



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNERLİK BİYOKİMYASI ANABİLİM DALI

**VİRAL HEMORAJİK SEPTİSEMİ VİRÜSÜNÜN  
GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDA (*Oncorhynchus  
mykiss*) DOKU MALONDİALDEHİT VE ANTİOKSİDAN  
DÜZEYLERİNE ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Merve ÖZCAN**

**Samsun  
Kasım-2018**





ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNERLİK BİYOKİMYASI ANABİLİM DALI

**VİRAL HEMORAJİK SEPTİSEMİ VİRÜSÜNÜN  
GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDA (*Oncorhynchus  
mykiss*) DOKU MALONDİALDEHİT VE ANTİOKSİDAN  
DÜZEYLERİNE ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Merve ÖZCAN**

**Danışman  
Prof. Dr. Ali ERTEKİN**

**Samsun  
Kasım-2018**

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Merve ÖZCAN tarafından Prof. Dr. Ali ERTEKİN danışmanlığında Viral Hemorajik Septisemi Virüsünün Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Doku Malondialdehit ve Antioksidan Düzeylerine Etkisi başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından ..... /.../2018 tarihinde yapılan sınav ile Veterinerlik Biyokimyası Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ali ERTEKİN  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Gülay ÇİFTÇİ  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Ayşegül ÇEBİ  
Giresun Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üye tarafından uygun görülmüştür.

..... / ..... / .....

**Prof. Dr. Ahmet UZUN**  
**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimi ve tez çalışma sürecinde desteğini her zaman hissettiğim, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, birlikte çalışmaktan onur ve mutluluk duyduğum sevgili danışmanım Prof. Dr. Ali ERTEKİN'e, yine eğitimim süresince bilgilerinden faydalandığım Prof. Dr. Gül Fatma YARIM'a, Prof. Dr. Sena ÇENESİZ'e, Prof. Dr. Gülay ÇİFTÇİ'ye ve Prof. Dr. Cevat NİSBET'e, viroloji anabilim dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Harun ALBAYRAK'a, zootekni ve hayvan besleme anabilim dalı Dr. Öğr. Üyesi Habip MURUZ'a, ayrıca manevi olarak desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Mehmet TÜTÜNCÜ'ye,

Virolojik çalışmalarda ve numunelerin alınmasında katkı sağlayan Araş. Gör. Cüneyt TAMER'e

Tez çalışma sürecimde desteklerini her zaman hissettiğim ve laboratuvar çalışmalarımdayanımdayan değerli arkadaşlarım, Araş. Gör. Emine ALTIN, Araş. Gör. Ayris GÖKÇEOĞLU, Elif TUNA, Dilek ZORLU ve Berika TAŞTEKİN'e,

Manevi desteğiyle beni her zaman cesaretlendiren Eser AKAL hocama,

Bütün hayatım boyunca olduğu gibi eğitimim süresince de yanımda olan kıymetli anneme ve babama,

Varlıklarıyla hayatımı anlamlandıran, her anımda yanımda olan, eğitimim boyunca bir an olsun desteğini esirgemeyen sevgili eşim Araş. Gör. Ümit ÖZCAN ve canım oğlum Ahmet Asil ÖZCAN'a,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

### VİRAL HEMORAJİK SEPTİSEMİ VİRÜSÜNÜN GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDA (*Oncorhynchus mykiss*) DOKU MALONDİALDEHİT VE ANTIOKSİDAN DÜZEYLERİNE ETKİSİ

**Amaç:** Bu çalışma, Viral hemorajik septisemi virüsünün (VHSV) gökkuşığı alabalığı doku malondialdehit ve antioksidan düzeyleri üzerine etkisini irdelemek amacıyla planlandı.

**Materyal Metod:** Çalışmada 15-30 cm uzunluğunda, 40-100 g ağırlığında 20 Gökkuşığı alabalığı kullanıldı. Balıklar rastgele iki gruba ayrıldı. Birinci grup virüs enjekte edilen alabalıklardan, ikinci grup kontrol alabalıklarından oluştu. Uygulama süresi 20 gün olarak planlandı. Uygulamanın sonunda alabalıklardan kas doku örnekleri alındı. Örneklerde malondialdehit (MDA), katalaz (CAT), redükte glutatyon (GSH), vitamin C ve total protein miktarları ölçüldü.

**Bulgular:** Alabalık kas dokusu MDA düzeylerindeki artışlar kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p < 0.05$ ). GSH ve total protein düzeylerinde saptanan düşüşler ve CAT aktivitesi ile vitamin C miktarlarında gözlenen artışlar istatistiki açıdan bir anlam ifade etmedi.

**Sonuç:** VHSV uygulanan alabalıkların kas dokusu MDA, antioksidan maddeler ve total protein düzeylerinde değişimler gözlemlendi. Bu değişimler kas dokusu hücrelerinde oksidatif hasardan kaynaklı, kısmi yıkımlanmanın şekillenmiş olabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidanlar; Gökkuşığı alabalığı; Malondialdehit; Viral hemorajik septisemi virüsü

Merve ÖZCAN, Yüksek Lisans Tezi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Kasım-2018

## ABSTRACT

### THE EFFECT OF VIRAL HEMORRHAGIC SEPTICEMIA VIRUS ON THE TISSUE MALONDIALDEHYDE AND ANTIOXIDANT LEVELS IN RAINBOW TROUTS (*Oncorhynchus mykiss*)

**Aim:** In this study were planned to investigate the effects of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) on the levels of malondialdehyde and antioxidant in rainbow trout tissue.

**Material and Method:** In this study, 20 rainbow trout which were about 40-100 g weighing and 15-30 cm long, was used. The fishes were randomly divided into two groups. The first group consisted of virus-injected rainbow trout, and the second group consisted of control rainbow trout. The application period was planned as 20 days. Muscle tissue samples were taken from rainbow trout at the end of the period. Malondialdehyde (MDA), catalase (CAT), reduced glutathione (GSH), vitamin C and total protein were measured in the samples.

**Results:** Increases in rainbow trout muscle tissue MDA levels were statistically significant ( $p < 0.05$ ) compared to the control group. Decreases in GSH and total protein levels and increases in CAT activity and vitamin C levels did not make any statistical significance.

**Conclusion:** The changes was observed in MDA, antioxidant substances and total protein levels in muscle tissue of VHSV infected rainbow trouts. These changes suggest that partial degradation may be caused by oxidative damage in muscle cells.

**Keywords:** Antioxidants; Malondialdehyde; Rainbow trout; Viral hemorrhagic septicemia virus

Merve ÖZCAN, Master Thesis

Ondokuz Mayıs University - Samsun, November-2018

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|             |   |
|-------------|---|
| <b>BHT</b>  | : Bütillenmiş Hidroksi Toluen           |
| <b>BSA</b>  | : Sığır Serum Albumin                   |
| <b>CAT</b>  | : Katalaz                               |
| <b>DNPH</b> | : 2,4-dinitrofenilhidrazin              |
| <b>DTNB</b> | : 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoik asit) |
| <b>EDTA</b> | : Etilen diamin tetraasetikasit         |
| <b>GGT</b>  | : Gama-Glutamil Transferaz              |
| <b>GPx</b>  | : Glutasyon Peroksidaz                  |
| <b>GR</b>   | : Glutasyon Redüktaz                    |
| <b>GSH</b>  | : Glutasyon                             |
| <b>GSSG</b> | : Okside Glutasyon                      |
| <b>GST</b>  | : Glutasyon S-transferaz                |
| <b>LPO</b>  | : Lipit Peroksidasyonu                  |
| <b>MDA</b>  | : Malondialdehit                        |
| <b>MSR</b>  | : Metiyonin sülfoksit redüktaz          |
| <b>ROS</b>  | : Reaktif Oksijen Türleri               |
| <b>SOD</b>  | : Süperoksit dismutaz                   |
| <b>TBA</b>  | : 2-tiyobarbitürik asit                 |
| <b>TCA</b>  | : Trikarboksilik Asit                   |
| <b>VHSH</b> | : Viral hemorajik septisemi hastalığı   |
| <b>VHSV</b> | : Viral hemorajik septisemi virüs       |



## İÇİNDEKİLER

|  |     |
|--|-----|
| <b>ÖZET</b> .....  | iv  |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | v   |
| <b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....                                       | vi  |
| <b>İÇİNDEKİLER</b> .....   | vii |
| <b>1. GİRİŞ</b> .....  | 1   |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....   | 2   |
| 2.1. Viral Hemorajik Septisemi Virüs.....                                  | 2   |
| 2.2. Gökkuşuğu Alabalığı.....  | 3   |
| 2.3. Serbest Radikaller .....  | 4   |
| 2.4. Lipit Peroksidasyonu.....   | 5   |
| 2.4.1. Malondialdehit.....   | 6   |
| 2.5. Antioksidan Savunma Sistemi .....                                     | 8   |
| 2.5.1. Enzimatik Antioksidanlar .....                                      | 10  |
| 2.5.1.1. Süperoksit Dismutaz.....  | 10  |
| 2.5.1.2. Glutatyon Peroksidaz.....   | 10  |
| 2.5.1.3. Katalaz .....   | 10  |
| 2.5.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar .....                              | 11  |
| 2.5.2.1. Glutatyon .....   | 11  |
| 2.5.2.2. C Vitamini .....  | 12  |
| 2.5.2.3. E Vitamini .....  | 13  |
| <b>3. MATERYAL VE METOD</b> .....  | 14  |
| 3.1. Materyal .....  | 14  |
| 3.1.1. Deney Hayvanları.....   | 14  |
| 3.1.2. Deney Hayvanlarının Gruplara Ayrılması ve Yapılan Uygulamalar ..... | 14  |
| 3.1.3. Doku Örneklerinin Alınması ve Analizler İçin Hazırlanması.....      | 14  |
| 3.2. Metod .....   | 15  |
| 3.2.1. Doku MDA Tayini .....   | 15  |
| 3.2.2. Doku GSH Tayini.....  | 15  |
| 3.2.3. Doku C Vitamini Tayini .....  | 16  |
| 3.2.4. Doku Katalaz Tayini.....  | 16  |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.2.5. Doku Total Protein Tayini ..... | 17        |
| 3.3 İstatistiksel Değerlendirme.....   | 18        |
| <b>4. BULGULAR.....</b>                | <b>19</b> |
| <b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>      | <b>23</b> |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>                 | <b>29</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>                  | <b>37</b> |



## 1. GİRİŞ

VHSV, Avrupa'daki çiftliklerde gökkuşığı alabalıklarını (*Oncorhynchus mykiss*) etkileyen en ciddi viral patojendir (Jensen ve ark., 1979). VHSV Rhabdoviridae ailesinden olup Novirhabdoviridae cinsine aittir. Viral hemorajik septisemi hastalığı (VHSH) birçok deniz balıkları ve tatlı su balıklarında görülen sistemik bir enfeksiyondur. Balıklar içerisinde en çok yavru balıklar bu enfeksiyona duyarlıdır. 1938'de Avrupa'da ilk kez ortaya çıkan hastalığın tanımlanması 1963'ü bulmuştur (Skall ve ark., 2005).

Gökkuşığı alabalığı, yapay yumurta yetiştiriciliğinin kolaylığı ve kuluçka süresinin kısa olması gibi özelliklerinden dolayı yetiştiricilikte çok fazla tercih edilen, vücudu uzamış ve basık yapıda, sırt kısmında bulunan yağ yüzgeci ile karakteristik bir balık türüdür (Emre ve Kürüm, 2007).

Lipit peroksidasyonu, biyomoleküllere çok fazla zarar verme özelliğine sahip olan zincir reaksiyondur. Membran yapısındaki doymamış yağ asitleri serbest radikaller ile reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini meydana getirirler. Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen ürünler membran yapısına katılarak geri dönüşümü mümkün olmayan hasara neden olurlar ve dolaylı olarak reaktif aldehitleri oluşturarak diğer hücre bileşenlerinde zarara sebep olurlar. Sonuç olarak doku hasarının yayılmasıyla çeşitli bozulmalar ortaya çıkar (Wang ve Quinn, 1999).

Oksidatif stres antioksidanlar ve oksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar lehine bozulması olarak tanımlanır. Hücrelerde hasar ve fonksiyon bozukluklarının meydana gelmesi serbest radikal düzeylerinin artmasından dolayı olup bu artışın nedeni ise organizmanın antioksidan savunma sisteminin yetersiz kaldığı durumlardır (Tabakoğlu ve Durgut, 2013).

Bu tez çalışmasında, VHSV' nin Gökkuşığı alabalığı doku MDA, antioksidan maddeler ve total protein düzeyleri üzerine etkisi irdelenecektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Viral Hemorajik Septisemi Virüs

VHSV Rhabdoviridae ailesi Novirhabdoviridae cinsine ait bir virüsdür. Gökkuşığı alabalıklarını etkileyen ciddi viral patojendir. VHSV özellikle yavru balıkların duyarlı olduğu, birçok deniz balıkları ve tatlı su balık türlerinde de görülen yaygın bir enfeksiyondur. Avrupa’da ilk kez 1938’de ortaya çıkan hastalık (Skall ve ark., 2005), 1946’da Polonya’nın güneyinde ve 1950’li yılların başında Fransa’da “Bulaşıcı Anemi” ismiyle tanımlanırken Danimarka’da bu hastalık “Egtved Hastalığı” adını almıştır. Bu virüsün viral etiyojisi hakkında bilgi edinilmesi, alabalık hücre kültüründe ilk kez izolasyonunun yapılmasıyla başladı. 1963’de yapılan uluslararası balık patolojileri toplantısında bu hastalığa “Viral Hemorajik Septisemi Hastalığı (VHSV)” adı verildi (Besse, 1995).

Su ürünleri yetiştiriciliğinde bulaşıcı bir hastalık olarak bilinen VHSV, gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), kalkan (*Scophthalmus maximus*) ve japon balıklarında (*Paralichthys olivaceus*) çok fazla görülmektedir. VHSV genotip I’in neden olduğu enfeksiyonlar gökkuşığı alabalığı yetiştiriciliğinde gözlenen en ciddi viral hastalıklar arasındadır ve gökkuşığı alabalıklarında % 80-100’e, küçük ve yaşlı balıklarda ise % 10-50’ye varan oranlarda ölümlere neden olmaktadır. VHSV, vahşi ve kültür balıklarında ciddi hastalığa neden olmasından dolayı Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü’ne (OIE) bildirilebilir hastalıklar arasında yer almaktadır (Vennerström ve ark., 2017).

Virüsün dört genotipi vardır. Bu çeşitliliğin nedeni coğrafik dağılımla paraleldir. Dört genotipten üçünün, deniz balıklarında ve tatlı su gökkuşığı alabalığında enfeksiyona yol açan virüsün kaynağı olduğu düşünülür. Virüsün nötralizasyon testi bulgularına göre ise 3 serotipi bulunmaktadır; bunlardan ilki izolasyonu Danimarka’da yapılan tip 1 F1 zinciri, ikincisi yine izolasyonu Danimarka gökkuşığı alabalıklarında yapılmış olan tip 2 Heddam ve üçüncüsü ise Fransa kahverengi alabalıklarında izole edilmiş olan tip 3’ dür (Gadd, 2013).

Virüs konağa girişini genellikle balığın yüzgeç bölgesinden yapar. Kronik olarak enfekte balıklar vücutlarındaki virüsü vücut sıvılarıyla yayarak bulaşmayı gerçekleştirirler. Akut enfeksiyon semptomları olarak koyulaşmış vücut rengi, uyuşukluk, sarmal yüzme biçimi, ekzoftalmi, yüzgeç kanamaları ve soluk solungaçlar

görülür. Virüs girdiği bölgelerde peteşiyal ya da ekimatöz hemorajiler oluşturduğu için genellikle kendine hedef olarak, kasları ve iç organlarda bulunan endotelial kan damarlarını belirler (Skall, 2005).

Teşhiste genellikle serolojik testler ve moleküler yöntemler kullanılır. Serolojik testler özellikle su sıcaklığının yüksek olduğu, hücre kültüründe izolasyon yapılamadığı ve endemik enfekte popülasyonlarda klinik semptom gözlenmediği durumlarda oldukça avantajlıdır. Ancak düşük su sıcaklığında enfeksiyondan sonra balıklarda antikor yanıtının yavaş gelişmesi ise serolojik testlerin dezavantajı olarak sayılır (Schyth ve ark., 2012).

## **2.2. Gökkuşığı Alabalığı**

Gökkuşığı alabalığı, yapay olarak yumurta yetiştirilmesinin kolaylığı ve kuluçka zamanının kısa olması gibi özellikleri nedeniyle yetiştiricilikte çok fazla tercih edilen balık türüdür. Vücudu uzun ve basık yapıda olup, sırt kısımlarında sahip oldukları yağ yüzgeçleri ile karakteristiktir (Emre ve Kürüm, 2007). Gökkuşığı alabalıklarının büyüme oranı ortamdaki besin miktarına ve suyun sıcaklığına bağlı olarak farklılık göstermektedir. Sert sularda ve soğuk bölgelerde yaşamını sürdüren bu balıklar, durgun sularda ve sıcak bölgede yaşayan balık türlerine göre daha uzun ömürlüdürler (Eren, 2011).

Balıkların kas sistemi miyomerlerden meydana gelmiştir. Yapı olarak sıcakkanlı hayvanların kas fibrilleri ile balıklardaki kas fibrilleri aynıdır. Sıcakkanlı hayvanlarınkine göre kas fibrillerinin kısa olması aralarında bir fark meydana getirir. Balık kas bölümlerinin açık renkli ya da koyu olması miyogloblin konsantrasyonunun farklı olmasından dolayıdır. Koyu renk olanlar kalp kasına benzerken aynı zamanda bu kaslar balıkların devamlı olarak yüzebilmesini sağlar. Balıkların açık renge sahip kasları ise sırtlarında ve karınlarında bulunup, kaçma gibi durumlarında işe yararlar (Ternes, 1994; Tülsner, 1994).

Su ürünleri yetiştiriciliğinde balıklar iyi beslenmeli ve suyun kalitesi gerektiği gibi olmalıdır. Balık sağlığının konservatif muayenesi kanın hematolojik ve biyokimyasal analizleri ile yapılır (Rehulka, 2002).

### 2.3. Serbest Radikaller

Dış yörüngelerinde bir ya da daha fazla çiftleşmemiş elektrona sahip yapılar serbest radikaller olarak tanımlanır. Serbest radikaller, dıştaki orbitallerinde tek elektron bulunduran oldukça reaktif moleküllerdir. Elektron alışverişlerini hücre içindeki herhangi bir molekül ile yapabilirler ve bu nedenle serbest radikaller patolojik veya fizyolojik reaksiyonlar esnasında moleküllerin yapısını bozabilirler (Durmuş, 2005). Metabolik süreçlerde meydana gelen serbest elektronların bir sistemden başka bir sisteme aktarılması sonucu organizmada enerji açığa çıkar. Aktarılma sırasında elektron transfer zincirinden kopan elektronların oluşturduğu oksiradikaller hücrelerde bütünlüğün ve geçirgenliğin bozulmasına neden olur (Fang ve ark., 2002).

Serbest radikaller üç farklı şekilde oluşurlar. Kovalent bağlı normal bir moleküldeki bağların homolitik olarak parçalanarak elektronlardan her birinin farklı atomlar üzerinde kalmasıyla, radikal özelliğe sahip olmayan moleküldeki bağların heterolitik olarak parçalanması veya tek bir elektronun kaybolmasıyla ve radikal özelliği bulunmayan moleküle bir elektronun eklenmesiyle oluşmaktadırlar (Özcan ve ark., 2015).

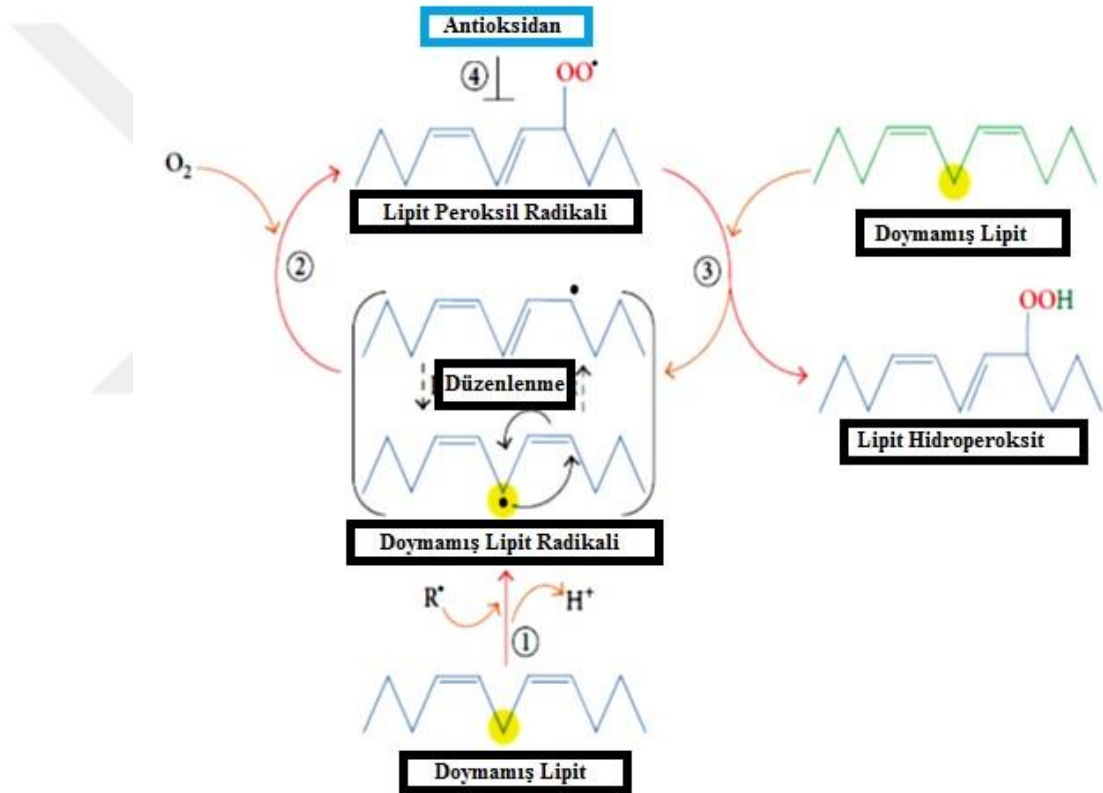
Serbest radikallerin meydana gelmesi, antioksidan kapasiteyi aşarsa fonksiyonel ve metabolik birçok bozukluğu ortaya çıkarır. Endojen oksidatif stresin oluşmasına, dokulardaki single elektronların oksijene devamlı akışı neden olur. Oksijenden türeyen peroksit, süperoksit radikali, hidroksil radikali ve diğer serbest yapıdaki radikaller çok reaktif olup, dolayısıyla membran bütünlüğünü sağlayan fosfolipitlerin, proteinlerin, DNA ve RNA gibi moleküllerin bütünlüğünü tehdit ederler. Çeşitli biyolojik olaylarda, örneğin; kanser, antimikrobiyal savunma, radyasyon hasarı, iltihaplanma, fotobiyolojik etkiler ve yaşlanmada, reaktif oksijen türleri rol oynar. Sonuç olarak ise DNA baz hasarları, lipid peroksidasyon ürünleri, protein oksidasyon ürünleri açığa çıkar (Balz, 1994).

Serbest radikallerin zararlarını engellemek için organizma tarafından, antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak bilinen birçok savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Antioksidanların düzeyleri ile serbest radikaller arasındaki hassas dengenin korunmaması halinde, hücre hasarına kadar giden birçok patolojik değişiklik meydana gelmektedir. İnsanlar askorbik asit sentezleme kabiliyetine gereksinim duyarlar bunun nedeni askorbik asitin oksidatif stresten hücreleri koruyan

önemli bir antioksidan olmasıdır. Bu yüzden diyetle alınması ve serbest okside formlarından askorbata geri dönüşümü, hücre içi askorbat seviyelerinin korunması için gereklidir (Yapar, 2006).

## 2.4. Lipit Peroksidasyonu

Lipit peroksidasyonu (LPO), serbest radikallerin etkisiyle başlayan ve membran yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna sebep olan ve böylelikle membranların lipit yapısını değiştirmesiyle hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan kimyasal bir olaydır. Olay otokatalitik olarak başladıktan sonra zincirleme olarak devam eder (Basaga, 1990).



**Şekil 1.** Lipit Peroksidasyonu. 1. Basamak başlangıç basamağıdır, bu basamakta prooksidanlar karbon merkezli lipit radikali oluşturmak üzere alilik hidrojeni çıkarırlar, 2. Basamak ilerleme basamağıdır, bu basamakta hızlı bir şekilde oksijen ile etkileşime giren lipit radikali, lipit peroksil radikalinin oluşmasını sağlar, 3. basamakta, oluşan bu lipit peroksil radikali bir başka doymamış yağ asiti molekülünden hidrojen çıkmasına neden olarak yeni bir lipit radikalinin ve lipit hidroperoksitin oluşmasını sağlar, dördüncü son basamakta lipit peroksil radikal türlerine hidrojen veren antioksidanlar, radikal olmayan ürünlerin oluşumuna neden olurlar (Ayala ve ark.'dan, 2014)

Membran fosfolipitlerinde bulunan çoklu doymamış uzun zincirli yağ asitleri, özellikle araşidonik asit ve dekosheksaenoik asit lipit peroksidasyonuna en duyarlı bileşiklerdir. Bu nedenle lipit peroksidasyonunun yol açtığı en önemli hasar hücre membranında gözlenir (Basaga, 1990).

Lipit peroksidasyonu, kontrollü ve enzimatik bir sistem olan lipit metabolizmasının tersine, başlama, uzama ve sonlanma basamaklarından oluşan kontrolsüz olarak ilerleyen enzimatik olmayan bir süreçtir. Hidroksil, alkoksil veya peroksil radikalleriyle başlayıp, doymamış yağ asitlerinin karbon-karbon çift bağına komşu metilen grubundaki hidrojen atomunun ayrılmasıyla oluşan kimyasal bir reaksiyondur. Uzama basamağında, lipit peroksil radikalının üretilmesi merkezi karbon olan lipit radikalının oksijenizasyonu sonrası komşu doymamış yağ asidinden hidrojen kopmasıyla gerçekleşir. Sonrasında kendiliğinden devam eden bir zincir reaksiyonu başlatarak başlangıçtaki oksidatif durumun artmasına neden olur. Lipit peroksil radikali, hücre membranı yapısında bulunan doymamış yağ asitlerinden hidrojen atomunun kopmasına neden olur ve serbest kalan hidrojen atomlarını lipit hidroperoksitlere dönüştürür (Bradley-Whitman, 2015).

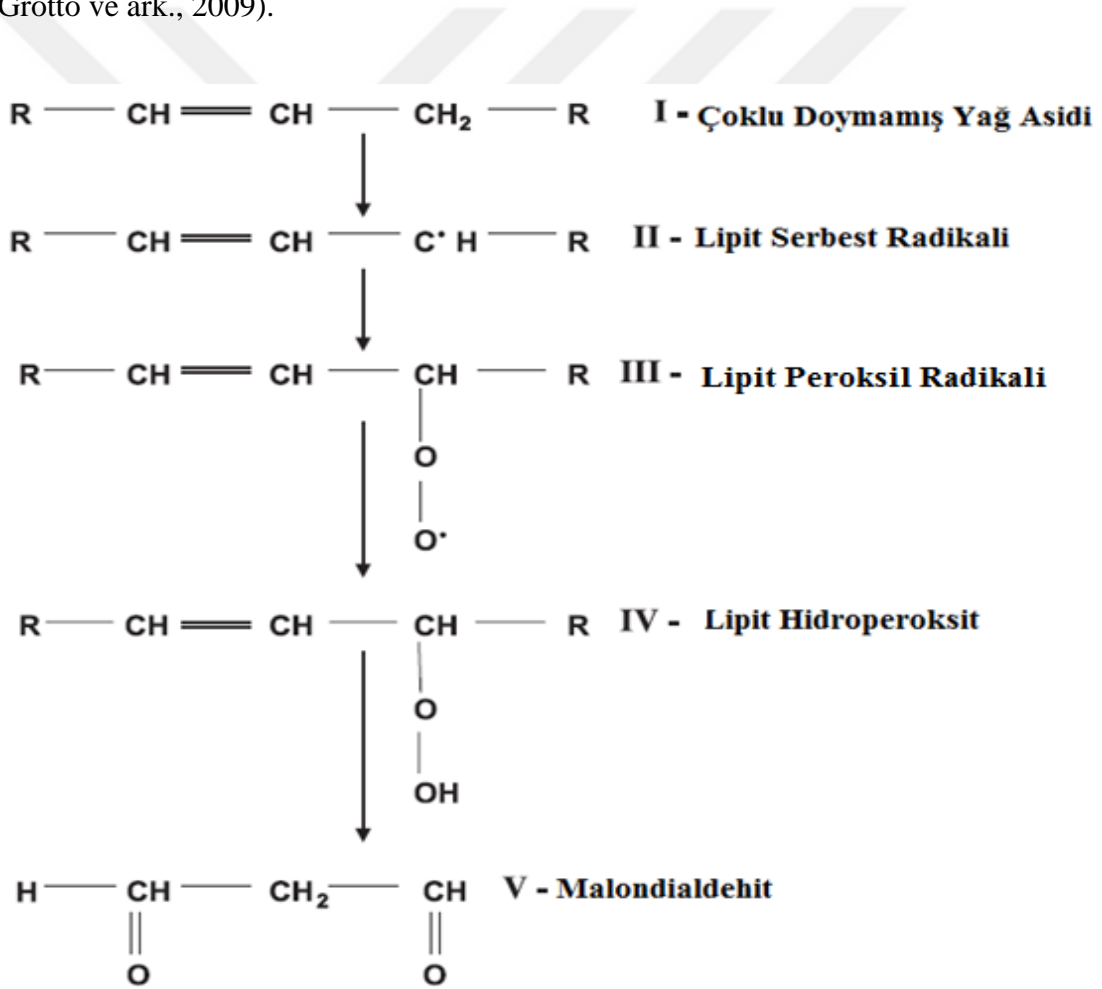
Lipit peroksidasyonu, biyomoleküllere çok fazla hasar verme özelliğine sahip bir zincir reaksiyonudur. Membran yapısındaki doymamış yağ asitleri serbest radikaller ile reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerinin oluşumuna sebep olurlar. Lipit peroksidasyon sonucu oluşan ürünler doğruca membran yapısına katılarak geri dönüşümsüz hasar oluşturarak reaktif aldehyitlerin ortaya çıkmasını sağlarlar ve bunun sonucunda diğer hücre bileşenlerinde zarara yol açarak doku hasarının yayılmasıyla çeşitli bozulumlara sebep olurlar (Wang ve Quinn, 1999).

#### **2.4.1. Malondialdehit**

Serbest radikallerin etkisi ile membran yapısındaki doymamış yağ asit zincirinden bir hidrojen atomunun kopması ile başlayan lipit peroksidasyonu sonucu yağ asiti zinciri bir lipit radikali niteliği kazanır. Bu radikaller moleküler oksijenle etkileşime geçerek lipit peroksil radikalleri meydana getirirler. Lipit peroksidasyonunun en önemli ürünü olan MDA, DNA bazları ile reaksiyon meydana getirerek bazların mutajenik karakter kazanması gibi pek olumsuzluklara neden olan, hücre membranlarından iyon geçişlerini engelleyerek geçirgenliğin hasar görmesine de sebebiyet veren vücut için oldukça zararlı bir üründür (Ertekin ve ark., 2008)



Çoklu doymamış yağ asitlerinde reaktif türlerin hedefi karbon-karbon çift bağıdır. Serbest radikallerin hidrojen atomunu kolayca alabilmesi, bu karbon-karbon çift bağının yağ asitinin karbon-hidrojen bağına zayıflatmasından kaynaklanmaktadır. Lipit serbest radikali, serbest radikalın bir hidrojen atomunu serbest bırakmasıyla oluşur ve oluşan bu lipit serbest radikali oksidasyona uğrayarak bir peroksil radikalini oluşturur. Diğer çoklu doymamış yağ asitleriyle etkileşime giren peroksil radikali, o yağ asitlerinden elektron uzaklaştırır, böylelikle lipit hidroperoksitleri ve diğer lipit serbest radikalleri oluşturur. Bu süreç bir zincir reaksiyonu içerisinde devamlı olarak tekrarlanarak devam edebilir. Lipit hidroperoksit kararsız bir yapıya sahip olduğu için parçalanarak lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'yı oluşturur (Şekil 2.) (Grotto ve ark., 2009).



Şekil 2. Çoklu doymamış yağ asitlerinden MDA oluşumu (Grotto ve ark.'dan, 2009).

Doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ile oluşan MDA, yüksek omurgalı canlılardaki gibi balıklarda da lipid peroksidasyonu sonucu meydana gelen bir üründür. Oksidatif stres hücreler bileşenlerinde meydana gelir ve MDA en önemli göstergelerinden biridir. Balıklarda da diğer aerobik organizmalarda olduğu gibi oksidatif stres birçok hasar meydana getirir. Bu hasarı engellemek için vücutta birçok savunma sistemi gelişmiştir. Bunlar antioksidan savunma sistemleridir ve enzimatik karakterdeki SOD, CAT, GSH-Px ile enzimatik olmayan GSH, A, E ve C vitaminleri gibi maddelerden oluşurlar (Dautremepuits ve ark., 2003; Trenzado ve ark., 2006).

## **2.5. Antioksidan Savunma Sistemleri**

Anti savunma mekanizmaları, balıklar ve oksijenle solunum yapan bütün canlılarda reaktif oksijen ürünlerinin meydana getirdiği zararlı etkilerine karşı geliştirilmiştir (Keleştemur ve Özdemir, 2011). Antioksidanlar, oksijenin yıkım reaksiyonuna karşı koruyucu özellik gösterirler. Organizmada iç (sindirim, hastalık, solunum, yaralanma vb.) ve dış (çevresel faktörler) etkenlerin uyarımlarıyla sürekli zorlanmalar oluşmaktadır. Bu zorlanmalar sırasında ve sonrasında bir takım tahribatlar meydana gelir. Bu tahribatlar zorlanmalarla oluşan oksidan moleküllerin hücrelere ve dokulara saldırması sonucu oluşur (Quiles ve ark., 2002). Antioksidan savunma sistemi, organizmada reaktif oksijen türlerini ve diğer prooksidanları serbest radikal gidericiler ve antioksidan enzimlerle sürekli etkisizleştiren bir sistem olup reaktif oksijen türlerine karşı hücre içi ve hücre dışı bir savunma mekanizmasıdır (McLean ve ark., 2005).

Organizmada devamlı olarak serbest radikaller oluşur ancak buna karşın güçlü savunma sistemleri de mevcuttur. Eğer serbest radikallerin oluşum hızı ile ortadan kaldırılma hızı yani oksidatif denge sağlanabildiği sürece organizma bu bileşiklerden etkilenmemektedir. Antioksidan savunma sistemlerinin yeterince etki göstermemesi durumunda organizmada serbest radikallerin üretimi artar ve doku hasarı meydana gelir (Hailiwell, 1994). Oksidatif strese karşı organizmanın savunma mekanizmaları yetersiz kaldığında hücrelerde oksidatif hasar gelişir ve bu da fonksiyonların önemli oranda aksamasına neden olur, dolayısıyla pek çok hastalığın esas ve gelişiminde kritik bir öneme sahip olması hastalığın şiddetini artırır. Antioksidan savunma mekanizması, yaşlanma ve kardiyovasküler hastalıklar, kanser, sepsis, dejeneratif nörolojik hastalıklar, böbrek yetmezliği, infertilite, karaciğer ve kas hastalıkları gibi pek çok hastalığın etiolojisinden sorumludur (Ercan ve Fidancı, 2012; Gutteridge, 1993).

Antioksidan maddeler değişik şekillerde etkilerini gösterirler. Bunlar;

1. Birincil veya zincir kırıcı antioksidanlar: Kendi elektronlarından birini vermesi sonucu serbest radikalleri etkisiz hale getirebilmesi nedeniyle bunlara radikal temizleyici antioksidanlar da diyebiliriz.

2. İkincil antioksidanlar birçok mekanizma ile etki gösterirler. Bunlara; geçiş metallere sekestrasyonunu sağlayarak, CAT ve GPx geçiş metal iyonlarıyla etkileşime girerek ROS üreten peroksitlerin ortadan kaldırılmasını sağlaması nedeniyle önleyici antioksidanlar diyebiliriz.

3. Üçüncül antioksidanlar: Ortamdaki hasara uğramış biyomoleküllerin birikmeden ortamdaki kaldırılmasını sağlamasıyla onarıcı antioksidanlar adını alır. Buna hasara uğramış DNA'nın metiyonin sülfoksit redüktaz (MSR) enzimi ile onarımı örnek verilebilir (Kumar ve ark., 2010).

Fizyolojik şartlar altında diğer canlılar gibi balıklarda da reaktif oksijen türleri ya da oksijen radikallerinin devamlı olarak oluşması söz konusudur. Oluşan bu radikaller antioksidanlar tarafından tam olarak kaldırılamazsa vücutta çeşitli hasarlar meydana getirirler. Özellikle DNA, hücre membranlarındaki lipit ve proteinler ile diğer önemli hücre komponentleri ve enzimler bu oksijen radikallerinden etkilenirler. Ayrıca çeşitli hastalıklar oluşarak beraberinde yüksek mortaliteye de neden olmaktadır (Tocher ve ark., 2002)

Organizmada serbest radikallerin ortamdaki uzaklaştırılması için kullanılan koruyucu antioksidanlar iki gruba ayrılır. Bunlar; endojen ve ekzojen kaynaklı antioksidanlardır. Endojen antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayan olarak iki gruba ayrılır. Enzimatik olanları CAT, GPx ve SOD gibi enzimler oluşturur (Durmuş, 2005).

Enzimatik olmayan antioksidanlar kendi içlerinde iki ayrı gruba ayrılmışlardır. Bunlar, glutatyon, lipoik asit, bilirubin, ürik asit, L-arginin gibi maddelerden oluşan metabolik antioksidanlar ile vitamin E, vitamin C, karotenoidler, bakır, selenyum, mangan, çinko, gibi dışarıdan diyetle alınması gereken besinsel antioksidanlardır (Shinde ve ark., 2012).

### 2.5.1. Enzimatik Antioksidanlar

#### Süperoksit Dismutaz

SOD süperoksit radikalının  $H_2O_2$ 'e dönüşümünü katalizleyen metalloenzimdir (Kumar ve ark., 2010). SOD enzimleri birçok farklı formda bulunabilir. Bu enzim hücrede sitoplazmada ve mitokondride yer almaktadır. Hücre sitoplazmasında CuZn-SOD, mitokondrisinde ise Mn-SOD bulunur. Bazı bakteri türleri anaerobik ortamlarda demir içeren Fe-SOD enzim mekanizmasına sahiptirler. *Streptomyces griseus* bakterisi ise homotetranemik yapısında nikel içeren süperoksit dismutaz enzimine sahiptir. SOD, reaktif oksijen türlerinden süperokside bir elektron vererek  $H_2O_2$ 'e indirgerken, katalaz ve selenyum-bağımlı GPx ise  $H_2O_2$ 'i suya indirger. Süperoksit ile  $Fe^{3+}$ 'ün,  $Fe^{2+}$ 'ye indirgenmesi sonucunda hidroksil radikalının oluşmasının engellenmesi SOD'un antioksidan etkisini tanımlar (Baskın ve Salem, 1997).

#### Glutasyon Peroksidaz

Tetrametrik bir yapıda olan GPx, yapısında selenosistein bulundurur bu aminoasitin kendine özgü bir yapısı vardır. GPx glutasyon gibi düşük moleküler ağırlıklı tiyollerini kullanan bir enzimdir (Birben ve ark., 2012). Bu enzim, GSH varlığında fosfolipit hidroperoksitlerin rejenerasyonunu sağlamakta ve membranları oksidatif strese karşı korumaktadır. Peroksidazlar ise yüksek konsantrasyonlarda bulunan  $H_2O_2$ 'i  $H_2O$ 'ya indirgeyerek glutasyonu okside ederler. Bu reaksiyon GSH'ın okside formu olan GSSG'ye dönüşümünü sağlar, yeterli GSH düzeyleri, glutasyon redüktaz tarafından sağlanır (Avsian-Kretchmer ve ark., 1999).

#### Katalaz

CAT protein yapısında ve aerobik hücrelerin çoğunda bulunan,  $H_2O_2$ 'i  $O_2$  ve  $H_2O$ 'ya parçalayan karakteristik bir enzimdir. CAT toksik  $H_2O_2$ 'i hücrelerden uzaklaştırarak serbest radikal üretmeden hücreyi toksik etkilere karşı koruyan bir enzimdir (Koltaş ve Bilgin, 2016).

Organizmada birçok patoloji sonucunda açığa çıkan serbest oksijen radikallerinin sonucunda şekillenen oksidatif strese karşı ilk olarak CAT devreye girer ve yapısında dört hem grubu bulundurur (Benzer, 2001). CAT eritrosit, karaciğer, böbrek, kemik iliği ve çeşitli dokularda, özellikle peroksizom organellerinde bulunur (Demir ve ark, 2004). Hidrojen peroksit veya glukoz biosensörlerinin bileşimi olarak

analitiksel amaçlı geniş alanlarda kullanılabilen bir enzim olan katalaz, hidrojen peroksidin (oksitleyici, ağartıcı veya sterilizasyon amaçlı kul.) uzaklaştırılmasında da kullanılır (Alptekin ve ark., 2004).

Değişmiş katalaz aktivitesi birçok hastalıkta ortaya çıkmaktadır. DM'de, malign hastalıklarda, down sendromunda, deneysel nefrotoksikosisde ve kendini yenileyen dokularda azalmış katalaz aktivitesi gösterilmiştir (Djordjević ve ark., 2000). Eritrosit katalaz enziminde gözlenen genetik bozukluk sonucunda akatalazemi (normal aktivitenin %10'undan az aktivite göstermesi) ve hipokatalazemi (normal aktivitenin %50 kadarı aktivite göstermesi) durumu oluşmaktadır (Eaton ve Ma, 1995).

## **2.5.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar**

### **Glutasyon**

GSH sitoplazmada glutamik asit, glisin ve sisteinden sentezlenen bir tripeptiddir, adenosin trifosfata bağımlı iki adımda glisinden oluşur. İlk reaksiyon  $\gamma$ -glutamilsistein ligaz tarafından katalizlenen bir reaksiyondur ve bu basamakta  $\gamma$ -glutamilsistein üretilir. İkinci aşamada glisin eklenir ve GSH'yi oluşturmak üzere glutasyon sentetaz ile katalize edilir (Claudia ve ark., 2018). Glutasyonun derişimi, sentezinde görev alan enzimlerin derişimine ve sentezinde kullanılan substratlarının teminine bağlıdır. Hücrelerde glutamat ve glisinden çok fazla, ancak sisteinden sınırlı miktarlarda bulunur. Doku proteinlerinin yıkımından ve diyetle alınan proteinlerden gelen sistein, bazı hücrelerde sistatyonin yolunda serin amino asitinin metiyonin tarafından trans sülfürasyonu ile de oluşur. Dolayısıyla, iki sentetazın substratlarının derişiminin artmasıyla da glutasyon sentezinde artış meydana gelir (Meister, 1985).

Yapısında yüksek konsantrasyona (0,1-10 mM) sahip tiyol grubu bulunduran GSH endoplazmik retikulum hariç % 99'dan daha fazlası indirgenmiş durumda bulunur. Bu durumda kalabilmesi pentoz fosfat metabolik yoluyla olur. Bu metabolik yolda üretilen NADPH, glutasyon disülfid redüktazın katalizör olarak kullanıldığı reaksiyonda koenzim olarak işlev görür (Lu, 2014).

GSH'nın anahtar işlevi, hidrojen peroksit ve diğer organik peroksitlerin glutasyon peroksidaz yoluyla indirgenerek ilgili hidroksil bileşikleri ile sonuçlanır. GSH'da bulunan sistein tiyol grubu, ROS gibi kararsız moleküllere indirgeyici bir elektron vererek reaktif hale gelebilir. Bu reaktif GSH, GSSG'yi oluşturmak için başka

bir reaktif GSH ile birleşir, bu GSH'yı yeniden oluşturmak için GR için bir substrat görevi görür. Redoks dengesindeki bir diğer önemli adım, askorbat-GSH döngüsünü içerir. Askorbat ve GSH, askorbat peroksidazın  $H_2O_2$ 'i nötralize etmesine izin vermek için dehidroaskorbat redüktazın etkisi ile oksitlenir ve indirgenir. Önemli bir indirgeyici güç olan GSH, DNA'nın deoksiribonükleozid öncüllerinin oluşması için ribonükleotidlerin indirgenmesinde ve hücre içi proteinlerin, dihidrolipoat, sistein ve koenzim A gibi moleküllerin tiyol gruplarının, askorbat,  $\alpha$ -tokoferol gibi antioksidan moleküllerin korunmasında kullanılır. GSH ayrıca hücrelerin toksik bileşiklere, oksidatif hasara, radyasyona karşı korunmasında, bazı ilaçların inaktivasyonunda, östrojen, prostaglandin ve lökotrienler gibi bazı endojen bileşiklerin metabolik işlemlerinde de yer alır (Jozefczak ve ark., 2012).

GSH biyosentezinden sorumlu olan koruyucu, metabolik, katalitik ve taşıma işlemlerinin bir kısmında görev alan gama-glutamil döngüsü, aynı zamanda GSH sentezi ve kullanımının düzenlenmesinde rol oynar. Ayrıca yine sistein amino asidinin taşınması ve depolanmasında da önemi oldukça fazladır (Meister, 1983).

### **C Vitamini**

C Vitamini (Askorbik Asit) suda çözünebilir bir radikal toplayıcıdır. Dihidroaskorbata dönüşerek serbest radikalleri indirger. Özellikle E vitamini ve C vitamini zincir kırıcı antioksidanlardır (Burton, 1994).

Askorbik asit, insanlar, diğer primatlar, kobaylar ve meyve yiyen yarasaların L-glukonolakton oksidaz enzimini içermediklerinden dolayı dışarıdan almak zorunda oldukları esansiyel bir diyet vitamindir. Kollagen biyosentezinde kullanılan prolin hidroksilaz ve dopamini non-adrenaline dönüştüren dopamin-beta-hidroksilaz için önemli bir kofaktördür. Askorbik asit güçlü bir redükleyici ajan ve antioksidan olmasından dolayı süperoksit, hidroksil ve peroksit radikalleriyle reaksiyona girer ve bir ara ürün olan semidehidroaskorbat yoluyla askorbik asitin metaboliti olan dehidroaskorbik asiti meydana getirir (Sinclair ve ark., 1990).

Vitamin C, yapısında bulundurduğu 2 elektronunu verirken, 1 elektronunu da kaybederek bir serbest radikal, semidihidroaskorbik asit veya askorbil radikalini oluşturur. Askorbil radikali diğer serbest radikallere göre  $10^{-5}$  saniyelik yarı ömrü ile tepkimeye fazla girmeyen dolayısıyla daha stabil bir maddedir. Bu özelliğinden dolayı askorbik asit fazlaca tercih edilen bir antioksidandır. Askorbik asit serbest radikallerle

tepkime verirken, reaktif ve zararlı olan serbest radikal indirgenir ve yarı ömrü daha kısa olan askorbil radikali oluşur. Reaktif serbest bir radikalın indirgenmesi ve bunun yerine daha az reaktif bir bileşiğin oluşması süpürme (scavenging) veya sönmülendirme (quenching) olarak tanımlanmaktadır. Askorbik asit taşıdığı kimyasal özellikleri nedeniyle iyi bir serbest radikal süpürücüsüdür (Buettner ve Moseley, 1993).

Askorbil radikali uzun ömürlü bir bileşik değildir. Bunun nedeni yapısında çiftleşmemiş elektronları olmasıdır. İkinci elektronunu kaybederek dihidroaskorbik asiti meydana getirir. Dihidroaskorbik asidin stabilitesi sıcaklık pH gibi faktörlerden etkilenir (Washko ve ark., 1993). Askorbil radikali ve dihidroaskorbik asit oluştuktan sonra tekrar askorbik aside indirgenebilmektedirler. Ancak insanlarda oluşan bu indirgenme kısmi bir şekilde gerçekleştiğinden dolayı oksitlenen askorbik asidin tamamının geri kazanılması mümkün olmamaktadır (Padayatty ve ark., 2003).

### **E Vitamini**

E vitamini (alfa-tokoferol) lipit peroksidasyonuna karşı koruyucu bir serbest radikal temizleyicisi olarak davranır. Lipitte çözünen bir yapıya sahip olduğu için hücre zarlarının fosfolipit tabakasına ve kan lipoproteinleri içerisine rahatlıkla konsantre olabilmektedir. Vitamin E kendi başına zayıf reaktif bir radikale dönüşerek peroksidasyon zincir reaksiyonunun kesilmesine neden olur. Vitamin E' nin rejenerasyonu için askorbik asit gereklidir (Sinclair ve ark., 1990).

Geniş bir antioksidan kapasitesi ile hücrel membranları lipit peroksidasyonuna karşı koruyan  $\alpha$ -tokoferol, yağda çözünme özelliğine sahip bir antioksidandır. Lipit peroksidasyonunun ilerleme aşamasında merkezinde karbon bulunduran radikal, komşu doymamış yağ asitinden bir hidrojen alarak yağ asidi radikali oluşturur, oluşan bu radikal moleküler oksijen ile reaksiyona girererek peroksil radikalini meydana getirir.  $\alpha$ -tokoferol selenyum bağlı GPx-4 ile GSH'yı harcayarak hidroperoksitleri daha az toksik olan lipit hidroksitlere dönüştürürken, lipit peroksil radikallerini de lipit hidroperoksitlere indirger. Askorbat da  $\alpha$ -tokoferol radikalının indirgenmesini sağlayarak, aktif  $\alpha$ -tokoferölü rejenere eder. Bunun devamında da okside olan askorbil radikali GSH aracılığıyla askorbata dönüşür. Hücrel membranların radikaller sebebiyle yıkımına karşı korunmada antioksidan ağı devamlılığı çok önemlidir (Lebold ve Traber, 2014).

Bu çalışmada, Viral hemorajik septisemi virüsünün (VHSV) gökkuşacağı alabalığı doku malondialdehit ve antioksidan düzeyleri üzerine etkisini irdelemek amaçlanmıştır

### **3. MATERYAL VE METOD**

Çalışma Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğünde aynı Enstitünün 29/11/2016-11-1 nolu Etik Kurul Kararı ile izin verilen “*Escherichia coli* Ekspresyon Sistemine Dayalı Rekombinant Viral Hemorajik Septisemi Virüsü Glikoprotein G’nin Üretilmesi ve İmmünolojik Etkinliğinin Araştırılması” isimli projenin sonunda hasat edilen alabalıklardan alınan kas doku örneklerinde yapıldı. Tez çalışması Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (31.05.2018 tarihli 19572899/031-46 sayılı ve 2018/6 nolu karar).

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Deney Hayvanları**

Çalışmanın materyalini 15-30 cm uzunluğunda, 40-100 g ağırlığında 20 Gökkuşacağı alabalığı oluşturdu. Balıklar Trabzon Maçka Sümer Alabalık işletmesinden sağlandı.

##### **3.1.2. Deney Hayvanlarının Gruplara Ayrılması ve Yapılan Uygulamalar**

Alabalıklar her bir grupta 10 balık bulunacak şekilde deney ve kontrol olarak 2 gruba ayrıldı. Deney grubuna  $10^{-11}$  doku kültürü efektif dozunda intraperitoneal olarak VHS virüs enjekte edildi, kontrol grubu ise hiçbir uygulama yapılmadan uygun koşullarda bekletildi. Balıklar virüs enjeksiyonunu takiben 12 °C suda 21 gün bekletildi.

##### **3.1.3. Doku Örneklerinin Alınması ve Analizler İçin Hazırlanması**

21 gün sonra alabalıklardan kas doku örnekleri alındı. Kas doku örnekleri 1/10 oranında soğuk serum fizyolojik ile sulandırılarak homojen hale getirildi (PRO 200 Homojenizatör). Homojenize edilen numuneler 4000 rpm/30 dk santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant ependorf tüplere pipetlendi.



## 3.2. Metod

### 3.2.1. Doku MDA Tayini

1. Fosfat tamponu: 0,194 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 8,1 g  $\text{NaCl}$  ve 2,302 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  distile suda çözündürüldü, 1 L'ye tamamlandı, Ph 7,4 olacak şekilde ayarlandı.
2. 0,1 M EDTA çözeltisi: 37,224 g EDTA- $\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$  distile suda çözündürüldü, 1 L' ye tamamlandı.
3. % 0,88'lik BHT çözeltisi: 0,220 g BHT 25 ml lik balon jodede mutlak alkolde çözündürüldü.
4. 0,05 N NaOH çözeltisi: 2 g NaOH distile suda çözündürüldü, 1 L'ye tamamlandı.
5. %30'luk TCA çözeltisi: 30 g TCA distile suda çözündürüldü. 100 ml'ye tamamlandı.
6. %1'lik TBA çözeltisi: 1 g TBA 0,05 N NaOH ile çözündürüldü hacim 100 ml' ya tamamlandı.

MDA tayini Sushil ve ark., (1989)'nın bildirdiği metoda göre çalışıldı. Deney tüpüne 200 µl örnek alındı, 800 µl fosfat tamponu, 25 µl BHT çözeltisi ve 500 µl %30'luk TCA eklendi ve tüp vortekslendi. 2 saat buzda bekletilen tüpler 2000 rpm/15 dk santrifüj edildi. Üstteki süpernatanttan 1 ml alındı, 75 µl 0,1 M EDTA- $\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$  ve 250 µl %1'lik TBA ilave edildi ve vortekslendi. Tüpler 90°C/15 dk sıcak su banyosunda bekletildi. Oda sıcaklığına gelen örnekler 532 nm'de spektrofotometrede (Thermo-Scientific Genesys 10S UV-Vis) okundu. Kör olarak 200 µl distile su kullanıldı, metottaki prosedür aynen uygulandı.

Hesaplama MDA ( $\mu\text{mol/g}$  doku) :  $(\text{OD } 532 / \epsilon.b) \times F$  formülü kullanıldı.

### 3.2.2. Doku GSH Tayini

1. 0,3 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  çözeltisi: 53,396 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4.2\text{H}_2\text{O}$  distile su ile çözündürülerek hacmi 1 L' ye tamamlandı.
2. DTNB (Ellman's) ayracı: 100 mg DTNB %1'lik sodyum sitrat çözeltisi ile 250 ml'ye tamamlandı.

Doku GSH ölçümü için değiştirilmiş Ellman metodu kullanıldı (Yüzüak ve ark., 2014). 0,5 ml örnek alındı, 2 ml 0,3 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,2 ml DTNB eklendi ve

karıştırıldı. 5 dk oda ısısında bekletildi, 412 nm'de spektrofotometre ile okundu. Kör olarak distile su kullanıldı.

Hesaplama için GSH ( $\mu\text{mol/g}$  doku) :  $(\text{OD } 412 / \epsilon.b) \times F$  formülü kullanıldı.

### 3.2.3. Doku C Vitamini Tayini

1. %10'luk TCA: 10 g TCA distile su 100 ml'ye tamamlandı.
2. 2,4-dinitrofenilhidrazin ayracı (DNPH): 4 g tiyoüre, 3 g DNPH, 50 mg bakır sülfat 9 mol/L'lik  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ile 100 ml'ye tamamlandı.
3.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (9 mol/L): % 98'lik  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 'den 48,91 ml alındı 100 ml'ye tamamlandı.
4. % 85'lik  $\text{H}_2\text{SO}_4$ : % 98'lik  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 'den 216 ml alındı distile su ile 250 ml'ye tamamlandı.

C vitamini ölçümü Omaye ve ark. (1979)'nın bildirdiği metoda göre çalışıldı. Homojenize edilmiş 1 ml örnek alındı, 1 ml % 10'luk TCA çözeltisi eklendi, vortekslendi, 4000 rpm/15 dk santrifüj edildi. 1 ml süpernatant alındı, 0,5 ml DNPH eklendi,  $37^\circ\text{C}/3$  saat bekletildi, buzdaki bekletilmiş % 85'lik  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 'den 2,5 ml eklendi, tüpler iyice karıştırıldı, oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi, 520 nm'de absorbansları okundu. Standart  $10 \mu\text{g/ml}$ 'lik saf askorbik asitten hazırlandı.

Hesaplama Vitamin C (  $\text{mg}/100\text{g}$  doku) :  $(\text{OD numune}/\text{OD standart}) \times F$  formülüne göre yapıldı.

### 3.2.4. Doku Katalaz Tayini

Katalaz tayini Aebi' nin (1984) metoduna göre çalışıldı.

1. Fosfat tamponu : a-) 6,81g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  distile su ile 1 L'ye tamamlandı. b-) 8,90g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  distile su ile 1 L'ye tamamlandı. 1:1,5 oranında karıştırıldı..
2. Hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (30 mM) : 0,34 ml %30' luk  $\text{H}_2\text{O}_2$  fosfat tamponu ile 100 ml'ye tamamlandı.
3.  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'li fosfat tamponu: Fosfat tamponuna optik dansite (240 nm) 0,5 olana kadar  $\text{H}_2\text{O}_2$  çözeltisinden ilave edilerek tampon çözelti hazırlandı.

Ölçüm için iki tüp alındı, tüplerden biri kör olarak diğer tüp örnek olarak işaretlendi, köre 2,99 ml fosfat tamponu örnek tüpe 0,01 ml örnek eklendi, daha sonra kör tüpe 0,01 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  li fosfat tamponu örnek tüpe ise 2,99 ml aynı

tampondan eklendi. Köre karşı örneğin absorbansının lineer azalma gösterdiği zaman aralığı 240 nm'de ölçüldü ve enzim aktivitesi hesaplandı.

Hesaplamalar Aktivite (k/g doku) :  $( 2.3/\Delta t ) \times ( \log A_1/A_2 ) \times F$  formülüne göre yapıldı.

### 3.2.5. Doku Total Protein Tayini

Total protein miktarı için biüret metodu kullanıldı (Tiftik, 1996).

1. 2,5 N Sodyum Hidroksit: 50 g NaOH distile suda çözündürüldü, 1 L' ye tamamlandı.
2. Sodyum Sülfat: 20 g sodyum sülfat distile suda çözündürüldü, 100 ml'ye tamamlandı.
3. Biüret Ayracı: 10 g Na-K tartarat ve 2,5 g bakır sülfat distile suda çözündürüldü, çözeltiye 2,5 N NaOH'dan 350 ml eklendi, distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
4. Sığır Serum Albumin (BSA) Standardı : 6 g/100 ml olarak hazırlandı.

|                   | Blank                            | Standart | Numune |
|-------------------|----------------------------------|----------|--------|
| Süpernatant       | -                                | -        | 50µl   |
| BSA standardı     | -                                | 50µl     | -      |
| Distile Su        | 50µl                             | -        | -      |
| NaSO <sub>4</sub> | 1 ml                             | 1 ml     | 1 ml   |
|                   | Karıştırıldı                     |          |        |
| Biüret Ayracı     | 1 ml                             | 1 ml     | 1ml    |
|                   | Karıştırıldı, 5 dakika beklendi. |          |        |
|                   | 505 nm'de absorbanlar okundu.    |          |        |

Hesaplamalar  $(OD_{Numune} \times Standartın\ Konsantrasyonu) / (OD_{standart}) \times F$  (seyreltme faktörü : 10) formülüne göre yapıldı.

### 3.3. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analizler için SPSS 21.0 paket programı Independent Samples T Testi ve Mann Whitney U Testi kullanıldı. Veriler  $\text{mean} \pm \text{standart error}$  olarak hesaplandı.



#### 4.BULGULAR

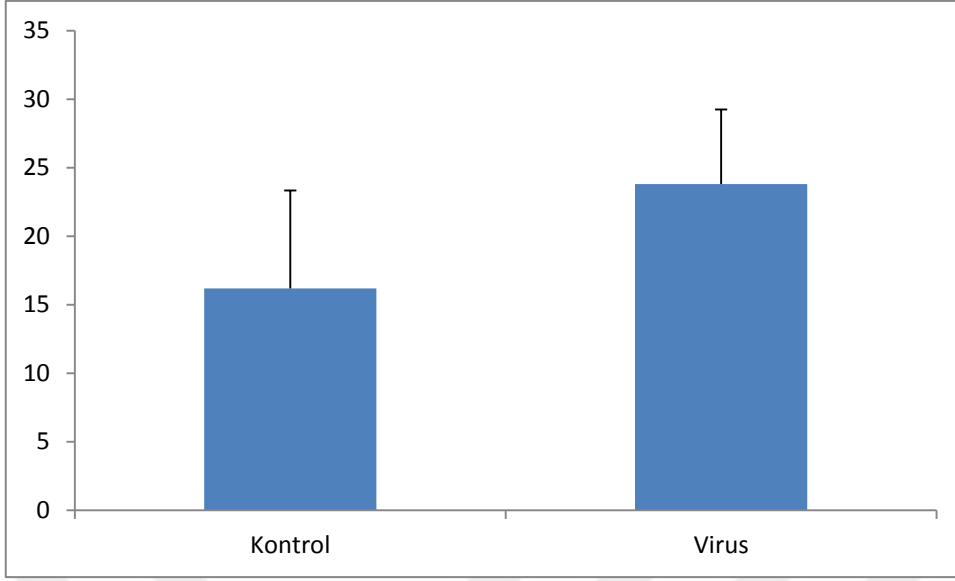
Kontrol ve deneme grubu alabalıklara ait kas doku örnekleri MDA, GSH, vitamin C ve total protein düzeyleri ile CAT enzim aktivitesi Tablo 1’ de sunulmuştur.

Kontrol grubu verilerine göre deneme grubu verileri karşılaştırıldığında alabalık kas dokusu örneklerinde ölçülen MDA düzeylerindeki artışlar istatistik olarak bir anlam ifade etti ( $p<0.05$ ) (Şekil 3). GSH ve total protein düzeylerinde saptanan düşüşler ve CAT aktivitesi ile vitamin C miktarlarında gözlenen artışlar istatistiki açıdan bir anlam ifade etmedi (Şekil 4, 5, 6, 7).

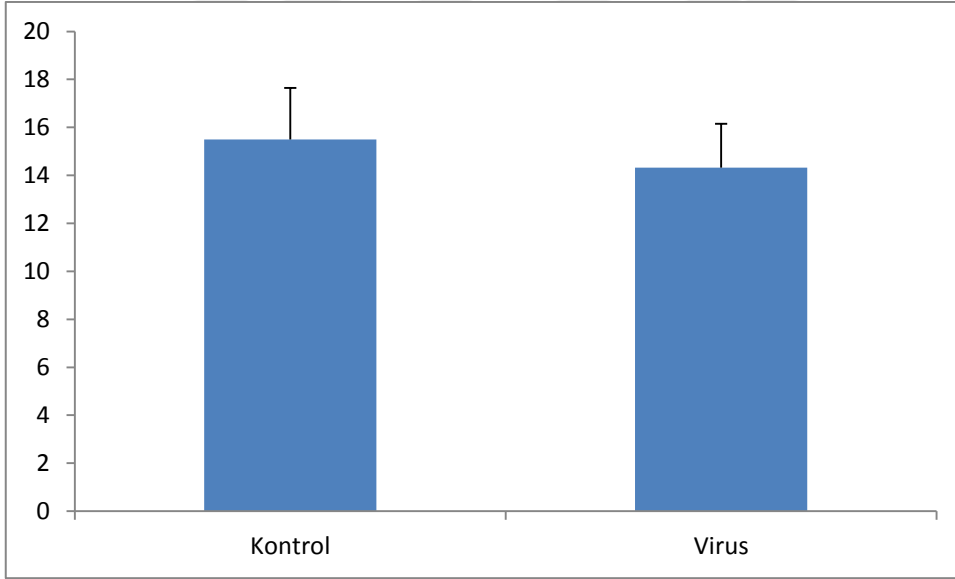
**Tablo 1.** Kontrol ve deneme grubu alabalıklara ait kas doku örnekleri MDA, GSH, vitamin C ve total protein düzeyleri ile CAT enzim aktivitesi.

| Gruplar       | n  | Parametreler                     |                                  |                     |                              |                       |
|---------------|----|----------------------------------|----------------------------------|---------------------|------------------------------|-----------------------|
|               |    | MDA<br>( $\mu\text{mol/g}$ doku) | GSH<br>( $\mu\text{mol/g}$ doku) | CAT<br>(k/g doku)   | Vitamin C<br>(mg/100 g doku) | Total Protein<br>(%g) |
| Kontrol Grubu | 10 | 16,197 $\pm$ 2,255               | 15,496 $\pm$ 0 ,678              | 34,705 $\pm$ 6,855  | 169,9 $\pm$ 9,737            | 6,991 $\pm$ 1,409     |
| Deneme Grubu  | 10 | 23,800 $\pm$ 1,724*              | 14,322 $\pm$ 0,577               | 59,297 $\pm$ 13,892 | 172,4 $\pm$ 9,542            | 6,437 $\pm$ 1,161     |

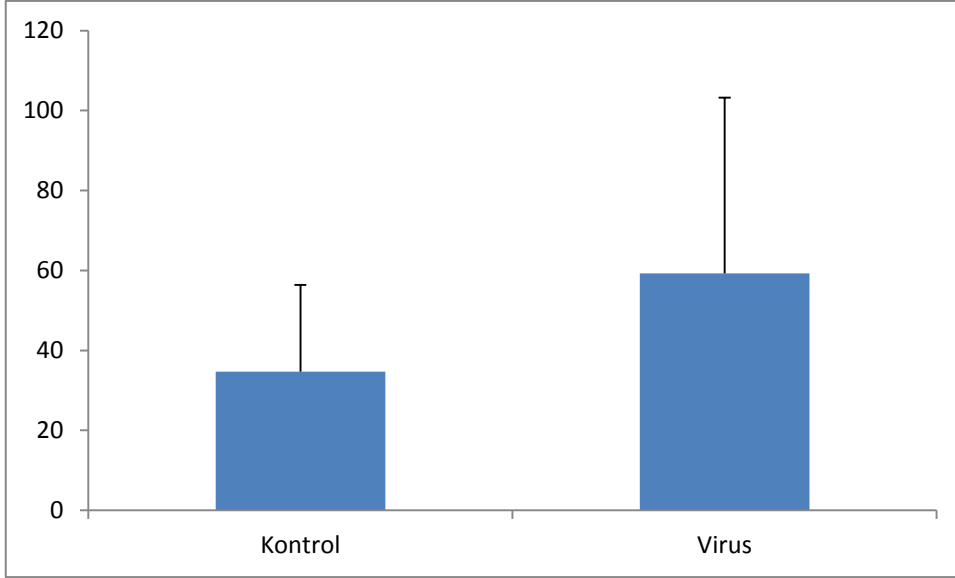
\* $p<0.05$ , Veriler mean $\pm$ standart error olarak hesaplanmıştır.



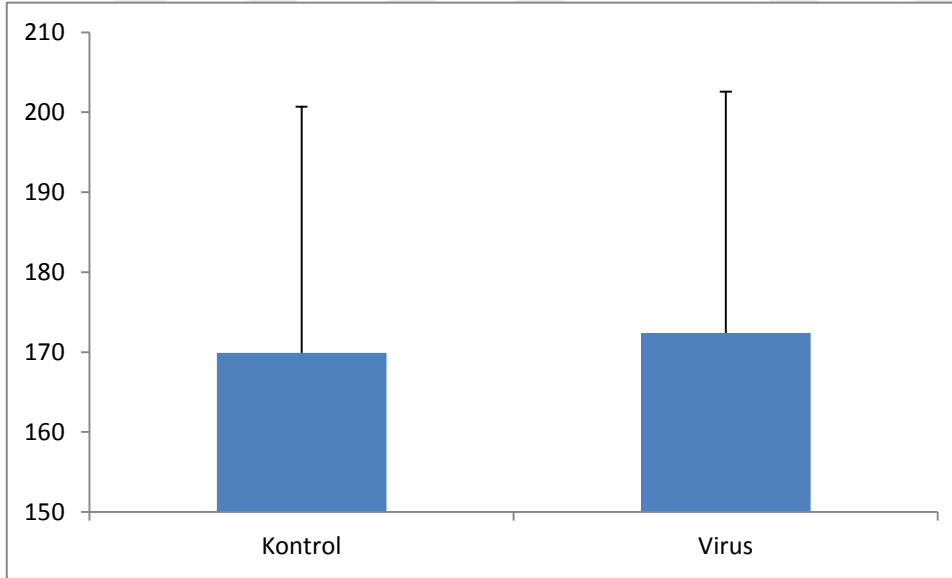
**Şekil 3.** Kontrol ve deneme grubu alabalıklara ait kas doku örnekleri MDA düzeyleri.



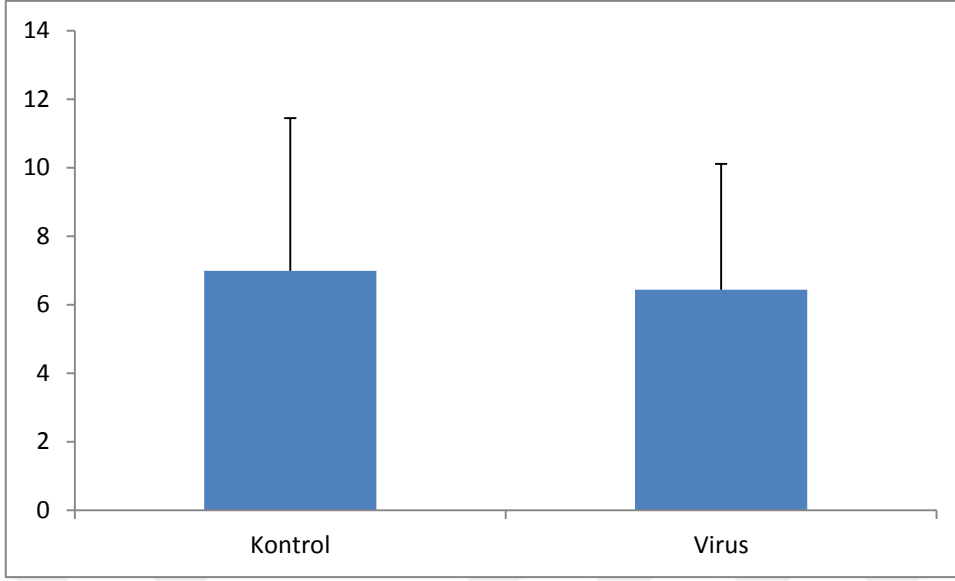
**Şekil 4.** Kontrol ve deneme grubu alabalıklara ait kas doku örnekleri GSH düzeyleri.



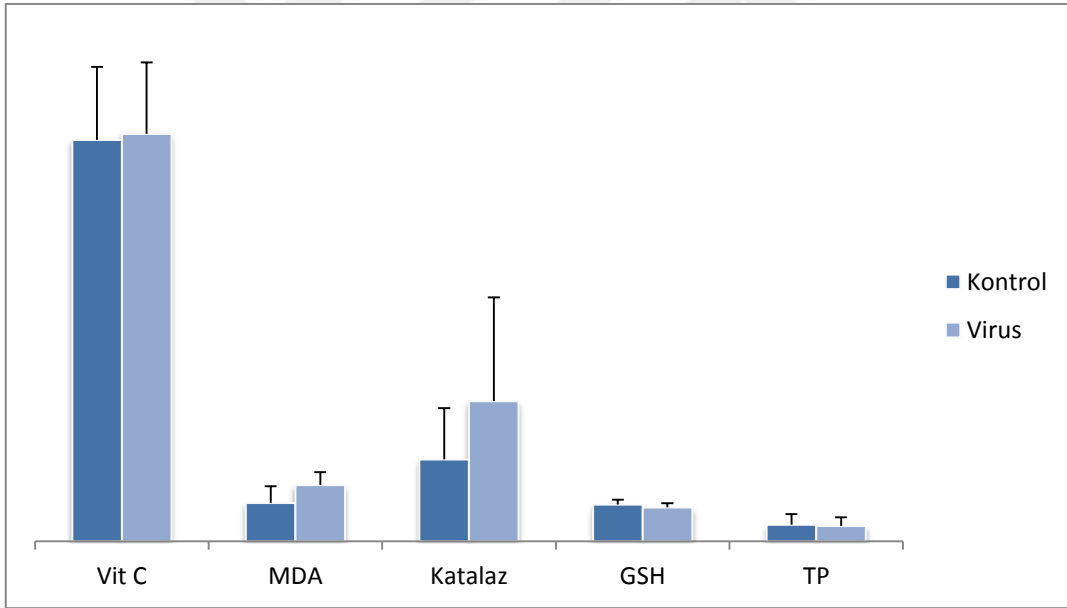
**Şekil 5.** Kontrol ve deneme grubu alabalıklara ait kas doku örnekleri CAT düzeyleri.



**Şekil 6.** Kontrol ve deneme grubu alabalıklara ait kas doku örnekleri vitamin C düzeyleri.



**Şekil 7.** Kontrol ve deneme grubu alabalıklara ait kas doku örnekleri total protein düzeyleri.



**Şekil 8.** Kontrol ve deneme grubu alabalıklara ait kas doku örnekleri vitamin C, MDA, CAT, GSH ve total protein düzeyleri.



## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Rhabdoviridae familyasına ait Novirhabdovirus cinsinin bir üyesi olan VHSV, pisi balığı, ringa balığı, çaça ve morina da dahil olmak üzere çeşitli deniz ve tatlı su balık türlerini enfekte eden bir negative strand RNA virüsüdür. VHSV enfeksiyonu Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü tarafından bildirilmesi zorunlu bir hastalık olarak listelenmiştir ve bir su ürünleri yetiştiriciliği çiftliğinde ve yabani balıklardan pisi balığında (*Paralichthys olivaceus*) 'da Kore'de tespit edilmiştir (King ve ark., 2012; Kim ve ark., 2011). VHSV enfekte olan balıkların böbreklerinde, derilerinde, kaslarında ve iç organlarında kanamalar oluşturmasının yanı sıra % 40-60 gibi yüksek oranda mortalite gösterir. Bundan dolayı VHSV virüsü ciddi ekonomik kayıplara sebep olur. Bu nedenle, su ürünleri yetiştiriciliği endüstrilerini korumak için VHSV enfeksiyonuna karşı bir koruyucu veya terapötik ajan gereklidir. Her ne kadar DNA aşuları VHSV enfeksiyonunu kontrol etmek için geliştirilmiş olsa da, bunların kitle aşılamaındaki zorlukları ve ticari amaçlar için düşük mevcudiyeti nedeniyle uygulamaları sınırlıdır. Her ne kadar artan sayıda çalışma VHSV enfeksiyonuna odaklansa da, VHSV enfeksiyonu sırasında balıklarda metabolik değişiklikler henüz net bir şekilde ortaya konmamıştır (Kim ve ark., 2009; Cho ve ark., 2017). Uygun antiviral ajanların olmaması nedeniyle, enfeksiyonun erken evrelerinin kontrol edilmesi, balıklarda VHSV enfeksiyonunun salgınlarının azaltılması için uygulanabilir bir yaklaşım olabilir. Enfeksiyonun ilk aşamalarında virüs, antiviral ajanların etkisine duyarlıdır; bununla birlikte, enfeksiyonun sonraki aşamalarında, virüs bu tür etkilere kısmen dirençli hale gelir (Khapersky ve ark., 2014).

VHSV enfeksiyonunun etkileri üzerine çeşitli çalışmalar yayınlanmıştır. Takami ve ark. (2010), VHSV enfeksiyonuna karşı pisi balığının korunmasında interferonun rolünü çalışmışlardır. Aquilino ve ark. (2014), gerçek zamanlı PCR ile VHSV ile enfekte gökkuşacağı alabalık solungaçlarında 19 mRNA molekülündeki değişiklikleri incelemişlerdir. Verrier ve ark. (2013), gökkuşacağı alabalığındaki VHSV enfeksiyonuna direnç ile ilişkili fenotiplerle ilgili çalışmalar yapmışlardır. Bununla birlikte, bu çalışmalarda gözlenen tepkilerin biyolojik mekanizmasını ve VHSV enfeksiyonuna direncini açık bir şekilde açıklayamamıştır. Bu nedenle, viral enfeksiyon üzerine biyolojik yanıtı anlamak için daha kapsamlı çalışmalar gereklidir.

Su ürünleri, sağlıklı ve dengeli beslenmede gerekli ve yüksek protein değeri ile önemli gıda kaynaklarından biridir. Dünya genelinde tüketilen hayvansal proteinin % 17' sini, tüm protein kaynaklarının ise % 6,5' ini su ürünleri oluşturmaktadır. Endüstriyel büyümesi ve üretimdeki artışla birlikte kültür koşullarındaki ani sıcaklık değişimleri, kötü su ve stres gibi istenmeyen olası faktörler önemli ekonomik kayıplara neden olan infeksiyöz hastalıkların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bakteri, mantar, virüs ve parazitler birçok infeksiyöz hastalığa sebep olmaktadır ve bu etkenlere karşı antimikrobiyal bileşenler kullanılmaktadır. Bu bileşenlerin sağlık ve çevre güvenliği üzerine olası yan etkilerinden dolayı kullanımları sınırlandırılmıştır. Bakteriyel hastalıkların tedavilerinde antibiyotiklerin yoğun kullanılmaları balık dokularında rezidü oluşumuna neden olmakta ve bunun sonucunda antibiyotiğe dirençli patojenlerin gelişimi artmaktadır. Ayrıca antibiyotikler balık dokusunda birikerek tüketici için potansiyel bir risk oluşturmaktadır (Görmez ve ark., 2017).

MDA çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna yol açan ve böylece oksidatif strese neden olan ana zincir reaksiyonlarının parçalanma ürünüdür (Yang ve ark., 2010). Lipit peroksidasyonu son ürünü olan MDA oldukça zararlı bir bileşik olup hücre membranı iyon geçişlerinin bozulmasına sebep olabilir. MDA DNA bazlarının mutajenik özellik kazanmasına da sebep olabilir (Moslen, 1994). Artan ROS üretiminin neden olduğu oksidan/antioksidan dengesizlik, hücresel yapıların ve moleküllerin oksidatif hasarındaki ana nedensel faktörlerdir. Özellikle, doymamış yağ asitleri açısından zengin biyolojik membranlar serbest radikal saldırısına maruz kalan hücresel yapılardır.

Yaptığımız çalışmada kontrol grubu MDA düzeyleri  $16,197 \pm 2,255$   $\mu\text{mol/g}$  doku, deneme grubundaki MDA seviyeleri ise  $23,800 \pm 1,724$   $\mu\text{mol/g}$  doku düzeylerinde tespit edildi. Tespit edilen artış kontrol grubuna kıyasla istatistik olarak değerlendirildiğinde  $p < 0.05$  kadar bir anlam ifade etti. Kontrol grubuna göre deneme grubunda anlamlı oranda artmış kas dokusu MDA düzeyleri, daha yüksek oranda oksidatif metabolik aktivite ve oksidasyona maruz kalmış membran çoklu doymamış yağ asitleri konsantrasyonuna bağlı olabilir. Lipit peroksidasyonuna maruz kalan grupta artmış olan MDA düzeyi, çeşitli reaktif oksijen türleri üzerine bir veya daha fazla faktörün sinerjik etkisine bağlı olarak, hücresel zarlara daha yüksek oranda bir serbest radikal hakareti olduğunu gösterebilir.

Önceki birkaç çalışma, mitokondriyal elektron transportunun inhibisyonu ve virüs enfeksiyonunun bir sonucu olarak ROS üretiminde bir artış olduğunu bildirmiştir (Korenaga ve ark., 2005; Song ve ark., 2009). Hepatit C virüsü ile enfekte karaciğerde yapılan bir çalışmada (Choi ve Ou, 2006), mitokondriyal ROS düzeylerinin daha düşük glutasyon düzeylerine bağlı olarak arttığı görülmüştür. ROS aşırı üretildiğinde, proteinlere ve DNA'ya zarar verir, lipid peroksidasyonunu artırır ve ATP sentezini inhibe eder. Aynı zamanda hücre içi serbest  $Ca^{2+}$ , membran peroksidasyonu ve yıkımında da bir artışa neden olur (Aruoma, 1988). Yine bir başka çalışmada Schwarz (Schwarz, 1996), viral enfeksiyonlardan kaynaklı ROS üretiminde bir artış olduğunu ve bu artışa karşılık antioksidan düzeylerinde bir azalma olduğunu yaptığı bir çalışmada bildirmiştir. Artan bu ROS seviyelerinin, hücre ölümlerinde önemli bir patojenik faktör olduğu literatürde bildirilmiştir (Bandyopadhyay ve ark., 1999). Bir çalışmada, RNA virüs enfeksiyonu yoluyla oksidatif stresin, enflamatuvar yanıt ve viral replikasyon dahil olmak üzere viral hastalık patogenezinin çeşitli yönlerine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Viral enfeksiyonlar bağlamında ROS, oksidatif patlamalar yoluyla virüsleri ve komşu hücreleri yok etmek için aktif nötrofiller tarafından üretilir, bununla birlikte son çalışmalar, ROS'un tüm hücre tiplerinde üretildiğini ve hücre sinyallemede ve çeşitli sinyal iletim yollarında haberci olarak hizmet ettiğini göstermiştir (Reshi ve ark., 2014). ROS enfeksiyonlarla mücadelede önemli rol oynamaktadır ve ev sahibi hücrenin apoptosisine katkıda bulunan bir koruma mekanizması olarak görülmektedir. Bununla birlikte, viral çoğalmanın ilerlemesiyle daha fazla ROS oluşur ve hücrel homeostazda ve oksidatif streste bir dengesizliğe neden olur, bu durumda, bu hücreler DNA, lipid ve protein hasarı geçirir, hücrel bütünlük ve işlevsellik kaybına yol açar (Jacobson, 1996).

Antioksidan maddeler farklı mekanizmalar ile oksidatif stresi engellemeye çalışırlar. Antioksidan enzimler oksidan molekülleri zayıflatarak ve oksijen ile reaksiyona girerek ya da oksijenin yerine geçerek lokal oksijen konsantrasyonunu azaltırlar bu şekildeki etkimesine temizleme etkisi denir. Baskılama etkisinde oksidan maddelere bir hidrojen molekülü verilerek hidroksil yapısında yer alan hidrojen ile bağ oluşturabilecek ürünler temizlenir ve peroksidasyonun başlaması engellenir. Onarma etkisinde antioksidanlar tarafından serbest radikal ataklarından kaynaklanan hasarlar onarılabilir. Zincir koparma etkisinde ise oksidan maddeler bağlanarak fonksiyonları

engellenir. Bu etkiye sahip antioksidanlar seruloplazmin, hemoglobin ve E vitamindir. Yapılan çalışmalarda balıklarda antioksidan savunma sisteminin, suyun sıcaklığına ve oksijenine, mevsimlerden kaynaklı farklılıklara, hastalık durumlarına, strese, stoktaki balık yoğunluğuna, suyun kirliliğine, ortamın gürültüsüne ve ışık gibi sayabileceğimiz çevreden kaynaklı şartlara ve besleme stratejisine bağlı olarak değişim gösterdiği bildirilmiştir. Çevreden kaynaklı stres faktörlerinin ortadan kaldırılması amacıyla antioksidan savunma sisteminin güçlendirilmesi için gerekli ve dışarıdan rasyonla alınması zorunlu olan antioksidan özellikli vitaminlerin rasyonlarda belirli miktarlarda verilmesinin balığın sağlığı ve gelişimi üzerinde birçok olumlu etkilerinin olduğu rapor edilmiştir. Balıklarda hücre içi enzim yapısına sahip antioksidan enzimler olarak SOD, CAT, GPx ve GR sayılabilir (Keleştemur ve Özdemir, 2011).

Hücreler tarafından oksidatif strese karşı savunma mekanizması olarak kullanılabilen GSH doğal indirgeyici bir güç kaynağıdır. Antioksidan aktivitesini oksidatif stres durumunda yapısında bulunan sülfidril grubunu ayırarak gerçekleştirir. GSH ROS'e karşı koruyucu aktivitesini gösterirken glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi antioksidan enzimlerle ortak çalışır. Hücrede en uygun GSH/GSSG oranının sağlanması hücre canlılığının devamı ve korunması için önemlidir. Bu nedenle sağlıklı sistemlerde bu oran optimum değerlerde bulunur. GSH' da olası eksiklik hücreyi oksidatif hasara karşı risk altına sokar.  $H_2O_2$  ve  $O_2^{\bullet-}$  gibi serbest radikallerin miktarında meydana gelen aşırı artışlar hücreler için oldukça toksiktir. Bu nedenle bu toksik bileşenleri metabolize ederek temizleyip ortamdaki uzaklaştıran sistemlerin fonksiyonları son derece önemlidir, bu sistem hücreler tarafından sıkı bir şekilde kontrol altında tutulur. CAT, SOD ve GPx, serbest radikal ataklarından kaynaklı meydana gelebilecek muhtemel hasarlara karşı hücreyi korurlar. SOD, radikal niteliğindeki oksijeni hidrojen peroksit ve moleküler oksijene çevirir, CAT ise hidrojen peroksit ile tepkimeye girerek su ve moleküler oksijen meydana getirir (Kanat ve Akdemir, 2017).

GSH, detoksifikasyon reaksiyonlarına katılan ve lipit peroksidasyonundan sorumlu olan bileşikleri ortadan kaldırarak serbest radikal aracılı hasarı dengeleyen önemli bir endojen antioksidandır. Kullanımdaki artışa bağlı olarak oksidatif stres ile GSH düzeyleri arasında ters bir ilişki vardır (Gill ve ark., 2015). Sunulan çalışmada kontrol grubu GSH düzeyi  $15,496 \pm 0,678 \mu\text{mol/g}$  doku olarak hesaplanırken deneme grubu alabalıklarda bu düzey  $14,322 \pm 0,577 \mu\text{mol/g}$  doku olarak hesaplandı. Kontrol

grubuna göre deneme grubunda tespit edilen azalmalar istatistik bir anlam ifade etmedi. Deneme grubunda GSH düzeylerindeki düşüş GPx veya GST ile hücre içi antioksidan kullanımının artmasına bağlı olabilir. Ek olarak, bu düşüş, ya GSH'nin inhibe edilmiş sentezine bağlı olarak ya da toksik kaynaklı serbest radikallerin detoksifikasyonu için GSH'nin artan kullanımından dolayı da olabilir (Singh ve ark., 2001). Viral karaciğer enfeksiyonlarında glutatyon güçlü bir antioksidandır. Bu bileşikler çeşitli etki mekanizmalarına sahiptir. Örneğin, GSH, reaktif moleküllere hidrojeni transfer ederek reaktif oksijen radikallerini nötralize edebilir ve böylece daha stabil bir kimyasal yapı oluşturabilir. Ancak, Hepatit C Virüsü gibi RNA virüs enfeksiyonlarında, GSH ve GR'nin seviyeleri, kanda olduğu kadar epitel sıvısı ve plazmasında da anormal bulunmuştur. Tüketimin derecesi, vücuttaki virüsün ciddiyetine, doğasına ve süresine göre değişir (Grune, 2002; Sheu ve ark., 2006).

CAT, birçok bilim insanı tarafından SOD'den daha iyi, oksidatif stresin önemli ve hassas bir biyobelirteci olarak kabul edilir. CAT ayrıca ROS üretiminde artışa karşı korumadan sorumlu enzimatik antioksidan savunma sisteminin ana enzimidir. SOD'un katalitik reaksiyonu ile oluşturulan  $H_2O_2$ , hem reaktif bir oksijen kaynağıdır hem de normal bir hücrel metabolittir ve GPx ve CAT ile detoksifiye edilir.  $H_2O_2$ 'nin katabolizması, süperoksit radikal anyonunun oluşumuna yol açar (Regoli ve ark., 2002). CAT'ın oksidatif stres toleransı geliştirmedeki rolü, patojenezle ilişkili fonksiyonlarının ve potansiyelinin moleküler temelli terapötik müdahalelerin hedefi olarak kabul edilmesine yol açmıştır (Shi ve ark., 2013). Yaptığımız ölçümlerde kontrol grubu alabalık kas dokusu CAT aktivitesi  $34,705 \pm 6,855$  k/g doku olarak ölçülürken deneme grubu alabalıklarda kas dokusu CAT aktivitesi  $59,297 \pm 13,892$  k/g doku düzeylerinde gözlemlendi. Alabalık kas doku örneklerinde gözlenen CAT' nin artmış aktivitesi, serbest radikallerin artan üretiminin bir sonucu olarak üretiminde veya aktivasyonunda bir artmaya bağlanabilir.

Vitamin C' nin süperoksit ve hidroksil radikallerini ortamdaki temizleyerek,  $\beta$ -karoten ve retinolun ortamdaki tüm serbest radikalleri toplayarak, glutatyonun serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girip meydana gelebilecek oksidatif hasarı engelleyerek, serüloplazminin ise fenton reaksiyonu ile iki değerlikli demiri üç değerlikli demire yükselttiği serbest radikal oluşumunu yavaşlatarak etkilerini gösterdikleri rapor edilmiştir (Ertekin ve ark., 2003). Askorbik asitin zincir kırıcı

özelliğe sahip olduğu, lipit peroksidasyonunu önlediği ve serbest radikal kaynaklı zincir reaksiyonlarını başlangıçta durdurduğu bildirilmiştir (Meister, 1988). Karotenoidlerin oksidatif stresten kaynaklı hastalıklara karşı önleyici bir etkiye sahip olduğu,  $\beta$ -karoten ve retinolün antioksidan aktivitelerini serbest radikalleri toplayarak ve serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek gösterdikleri bildirilmiştir (Polyakov ve ark., 2001). Sunulan çalışmada kontrol grubu alabalıklara ait vitamin C düzeyleri  $169,9 \pm 9,737$  mg/100 g doku düzeylerinde tespit edildi. Deneme grubu alabalık kas doku örneklerinde bu düzey  $172,4 \pm 9,542$  mg/100 g doku olarak ölçüldü. Deneme grubunda kontrol grubuna göre tespit edilen artış istatistik anlamda bir önem ifade etmedi.

Çalışmalarda hücre içi GSH miktarının hücre içi askorbik asit redoks durumu tarafından kontrol edildiği bildirilmiştir. Askorbik asit antioksidan savunma mekanizmasının ilk basamağında bulunur, oksidasyonlara karşı oldukça duyarlıdır ve aynı zamanda iyi bir radikal temizleyicisidir (Olayinka ve Olukowade, 2010). Çoğu çalışmada askorbik asitin lipit peroksidasyonunu düşürdüğü gözlenmiştir (Barja ve ark., 1994; Tanaka ve ark., 1997)

Çalışmamızda kontrol grubu alabalıklarda total protein düzeyleri  $6,991 \pm 1,409$  %g, deneme grubu alabalıklarda ise  $6,437 \pm 1,161$  %g düzeylerinde ölçüldü. Kontrol grubuna göre deneme grubunda gözlenen azalmalar istatistiki olarak bir anlam ifade etmedi.

Sonuç olarak, VHSV uygulanan alabalıkların kas dokusu MDA, antioksidan maddeler ve total protein düzeylerinde değişimler gözlemlendi. Bu değişimler kas dokusu hücrelerinde oksidatif hasardan kaynaklı kısmen yıkımlanmanın şekillenmiş olabileceğini göstermektedir.

## KAYNAKLAR

- Aebi H. Catalase *in vitro*. *Enzymol* 1984;105:121-126.
- Alptekin Ö, Yıldırım D, Özyılmaz G, Tokel S. Florosile immobilize edilmiş katalaz enziminin immobilizasyon koşullarının optimizasyonu. XVIII. Ulusal Kimya Kongresi, Kars 2004; 498.
- Aquilino C, Castro R, Fischer U, Tafalla C. Transcriptomic responses in rainbow trout gills upon infection with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Dev Comp Immunol* 2014;44:12–20.
- Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J Am Oil Chem Soc* 1998;75:199–212.
- Avsian-Kretchmer O, Eshdat Y, Gueta-Dahan Y, Ben-Hayyim G. Regulation of stress-induced phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase expression in citrus. *Planta* 1999;209:469-477.
- Ayala A, Muñoz MF, Argüelle S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014;1-31.
- Balz F. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Vitamins: Mechanism of Action. *Am J Med* 1994;97:5-13.
- Bandyopadhyay U, Das D, Banerjee RK. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Curr Sci* 1999;77:658-66.
- Barja G, Lopez-Torres M, Perez-Campo R, Rojas C, Cadenas S, Prat J, Pamplona R. Dietary vitamin C decreases endogenous protein oxidative damage, malondialdehyde and lipid peroxidation and maintains fatty acid unsaturation in the guinea pig liver. *Free Radic Biol Med* 1994;17:105–15.
- Basaga HS, Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol* 1990;68:989-998
- Baskin SI, Salem H. Oxidants, antioxidants, and free radicals. Washington DC, Taylor and Francis 1997; 79-120.
- Benzer F. Fasciola hepatica ile enfekte koyunların kan ve karaciğer dokularında arginaz, nitrik oksit, bazı antioksidant enzimler ve lipit peroksidasyon düzeyleri ile karaciğer arginaz enziminin biyokimyasal özellikleri, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, (2001).
- Besse P. Recherche sur L'etiologie de L'anemie Infectieuse de la Truite. *Bull Acad Vet Fr* 1995;5:194–198.

- Birben E, Şahiner UM, Saçkesen C, Erzurum S, Kalaycı Ö. Oxidative stress and antioxidant defense. WAO Journal 2012;5:9–19.
- Bradley-Whitman MA, Lovell MA. Biomarkers of lipid peroxidation in Alzheimer disease (AD): an update. Arch Toxicol 2015;89:1035–1044.
- Buettner GR, Moseley PL. EPR spin trapping of free radicals produced by bleomycin and ascorbate. Free Radic Res Commun 1993;19:89–93.
- Burton G. Vitamin E Molecular and biological function. Proc Nutr Soc 1994;53(2):251-62.
- Cho SY, Kwonb YK, Namb M, Vaidyad B, Kime SR, Lee S, Kwona J, King D, Hwang GS. Integrated profiling of global metabolomic and transcriptomic responses to viral hemorrhagic septicemia virus infection in olive flounder. Fish and Shellfish Immunology 2017;71:220–229.
- Choi J, Ou JH. Mechanisms of liver injury. III. oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virüs. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2006;290: 847–851.
- Claudia R, Alexandra A. Glutathione system in animal model of solid tumors: From regulation to therapeutic target. Crit Rev Oncol Hematol 2018;128:43–57.
- Dautremepuits C, Betoulle S, Vernet G. Stimulation of antioxidant enzymes levels in carp (*Cyprinus carpio* L.) infected by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). Fish and Shellfish Immunology 2003;15:467–471.
- Demir H, Alkan S, Savran A. Sığır karaciğerinden saflaştırılan katalaz enzimi üzerinde bazı ilaçların inhibisyon kinetiğinin incelenmesi. XVIII. Ulusal Kimya Kongresi Kars, BK, 2004; 500.
- Djordjević BV, Ćosić V, Pavlović D, Vlahović P, Jevtović T, Kocić G, Savić V. Does captopril change oxidative stress in puromycin aminonucleoside nephropathy. Renal Fail 2000;22:535-544.
- Durmuş AS, Ünsaldı E. Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar ve kırık iyileşmesi. Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları, 2005.
- Eaton JW, Ma M. Acatlasemia. In the metabolic bases of inherited disease. 7th ed., New York, McGraw-Hill. 1995; 2371–2383.
- Emre Y, Kürüm V. Havuz ve kafeslerde alabalık yetiştiriciliği. Yenice Değerlendirme Sempozyumu 2007; 272.
- Ercan N, Fidancı UR. Piyodermalı köpeklerde idrarda 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) düzeyleri. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2012;59:163-168.



- Eren F. Gökkuşığı alabalığı (*Onorhynchus mykiss* w.,1792)'ndan jambon yapımı ve raf ömrünün belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, Yüksek Lisans Tezi, 2011.
- Ertekin A, Turel İ, Oto G, Celikezen F, Yaşar S. Isırgan otunun dimetilbenzantrazen uygulanan tavşanlarda lipit peroksidasyonu, antioksidan maddeler ve nitrit-nitrat düzeyleri üzerine etkisi. Y.Y.U. Veteriner Fakültesi Dergisi 2008;2:11-15.
- Ertekin A, Karaca M, Akkan HA, Cemek M, Ormancı N. Köpeklerde gentamisin nefrotoksikozisinde lipit peroksidasyonu, antioksidan maddeler, antioksidan vitaminler ve bazı hematolojik-biyokimyasal parametre düzeylerinin araştırılması. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 2003;2:535–540.
- Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. Nutrition 2002;18:872-879.
- Gadd T. Virus, viral haemorrhagic septicaemia, perch rhabdovirus prv and epidemiology in Finland. Fish rhabdoviruses. Veterinary Virology Research and Laboratory Department Finnish Food Safety Authority, Evira Helsinki, Finland academic dissertation 2013; 122-136
- Gill KK, Sandhu HS, Kaur R. Evaluation of lipid peroxidation and antioxidant antioxidant status on fenvalerate, nitrate and their co-exposure in *Bubalus bubalis*. Pestic Biochem Physiol 2015;123:19-23.
- Görmez Ö, Diler Ö. Balık patojenlerine karşı bazı bitkisel uçucu yağların antibakteriyel aktivitesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Yalvaç Akademi Dergisi 2017;2(1):112-122.
- Grotto D, Maria LS, Valentini J, Paniz C, Garcia GSSC, Pomblum VJ, Rocha JBT, Farina M. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. Quim Nova 2009;32(1):169-174.
- Grune T. Oxidants and antioxidative defense. Hum Exp Toxicol 2002;21:61– 62.
- Gutteridge JMC. Free radicals in dishaease processes: A compilation of cause and consequence. Free Radic Res Commun 1993;19(3):141-158.
- Hailiwell B. Free radicals antioxidants and human disease. Curiosity, cause or consequence. The Lancet 1994;344:721- 724.
- Jacobson MD. Reactive oxygen species and programmed cell death. Trends Biochem Sci 1996;21:83–86.
- Jensen N, Bloch BJL. LarsenMorina'da Ulcus sendromu ( *Gadus morhua* ) III. Bir ön virolojik rapor. Nord Vet-Med 1979;31:436 – 442.

- Jozefczak M, Remans T, Vangronsveld J, Cuypers A. Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. *Int J Mol Sci* 2012;13:3145–3175.
- Kanat N, Akdemir S. Bakterilerde glutatyon ve önemi. *SAÜ Fen Bil Der* 2017;18(2):111-117.
- Khaperskyy DA, Emara MM, Johnston BP, Anderson P, Hatchette TF, McCormick C. Influenza A virus host shutoff disables antiviral stress-induced translation arrest. *PLoS Pathog* 2014;e1004217/1e14.
- Keleştemur G, Özdemir Y. Balıklarda antioksidan savunma ve oksidatif stres. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 2011;4(1):69-73.
- Kim WS, Kim SR, Kim D, Kim JO, Park MA, Kitamura SI, Kim HY, Kim D, Han HJ, Jung SJ, Oh MJ. An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed olive flounder *paralichthys olivaceus* in Korea. *Aquaculture* 2009;296:165–168.
- Kim WS, Jung SJ, Kim JO, Kim DW, Kim JH, Oh MJ. Genetic positioning of Korean viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from cultured and wild marine fishes. *J. Fish. Pathol* 2011;24:1–9.
- King AMQ, Adams MJ, Carstens EB. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London, Elsevier Academic Press, 2012; 651-782.
- Koltas IS, Bilgin R. Catalase levels in human fascioliasis: Antioxidant enzymes against toxic reactive oxygen species in human fascioliasis. 6th Annual International Conference on Advanced in Biotechnology (BIOTECH), 2016.
- Korenega M, Wang T, Li Y, Showalter LA, Chan T, Sun J, Weinman SA. Hepatitis C virus core protein inhibits mitochondrial electron transport and increases reactive oxygen species (ROS) production. *J Biol Chem* 2005;280:37481–37488.
- Kumar SV, Saritha G, Fareedullah MD. Role of antioxidants and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Annals of biomedical Res* 2010;1(3):158-173.
- Lebold KM, Traber MG. Interactions between  $\alpha$ -tocopherol, polyunsaturated fatty acids, and lipoxygenases during embryogenesis. *Free Radic Biol Med* 2014;66:13–19.
- Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys* 2014;3143–3153.
- McLean JA, Karadas F, Surai PF, McDevitt RM, Speake BK. Lipid- soluble and water-soluble antioxidant activities of the avian intestinal mucosa at different sites along

- the intestinal tract. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2005;141:366-372.
- Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 1988;263:17205-8.
- Meister A. Methods for selective modification of Glutathione metabolism and study of glutathione transport. *Methods Enzymol* 1985;113:571-85.
- Meister A. Selective modification of glutathione metabolism. *Science* 1983;220:472-477.
- Moslen MT. Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis, free radicals in diagnostic medicine, Editor: D. Armstrong, Plenum Press New York 1994; 1-15.
- Olayinka ET, Olukowade IL. Effect of amoxicillin/clavulanic acid (Augmentin 625®) on antioxidant indices and markers of renal and hepatic damage in rats. *J Toxicol Environ Health Sci* 2010;2(6):85-92.
- Omaye ST, Turnbull JD, Sauberlich HE. Selected methods for the determination of ascorbic acid in animal cells, tissues and fluids. In: McCormick DB, Wright LD, editors. *Methods in enzymology* New York: Academic Press 1979; 62:3-11.
- Özcan O, Erdal H, Çakırcal G, Yönden Z. Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *J Clin Exp Invest* 2015; 6(3):331-336.
- Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta SK, Levine M. Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr* 2003;22(1):18-35.
- Polyakov NE, Leshina VT, Konovalova TA, Kispert LD. Carotenoids as scavengers of free radicals in a fenton reaction: antioxidants or pro-oxidants. *Free Radical Biology & Medicine*, 2001;31(3):398-404.
- Quiles J, Huertas J, Batine M, Mataix J, Tortosa C. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology* 2002;180:79-95.
- Regoli F, Gorbi S, Frenzilli G, Nigro M, Corsi I, Focardi S, et al. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. *Mar Environ Res* 2002;54(3-5):419-23.

- Rehulka J. Effect of polychlorinated biphenyls Delor 103 on some haematological and biochemical indices of the blood plasma of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), 2002.
- Reshi ML, Su Yi-Che, Hong Jiann-Ruey. RNA viruses: ROS-mediated cell death. *Int J Cell Biol* 2014;467452.
- Schwarz KB, Oxidative stress during viral infection: a review. *Free Radic Biol Med* 1996;21:641e649.
- Schyth BD, Ariel E, Korsholm H, Olesen NJ. Diagnostic capacity for viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) infection rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is greatly increased by combining viral isolation with specific antibody detection. *Fish Shellfish Immunol* 2012;32(4):593-597.
- Shinde A, Ganu J, Naik P. Effect of free radicals & antioxidants on oxidative stress: A Review. *J Dent Allied Sci* 2012;1(2):63-66.
- Sheu SS, Nauduri D, Anders MW. Targeting antioxidants to mitochondria: a new therapeutic direction. *Biochim* 2006;1762 (2):256–265.
- Shi XL, Shi ZH, Feng MQ, Li Ye, Zhu HY, Li J, Ju DW, Zhou P. High expression of recombinant human catalase and its immunomodulatory effects on H1N1 influenza virus infection. *Process Biochem* 2013;48:588–592.
- Sinclair AJ, Barnett AH, Lunec J. Free radicals and antioxidant systems in health and disease. *Br J Hosp Med* 1990;43:334-344.
- Singh SP, Coronella JA, Beneš H, Cochrane BJ, Zimniak P. Catalytic function of *Drosophila melanogaster* glutathione S-transferase DmGSTS1-1 (GST-2) in conjugation of lipid peroxidation end products. *Eur J Biochem* 2001;268(10):2912-23.
- Skall HF, Olesen NJ ve Mellergaard S. Viral haemorrhagic septicaemia virus in marine fish and its implications for fish farming. *J Fish Dis* 2005; 28:509–529.
- Song X, Wang Y, Mao W, Shi K, Zhou Y, Nogués S, Yu J, Effects of cucumber mosaic virus infection on electron transport and antioxidant system in chloroplasts and mitochondria of cucumber and tomato leaves. *Physiol Plant* 2009;135:246–257.
- Sushil JK, Mcvie R, Duett J, Herbst JJ. Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes* 1989;38:1539-1543.
- Tabakoğlu E, Durgut R. Veteriner hekimlikte oksidatif stres ve bazı önemli hastalıklarda oksidatif stresin etkileri. *AVKAE Derg* 2013;3(1):69-75.

- Takami, Kwon SR, Nishizawa T, Yoshimizu M, Protection of Japanese flounder *paralichthys olivaceus* from viral hemorrhagic septicemia (VHS) by poly(I: C) immunization, *Dis Aquat Organ* 2010;89:109–115.
- Tanaka K, Hashimoto T, Tokumaru S, Iguchi H, Kojo S. Interactions between vitamin C and vitamin E are observed in tissues of inherently scorbutic rats. *J Nutr* 1997; 127:2060–4.
- Ternes, W, “Naturwissenschaftliche Grundlagen der Lebensmittelzubereitung”, 2.Aufl. Behr’s Verlag, Hamburg, Deutschland, 1994.
- Tiftik AM. Biüret metoduyla total protein tayini, *Klinik Biyokimya, Mimoza Yayınları*, Konya 1996; 291-292
- Tocher DR, Mourente G, Van Der Eecken A, Evjemo E, Díaz E, Bell JG, Geurden J, Lavens P, Olsen Y. Effect of dietary vitamin E on antioxidant defence mechanisms of juvenile turbot (*Hippoglossus hippoglossus* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.), *Aquaculture Nutrition* 2002;195-207.
- Trenzado C, Carmen HM, Gallego MG, Morales AE, Furne M, Domezain A, Domezain J, Sanz A. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccarii* and trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture* 2006;254:758–767.
- Tülsner M, Band I. Rohstoff-eigenschaften und Grundlagen der verarbeitungsprozesse. Behr’s Verlag, Hamburg, Deutschland, 1994.
- Vennerström P, Välimäki E, Lyytikäinen T, Hautaniemi M, Vidgren G, Koski P, Virtala AM. Viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV Id) infections are detected more consistently using syndromic vs. active surveillance. *Diseases of aquatic organisms* 2017;126:111–123.
- Verrier ER, Dorson M, Mauger S, Torhy C, Ciobotaru C, Hervet C, Dechamp N, Genet C, Boudinot P, Quillet E. Resistance to a rhabdovirus (VHSV) in rainbow trout. Identification of a major QTL related to innate mechanism. February 4 2013; e55302.
- Wang X, Quinn PJ. Vitamin E and its function in membranes. *Progress in lipid Research* 1999;38:309-336.
- Washko PW, Wang Y, Levine M. Ascorbic acid recycling in human neutrophils. *J Biol Chem* 1993;268:15531–15535.
- Yang L, Tan GY, Fu YQ, Feng JH, Zhang MH. Effects of acute heat stress and subsequent stress removal on function of hepatic mitochondrial respiration, ROS production and lipid peroxidation in broiler chickens. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2010;151(2):204-8.

Yapar SB. Alfa lipoik asitin rat karaciğer homojenatlarında indüklenmiş lipit peroksidasyonuna etkisi, Trakya Üni Tıp Fak, Edirne, Uzmanlık Tezi, 2006.

Yüzüak H, Akbulut KG, Yüzüak S. Yaşlanma sürecinde melatoninin pankreas dokusundaki oksidan ve antioksidanlara etkisi. J Clin Exp Inves 2014;5(4):583-588.



## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Merve ÖZCAN

**Doğum Yeri:** Türkeli

**Doğum Tarihi:** 22.05.1991

**Medeni Hali:** Evli

**Bildiği Yabancı Diller:** İngilizce

**Mezun Olduğu Üniversite:** Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi

Kimya Bölümü (Lisans-2013)

**Çalıştığı Kurum:** Monitor Medikal – Klinik Araştırma Saha Koordinatörü (2018-  
Halen)

**Tel:** 05062781006

**e-posta:** m3rv3\_R@hotmail.com