dezenfeksiyonu için de kullanılır. kloramin-T düşük bir sitotoksositeye sahip olduğu için dokulara doğrudan temas olan durumlarda güvenle kullanılabilir. Büyük Britanya'da tüberküloz, çiftlik hayvanları hastalıkları, gıda ve ağız hastalıklarında uygulanmasının yanı sıra mutfak, kesimhane ve yoğun tarım uygulamaları gibi çeşitli endüstri dallarında da kullanılır (Masten 2002).

Flavobacterium branchiophilum ve diğer sarı pigmentli, filamentli bakterilerin neden olduğu bakteri solungaç hastalığı balıklarda ölüme neden olur. kloramin-T, tatlı sularda yetiştirilen balıkların ölüm oranlarını kontrol etmek için kullanılan etkili bir biyosittir (Bowker *et al.* 2011).

Canlı organizmalarda dışarıdan alınan besinlerin enerjiye dönüşümünde oksijen kullanılır ve bu dönüşüm esnasında serbest oksijen radikalleri (SOR) adı verilen reaktif moleküller oluşur. Bu reaktif moleküllerin aşırı üretimi ya da yetersiz metabolize olması sonucu hücrenin redoks durumunda istenmeyen yönde değişiklikler ortaya çıkar. Serbest oksijen radikallerinin karbonhidrat, protein, lipid ve nükleotit gibi yapılara olumsuz yönde etki etmesini inhibe eden ya da geciktiren enzim ve yapılara antioksidan adı verilir (Bostancı 2014).

Antioksidanlar serbest radikaller için kolay bir elektron hedefi oluşturur ve iki serbest radikali birleştirerek inhibe edebilme özeliğine sahiptir. Bir enzime taşınana kadar radikalle istikrarlı bir yapı oluşturur. Serbest radikaller inhibe edilemezlerse vücutta DNA mutasyonları, hücre ölümleri ve hastalıkları gibi çok ciddi hasarlara neden olabilirler (Thompson 2004).

Canlı hücrelerde serbest oksijen radikaller (SOR) ve antioksidanlar canlı yaşamının bir gereği olarak kontrollü ve sürekli bir şekilde üretilir. Hücresel bütünlüğün ve fonksiyonların normal düzeylerde tutulması için aşırı üretilen serbest oksijen radikaller, endojen glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GPO), glutatyon reduktaz (GRx), glutatyon s transferaz (GST), süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve diğer antioksidan (A,C, E vitaminler) savunma sistemlerince nötralize edilirler (Süleyman vd 2018).

Canlı sistemlerdeki antioksidan savunma sistemindeki antioksidan molekülleri, radikal önleyici, radikal süpürücü ve radikallerin neden olduğu hasar onarımı şeklinde farklı seviyelerde hareket eder. Birinci basamak savunma antioksidanları hücrelerde serbest radikallerin veya reaktif türlerin oluşumunu baskılayan veya önleyen bir antioksidan koleksiyonudur. İkinci basamak savunma antioksidanları serbest radikalleri nötralize eder veya temizlerler ve bu süreçte serbest radikallerin kendileri olurlar ancak daha az zararlı etkiler yaparlar. Üçüncü basamak savunma antioksidanları hasarlı DNA, protein ve lipitleri onarır ayrıca vücut dokularına toksik olabilecek birikimlerini önlemek için okside olmuş veya hasar görmüş proteinleri, DNA ve lipitleri tanırlar, parçalarlar ve temizlerler. Dördüncü basamak savunma antioksidanları ise serbest radikalden üretilen sinyali algılayıp, uygun bir antioksidanın oluşumunu ve doğru bölgeye taşınmasını sağlar (Ighodaro and Akinloye 2018).

Balıklarda, buldukları ortamdaki su kalitesindeki bir takım değişiklikler, toksik maddeler, kirlilik, oksijen azlığı, sıcak soğuk dengesinin bozulması, mikrobiyal bulaşmalar, hastalık ve yetersiz beslenme gibi stres faktörleri balığın doğrudan fizyolojik durumunu etkilemekte ve organizmada serbest radikallerin oluşmasına neden olmaktadır. Serbest radikaller, canlıdaki hücreleri parçalayarak yaşlanmaya ve hastalıklara yol açan tahrip edici moleküllerdir (Yonar vd 2014).

Glukoz 6 - fosfat dehidrojenaz (G6PD), memelilerde X-bağlantılı bir gen tarafından kodlanan bir temizlik enzimidir. Aracı metabolizmada önemli işlevlere sahiptir, çünkü pentoz fosfat yolundaki ilk adımı katalize eder ve NADPH şeklinde indirgeyici potansiyel

sağlar. G6PD enzimi hücreyi oksidan hasarlardan korumak amacıyla görev yapar (Pandolfi *et al.* 1995). Glikoz-6-fosfat dehidrojenaz geni (G6PD), pentoz fosfat yolundaki NADPH üretimi sayesinde oksijen radikallerinin detoksifikasyonuna katılır ve bu nedenle oksidatif stres ve DNA hasarı için hücre koruyucu bir enzim olarak kabul edilmiştir (Lopez *et al.* 2007).

Antioksidanlar, serbest oksijen radikallerinin oluşumunu engelleyerek ve oluşan serbest oksijen radikalleri etkisiz hale getirerek etkilerini gösterir. Antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayan şekilde sınıflandırılırlar (Bostancı 2014).

Çizelge 1.2. Başlıca enzimatik endojen antioksidanlar (Acar 2015)

Antioksidanlar	Reaksiyonlar
Süperoksit dismutaz (SOD)	Süperoksit serbest radikalini hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir. SOR'lara karşı ilk savunma adımudur.
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	Eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidan enzim olan GSH-Px hidroperoksitlerin metabolize olmasını sağlar.
Glutasyon redüktaz	GSH-Px metabolizesi sonrası oluşan okside glutasyonu tekrar indirgenmiş glutatyona dönüşümünü sağlar.
Glutasyon-S-transferaz (GST)	Lipid peroksitlere karşı GSH-Px aktivitesi göstererek antioksidan savunma mekanizması oluştururlar.
Mitokondriyal-sitokrom oksidaz	Solunumun zincirinin son enzimi olup, süperoksidi elemine eder.
Katalaz	Hidrojen peroksidi ve hidroksili suya ve oksijene parçalayarak, hidrojen peroksidin ve hidroksilin radikallerinin oluşumunu önler.

Çizelge 1.3. Enzimatik olmayan (nonenzimatik) antioksidanlar (Acar 2015)

Antioksidanlar	Reaksiyonları
Melatonin	Melatonin, canlı hücrelerde lipofilik özellik gösterir. Böylece hücrenin hemen hemen bütün organellerine kadar ulaşarak hidroksil ve süperoksit radikallerini bağlayarak antioksidan etki gösterir.
Seruloplazmin	Ferro demiri (Fe^{2+}) ferri demire (Fe^{3+}) yükseltgeyerek fenton reaksiyonunu ve hidroksil radikali oluşumunu engeller.
Transferrin	Serbest demir iyonlarını bağlayarak fenton reaksiyonunu önler.
Laktoferrin	Düşük pH'lı ortamlardaki demir iyonlarını bağlar
Glutasyon (GSH)	Tripeptiddir ve karaciğerde sentezlenir. Hemoglobinin oksitlenmesini önler. Eritrositleri, lökositleri, göz lensini oksidatif hasara karşı korur.
Sistein	Süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır.
Ürik asit	Genelde metal bağlayıcı olarak çalışırken değişik radikalleri de toplar.
Glikoz	Hidroksil radikali gidericisidir.
Albumin	Hipokloroz asit radikalini toplayarak proteini ve metal iyonlarını bağlar.
Bilirubin	Önemli bir peroksil radikali toplayıcısıdır.

Araştırmamızda, Gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) uygulanan Kloramin-T'nin kas ve karaciğerde oluşturabileceği oksidatif stres düzeyinin incelenmesi hedef alınmıştır. Balıklarda meydana gelebilecek hastalıkları tedavi ederken balık antioksidan genleri üzerine olabilecek etkisi tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla kloramin-T sublethal (2mg/L) dozda (Arslan ve Özdemir 2018) uygulanan gökkuşağı alabalıklardan kas ve karaciğer dokuları alınarak antioksidan enzimleri kodlayan genlerin (SOD, CAT, GST ve G6PD) mRNA transkript seviyeleri qRT-PCR ile ölçülmüştür.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Çiltaş vd (2003), yaptıkları çalışmada paraziter ve bakteriyel hastalıkların geleneksel tedavilerinde kullanılan kloramin-T ve CuSO_4 gibi kemoterapötik bileşiklerin etkilerini araştırmışlardır. kloramin-T ve bakır sülfatın (CuSO_4) G6PD üzerindeki etkileri in vitro olarak araştırmışlardır. kloramin-T ve CuSO_4 'ün enzim üzerinde inhibe edici etkilerini saptamışlardır. İn vivo çalışmalarda ise gökkuşağı alabalığı eritrositlerinde G6PD'nin bir saat içinde CuSO_4 tarafından önemli ölçüde inhibe edildiğini ancak kloramin-T tarafından inhibe edilmediğini tespit etmişlerdir.

Altınok (2004), yaptığı çalışmada *Flavobacterium columnare* ile enfekte edilen yavru süs balıklarının ölüm oranını kontrol etmek için kloramin-T'nin etkisini ve normal şartlar altında Kloramin-T'nin toksisite şiddetini belirlemeye çalışmıştır. Toksikite testinde kloramin-T konsantrasyonunu 5 - 40mg\L'a kadar sıralamıştır. Elde ettiği sonuca göre kloramin-T konsantasyonu 20 ya da 25mg\L'ye kadar çıkartıldığında balıkların hayatta kalma oranının azaldığını gözlemlemiştir. Sonuç olarak 15mg\L'ye kadar kloramin-T'nin *columnaris* hastalığının tedavisi için kullanılabileceği kanısına varmıştır.

Balta vd (2009), Doğu Karadeniz Bölgesindeki Gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliğinde yüksek oranda ölümlere neden olan *contiasis* enfeksiyonunun etkin tedavisini çalışmışlardır. Bu amaçla gökkuşağı alabalıklarında farklı dozda formalin ve kloramin-T denemeleri yapmışlardır. En etkin tedavi 15°C'de 0,3 mg/l dozunda 20 dakika formalin uygulamasının olduğunu tespit etmişlerdir.

Bowker *et al.* (2011), yaptıkları çalışmada ABD onayını desteklemek üzere veri üretmek için, Kloramin-T'nin bakteriyel solungaç hastalığının ölüm oranını kontrol etmedeki etkinliğini araştırmışlardır. *Oncorhynchus keta*, *O. gilae apache* ve *O. mykiss* balıklarına yapılan uygulama sonucunda toplam ölüm oranlarının kontrol gurubuna oranla anlamlı derecede azaldığını tespit etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre ABD'de bakteriyel

solungaç hastalığı teşhisi konulan tatlı su kaynaklı salmonidlerde mortaliteyi kontrol etmek için kloramin-T kullanımını desteklediklerini belirtmişlerdir.

Boran ve Altınok (2014), yaptıkları çalışmada yavru gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum))'nda Kloramin-T'nin antioksidan enzim sistemi ve genetik yapı üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Kontrol ile karşılaştırıldığında, Kloramin-T'nin, balıkların kırmızı kan hücrelerinde önemli bir DNA hasarına neden olmadığını tespit etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre 10 ya da 20 mg L⁻¹ Kloramin-T'nin, gökkuşuğu alabalığının dış parazitik ve bakteriyel enfeksiyonunu önlemek veya tedavi etmek için güvenle kullanılabileceği kanısına varmışlardır.

Arslan ve Özdemir (2019), yaptıkları çalışmada, gökkuşuğu alabalıklarına (*Oncorhynchus mykiss*) uygulanan Kloramin-T'nin solungaçlarda oluşturacağı oksidatif stres düzeyini ve bu stresin beyindeki nöronal aktiviteyi etkileyip etkilemediğini araştırmışlardır. Bu amaç için gökkuşuğu alabalıklarına sub-lethal dozda (2,8 mg/L) 0-1-24-48-72 ve 96 saat Kloramin-T uygulaması yapmışlardır. Daha sonra antioksidant enzimleri kodlayan genlerin (süperoksit dismutaz 1 (SOD1), süperoksit dismutaz 2 (SOD2), katalaz (CAT), glutathion peroksidaz 1 (GPX1), glutathion peroksidaz 4 (GPX4)) mRNA transkript seviyeleri qRT-PCR ile ölçmüşlerdir. Kloramin-T uygulanan balıkların solungaçlarında SOD1, SOD2, CAT ve GPX1 genlerinin ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna göre önemli derecede arttığını gözlemlemişlerdir. Çalışmadan elde edilen bu sonuçlara göre, aşırı ve/veya yanlış Kloramin-T uygulamasının gökkuşuğu alabalıklarının solungaç dokularında oksidatif strese neden olduğunu ve oksidatif strese maruz kalan balıkların beyin dokularında nöronal aktivitenin negatif yönde etkilendiği kanısına varmışlardır.

Heidarieh *et al.* (2013), yaptıkları çalışmada Aloe vera bitkisinin gökkuşuğu alabalığının büyüme performansı ve gastrointestinal sistemdeki bazı histolojik değişiklikler ve *Streptococcus agalactiae*'ye (*S. agalactiae*) karşı hastalık direnci üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda Aloe veranın, spesifik büyüme hızı ve yem dönüşüm

oranı ile sonuçlandığını gözlemlerken *S. agalactiae* ile mücadeleden sonraki ölüm oranının anlamlı derecede düşük olduğunu tespit etmişlerdir.

Ural vd (2013), yaptıkları çalışmada gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1972) yumurtalarına kuluçkalama evresinde mantarlaşmaya karşı dezenfektan olarak antimikrobiyal bir madde olan sirkenin kullanılabilirliğini araştırmışlardır. Bu amaçla içerisinde hiçbir katkı maddesi bulunmayan ticari bir sirke kullanmışlardır. Çalışma süresince döllenmiş yumurtalar bir hafta arayla sirkenin 2, 4, 8 ve 12 ml/L konsantrasyonlarına 15 dakika süreyle banyo şeklinde maruz bırakmışlardır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında gökkuşuğu alabalığı yumurta ve larvalarının dezenfeksiyonunda, kimyasallar yerine doğal bir dezenfektan olan sirkenin kullanılabilmesi ve en uygun sirke konsantrasyonunun ise 12ml/L olduğunu tespit etmişlerdir.

Yonar vd (2014), yaptıkları çalışmada, balık hastalıklarının tedavisinde ve dezenfektan olarak yaygın bir şekilde kullanılan formaldehit (CH_2O)'in gökkuşuğu alabalığında bazı hematolojik ve antioksidan parametrelere etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla, formaldehitin 40 ve 120 ppm'lik konsantrasyonları balıklara 4 gün boyunca 30 dakika süreyle uygulamışlardır. Formaldehit uygulanan deneme gruplarında hematolojik parametrelerin tamamının kontrol grubuna göre azaldığını belirlemişlerdir. Kontrol grubuna göre formaldehit uygulanan gruplarda doku MDA konsantrasyonunun arttığını saptamışlardır. GSH-Px ve GST enzim aktiviteleri ile GSH düzeyinin ise kontrol grubuna göre arttığını belirlemişlerdir. Bu artış yalnızca böbrek GST aktivitesinde istatistiksel olarak önemsiz bulmuşlardır.

Bulut vd (2015), yaptıkları çalışmada, su ürünleri sektöründe balık hastalıklarının kontrolü ve dezenfektan olarak yaygın bir şekilde kullanılan ancak çeşitli çevresel olumsuzluklara sebep olabilen formaldehitin balıklar üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada 250 mg/L (1 saat) ve 500 mg/L (45 dk) konsantrasyonlarında formaldehit uygulamışlardır. Çalışma sonucunda elde edilen histopatolojik bulgularda formaldehit uygulanan balıkların solungaç lamellalarda pılar ve epitel hücrelerinde

dejenerasyon, interlamella alanlarda lenfoid ve mononükleer hücre infiltrasyonu ve nekroz, kas dokularında dejenerasyon ve hepatositlerde dejenerasyon belirlemiştir. Sonuç olarak formaldehit uygulamasının gökkuşuğu alabalıklarında histolojik olarak olumsuz etkilere neden olduğunu gözlemlemiştir. Bu nedenle su ürünleri işletmelerinde bilinçli ve ihtiyaç dahilinde kullanılması gerektiği kanaatine varmışlardır.

Serdoz *et al.* (2011), yaptıkları çalışmada normalde ilaçlı yem şeklinde verilen bir makrolit antibiyotiği olan eritromisin farklı bir yöntem olarak kendinden emülsifiye edici bir sistem şeklinde uygulanmasının gökkuşuğu alabalığı üzerinde eritromisin bazının biyo yararını arttırıp arttırmadığını araştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre mikroemülsifiye edilmiş eritromisin içeren yemlerin büyük ölçüde üstün oral biyoyararlanım sağladığını ve bakteriyel enfeksiyonlara karşı aynı etkililiği çok daha düşük bir ilaç dozu ile elde etme avantajını sağladığını tespit etmişlerdir.

Lia *et al.* (2010), yaptıkları çalışmada bir anti epileptik ilaç olan karbamazepin (CBZ)'in gökkuşuğu alabalığının beyindeki antioksidan savunma sistemine etkisini araştırmışlardır. Elde ettikleri sonuca göre CBZ'ye uzun süre maruz kalmak aşırı reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olduğunu, sonunda lipitler ve proteinlerde oksidatif hasar ile sonuçlandığını ve balık beyinde antioksidan kapasitelerini inhibe ettiğini gözlemlemiştir. Kısacası, düşük oksidatif stres seviyesi, antioksidan enzimlerin adaptif tepkilerini indükleyebileceğini, ancak CBZ'ye uzun süre maruz kalmak balık beyinde ciddi oksidatif hasara yol açabileceğini tespit etmişlerdir.

Lia *et al.* (2011), yaptıkları çalışmada verapamil (VRP) (bir kardiyovasküler ilaç)'in yavru yarı alabalıklar (*Oncorhynchus mykiss*) üzerine toksik etkilerini incelemiştir. Verapamile maruz bırakılan balıkların morfolojik endeksleri, hematolojik parametreleri ve farklı dokuların (beyin, solungaç, karaciğer, kas ve bağırsak) antioksidan yanıtları da dahil olmak üzere birçok biyobelirteçlerini ölçmüşlerdir. Sonuçlara dayanarak, VRP'ye maruz kalan balıklarda çevre ile ilişkili konsantrasyonda ölçülen tüm parametrelerde önemli bir değişiklik olmamasına karşın, yüksek konsantrasyonlara maruz kalan balıklarda VRP'nin neden olduğu stresten dolayı

fizyolojik ve biyokimyasal yanıtlarda önemli değişiklikler gözlemlemiştir. Sonuç olarak balıklardaki çoklu tepkilerin, VRP'nin fizyolojik strese neden olduğunu tespit etmişlerdir.

Talas vd (2008), yaptıkları çalışmada Cd^{+2} , Cr^{+3} ve Se metallerinin *Oncorhynchus mykiss*'in karaciğer dokusunda biyokimyasal parametreler üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Gökkuşığı alabalığını ağır metal stresine maruz bırakmışlardır. Selenyum tedavisinin bazı biyokimyasal parametreler üzerindeki koruyucu etkisinin belirlenmesi için aynı dozda (2 ppm) uygulamasını yapmışlardır. Ağır metallere maruz kalan balık gruplarındaki karaciğer dokusunda katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ve malondialdehit (MDA) seviyelerinde biyokimyasal parametrelerde değişiklik gözlemlemiştir. Selenyum uygulanmış gruplarda kontrol gruplarına daha yakın değerler elde etmişlerdir. İstatistiksel değerlendirme sonucunda, ağır metal toksisitesine maruz kalan grupların biyokimyasal parametrelerinde meydana gelen olumsuz etkileri selenyum tedavisi sonucunda önemli ölçüde ortadan kaldırıldığını tespit etmişlerdir.

Grynevych *et al.* (2018), yaptıkları çalışmada su ürünleri yetiştiriciliği sistemlerinde sıklıkla karşılaşılan ve balıklar için toksik olan nitritin yavru tatlı su balıklarından *Oncorhynchus mykiss*'in solungaçlarına, karaciğerine ve böbrek histopatolojisine etkisini araştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlarda balıkların solungaçlarında, karaciğerinde ve böbreklerinde mikroskopik olarak gözlenen histopatolojik değişikliklerin dokularda hasar gösterdiğini kontrol grubunun ise solungaçlarında, karaciğerinde ve böbreklerinde normal bir yapı gözlemlemiştir. Nitrite maruz kalmış balıklarda gözlemlenen en karakteristik özellikler ise ağız boşluğu, solungaç ve balık vücudu yüzeyindeki kanamalar; karaciğer kapsülü altında ve parankimin stratumunda fokal kanamalar olmuştur.

Yonar vd (2016), yaptıkları çalışmada, farklı bakır sülfat konsantrasyonlarına ($CuSO_4$) maruz kalan gökkuşığı alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) antioksidan tepkilerini değerlendirmeğe çalışmışlardır. Elde edilen sonuçlar, MDA seviyelerinin balık

dokularında arttığını göstermiştir. Kontrole kıyasla, farklı CuSO₄ konsantrasyonlarına maruz kalan balıklarda GSH seviyesi ve GSH-Px ve CAT aktiviteleri önemli ölçüde azaldığını tespit etmişlerdir.

Denk *et al.* (2011), yaptıkları çalışmada propolisin etanolik ekstraktının (EEP) gökkuşağı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) plazma biyokimyasal parametreleri üzerindeki etkisini ve büyüme performansını araştırmışlardır. Araştırma sonucunda EEP takviyesinin, balığın spesifik büyüme hızını önemli ölçüde iyileştirdiğini ve yem verimi oranını ve protein verim oranını arttırdığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca EEP desteği genellikle plazma süperoksit dismutaz, lizozim, toplam antioksidan kapasite, glutatyon peroksidaz ve katalaz aktivitelerini arttırdı, fakat plazma malondialdehit seviyesini düşürdüğünü tespit etmişlerdir.

Sahiti *et al.* (2018), yaptıkları çalışmada ağır metallerin (Pb, Cr ve Cd gibi) *Cyprinus carpio*'un biyokimyasal ve hematolojik parametreleri üzerine yaptığı olumsuz etkileri ve bu olumsuz etkilerin hafifletilmesi için vitamin C'in etkinliğini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda ağır metallere maruz kalan balıkların solungaçlarında GST ve MDA değerlerinde önemli bir artış gözlemlemişlerdir. Ayrıca önemli bir artışta alkalın fosfat (ALP) ve aspartate aminotransferaz (AST)'da gözlemlerken kandaki toplam protein oranında düşüş tespit etmişlerdir. C vitamini uygulaması sonrasında ise MDA ve GST seviyelerinde önemli bir oranda düşüş olduğunu gözlemlemişlerdir. Elde ettikleri sonuca göre balıktaki ağır metallerin toksik etkilerine karşı vitamin C takviyesi yapılabilir.

Sanchez *et al.* (1997), yaptıkları çalışmada yavru gökkuşağı alabalığı olan *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), haftada iki kez, 1 saatlik bir statik kloramin bath T (10 mg l⁻¹ banyo) ile tedavi etmişlerdir. Solungaç hasarının morfolojik göstergeleri ve artırılmış ve çiftlenmiş arıtılmamış tanklardaki balıkların solungaç mukoza hücrelerinin histokimyasal özelliklerini karşılaştırmışlardır. Elde ettikleri sonuca göre Kloramin-T'nin kullanımının, ortalama lamel genişliğinde hafif bir artışa neden olduğunu, ancak daha yüksek derecede lamel ödem, lamel füzyonu, doku infiltrasyonu, işlem görmüş pillar kanallarının epitelyal

hiperplazisi, klorür hücre metaplazisi veya trombozuna neden olmadığını tespit etmişlerdir.

Bullock *et al.* (1991), yaptıkları çalışmada Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'teki bakteriyel solungaç hastalığının kontrolü için Kloramin-T'nin etkinliğini belirlemek için üç kuluçkahane denemesi yaparak her çalışmada, 8,5 mg kloramin-T / L tedavisi ile tek bir akış kullanmışlardır. Tek tedavi her üç denemede de etkili kontrol sağlamışlar ancak bir salgının erken aşamalarında tedaviye başladığında sonuçların en iyisi olduğunu gözlemlemişlerdir. Bir salgın ileri aşamadaysa veya balık stres altındaysa, ikinci veya üçüncü bir tedavi gerekebileceği kanısına varmışlardır.

Tkachenko *et al.* (2015), yaptıkları çalışmada akuakültürde kullanılan farklı dezenfektanların tedavisinin, SOD aktivitesi seviyesinde anlamlı bir artışa neden olduğunu tespit ederken doku oksidatif stres biyobelirteçleri, kloramin-T veya CIP dezenfektan maruziyetinde değişiklik saptamamışlardır. Tkachenko and Grudniewska. (2017), yaptıkları bir başka çalışmada ise Kloramin-T ile dezenfeksiyonun gökkuşığı alabalığının kas dokusu üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre L başına 9 mg dozunda Kloramin-T'nin en azından kısmen oksidatif stresi azaltabildiğini ve gökkuşığı alabalığının profilaktik dezenfekte edici tedavisi için kullanılabileceğini tespit etmişlerdir.

Tkachenko and Grudniewska. (2017), yaptıkları çalışmada Kloramin-T ile dezenfeksiyonun Gökkuşığı alabalığının kas dokusu üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Kloramin-T banyolarının, lipid peroksidasyonunun yanı sıra ALT ve AST (alanin ve aspartat aminotransferazlar) aktivitesinin azalmasına ve LDH (laktat dehidrojenaz) aktivitesinin kontrollere kıyasla anlamlı derecede azalmasına neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Kloramin-T, laktat ve piruvat metabolizmasını belirgin şekilde etkiler ve LDH aktivitesinin azalmasına neden olur. Korelasyon analizi, lipid peroksidasyon seviyesinin, işlenmeyen kontrol grubunun kas dokusundaki ALT ve AST aktivitesi ile korele olduğunu tespit etmişlerdir. Kloramin-T ile dezenfekte edilen alabalık kas dokusunda LDH aktivitesi, ALT ve AST aktivitesi ile pozitif korelasyon gösterdiğini

bu nedenle, balığın iskelet kasları, biyosentez için daha büyük bir potansiyel içeren glukoneojenik ve glikojenik yollardan laktat işlenmesinde önemli bir rol oynadığı kanısına varmışlardır. Çalışmalarında L başına 9 mg dozunda Kloramin-T'nin en azından kısmen oksidatif stresi azaltabildiğini ve gökkuşuğu alabalığının profilaktik dezenfekte edici tedavisi için kullanılabileceğini tespit etmişlerdir. Oksidatif stres ve biyokimyasal değişiklikler, suda yaşayan organizmalara farmasötik olarak maruz kalmak için uyarı sinyalinde balıklara yönelik Kloramin-T toksisitesinin potansiyel biyolojik belirteçleri olarak etkili bir şekilde kullanılabilir kanısına varmışlardır.



3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırma yeri

Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarında ve Su Ürünleri Mühendisliği Laboratuvarında 10 haftalık bir çalışma yürütülmüştür.

3.1.2. Balık materyali

Araştırmada yaklaşık 230 ± 20 gr ağırlığında herhangi bir kimyasala maruz bırakılmamış 10 adet gökkuşuğu alabalığı kullanılmıştır. Denemede kullanılan alabalıklar Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi İç Su Balıkları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir.

3.1.3. Su materyali

Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Akvaryum Balıkları ve Araştırma Merkezindeki mevcut su kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Denemede kullanılan suyun kimyasal ve fiziksel özellikleri

PARAMETRE	DEĞER
PH	8,1
OKSİJEN	8,8 ppm
SO ₄	0,33 mg/L
PO ₄	Eser
NO ₃	3,45 mg/L
İLETKENLİK	276 μ s/cm
SICAKLIK °C	10,5 \pm 2,5

3.1.4. Kullanılan kimyasallar

Çizelge 3.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Madde	Kullanım Alanı
Kloramin-T	Balıklara uygulanmasında
RNA Later	Alınan dokuların saklanmasında
ROCH High Pure RNA Isolation	Manuel RNA İzolasyonunda
Oligo (dT)20 Primer	cDNA kütüphanesinin oluşturulmasında
dNTP Mix	cDNA kütüphanesinin oluşturulmasında
ddH2O	cDNA kütüphanesinin oluşturulmasında
First Strand Buffer	cDNA kütüphanesinin oluşturulmasında
DTT	cDNA kütüphanesinin oluşturulmasında
RNase OUT™	cDNA kütüphanesinin oluşturulmasında
Super Script III RT	cDNA kütüphanesinin oluşturulmasında
FastStart TaqMan	Real time PCR uygulamalarında
Hydroliz Prob	Real time PCR uygulamalarında
Forward primer	Real time PCR uygulamalarında
Reverse primer	Real time PCR uygulamalarında
DEPC	RNA'nın kalitatif tayininde
MOPS	RNA'nın kalitatif tayininde
EDTA	RNA'nın kalitatif tayininde
Sodyum asetat	RNA'nın kalitatif tayininde
Etidyum bromür	RNA'nın kalitatif tayininde
Agaroz	RNA'nın kalitatif tayininde
Formamid	RNA'nın kalitatif tayininde
Kloroform	RNA'nın kalitatif tayininde

3.1.5. Kullanılan alet ve cihazlar

Çizelge 3.3. Kullanılan alet ve ekipmanlar

NO	ALET
1	Buzdolabı (+4) Derin Dondurucu (-20 -80)
2	Otoklav
3	Destile Su Cihazı
4	Hassas Terazı
5	Manyetik Karıştırıcı
6	Kar Üretme Makinesi
7	pH Metre
8	Soğutmalı Santrifüj
9	Vortex
10	PCR
11	Nanodrop
12	Real-Time PCR
13	Elektroforez Cihazı
14	Ultratoraks
15	Derin Dondurucu
16	Mikropipet Seti
17	Mikrodalga Fırın
18	Ependorf Tüpler
19	Falkon Tüpler
20	Güç Kaynağı

3.1.6. Balıkların beslenmesinde kullanılan yem materyali

Çizelge 3.4’de alabalıklara uygulanan yem içeriği verilmiştir.

Çizelge 3.4. Deneme süresince alabalıklara verilen yem içeriği

Yağ	%8
Protein	%40
Selüloz	%2
Kül	%10
Nem	%8,5
Fosfor	%2
Kalsiyum	%2,2
VitaminK	14 mg/kg
VitaminE	700 mg/kg
VitaminD3	3000 IU/kg
VitaminA	15000 IU/kg

3.2. Metot

3.2.1. Deneme düzeni, balıkların bakımı ve Kloramin-T verilmesi

İki adet fiberglas tanka rastgele ve eşit sayıda (beşer) gökkuşağı alabalığı dağıtılmış ve 15 günlük aklimitasyona tabi tutulmuştur. Denemede dakikada 1,5 litrelik akış hızına sahip kaynak suyu kullanılmıştır. Balıklar bir kontrol, bir muamele olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. 350lt’lik fiberglas tanka ± 0.7 gr (2mg/L) sub-letal dozda (Arslan ve Özdemir 2018) Kloramin-T maddesi su ile karıştırılarak verilmiştir. Kloramin-T uygulandıktan sonra herhangi bir anestezi uygulamasından öldürülen muamele grubundan 60 dakika sonra karaciğer ve kas örnekleri alınmıştır.

3.2.2. Doku örneklerin alınması ve muhafazası

Yaklaşık 230±20 gr ağırlığındaki gökkuşağı alabalıkları öldürüldükten sonra karaciğer ve kas dokuları alınmıştır. Küçük miktarlarda falcon tüp ve ependorf tüplere aktarılmıştır. RNA later solüsyonu tüplerin üstü dolana kadar eklenmiştir ve -80°C’de saklanmıştır.

3.2.3. Manuel olarak RNA izolasyonu

Bu amaçla ROCH High Pure RNA Isolation Kit kullanılmıştır. RNA izolasyonunda aşağıdaki adımlar sırasıyla takip edilmiştir:

1. Alınan örnekler -80’den çıkartılıp RNA Later solüsyonundan arındırıldıktan sonra 0.01-0.02gr arası alınarak 2ml’lik tüplere aktarılıp içerisine 400µL Lysis Buffer eklenip homojenize edilmiştir. 1 dakika boyunca buzda bekletilmiştir.
2. 13000 RPM 4°C’de 2 dakika santrifüj yapıldıktan sonra üstte kalan kısım yeni 1.5ml’lik tüpe aktarılarak üzerine 200 µL saf alkol eklenmiştir.
3. Alt üst edildikten sonra 600 µL kitdeki filtreli tüplere aktarılıp 13000 RPM 4°C’de 30 saniye santrifüj yapılmış ve altta kalan kısım dökülmüştür.
4. Her bir örneğin üzerine 90 µL Dnaz Buffer ve 10 µL Dnaz Enzim eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
5. Wash Buffer 1’den 500 µL ilave edilerek 8000 RPM’de 4°C’de 30 saniye santrifüj yapılmıştır. Bu işlem üst kısımda sıvı kalmayana dek tekrar edilmiştir.
6. Wash Buffer 2’den 500 µL ilave edilerek 8000 RPM’de 4°C’de 30 saniye santrifüj yapılmıştır.
7. Wash Buffer 2’den 300 µL ilave edilerek 13000 RPM’de 4°C’de 2 dakika santrifüj yapılmıştır.
8. Sonra hiçbir şey katmadan 30 saniye daha santrifüj yapılmıştır. Daha sonra filtreler 1.5 ml’lik tüplere konulup üzerine 40 µL Elasyon Buffer ekleyerek 8000 RPM 4°C’de 1 dakika santrifüj yapılmıştır.
9. En son altta kalan kısma pipetaj yapılmıştır. Böylelikle manuel olarak RNA izolasyonu tamamlanmıştır.

3.2.4. RNA'nın kantitatif tayini

DNA, RNA ve proteinlerin fotometrik analizleri için kullanılan μ Drop™ cihazı ile RNA'nın yapısında yer alan pürin ve pürimidin bazları (A260/A280) dalga boyunda ışığa verdiği için bu dalga boylarında ölçümleri yapılmıştır. Böylece örneklerin konsantrasyonu ve saflık dereceleri μ Drop™ Plate'de belirlenmiştir.

3.2.5. RNA'nın kalitatif tayini

RNA izolasyonunun başarılı olduğunun sağlanması için Agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. RNA'nın kalitatif tayini için sırasıyla aşağıdaki aşamalar takip edilmiştir.

1. Öncelikle 70 ml'lik elektroforez küveti hazırlamak için %1'lik agaroz jel hazırlama protokolüne göre 0,7 gr agaroz hassas terazide tartılarak bir erlenmayere konulmuştur.
2. Üzerine 66,5 ml ddH₂O ve 4,38 ml 20×MOPS solüsyonu eklendikten sonra bileşenlerin tamamen çözünmesi için mikrodalga fırında yaklaşık 3 dakika süreyle tutulmuştur.
3. Su altında soğutulduktan sonra içine 15,6 μ L ve 12,8 μ L etidyum bromür (10 μ g/ μ l) ilave edilmiştir.
4. Daha sonra steril olan 0,2 ml'lik ependorf tüp içerisine 0,5 μ L 20×MOPS solüsyonu, 3,5 μ L ddH₂O, 5 μ L formamid ve 1 μ L izole edilen RNA örneklerinden koyularak 65°C'de 15 dk etüvde inkübe edilmiştir.
5. Hazırlanan jel donduktan sonra üzerine jeli kaplayacak kadar 1×MOPS solüsyonu dökülmüştür.
6. Jel yükleme tamponu Brom Fenol Blue ile boyanan örnekler kuyucuklara yüklenmiştir ve 90V 90A'da 30 dakika yürütülmüştür.

500 ml DEPC hazırlanışı; 500 μ L DEPC ve 500 ml saf su bir erlenmayere koyulup ve 2 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra otoklavlanmıştır.

20×MOPS solüsyonunun hazırlanışı; 41,9 gr MOPS, 6,8 gr sodyum asetat, 2,6 gr EDTA tartılarak erlenmayer içerisine alınmıştır. Üzerine 500 ml DEPC H₂O'dan yaklaşık 480 ml ilave edilerek pH metre ile pH 7,0 olacak şekilde ayarlanmıştır. Sonrasında DEPC'li su kullanılarak hacim 500 ml'ye tamamlanmıştır. Daha sonra 24 saat süreyle manyetik karıştırıcıda manyetik bar yardımıyla karıştırılmıştır.

1×MOPS solüsyonunun hazırlanışı; 19 birim saf su ve 1 birim 20×MOPS solüsyonu alınarak %5 oranında dilüsyon yapılmış ve manyetik karıştırıcı ile 30 dakika boyunca karıştırılmıştır.

3.2.6. RT-PCR ile cDNA kütüphanesinin oluşturulması

➤ cDNA kütüphanesi oluşturulması aşamasında kullanılacak olan izole edilmiş RNA'ların konsantrasyonları spektrofotometrik ölçümlerle hesaplanmış ve konsantrasyonlar 1µg/µL olacak şekilde ayarlanmıştır.

➤ PCR tüplere (0,2ml'lik): Oligo (dT)20 Primer (50µM) = 1µL
dNTP Mix (10µM) = 1µL

İlave edildikten sonra toplam hacmin konsantrasyonu 1µg olan total RNA'dan hesaplanan miktarda (x) eklenerek 13µL'ye tamamlanmıştır.

➤ Üzerine 11-x µL ddH₂O ilave edilerek 65°C'de 5 dakika PCR'da tutuldu ve ardından 1 dakika buz üstünde bekletilmiştir.

➤ Daha sonra kısa süreli (yaklaşık 5-10 sn) mikrosantrifüj yapıldıktan sonra herbir örnek için aşağıdaki ölçülerde mix hazırlanmıştır:

- 5x First Strand Buffer = 4µL
- 0,1 M DTT = 1µL
- RNase OUT (40 unit/ µL) = 1µL
- Super Script III RT (200 unit/µL) = 1µL

➤ Dikkatli bir şekilde pipetaj yapıldıktan sonra önce 50°C’de 45 dakika sonra 70°C’de 15 dakika PCR’de tutulmuştur. Böylece cDNA kütüphanesi oluşturulmuş ve örnekler çalışılincaya kadar -20°C’de stoklanmıştır.

3.2.7. Genlere spesifik primer ve TaqMan prob dizaynı

Çalışmada SOD, CAT, GST ve G6PD genleri kullanılmıştır. Housekeeping gen olarak adlandırılan referans gen için GAPDH tercih edilmiştir. Kullanılan genlere ait primer ve proplar Çizelge 3.5’de belirtilen çalışmalardan alınmıştır.

Çizelge 3.5. Araştırmada kullanılan genlerin primer ve propların baz dizilimleri

GEN	Primerler (5' >3')	KAYNAKLAR
SOD	F TGCTTATGGAGACAACACCAA	Mercan ve ark. 2013
	R TGGATGTTGATCTTAGCCACA	
	Fam-CCACTGATGCTGTTCCGGCACGT-Tamra	
CAT	F TCCTTTATCCACTCTCAGAAGCG	Kutluyer ve ark. 2017
	R CCACGGTCACTGAACAGGAA	
	Fam-TGGTGTGGGACTTCTGGAGCCTGC-Tamra	
GST	F TGGCTGACGTTATTGTCTTCC	Çiltaş ve Balık 2016
	R CTGGGTCTGTCCTTACCATA	
	Fam-CGGCGCGTTACCCCAAAGT-Tamra	
G6PD	F CGTCTACCACGATGTCACCA	Çiltaş ve ark. 2003
	R TTCTCCACAATCACCCTGCT	
	Fam-ACGGCATGAGCACCAAGGGC-Tamra	
GAPDH	F ATCAAAGGGGCTGTCAAGAA	Beydemir ve ark. 2011
	R AGGAGTGGGTGTCTCCAATG	
	Cy5-CGCCGAAGGACCCATGAAGG-BHQ	

Elde edilen cDNA kütüphanesi üzerinde ilgili genlerin kantitatif tayininde Real-time PCR kullanılmıştır. Bu amaçla dizayn edilen gene spesifik primerler TaqMan prob ile işaretleme yapılarak gen ekspresyonu kantitatif olarak belirlenmeye çalışılmıştır. TaqMan probun Real time PCR’da ilgili bölgenin çoğaltılması sırasında kantitatif olarak oluşan ürüne bağlanıp belirli dalga boyunda ışığa yaparak absorbans vermesiyle gen ekspresyon dereceleri belirlenmektedir. Böylece oluşan ürünün miktarı kantitatif olarak ölçülmektedir. FastStart TaqMan® Probe kullanılarak gerçekleştirilen Real time PCR uygulamasında kullanılan maddelerin oranları Çizelge 3.6’da verilmiştir.

Çizelge 3.6. Real time PCR uygulamasında kullanılan maddeler

Bileşenler	Konsantrasyon	Hacim (µL)
FastStart TaqMan® Probe	2x	25
Reverse primer	20 pmol	2
Forward primer	20 pmol	2
Hydroliz Prob	10 pmol	1
ddH2O		18
cDNA		2
Toplam hacim		50 µL

3.2.8. Gen ekspresyon sonuçlarının analizi ve değerlendirilmesi

Gökkuşığı alabalığının, bir dezenfeksiyon ürünü olan Kloramin-T’ye maruziyeti sonrasında kas ve karaciğer dokularında total RNA izolasyonu yapılmıştır. Nanodrop ölçümleri yapıldıktan sonra cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. SOD, CAT, GST ve G6PD genlerine özgü primer ve prop dizaynı yapılmıştır. Bu genlere ait primer ve proplar kullanılarak Real time PCR yapılmıştır.

3.2.9. İstatistiksel analiz

Kloramin-T uygulanan Gökkuşığı alabalığının karaciğer ve kas dokularından alınan SOD, CAT, GST ve G6PD genlerine ait ifade profilleri ve kontrol profilleri GAPDH ile karşılaştırılmıştır. Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH), enerji üretimindeki rolü önemli olduğu için klasik bir glikolitik protein olarak kabul edilir. Protein ve enzim analizi için bir model olarak ve ayrıca gen ekspresyonunun göreceli nicelemesi için bir iç kontrol faktörü olarak kullanılır. GAPDH çekirdekte bulunur ve gen transkripsiyonunda, DNA replikasyonunda, DNA onarımında ve nükleer RNA ihracatında rol oynar (Hara *et al.* 2006).

Uygulama grupları ve kontrol grupları arasında çalışılan genlerin ekspresyonunun kat değişiminin istatistiksel önemini değerlendirmek için SSPS veri analiz yazılımı tarafından sağlanan Student's t-test kullanılmıştır. İstatistik anlamlar %5 ve %1 hata seviyesinde verilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. İzole Edilen RNA'ların Nanodrop Spektrofotometre Değerleri

Gökkuşığı alabalığı antioksidan genleri üzerine yaptığımız çalışmada, Kloramin-T dezenfektan maddesi uygulaması sonrası kas ve karaciğer dokularından alınan örneklerden elde edilen total RNA'ların konsantrasyon ve saflık dereceleri Nanodrop spektrofotometrede belirlenmiştir. Bu amaçla 260 ve 280 nm'de ölçümü gerçekleştirilen absorbansların oranı (A260/A280) değerlendirilmiştir. Ölçümü yapılan A260/A280 değerlerinin yaklaşık olarak 2,0 oranında olması yapılan izolasyonun başarılı olduğunun bir göstergesi olduğu söylenebilir. Kas ve karaciğer dokularından cDNA elde etmek için gerekli RNA saflık ve konsantrasyon verileri elde edilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Total RNA konsantrasyonları (ng/µL) ve 260/280 (nm) oranlarına göre kas ve karaciğer dokusu değerleri

GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI

	Konsantrasyon (ng/µl)	Saflık A ₂₆₀ / A ₂₈₀ (nm)
KARACİĞER KONTROL	1	2644
	2	2141
	3	1609
KARACİĞER UYGULAMA	1	2026
	2	2609
	3	2145
KAS KONTROL	1	2065
	2	2024
	3	2201
KAS UYGULAMA	1	2010
	2	2301
	3	2089

4.2. Gen İfadelerinin Analizi

Çalışmamızda gerçekleştirilen gen ifade analizi sonucuna göre örneklerin eşik (threshold) değerleri tespit edilmiştir. Microsoft Excel programı kullanılarak PCR analizinde elde edilen sonuçlara göre Ct değerlerine ait standart sapmalar hesaplanmıştır. Standart sapması istenilen oranlardan düşük olan denekler üç tekrar şeklinde değerlendirilmiştir. Gökkuşluğu alabalığı kas ve karaciğer dokularına ait genlerin ifade oranları Livak and Schmittgen ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) göre oransal hesaplama algoritması ile tespit edilmiştir. Real time PCR analiz işlemlerinde GAPDH geni referans gen olarak kullanılmıştır ve bu referans gene göre genlerin ifadesi gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.2). Gen ifadelerine ait istatistiki analizler Çizelge 4.3’de verilmiştir.

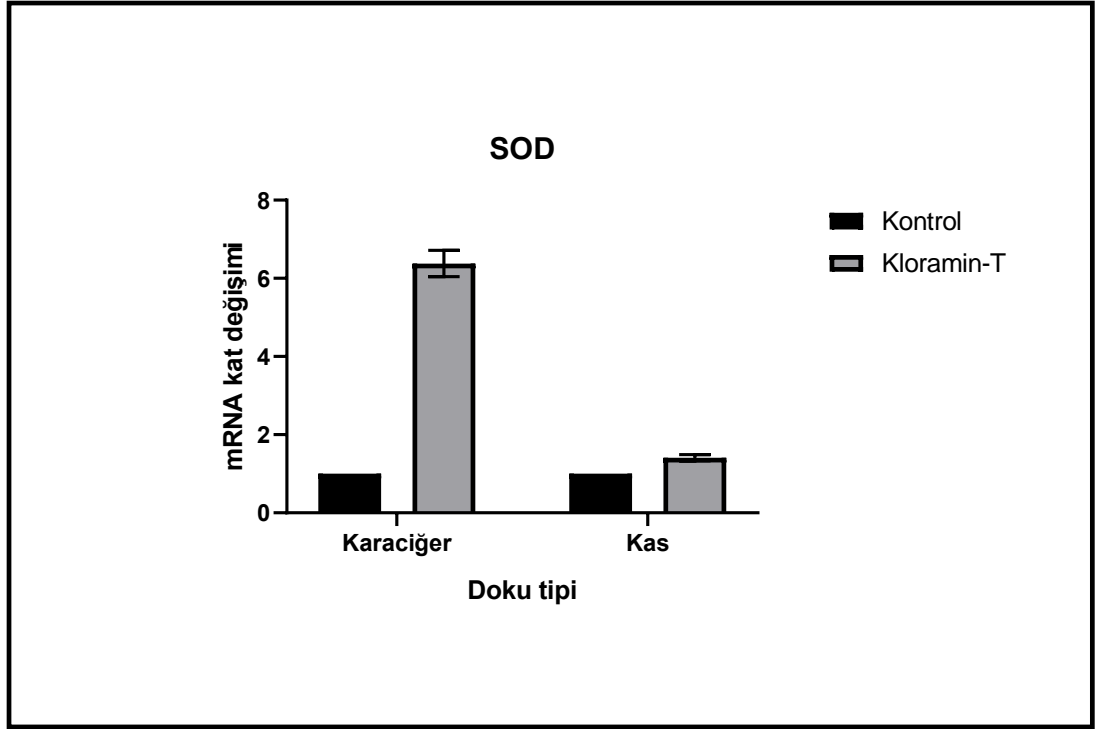
Çizelge 4.2. Referans gen ifadesine göre genlerin ifadesi

GAPDH		İfade	Std. Sapma
K-SOD	Kontrol	1,00	
	Kraciğer	6,38	0,34
	Kas	1,41	0,08
K-CAT	Kontrol	1,00	0,00
	Karaciğer	4,36	0,42
	Kas	5,21	0,42
K-GST	Kontrol	1,00	
	Karaciğer	3,44	0,19
	Kas	6,35	0,88
K-G6PD	Kontrol	1,00	
	Karaciğer	5,09	0,66
	Kas	0,40	0,09

Çizelge 4.3. Kas ve karaciğer dokusundaki SOD, CAT, GST ve G6PD gen ifadelerine ait istatistiki analizler

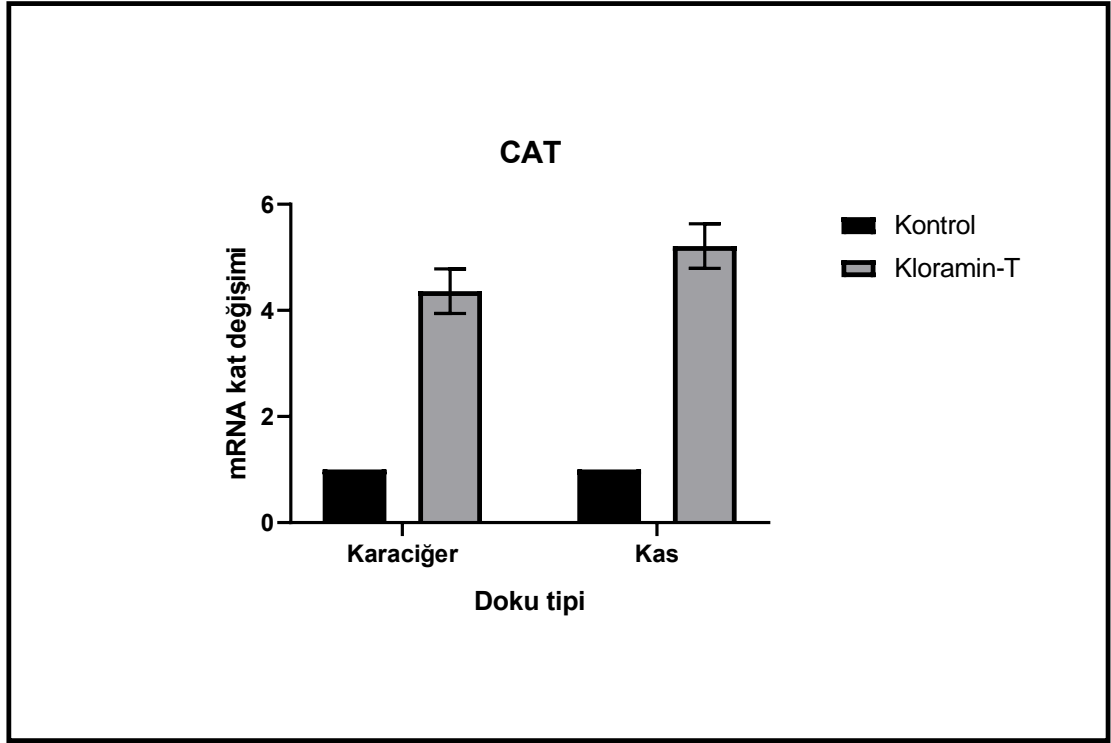
İstatistik analiz sonuçları (t testi)			
	t	SD	p
K-SOD	-27,453	4	0,000
K-CAT	-13,817	4	0,000
K-GST	-22,824	4	0,000
K-G6PD	-10,758	4	0,000
KAS-SOD	-8,765	4	0,001
KAS-CAT	-17,485	4	0,000
KAS-GST	-10,560	4	0,000
KAS-G6PD	11,055	4	0,000

Gökkuşığı alabalığının karaciğer ve kas dokusundaki SOD geninin mRNA ifade seviyesi incelendiğinde, Kloramin-T uygulamasının hem karaciğer hem kas dokusunda bu genin up-regüle olmasına neden olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.1). Kloramin-T maddesine maruz bırakılmayan kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hem kas hem de karaciğer dokusunda SOD gen ekspresyonunda artış olduğu görülmüştür. Bu artışların her ikisi de istatistiki açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0,001$) Bu artışın karaciğer dokusunda 6,38, kas dokusunda ise 1,41 seviyesinde olduğu görülmüştür.



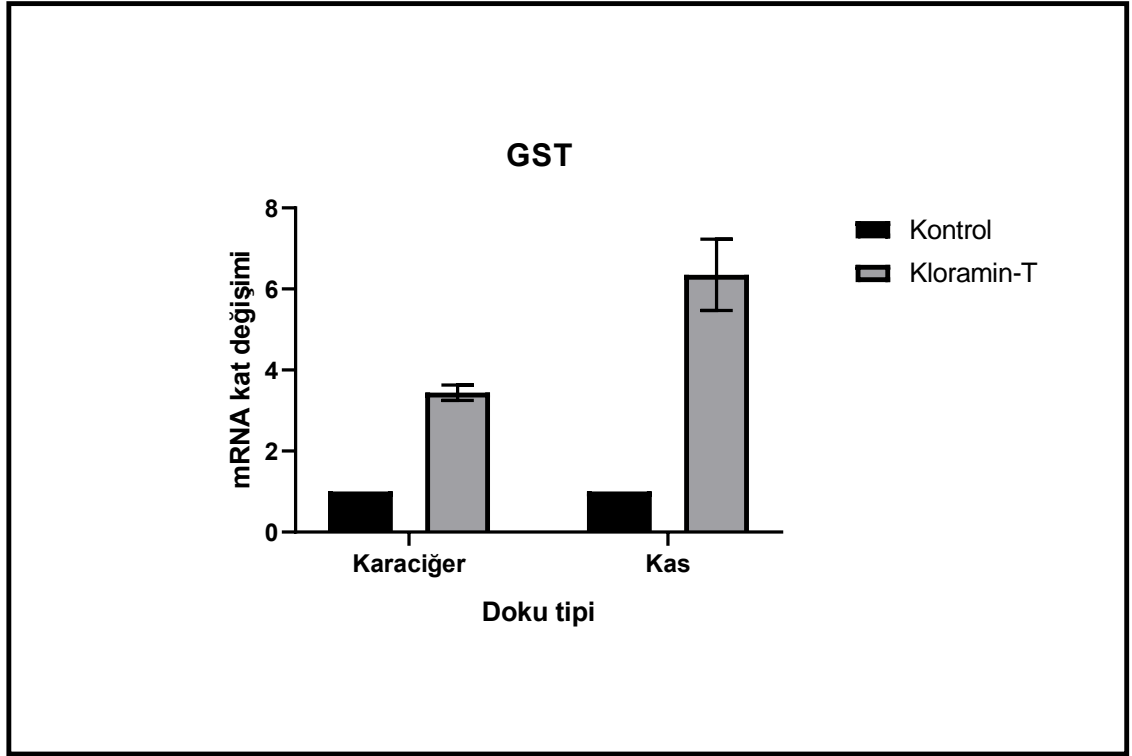
Şekil 4.1. Kloramin-T dezenfektan maddesine maruz bırakılan kas ve karaciğer dokularındaki SOD genine ait mRNA kat değişimi

Karaciğer ve kas dokusundaki CAT geninin mRNA ifade seviyesi incelendiğinde Kloramin-T uygulamasının her iki dokuda da bu genin up-regüle olmasına neden olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2). En fazla artış 5,21 kat ile kas dokusunda görülürken, karaciğerde bu oran 4,36 olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında her iki dokudaki artış da istatistiki açıdan önemli ($p < 0,01$) bulunmuştur (Çizelge 4.3).



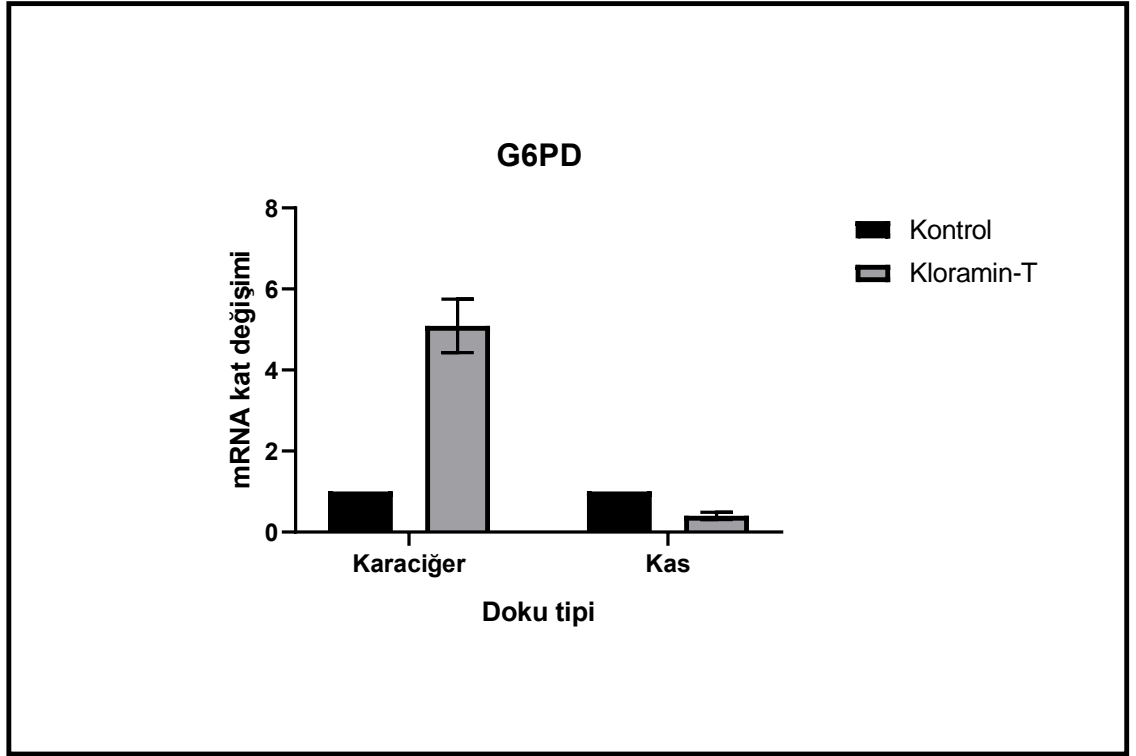
Şekil 4.2. Kloramin-T dezenfektan maddesine maruz bırakılan kas ve karaciğer dokularındaki CAT genine ait mRNA kat değişimleri

Kloramin-T uygulaması sonrası GST geni mRNA seviyelerinin karaciğer ve kas dokularında sırasıyla 6,35 ve 3,44 olarak gerçekleştiği anlaşılmıştır (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.3). Her iki dokuda da GST geninin up-regüle olduğu, kontrol grubuyla kıyaslandığında meydana gelen artışların istatistiki açıdan önemli olduğu ($p < 0,01$) tespit edilmiştir (Çizelge 4.3).



Şekil 4.3. Kloramin-T dezenfektan maddesine maruz bırakılan kas ve karaciğer dokularındaki GST genine ait mRNA kat değişimleri

Son olarak G6PD geninin mRNA ifade seviyesi incelendiğinde ise Kloramin-T uygulamasının karaciğerde bu genin up-regüle olmasına neden olurken kas dokusunda down-regüle olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.4). Her iki dokudaki farkın kontrol grubuna kıyasla istatistiki açıdan önemli ($p < 0,01$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.3). G6PD geni mRNA seviyeleri incelendiğinde karaciğer dokusunda 5,09, kas dokusunda ise 0,40 olarak gerçekleştiği tespit edilmiştir.



şekil 4.4. Kloramin-T dezenfektan maddesine maruz bırakılan kas ve karaciğer dokularındaki G6PD genine ait mRNA kat değişimleri

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Balık hastalıklarının tedavisinde ve korunmasında kullanılan kemoterapotik maddeler balıklarda farklı oranlarda strese neden olmaktadır. Bu maddelerin yan etkileri tam olarak bilinmemekle beraber bu alanda birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda kullanılan maddelerin etkilerini belirlemek için özellikle antioksidan savunma mekanizmaları incelenmektedir.

Hücrelerdeki serbest oksijen radikalleri (SOR), bir savunma mekanizması olarak antioksidan enzimlerinin yükselmesine neden olabilmektedir. Antioksidanlar, hücrelerde SOR kaynaklı hasarlardan kapsamlı bir savunma sağlamaktadır. Bu savunma mekanizmalarına düşük molekül ağırlıklı bileşikler (glutasyon ve askorbat gibi) ve antioksidan enzimler (süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyonla bağlı antioksidan enzimler gibi) dâhildir. Oksidatif strese karşı ilk savunma hattı, süperoksit radikallerini hidrojen peroksit ve daha sonra su ve moleküler oksijene dönüştüren SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan enzimlerden oluşmaktadır. Antioksidan enzimlerin indüksiyonu balıklarda oksidatif strese karşı önemli bir savunma hattıdır (Tkachenko *et al.* 2014).

Balıklarda ve diğer aerobik organizmalarda, antioksidan savunma sistemi oksidatif bozulmaların toksik etkilerine karşı koruyucu ve önleyici etkiler göstermektedir. Hücrel oksidatif stres, antioksidan kuvvetleri serbest radikaller tarafından inhibe edildiğinde ortaya çıkmaktadır. Antioksidan savunma sistemi, enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmalar içermektedir. Bu sistemler, duyarlı biyolojik makromoleküllerle reaksiyona girebilen ve lipid hidroperoksidasyon, DNA hasarı ve protein karbonilleri üretebilen ve oksidatif strese neden olan reaktif oksijen türlerinin (SOR) oluşumunu önleyebilmektedir (Velisek *et al.* 2010).

Canlı metabolizmasında sürekli olarak oksidasyon olayları meydana gelmekte, dışarıdan alınan reaktif oksijen maddeler de bu oksidasyon olaylarını hızlandırmaktadır (Karabulut ve Gülay 2016). Uygulanan maddelerin çeşidine ve konsantrasyona bağlı olarak suçul

organizmaların organlarında ve dokularında birikmekte ve ilerleyen aşamalarda yıkıcı etkilere yol açan moleküler değişikliklere neden olabilmektedir. Sucul organizmalarda çevresel kirliliğin etkilerinin tespit edilmesinde, antioksidant savunma sistemlerine ait parametrelerin yararlı biyobelirteçler olarak kullanılabilceği görülmektedir (Uçar vd 2012).

Çalışmamızda Kloramin-T'ye maruz bırakılan Gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nda bazı antioksidan enzimlerin gen ekspresyonu üzerine etkilerini araştırdık. Kloramin-T uygulaması sonrası kas ve karaciğer dokularında incelen antioksidan genlerinin (SOD, CAT, GST ve G6PD) mRNA ifade seviyelerindeki değişimlerinin kontrol grubuna kıyasla istatistiki olarak önemli ($p < 0,01$) olduğu tespit edilmiştir.

SOD ve CAT, toksisiteye karşı ilk ve en önemli savunma basamağıdır (Alak vd 2016). SOD, süperoksitin hidrojen peroksite dismutasyonunu katalize eden, çok önemli bir antioksidan rolü oynayan ve aerobik organizmalardaki süperoksit radikallerinin toksik etkilerine karşı birincil savunmayı oluşturan bir metaloenzimler grubudur (Tkachenko *et al.* 2014). Araştırmamızda, Kloramin-T'ye maruz kalan balıkların karaciğer ve kas dokularında SOD gen ifadesinin kontrol grubuna kıyasla önemli oranda arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca SOD geni, kas dokusuna kıyasla karaciğer dokusunda daha fazla artış gösterdiği tespit edilmiştir. Karaciğer, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ve metabolik üretim süresinde katabolik süreci gerçekleştiren ana organdır. Bunun sonucu olarak antioksidan sistem elemanları da diğer organlara göre en fazla karaciğerde bulunduğundan (Lushchak vd., 2005) dolayı bu sonucun elde edildiği düşünülmektedir. Diğer taraftan Doğan ve ark. (2011), metabolik faaliyetlerin ve detoksifikasyon süreçlerinin temel organı olan karaciğerin, metabolizmadaki her türlü değişimden ve toksik maddelerin olumsuz etkilerinden en çok etkilenen organlardan biri olduğunu bildirmiştir. Karaciğer metabolik fonksiyonları, ilaç metabolizması, depolama ve sentez fonksiyonu gibi birçok fizyolojik fonksiyonları olan karmaşık bir organdır. Birçok ilaç karaciğer tarafından metabolize edilirken birçok hastalıkta karaciğer dokusu direkt veya dolaylı olarak etkilenir (Lawler *et al.* 1987; Al-Jumaily and Khaleel 2012). Araştırmamızda Chl-T maruziyetinin SOD geni mRNA ifade seviyelerini artırdığını

dolayısıyla karaciğer dokusunda kas dokularına göre daha fazla oksidatif strese neden olduğu ve bunu ortadan kaldırmak için SOD miktarında artışın meydana geldiği söylenebilir. Bir fungusit olan karboksinin antioksidant savunma sistemleri üzerine etkisini araştırmak için yapılan bir diğer çalışmada (Uçar vd 2012) ise karboksinin gökkuşağı alabalığı karaciğerinde SOD aktivitesini önemli oranda ($p < 0.01$) artırdığı ve bu türde oksidatif strese neden olduğu tespit edilmiştir.

Oksidatif stres, biyolojik sistemde antioksidanlar ile prooksidanlar arasındaki dengenin, prooksidanlar lehine bozulması olarak tanımlanır (Bhuvaramurthy *et al.* 1996; Berk *et al.* 2008). Balıklarda oksidatif stres ve antioksidan genlerin verdiği yanıtlarla ilgili birkaç çalışmaya bakıldığında Carvalho *et al.* (2012) metallerin etkisinde balıklarda artan SOD aktivitesinin metallerin toksik etkilerinin detoksifikasyonunda önemli olduğunu ve balıkların bu enzim aktivitesindeki artışa bağlı olarak süperoksit radikalının toksik etkilerine karşı kendilerini koruduklarını belirtmişlerdir. Yine, Fernandes *et al.* (2008), balık dokularındaki yüksek SOD aktivitesinin metal etkileşimine yanıtta önemli olduğu vurgulamışlardır. Yüzereroğlu (2011), metallerin etkisinde dokularda SOD aktivitesindeki artışın, metallerin birikimi esnasında oluşan serbest radikallerle mücadele sonucu olduğunu savunmuştur.

CAT, hidrojen peroksidi ve hidroksili suya ve oksijene parçalayarak, hidrojen peroksidin ve hidroksilin radikallerinin oluşumunu önler (Acar 2015). CAT, diğer dokularla kıyaslandığında kan, karaciğer, kemik ve böbreklerde daha yüksektir ve daha fazla aktivite gösterir (Alak vd 2016). Çalışmalar hücre içi hidrojen peroksit (H_2O_2) konsantrasyonlarının yüksek olduğu durumlarda, CAT'ın oksidatif stresin kontrol edilmesinde daha etkili olduğunu göstermiştir (Gökhan 2015). Araştırmamızda, Kloramin-T'ye maruz kalan balıkların karaciğer ve kas dokularında CAT genin ifadesi kontrol grubuna kıyasla önemli oranda arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca CAT geni, karaciğer dokusuna kıyasla kas dokusunda daha fazla artış gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durumun hücre ve dokularda antioksidanların farklı oranlarda dağılım göstermesi ve ayrıca kullanılan dezenfektan maddenin farklı mekanizmalara etki etmesinden (Tkachenko *et al.* 2014) dolayı olduğu düşünülebilir. Proteinler canlı organizmalarda

yapısal ve işlevsel olarak önemli rolleri üstlenmiş biyomoleküller. CAT, protein yapısında bol miktarda bulunan karakteristik bir enzimdir (Işık 2019). Proteinler serbest radikallere karşı lipitlerden daha az hassastır. Serbest radikallerin meydana getirdiği hasar sonucunda proteinlerde parçalanma, çapraz bağlanmalar ve proteinlerin agregasyonu meydana gelir (Gökhan 2007). Balık canlı sisteminde, tüm dokularda olduğu gibi kas dokusunda da kimyasal bir döngü vardır. Ölüm sonrasında balık kas dokusunda biyokimyasal reaksiyonlar otolitik ve kimyasal değişimlerle başlamaktadır (Soyer 1999). Kas proteinlerindeki SOR'lar karbonil türevlerinin oluşumuna, sülfidril gruplarının kaybına ve oksidasyonun neden olduğu proteinlerin polimerizasyonu ile protein yapısı ve işlevsellikleri üzerinde daha fazla hasara yol açarak, temel aminoasitlerin yıkımına neden olmaktadır. Kas proteinlerinin, özellikle miyofibriller proteinlerin, işleme ve saklama esnasında SOR'lara duyarlı olduğunun ve serbest radikaller yoluyla proteinlerin oksidasyonuna neden olduğu bilinmektedir (Esenbuğa 2013). Balıklarda vücudun 2/3'ü kas oluşturur. Kaslar görev olarak vücudun hareket işlevlerini sağlarken, kan dolaşımı, solunum, sindirim, üreme ve boşaltım gibi temel fonksiyonlarına yardımcı olur (Küçük 2015). Kas ayrıca ısı üretimi, elektrolit, su ve protein deposu görevi yapmaktadır; bundan dolayı, organizmanın genel metabolizmasında önemli bir homeostatik rol oynar (Bingöl ve Mutluer 1992).

Araştırma sonucuna göre kloramin-T maruziyetinin CAT geni mRNA ifade seviyelerini artırdığını dolayısıyla karaciğer ve kas dokularında oksidatif strese neden olduğunu göstermektedir. Bu sonuç güçlü bir dezenfektan olan ve yaygın bir şekilde kullanılan Kloramin-T'nin gökkuşağı alabalığında MDA düzeyini arttırarak oksidatif strese sebep olduğunu belirleyen Tkachenko *et al.* (2013)'in bulgularıyla paralel bulunmuştur.

Yapılan çalışmalara bakıldığında uygulanan maddenin dozu ve süresi de canlı vücudunda farklı tepkimelere yol açmaktadır. Gökkuşağı alabalığı antioksidan genleri üzerine yapılan başka bir çalışmada α -tokoferolün etkisi araştırılmış ve bu amaçla katalaz (CAT), peroksidaz (POD) ve glutasyon redüktaz (GSSG-Rx) gibi antioksidan enzimlerin aktiviteleri incelenmiştir. Sonuç olarak α -tokoferolün yüksek bir dozda pro-oksidan eğilimine sahip olabileceğini ve gen ekspresyonunu yönlendiren hafif oksidatif strese

neden olabileceğini bu nedenle α -tokoferol'un balıklarla ilgili tüm uygulamalarda dikkatli kullanılması gerektiği kanısına varılmıştır (Gülçin vd 2005). Gerek bu sonuçlar ve gerekse araştırmamız sonucunda elde edilen bulgulara göre tedavi ya da koruma amacıyla vücuda verilen herhangi bir madde az ya da çok strese neden olabilmekte ve de doz ve kullanım sürelerine dikkat edilmesi gerektiği söylenebilir. Balık yetiştiriciliğinde kullanılan kimyasallarda yapılan çalışmalara bakıldığında, Kankaya ve Kaptaner (2017), araştırmalarında genel bir dezenfektan olan Formaldehitin subletal konsantrasyonlarının sazan balığı üzerindeki toksik etkilerini incelemişlerdir. Balıklardan alınan karaciğer ve solungaç dokularında histolojik incelemeler yapılmıştır. Uygulanan dezenfektanın miktarına bağlı olarak SOD, CAT ve GST aktivitelerinin azaldığını tespit etmişlerdir. Yapılan çalışma sonucuna göre Formaldehitin sazan balığında incelenen kriterler için hafif toksik etkiye sahip olacağını buna göre akuakültürde yaygın olarak kullanılan Formaldehitin kontrolsüz ve gereksiz kullanımından kaçınılması gerektiğini savunmuşlardır. Yine, İspir vd (2017), akuakültürde enfeksiyonlara karşı yaygın bir şekilde kullanılan Formalin kimyasalının gökkuşağı alabalığı antioksidan sistemleri üzerine etkisini araştırmışlardır. Kullanılan Formalin miktarının konsantrasyonuna bağlı olarak MDA seviyelerinde artış ve CAT seviyelerinde azalış tespit etmişlerdir. Buna göre balıkta ikincil bir toksisiteye sebep olabileceği kanısına varmışlardır.

Balıklarda bazı toksin bileşiklerde yapılan çalışmalar incelendiğinde, Yonar *et al.* (2011), araştırmalarında bir pestisit olan Deltametrin'in gökkuşağı alabalığı antioksidan genler üzerine etkisini araştırmıştır. Kullanılan maddenin dozuna ve süresine bağlı olarak malondialdehye (MDA) seviyelerini artırdığı ve CAT seviyelerini azalttığını tespit etmişlerdir. Buna göre Deltamethrin'in hem balıklar için hem de ekolojik çevre için toksik bir risk olabileceğini savunmuşlardır. Topal (2016), çalışmasında bir herbisit olan linuron'un gökkuşağı alabalığının karaciğer ve solungaç dokuları üzerindeki histopatolojik ve biyokimyasal etkileri araştırmıştır. Elde edilen sonuçlara göre uygulanan maddenin konsantrasyon artışına bağlı olarak CAT ve SOD aktivitelerinde düşüş kaydedilmiştir. Sonuç olarak, linuron'nun yüksek konsantrasyonda gökkuşağı alabalığı solungaç ve karaciğer dokularında toksik etkilere sebep olabileceği tespit edilmiştir.

GST, lipid peroksitlere karşı GSH-Px aktivitesi göstererek antioksidan savunma mekanizması oluştururlar (Acar 2015). Detoksikasyon genel olarak karaciğerde bulunan enzimler aracılığıyla yapılmaktadır. Bu tür enzimlerden bir tanesi de Gulutatayon-S transferazdır (GST). GST oksidatif strese neden olan organik ksenobiyotiklerin etkilerinin değerlendirilmesinde biyomarker olarak kullanılmaktadır (Gökhan 2015). Yapılan çalışmada, Kloramin-T'ye maruz kalan balıkların karaciğer ve kas dokularında GST genin ifadesi kontrol grubuna kıyasla önemli oranda arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca GST geni, karaciğer dokusuna kıyasla kas dokusunda daha fazla artış gösterdiği tespit edilmiştir. Buna göre Kloramin-T maruziyetinin GST geni mRNA ifade seviyelerini artırdığını dolayısıyla karaciğer ve kas dokularında oksidatif strese neden olduğunu göstermektedir. Gerçekleştirilen tez çalışması literatür taramalarıyla kıyaslandığında elde edilen bulgular GSH düzeyinin artması oksidatif stresin vücut tarafından bertaraf edilmeye çalışıldığının bir işareti olduğunu göstermektedir (Yonar vd 2014). Radikallerin artması antioksidan enzim aktivitesini artırır ve bu nedenle kontrol grubu ile kıyaslandığında gen ifade düzeyleri yüksek bulunur (Bostancı 2014).

G6PD, pentoz fosfat yolundaki NADPH üretimi sayesinde oksijen radikallerinin detoksifikasyonuna katılır ve bu sebeple oksidatif stres ve DNA hasarı için hücre koruyucu bir enzim olarak kabul edilmiştir (Lopez *et al.* 2007). Yapılan çalışmada, Kloramin-T'ye maruz kalan balıkların karaciğer dokusunda G6PD genin ifadesi kontrol grubuna kıyasla önemli oranda artarken kas dokusunda 0,40 kat azalma gözlemlenmiştir. Buna göre Kloramin-T maruziyetinin G6PD geni mRNA ifade seviyelerini artırdığını dolayısıyla karaciğer ve kas dokularında oksidatif strese neden olduğunu göstermektedir. Özellikle karaciğer dokusundaki artış uygulanan maddenin olumsuz etkisine karşı savunma sistemi oluşturduğunu gösterir (Yonar *et al.* 2014). Hisar vd (2009) araştırmalarında Kadmiyum'un gökkuşuğu alabalığı solungaç, karaciğer ve böbrek dokularındaki glikoz 6-fosfat dehidrojenaz enzimatik aktivitelerine etkilerini araştırmışlardır. Kontrol grubuna kıyasla önemli oranda uyarıldığını tespit etmişler ve bu sonuca göre glikoz 6-fosfat dehidrojenaz enziminin kadmiyum toksisitesine karşı koruma işlevi gördüğünü gözlemlemişlerdir.

Sonuç olarak araştırmamızda kullanılan Kloramin-T'nin balıklar üzerinde oksidatif strese yol açtığı ve biyokimyasal değişikliklere neden olduğu kanısına varılmıştır. Bununla birlikte, kültür balıkçılığındaki dezenfektan tedavisini izlemek için bu spesifik biyobelirteçlerin kullanımı hakkında daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır.



KAYNAKLAR

- Acar Ö, 2015. Sıçanlarda Siklofosamid Nedenli Hepatotoksisitede Oksidatif Stres ve Karaciğer Hasarına Karşı Selenyumun Koruyucu Etkisi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 2015.
- Alak G, Uçar A, Atamanalp M, & Kocaman E. M. (2016). Is zeolite a detoxificant: modelling of ferrous chloride/zeolite application of aquatic organisms on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to determine its effects on oxidative stress. *Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research*, 2(2), 77-81.
- Altınok I. (2004). Toxicity and therapeutic effects of chloramine-T for treating *Flavobacterium columnare* infection of goldfish. *Aquaculture*, 239(1-4), 47-56.
- Anonim, 2019a TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası. Su Ürünleri Üretimimizin Yapısı. https://www.zmo.org.tr/genel/bizden_detay.php?kod=27302&tipi=17&sube=0 (10 Mart 2019).
- Anonim, 2019b Tarım ve Orman Bakanlığı Balıkçılık ve Su Ürünleri Genel Müdürlüğü. Su Ürünleri İstatistikleri. <https://www.tarimorman.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/BSGM.pdf> (10 Nisan 2019).
- Anonim, 2019c T.C Milli Eğitim Bakanlığı. Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi. http://www.megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Alabal%C4%B1k.pdf (13 Nisan 2019).
- Anonim, 2019d Veteriner Hekimlikte Antibiyotikler (Pratik Bilgiler Rehberi). <https://www.interactivepdf.uniflip.com/2/34834/312877/pub/document.pdf> (22 Nisan 2019).
- Anonim, 2019f, Aykut Urfalıoğlu KSÜ Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon ad. Toksikoloji ve Karaciğer http://file.atuder.org.tr/_atuder.org/fileUpload/94vF6ufcNBj1.pdf (26 Ağustos.2019).
- Anonymous, 2019e. Kloramin-T (Sodyum *N*- Kloro- *p* -tolüensülfonamid) <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-2005918936> (25 Haziran 2019).
- Arslan H, Özdemir S. Gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) kloramin-T uygulaması sonucu solungaçlarda meydana gelen oksidatif stresin beyin dokusundaki c-Fos ve BDNF gen ekspresyonu üzerine etkisinin araştırılması. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 6(1), 78-83.
- Balık Y.Z. Oksitetrasiklin Antibiyotiğinin Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Karaciğerinde Glutasyon s-transferaz Enzimi Aktivitesi ve Gen Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkisi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı. Yüksek lisans Tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2016.
- Balta F, Kayış Ş, Balta Z. D. (2009). Doğu karadeniz bölgesinde yetiştiriciliği yapılan gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) görülen costiasis enfestasyonu ve tedavisi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 5(1).
- Berk M, Ng, F, Dean O, Dodd S, Bush A. I. (2008). Glutathione: a novel treatment target in psychiatry. *Trends in Pharmacological Science*, 29(7), 346-351.

- Beydemir, S., Aksakal, E., Ahm, Z., Erdogan, O., & Ceyhun, S. B. (2011). The Effects Of Stocking Density On Cyp 450 1 A Gene Expression And Carbonic Anhydrase Enzyme Activity In Rainbow Trout(*Oncorhynchus mykiss*). *Fresenius Environmental Bulletin*, 20(6), 1452-1457.
- Bhuvarahamurthy V, Balasubramanian N, Govindasamy S. (1996). Effect of radiotherapy and chemoradiotherapy on circulating antioxidant system of human uterine cervical carcinoma. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 158(1), 17-23.
- Bilgin N. Farklı Dezenfeksiyon Yöntemlerinde Ranitidin'in- nitrosodimetilamin (ndma) Öncü Maddesi Olarak Davranışının İncelenmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Bilim Dalı. Yüksek lisans Tezi, İstanbul: İstanbul Teknik Üniversitesi, 2014.
- Boran H, Altinok I. (2014). Impacts of chloramine- T treatment on antioxidant enzyme activities and genotoxicity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of fish diseases*, 37(5), 431-441.
- Bostancı H. E. Deneysel olarak diyabet oluşturulmuş sıçanlarda vitaminlerin oksidasyona etkisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı. Doktora tezi, Denizli: Pamukkale Üniversitesi, 2014.
- Bowker J. D, Carty, D. G, Telles, L, David, B, Oviedo, D. (2008). Efficacy of chloramine-T to control mortality in freshwater-reared salmonids diagnosed with bacterial gill disease. *North American Journal of Aquaculture*, 70(1), 20-26.
- Bowker J. D, Carty D, Smith C. E, & Bergen S. R. (2011). Chloramine-T margin-of-safety estimates for fry, fingerling, and juvenile rainbow trout. *North American Journal of Aquaculture*, 73(3), 259-269.
- Bullock GL, Herman RL ve Waggy C. (1991). Kuluçka etkinliği, bakteriyel solungaç hastalığının kontrolü için kloramin - T ile denenmektedir. *Sucul Hayvan Sağlığı Dergisi*, 3 (1), 48-50.
- Bulut C, Kubilay A, Bektaş Z. H, & Birden B. (2015). Gökkuşluğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) formaldehit (CH₂O)'in histopatolojik etkileri. *Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research*, 1(1), 43-48.
- Cengiz Ö. Farklı Konsantrasyonlarda Sodyum Hipoklorit Kullanılan Gökkuşluğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*, walbaum 1792) Patolojik İncelemeler. Sağlık Bilimler Enstitüsü, Patoloji Yüksek Lisans Programı. Yüksek lisans Tezi, Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi, 2016.
- Ceyhun SB, Şentürk M, Ekinci D, Erdoğan, O, Çiltaş A., Kocaman EM (2010). Deltametrin, antioksidan savunma sistemini hafifletir ve gökkuşluğu alabalığında ısı şoku proteini 70 ekspresyonunu indükler. *Karşılaştırmalı Biyokimya ve Fizyoloji Bölüm C: Toksikoloji ve Farmakoloji*, 152 (2), 215-223.
- Çantaş İ. Aspir Küşpesi Unu İçerikli Gökkuşluğu Alabalığı Yemlerine İlave Edilen Mikrobiyal Fitaz Enzimlerinin, Balıkların Büyüme Performansı, Yem Değerlendirme ve Vücut Biyokimyasına Etkilerinin Araştırılması. Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı. Yüksek lisans Tezi, Muğla: Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, 2015.
- Çiltaş A, Erdogan O, Hisar O, Çiftçi M. Effects of chloramine-T and CuSO₄ on enzyme activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase from rainbow trout (*Oncorhynchus Myskiss*) erythrocytes in vitro an in vivo. *The Israeli Journal of Aquaculture*, 2003, 55(3): 187-196.

- Çiltaş, A., & Balık, Y. Z. Effects of Oxytetracycline Antibiotic on GST Enzyme Activity and Gene Expression Levels in Rainbow Trout. Atatürk University, Faculty of Agriculture, Department of Agricultural Biotechnology Turkey, 2016.
- Demir E, Eseceli H, Yıldız M, Azak H. Alabalık, Levrek ve Çipura Yetiştiriciliği. <https://www.docplayer.biz.tr/1567620-Alabalik-levrek-ve-cipura-yetistiriciligi-trout-sea-bass-and-sea-bream-farming.html> (11 Nisan 2019).
- Deng J, An Q, Bi B, Wang Q, Kong L, Tao L, Zhang X. (2011). Effect of ethanolic extract of propolis on growth performance and plasma biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish physiology and biochemistry*, 37(4), 959-967.
- Doğan N, Yazıcı Z, & Şişman T. (2016). Lepistes Balığının Karaciğeri Üzerine Fenpiroksimat Akarisiti'nin Biyokimyasal Etkileri. *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(1), 1-8.
- Dos Santos Carvalho ., Bernusso V. A, de Araújo, H. S. S., Espíndola, E. L. G., & Fernandes, M. N. (2012). Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus*. *Chemosphere*, 89(1), 60-69.
- Dunnett C. W. 1955. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *Journal of the American Statistical Association*, 50(272), 1096-1121.
- Esenbuğa H. SDS (Sodium Dodecyl Sulphate)'nin Farklı Dozlarının Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nin Yüzme Performansı, Hematoloji Parametreleri Ve Bazı Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkileri. Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı. Yüksek lisans tezi. Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2013.
- Fernandes C, Fontainhas-Fernandes A, Ferreira, M., & Salgado, M. A. (2008). Oxidative stress response in gill and liver of *Liza saliens*, from the Esmoriz-Paramos Coastal Lagoon, Portugal. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 55(2), 262-269.
- Gökhan H. B. (2015). Bakır sülfat uygulanan gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792)'nda bazı immun ve antioksidan parametrelere Spirulina'nın etkisinin araştırılması. Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Anabilim Dalı. Doktora tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, 2015.
- Grynevych N, Sliusarenko A, Dyman T, Sliusarenko S, Gutyj B, Kukhtyn M, Kushnir V. (2018). Etiology and histopathological alterations in some body organs of juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) at nitrite poisoning. *Ukrainian Journal of Ecology*, 8(1), 402-408.
- Gülçin İ, Beydemir Ş. ve Hisar O. (2005). Effect of α -tocopherol on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Veterinaria Hungarica*, 53(4), 425-433.
- Hara M. R, Cascio M. B, & Sawa A. (2006). GAPDH as a sensor of NO stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1762(5), 502-509.
- Heidarieh M, Mirvaghefi AR, Sepahi A, Şeyhzadeh N, Shahbazfar AA ve Akbari M. (2013). Diyet Aloe verasının gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) büyüme performansı, cilt ve gastrointestinal morfolojisi üzerindeki etkileri. *Türkiye Balıkçılık ve Su Bilimleri*, 13 (2), 367-373.

- Hisar O, Sönmez A. Y, Beydemir Ş, Hisar Ş. A, Yanik T, & Cronin T. (2009). Kinetic behaviour of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in different tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to non-lethal concentrations of cadmium. *Acta Veterinaria Brno*, 78(1), 179-185.
- Ighodaro OM ve Akinloye OA (2018). Birinci basamak savunma antioksidanları-süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX): Tüm antioksidan savunma şebekesinde temel rolleri. *İskenderiye Tıp Dergisi*, 54 (4), 287-293.
- Işık A. Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Filetolarında Farklı Öldürme Tekniklerinin Antioksidan Düzeyi ve Protein Oksidasyonu Üzerine Etkileri. Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı. Yüksek lisans tezi. Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2019.
- İspir U, Kirici M, Yonar M. E, & Mise S. Y. (2017). Response of antioxidant system to formalin in the whole body of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Cell. Mol. Biol.(Noisy-le-Grand)*, 63, 13-16.
- Jia, Y, Xue L, Liu H. ve Li, J. (2009). Halotolerant alg dunaliella salinadan gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) geninin karakterizasyonu ve ekspresyonunun RNAi tarafından inhibe edilmesi. *Güncel mikrobiyoloji*, 58 (5), 426-431.
- Kankaya E, & Kaptaner B. Formaldehitin subletal konsantrasyonlarının sazan (*Cyprinus carpio L.*, 1758) balığı üzerindeki toksik etkileri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 27(3), 406-415.
- Karabulut H, & Gülay M. Ş. (2016). Antioksidanlar. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1(1), 65-76.
- Karadağ S.G. Klor Dioksitin Dezenfeksiyon Amaçlı Kullanımında Yan Ürün Oluşumunun Araştırılması. Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Bilim Dalı. Yüksek lisans Tezi, İstanbul: İstanbul, 2011.
- Korun J, Kurtoğlu M. (2018). Yavru Gökkuşığı Alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, W.)'ndan *Lactococcus garvieae*'nin İzolasyonu ve Plazmit Profilleri Üzerine Bir Çalışma. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 3(1), 11-22.
- Kutluyer, F., Sirkecioğlu, A. N., Aksakal, E., Aksakal, F. İ., Tunç, A., & Günaydin, E. (2017). Effect of dietary fish oil replacement with plant oils on growth performance and gene expression in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Annals of animal science*, 17(4), 1135-1153.
- Kutluyer F, Benzer F, Erişir M, Öğretmen F. ve İnanan BE (2016). Sipermetrinin gökkuşığı alabalığı ve oksidatif stres indeksleri üzerindeki in vitro etkisi *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa. *Pestisit biyokimyası ve fizyolojisi*, 128, 63-67.
- Küçük, M. Karadeniz Alabalığı (*Salmo Trutta Labrax*) Böbrek, Karaciğer, Solungaç ve Kas Dokularından Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu Ve Bazı Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı. Doktora tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2015.
- Lawler W, Ahmed A and Hume W.(Essential Pathology For Dental Students, 1987.pg :82-83).
- Li ZH, Velisek J, Zlabek V, Grabic R, Machova J, Kolarova J, Randak T. (2011). Verapamilin yavru gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)

- üzerindeki kronik toksisitesi: morfolojik indeksler, hematolojik parametreler ve antioksidan tepkiler üzerine etkileri. *Tehlikeli Maddeler Dergisi*, 185 (2-3), 870-880.
- Li ZH, Zlabek V, Velisek J, Grabic R, Machova J, ve Randak T. (2010). Kronik karbamazepin tedavisi sonrası gökkuşuğu alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) beynindeki antioksidan savunma sisteminin modülasyonu. *Karşılaştırmalı Biyokimya ve Fizyoloji Bölüm C: Toksikoloji ve Farmakoloji*, 151 (1), 137-141.
- Lopes AS, Wrenzycki C, Ramsing NB, Herrmann D, Niemann H, Løvendahl P, ... & Callesen H. (2007). Solunum hızları, in vitro üretilen blastosistlerde bireysel sığırlarda G6PD ve GLUT1 genlerinin mRNA ekspresyonu ile ilişkilidir. *Theriogenology*, 68 (2), 223-236.
- Lushchak, V.I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat Toxicol*, 101, 13-30.
- Masten S. (2002). Chloramine-T [127-65-1] and Metabolite p-Toluenesulfonamide [70-55-3]: Review of Toxicological Literature. *Toxicological Literature*, Feb.
- Mercan, L., Sirkecioğlu, N., Aksakal, E., Bayır, M., Bayır, A., Aras, M., & Ekinci, D. (2013). Goose fat, a promising nutrient for fish feeding, activates antioxidant enzymes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 36(3), 964-971.
- Naz H, Abdullah S, Abbas K, Hassan W, Batoool M, Perveen S, Mushtaq S. (2019). Toxic Effect of Insecticides Mixtures on Antioxidant Enzymes in Different Organs of Fish, *Labeo rohita*. *Pakistan Journal of Zoology*, 51(4), 1355-1361.
- Okumuş İ. (2002). Rainbow trout broodstock management and seed production in Turkey: Present practices, constraints and the future. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2(1), 41-56.
- Pandolfi PP, Sonati F, Rivi R., Mason P, Grosveld F. ve Luzzatto L. (1995). Glikoz 6 - fosfat dehidrojenaz (G6PD) kodlayan temizlik geninin hedeflenen bozulması: G6PD, pentoz sentezi için vazgeçilmezdir, ancak oksidatif strese karşı savunma için gereklidir. *EMBO günlüğü*, 14 (21), 5209-5215.
- Sahiti H, Bislimi K, Bajgora A, Rexhepi A, Dalo E. (2018). Protective effect of vitamin C against oxidative stress in common carp (*Cyprinus carpio*) induced by heavy metals. *International Journal of Agriculture and Biosciences*, 7(2), 71-75.
- Sanchez JG, Speare DJ ve Johnson GJ (1997). Kloramin - T tedavisi ile ilişkili gökkuşuğu alabalığı, *Oncorhynchus mykiss*'in (*Walbaum*) dal dokusu yanıtının morfometrik ve histokimyasal olarak değerlendirilmesi. *Balık Hastalıkları Dergisi*, 20 (5), 375-381.
- Sasmaz I. (2009). Glükoz-6-fosfat dehidrojenaz enzim eksikliği. *Turkish Pediatrics Archive/Turk Pediatri Arsivi*, 44.
- Serdoz F, Voinovich D, Perissutti B, Grabnar I, Hasa D, Ballestrazzi R, Pellegrini E. (2011). Gökkuşuğu alabalığına (*Oncorhynchus mykiss*) oral uygulama için eritromisin lipidik formülasyonlarının geliştirilmesi ve farmakokinetik değerlendirilmesi. *Avrupa İlaç ve Biyofarmasötik Dergisi*, 78 (3), 401-407.
- Süleyman H, Gül V, & Erhan E. (2018). Oksidatif stres ve doku hasarı. *Erzincan Tıp Dergisi*, 1(1), 1-4.
- Şeker M. Muğla İlindeki Gökkuşuğu Alabalığı ve Levrek İşletmelerinin Yapısal Analizi ve Görülen Hastalıklar Açısından Değerlendirilmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Su

- Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı. Yüksek lisans Tezi, Muğla: Muğla Üniversitesi, 2012.
- Talas ZS, Orun I, Özdemir I, Erdoğan K, Alkan A, Yılmaz I. (2008). Selenyumun ağır metallerin (Cd + 2, Cr + 3) toksik etkisine karşı gökkuşuğu alabalığı karaciğerine (*Oncorhynchus mykiss Walbaum 1792*) karşı antioksidan rolü. *Balık fizyolojisi ve biyokimyası*, 34 (3), 217-222.
- Thompson H. J. (2004). DNA oxidation products, antioxidant status, and cancer prevention. *The Journal of nutrition*, 134(11), 3186S-3187S.
- Tkachenko H. ve Grudniewska, J. (2017). Chloramine-T ile dezenfekte edilmiş gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*) kas dokusunda biyokimyasal değişiklikler. *Baltık Kıyı Bölgesi*, 20, 2016-20.
- Tkachenko H, Kurhaluk N, & Grudniewska J. (2013). Effects of chloramine-T exposure on oxidative stress biomarkers and liver biochemistry of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss (Walbaum)*, brown trout, *Salmo trutta (L.)*, and grayling, *Thymallus thymallus (L.)*. *Archives of Polish Fisheries*, 21(1), 41-51.
- Tkachenko H, Kurhaluk N, Grudniewska J. ve Andriichuk A. (2014). Oksidatif stres biyobelirteçlerine ve gökkuşuğu alabalığındaki antioksidan savunmalara dokuya özgü tepkiler Furunculosis'e karşı bir aşılama sırasında *Oncorhynchus mykiss*. *Balık fizyolojisi ve biyokimyası*, 40 (4), 1289-1300.
- Tkachenko H, Kurhaluk N, ve Grudniewska J. (2015). Gökkuşuğu alabalığının (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*) kalbinde farklı dezenfektanların göstergesi olarak oksidatif stres ve antioksidanların biyolojik belirteçleri. *Su ürünleri araştırmaları*, 46 (3), 679-689.
- Tongul B, Kavakcıoğlu B, & Tarhan L. (2018). Chloramine T induced oxidative stress and the response of antioxidant system in *Phanerochaete chrysosporium*. *Folia microbiologica*, 63(3), 325-333.
- Topal, A. (2016). Linuron'un Gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) solungaç ve karaciğer dokuları üzerinde histopatolojik ve biyokimyasal etkilerinin araştırılması. Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı. Doktora Tezi. Erzurum; Atatürk Üniversitesi, 2016.
- Uçar A, AL-Hamdani A. H. A, Alak G, Atamanalp M, Topal A, Arslan H, ... & Şensurat T. (2012). Karboksın'ın gökkuşuğu alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*)'nda süperoksitdismutaz enzim aktivitesi üzerine etkisi. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 5(2), 83-85.
- Ural M. Ş, Çalta M, Celayir Y. Gökkuşuğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss Walbaum, 1972*) Yumurtalarının Dezenfeksiyonunda Sirkenin Kullanılabilirliği. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 2(3), 81-88.
- Velisek J, Stara A, Li ZH, Silovska S, ve Turek J. (2011). Gökkuşuğu alabalığındaki dört anestezinin kan biyokimyasal profilleri ve oksidatif stres biyobelirteçleri üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması. *Su Ürünleri*, 310 (3-4), 369-375.
- Yonar M. E, Ispir U, Yonar S. M, Kirici M. (2016). Effect of copper sulphate on the antioxidant parameters in the rainbow trout fry, *Oncorhynchus mykiss*. *Cellular and Molecular Biology*, 62(6), 55-58.
- Yonar S. M, Sağlam N, Yöntürk Y, Aytemur A, Kosar A. (2014). Formaldehit Uygulanan Gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nda Bazı Hematolojik ve Antioksidan Parametrelerin Araştırılması. *Journal of Fisheries Sciences. com*, 8(4), 317.

- Yonar S. M, Sakin F, Yonar M. E, Ispir U, & Kirici M. (2011). Oxidative Stress Biomarkers of Exposure to Deltamethrin in Rainbow Trout FRY(*Oncorhynchus mykiss*). *Fresenius environmental bulletin*, 20(8), 1931-1935.
- Yüzereroğlu T.A, *Oreochromis niloticus*'da Bakır, Kadmiyum ve Bakır-Kadmiyum Etkileşiminde Metallerin Doku ve Organlarda Birikimi, Aliminasyonu ve Antioksidant enzim Aktivitelerine Etkileri. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Doktora tezi, Adana: Çukurova Üniversitesi, 2011.



ÖZGEÇMİŞ

Ben Esra Yıldırım, 1982 Kars doğumluyum. 1984'den beri Erzurum'da yaşıyorum. 2010'da Erzurum Meslek Yüksek Okulu/ Gıda Kalite Kontrolü ve Analizi Bölümü okudum. Sonrasında 2012'de dikey geçişle Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji bölümüne geçtim. 2015'de mezun oldum. Hâlihazırda aynı bölümde yüksek lisans yapmaktayım.

