

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Azotlu Gübre Uygulanan *Capoeta capoeta* (Guldenstaedt 1773)'nın
Dokularında Oksidatif Doku Hasarının İmmunohistokimyasal ve
Antioksidan Seviyelerinin Biyokimyasal Yöntemlerle Belirlenmesi**

Seda VURAL AYDIN
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Muhitdin YILMAZ

II. DANIŞMAN
Prof. Dr. Hasan ÖZEN

ARALIK-2017
KARS



T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



**Azotlu Gübre Uygulanan *Capoeta capoeta* (Guldenstaedt 1773)'nın
Dokularında Oksidatif Doku Hasarının İmmunohistokimyasal ve
Antioksidan Seviyelerinin Biyokimyasal Yöntemlerle Belirlenmesi**

**Seda VURAL AYDIN
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Muhitdin YILMAZ**

**II. DANIŞMAN
Prof. Dr. Hasan ÖZEN**

**ARALIK-2017
KARS**

Bu tez çalışması Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2015-FM-48

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı öğrencisi Seda VURAL AYDIN'nın Doç. Dr. Muhitdin YILMAZ danışmanlığında Doktora tezi olarak hazırladığı “Azotlu Gübre Uygulanan *Capoeta capoeta* (Guldenstaedt 1773)'nın Dokularında Oksidatif Doku Hasarının İmmunohistokimyasal ve Antioksidan Seviyelerinin Biyokimyasal Yöntemlerle Belirlenmesi” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy **.birliği.** ile kabul edilmiştir.

04 / 12 / 2017



Adı ve Soyadı

Başkan : Doç. Dr. Muhitdin YILMAZ
Üye : Doç. Dr. Ecevit EYDURAN
Üye : Doç. Dr. İnan KAYA
Üye : Yrd. Doç. Dr. Ertuğrul Osman BURSALIOĞLU
Üye : Yrd. Doç. Dr. Evren KOÇ

İmza

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .. / .. / 20.. gün ve ...
... / sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Doç. Dr. Fikret AKDENİZ
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.


Seda VURAL AYDIN
04/12/2017

ÖZET

(Doktora Tezi)

AZOTLU GÜBRE UYGULANAN *Capoeta capoeta* (GULDENSTAEDT 1773)'NİN DOKULARINDA OKSİDATİF DOKU HASARININ İMMUNOHİSTOKİMYASAL VE ANTİOKSİDAN SEVİYELERİNİN BİYOKİMYASAL YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ

Seda VURAL AYDIN

Kafkas Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Muhitdin YILMAZ

II. Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZEN

Bu çalışmada, azotlu gübre uygulaması sonucu *Capoeta capoeta* (Guldenstaedt 1773) dokularında oksidatif doku hasarının ve antioksidan seviyelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla çalışmada, 36 adet *Capoeta capoeta* (Guldenstaedt 1773) kullanıldı. Hayvanlar 10 günlük adaptasyon süreci sonunda 2 deney (15 mg/L ve 30 mg/L azotlu gübre) ve 1 kontrol olmak üzere, her grupta 12 balık bulunan 3 gruba ayrıldı. Gruplar deney süresi boyunca 300'er litrelik su tanklarında bekletildi. Deney gruplarına uygulanan gübre su ortamına verildi. Kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmadı. Deney gruplarından 15 günlük azotlu gübre uygulamasının sonunda immunohistokimyasal ve biyokimyasal çalışmalar için kan ve doku örnekleri alındı. Elde edilen plazma örnekleri total oksidan (TOS) ve total antioksidan seviyelerinin (TAS) ölçülmesine kadar -20°C'de saklandı. Histolojik inceleme için alınan karaciğer, solungaç ve bağırsak doku örnekleri ise fosfat tamponu solüsyonu ile hazırlanmış %10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi.

Balıklardan alınan doku örnekleri üzerinde yapılan histopatolojik incelemelere göre kontrol grubuna kıyasla gübre uygulanan gruplarda; karaciğerin en fazla etkilenen organ olduğu, hepatositlerde hidropik dejenerasyon, nekroz ve hepatik kordon dejenerasyonları; solungaç dokusu incelendiğinde sekonder lamellada kütleşme, lamella epitelinde vakuolleşme; bağırsak dokusunda ise villuslarda kütleşme, supranükleer boşlukta azalma ve lamina propria hücre infiltrasyonu gözlenmiştir.

Katalaz immunoreaktivitesi incelemesine göre kontrol grubuna kıyasla gübre uygulanan gruplarda karaciğer dokusunda dejenerasyonun fazla olduğu bölgelerde ve piknotik çekirdekli hücrelerde immunboyama olduğu, solungaçların sekonder lamel epitel hücrelerinde ve sekonder lamella tabanında katalaz immunoreaktivitesi olduğu, bağırsak dokularında katalaz immunoreaktivitesi olmadığı saptanmıştır.

SOD1 immunoreaktivitesi incelemesine göre kontrol grubuna kıyasla gübre uygulanan gruplarda, karaciğer dokusunda çekirdek üzerinde SOD1 immunoreaktivitesi olduğu, solungaç dokularında bazı sekonder lamella hücrelerinde SOD1 immunoreaktivitesi olduğu, bağırsak dokusu incelendiğinde enterosit kolumnar hücrelerinde hafif şiddette SOD1 immunoreaktivitesi olduğu gözlenmiştir.

TAS ve TOS ölçüm sonuçlarına göre, TAS düzeyinde 15 mg/L ve 30 mg/L gübre uygulanan gruplarda istatistiksel olarak artış olduğu saptandı ($p < 0,05$). TOS düzeylerinde artış olduğu görüldü ancak istatistiksel olarak önemli bir fark belirlenmedi.

Anahtar Kelimeler: Oksidatif Stres, İmmunohistokimya, *Capoeta capoeta*, Kimyasal Gübre

2017, 102 sayfa

ABSTRACT

(Doctorate Thesis)

DETERMINATION OF OXIDATIVE TISSUE DAMAGE AND ANTIOXIDANT LEVELS IN THE TISSUES OF *Capoeta Capoeta* (GULDESTAEDT 1773) BY IMMUNOHISTOCHEMICAL AND BIOCHEMICAL METHODS

Seda VURAL AYDIN

Kafkas University

Graduate School of Applied and Natural Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Muhitdin YILMAZ
Supervisor II: Prof. Dr. Hasan ÖZEN

In this study, it was aimed to determine oxidative tissue damage and antioxidant levels in tissues of *Capoeta capoeta* (Guldenstaedt 1773) which is the result of application of nitrogen fertilizer.

For this purpose, 36 *Capoeta capoeta* (Guldenstaedt 1773) was used. Animals were divided into 3 groups of 12 fish (15 mg/L and 30 mg/L nitrogenous fertilizer) and 1 control in each group at the end of the 10-day adaptation period. The groups were kept in 300 liter water tanks throughout the experiment. The fertilizer applied to the experimental groups was given to the water. No treatment was given to the control group. Blood and tissue samples were taken for immunohistochemical and biochemical studies at the end of 15 day nitrogen fertilizer application from experimental groups. Obtained plasma samples were stored at -20 °C until total oxidant (TOS) and total antioxidant levels (TAS) were measured. Liver, gill and intestinal tissue samples collected for histological analyses were fixed in 10% phosphate buffered formaldehyde solution.

According to the histopathological studies on the tissue samples taken from the fishes, in comparison with the control group, liver is the most affected organ, hydropic degeneration, necrosis and hepatic cord degeneration in hepatocytes, when the gill texture is examined, secondary to laminae laminae, vacuolization of lamella epithelium, masses in the villi around the intestine, decrease in the supranuclear space and cell infiltration of the lamina propria were observed.

Catalase immunoreactivity was examined in comparison with control group in fertilizer applied groups, regions where there is excessive degeneration in the liver, and immunoblots in picnic nucleated cells, catalase immunoreactivity in the glandular lamellar epithelial cells of the gills and on the bottom of the laminae of the secondary, Catalase immunoreactivity was not found in intestinal tissues. SOD1 immunoreactivity was examined in comparison with control group in fertilizer applied groups SOD1 immunoreactivity is on the nucleus in liver tissue, there is SOD1 immunoreactivity in some gonadal lamella cells in the gill tissues, When intestinal tissue was examined, it was observed that mild severe SOD1 immunoreactivity was found in enterocyte columnar cells.

According to TAS and TOS measurement results, it was found that there was a statistically significant increase in the TAS level in 15 mg/L and 30 mg/L fertilizer application groups ($p < 0,05$). There was an increase in TOS levels but no statistically significant difference was found.

Key Words: Oxidative Stress, Immunohistochemistry, *Capoeta capoeta*, Chemical Fertilizer

2017, 102 pages

ÖNSÖZ

Azotlu gübre uygulamasının, Kars Çayı'nda yayılışı bulunan *Capoeta capoeta* (Guldestaedt 1773) üzerinde etkilerinin araştırıldığı bu çalışma, Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında doktora tezi olarak hazırlanmıştır.

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalanma imkânı sunan, ilgi, yardım ve desteklerini benimle paylaşan değerli danışman hocalarım Doç. Dr. Muhitdin YILMAZ ve Prof. Dr. Hasan ÖZEN'e, biyokimyasal çalışmalar ve istatistiksel hesaplamalarda bilgilerinden yararlandığım Doç. Dr. İnan KAYA'ya, doktora eğitimim boyunca yanımda olan ve bana her konuda destek olan değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Duygu TANRIKULU ve Arş. Gör. Gül Esmâ AKDOĞAN'a, çalışmama maddi destekte bulunan Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne, Kafkas Üniversitesi Fen – Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nün değerli öğretim üyeleri ve öğretim elemanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, yaşamımın her aşamasında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen değerli aileme ve sevgili eşime sonsuz teşekkür ederim.

Seda VURAL AYDIN

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	ix
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
GRAFİKLER DİZİNİ	xvi
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Stres	3
1.2.1. Oksidatif Stres	5
1.3. Serbest Radikaller	7
1.3.1. Reaktif Oksijen Türleri	11
1.4. Serbest Radikal Kaynakları.....	19
1.4.1. Endojen Kaynaklar	20
1.4.2. Eksojen Kaynaklar.....	24
1.5. SERBEST RADİKAL OLUŞUMUNDA ROL OYNAYAN MEKANİZMALAR	24
1.5.1. Kovalent Bağların Homolitik Kırılması İle Radikal Oluşumu.....	24
1.5.2. Normal Bir Molekülün Elektron Kaybetmesi İle Radikal Oluşumu	24
1.5.3. Normal Bir Moleküle Elektron Transferi İle Radikal Oluşumu	25
1.6. SERBEST RADİKALLERİN BİYOLOJİK ETKİLERİ.....	25
1.6.1. Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri	26
1.6.2. Serbest Radikallerin Karbonhidratlar Üzerine Etkileri.....	27
1.6.3. Serbest Radikallerin Nükleik Asitler ve DNA Üzerine Etkileri	27
1.6.4. Serbest Radikallerin Hücre Zarı ve Membran Lipidleri Üzerine Etkileri 28	
1.7. Antioksidanlar	29
1.7.1. Enzimatik Antioksidanlar	32
1.7.2. Non-Enzimatik Antioksidanlar	36

1.8. Balıklarda Reaktif Oksijen Türlerinin Üretimi ve Antioksidan Savunma Sistemi	41
1.9. GÜBRE VE GÜBRELEME.....	43
1.9.1. Gübrelerin Sınıflandırılması.....	43
1.9.2. Kimyasal Gübrelemenin Neden Olduğu Çevresel Sorunlar	44
1.10. Çalışma Alanı Hakkında Genel Bilgi	47
2. MATERYAL VE METOT	48
2.1. MATERYAL.....	48
2.1.1. Hayvan Materyali	48
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Aletler	48
2.1.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	48
2.2. METOT	49
2.2.1. Deney Düzenegi	49
2.2.2. Balıklardan Kan Alma	49
2.2.3. Biyokimyasal Analizler	49
2.2.4. Histopatolojik İncelemeler	52
2.2.5. İmmunohistokimyasal İncelemeler	52
2.2.6. İstatistik Analiz	53
3. BULGULAR	54
3.1. Makroskobik Bulgular	54
3.2. Total Antioksidan Düzeyleri	54
3.3. Total Oksidan Düzeyleri	55
3.4. Histopatolojik Bulgular.....	56
3.5. İmmunohistokimyasal Bulgular	59
3.5.1. Katalaz İmmunoreaktivitesi	59
3.5.2. SOD1 İmmunoreaktivitesi	62
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	66
KAYNAKÇA.....	74
ÖZGEÇMİŞ	85

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

TAS	: Total Antioksidan Düzeyi
TOS	: Total Oksidan Düzeyi
SOD	: Süperoksit Dismutaz
CAT	: Katalaz
GAS	: Genel Adaptasyon Sendromu
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
RNT	: Reaktif Nitrojen Türleri
SR	: Serbest Radikal
$O_2^{\cdot-}$: Süperoksit Anyonu
H_2O_2	: Hidrojen Peroksit
OH^{\cdot}	: Hidroksil Radikali
ATP	: Adenozin Trifosfat
ADP	: Adenozin Difosfat
ETS	: Elektron Transfer Sistemi
Fe	: Demir
Cu	: Bakır
Mn	: Mangan
Co	: Kobalt
Mo	: Molibden
1O_2	: Singlet Oksijen
NO_2^{\cdot}	: Azot Dioksit
NO_2^+	: Nitronyum İyonu
ER	: Endoplazmik Retikulum
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
PUFAH	: Çoklu Doymamış Yağ Asitleri
GABA	: Gama-aminobütirik asit
GSH	: Glutasyon
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GR	: Glutasyon Redüktaz
CoQ10	: Koenzim Q10
NH_3	: Amonyak

μl : Mikrolitre
DNA : Deoksiribo nükleik asit
 $^{\circ}\text{C}$: Santigrat derece
rpm : Dakikadaki dönüş sayısı
M : Molar
UV : Ultraviyole



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.1: Hücresel serbest radikallerin etkilediği moleküller (Akpoyraz ve Durak, 1995).....	26
Tablo3.1: Total Antioksidan Seviyeleri (mmolTrolox Equiv./L).....	54
Tablo 3.2: Total Oksidan Seviyeleri ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L)	55



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. : Genel Adaptasyon Sendromu Aşamaları (Yurdakoş, 2005).....	4
Şekil 1.2: Canlı organizmalarda (ROT) seviyesinin dinamik yapısı (Akbulut, 2014).	6
Şekil 1.3: Vücutta üretilen serbest radikallerin kaynakları ve serbest radikal hasarının sonuçları (Young ve Woodside, 2001).	9
Şekil 1.4: Canlılarda oksijen metabolizması ve ROT arasındaki dönüşüm (Akbulut, 2014)	12
Şekil 1.5: Moleküler oksijenin farklı formlarının 2p orbital elektron konfigürasyonu (Kılınç ve Kılınç, 2002).	13
Şekil 1.6: Biyolojik kaynakların ROT üretimine etkisi (Akbulut ve ark., 2014)..	20
Şekil 1.8: Lipidlerin genel peroksidasyon şeması (Akpoyraz ve Durak, 1995) ...	29
Şekil 1. 9: Serbest radikal saldırısına karşı antioksidan savunmaları (Young ve Woodside, 2001).....	31
Şekil 1.10: Serbest radikal savunma mekanizmaları (Kavas, 1989).....	32
Şekil 1.11: Okside ve redükte glutatyon oluşmasında glutatyon peroksidazın ve glutatyon redüktazın rolü (Urso ve Clarkson, 2003)	36
Şekil 1.12: Doğal tokoferol yapıları (Pekiner, 2003)	38
Şekil 1.13: A vitamini kimyasal yapısı (Bragadóttir, 2001).....	40
Şekil 1.14: Melatoninin (5-Metoksi-N-Asetiltriptamin) kimyasal yapısı (Yazıcı ve Köse, 2004)	40
Şekil 1.15: Melatoninin sahip olduğu antioksidan özellikler (Yazıcı ve Köse, 2004)	41
Şekil 3.1: Karaciğer dokusu histolojik kesiti. A) Kontrol Grubu B) 15 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup. Hidropik dejenerasyon (ok), nekroz (N). C) 30 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup. Hidropik dejenerasyon (ok), nekroz (N). H-E, 100µm.	57
Şekil 3.2: Solungaç dokusu histolojik kesiti. A) Kontrol Grubu B) 15 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup. Sekonder lamellada kütleşme (siyah ok), lamel epitellerinde vakuolleşme (mavi ok). C) 30 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup. Sekonder lamellada kütleşme (siyah ok), lamel epitellerinde vakuolleşme (mavi ok). H-E, 200µm.	58

Şekil 3.3: Bağırsak dokusu histolojik kesiti. A) Kontrol Grubu B) 15 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup. Villuslarda kütleşme (siyah ok), hücre infiltrasyonu (mavi ok) C) 30 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup. Villuslarda kütleşme (siyah ok), hücre infiltrasyonu (mavi ok) H-E, 200µm.....	59
Şekil 3.4: Karaciğer dokusu katalaz immunoreaktivitesi (siyah ok) A) Kontrol Grubu B) 15 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup. C) 30 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup.....	60
Şekil 3.5: Solungaç dokusu katalaz immunoreaktivitesi (siyah ok). A) Kontrol Grubu B) 15 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup C) 30 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup.....	61
Şekil 3.6: Bağırsak dokusu katalaz immunoreaktivitesi A) Kontrol Grubu B) 15 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup C) 30 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup	62
Şekil 3.7: Karaciğer dokusu SOD1 immunoreaktivitesi (siyah ok) A) Kontrol Grubu B) 15 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup C) 30 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup.....	63
Şekil 3.8: Solungaç dokusu SOD1 immunoreaktivitesi (siyah ok) A) Kontrol Grubu B) 15 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup C) 30 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup	64
Şekil 3.9: Bağırsak dokusu SOD1 immunoreaktivitesi (siyah ok) A) Kontrol Grubu B) 15 mg/L Gübre Uygulanan Grup C) 30 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup	65

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 3.1: Total Antioksidan Seviyeleri..... 55

Grafik 3.2: Total Oksidan Seviyeleri..... 56



1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Dünya çapında nüfusun hızlı bir şekilde artması sebebiyle besin ihtiyacının da artması sonucu tarımda verimin artırılması amacıyla tarımsal kimyasalların kullanımı son yıllarda daha fazla yaygınlaşmıştır. Bu durum çevresel sorunlara neden olmaktadır. Ekolojik denge ve biyolojik gelişimde oluşan bozukluklar, tarım ürünlerindeki kimyasal artıklar insan sağlığını tehdit etmeye başlamıştır. Kimyasal gübrelerin ve tarım ilaçlarının yoğun kullanımı insan ve çevre açısından önemli tehlikelerden biri haline gelmiştir. Ülkemizde nüfus artışıyla ters orantılı olarak tarım alanlarında azalma görülmektedir. Bu durum birim alandan daha fazla ürün elde etme zorunluluğunu doğurmakta ve artan nüfusun besin ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla çevre kirliliği ve güvenliği gibi dikkat edilmesi gereken konular göz ardı edilebilmektedir. Böylece tarım alanlarında kontrolsüz olarak kimyasal gübre ve ilaç kullanımı gündeme gelmektedir (Atılğan ve ark., 2007).

Kimyasal gübre kullanımının başlaması ile gübrenin toprak verimliliği, besin maddelerinin niteliği ve çevre üzerine etkileri tartışma konusu olmuştur (Yüksel, 1979). Diğer ekonomik sektörlerle kıyaslandığında, tarımsal faaliyetlerin pozitif etkilerinin yanı sıra negatif çevresel etkilerinin de olduğu görülmektedir. Tarımsal uygulamaların yaygın olması bir bölgedeki doğal ekosistemleri, üretilen oksijen ve bölgenin iklim koşulları üzerine olumlu etkileri bulunurken, yine tarımın yaygınlaştığı alanlarda uygulanan kimyasal maddelerin artması ile nitrat ve fosfat kirliliği, tarım ilaçlarından kaynaklanan kirlilik ve toprakta tuzluluk problemleri ile çevre üzerinde olumsuz etkiler görülebilmektedir (Karaer ve Gürlük, 2003).

Geçmişten günümüze kadar ortaya konan tarımsal faaliyetlerin neden olduğu değişimlerin büyük oranda olumsuz etkilerinin olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmaktadır. Tarımsal uygulamalarda uygun tekniklerin kullanılmaması, toprağın verimliliğini kaybetmesine, erozyona duyarlı hale gelmesine ve çoraklaşmasına neden olmaktadır. Gübre ve tarım ilaçlarının denetimsiz ve bilinçsiz olarak kullanılması, toprak sistemi, su sistemi ve biyolojik çeşitliliği olumsuz etkilemektedir. Uygulanan gübrelerin %50'sinin bitkiler tarafından kullanıldığı,

kalan diğerk kısmın yıkanma, buharlaşma ve yüzey akışı yolları ile diğerk ortamlara karıştığı bilinmektedir (Haktanır, 2009).

Bitkisel üretimin arttırılması amacıyla toprağına uygulanan gübreler arasında birinci sırada azotlu ve fosforlu gübreler bulunmaktadır. Gübreleme işlemi yapılırken uygulama miktarı ve zamanının uygun seçilmemesi durumunda azotlu gübrelerde bulunan azot (N) mineralizasyona uğramaktadır. Azotlu gübrelerin aşırı kullanımı sonrası yağmur suları ile topraktan yıkanan nitrat, yer altı sularına karışır. Buradan yüzey sularına taşınarak, sularda fauna üzerinde olumsuz etki gösterebilmekte, canlı hayatının yok olmasına neden olabilmektedir (Algan ve Bilen, 2005; Güler ve Çobanoğılu, 1994).

Tarımsal üretimin önemli girdilerinden biri olan gübre, yeterli uygulama olmadığında verim ve kalitede düşüşe sebep olurken, fazla miktarda kullanıldığında su kaynakları ile hava kirliliğine sebep olmaktadır (Atılğan ve ark., 2007). Kimyasal gübre kullanım alanlarının ve uygulanan miktarların artması sonucu suların bitki besin maddeleri ile kirlenmesi ve su kalitesinin düşmesi gibi durumlara aşırı gübre kullanımının neden olduğu belirtilmektedir. Su kirliliğinde başlıca kirleticiler olarak nitrat ve fosfat gösterilmektedir (Yüksel, 1979). Nitrat ve fosfat, su florasının gelişmesine neden olmakta ve su ortamında sürekli organik madde üretilmesine neden olmaktadır. Böylece sularda oksijen miktarının azalması sonucu ötrofikasyon meydana gelmektedir (Haktanır, 2009; Yüksel, 1979).

Günümüzde içme, kullanma, endüstri ve sucul canlılar için yeterli ve kaliteli su temin etmek önem kazanmıştır. Mevcut kaynaklarda oluşan kirlenme uygun su kaynakları bulmayı zorlaştırmaktadır. Sulardaki toksik organik atıklar metallere birleşerek ya da başka bileşiklere dönüşerek daha toksik hale geçebilmektedirler. Böylece su canlılarına zarar verecek boyutta su kalitesinin bozulmasına neden olarak su kirliliğine yol açmaktadır (Atamanalp ve ark., 2013).

Son yıllarda su ortamlarında tarımsal ve endüstriyel kimyasalların oranları artmıştır. Sucul canlılar su, sediment, suda asılı partiküller ve beslenme aracılığıyla bu kimyasalları bünyelerine almaktadır. Bu kimyasallar, serbest radikallerle mücadelede yer alan süreçlere zarar verebilmektedir (Akbulut ve ark., 2014). Bu sebeple pek çok araştırmada, sucul canlılar, stres ve hastalıkların kontrolünde, doku

ve hücrel hasarın belirlenmesinde ve oksidatif stresin önlenmesi çalışmalarında örnek canlılar olarak yer almaktadır (Akbulut ve ark., 2014; Atamanalp ve ark., 2003). Balıklarda hematolojik parametreler çevresel şartlarda meydana gelen değişikliklere kısa sürede yanıt verdiği için, toksikolojik çalışmalarda bu parametreler yaygın olarak kullanılmakta ve bu nedenle de hastalıklara karşı mücadele çalışmalarında balıkların savunma sistemi hakkında bilgi edinmek önem kazanmaktadır (Atamanalp ve ark., 2003; Atamanalp ve ark., 2013).

1.2. Stres

Stres ifadesi için pek çok tanım yapılabilir. Ancak fizyolojik olarak tanımlanacak olursa, canlının kapasitesini düşürerek onu zorlayan, sağlık durumunu tehlikeye sokan, canlı ile çevre arasındaki etkileşim olarak tanımlanabilir. Canlının yaşamını sürdürdüğü ortamda oluşan değişimler, canlıyı belirli bir ölçüde etkilediğinde canlı bünyesinde stres oluşmaktadır (Kayhan ve Yön, 2009).

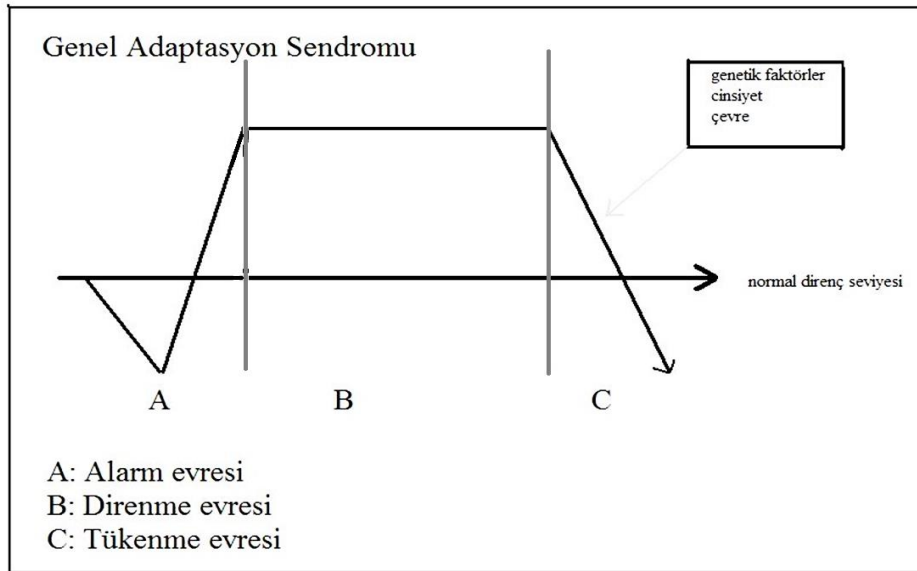
Genel olarak canlılarda strese yanıt, strese neden olan faktörlere direnmek, bu faktörlerle başa çıkmaya çalışmak için doku ve organ fonksiyonlarında değişimlerin oluşmasıyla başlar. Homeostaziden uzaklaşma şeklinde sonlanır. Stres sonucu meydana gelen değişimler canlı türleri arasında farklılık gösterse de benzer özelliklere sahip fizyolojik yanıtlardır (Dönmez ve ark., 2006; Kayhan ve Yön, 2009; Schreck ve ark., 2001).

Balıklar, yaşamlarını sürdürdükleri ortamdan kaynaklanan etkenlerle sürekli uyarılmaktadırlar. Balığın bu uyarılara tepki verip vermemesinin belirlenmesinde uyarıların şiddeti ve süresi önemlidir. Stres faktörlerinin, metabolik açıdan enerji maliyetine sebep olan uyarılar olduğu düşünüldüğünde, bu faktörlerin sucul organizmalar üzerinde hayati etkilere sahip olduğu söylenebilir. Yaşam alanlarında meydana gelen değişimlere bağlı olarak sucul canlıların özellikle besin maddesi olarak insanlar tarafından tüketilen balıkların sağlığının korunma ve balık yetiştiricilik metodlarının farklı koşullara göre karşılaştırılması konularında önemli çalışmalar yapılmıştır (Öğüt, 2010).

İki tür stresten bahsedilmektedir. Bunlar; “akut stres” ve “kronik stres”tir. Balıkların aniden şoka girmesi ile oluşan stres akut, uzun zaman içinde, kesintisiz şekilde uyarılması ile oluşan stres kroniktir (Kulaksız, 2009).

Balıkların fiziksel, kimyasal ve biyolojik tehlikelerin üstesinden gelebilmeleri için oluşturulan fizyolojik olaylar, “Genel Adaptasyon Sendromu (GAS)” olarak adlandırılan stres cevaplarına sebep olabilir (Kayhan ve Yön, 2009; Öğüt, 2010). Stres etmeninin GAS’ı harekete geçiren etkisi spesifik bir etki değildir (Yurdakoş, 2001). Sadece strese sebep olan etkenlerin kronik veya akut yapısı, stres cevabında canlıdan canlıya farklılık gösterebilmektedir (Öğüt, 2010).

“Genel Adaptasyon Sendromu (GAS)” olarak adlandırılan stres cevapları üç evreye ayrılır. Bunlar; Alarm, Direnç ve Tükenme Evreleri’dir.



Şekil 1.1. : Genel Adaptasyon Sendromu Aşamaları (Yurdakoş, 2005)

1. Alarm Evresi: Canlı stres etkeni ile karşılaştığında beyindeki hipotalamik-pituitari- interrenal (HPI) aksis aktif hale getirilir. Böbreklerden, kas ve kan kimyasında bazı faktörleri düzenleyen katekolaminler ve kortikosteroidler salgılanır (Öğüt, 2010). Stres oluşmasına neden olan etkenin kuvvetli olması durumunda canlı birkaç saat veya birkaç gün içinde hayatını kaybedebilir. Canlının bu evrede stres etkenine adapte olmaya çalışması ile ikinci evre yani direnç evresi başlar (Yurdakoş, 2005).

2. Direnç Evresi: Alarm evresinde doku katabolizmasında artış olmasının aksine direnç evresi anabolik bir süreçtir. Strese neden olan etkenlerin ortamda var olmaya devam etmesine rağmen fizyolojik sistem, stres vericinin negatif etkilerine karşı koyarak normalin üstünde direnç gösterir. Direnç evresi, stres etkeninin gücü ile canlının adaptasyon gücüne bağlıdır. Stres etkeni ortamda var oldukça adaptasyon gücü azalır. Adaptasyon enerjisinin tükenmesi ile üçüncü dönem olan tükenme evresi başlar (Yurdakoş, 2005).

3. Tükenme Evresi: Stres etkeninin miktarının veya süresinin fazla olması halinde fizyolojik sistem fonksiyonunu kaybetmeye başlar (Öğüt, 2010). Adaptasyon enerjisi azalır ve alarm evresi tekrar ortaya çıkar. Canlının adaptasyon enerjisinin tükenmesi durumunda ölüm meydana gelir (Yurdakoş, 2005).

Eğer stres kronik bir duruma dönüşürse bu evrelere ek olarak şu durumlar görülmektedir:

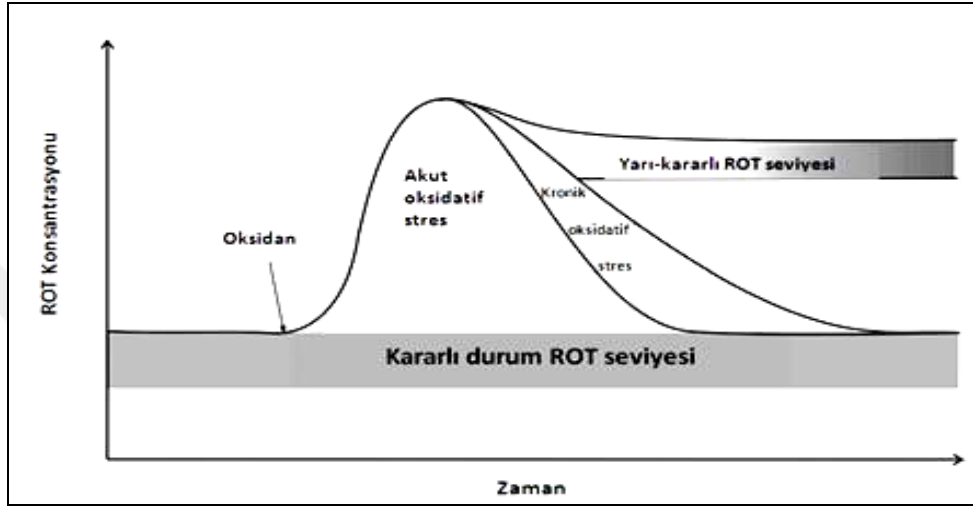
- Canlının bütününde değişikliklerin ortaya çıkması: Büyümede ve hastalıklara karşı dirençte azalma ile davranışsal değişiklikler üremede aksaklığa neden olur veya hayatta kalma oranını azaltır (Öğüt, 2010).
- Populasyon veya ekosistem seviyesinde değişikliklerin oluşması: Populasyon, üreme aksaklığı sebebiyle azalma başlayacaktır. Ayrıca besin zincirinin herhangi bir tropik seviyesinde meydana gelen bu değişimler, ekosistemdeki tür çeşitliliğini de azaltacak etkiler gösterecektir (Öğüt, 2010).

1.2.1. Oksidatif Stres

Vücudun antioksidan savunma mekanizması ile hücrelerde bulunan lipid tabakasında yağların yükseltgenmesine neden olan serbest radikallerin üretimi arasındaki denge halinin bozulması yani normal “ROT (Reaktif oksijen türleri) / RNT (Reaktif nitrojen türleri) ile homeostaz”ın dengesizliği “oksidatif stres” olarak tanımlanabilir (Ježek ve Hlavatá, 2005; Kopani ve ark., 2006; Mercan, 2004).

ROT konsantrasyonunun değişmesi ya da kronik halde olması ile oksidatif stres kararlı duruma geçer ve hücrel metabolizmaya zarar verir. Şekil 1.2.’de ROT konsantrasyonuna göre oksidatif stresin durumu görülmektedir. Normal koşullarda,

ROT üretimi ve ROT' un ortamdan uzaklaştırılması arasındaki denge, ROT oranının sabit tutulmasıyla sağlanır. Oksidatif hasarın oluşması ile kararlı durumda olan ROT seviyesi artar. Böyle bir durumda antioksidan potansiyeli yeterli seviyede ise ROT seviyesinde meydana gelen geçici artış akut oksidatif stres olarak tanımlanır. Antioksidan potansiyeli dengede olmadığında ise ROT hızlı bir şekilde üretilir ve böylece kronik oksidatif stres adı verilen durum ortaya çıkar (Akbulut, 2014).



Şekil 1.2: Canlı organizmalarda (ROT) seviyesinin dinamik yapısı (Akbulut, 2014).

Oksidatif stresin artmasında sigara kullanımı, ağır metal birikimi, radyasyon, enfeksiyonlar gibi pek çok faktör rol oynamaktadır. Oksidatif stres, lipidlerde ve diğer makromoleküllerde oksidatif hasara yol açarak dokularda hasara, kronik hastalıklara ve hatta ölüme sebep olmaktadır (Sezer ve Keskin, 2014). Oksidatif stres, kronik ve dejeneratif hastalıkların bir kısmında (kanser, artrit, yaşlanma, otoimmün rahatsızlıklar, kardiovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar vb.) önemli rol oynar (Kabel, 2014; Pham-Huy ve ark., 2008). Oksidatif hasara karşı en hassas organ beyindir. Merkezi sinir sisteminin patolojik durumların çoğunda, serbest radikaller direkt doku hasarına neden olmaktadır (Mercan, 2004).

Oksidatif stres, toksisiteyi ortaya koyan bir mekanizma olarak son yıllarda toksikolojik çalışmalar için temel oluşturmaktadır (Kopáni, 2006; Mercan, 2004). Serbest radikal oluşum mekanizmaları ile bu radikallere karşı oluşturulan yanıt, oksidatif stresin değerlendirilmesi açısından önemlidir (Yazıcı ve Köse, 2004).

1.3. Serbest Radikaller

Elektron, proton ve nötronlardan oluşan atomlar, maddenin en küçük yapı birimidir. Çekirdeğin etrafında dönen elektronlar, partikül ve dalga özelliğine sahiptirler. Bu sebeple ışık hızı ile hareket ederler. Işık hızıyla hareket eden elektronların çekirdek etrafındaki yerleri belirlenemediğinden tarif edilemez. Ancak bulunma ihtimalinin en yüksek olduğu yerden bahsedilmektedir ve elektronların bulunma ihtimalinin bulunduğu bu alan “orbital” olarak isimlendirilmektedir. Her bir orbitalde, zıt yönlü iki elektron bulunabilmektedir. Elektronlar farklı enerji düzeylerine sahiptirler ve sayılarına göre farklı orbitallerde bulunurlar. Elektronların enerji seviyeleri çekirdekten uzaklaştıkça artmaktadır. Atom türüne bağlı olarak yörünge türü, orbitallerde bulunan elektron sayısı ve elektron dağılımları farklılık göstermektedir (Kılınç ve Kılınç, 2002).

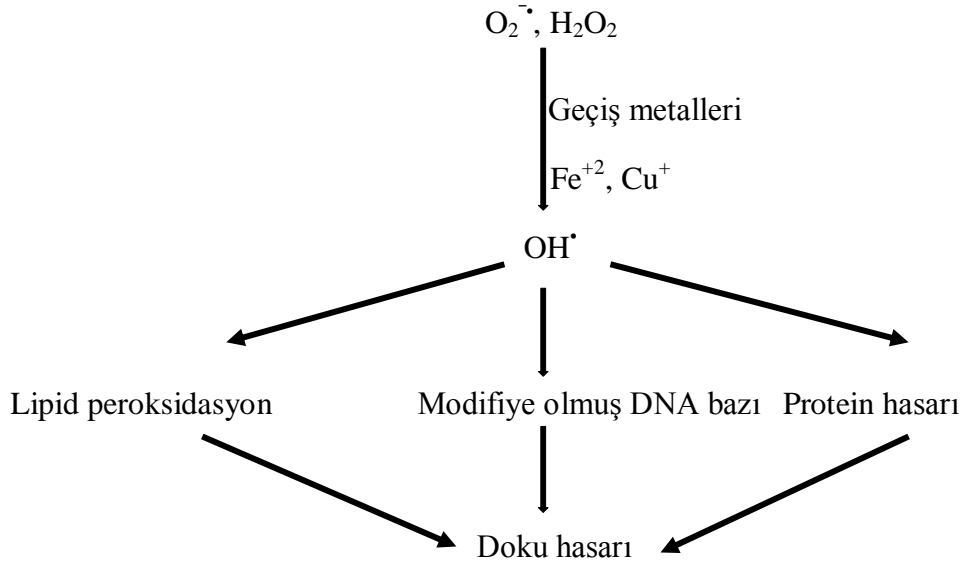
Dış orbitallerinde eşleşmemiş elektron içeren kimyasal türlere radikal adı verilmektedir. Radikaller basit yapılı bir atom ya da karmaşık yapılı organik bir molekül yapısına sahip olabilmektedir. Kimyasal ve biyokimyasal tepkimeler, atomların dış orbital seviyelerinde meydana gelmektedir. Dış orbitallerde eşleşmemiş elektron bulunması radikallerin reaktivitesini arttırmaktadır (Kılınç ve Kılınç, 2002).

Ortamda serbest radikal bulunması canlılarda hastalıklara ve yaşlanmaya neden olmaktadır. Zararlı etkilere sahip olan serbest radikallerin bazı antioksidan sistemler tarafından kontrol edilebilir olduğu yaklaşık elli yıllık bir süredir bilinmektedir (Halliwell, 1995). 1954 yılında Gerschmann ve arkadaşları, canlılar tarafından oksijenin kullanılması sonucu iyonize radyasyona benzer bir etkiye neden olabilecek reaktif ürünlerin meydana gelebileceğini ileri sürmüşlerdir (Gerschmann ve ark., 1954). Bu ürünler, fizyolojik ve patolojik tepkimeler esnasında oluşabilen, orbitallerinde bir veya birden fazla sayıda eşleşmemiş elektronu bulunan, bağımsız olarak varlığını sürdürebilme yeteneğine sahip, kararsız, etkinlik oranı yüksek ve moleküler ağırlığı düşük, yüksek reaktiviteli ve serbest radikal (SR) adı verilen atom, iyon veya moleküllerdir (Akpoyraz ve Durak, 1995; Bahorun ve ark., 2006; Kabel, 2014; Kopáni ve ark., 2006; Young ve Woodside, 2001) Kısaca serbest radikaller, bağımsız bir şekilde var olan, en az bir 'eşleşmeyen elektron' içeren

herhangi bir kimyasal tür olarak tanımlanabilir (Tokoyuni, 1999). Eşlenmemiş elektron bulundurmaları sebebiyle nötrale olabilmek için diğer maddelerden elektron alma eğilimindedirler. Oksijen ve nitrojen kaynaklı olabilirler (Derviş, 2011). Kimyasal bağ kırılması yoluyla oluşan, her parçası bir elektron tutan moleküllerden ve redoks tepkimeleri yoluyla oluşturulur (Bahurun ve ark., 2006; Pham-Huy ve ark., 2008).

Günümüzde genel olarak radikal ve serbest radikal terimleri birbirlerinin yerine kullanılmaktadır ancak radikal terimi, serbest radikallerinin su molekülleri tarafından tutulan bağlı formunu ifade etmektedir. Tarihsel olarak bakıldığında reaksiyon sırasında yapısı değişmeyen atom gruplarını ifade etmek amacıyla radikal kelimesi kullanılmaktadır. Günümüzde bu tanım büyük ölçüde kullanımdan kalkmıştır (Çakatay ve Kayalı, 2006).

Eşleştirilmemiş bir elektronun var olması ortak özelliklere sahip pek çok radikal tarafından paylaşılmasına neden olmaktadır. Radikaller zayıf bir manyetik alana doğru çekilirler ve bu özellikleri sebebiyle paramanyetik olduğu söylenmektedir. Birçok radikal oldukça reaktiftir ve bu sebeple bir elektron bağışlar veya diğer moleküllerden bir elektron çıkarmaktadır. Böylece oksitleyiciler veya indirgeyiciler olarak hareket etmektedir. Yüksek reaktivitenin sonucu olarak, bazı radikal türlerinin varlıklarını uzun süre korumalarına rağmen pek çok radikal biyolojik sistemlerde çok kısa bir yarı ömre (6-10 saniye veya daha az) sahiptir. Birçok hastalık başta süperoksit ve hidroksil radikali olmak üzere oksijen türevi olan önemli serbest radikallerden kaynaklanmaktadır. Vücutta radikaller, endojenler ve çevresel faktörleri içeren çeşitli mekanizmalarla oluşmaktadır (Şekil 1.3) (Young ve Woodside, 2001).



Şekil 1.3: Vücutta üretilen serbest radikallerin kaynakları ve serbest radikal hasarının sonuçları (Young ve Woodside, 2001).

Serbest radikal oluşumu ve nötralizasyonu arasında bir dengesizlik olması durumunda oksidatif stres meydana gelmektedir. Örneğin; hidroksil radikali ve peroksinitritin fazla miktarda olması, lipid peroksidasyonu olarak adlandırılan bir reaksiyonla hücre zarına ve lipoproteinlere zarar verebilir. Bu reaksiyon, sitotoksik ve mutajenik özellikte olan malondialdehit ve konjuge dien bileşiklerinin oluşmasına neden olur. Lipid peroksidasyonu, başladıktan sonra hızla yayılan ve çok sayıda lipid molekülünü etkileyen bir zincir reaksiyonu şeklinde meydana gelmektedir (Kabel, 2014).

Vücut, hücrelerin enerji üretme sürecinin bir parçası olan oksijenle sürekli olarak etkileşim halindedir. Bu kimyasal etkileşimler moleküllerin oksidasyonunu ve redüksiyonunu içerir. Bu aktivitenin bir sonucu olarak, serbest radikal adı verilen yüksek miktarda reaktif moleküller üretilmektedir (Kopáni ve ark., 2006).

Hücrel metabolizma olayları esnasında enzimatik reaksiyonlarda ara ürün olarak serbest radikaller sürekli meydana gelmektedir. Bu reaksiyonlar sonucu üretilen serbest radikallerin moleküler oksijen ile etkileşmesi durumunda serbest oksijen radikalleri oluşmaktadır (Schreck ve ark., 2001).

Bu bağlamda biyolojik serbest radikaller, kararsızlığı oldukça yüksek, çeşitli organik substratlarla tepkimeye uygun elektronlara sahip olan moleküllerdir. Hücre

içinde gerçekleşen diğer moleküllerle etkileşim oksidatif hasara sebebiyet verebilir. Serbest radikaller, hücrelerin önemli yapısal bileşenleri olan lipid, protein ve nükleik asit gibi bileşenlere zarar verebilirler. Serbest radikaller, ağırlıklı olarak hücresel solunum ve normal metabolizma esnasında üretilen, yüksek reaktif özellikli moleküllerdir (Kopáni ve ark., 2006).

Canlı sistemlerde oluşan biyolojik serbest radikaller, dayanıksız olmalarına rağmen reaktif özellikleri yüksek olduğundan hücresel moleküllerle etkileşmek suretiyle oksidatif hasara yol açmaktadırlar (Çakatay ve Kayalı, 2006).

Öncelikle mitokondrideki O₂'li solunum sırasında elektron transfer sistemi (ETS) olmakla birlikte, fagositik hücrelerde meydana gelen solunum patlaması, sitokrom p450 sistemi, sitoplazmik, peroksizomal, lizozomal ya da membrana bağlı oksidaz aktiviteleri gibi fizyolojik şartlarda gerçekleşen pek çok hücresel süreç de ROT oluşumuna neden olmaktadır (Yazıcı ve Köse, 2004; Yerer ve Aydoğan, 2000). Ayrıca ROT düzeylerini etkileyen faktörler olarak ağır egzersizler, aromatik hidrokarbonlar, antibiyotikler, anestezipler, radyasyon, sigara dumanı ve hava kirliliği gibi çevresel faktörler de gösterilebilir. İntraselüler ROT düzeyi, çevresel faktörlere ve hücre tipine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Genel olarak nötrofiller, monositler ve makrofajlar ROT üretimi açısından yüksek aktiviteli hücrelerdir (Yazıcı ve Köse, 2004).

Hücreler enerji üretmek için oksijen kullandıklarında mitokondriler tarafından, ATP (Adenozin trifosfat) üretiminin bir sonucu olarak, yan ürün olarak serbest radikaller oluşturulur. Bu yan ürünler genellikle hücresel redoks tepkimeleri sonucu oluşan reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif azot türleri (RNT)'dir. Bu ürünler hem toksik hem de yararlı olmak üzere ikili bir role sahiptir. Bu iki antagonistik etki arasındaki hassas denge yaşam açısından önemlidir (Pham-Huy ve ark., 2008). ROT ve RNT çeşitli reaksiyonlar için önemlidir ancak oksijenli solunum yapan canlılar için ROT çok önemli olup, fizyolojik ve patolojik koşullarda oluşabilir. Normal seyrinde olan metabolik aktiviteler sırasında yaklaşık %1 oranında ROT meydana gelir (Derviş, 2011; Kasnak ve Palamutoğlu, 2015). Hücresel metabolizmanın hızlanmasına sebep olan egzersiz gibi aktiviteler esnasında, enfeksiyonlar, kronik inflamatuvar hastalıklar, alerjik hastalıkların varlığında, oksijen basıncının yüksek

olduğu durumlarda, hava kirliliğinin yoğun olduğu yerlerde, sigara dumanı, pestisit, insektisit, radyasyon, ilaç, kontamine sular ve çeşitli toksik maddelere maruziyetlerde ve yaşlanma sürecinde ROT retimi artar (Derviş, 2011; Kabel, 2014; Kasnak ve Palamutoğlu, 2015; Koca ve Karadeniz, 2003).

Düşük ya da orta düzeyde ROT ve RNT, bağışıklık fonksiyonu ve hücresel yanıtarda yararlı etkilere sahiptir (Pham-Huy, 2008). Düşük seviyelerde ROT çeşitli moleküllerin kontrollü oksidasyonunu sağlar (Derviş, 2011). Yüksek konsantrasyonlarda, hücresel yapıarda hasara neden olan oksidatif strese neden olurlar (Pham-Huy, 2008). ROT düzeyinin artışı ile hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptoz, immün cevaplar oluşur (Derviş, 2011).

1.3.1. Reaktif Oksijen Türleri

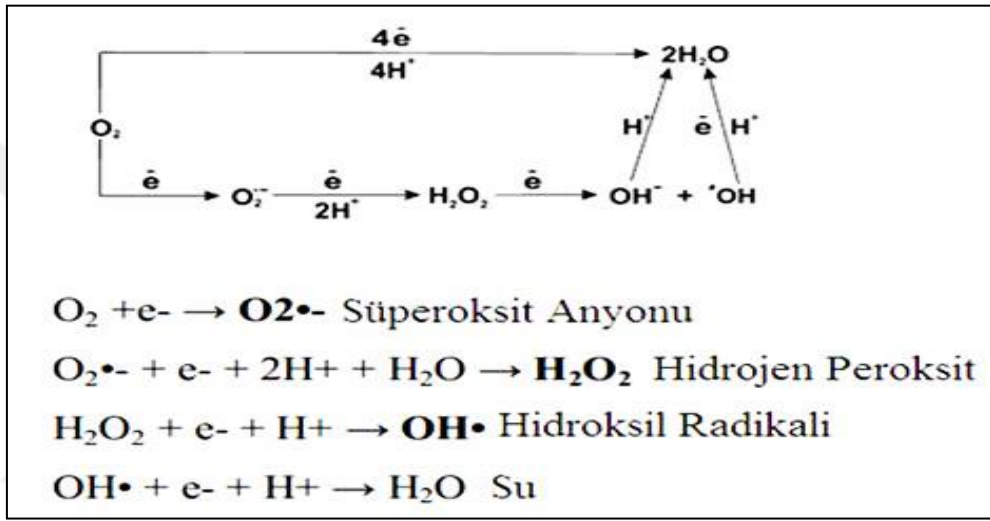
Oksijen, organik moleküllerin yapısında bulunması ve aerobik canlıların enerji metabolizmalarında rol oynaması sebebiyle canlılar için vazgeçilmez bir elementtir (Kabel, 2014; Kılınç ve Kılınç, 2002). Pek çok hidroksilaz ve oksidaz enzimi substratı olarak oksijeni kullanmak suretiyle molekül yapılarına oksijen katılımını sağlar (Kılınç ve Kılınç, 2002).

Tüm hayvanlar ve bitkiler, anaerobik koşullar altında yaşayacak şekilde özel olarak adapte edilmiş olan organizmalar haricinde verimli enerji üretimi için oksijen gerektirirler (Tokoyuni, 1999).

Aerobik canlılar moleküler oksijene ihtiyaç duyarken anaerobik canlılar oksijene gereksinim duymazlar. Zorunlu anaerobik olan canlılar için oksijen toksiktir. Bunun nedeni, biyolojik moleküllerin oksijenden kaynaklanan reaktif türler tarafından oksitlenmeleri ve anaerobik canlılarda da bu durum için bir savunma sisteminin olmayışıdır. Herhangi bir canlının oksijenli ortamda yaşamını sürdürebilmesi için oksijenden kaynaklanan radikallere karşı bir savunma mekanizmasına sahip olması gerekmektedir (Kılınç ve Kılınç, 2002).

Aerobik canlılar için de oksijen elementinin toksik etkileri bulunmaktadır. Aerobik canlılarda oksijen toksisitesi iki mekanizma ile oluşmaktadır;

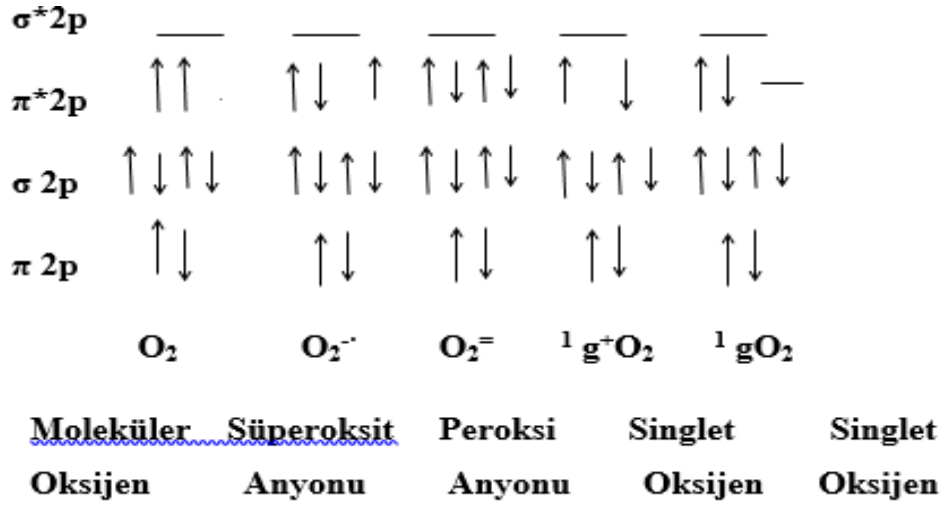
- Moleküler oksijen, reaktif türlerinden bağımsız olarak bazı enzimleri inhibe edebilmektedir. Örneğin; nitrojenaz enzimleri, ribuloz bifosfat karboksilaz gibi enzimler oksijen tarafından kompetitif inhibisyona uğrarlar. Glutamat dekarboksilaz enziminin de oksijen tarafından inhibe edilmesiyle GABA (Gama-aminobütirik asit) derişiminin düşmesine neden olmaktadır (Kılınç ve Kılınç, 2002).
- Oksijenin kendisinden kaynaklanan toksik etkiler, oksijen radikalleri olarak tanımlanan, oksijenin metabolizma sırasında meydana gelen reaktif türlerden kaynaklanmaktadır (Kılınç ve Kılınç, 2002).



Şekil 1.4: Canlılarda oksijen metabolizması ve ROT arasındaki dönüşüm (Akbulut, 2014)

Moleküler iki değerlikli oksijen, tanım olarak, bir serbest radikaldir (Tokoyuni, 1999). Oksijen molekülü reaktivitesi düşük olan ancak diradikal olarak adlandırılan bir yapıya sahiptir. Herhangi bir molekülün oksijenle tepkimeye girebilmesi için, oksijenin diradikal özelliği sebebiyle, oksijen molekülüne benzer bir yapıya sahip olması gerekmektedir. Diğer organik moleküllere bakıldığında, moleküllerin sahip olduğu orbitallerde yer alan elektronlar paralel olmayan ve eşleşmemiş şekilde bulunurlar veya paylaşılmayan elektronlar kovalent bağlara katılmışlardır. Bu durum oksijenin reaktivitesini kısıtlamaktadır. Spin kısıtlaması olarak adlandırılan bu kısıtlamanın canlılar tarafından aşılması için oksijene elektron transferi gerçekleştirmeleri gerekmektedir. Canlılar elektron transferi için geçiş

elementlerinden bazı metal iyonlarını kullanırlar. Dış orbitallerinde bir veya birden fazla sayıda paylaşılmamış elektron içeren demir (Fe), Bakır (Cu), Mangan (Mn), Kobalt (Co) ve Molibden (Mo) geçiş elementleri vücudun ihtiyacının olduğu elementlerdir. Biyolojik sistemlerde oksijeni kullanan enzimler veya oksijenle etkileşim halinde olan proteinler bu elementlerden en az birini içermek zorundadırlar (Kılınç ve Kılınç, 2002).



Şekil 1.5: Moleküler oksijenin farklı formlarının 2p orbital elektron konfigürasyonu (Kılınç ve Kılınç, 2002).

Enerji üretmek amacıyla oksijen kullanıldığında, mitokondriden ATP üretiminin bir sonucu olarak serbest radikaller oluşmaktadır. Bu ürünler, hücrel redoks işleminden kaynaklanan ve hem toksik hem de faydalı bileşenler olarak ikili bir rol oynayan reaktif oksijen türleri (ROT) olarak adlandırılır. Düşük veya orta düzeyde ROT, hücrel yanıtlar ve bağışıklık fonksiyonu üzerinde faydalı etkiler sağlarken, yüksek konsantrasyonlarda oksidatif strese neden olmaktadır. Bu durum tüm hücrel yapılara zarar verebilecek zararlı bir süreçtir (Kabel, 2014).

Biyolojik sistemler için oksijenden oluşan serbest radikaller oldukça önemlidir (Akkuş, 1995; Kulaksız, 2009). Kararsız yapıda olan oksijenin, bir diğer oksijenin dış yörüngesinde bulunan elektronları ortak kullanması sonucu oksijen radikalleri meydana gelmektedir (Kulaksız, 2009).

Reaktif oksijen türleri (ROT), oksijen atomu veya bunların eşdeğerleri ile bağlantılı olan serbest radikallerdir ve moleküler oksijen (O_2) ile diğer moleküllerden daha

güçlü bir reaktiviteye sahiptirler. Reaktif oksijen türleri genellikle aşağıdaki dört türe işaret eder: (i) süperoksit anyonu (O_2^-); (ii) hidrojen peroksit (H_2O_2); (iii) hidroksil radikal ($\cdot OH$); ve (iv) biyolojik açıdan önemli serbest radikallerin büyük bir bölümünü oluşturan singlet oksijen (1O_2). H_2O_2 ve 1O_2 tanımı gereği serbest radikal değildir, ancak bu türler serbest radikaller gibi davranırlar (Tokoyuni, 1999).

ROT'un en belirgin özellikleri diğer moleküllerle olan yüksek reaktivitesidir. Burada, O_2^- veya H_2O_2 'nin kendiliğinden diğer moleküllerle olan reaktivitesinin oldukça düşük olduğunu, ancak az miktarda bir geçiş metalinin varlığında, Fenton veya Haber-Weiss reaksiyonu ile OH^\cdot radikaline dönüştürdüğü akılda tutulmalıdır. OH üretmek için yapılan reaksiyonun 100 yıldan fazla süredir bilinmekte olduğunu unutmamak gerekir. Bir İngiliz kimyager olan Fenton, 1894 yılında $FeSO_4$ ve H_2O_2 'nin kostik alkali ilavesiyle menekşe rengi veren tartarik asit oksidasyonuna neden olduğunu bildirmiştir (Fenton, 1894). Günümüzde, ROT ile bağlantılı yüzlerce reaksiyonun insan vücudunda ısrarla çalıştığı bilinmektedir (Tokoyuni, 1999).

Bu verimli çalışmaların başarısı, McCord ve Fridovich'in 1968'de süperoksit dismutaz enzimini keşfetmesidir. 1970'lerde ve 1980'lerde, biyokimyacılar ve radyasyon biyologları, biyolojik moleküllerin yapısını geri döndürülemez biçimde zararlı hale getirmek için ROT'un rolünü yoğun bir şekilde incelemiştir. Bununla birlikte, 1990'lı yıllarda, ROT'un moleküllerdeki geri döndürülebilir yapısal değişikliklere dahil olduğu bulundu ve bu, daha sonra kısaca gözden geçirilecek olan ROT ve transkripsiyon faktörleri arasındaki ilişki üzerine kapsamlı araştırma faaliyetlerine yol açmıştır (Tokoyuni, 1999).

ROT'un mutasyon, karsinogenez, yaşlanma, arteroskleroz, radyasyon veya ultraviyole maruziyeti, inflamasyon, iskemi-reperfüzyon hasarı, diabetes mellitus ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli biyolojik fenomenlerde yer aldığı saptanmıştır. Dahası, ROT, oksijeni büyük bir enerji kaynağı olarak kullandığı sürece her hücrede kalıcı olarak üretilir. Hazırlanmış antioksidan mekanizmalar ROT yükünü tamamen telafi etmedikçe, hücrenin içinde veya dışında üretilen reaktif oksijen türleri "oksidatif stres" oluştururlar (Tokoyuni, 1999).

Son çalışmaların sonuçlarına göre nispeten düşük seviyelerde oksidatif stresin dejenerasyona veya ölüme neden olmaktan ziyade hücre proliferasyonunu artırdığı kabul edilmektedir. Örneğin, kültürlü kanser hücrelerinde herhangi bir uyarı yapılmaksızın büyük miktarda H_2O_2 üretilir. Kanser hücreleri bu nedenle non-neoplastik hücrelere göre daha fazla oksidatif strese maruz kalır, ancak stres apoptoz veya nekroza neden olacak kadar güçlü değildir (Tokoyuni, 1999). Belirli koşullarda oksijenin indirgenmesi ile güçlü oksidan özelliğine sahip ve kısa ömürlü olan serbest oksijen radikalleri oluşmaktadır (Kulaksız, 2009).

Bazı biyolojik moleküller, serbest oksijen radikalleri tarafından zarar görebilirler. Kararsız yapıda olan oksijen, çevresinde bulunan moleküller ile reaksiyona girerek kararlı hale gelmektedir. Bilinen en önemli radikaller, çeşitli reaksiyonlar sonucunda oluşan süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil (OH^\cdot) radikalleridir. Bunlara ek olarak, serbest radikal etkisi ile alkoksil, peroksil radikalleri ve oksijen merkezli olmayan radikaller de oluşmaktadır. Bunların tümü reaktif oksijen türleri adını almaktadır. Reaktif oksijen türlerine maruz kalma miktarına ve süresine bağlı olarak hücre fonksiyonları bozulmaktadır (Kulaksız, 2009).

Farklı türlerdeki antioksidanlarla reaktif oksijen türlerinin etkinliği ortadan kaldırılabileceği gibi reaktif oksijen türlerinin hücrel bileşenlerle etkileşimi de söz konusu olabilir. ROT metabolizmasının canlılarda zararlı etki potansiyeli yüksek olduğundan hücre kontrolü altındadır ve hücre içi konsantrasyonları genel olarak 8-10 molar civarındadır. ROT, sürekli üretilip harcandığından hücre içi konsantrasyonu değişiklik gösterebilir. Üretilip harcanan ROT miktarları eşit durumda olduğunda kararlı duruma geçilir (Akbulut ve ark., 2014).

1.3.1.1. Süperoksit Radikali

Süperoksit (O_2^-) oksijene bir elektron eklenmesiyle üretilir ve çeşitli mekanizmalar ile in vivo olarak üretilmektedir. Süperoksit üretiminde, adrenalin, flavin nükleotitleri, tiyol bileşikleri ve glikoz dahil olmak üzere pek çok molekül oksijen varlığında oksitlenebilir (yükseltgenebilir) ve bu reaksiyonlar demir veya bakır gibi geçiş metallerinin varlığında büyük ölçüde hızlandırılmaktadır. Mitokondri iç zarında yer alan elektron transfer zinciri oksijenin suya indirgenmesini

gerçekleştirir. Bu kimyasal işlemler sırasında genellikle transfer zincirinin bileşenlerine sıkı bir şekilde bağlı olan serbest radikal ara ürünleri oluşturulur. Ancak mitokondri matriksi içinde birkaç elektronun sabit bir sızıntısı söz konusudur ve bu durumun sonucu olarak süperoksit oluşur. Karaciğerde bulunan sitokrom p450 oksidaz ve adrenal hormonların sentezinde görev alan enzimler gibi bazı enzimlerin aktivitesi sitoplazma çevresine ve dolaylı olarak da süperoksit yapısına birkaç elektronun sızmasına yol açar. Ayrıca vasküler endotelyum tarafından nitrik oksidi nötralize etmek amacıyla, diğer hücreler tarafından hücre büyümesini ve farklılaşmasını düzenlemek ve fagositik solunumsal patlama sırasında süperoksit üretimi gerçekleşmektedir (Young ve Woodside, 2001).

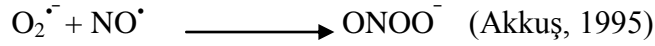
Canlı sistemlerde süperoksit radikali oluşumuna neden olan olaylar iki grupta toplanabilir (Tekkeş, 2006):

1. Çeşitli fiziksel ve kimyasal çevresel faktörler süperoksit oluşumuna neden olabilmektedir. Beta, gama ve X ışınlarının süperoksit oluşumuna neden olması bu duruma örnek olarak verilebilir (Tekkeş, 2006).
2. Moleküler oksijeni metabolize eden canlılar, radikal oluşumuna neden olan çevresel koşullardan izole edilmiş olsalar dahi, organizmalarda gerçekleşen redoks tepkimeleri esnasında yine süperoksit üretimi gerçekleşebilir. Oksidaz enzimlerinin ve hidroksilaz enzimlerinin katalizlediği tepkimelerde ara ürün olarak radikaller üretilebilmektedir (Tekkeş, 2006).

Genel olarak oksijenli solunum yapan canlılarda, oksijen bir elektron alarak indirgenmektedir. Böylece süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) oluşmaktadır (Akkuş, 1995):



Süperoksit radikalının doğrudan bir zararı yoktur. Hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonları için indirgeyici olması açısından önemlidir. Süperoksit radikali ile nitrik oksit radikali birleşmesi sonucunda peroksinitrit meydana gelmektedir. Peroksinitritlerin oluşmasıyla NO^{\cdot} 'in etkisi ortadan kalkar. Ancak peroksinitritler proteinler üzerinde zararlı etkilere sahiptir (Akkuş, 1995).



pH değerinin düşük olduğu koşullarda, süperoksit radikalının reaktivitesi artar ve perhidroksil radikali (HO_2^{\cdot}) oluşturmak amacıyla protonlanır (Akkuş, 1995).

Süperoksit anyonunun hem oksitleyici hem de redükleyici özelliği vardır. Redükleyici özellik olarak, ferrisitokrom c'nin redüksiyon reaksiyonunda bir elektron kaybederek oksijene okside olması örnek olarak verilebilir. Sitokrom c indirgenme reaksiyonunun SOD (süperoksit dismutaz) tarafından inhibe edilmesi sayesinde $\text{O}_2^{\cdot-}$ tayini yapılmaktadır. Oksitleyici özelliğine örnek olarak, epinefrin oksidasyonu sırasında bir elektron almak suretiyle hidrojen perokside indirgenmektedir (Akkuş, 1995).

Süperoksit ve perhidroksil radikallerinin birlikte girdikleri dismutasyon reaksiyonunda birinin okside olması diğerinin indirgenmesi ile oksijen (O_2) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşmaktadır (Akkuş, 1995).



Süperoksit radikalının olduğu bir diğer reaksiyon da indirgenen geçiş metallerinin otooksidasyonudur (Akkuş, 1995).



1.3.1.2. Hidroksil Radikali

O_2 ve H_2O_2 'nin sebep olduğu hasarın büyük çoğunluğunun in vivo olarak hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) gibi daha reaktif türlere dönüşmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. $\cdot\text{OH}$ radikalının oluşumu en az dört mekanizma ile gerçekleşmektedir (Halliwell, 1995):

- i. Özellikle demir ve bakır iyonları tarafından gerçekleştirilen geçiş metali iyonlarının katalize edilmesi
- ii. Radyasyona maruz kalma

iii. Peroksinitrit oluşturmak üzere O_2 - NO_2 reaksiyonu (Proksinitrit, tamamen sitotoksik olan ve fizyolojik pH'da parçalanabilen, nitronyum iyonu (NO_2^+), azot dioksit (NO_2^*) ve *OH içeren zararlı ürünlerdir).

iv. $HOCl$ ile O_2^* 'nin reaksiyonu (Halliwell, 1995).

Ortamda geçiş metallerinin bulunması durumunda hidrojen peroksit indirgenmesi ya da su moleküllerinin radyasyona uğraması sonucu hidroksil radikali (*OH) oluşmaktadır (Akkuş, 1995).

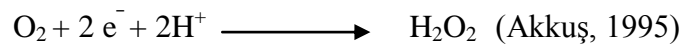
1.3.1.3. Singlet (Tekli) Oksijen (1O_2)

Singlet oksijen, serbest radikal olmayan bir oksijen molekülü olmasına rağmen serbest radikal reaksiyonları sonucunda oluşabilmekte veya serbest radikal oluşumuna sebep olan reaksiyonları tetikleyebilmektedir. Oksijen atomunda bulunan elektronlardan birinin enerji alma yoluyla ters yönde başka bir orbitale geçişiyle singlet oksijen oluşmaktadır. Uyarılan elektronların daha düşük enerji seviyelerine inmesi sonucu singlet oksijen ışık yaymaktadır. Singlet oksijenin kimyasal etkileşimler sonucu ortaya çıkan bu kimyasal ışınım ROT tayininde direkt yöntem olarak kullanılmaktadır (Akkuş, 1995).

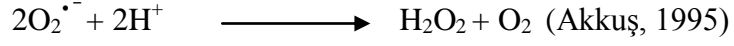
1.3.1.4. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Mitokondrilerde hidrojen peroksit üretiminin gerçekleştiği ilk olarak 1970'lerde araştırılmış ve ifade edilmiştir (Boveris ve Chance, 1973; Loschen ve ark., 1971). Hayvan hücrelerinde bulunan mitokondrilerde H_2O_2 üretimi, aerobik koşullar altında fizyolojik bir olay olarak ortaya çıkmaktadır (Boveris ve Chance, 1973).

Süperoksit radikalının bir elektron alması veya moleküler oksijenin iki elektron alması sonucunda peroksit molekülü oluşmaktadır. Peroksit molekülünün iki hidrojen atomuyla birleşmesi ile hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşmaktadır. Hidrojen peroksit (H_2O_2) uzun ömürlü bir radikaldir ve membranlardan kolay bir şekilde geçebilmektedir (Akkuş, 1995).



Canlı sistemlerde hidrojen peroksit üretimi süperoksit molekülünün dismutasyonu sonucu gerçekleşir. İki süperoksitin iki proton alması sonucu hidrojen peroksit ve moleküler oksijen oluşmaktadır (Akkuş, 1995).



Hidrojen peroksit ve moleküler oksijenin oluştuğu bu reaksiyon sonucu oluşan ürünler radikal olmadığından dismutasyon reaksiyonu olarak bilinmektedir. Hidrojen peroksiti oluşturan bu dismutasyon reaksiyonu, spontan olabildiği gibi süperoksit dismutaz enziminin katalizlemesi ile de olabilir. Serbest radikal özelliğinde olmayan hidrojen peroksit, süperoksit molekülü ile reaksiyona girmek suretiyle reaktif ve en zararlı radikal olan hidroksil radikalının oluşumuna neden olmaktadır. Bu sebeple hidrojen peroksit reaktif oksijen türlerinden biri olarak sınıflandırılmaktadır (Akkuş, 1995).



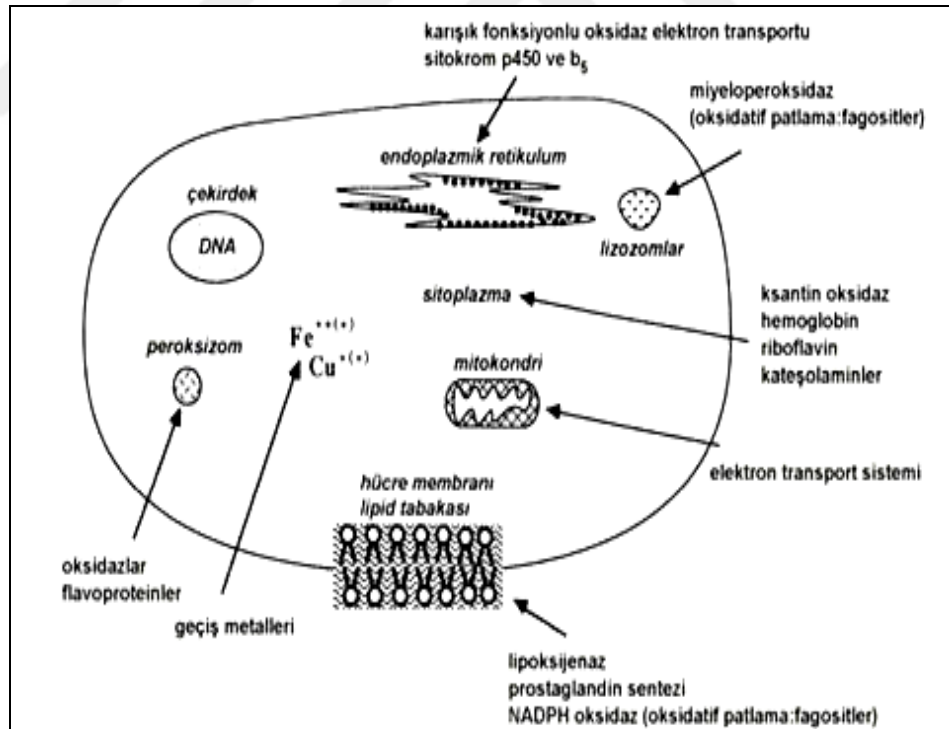
1.4. Serbest Radikal Kaynakları

Serbest radikal kaynaklarının hücreye ve organel yüzeylerine yakınlığı açısından bakıldığında metabolik ürünlerin sitozolik, membran ve ekstrasellüler komponentleri etkileyebilme olasılığının çok önemli bir durum olduğu görülmektedir. Ürünün çözünürlüğü, difüzyon mesafesi gibi faktörler serbest radikalın etki derecesini ortaya koymaktadır. Serbest radikalın reaktivitesi, temelde difüzyon mesafesi ile ilgilidir. Örneğin; hidroksil radikalının reaktivitesi oldukça yüksektir. Bundan dolayı meydana geldiği hücre bölümünden daha uzağa difüze olmasına gerek kalmadan hemen reaksiyona girebilmektedir. Süperoksit radikaline bakıldığında ise reaktivitesi hidroksil radikalından az olduğundan meydana geldiği hücre bölgesinden daha uzak bölgelere difüze olabilmektedir. Hidrojen peroksit mitokondrial membranlar, peroksizomal membranlar ve plazma membranından kolaylıkla difüze olarak toksik etkilerini, açığa çıktığı noktadan daha uzak hücre bölümlerinde güçlü bir şekilde gösterebilir (Kavas, 1989).

1.4.1. Endojen Kaynaklar

Moleküler oksijen, aerobik organizmalar için başlıca serbest radikal kaynağıdır. Oksijenin redüksiyonu ve aerobik hücrelerde gerçekleşen enzimatik oksidasyon sırasında süperoksit radikali (O_2^-) açığa çıkmaktadır (Kavas, 1989). Serbest radikaller genellikle hücrelerde elektron transfer reaksiyonlarıyla meydana gelmektedirler. Serbest radikal oluşumuna neden olan reaksiyonlar enzimlerin etkisiyle ya da nonenzimatik geçiş metalleri iyonlarının redoks tepkimeleri yoluyla gerçekleşmektedirler (Akkuş, 1995).

Mitokondriyal elektron transport zincirinin önemli bileşenleri olan Koenzim Q ve kompleks III yapıları, moleküler oksijenin elektronlar ile etkileşmesini sağlayarak süperoksit anyonunu oluştururlar. Bir diğer ROT kaynağı, endoplazmik retikulum (ER) elektron transport zinciridir. Hüresel ve canlıya yabancı olan kimyasal maddelerin katabolizması sitokrom p450 ve redoks basamaklarını içermektedir (Akbulut ve ark., 2014).



Şekil 1.6: Biyolojik kaynakların ROT üretimine etkisi (Akbulut ve ark., 2014)

Mitokondri

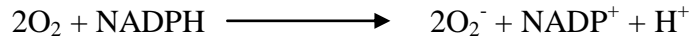
Hücresel düzeyde serbest radikal oluşumuna neden olan en büyük kaynak elektron transport sisteminde (ETS) meydana gelen elektron sızıntılarıdır. Hücrelerde enerji üretimini sağlayan mitokondrilerin iç zarlarında bulunan oksidatif fosforilasyon sistemi elemanlarının indirgenmesi ile mitokondriyal süperoksit radikallerinin oluşum oranı artmaktadır (Akkuş, 1995).

İlk kez 1966'da yapılan çalışmalar ile mitokondrial hidrojen peroksit üretiminin olduğu saptanmıştır. Sonraki çalışmalar ile mitokondrial hidrojen peroksitin çoğunluğunun, süperoksit radikallerinin dismutasyonundan meydana geldiği gösterildi. Moleküler oksijenin, mitokondrial sitokrom c oksidaz tarafından suya redüksiyonunda serbest radikal halinde ara maddelerin rol oynamadığı bir elektron transferi meydana gelmektedir. Mitokondrial süperoksit radikali yapımında sitokrom bir kaynak oluşturmamaktadır. İç mitokondrial zarında lokalize olan respiratuar zincir taşıyıcıları yüksek oranda indirgenmiş mitokondrial süperoksit radikalini açığa çıkışı büyük oranda artmaktadır. Bu durum, mitokondrial radikal yapımını etkileyen endojen faktörlerin, respirasyonu düzenleyen faktörler olduğunu düşündürmektedir. Respirasyonu düzenleyen faktörler, kullanıma hazır NAD-linked (bağlı) substratlar, süksinat, ADP ve oksijendir. Eğer oksijen, sitokrom oksidaz tarafından suya redüksiyonu sınırlı olacak miktarlarda bulunursa, artan respiratuar zincir redüksiyonu ve hücre içinde redükte ko-faktörlerin birikimi, iskemik hücrelerde süperoksit radikali yapımını kolaylaştırabilir (Kavas, 1989).

Enzimler

Katalitik döngüleri esnasında, pek çok enzim serbest radikallerin açığa çıkmasına neden olmaktadır. Bunlardan, üzerinde en çok çalışılan ksantin oksidaz enzimidir. Bu enzim, oksijenin hidrojen peroksit redüksiyonu sırasında süperoksit radikalini meydana getirmektedir. İn vivo iskemia, ksantin oksidazı dehidrogenaz formundan oksidaz formuna dönüştürürken süperoksit radikalini açığa çıkarır. Serbest radikal oluşumunda rol oynayan bir diğer enzim NADPH oksidazdır. Redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfatın (NADPH), NADPH oksidaz tarafından okside edilmesi esnasında oksijen süperoksit iyonuna dönüştürülür. Oluşan süperoksit iyonu dismutasyon reaksiyonu ile hidrojen peroksit dönüştürülür (Kavas, 1989).

Oksidaz



Benzer şekilde, serbest radikal oluşturan diğer enzimler flavoprotein dehidrogenaz, triptofan dioksijenazdır (Kavas, 1989).

Endoplazmik Retikulum ve Nükleer Membran Elektron Transport Sistemleri

Endoplazmik retikulum ve çekirdek zarında serbest radikallerin oluşturulması zara bağlı olan sitokromların oksidasyonundan kaynaklanmaktadır (Akkuş, 1995; Kavas, 1989). Birçok enzimin katalitik döngüleri esnasında da serbest radikaller oluşmaktadır (Akkuş, 1995).

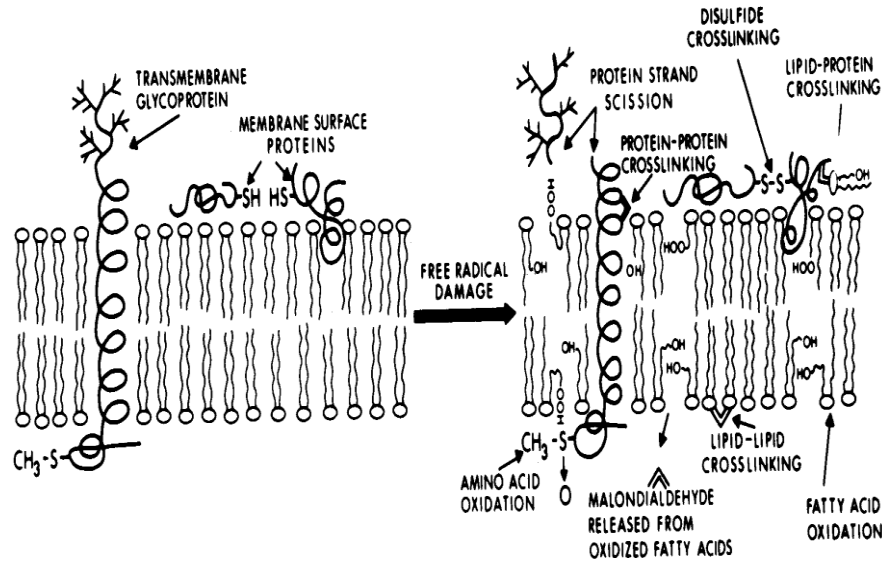
Oluşan serbest radikaller hem intraorganel ve hem de sitozolik reaksiyonları başlatabilmektedirler. Nükleer membrandan açığa çıkan radikaller özellikle DNA'da harabiyete sebep olmaktadır (Kavas, 1989).

Endoplazmik retikulum ve nükleer membranlar aynı elementleri (sitokrom P₄₅₀ ve b₅) içerdiklerinden doymamış yağ asitlerini, ksenobiyotikleri okside edebilir ve dioksijeni indirgeyebilirler (Kavas, 1989; Konukoğlu, 2007). Ayrıca, flavoprotein içeren sitokrom redüktazlar da otoksidasyonla superoksit radikali ve hidrojen peroksit oluştururlar. Mikrozomal ve nükleer membran sitokromları bir elektron transferinin direkt olarak superoksit radikali ya da peroksi-sitokrom komplekslerini çözmesi ile hidrojen peroksit meydana getirebilirler (Kavas, 1989).

Plazma Membranları

Plazma membranı, serbest radikal reaksiyonları açısından oldukça kritik bir yerdir. Ekstrasellüler olarak meydana gelen serbest radikaller hücrenin diğer bileşenleri ile reaksiyona girebilmek için öncelikli olarak ya plazma membranını aşmalıdır ya da toksik reaksiyonlarını mambranda başlatmalıdır. Membranda var olan doymamış yağ asitleri (fosfolipidler, glikolipidler, gliseridler, steroller) ve okside olabilen amino asitleri içeren transmembran proteinleri serbest radikal harabiyetine açıktır. Ayrıca serbest radikaller tarafından başlatılan lipid peroksidasyonu veya yapısal açıdan önemli proteinlerin oksidasyonu, transmembran iyon grandiyentinin bozulmasına, salgılama fonksiyonu kaybına ve birbirine entegre olan hücresel

metabolik süreçlerin inhibisyonuna neden olabilmektedir. (Şekil 1.7) (Freeman ve Crapo, 1982).



Şekil 1.7: Serbest radikallerin membranlar üzerinde zararları (Freeman ve Crapo, 1982)

Serbest radikaller, kısa zincirli yağ açıl türevleri ve malondialdehit üretimine neden olmak suretiyle lipidleri etkileyebilir. Çapraz bağlanma reaksiyonlarının çeşitliliği, malondialdehid reaksiyonlar vasıtasıyla sağlanabilir. Ayrıca serbest radikaller, aminoasit oksidasyonu, protein-protein çapraz bağlanmasını ve protein ipliklerinin ayrılmasını katalize edebilir (Freeman ve Crapo, 1982).

Hidrojen peroksitin membranlardan geçişi neredeyse su kadar kolaydır. Superoksit radikali de membranları geçebilir ve transmembran anyon kanalları aracılığı ile hücre içine ulaşır (Freeman ve Crapo, 1982).

Membran enzimlerinden lipooksijenaz ve siklooksijenaz enzimleri serbest radikal oluşumuna neden olmaktadır. Bu enzimlerin katalize ettiği reaksiyonlar sonucunda prostaglandinler, tromboksanlar, lokötrienler ve anafilaksinin yavaş etkili maddesi sentezlenir (Konukoğlu, 2007). Söz konusu olan enzimlerin substratı olan araşidonik asitin biyolojik olarak güçlü ürünlere dönüşümü sırasında serbest radikaller ortaya çıkmaktadır (Freeman ve Crapo, 1982).

Peroksizomlar

Peroksizomlar yüksek oranda oksidaz içerdiklerinden güçlü bir hücrel hidrojen peroksit kaynağıdır. Bu yapılar, D-amino asit oksidaz, urat oksidaz, L-alfa-hidroksi asit oksidaz ve açıl-KoA oksidazdan çok zengin olup bu enzimler hidrojen peroksit açığa çıkarıcı özelliğe sahiptirler (Kavas, 1989, Konukoğlu, 2007).

1.4.2. Eksojen Kaynaklar

Elektromanyetik radyasyona (x ışınları, gamma ışınları) ve partiküllü radyasyona (elektronlar, protonlar, nötronlar, alfa ve beta partikülleri) organizmanın maruz kalması sonucu primer radikaller açığa çıkmaktadır. Bunlara ek olarak, fotokimyasal hava kirleri, hiperoksia, sigara dumanı ve genel olarak aromatik hidrokarbonlar gibi çok çeşitli çevresel ajanlar da serbest radikallerin meydana gelmesine neden olmaktadır (Kavas, 1989).

1.5. Serbest Radikal Oluşumunda Rol Oynayan Mekanizmalar

Yaşam alanlarımızda sürekli olarak oluşan kimyasal olaylar sonucu serbest radikal oluşmaktadır. Bunun yanı sıra canlı yapısında da hücrel düzeyde serbest radikal üretimi söz konusudur. Radikal oluşturan başlıca mekanizmalar şunlardır (Kılınç ve Kılınç, 2002):

1.5.1. Kovalent Bağların Homolitik Kırılması İle Radikal Oluşumu

Enerjisi yüksek olan elektromanyetik dalgalara ve yüksek sıcaklığa (500-600°C) maruz kalınması ile kimyasal bağlarda kırılmalar meydana gelmektedir. Bu kırılmalar sırasında bağ yapısında bulunan iki elektronun ayrı atom üzerinde kalması durumuna homolitik kırılma denmektedir. Homolitik kırılma sonucu her iki atom üzerinde paylaşılmamış elektron kalmaktadır. Bu durumda da ortaya çıkan ürünler reaktif ürünlerdir (Kılınç ve Kılınç, 2002).

1.5.2. Normal Bir Molekülün Elektron Kaybetmesi İle Radikal Oluşumu

Moleküllerin elektron kaybı esnasında dış orbitallerinde paylaşılmamış elektron kalması durumunda radikal formlar oluşmaktadır. Örneğin, bazı hücrel antioksidanlar (glutatyon, askorbik asit ve tokoferoller gibi) radikalleri indirgemek

amacıyla onlara bir elektron verir ancak kendi radikal formları oluşur. Glutatyonun (GSH) radikalleri indirgerme reaksiyonu sonucu tiyil radikali (GS[•]) meydana gelir (Kılınç ve Kılınç, 2002).

1.5.3. Normal Bir Moleküle Elektron Transferi İle Radikal Oluşumu

İndirgenme reaksiyonu sonucu moleküle elektron aktarıldığında, bu molekülün dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşması durumunda serbest radikal oluşumu gerçekleşir. Örneğin, süperoksit radikali (O₂^{-•}) moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi sonucu oluşmaktadır. Biyolojik sistemlerde en yaygın görülen radikal oluşum mekanizması bu yolla gerçekleşendir. Süperoksit radikali hem enzimatik hem de enzimatik olmayan reaksiyonlarda üretilebilmektedir. Süperoksit radikalının artışı oksijenin diğer radikal türlerinin oluşmasını başlatan bir fonksiyona sahiptir (Kılınç ve Kılınç, 2002).

1.6. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri

Biyolojik ortamlarda oluşan ve difüzyon yarıçapı çok küçük olan serbest radikaller son derece aktif durumdadır. Yapılan çalışmalar, Cl₃C[•] ve HO[•] gibi radikallerin biyolojik ortamlardaki yarı ömürlerinin çok kısa olduğunu göstermektedir. Difüzyon hızları yüksek olan ancak aktivitesi düşük olan radikaller, hücrede hasarlara neden olmamaktadırlar. Serbest radikal oluşumuna neden olan reaksiyonlar genel olarak üç basamaklı zincir reaksiyonlardır. Bu zincir reaksiyonun başlama safhası serbest radikal oluşumunu kapsamaktadır. Başlama safhasını takip eden ilerleme basamağı, ara ürün olarak meydana gelen serbest radikaller üzerinden devam eder. Bu esnada hücre zarar görmeye başlar (Tablo 1.1). İlerleme reaksiyonları radikal yakalayıcılar reaksiyonu sonlandırmadıkça sonsuz devam edebilir. Radikal yakalayıcılar, serbest radikalleri tutamazsa sitotoksikite meydana gelir (Akpoyraz ve Durak, 1995).

Antioksidan savunma mekanizmasının serbest radikaller tarafından aşılması ile çeşitli bozukluklar ortaya çıkmaktadır (Kulaksız, 2009). Hücrelerin önemli bileşikleri olan lipid, protein, DNA ve karbonhidrat başta olmak üzere tüm hücre bileşenlerinin serbest radikaller tarafından etkilenmesi sonucu hücrede yapısal ve metabolik değişiklikler görülmektedir (Akkuş, 1995; Kulaksız, 2009).

Etkilenen Bileşik	Sonuçlar
Doymamış amino asitler ve kükürt içeren aminoasitler	-Protein denaturasyonu -Çapraz bağlanma -Enzim inhibisyonu -Organ ve hücre geçirgenliğinde değişiklikler
Nükleik asitler	-Hücre gelişiminde değişimler -Mutasyon
Karbonhidratlar	-Hücre yüzeyi reseptörlerinde değişimler
Doymamış lipidler	-Kolesterol ve yağ asitlerinin oksidasyonu
Kofaktörler	-Nikotinamid ve flavin içeren kofaktörlerin aktifliğinde azalma
Antioksidanlar	-Askorbat ve porfirin oksidasyonu -Tokoferol ve karoten gibi antioksidanların etkinliğinde azalma
Proteinler	-Denaturasyon -Peptit zincirinde kırılmalar
DNA	-Baz modifikasyonları -Zincirde kırılmalar

Tablo 1.1: Hüresel serbest radikallerin etkilediği moleküller (Akpoyraz ve Durak, 1995)

1.6.1. Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri

Serbest radikallerin aminoasitler ile direkt veya doğrudan etkileşime girmesi sonucu protein yapıları bozulmaktadır (Akkoç, 2008). Doymamış ve sülfür içeren bileşiklerin serbest radikallerle aktivitesi yüksektir. Bu yüzden sistein, metiyonin, tyrozin, histidin, triptofan ve fenilalanin gibi aromatik yapıli aminoasitler oksidasyondan en fazla etkilenen moleküllerdir (Akkoç, 2008; Akpoyraz ve Durak, 1995; Kulaksız, 2009). Oksidasyon reaksiyonları sonucunda proteinlere ait sekonder ve tersiyer yapılarda değişiklikler meydana gelmektedir. Bu değişikliklerin protein fonksiyonları üzerinde olumsuz etkileri vardır. Enzim veya reseptör özellikli zar proteinleri, serbest radikallerin oluşumuna duyarlı olduklarından önemli hüresel fonksiyonlar zarar görmektedir (Akkoç, 2008).

Sitoplazmik ve membran proteinlerinde çapraz bağlanma sonucu moleküler kümeleşme, serbest radikallerin etki etmesiyle meydana gelebilmektedir (Akpoyraz, 2008; Kulaksız, 2009). Yukarıda adı geçen aminoasitlere bağlı olan papain ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz gibi enzimler, serbest radikal etkisi altında kaldıklarında inhibe olmaktadır. Aktivitesi yüksek olan HO[•] radikalleri,

aminoasit yapılarında hidrosilasyon reaksiyonlarının oluşumuna yol açarak yapı ve fonksiyon bozukluklarına neden olurlar (Akpoyraz ve Durak, 1995). Serbest radikaller, proteinlerde moleküler kümeleşme, bölünme, karşı bağ oluşumuna neden olurlar. Serbest radikallerin proteinler üzerinde neden oldukları hasarın derecelendirilmesi aminoasit kompozisyonuna bağlıdır (Kulaksız, 2009).

1.6.2. Serbest Radikallerin Karbonhidratlar Üzerine Etkileri

Karbonhidratlar üzerinde serbest radikallerin önemli etkileri bulunmaktadır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu ile peroksitler ve okzoaldehydler oluşmaktadır. Okzoaldehydler DNA, RNA ve proteinlere bağlanarak antimitotik etki göstermektedirler. Bu şekilde serbest radikaller kanser ve yaşlanma gibi olaylarda rol oynamaktadırlar (Akkuş, 1995).

Fizyolojik koşullarda glikoz, mannoz ve deoksi şekerlerin otooksidasyona uğraması ile hidrojen peroksit ve süperoksit radikalinin oluştuğu bildirilmektedir (Kulaksız, 2009).

1.6.3. Serbest Radikallerin Nükleik Asitler ve DNA Üzerine Etkileri

Canlı hücrelerde normal hücrel metabolizma veya ekzojen kaynaklarla oluşan oksijen türevlerinin, mutagenез, karsinogenез, üreme hücresi ölümü ve yaşlanma gibi biyolojik süreçlerde nedensel bir rol oynadığı düşünülmektedir (Zastawny, 1995). Moleküler oksijen türlerinin aşırı üretimi veya yok edilmemesine bağlı olarak aktive edilmiş formunun artması, DNA yapısında hasara neden olabilir ve böylece mutasyonlara, kromozomal sapmalara ve karsinogenезe neden olabilmektedir (Yılmaz ve ark., 2006).

Reaktif oksijen türlerinin, hücrede saldırdığı önemli makromoleküllerden biri de nükleik asitlerdir (Akkoç, 2008). Radyasyonun her tipi (UV, görünür ışık, ısı ve X ışınları v.b.), hücrelerde serbest radikal oluşumuna yol açmaktadır (Akpoyraz ve Durak, 1995). Nükleotidleri oluşturan purin ve pirimidin bazıları serbest radikallerin nükleik asitler üzerinde etkilerinin görüldüğü alanlardır. Özellikle guanin bazının hidrosilasyonu sonucu DNA'nın yapısı değişmekte ve mutasyonlar görülmektedir (Akkoç, 2008). Serbest radikallerin DNA molekülünü etkilemesi üzerine tek ve çift iplik kırılmalarına, baz dizilerinde değişikliklere ve baz eksilmelerine neden

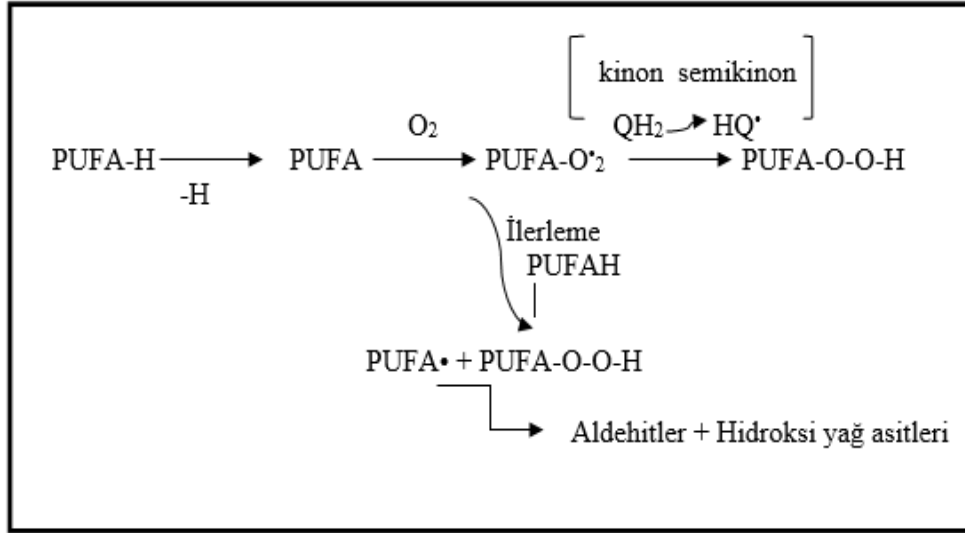
olmaktadır (Koca ve Karadeniz, 2003). Enzimatik radikal yakalayıcılar öncü HO[•] radikallerinin konsantrasyonunu düşürerek DNA'yı korumaktadırlar (Akpoyraz ve Durak, 1995).

1.6.4. Serbest Radikallerin Hücre Zarı ve Membran Lipidleri Üzerine Etkileri

Serbest radikallerin en önemli etkisi lipidler üzerinedir ve bu etki lipid peroksidasyonu olarak adlandırılan bir reaksiyon ile görülmektedir. Aerobik metabolizmanın gereği olarak lipid peroksidasyonu sürekli gerçekleşmektedir (Kulaksız, 2009). Lipid peroksidasyonu, doymamış yağ asitleri, oksijen ve metal katalizörlerinin ortamda bulunduğu durumlarda serbest radikal oluşumuna neden olmaktadır. Lipid peroksidasyonu, biyolojik membranlarda yaygınlaştığında hücre bileşenlerinde ve fonksiyonlarında hasarlar meydana gelmektedir. Hücre sel yapılarında meydana gelen hasar derecesine göre, hücre zarı akışkanlığının ve zar potansiyelinin azalması, membran geçirgenlikte değişiklik, membrana enzimlerinin aktivitesinde azalma gözlenmektedir. Lizozomal ve mitokondrial membranlarıyla ilgili olarak ileri derecede lipid peroksidasyonu sonucu organel içeriğinin hücre içine salınması ile proteoliz hızı artmaktadır ve doku hasarı şiddetlenmektedir (Akkoç, 2008).

Zar yapısında bulunan poliansatüre (doymamış) yağ asitleri, çok sayıda çift bağ içermesi sebebiyle serbest radikal hasarına karşı en hassas olan lipidlerdir (Kulaksız, 2009).

Doymamış yağ asitlerinin bağları, serbest radikallerle reaksiyona girmesi ile peroksidasyona uğramaktadırlar. Bu reaksiyon sonucu lipid peroksitler, lipid alkoller ve aldehit yapılı yan ürünler oluşmaktadır. Üç veya daha fazla sayıda çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyona uğraması ile malondialdehit meydana gelir. Lipidlerin genel peroksidasyon reaksiyonu aşağıda gösterilmiştir (Akpoyraz ve Durak, 1995).



Şekil 1.8: Lipidlerin genel peroksidasyon şeması (Akpoyraz ve Durak, 1995)

Bu tip reaksiyonlarda, radikal başlatıcıların etkisi ile çokludoymamış yağ asitlerinden (PUFAH) H[•] ve PUFA[•] radikalleri oluşur. PUFA radikalinin moleküler oksijen (O₂) ile reaksiyonu sonucunda lipid peroksit ara ürünleri (PUFA-O-O) oluşmaktadır. Radikalik reaksiyon bittiğinde aldehitler ve hidroksi-yağ asitleri ile yağ asidi peroksidasyonu sonucu kısa zincirli bileşikler oluşmaktadır. Bu bileşikler, malondialdehit (OHC-CH₂-CHO), ROOH, RCOOH, RCHO ve ROH yapısında olan, membran geçirgenliği ve membran mikrovizkozitesini büyük ölçüde değiştiren bileşiklerdir (Akpoyraz ve Durak, 1995).

Malondialdehit, membran komponentlerinin çapraz bağlanmasına yol açarak membran iyon geçirgenliğini ve enzim aktivitelerini değiştirmek suretiyle pek çok olumsuz duruma neden olmaktadır. Malondialdehit küçük bir molekül olması sebebiyle kolay difüzlenebilir ve bu sayede DNA bazları ile raksiyona girmektedir. Sebep olduğu olumsuz etkiler, malondialdehite mutajenik, kanserojenik ve genotoksik özellikler vermektedir (Akpoyraz ve Durak, 1995).

1.7. Antioksidanlar

Radikaller, hemen hemen her hücrel bileşene hasar verecek şekilde kararsız bir şekilde reaksiyona girme kapasitesine sahip olduklarından, organizmalarda serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı koruyucu mekanizmalar bulunmaktadır

(Kulaksız, 2009; Young ve Woodside, 2001). Bunlardan bazıları serbest radikal oluşumunu önlerken bazıları da var olan serbest radikallerin zararlı etkilerini önlemektedir (Kulaksız, 2009). Serbest radikalleri yakalama yeteneğinde olan ve serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen veya yavaşlatan moleküllere “antioksidan” adı verilmektedir (Kabel, 2014; Young ve Woodside, 2001). Tanımdan da anlaşılacağı üzere antioksidanların fizyolojik rolü, serbest radikal içeren kimyasal reaksiyonların bir sonucu olarak ortaya çıkan hücresel bileşenlerin hasar görmesini önlemektir (Young ve Woodside, 2001).

Oksidasyon reaksiyonları, hücrelerde hasara yol açan serbest radikal üretimine neden olabilir. Antioksidanlar, ara maddeleri radikaller olan zincir reaksiyonlarda, radikalleri çıkararak oksidasyon reaksiyonlarını kendileri oksitlemek suretiyle reaksiyonları inhibe ederler. Bu sebeple, antioksidanlar genellikle tiyoller veya polifenoller gibi indirgeyici ajanlardır (Kabel, 2014).

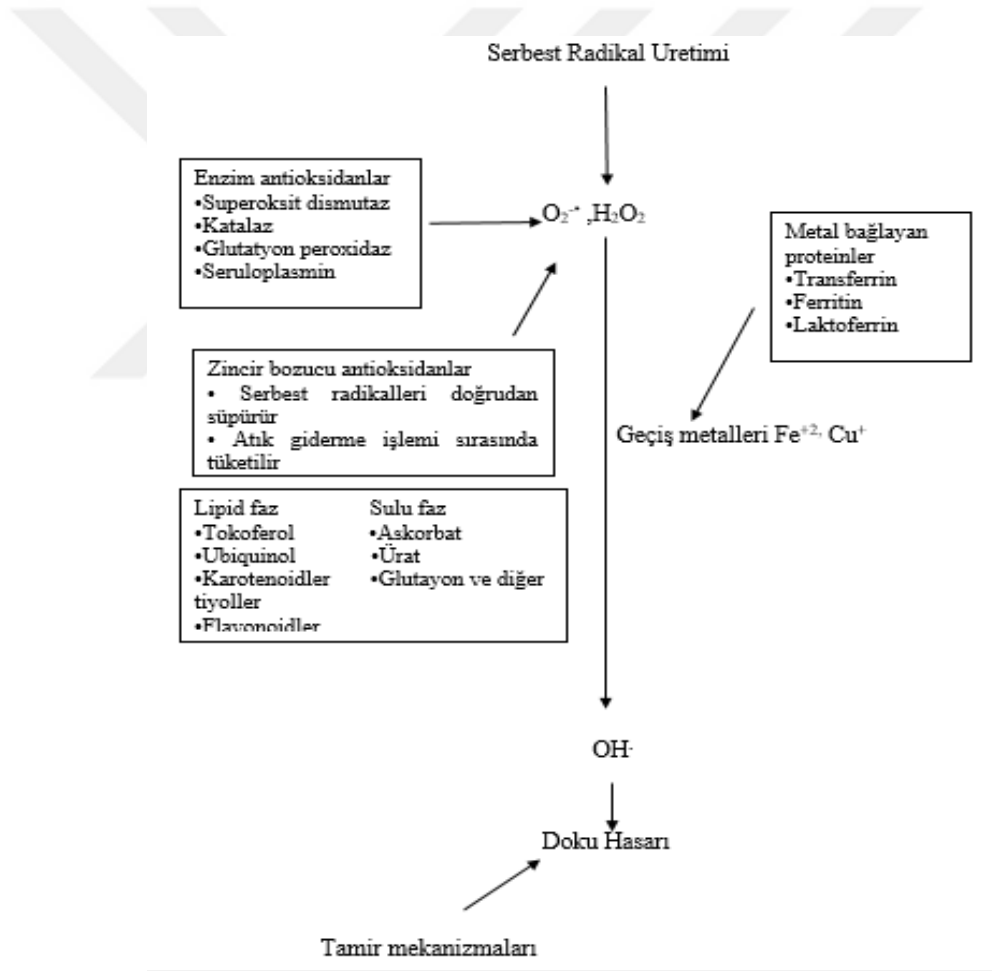
Antioksidan savunma sistemleri serbest radikallerin başlangıçtaki üretimini engellemek, oksidanları temizlemek veya daha az toksik bileşiklere dönüştürmek, toksik metabolitlerin ikincil üretimini bloke etmek, sekonder oksidanların çoğalmasını önlemek, serbest radikaller tarafından indüklenen moleküler hasarı onarmak yoluyla işlev görür. Bu savunma mekanizmaları, vücudu oksidatif stresden korumak için birlikte hareket eder (Kabel, 2014).

Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşmasını önleyenler ve mevcut serbest radikalleri etkisiz hale getirenler şeklinde kategorize edildiği gibi endojen kaynaklı (doğal) ve ekzojen kaynaklı olarak da sınıflandırılmaktadır. Bunların yanında nonenzimatik ve enzimatik antioksidanlar şeklinde de gruplandırılmaktadır (Kulaksız, 2009).

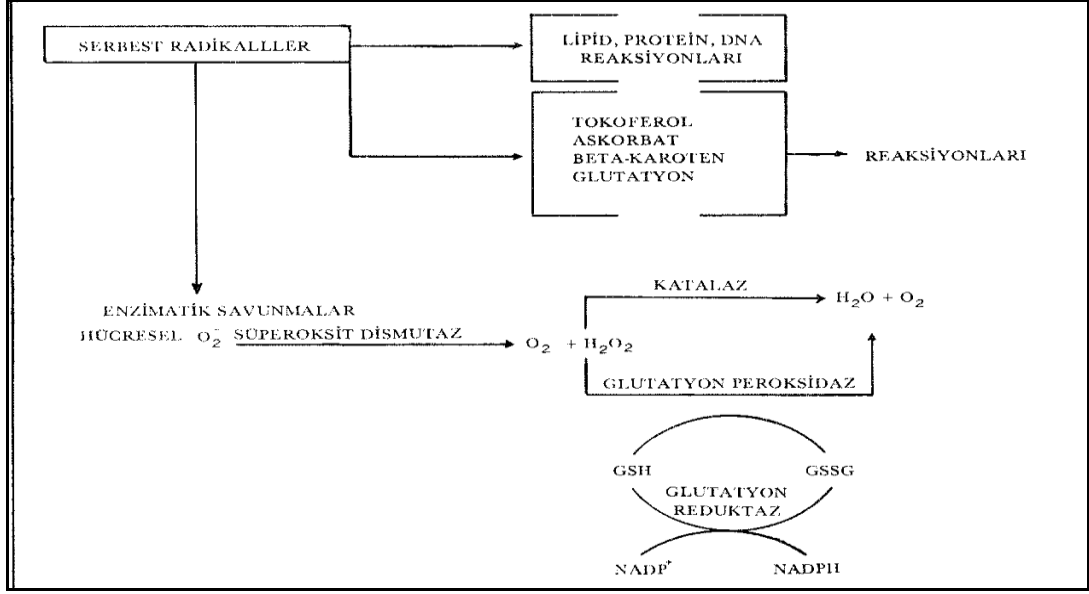
Antioksidan etkisi, günümüze kadar belirlenen mekanizmalar ile görülmektedir. Bu mekanizmalar bağımsız veya birlikte işbirliği yaparak işleyebilmektedir (Kulaksız, 2009):

- 1.** Oksijen ile reaksiyona girmek suretiyle ya da oksijenin yerini alarak bölgesel olarak oksijen seviyesini düşürebilirler.

2. Peroksidasyon başlangıcını önlemek suretiyle hidroksil (OH⁻) radikalının yapısında bulunan atomları, bağ oluşturabilecek yapıdaki ürünleri temizleyebilirler.
3. Doğrudan membran lipidlerine etki ederek peroksit oluşturabilen singlet oksijeni (¹O₂) ortamdaki uzaklaştırabilirler.
4. Metal iyonlarını bağlayarak reaktif grupların veya lipid peroksitlerden peroksil ve alkoksil radikallerinin oluşumunu önleyebilirler. Peroksitleri, alkol gibi nonradikal ürünlere çevirebilirler.
5. Zincir oluşumuna neden olabilen serbest radikallerle reaksiyona girerek yağ asidi zincirlerinden sürekli hidrojen iyonu salınımını engelleyebilirler. Burada, vurgulanması gereken nokta antioksidanların pek çoğunun birden fazla mekanizma ile asıl etkisinin görülebileceğidir (Kulaksız, 2009).



Şekil 1. 9: Serbest radikal saldırısına karşı antioksidan savunmaları (Young ve Woodside, 2001)



Şekil 1.10: Serbest radikal savunma mekanizmaları (Kavas, 1989)

Antioksidan enzimler, genellikle hücre içi ortamda serbest radikal türlerinin parçalanmasını katalize eder. Geçiş metali bağlayıcı proteinler, demir ve bakır gibi geçiş metallerinin hidrojen peroksit ve süperoksit ile reaksiyona giren hidroksil radikalleri ile etkileşimini önler. Zincir bozucu antioksidanlar güçlü elektron vericileridir ve önemli hedef moleküller hasar görmeden öncelikle serbest radikallerle reaksiyona girerler. Bunu yaparken, antioksidan oksitlenmektedir. Bu nedenle rejenere edilmeli veya değiştirilmelidir (Young ve Woodside, 2001).

1.7.1. Enzimatik Antioksidanlar

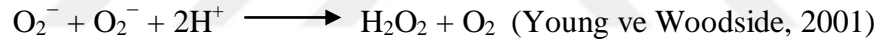
Biyolojik sistemlerde üretilen reaktif oksijen türleri (ROT), antioksidan savunmalarıyla detoksifikasyona uğrar (Üner ve ark., 2005). Vücuttaki tüm hücreler güçlü antioksidan enzimler içerir. Antioksidan enzimlerin üç ana sınıfı süperoksit dismutazlar, katalazlar ve glutatyon (GSH) peroksidazlardır. Buna ek olarak, oksidanlarla reaksiyona giren ve oksitleyicileri detoksife eden çok sayıda özel antioksidan enzim vardır (Kabel, 2014). Bu antioksidan enzimlerin önemli özelliklerinden birisi, oksidatif stres koşulları altında indüklenebilirlik özelliğidir ve bu indüksiyon kirleticilerin neden olduğu strese önemli bir adaptasyon oluşturabilir (Üner ve ark., 2005).

1.7.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutazlar, süperoksit anyonunun oksijen ve hidrojen peroksit'e parçalanmasını katalizleyen bir metalloenzim grubudur (Kabel, 2014; Kulaksız, 2009). Hücrelerin sitosolünde, mitokondrilerinde ve plazmada bulunurlar (Kulaksız, 2009).

Neredeyse tüm aerobik hücrelerde ve hücre dışı sıvılarda bulunurlar. Bakır, çinko, manganez veya demir olabilen metal iyonları içerirler. Ekstraselüler sıvılardaki aktif yerlerinde bakır ve çinko içeren üçüncü bir süperoksit dismutaz formu da bulunmaktadır. Süperoksit dismutaz, bir bozunma reaksiyonunu katalizleyerek oksijeni giderir. Süperoksit dismutaz yokluğunda, bu reaksiyon nonenzimatik olarak, ancak çok yavaş bir hızda gerçekleşir (Kabel, 2014). Süperoksit dismutaz enzimi, süperoksit anyonunun ($\cdot\text{O}_2^-$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene çevrimini katalizleyerek bu serbest radikallerin zararlı etkilerini düşürebilmektedirler (Koca ve Karadeniz, 2003).

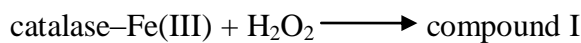
Süperoksit dismutaz, süperoksitin hidrojen peroksit'e dismutasyonunu katalizler:

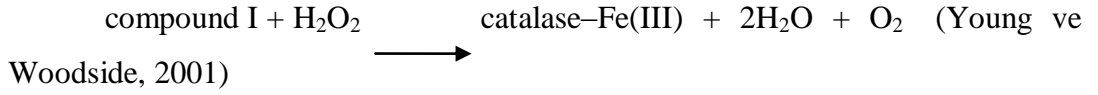


1.7.1.2. Katalaz (CAT)

Redoks reaksiyonlarının oluşumunu teşvik eden en etkili enzimlerden biri katalaz enzimidir. Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi faaliyeti sonucunda meydana gelen toksik hidrojen peroksit (H_2O_2), katalaz enziminin etkisiyle su ve oksijene dönüştürülmektedir (Koca ve Karadeniz, 2003). Katalaz (H_2O_2 oksidoredüktaz), tüm hücre tiplerinde farklı konsantrasyonlarda bulunan dört polipeptit zincirinin tetrameri olup, her biri 500 aminoasit uzunluğunda, her biri bir haem grubu ve bir NADPH molekülü içeren dört protein alt biriminden oluşur (Young ve Woodside, 2001; Kabel, 2014; Kulaksız, 2009).

Katalaz, hidrojen peroksitin su ve oksijene iki aşamalı dönüşümünü katalize eder:





Katalaz, enzimatik aktivitenin iki farklı moduyla katalize edilen reaksiyonlarda hidrojen peroksit (H_2O_2) 'yi parçalayabilir: aktivasyonun katalitik modu ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$) ve peroksidatik aktivite modu ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{AH}_2 \rightarrow \text{A} + 2\text{H}_2\text{O}$). Katalaz alışılmadık bir enzimdir, çünkü hidrojen peroksit tek substratı olmasına rağmen bir pingpong mekanizmasını izler. Burada, onun kofaktörü bir hidrojen peroksit molekülü ile oksitlenir ve daha sonra bağlanmış oksijenin ikinci bir substrat molekülüne aktarılmasıyla rejenere olur (Kabel, 2014).

Katalaz, tüm enzimlerin en yüksek devir hızlarından birine sahiptir ($\sim 10^7 \text{ M} / \text{sn}$) (Kabel, 2014; Young ve Woodside, 2001). Bir katalaz molekülü milyonlarca hidrojen peroksit molekülünü saniyede suya ve oksijene dönüştürür. Katalazın katalitik aktivitesi ile H_2O_2 ayrışımı, birinci derece reaksiyon modeli izler ve hızı H_2O_2 konsantrasyonuna bağlıdır (Kabel, 2014).

Katalaz, tüm prokaryotlarda ve ökaryotlarda bulunur (Kabel, 2014). Katalaz büyük oranda hidrojen peroksit üretebilen enzimlerin çoğunu içeren peroksizom hücrelerinde bulunur. Sitoplazmada ve diğer hücre altı bölümlerdeki katalaz miktarı belirsizliğini korumaktadır, zira peroksizomlar hücrelerin manipülasyonu sırasında kolaylıkla kopar. En büyük aktivite karaciğer ve eritrositlerde bulunur ancak bazı katalazlar tüm dokularda bulunur (Young ve Woodside, 2001).

Katalazın hücre ve dokuları oksidatif strese karşı savunmadaki rolü kapsamlı olarak incelenmiştir. Katalazın aşırı ekspresyonu, hücreleri, H_2O_2 ve oksidan aracılı yaralanma toksisitesine karşı daha dirençli hale getirir (Kabel, 2014). H_2O_2 , biyolojik olarak önemli olan moleküllerin pek çoğuyla reaksiyona girmezken, OH radikali gibi diğer reaktif oksidantların oluşumunda rol oynamaktadır. Peroksidazlar da katalaz enzimiyle aynı etkiye sahiptir (Koca ve Karadeniz, 2003).

1.7.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx)

Glutasyon sistemi glutasyon, glutasyon redüktaz, glutasyon peroksidaz ve glutasyon S-transferazı kapsamaktadır. Glutasyon peroksidaz hidrojen peroksit ve organik hidroperoksitlerin parçalanmasını katalize eden bir enzimdir. Glutasyon S-

transferazlar, lipid peroksitlerle yüksek aktivite gösteren başka bir glutatyon bağımlı antioksidan sınıfıdır. Bu enzimler karaciğerde yüksek seviyededir ve ayrıca detoksifikasyon metabolizmasında yardımcı olurlar (Kabel, 2014).

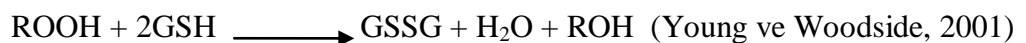
İndirgenmiş glutatyon (GSH) varlığında hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerinin parçalanmasında rol oynayan bu enzim ilk olarak 1957 yılında Mills tarafından keşfedilmiştir. Aktif bölgesinde prostetik grup olarak selenyum bulunur. Membran lipidlerini lipid peroksidasyonunun zararlı etkilerinden korur (Mills, 1957).

Tiyol grupları, enzimatik reaksiyonlar aracılığıyla serbest radikalleri yakalamada rol oynayan hücresel antioksidanlardır. Glutatyon, tiyol grubu taşıyan bir tripeptiddir ve serbest radikallerin yıkıcı etkilerini önleyen veya azaltan transferazlar, peroksidazlar gibi birçok enzimin substratı olarak görev yapmaktadır. Glutatyon, suda çözünebilmekte ve hücrede yüksek miktarda bulunmaktadır. Biyolojik membranları enzimatik olarak lipid peroksidasyonuna karşı korumaktadır (Koca ve Karadeniz, 2003).



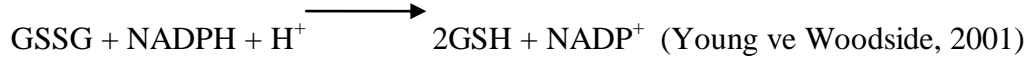
Glutatyon aynı zamanda hücre içinde tekli oksijen ($^1\text{O}_2$), süperoksit anyonu ($\cdot\text{O}_2^-$), hidroksi ($\cdot\text{OH}$) radikalleri gibi birçok zararlı oksidanla enzim katalizi olmaksızın da reaksiyona girmektedir (Koca ve Karadeniz, 2003).

Glutatyon redüktaz (GR), önemli bir hücresel antioksidan sistem olan NADPH-bağımlı mekanizması ile glutatyon disülfid (GSSG) 'yi sulfhidril formuna (GSH) indirgeyen kritik bir enzimdir. GR, NADPH tarafından indirgenen bir proteaz grubu olarak iki FAD molekülünü içeren bir flavoproteindir. GR, termostabil enzimlerden biridir. GR, organizmayı kimyasal ve oksidatif strese karşı koruyan savunma sistemine aittir. Eksikliğinde, eritrosit membranların H_2O_2 'ye duyarlılığının artması nedeniyle hemoliz ile karakterizedir ve birçok hastalığın patogeneğinde anahtar rol oynayan oksidatif strese katkıda bulunur (Kabel, 2014).

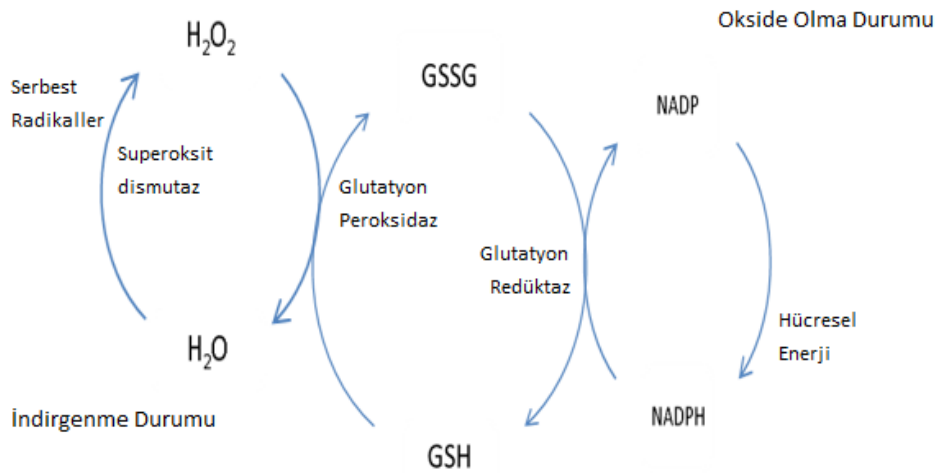


Lipid hidroperoksitleri de dahil olmak üzere diğer peroksitler bu enzimler için alt tabaka olarak da görev yapabilirler ve bu nedenle bu enzimler lipid

peroksidasyonundan kaynaklanan hasarın onarılmasında rol oynayabilir. Hücreler içinde en yüksek konsantrasyonlar karaciğerde bulunur, ancak neredeyse tüm dokularda yaygın olarak bulunur. Enzimin aktivitesi, indirgenmiş glutatyonun sürekli bulunabilirliğine bağlıdır. (Young ve Woodside, 2001):



Azalan glutatyonun tekrar oluşması için gereken NADPH pentoz fosfat yoluyla sağlanmaktadır. NADPH'yi kullanan herhangi bir rekabet yolu (aldoz redüktaz yolu gibi) indirgenmiş glutatyon eksikliğine yol açabilir ve bu nedenle glutatyon peroksidazın etkisi bozulabilir. Glutatyon redüktaz, flavin nükleotid bağımlı bir enzimdir ve glutatyon peroksidazına benzer bir doku dağılımına sahiptir (Young ve Woodside, 2001).



Şekil 1.11: Okside ve redükte glutatyon oluşmasında glutatyon peroksidazın ve glutatyon redüktazın rolü (Urso ve Clarkson, 2003)

1.7.2. Non-Enzimatik Antioksidanlar

1.7.2.1. Glutatyon (GSH)

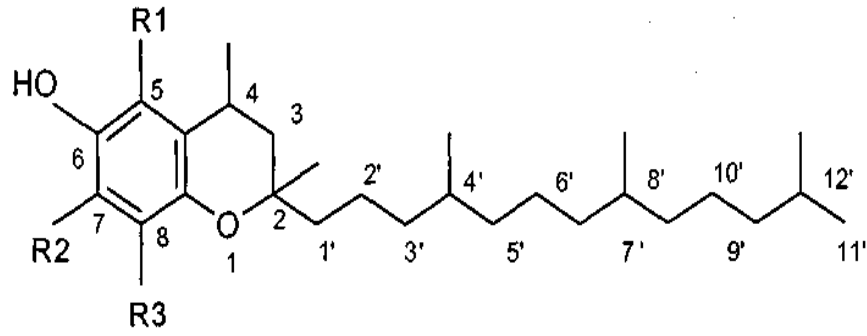
Redükte glutatyon (GSH), aerobik canlıların çoğunda, glutamik asit, sistein ve glisin içeren bir tripeptittir (Kabel, 2014; Kulaksız, 2009). Aktif bir sülfidril (-SH) grubu içerir (Kulaksız, 2009). Sistein tiol grubu indirgeyici bir ajandır, tersine çevrilebilir ve indirgenebilir. Bu sayede glutatyon antioksidan özellik göstermektedir (Kabel, 2014). GSH'nin büyük kısmı karaciğerde, genetik bilgiye

ihtiyaç duyulmaksızın iki aşamada sentezlenmektedir. Önemli bir antioksidan olan GSH, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif strese karşı korur (Kulaksız, 2009; Young ve Woodside, 2001). Glutatyonun en önemli işlevi, enzim ve proteinlerin tiyol gruplarının (-SH) indirgenmesi ile redükte formlarının yeterli düzeylerde kontrolünü sağlamaktır. Tiyol grubu bulduran pek çok enzim düşük hızda okside olarak ya da O₂'nin direkt etkisiyle hızla aktivitelelerini kaybederler. Tiyol gruplarının indirgenerek aktivasyonlarının sağlanması için GSH okside olmaktadır. GSH'nin oksitlenme özelliğinden özellikle H₂O₂'nin elimine edilmesinde faydalanılmaktadır (Kulaksız, 2009). Glutatyon, hücrelerde sentezlendiğinden diyetle almak gerekli değildir. Hücrelerde, glutatyon düşük şekildeki glutatyon redüktaz tarafından korunur ve diğer metabolitleri ve enzimleri azaltır ve doğrudan oksidantlarla reaksiyona girer. Yüksek konsantrasyonunun ve hücrenin redoks durumunun sürdürülmesindeki merkezi rolü nedeniyle, glutatyon en önemli hücresele antioksidantlardan biridir (Kabel, 2014).

1.7.2.2. Vitaminler

Vitamin E (α -tokoferol)

Tokoferoller (α , β , γ , and δ) bir kromanol halkasına ve bir fitil kuyruğuna sahiptir ve halkadaki metil gruplarının sayısı ve konumu farklıdır (Young ve Woodside, 2001). Doğada en yaygın bulunan vitamin E, yağda çözünen ve hücre membranlarındaki en önemli zincir kırıcı antioksidandır (Kulaksız, 2009). Serbest oksijen radikallerine karşı membran lipitlerinde bulunan doymamış yağ asitlerini koruma görevi olan vitamin E çok güçlü bir antioksidandır (Kabel, 2014; Kulaksız, 2009). Antioksidan aktiviteleleri altıncı karbondaki bulunan hidroksil grubundan kaynaklanmaktadır. Vitamin E, peroksil radikali ile reaksiyona girer ve bu radikale bir hidrojen verir. Böylece tokoferoksil radikaline dönüşerek oksitlenir ve protein, lipid, enzim gibi moleküllerin oksitlenmesini engeller. Bu sayede lipid peroksidasyon zinciri kırılır (Kulaksız, 2009).



R1 R2 R3

α-tokoferol	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β-tokoferol	CH ₃	H	CH ₃
γ-tokoferol	H	CH ₃	CH ₃
δ-tokoferol	H	CH ₃	CH ₃

Şekil 1.12: Doğal tokoferol yapıları (Pekiner, 2003)

Antioksidan rolü yanı sıra, E vitamini membranları dengelemek için yapısal bir role de sahip olabilir. Hücrenin membranlarında ve lipoproteinlerde E vitamininin önemli antioksidan fonksiyonu, peroksil radikallerini yakalamak ve lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu kırmaktır. E vitamini, lipid açısından zengin bir ortamda karbon merkezli radikallerin oluşumunu engellemez, ancak ikincil radikaller oluşumunu en aza indirir. α -Tokoferol, tokoferollerin en güçlü antioksidandır ve aynı zamanda insanlarda en bol antioksidandır (Young ve Woodside, 2001).

Vitamin C (Askorbik asit)

Askorbik asit veya vitamin C hem hayvanlarda hem de bitkilerde bulunan bir monosakkarit antioksidandır ancak insanlarda sentezlenemez ve diyetten alınması gerekir. Hücrelerde, glutatyon ile reaksiyona sokularak indirgenmiş halde tutulur. Askorbik asit, hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerini azaltabilen ve böylece nötralize edebilen bir indirgeyici ajandır (Kabel, 2014).

Vitamin A ve E nin aksine vitamin C hidrofildir yani sulu ortamda etkindir. Antioksidan olarak, doğrudan singlet oksijen (O₂[•]) ve hidroksil radikali (OH[•]) çeşitli

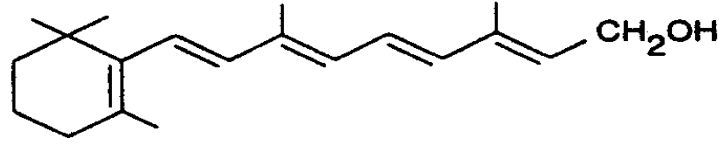
lipid peroksitlerle etkileşir. Vitamin C'nin en önemli fonksiyonu vitamin E radikaline yeniden antioksidan aktivite kazandırmaktır. Diğer suda çözünür antioksidanlara kıyasla, vitamin C plazma lipid peroksidasyonuna karşı en etkili korumayı sağlar (Kulaksız, 2009).

Çoğu durumda, tam enzimatik aktivite elde etmek için metal iyonlarını indirgenmiş biçimde gerektiren enzimler için elektron sağlar. Bilinen en iyi rolü, kollajenin sentezinde prolil ve lisil oksidazların bir kofaktörüdür. Bir enzim kofaktörü rolü yanında, askorbatın diğer önemli fonksiyonu sulu fazda antioksidan kırma anahtar zinciridir. Askorbatın süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali, hipokloröz asit, sulu peroksil radikalleri ve singlet oksijeni inhibe ettiği gösterilmiştir. Antioksidan etkisi sırasında, askorbat, başta semidihidroaskorbil radikaline ve daha sonra da dehidroaskorbate olmak üzere iki elektron indirgeme işlemine tabi tutulur. Semidihidroaskorbil radikali, üç oksijen atomu üzerinde tek bir elektron varlığı ile ilişkili yük dağılımına bağlı olarak nispeten kararludur ve artmış serbest radikal üretimi varlığında vücut sıvıları içindeki elektron spin rezonansı ile kolaylıkla tespit edilebilir. Dehidroaskorbat nispeten dengesizdir ve kolaylıkla oksalik aside ayrıştırılan diketogüloik aside hidroliz eder. Dehidroaskorbatın askorbata indirgenebileceği iki mekanizma tanımlanmıştır; Biri selenoenzim tioredoksin redüktaz vasıtasıyla, diğeri indirgenmiş glutasyonu kullanan enzim aracılı olmayan bir reaksiyontur. Plazmada bulunan Dehidroaskorbat muhtemelen geri dönüşüm öncesinde kırmızı kan hücreleri tarafından hızla alınır, böylece plazmada dehidroaskopat var ise çok az olur (Young ve Woodside, 2001).

Vitamin A

Karotenoidlerin en önemli fizyolojik işlevlerinden biri, hayvanlarda A vitamini öncülü olmalarıdır. Bir karotenoidin A vitamini öncüsü olabilmesi için en az bir terminal β -iyon halkası içermesi gerekir (Şekil 1.13) (Bragadóttir, 2001). Karotenoidler, izoprenoit karbon iskeletine dayanan bir grup lipid çözünür antioksidandır (Young ve Woodside, 2001). Karotenler, doğada yaygın bulunan ve hücre korumasında önemli görevlere sahip olan pigmentlerdir (Kulaksız, 2009). β -karotenin, singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikalini temizlediği ve peroksi

radikalleri ile direkt olarak etkileşerek antioksidan olarak rol oynadığı bildirilmiştir (Kabel, 2014; Kulaksız, 2009).



Şekil 1.13: A vitamini kimyasal yapısı (Bragadóttir, 2001)

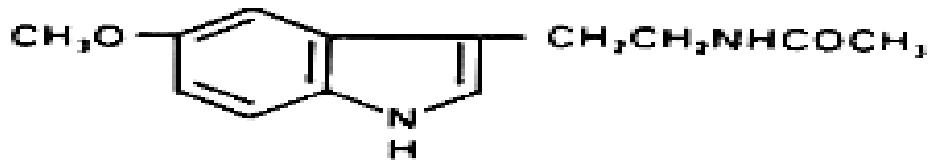
Serbest radikal patoloji açısından, karotenoidlerin en önemli biyolojik fonksiyonları, antioksidan doğası, singlet oksijenlerini söndürme yetenekleri ve bağışıklık tepkilerinin artırılmasında ve mutajenezin inhibisyonunda olası roller gibi gözükmektedir. (Bragadóttir, 2001).

1.7.2.3. Koenzim Q10 (CoQ10)

Koenzim Q10 (CoQ10), mitokondriyal elektron taşıma zinciri Kompleks II'de elektron taşıyıcısı görevi gören bir bileşiktir. CoQ10 yağda çözünebilir bir antioksidandır ve yüksek konsantrasyonlarda O₂'yi temizler (Johansen ve ark., 2005).

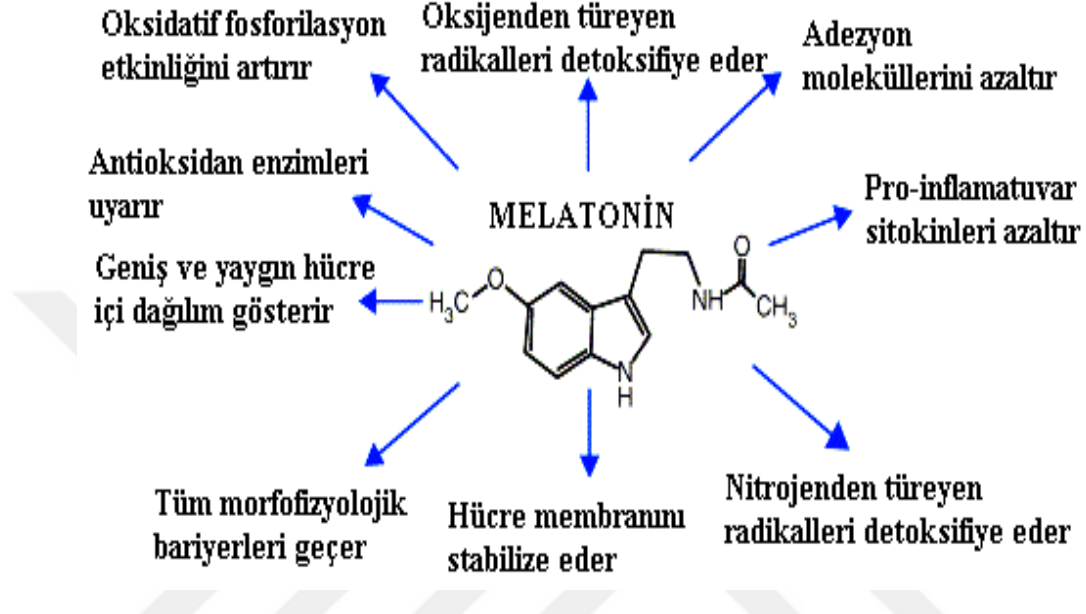
1.7.2.4. Melatonin

Lipofilik özelliğe sahip olan melatonin, hidroksil radikalini yakalayıp ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidandır (Kulaksız, 2009). Melatonin, karanlıkta pineal bezden salgılanan, uyku, üreme ve immünite gibi pek çok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynayan bir hormondur (Yazıcı ve Köse, 2004). Melatonin, epifizde triptofan amino asidinden, serotonin üzerinden sentezlenir (Reiter ve ark., 2000).



Şekil 1.14: Melatoninin (5-Metoksi-N-Asetiltryptamin) kimyasal yapısı (Yazıcı ve Köse, 2004)

Melatonin HO^* , H_2O_2 , 1O_2 , $HOCl$, NO^* , $ONOO^-$ gibi oksidatif strese yol açabilen serbest radikalleri detoksifiye ederek, serbest radikallerin biyomoleküller üzerindeki zararlı etkilerini önler. Farmakolojik düzeylerdeki melatonin, SOD, GSH-Px, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz gibi bazı antioksidan enzimlerin aktivitelerini arttırmak suretiyle oksidatif stresi baskılar (Yazıcı ve Köse, 2004).



Şekil 1.15: Melatoninin sahip olduğu antioksidan özellikler (Yazıcı ve Köse, 2004)

1.8. Balıklarda Reaktif Oksijen Türlerinin Üretimi ve Antioksidan Savunma Sistemi

Pek çok organizma için olduğu gibi balıklar için de oksijen hayati öneme sahip olan bir elementtir. Oksijen, hayati öneme sahip olmasına rağmen, çok tehlikeli toksik formlar olan serbest radikallere de dönüşebilmektedir. Ağır metaller, pestisitler ve çevre kirliliği gibi nedenler, balıklarda serbest radikal oluşumuna neden olmaktadır. Serbest radikallerin sebep olduğu hücresel hasarı önlemek için, tüm canlılar serbest radikal seviyelerini kontrol altında tutmaya çalışırlar (Akbulut ve ark., 2014).

Hücrelerde bulunan karbonhidrat, lipid, protein ve DNA gibi maddelerin oksidasyonunu önleyen veya oksidasyonunu geciktiren maddelere antioksidan adı verilmektedir. Bu olaya da antioksidan savunma denmektedir (Çavdar ve ark., 1997). Hem hayvanlarda hem de insanlardaki antioksidan savunma sistemleri birbirine çok benzemektedir (Akbulut ve ark., 2014). Bağışıklık sistemi

fonksiyonlarının birbirleriyle etkileşim halinde olması ile homeostasis durumu sağlanmaktadır. Bu sistemin çalışması ile normal fizyolojik faaliyetlerin hakim olması durumunu bozacak ani değişimler önlenmektedir (Öğüt, 2010). Organizma oksidatif strese maruz kaldığında antioksidan savunma sistemi, antioksidan enzimlerin sentezini artırarak yanıt oluşturabilmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1999). Antioksidan savunma sistemi, oksidatif stresin ortadan kaldırılmasında etkili olursa dokularda herhangi bir hasar oluşmazken, stresin ortadan kaldırılmasında antioksidan sistemin yetersiz kalması durumunda antioksidan enzimler inhibisyona; proteinler, lipitler, DNA ve diğer temel moleküller oksidasyona uğramaktadır. Böylece, hücre ve dokularda hasar meydana gelmektedir (Reznick ve ark., 1998).

Balıklarda bağışıklık sistemi, enfeksiyon oluşumuna engel olan, oluşan enfeksiyona vücudun karşı koymasını sağlayan faktörleri kapsamaktadır. Bağışıklık sistemi diğer omurgalı canlılarda olduğu gibi balıklarda da spesifik ve spesifik olmayan bağışıklık şeklinde iki kısma ayrılmaktadır. Memelilerle kıyaslandığında balıkların temel savunma mekanizması spesifik olmayan sisteme dayanır. Bu açıdan balıkların güçsüz bir savunma sistemine sahip olduğu düşünülse de spesifik olmayan sistemde yabancı (antijen, bakteri, virüs vs.) tanınmasına ihtiyaç olmaması, çok kısa sürede cevap verilmesi ve nispeten sıcaklığa bağımlı olmadan çalışması gibi avantajlara sahiptir (Atamanalp ve ark., 2013). Balıklarda, bir stres tepkisine neden olabilecek faktörler; fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörler olarak sınıflandırılabilir (Öğüt, 2010):

Fiziksel stres faktörleri; sıcaklık, ışık, ses ve çözünmüş gazlar (Öğüt, 2010).

Kimyasal stres faktörleri; düşük su kalitesi, düşük çözünmüş O₂, optimal olmayan pH, bilinçli veya bilinçsiz meydana gelen kirlilik, diyet içerikleri, nitrojen içerikli atık maddeler (dışkı yada atık yem kaynaklı maddeler) (Öğüt, 2010).

Biyolojik stres faktörleri; diğer balık türleri (rekabet, yer ihtiyacı vs.), mikrocanlılar (patojenik olan ve olmayanlar), makrocanlılar (iç ve dış parazitler) (Öğüt, 2010).

1.9. Gübre Ve Gübreleme

Tohumun çimlenmesinden olgunluk evresinin sonuna kadar bitkinin toprak altı ve toprak üstü organları tarafından alınarak bitkilerde gelişmeyi uyaran maddeler gübre olarak adlandırılmaktadır. Bu maddelerin toprağa veya bitkisel yapılara verilmesi işlemine de gübreleme denmektedir (Danışman ve Bellitürk, 2007).

Gübreler tarımsal üretim sonucunda toprakta azalan bitki besin maddelerini tekrar toprağa kazandıran, toprağın verim gücü ile gıda kalitesini yükselten etkin maddelerdir. Dünya nüfusundaki hızlı artış, beslenme alışkanlıklarının değişmesi sonucu gıda gereksiniminde artış ve ekilebilir alanların azalması durumları, birim alandan daha fazla miktarda bitkisel üretime ihtiyaç duyulmasına neden olmuştur. Bu yüzden gübrelerin tarımın en önemli girdilerinden biri olması kaçınılmazdır. Günümüzde birçok ülke, gelecekteki çıkarlarını göz önünde bulundurarak ulusal gübre endüstrileri kurmuşlardır (Eraslan ve ark., 2010).

1.9.1. Gübrelerin Sınıflandırılması

Doğru miktarlarda kullanıldığı takdirde tarım ürünlerinin verim ve kalitesi üzerinde pozitif etkisi bulunan gübreler doğal ve yapay olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Bu ayrım gübrelerin içeriği olan organik ve inorganik bitki besin maddelerinden kaynaklanmaktadır (Verap ve Ödün, 2016).

1.9.1.1. Organik Gübreler

Organik gübreler, bitkilere gereken azot, fosfor gibi elementleri bitki ve hayvanlardan sağlarlar. Bu gübreler, yavaş etki gösterirler ve bu sayede yeni filiz köklerine zarar vermezler. Organik gübreler yüksek maliyetleri sebebiyle modern tarımda fazla tercih edilmezler (Verap ve Ödün, 2016). Ancak çevre bilincinin yaygınlaşmasıyla organik gübrelere karşı ilginin artması beklenmektedir (Kaçar ve Katkat, 2014). En önemli organik gübreleri, ahır gübresi, kompostlar ve yeşil gübre olarak sıralamak mümkündür (Verap ve Ödün, 2016).

Ahır gübresi olarak adlandırılan organik gübreler, büyük ve küçükbaş hayvanların dışkılarından oluşmaktadır. Bu gübrelerin toprak yapısı ve ürün miktarı üzerine olumlu etkileri bulunmaktadır. Kompost gübreler, bitkisel ve hayvansal kaynaklı

organik atıklardan oluşmaktadır. Bitki sapları, yapraklar, mutfak artıkları gibi atıklar fermentasyona bırakılmak suretiyle kompostlaştırılmaktadır. Yeşil gübre, organik madde oluşumunu sağlamak için yetiştirilen bitkilerin belirli gelişim evrelerinde ve bitki henüz yeşil iken sürülmesiyle toprak altına getirilmesi ile oluşturulmaktadır (Soyergin, 2003).

1.9.1.2. Kimyasal Gübreler

Kimyasal gübreler, modern tarımın en önemli girdilerinden biridir (Haktanır, 2009). Kimyasal gübreler grubunda temel olarak azotlu gübre, fosforlu gübre ve potasyumlu gübre olmak üzere üç tip gübreden bahsedilebilir. Azotlu gübreler, dünya genelinde en fazla tüketilen ve bitkisel üretimde özel yeri olan bir gübre grubudur. 2013'te dünya genelinde tüketilen toplam hektar başına gübre içerisinde % 47.90'lık payıyla azotlu gübreler önemli bir yer işgal etmektedir. Tüketim açısından azotlu gübreleri potasyumlu gübreler (K_2O) ve fosforlu gübreler (P_2O_5) izlemektedir (Şahin, 2016). Kimyasal gübrelerin sıvı ve katı formları bulunmakla birlikte taşıma ve depolama kolaylığı açısından katı haldeki gübreler daha çok tercih edilmektedir. Toprak yapısı ve bitki türüne göre azot, fosfor ve potasyum içeren kimyasal gübreler tercih edilebilir (Verap ve Ödün, 2016).

Azotlu kimyasal gübrelerin yapıtaşı amonyak (NH_3)'tır. NH_3 , amonyum nitrat, sodyum nitrat, kalsiyum nitrat gibi nitratlı gübrelerin üretimi için gerekli ara ürün olan nitrik asit üretiminde kullanılır (Kaçar ve Katkat, 2014).

1.9.2. Kimyasal Gübrelemenin Neden Olduğu Çevresel Sorunlar

Artan kimyasal gübre talebini karşılamak amacıyla kimya endüstrisinin bu yöndeki yatırım hızı artmaktadır (Karaer ve Gürlük, 2003). Dünya genelinde gübre tüketimi yıldan yıla artmakla birlikte, tarımda kullanılan bu gübrelerin sadece %50'si bitkiler için faydalıdır. Geriye kalan %50'lik kısım yıkanma, yüzey akış ve buharlaşma gibi yollarla topraktan uzaklaşarak diğer ortamlara ulaşmaktadır. Bu ortamlarda gübrelerin yol açtığı besin zenginliği, ötrofikasyon veya aşırı nitrat birikimi sonucu sağlık problemlerinin artması gibi sorunlara neden olmaktadır. Bilinçsiz gübre tüketimi çevre sorunlarına neden olurken gıdalardaki bazı karsinogen maddelerin

insan sağlığını olumsuz etkilemesi ve toprakların ağır metal kirlenmesine maruz kalması gibi problemleri de gündeme getirmektedir (Haktanır, 2009).

Kimyasal gübre kullanımının en yaygın çevresel sorunları toprak, hava ve suda oluşan kimyasal kirliliktir (Şahin, 2016). Bilinçsizce kullanılan gübre ve tarım ilaçları, toprak yapısını etkilemesinin yanı sıra özellikle su sistemi ve biyolojik çeşitliliği de olumsuz etkilemektedir (Haktanır, 2009). Aşırı ve yanlış gübre uygulamaları, bitkilerde ağır metal gibi kimi maddelerin birikimine neden olabilmektedir. Fosforlu gübre üretiminde kullanılan fosforlu kayaların bileşiminde bulunan ağır metaller toprak kirliliği riski meydana getirmektedir (Karaçal ve Tfeni, 2010). Ayrıca topraktan azot giderilmesi işlemi yavaş bir süreç olduğundan, gübre kullanımının artışı toprakta azot birikimine de sebebiyet vermektedir (Karaer ve Gürlük, 2003).

Su ekosisteminde oluşan kirlilik, küresel iklim değişiklikleri ve temiz su kaynaklarında artan nüfusun oluşturduğu baskı gibi nedenlerle su ekosistemi açısından kirliliğin kontrolü özellikle önem kazanmaktadır. Fosfatlı gübreler başta olmak üzere kimyasal gübrelerin suya karışması sonucu ortaya çıkan ötrofikasyon zamanla su ekosisteminde çökmeye sebep olmaktadır. Yağış, evaporasyon, sulama gibi işlemler sonuca kimyasal gübrelerin erimesi ile sulara karışan azot bileşikleri de ötrofikasyona neden olmakta ve hava, su, toprakta oluşan nitrat kirliliği ile meydana gelen ciddi çevresel sorunların yanı sıra insan sağlığını da tehdit etmektedir (Nuhoğlu ve ymeni 1993; Şahin, 2016). Özellikle gl ekosistemlerinde alg üretimini kısıtlayan temel besin maddeleri azot ve fosfordur. Bu elementlerin miktarındaki artış aşırı alg üremesine sebep olmaktadır. Zamanla len alglar suyun dibine çökmek ve çürümek suretiyle sularda çözünmüş oksijen seviyesini düşürmektedir. Böylece trofikasyon olayı başlamaktadır. Ötrofikasyonun meydana geldiği su ekosistemlerinde çözünmüş oksijene ihtiyaç duyan canlı türleri yok olmaktadır (Karaçal ve Tfeni, 2010; Nuhoğlu ve ymen, 1993; Savcı, 2012). Bu durum insanların beslenmesinde önemli bir yeri olan su ekosistemlerinden elde edilen besin kaynaklarının azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca su kaynaklarında oluşan nitrat kirliliği, ocuk ve hayvanlarda görülen methemoglobinemia sendromuna neden olmaktadır. Diğer azotlu bileşikler de kanserojen maddeler olan nitrozaminleri oluşturmaktadır. Yine NO₃⁻'n taze olarak tüketilen sebzelerde

birikmesi ile insan sağlığı olumsuz etkilenmektedir (Algan ve Bilen, 2005). Nitrifikasyon ve suni gübreler aracılığıyla toprağa karışan NO₃⁻'n denitrifikasyon bakterileri tarafından redükte edilmesi sonucu azot oksitler hava kirliliğine sebebiyet vermektedir (Algan ve Bilen, 2005; Karaçal ve Tüfenkçi, 2010).

Günümüzde azotlu gübre kullanımının evre üzerine etkileri daha iyi anlaşılmaktadır. Tarım alanlarında bulunan azot drenaj, szlme ve su akşı ile sulara karışmaktadır. Nitrat szlm özellikle gübreleme ve ekim işlemleriyle bağlantılıdır. Bazı kurak ve yarı kurak bölgelerde tarım arazilerinin sulanması ile topraktaki nitrat birikimi buharlaşma ile birlikte artmaktadır. Toprakta bulunan gübreler mikroorganizmalar tarafından nitrifikasyonla nitrata dönüştürülür. Bu sayede negatif yüklü nitrat, yeraltı sularına ulaşabilmektedir. Normal koşullarda bitkiler toprağa uygulanan azotlu gübrelerin %50'sini kullanırken, %2-20'si buharlaşmayla kaybedilir. %15-25'i organik bileşiklerle tepkimeye girer ve kalan %2-10'u yüzey ve yeraltı sularına bulaşmaktadır. Azotlu gübrelerin çoğunluğunun emilimi yoktur ve bu yüzden hem yüzey sularına hem de yer altı sularına bulaşmaktadırlar (Savcı, 2012).

İnsan faaliyetleri sonucu üretilen reaktif azot, küresel azot döngüsünde değişikliklere yol açmaktadır ve endişe verici şekilde vresel etkilere neden olmaktadır (Shindo ve ark., 2006). Gübrelerden kaynaklanan kirlilik kapsamında üzerinde en fazla durulması gereken ve en fazla risk unsuruna sahip olan kirlilik çeşidi sulardaki nitrat kirliliğidir. Çünkü nitrat, tarımsal üretimde kullanılan gübrelerle gün geçtikçe artan miktarlarda kullanılmakta ve toprakta birikmektedir. Biriken bu nitrat koşullara göre değişen miktarlarda yıkanarak toprak derinliğine hareket etmektedir. Toprakta mikroorganizmalar tarafından nitrifikasyonla nitrata dönüşmekte ve nitratın negatif yüklü olması nedeniyle yıkanarak taban suyuna ulaşmaktadır (Sönmez ve ark., 2008). Reaktif azotun çevrede fazla miktarda bulunması, yer altı sularında nitrat kirliliğine, gllerde ötrofikasyona, kıyı bölgelerinde gelgitlere ve azotlu gazların yüksek miktarda çevreye yayılmasına neden olmaktadır (Shindo ve ark., 2006).

1.10. Çalışma Alanı Hakkında Genel Bilgi

Çalışmamızda kullanılan balıklar Kars Çayı'nda yaygın olarak bulunmaktadır ve Kars Çayı'ndan temin edilmiştir.

Allahuekber dağlarından Arpaçay Baraj Gölü'ne kadar uzanan Kars Çayı, Sarıkamış Çayı, Kekeç Çayı, Katranlı Çayı, Bayburt Suyu, Susuz Çayı, Çıldır Gölüyağı, Karahan Çayı ve Tazekent Suyu olarak adlandırılan yan kolların birleşmesi ile oluşmuştur. Uzunluğu yaklaşık 93 km'dir. Kars Çayı, biyolojik çeşitlilik bakımından önemli bir yere sahip olan tipik bir tatlı su ekosistemidir. Kars Çayı, sahip olduğu morfolojik özelliklerden dolayı, özellikle balıklar başta olmak üzere çeşitli türler için uygun bir yaşama ortamıdır. Kars Çayı'nda sıklıkla görülen balık türleri; *Squalius cephalus*, *Luciobarbus capito*, *Carassius gibelio*, *Capoeta capoeta* ve *Silurus glanis*' tir. Çay'da hakim olan tür *Capoeta capoeta* olarak bildirilmektedir. Kars Çayı, yöredeki tarım, hayvancılık ve endüstriyel faaliyetlerden etkilenmektedir. Evsel atıklar, endüstriyel atıklar, gübre ve zirai mücadele ilaçları içeren atıkların Çay'a bulaşması ile kirlilik meydana gelmekte ve Çay'daki ağır metal yükü artmaktadır (Karakuş ve Gey, 2006).

2. MATERYAL VE METOT

2.1. MATERYAL

2.1.1. Hayvan Materyali

Bu çalışmada, ağırlıkları 120-170 g arasında değişen 36 adet *Capoeta capoeta* (Guldenstaedt, 1773) kullanıldı. Balıklar Kars Çayı'ndan yakalandı. Hayvanlar deney süresi boyunca laboratuvar ortamında, 300'er litrelik su tanklarında bekletildi. Çalışmayla ilgili olarak Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan çalışma izni alındı (Karar Sayı No: 2015-068).

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Aletler

- Etüv (Labart, DHG-9140A, Güney Kore)
- Vorteks (IKA, Works Inc, Amerika Birleşik Devletleri)
- Hassas terazi (Precisa, 205A SCS, İsviçre)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- Ayarlanabilir otomatik pipetler (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, Ependorf, Varipette, Almanya)
- Işık mikroskobu (Olympus BX51, Japonya)
- Spektrofotometre (Microplate Reader Epoch)
- Mikrodalga fırın

2.1.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

- TOS (Total Oksidan Status) Kiti (Rel Assay Diagnostics, Clinical Chemistry Solutions, Gaziantep, Türkiye)
- TAS (Total Oksidan Status) Kiti (Rel Assay Diagnostics, Clinical Chemistry Solutions, Gaziantep, Türkiye)
- Etanol (Merck)
- Formaldehit (Merck)
- %33'lük Azotlu Gübre (% 16.5 Nitrat % 16.5 Amonyum) (Yilfert Gemlik A.Ş.)
- SOD1 antibody (Rabbit polyclonal) (Katalog No: GTX100659; Genetex)
- Catalase antibody (Rabbit polyclonal) (Katalog No: GTX110704; Genetex)
- Histostain-Plus Kit (HRP, Broad spectrum) (İnvitrogen)

- DAB Plus substrate (Labvision)

2.2. Metot

2.2.1. Deney Düzenegi

Deney hayvanları,10 gün süreyle ortama adaptasyonları sağlandıktan sonra her grupta 12 balık olmak üzere 3 ayrı grup oluşturuldu. I. gruptaki balıklar normal su ortamında, II. ve III. gruptaki balıklar ise sırasıyla 15 ve 30 mg/L, %33'lük azotlu gübre (% 16.5 Nitrat azot % 16.5 Amonyum azot, YILFERT Gemlik A.Ş.) içeren su ortamlarında 15 gün süreyle bekletildi. Çalışma süresi sonunda biyokimyasal ve immunohistokimyasal çalışmalar için balıklardan kan ve doku örnekleri alındı. Jelli tüplere alınan kan numuneleri +4 °C ve 3000 rpm' de 10 dk santrifüj edilerek serumun ayrılması sağlandı. Elde edilen serumlar analizler yapıncaya kadar -20 °C' de saklandı. Doku örnekleri ise histopatolojik inceleme için fosfat tampon solüsyonu ile hazırlanmış %10'luk formaldehit solüsyonuna alınarak tespit edildi.

2.2.2. Balıklardan Kan Alma

Balıkların kuyruklarından yeterli miktarda kan alabilmek için balıklar canlı iken baş kısmı yukarıda, kuyruk kısmı aşağıda olacak şekilde statife bağlı bir kıskaçla tespit edildi. Balıklar, pedünkül hemoskülatör ile kan damarlarını kapatmayacak şekilde sıkıştırıldıktan sonra keskin bir bıçakla kuyruk tek darbede kesildi ve dorsal aorttan akan kan direkt olarak tüplere alındı.

2.2.3. Biyokimyasal Analizler

Balıklardan alınan serum örneklerinde antioksidan ve oksidan miktarları, Total Antioksidan Status (TAS) Assay Kit ve Total Oksidant Status (TOS) Assay Kit (Rel Assay Diagnostic, Clinical Chemistry Solutions, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü (Erel, 2004; Erel, 2005).

2.2.3.1. Total Antioksidan Seviye (TAS) Ölçümü

Prensip: Bu işlem, mavi-yeşil renkli olan 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonik asit) (ABTS) radikal katyonunun renk kaybı prensibine göre gerçekleşmektedir. Örnekte bulunan antioksidanlar, mavi-yeşil renkli olan ABTS radikalini renksiz ABTS formuna indirgerler. Örnekte bulunan antioksidan miktarı

ile spektrofotometrede 660 nm'deki absorbans değişikliği bağlantılıdır. Trolox Equivalent adı verilen ve E vitamini analogu olan standart antioksidan solüsyonu ile kalibre edilir. Elde edilen sonuçların birimi mmol Trolox Equiv./L olarak ifade edilir.

Kullanılan Reaktif ve Standartlar

Reaktif 1: Test tamponu

Reaktif 2: Renklendirilmiş ABTS

Standart 1: 0.0 mmol Trolox Equiv./L (Kör solüsyonu)

Standart 2: 1.0 mmol Trolox Equiv./L solüsyonu

Metot:

	Absorbans 1 (660 nm)	Absorbans 2 (660 nm)
Standart 1	200 µl reaktif 1 + 12 µl standart 1 Standart 1'in ilk absorbansı	Standart 1 + 30 µl reaktif 2 Oda ısısında 10 dakika ya da 37 °C'de 5 dakika inkübasyon
Standart 2	200 µl reaktif 1 + 12 µl standart 2 Standart 2'nin ilk absorbansı	Standart 2 + 30 µl reaktif 2 Oda ısısında 10 dakika ya da 37 °C'de 5 dakika inkübasyon
Örnek 1	200 µl reaktif 1 + 12 µl örnek Örneğin ilk absorbansı	Örnek 1 + 30 µl reaktif 2 Oda ısısında 10 dakika ya da 37 °C'de 5 dakika inkübasyon

Sonuçların Hesaplanması

$$[(\Delta\text{Abs Std1}) - (\Delta\text{Abs Örnek})]$$

$$\text{Sonuç} = \frac{\quad}{\quad} \times 20$$

$$[(\Delta\text{Abs Std1}) - (\Delta\text{Abs Std2})]$$

$$\Delta \text{ Standart 1'in absorbansı} = (\text{Std 1'in ikinci absorbansı} - \text{Std 1'in ilk absorbansı})$$

$$\Delta \text{ Standart 2'nin absorbansı} = (\text{Std 2'in ikinci absorbansı} - \text{Std 2'in ilk absorbansı})$$

$$\Delta \text{ Örneğin absorbansı} = (\text{Örneğin ikinci absorbansı} - \text{Örneğin ilk absorbansı})$$

2.2.3.2. Total Oksidan Seviye (TOS) Ölçümü

Prensip: Örnekte bulunan oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidine kompleksini ferrik iyonu oksitlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar asidik ortamda xylenele orange ile renkli bir bileşik oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Sonuçlar hidrojen peroksit ile kalibre edilir. Birimi $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L}$ 'dir.

Kullanılan Reaktif ve Standartlar

Reaktif 1: Test tamponu

Reaktif 2: Prokromojen solüsyonu

Standart 1 (Stn 1): Kör solüsyonu (deiyonize su)

Standart 2 (Stn 2): Stabilize edilmiş standart stok solüsyonu (SSSS) ($800 \text{ mM H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L}$)

Metot

	Absorbans 1 (530 nm)	Absorbans 2 (530 nm)
Standart 2	300 μl reaktif 1 + 45 μl standart 2 Standart 2'nin ilk absorbansı	Standart 2 + 15 μl reaktif 2 Oda ısısında 10 dakika ya da 37 $^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika inkübasyon
Örnek 1	300 μl reaktif 1 + 45 μl örnek Örneğin ilk absorbansı	Örnek 1 + 15 μl reaktif 2 Oda ısısında 10 dakika ya da 37 $^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika inkübasyon

Sonuçların Hesaplanması

$$\text{Sonuç} = \frac{(\Delta\text{Abs Örnek})}{(\Delta\text{Abs Std2})} \times 20 \text{ (Std 2 değeri)}$$

$$\Delta\text{Abs Örnek} = \text{Örneğin ikinci absorbansı} - \text{örneğin ilk absorbansı}$$

$\Delta\text{Abs Std2} = \text{Standart 2'nin ikinci absorbanası} - \text{standart 2'nin ilk absorbanası}$

Std 2 değeri = 20 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{Equiv./L}$

2.2.4. Histopatolojik İncelemeler

Deney süreci sonunda her 3 gruptaki balıkların tümünden solungaç, karaciğer ve bağırsak doku örnekleri alınarak fosfat tampon solüsyonu ile hazırlanmış %10'luk formaldehit içerisinde 48 saat tespit edildi. Dokuların tespit işlemini takiben rutin işlemlerden geçirilen doku örnekleri parafin içerisinde gömülme suretiyle parafin bloklar hazırlandı. Parafin bloklardan 5 μ kalınlığında kesitler mikrotomda kesilmek suretiyle elde edilen doku kesitleri rutin işlemlerden geçirilerek hematoksilin-eozin (HE) ile boyandı ve Entallen vasıtasıyla lamel kapatılarak incelemeye hazır hale getirildi. HE boyalı doku kesitleri mikroskopta incelenerek patolojik değişikliklerin varlığı yönünden değerlendirildi.

2.2.5. İmmunohistokimyasal İncelemeler

Dokularda meydana gelen hasarın mekanizmasını araştırmak amacıyla doku hasarında sıklıkla rol alan moleküller olan Katalaz ve Süperoksit dismutaz 1 (SOD1) immunohistokimyasal ekspresyonu araştırıldı. Bu amaçla solungaç, karaciğer ve bağırsak doku örneklerinden hazırlanan parafin bloklardan 4 μ kalınlığında kesitler alınarak Poly-L-Lysine kaplı lamalar üzerine yerleştirildi. Doku kesitleri ksilende deparafinize edilerek %100 den %70'e azalan derecelerde alkol serisinden geçirildi. Endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek amacıyla dokular %3'lük hidrojen peroksit içerisinde 15 dakika tutuldu. Antijenik reseptörlerin açığa çıkarılması amacıyla 0.1 M Sodyum sitrat solüsyonu (pH 6,0) içerisinde mikrodalga fırında doku kesitleri ısıtılma maruz bırakıldı. Spesifik olmayan antikor boyanmasını engellemek maksadıyla non-immun serum ile dokular 30 dakika inkübe edildi. Takibinde doku kesitleri nemlendirilmiş bir kap içerisinde uygulanan boyamaya göre anti-katalaz antikoru (Katalog Numarası: GTX110704; GENETEX) fosfat tampon solüsyonu ile 1: 500 oranında sulandırılmış) veya anti-SOD 1 antikoru (Katalog Numarası: GTX100659; GENETEX) fosfat tampon solüsyonu ile 1: 500 oranında sulandırılmış) ile oda ısısında 1 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Primer antikor ile inkübasyonu takiben kesitler 3 defa fosfat tampon solüsyonu ile

5'er dakika yıkandı. Doku kesitleri biyotinlenmiş sekonder antikor ile 30 dakika muamele edildikten sonra daha önce tarif edildiği üzere fosfat tampon solüsyonu ile yıkandı ve sonrasında horse-radish peroksidase ile 30 dakika inkübe edilerek tekrar fosfat tampon solüsyonu ile yıkandı. Sonrasında Diaminobenzidine/hidrojen peroksit solüsyonu kullanılarak immunohistokimyasal boyanmanın göstergesi olan renk kahverengi oluşumunun olup oluşmadığı gözlemlendi ve renk oluşumu gözlemlendiğinde reaksiyona distile su ile son verildi. Hematoksilen ile zemin boyaması yapılan kesitler rutin işlemlerden geçirilerek Entallen ile lamel kaplanarak mikroskopta incelendi ve fotoğraflandı.

2.2.6. İstatistik Analiz

İstatistik hesaplamalarında, kontrol ve deney gruplarından elde edilen biyokimyasal veriler kullanılarak, gruplar arası ve grup içi verilerde anlamlı değişikliklerin olup olmadığı tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile belirlendi. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma ($X \pm SD$) olarak belirlendi ve $p < 0.05$ istatistiksel farklılığı görüldü.

Hesaplamalar IBM SPSS 20,0 for Windows istatistik paket programı kullanılarak yapıldı.

3. BULGULAR

3.1. Makroskobik Bulgular

Çalışmanın yapıldığı süre içerisinde, kontrol ve deney grubunda bulunan balıkların hareketlerinde ve yem alma isteklerinde herhangi bir değişiklik tespit edilmedi. Balıkların dış yüzeylerinde mukus salgısının artmış olduğu gözlemlendi. Ayrıca 13. günün sonunda 15 mg/L azotlu gübre uygulanan balıklardan 1 adet, 30 mg/L azotlu gübre uygulanan balıklardan 2 adet olmak üzere toplam 3 balığın öldüğü tespit edildi.

3.2. Total Antioksidan Düzeyleri

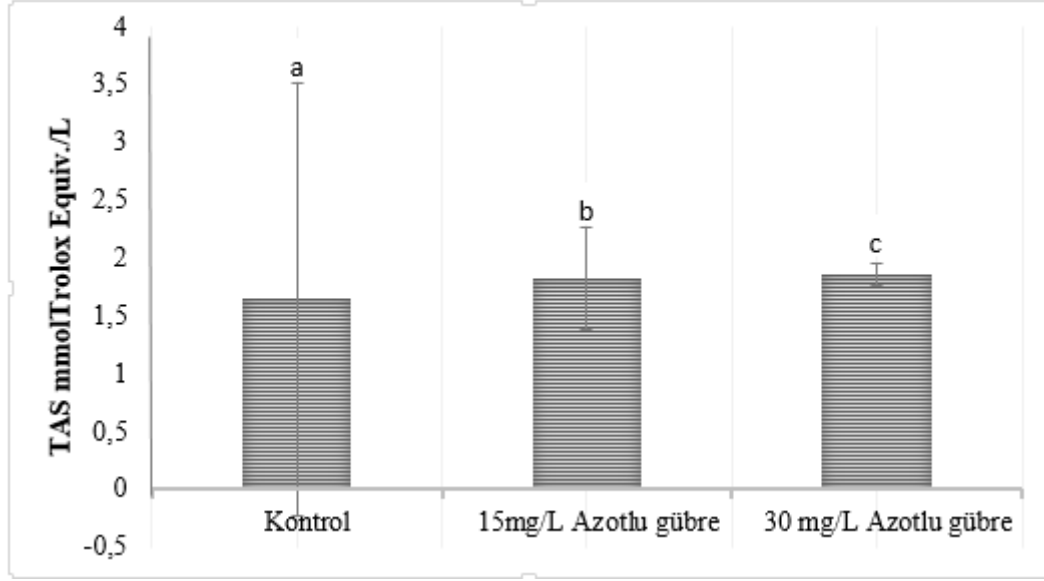
Grupların Total Antioksidan Seviyelerinde (TAS) gözlenen değişimler Tablo 3. 1 ve Grafik 3.1'de gösterilmiştir.

Kontrol grubu, 15 mg/L azotlu gübre uygulanan ve 30 mg/L azotlu gübre uygulanan gruplarda serum TAS düzeyleri karşılaştırıldığında, TAS seviyelerinin istatistiksel olarak 15 mg/L ve 30 mg/L azotlu gübre uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre artmış olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

Gruplar			P
Kontrol n=8	15mg/L Azotlu gübre n=9	30 mg/L Azotlu gübre n=8	
1.65±1.87 ^a	1.83±0.44 ^b	1.86±0.09 ^c	0.003

^{a-b}, ^{a-c} : $p < 0,05$

Tablo3.1: Total Antioksidan Seviyeleri (mmolTrolox Equiv./L)



Grafik 3.1: Total Antioksidan Seviyeleri

3.3. Total Oksidan Düzeyleri

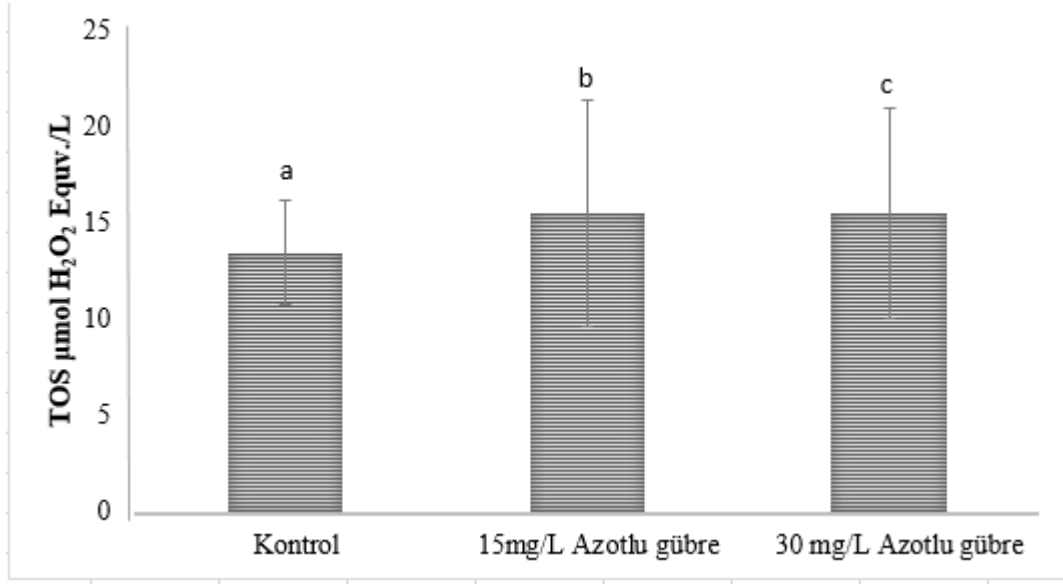
Grupların Total Oksidan Seviyelerinde (TOS) gözlenen değişimler Tablo 3.2 ve Grafik 3.2'de gösterilmiştir.

Kontrol grubu, 15 mg/L azotlu gübre uygulanan ve 30 mg/L azotlu gübre uygulanan gruplarda serum TOS düzeyleri karşılaştırıldığında TOS seviyelerinde meydana gelen değişikliklerin istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlenmiştir.

Gruplar			P
Kontrol n=8	15mg/L Azotlu gübre n=9	30 mg/L Azotlu gübre n=8	
13.48±2.73	15.51±5.83	15.47±5.45	0.639

^{a-b, a-c} : p> 0,05

Tablo 3.2: Total Oksidan Seviyeleri ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equv./L)

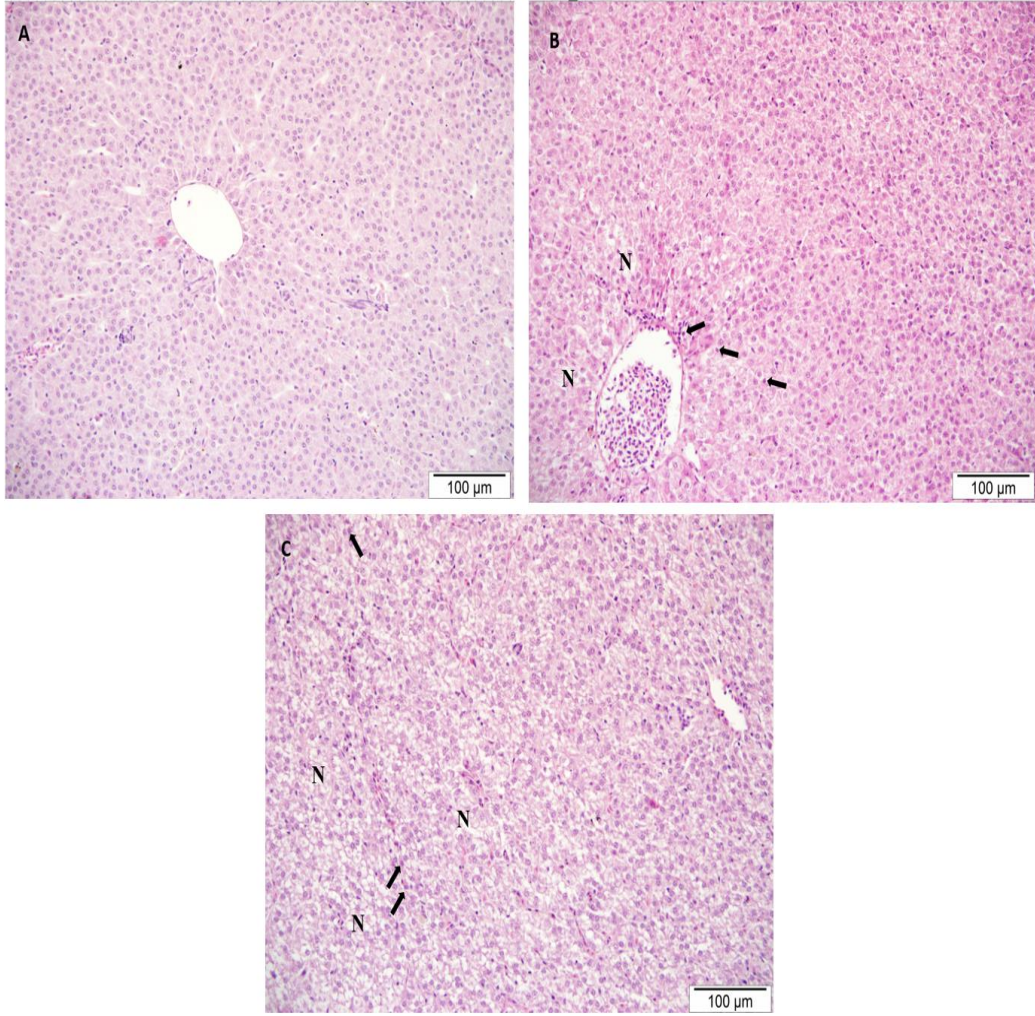


Grafik 3.2: Total Oksidan Seviyeleri

3.4. Histopatolojik Bulgular

Karaciğer Dokusu

Kontrol grubu balıkların karaciğerlerinin normal görünümlü hepatositleri içeren hepatik kordonlara sahip oldukları ve safra kanaliküllerinin normal görünümlü oldukları belirlendi (Şekil 3.1A). Gübre uygulanarak tutulan her iki gruptaki balıkların doku morfolojileri genel olarak birbirlerine benzerlik göstermekteydi. Bu gruplardaki balıkların karaciğerleri incelenen dokular arasında en fazla etkilenen organdı. Karaciğerde orta dereceden şiddetliye değişen derecelerde hasarın olduğu gözlemlendi. Hepatositlerde hidropik dejenerasyonun mevcut olduğu yer yer nekrozların bulunduğu gözlemlendi. Hepatik kordonların dejenerasyona uğrayan alanlarda bozulduğu ve hücresel yapıların doku içerisinde yaygın biçimde yer aldığı gözlemlendi. Genel olarak 30mg/L azotlu gübre uygulanan balıklarda (Şekil 3.1C) gözlemlenen bu değişikliklerin daha şiddetli seyrettiği 15mg/L azotlu gübre uygulanan grupta (Şekil 3.1B) ise ortadan şiddetliye değişen derecelerde olduğu dikkat çekti.

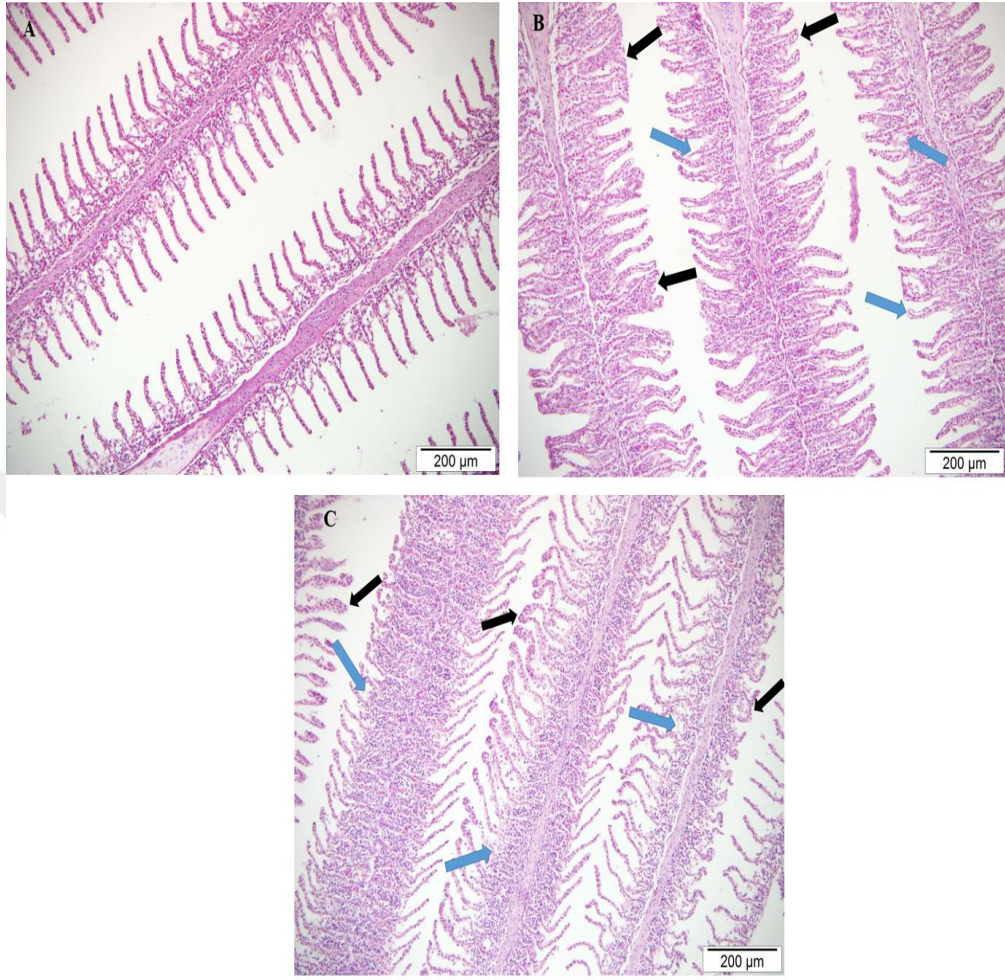


Şekil 3.1: Karaciğer dokusu histolojik kesiti. A) Kontrol Grubu B) 15 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup. Hidropik dejenerasyon (ok), nekroz (N). C) 30 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup. Hidropik dejenerasyon (ok), nekroz (N). H-E, 100µm.

Solungaç Dokusu

Kontrol grubu balıkların solungaçlarında lamellar yapıların normal histomorfolojide olduğu ve hücresel yapıların normal oldukları gözlemlendi (Şekil 3.2A). Gübre uygulanan gruptaki balıkların solungaçlarında değişen derecelerde dejenerasyonlar gözlemlendi. Her iki dozda gübre uygulanan balıkların solungaçlarında gözlemlenen lezyonların şiddeti bakımından ise belirgin bir fark dikkati çekmedi. Bu gruplarda, değişen alanlarda solungaçlarda sekonder lamellaların kütleşerek yer

yer asosiasyonların oluşmaya başladığı, diğer alanlarda ise bazı lamel epitellerinde vakuolleşme ile karakterize değişikliklerin oluştuğu dikkati çekti (Şekil 3.2 B, C).

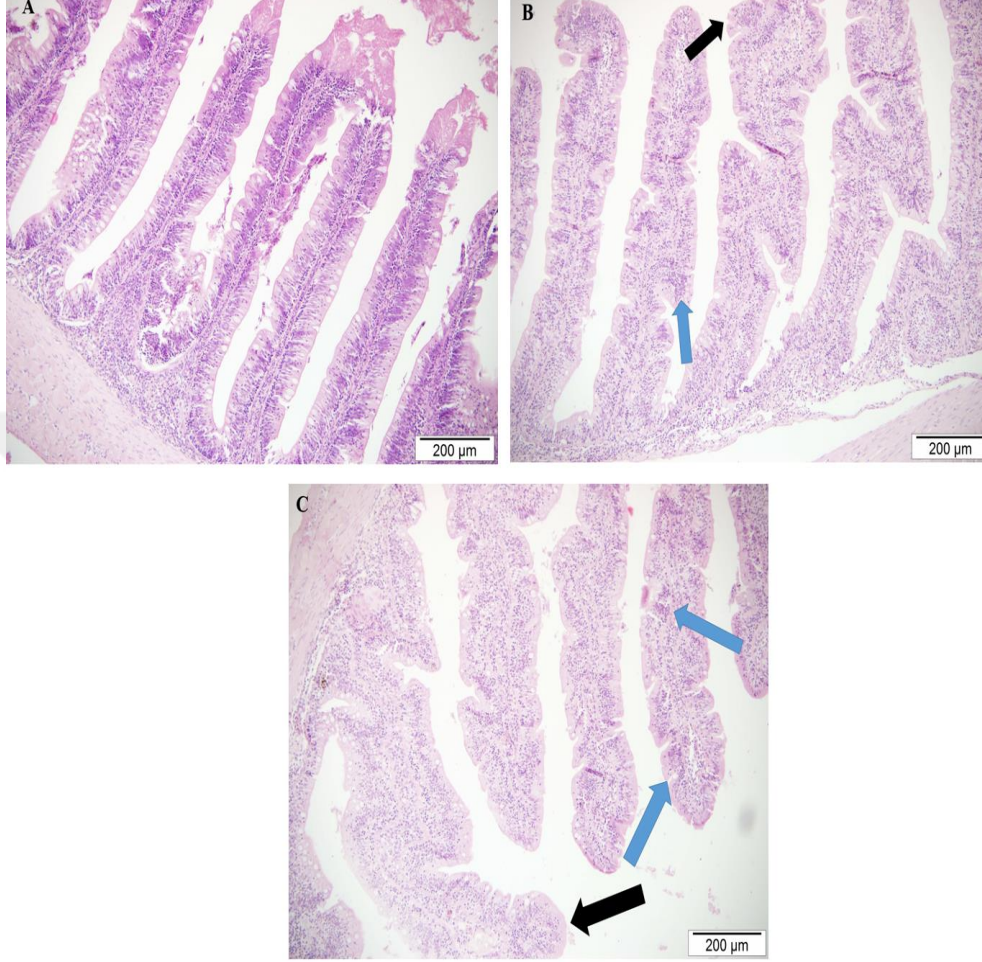


Şekil 3.2: Solungaç dokusu histolojik kesiti. A) Kontrol Grubu B) 15 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup. Sekonder lamellada kütleşme (siyah ok), lamel epitellerinde vakuolleşme (mavi ok). C) 30 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup. Sekonder lamellada kütleşme (siyah ok), lamel epitellerinde vakuolleşme (mavi ok). H-E, 200µm.

Bağırsak Dokusu

Bu balıkların ince bağırsak yapılarının da normal görünümde oldukları, villusların ve enterositler ile goblet hücrelerinin normal morfolojilerde oldukları tespit edildi (Şekil 3.3 A). Gübre uygulaması yapılan balıkların bağırsaklarındaki villuslarda yer yer kütleşmeler olarak boylarının kısaldığı ve genel olarak supranükleer boşluklarda azalmaların mevcut olduğu dikkati çekti (Şekil 3.3 B, C). Lamina propria ise

değişen derecelerde olmak üzere hücre infiltrasyonu gözlemlendi. Enterosit kolumnar epitel hücrelerinde ise belirgin dejeneratif bir değişikliğe rastlanmadı. Her iki gübre uygulanan grup arasında belirgin bir fark belirlenmedi.



Şekil 3.3: Bağırsak dokusu histolojik kesiti. A) Kontrol Grubu B) 15 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup. Villuslarda kütleşme (siyah ok), hücre infiltrasyonu (mavi ok) C) 30 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup. Villuslarda kütleşme (siyah ok), hücre infiltrasyonu (mavi ok) H-E, 200µm.

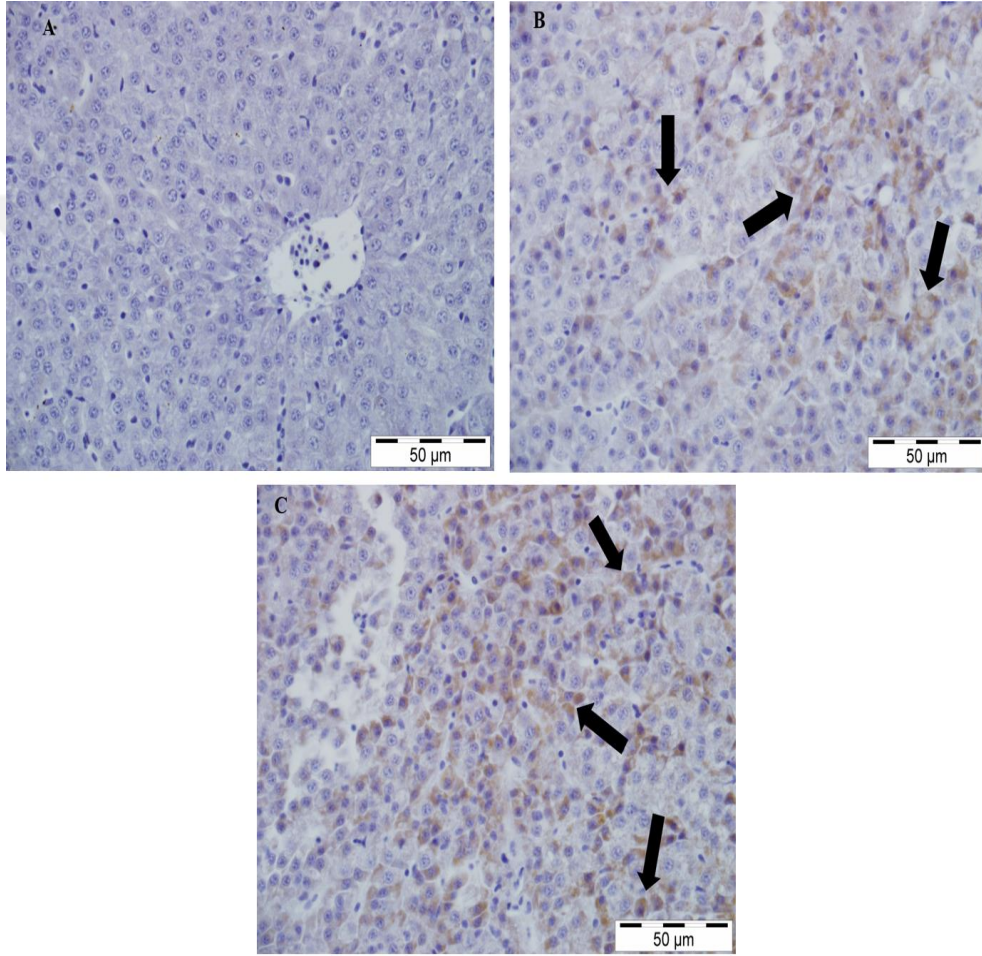
3.5. İmmunohistokimyasal Bulgular

3.5.1. Katalaz İmmunoreaktivitesi

Karaciğer Dokusu

Kontrol grubu balıkların karaciğerlerinde belirgin bir katalaz immunoreaktivitesi gözlemlenmedi (Şekil 3.4 A). Bu gruptaki balıkların karaciğer hepatositlerinde olsun Kupffer hücrelerinde olsun belirgin bir immunoreaktiviteye rastlanmadı.

Hepatositlerde tek tük boyamalar nadiren gözlemlendi. Gübre uygulamasına maruz bırakılan her iki grupta katalaz immunoreaktiviteleri birbirlerine benzerlik göstermekteydi. Bu gruplarda özellikle dejenerasyonun fazla şekillendiği alanlarda immunboyanmalara rastlandı. İmmunboyanmalar vakuoler dejenerasyona uğrayan hepatositlerde bulunmakla birlikte bunlarda genel olarak immunboyanma daha hafif şiddetteydi. Dejenerasyon bulunan alanlarda piknotik çekirdekli hücrelerde ise immunboyanma şiddetli şekilde dikkati çekti (Şekil 3. 4 B, C).

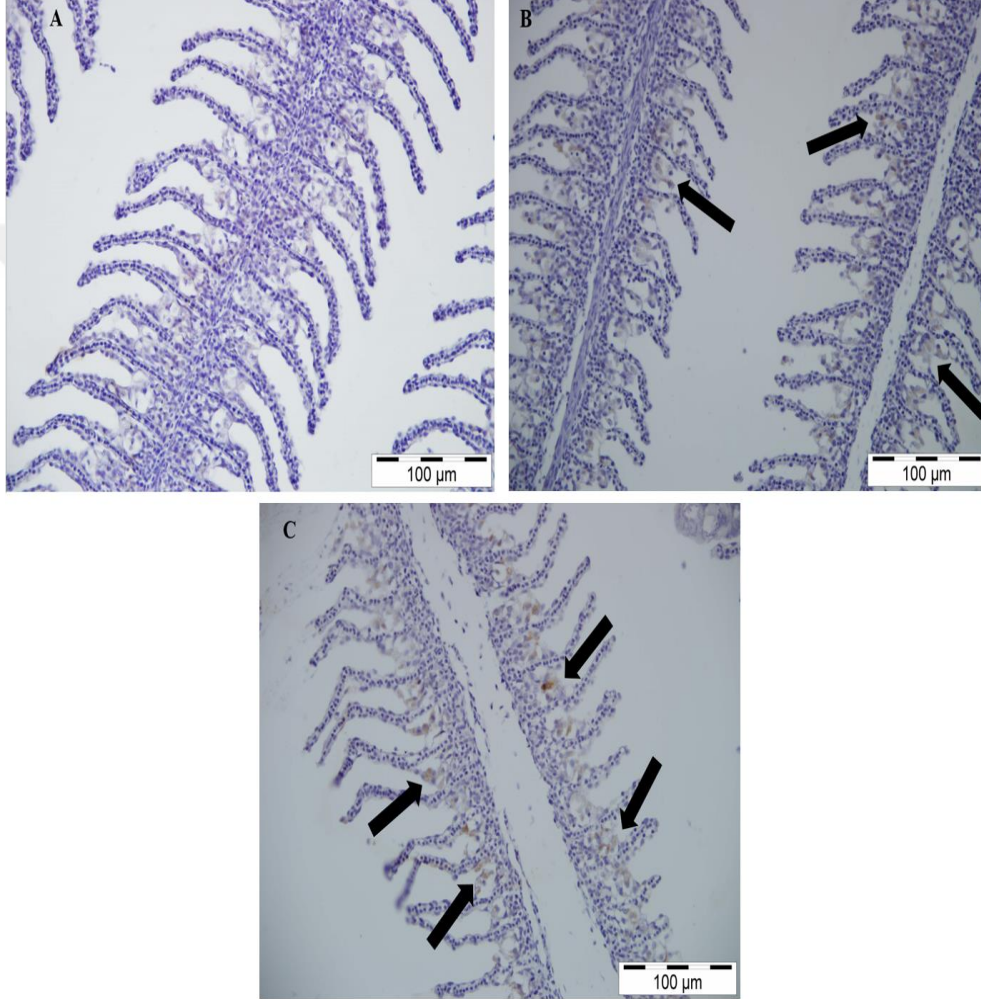


Şekil 3.4: Karaciğer dokusu katalaz immunoreaktivitesi (siyah ok) A) Kontrol Grubu B) 15 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup. C) 30 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup.

Solungaç Dokusu

Kontrol grubu balıkların solungaçlarında belirgin bir katalaz immunoreaktivitesine rastlanmadı (Şekil 3.5 A). Gübre uygulamasına maruz bırakılan balıklarda

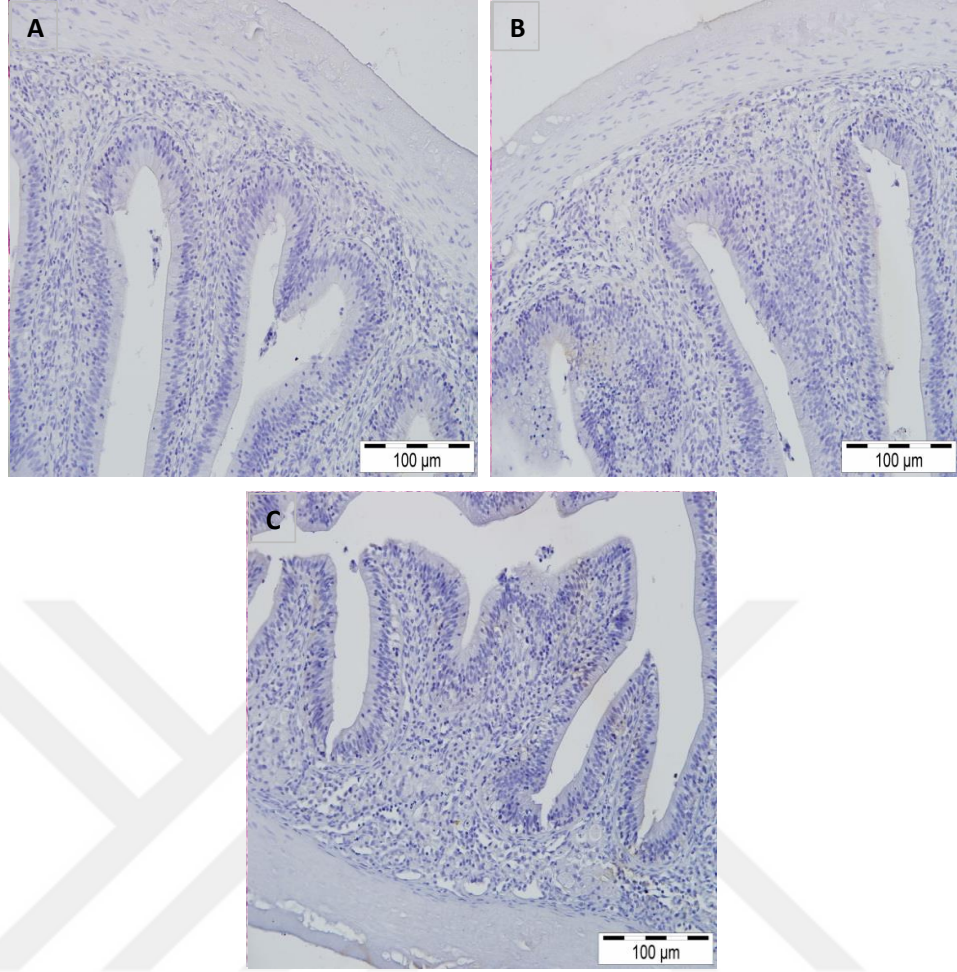
solungaçların sekonder lamel epitel hücrelerinde değişen derecelerde olmak üzere katalaz immunoreaktivitesine rastlandı (Şekil 3.5 B,C). Katalaz immunoreaktivitesi sekonder lamellerin primer lamelleye bağlandığı taban kısımlarına yakın olan bölgelerde belirgin olarak gözlemlendi. Ancak özelleşmemiş hücrelerin bulunduğu primer lamella kısımlarda herhangi bir immunboyanmaya rastlanmadı. Katalaz immunoreaktivitesi genel olarak yüksek doz gübreyle maruz bırakılan balıklarda daha şiddetliydi.



Şekil 3.5: Solungaç dokusu katalaz immunoreaktivitesi (siyah ok). A) Kontrol Grubu B) 15 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup C) 30 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup.

Bağırsak Dokusu

Çalışmada kullanılan üç gruptaki balıkların bağırsak kesitlerinin hiçbirinde belirgin bir katalaz immunoreaktivitesine rastlanmadı (Şekil 3.6 A, B, C).

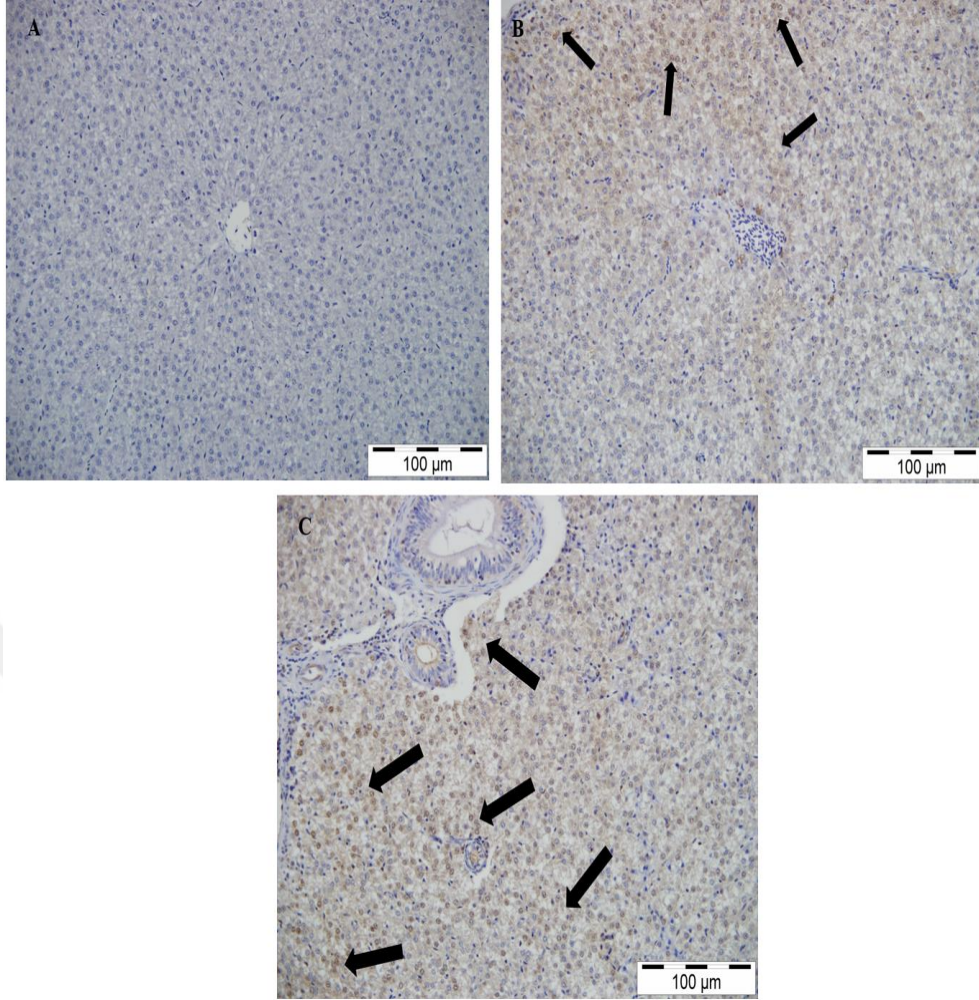


Şekil 3.6: Bağırsak dokusu katalaz immunoreaktivitesi A) Kontrol Grubu B) 15 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup C) 30 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup

3.5.2. SOD1 İmmunoreaktivitesi

Karaciğer Dokusu

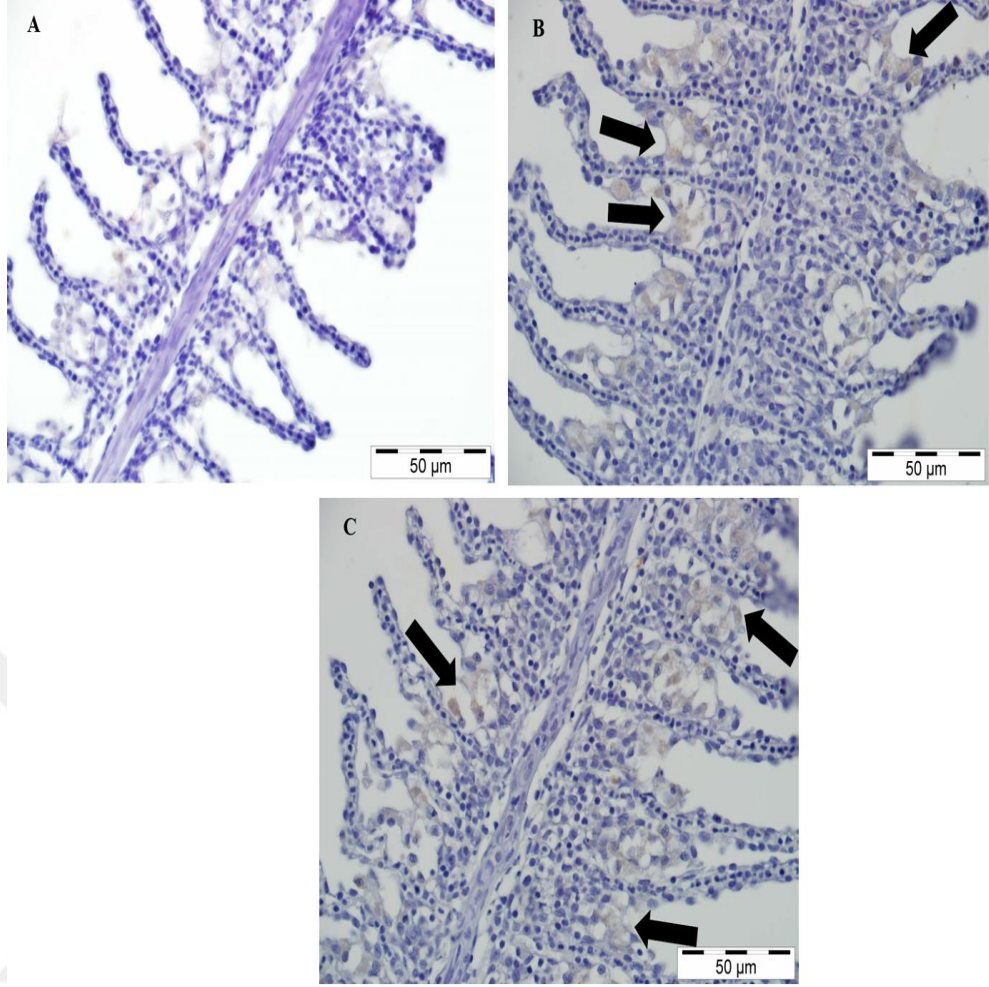
Kontrol grubundaki balıkların karaciğer dokularında SOD1 immunoreaktivitesi gözlemlenmedi (Şekil 3.7 A). Düşük doz gübre uygulaması yapılan grupta belirgin bir SOD1 immunoreaktivitesi gözlemlenmedi. Ancak bu grupta bazı deneklerin karaciğer dokusunda hafif şiddette olmak üzere immunboyanmalara rastlandı (Şekil 3.7 B). Yüksek doz gübre uygulanan balıklarda ise denekler arasında farklar gözlemlenmekle beraber SOD1 immunoreaktivitesi genelde ortadan şiddetli dereceye değişen miktarlarda gözlemlendi (Şekil 3.7 C). SOD1 immunoreaktivitesi bulunan hücrelerde immunboyanmalar çekirdek üzerinde gözlemlendi.



Şekil 3.7: Karaciğer dokusu SOD1 immunoreaktivitesi (siyah ok) A) Kontrol Grubu B) 15 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup C) 30 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup.

Solungaç Dokusu

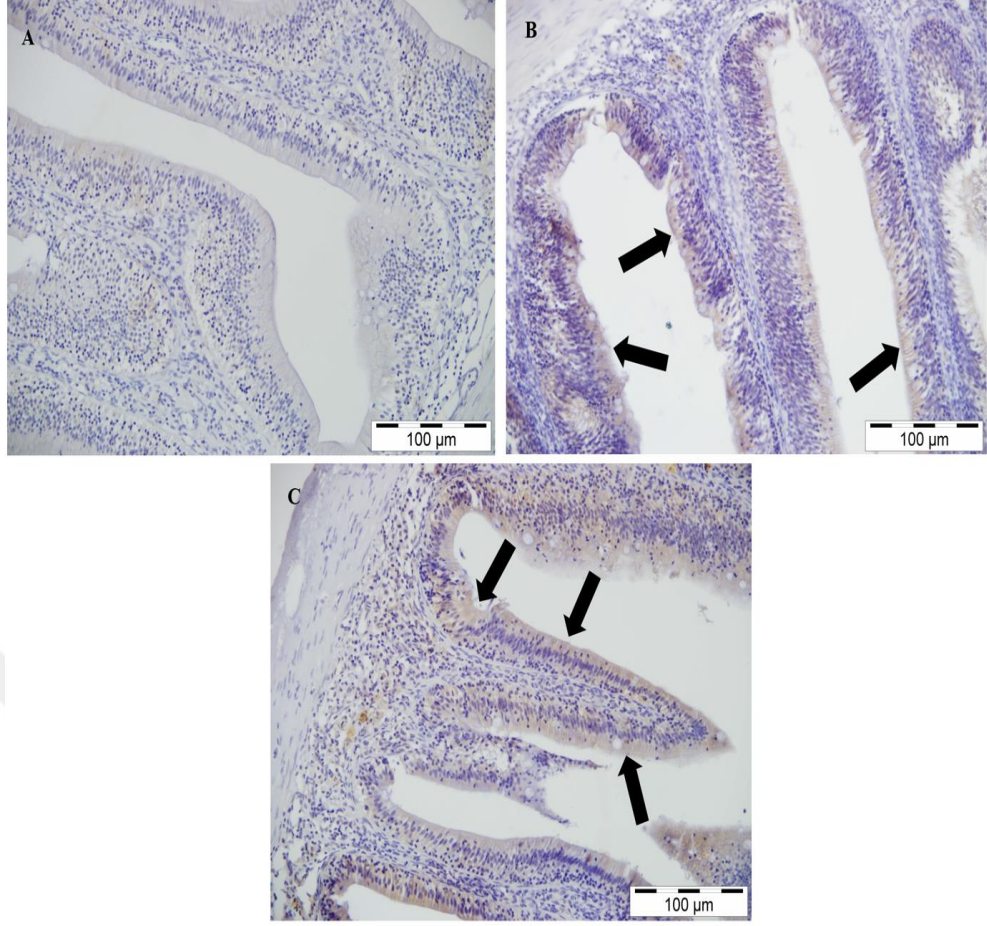
Solungaç dokusunda kontrol grubundaki balıklarda herhangi bir SOD1 immunoreaktivitesi gözlemlenmedi (Şekil 3.8 A). Nadiren bireysel hücre olarak boyanmalara rastlanabildi. Gübre uygulaması yapılan balıklarda SOD1 immunoreaktivitesi birbirine benzerlik göstermekteydi. Bu gruplarda hafif şiddette ve az sayıda olmak üzere bazı sekonder lamella hücrelerinde immunboyanmalara rastlandı (Şekil 3.8 B, C).



Şekil 3.8: Solungaç dokusu SOD1 immunoreaktivitesi (siyah ok) A) Kontrol Grubu B) 15 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup C) 30 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup

Bağırsak Dokusu

Bağırsaklarda SOD1 immunoreaktivitesi kontrol grubu balıklarda gözlemlenmedi (Şekil 3.9 A). Gübre uygulanan bazı deneklerde ise oldukça hafif şiddette olmak üzere enterosit kolumnar hücrelerinde boyanma gözlemlendi (Şekil 3.9 B, C). Diğer deneklerde ise kontrol grubundakilere benzer olarak belirgin bir boyanmaya rastlanmadı.



Şekil 3.9: Bağırsak dokusu SOD1 immunoreaktivitesi (siyah ok) A) Kontrol Grubu
B) 15 mg/L Gübre Uygulanan Grup C) 30 mg/L Azotlu Gübre Uygulanan Grup

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Canlı yapısını oluşturan temel elementlerden biri olan azot elementi, canlı materyalin % 5'ini oluşturmaktadır (Benli, 2006). Aminoasitler yapılarında yüksek oranda azot ihtiva etmektedirler (Svobodova ve ark., 1993). Hayvanlarda azotlu ürünler çeşitli aktivitelerde (boşaltım, osmoregülasyon, yüzme, asit-baz dengesini sağlama gibi) son ürün olarak ortaya çıkmaktadır (Wright, 1995). Su ortamında bulunan azot bileşiklerini azot, organik azot, iyonize olmamış amonyak, amonyum, toplam amonyak, nitrit ve nitrat oluşturmaktadır (Benli, 2006). Sucul ortamda amonyak ve nitrit en toksik azotlu bileşiklerdir (Lawson, 1995). İyonize olmamış amonyak, solungaç membranından kolay bir şekilde geçebildiğinden sucul organizmalar için daha toksik bir bileşiktir. Normal şartlarda su ile doku yüzeyi arasında bir pH dengesi vardır. İyonize olmamış amonyağın artmasıyla bu alanda pH düşüşüyle amonyak solungaç epiteline ve kana, burdan da diğer dokulara ulaşmaktadır (Svobodova ve ark., 1993). Azotlu ürünler farklı hayvan gruplarında boşaltım, asit-baz dengesi, osmoregülasyon ve yüzme yeteneği gibi değişik fizyolojik fonksiyonlarda son ürün olarak görülmektedir (Wright, 1995). Buna ek olarak ortalama % 25 civarında azotlu ürün yemlerle ya da organik ve inorganik gübreler gibi diğer besleyicilerle ortama katılabilmektedir. Bu şekillerde ortama katılabilen azot atıkları birikerek havuzların asimilasyon kapasitesinin üstüne çıkar. Su kalitesinin bozulmasına neden olan bu olay aynı zamanda sucul organizmalar için toksik etki yapmaktadır (Hargreaves, 1998).

Gübre, tarımsal üretimin önemli araçlarından biri olmakla birlikte, yeterli uygulaması yapılmadığında verim ve kalitede düşüklüğe neden olmakta, buna karşın aşırı uygulanması ile özellikle azot ve fosforlu gübrenin yıkanması ile taban ve yüzey sularında kirliliğe, azot oksit (NO, N₂O, NO₂) emisyonu ile hava kirliliğine neden olmaktadır (Atılğan ve ark., 2007). Uygulanan kimyasal gübrelerin belirli bir kısmı bitkiler tarafından kullanılmakta, geriye kalan kısım ise yer altı ve yüzey sularına karışarak insan, bitki ve hayvan sağlığını tehdit ettiği görülmektedir. Ayrıca günümüzde artan gübre ihtiyacını karşılamak için kurulan üretim tesislerinden, çevreye yayılan atık sular da dikkate alındığında, sorunun ne kadar ciddi boyutlarda olduğu görülmektedir. Bu gübreleri üreten tesislerin atık sularındaki amonyum azotu ve nitrat azotu yönetmeliklerde belirtilen miktarların

çok üstünde olduğu görülmektedir (Anonymous, 2004). Yapılan bir araştırmada kış aylarında yetiştiriciliği yapılan ıspanak ve marul gibi bazı bitkilerdeki nitrat içeriğinin sınır değerlerin üzerinde olduğu bildirilmiştir (Karaman ve ark., 2000). Gübre uygulaması yapılmayan çayır mera arazilerinde taban suyunda nitrat miktarı 1mg/ml iken, normal ölçüde gübre uygulanan arazilerde bu değer 31mg/ml'ye kadar çıkabilmektedir. Su ortamında azotun amonyak formuna dönüşmesi balıklarda yaşamı kısıtlayıcı etkiye sahip olmaktadır (Karaman, 2006).

Amonyak, özellikle sucul canlılar için zararlı çevresel bir toksikanttır. Sucul sistemlerde amonyak konsantrasyonu tarımsal faaliyetler ve biyolojik atıkların ayrışması ile artmaktadır (Chezhian ve ark., 2012). Suda amonyak miktarının artması, balığın büyümesinde ve üremesinde azalmaya, serebral enerji metabolizmasında bozukluklara, solungaç, karaciğer, böbrek, tiroit dokusunda zararlara, denge kaybı, koma ve sonunda ölümlere neden olduğu saptanmıştır (Twitchen ve Eddy, 1995).

Canlı sistemine ait tüm bileşenlerin reaktif oksijen türlerine karşı birlikte çalışması antioksidan savunma sisteminin en önemli özelliğidir (Chaudiere ve Ferrai-Iliou, 1999). Bu yüzden tüm antioksidanlar canlıda iç dengenin sağlanmasında hayati öneme sahiptirler (Kaya ve ark., 2014). Bir kısım oksidan ve antioksidanların kanda birlikte çalışması ile tek başına gösterdikleri etkiden daha fazla oksidan ve antioksidan etkisi ortaya çıkmaktadır. Bu sebepten total oksidan/antioksidan dengesinin saptanması için tek tek ölçüm yerine total oksidan (TOS) ve total antioksidan (TAS) ölçümünün daha faydalı olabileceği bildirilmektedir (Erel, 2004; Erel, 2005).

Kanada Ontorio'da gökkuşağı alabalığı çiftliklerinde Nisan-Mayıs aylarında suda amonyak artışı sonucu 48 saat içerisinde 13000 pazarlık balıktan 4000'nin öldüğü bildirilmiştir. Balıklar üzerinde yapılan patolojik inceleme sonucu solungaç lamellalarında telangiektazi görülmüştür (Speare ve Backman, 1988). Pullu sazan balıklarının, 72 saat süreyle farklı amonyak (10, 20 ve 30 mg/L TA-N) miktarlarının uygulandığı bir çalışmada, solungaç, karaciğer ve böbrekler histopatolojik olarak incelenmiştir. Üç organda da hipertrofi ve nekroz gibi doku değişimlerine neden olmuştur. (Yang ve Chun, 1986). Gübre üretiminde kullanılan

bileşikler üzerinde yapılan incelemelerde Cd, Pb, Ni ve As gibi ağır metal konsantrasyonlarının sınır değerlerin oldukça üzerinde olduğu belirtilmiştir (Köleli ve Kantar, 2005). Tarımsal faaliyetler sonucu özellikle fosfatlı gübrelerin yüksek miktarda kullanımı ile kadmiyum su kaynaklarına deşarj edilmekte ve sucul canlılarda birikmektedir (Aslan ve ark. 2012). Kadmiyum kaynaklı karaciğer toksisitesinde oksidatif stresin etkisi önemlidir. Oksidatif stres sonucu açığa çıkan serbest oksijen radikalleri, hücre membran lipid ve proteinlerini yıkarak, hücre membranını sertleştirip hücre fonksiyonunu engelleyerek, nükleer membranı geçip nükleustaki genetik materyale etki edip DNA'yı kırılma ve mutasyonlara açık hale getirerek vücutta ciddi hasarlara neden olabilirler (Aydoğdu ve ark., 2007; El-Sokkary ve ark., 2010). Kadmiyumun oluşturduğu hasarı önlemeye veya ortadan kaldırmaya yönelik yapılan çalışmalar incelendiğinde, kullanılan antitoksik ajanların, antioksidan veya serbest radikal giderici özelliklerinden yararlandığı görülür. Antioksidan savunma sisteminin bozukluğu, kadmiyum bağlı hepatotoksistide kritik bir olay olarak kabul edilir (Wajsbrot ve ark., 1993). Çevrede yaygın olarak bulunan ve gübreler aracılığı ile de bulaşabilen kurşun elementinin canlılarda oksidatif stresi uyardığı bildirilmiştir (Çaylak ve ark., 2007). Ağır metallerin, reaktif oksijen türlerinin üretimi aracılığıyla hücre membranlarında hasara, hücre dejenerasyonu ve ölümüne neden olduğu ifade edilmektedir (Pourahmad ve ark., 2003). Ağır metallerden arseniğin, bitkilerde bulunma oranının su kirliliğine, hava kirliliğine ve gübre kullanımına bağlı olarak değiştiği, ayrıca balıklarda yüksek miktarda biriktiği bildirilmiştir (Ayaz ve Yurttagil, 2008). Ağır metallerle maruz kalma sonucunda yapılan immünohistokimyasal analizlerde ısı şok proteinlerinin ekspresyonunda değişiklikler olduğu göze çarpmaktadır (Tekkeşin ve ark., 2011).

Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) üzerine yapılan bir çalışmada azot uygulaması ile histolojik olarak balığın böbreğinde, deri, solungaçlar, karaciğer ve pankreas dokularında lezyonlar meydana geldiği, epidermiste boşluklu epithelial hücreleri olduğu, mikrokistik dilatasyon, ve mukus hücresinde intrasellüler ödem, karaciğerde şişkinlik ve lenf bezi yapısını kaybetmeyen hepatositlerle birlikte hematopoetik dokuların, böbreğin proximal tubullerinde nekroz ve vakuoler dejenerasyonlar tespit edilmiş ve dolayısıyla da en çok etkilenmiş organların, deri, karaciğer ve böbrek olduğu bildirilmiştir (Çapkin ve ark., 2009). Yine gökkuşığı

alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) 2 saat süre ile 0,1 mg/L NH₃'e maruziyet sonucu lamella yüzeyinin tamamen, filament ve lamella epitelinin ise yüzeysel olarak katlandığı, aynı konsantrasyonda 24 saat sonunda ise filament üzerindeki lamellalarda telangiektazi görülmüştür. 0.5 mg/L NH₃'e maruz kalmış solungaçların lamellalarında daha fazla kıvrılma ve katlanma meydana geldiği, 24 saat sonunda ise epiteldeki deformasyonların daha derin çukurlar şeklinde olduğu gözlenmiştir. Ayrıca mukus ve klorit hücrelerde artma ile mukus hücrelerinde şekil bozukluğu saptanmıştır (Kirk ve Lewis, 1993). Yirmi gün süreyle, yaklaşık 2,5 aylık olan çipura (*Sparus aurata*) yavrularının kullanıldığı kronik toksisite çalışmasında, amonyağın büyüme ve yaşama oranı üzerine etkisi incelenmiştir. 20 günün sonunda 13 mg/L TA-N' a maruz kalan çipura yavrularında ağırlık kazancı kontrol grubuna göre % 39 oranında azaldığı gözlenmiştir. Yaşama oranları ise 15,7 mg/L TA-N' na maruz kalan çipura yavrularında kontrol grubuna göre % 50 oranında düştüğü saptanmıştır. Aynı deneyde araştırmacılar, her amonyak konsantrasyonundan iki balığın solungaç, karaciğer, böbrek ve dalaklarını histolojik olarak incelemiştir. Amonyaga maruz kalan balıklarda karaciğer hücrelerinin merkezinde bir miktar yağ vakuolizasyonu ve hücre sitoplazmasının çoğunlukla granüler olduğunu saptamışlardır. Karaciğer dokusundaki bu lezyonlar 8,2 mg/L TA-N ve 13 mg/L TA-N dozlarında arasında gözlenmiştir. Ayrıca karaciğerde hepatositlerde bir miktar atrofi, sitoplazmada ayrışma ve yağ vakuolasyonu görülmüştür. Solungaç, böbrek ve dalakta ise herhangi bir patolojik bulguya rastlanmamıştır (Wajsbrot ve ark., 1993). Pullu sazan balıklarının solungaç dokuları üzerinde letal ve subletal amonyağın etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, pH 9 ve sıcaklığın 20°C olduğu koşullarda, 96 saat (250-1340 µg/L NH₃) ve 28 gün (30-370 µg/L NH₃) süre ile incelemeler yapılmıştır. 96 saatlik süre sonunda solungaç epitelinde şişkinlik, solungaç dokularında ödemler, telangiektazi, hipertrofi ve hiperplazi olduğu görülmüştür. 28 gün sonunda, 370 µg/L NH₃ konsantrasyonunda ise solungaçlarda hiperemi, telangiektazi ve pillar hücrelerde hasar saptanmıştır (Malik ve ark., 1986). Yine pullu sazan balıklarında, 24 saat amonyak uygulaması sonucu yapılan histopatolojik incelemelerde, solungaç dokusunda hiperemi, ödem ve anevrizma ile karaciğer dokusunda hiperemi, dejenerasyon ve nekrozların yaygın olarak görüldüğü bildirilmiştir (Peyghan ve Takamy, 2002). Pullu sazan balıklarında amonyağın büyüme parametreleri üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada

uygulanan amonyak dozlarının artışı ile büyümenin gerilediği saptanmıştır (Mallet ve Sims, 1994). Sazan balıkları (*Cyprinus carpio*) ile yapılan bir diğer çalışmada, farklı amonyak konsantrasyonlarının balıklar üzerine etkisi araştırılmış ve solungaç lamellerinde füsyon, ödem, hiperplazi, klorit hücrelerinde proliferasyon gibi bulgulara rastlanmıştır (Chezhian ve ark., 2012). Yapılan bir çalışmada *Channa punctatus* (Bloch) bireyleri üzerinde altı aylık bir periyotta 100 ppm ve 500 ppm amonyum sülfat gübresi uygulanmış ve canlıların karaciğer ile tiroid dokuları incelenmiştir. Çalışma sonucunda hepatositlerde degranülasyon, piknotik çekirdek ve fokal nekroz; tiroid foliküllerinde hipertrofi, hiperplazi, hiperemi gözlenmiştir (Ram ve Stahyanesan, 1987). NPK (Azot- Fosfor- Potasyum kompoze) gübresinin uygulandığı *Mystus M. vittatus* (BL.) türünde solungaç dokusu incelenmiş ve sekonder lamellada kütleşme, mukus salgısında artış, solungaç epitelinde parçalanmalar ve gübre uygulanan balıkların 96 saat sonunda %40'nın öldüğü gözlenmiştir (Pande ve Pande, 1988). Yapmış olduğumuz bu çalışmada da suda amonyak konsantrasyonunun artışı ile meydana gelen, karaciğer dokularında nekroz, hiropik dejenerasyon ve hepatik kordon dejenerasyonları, solungaç dokularında sekonder lamellada meydana gelen kütleşmeler ve vakuolleşmeler ile bağırsak dokularında hücre infiltrasyonları ile villuslarda kütleşmelerin daha önce yapılan benzer çalışmalarla uygun olduğu görülmüştür.

Son yıllarda su ortamlarındaki toksisitenin belirlenmesinde balıklar indikatör canlılar olarak kullanılmaktadır. Buna ek olarak tarımda kullanılan kimyasalların insanlar üzerinde etkisi olup olmadığını anlamak için de detoksifikasyon mekanizmalarının benzer olması sebebiyle yine balıklar test canlısı olarak kullanılabilir (Stegeman ve Lech, 1991). Sucul canlılar, insanların besin kaynakları arasında da önemli bir yere sahip olduğundan balıklarda oluşabilecek toksik etkiler özellikle araştırılmaktadır (Kaya ve ark., 2014). Toksik etkilerin araştırılmasında histolojik analizler çok duyarlı parametreler olarak bilinir ve hedef organlarda hücresel değişimlerin belirlenmesinde gereklidir. (Uçar ve Atamanalp, 2009). İmmunohistokimyasal analizler, tüm doku sıvıları, vücut sıvıları ve iğne aspirasyon materyallerinde uygulanır. Bu materyallerdeki hücrelerin özellikle sitoplazmalarındaki intermedier filamentler, mikrotübüller, mikroflamanlar, nöroflamanlar ve hücre zarı reseptör proteinleri incelenir. Bu yapılar antijen kabul edilerek dışarda özel olarak üretilen antikorlar; anahtar-kilit, koenzim-substrat

örneğinde olduğu gibi oluşturulan Antijen-Antikor kompleksi özel boyalar ile boyanır. Yani bu kompleks görülür hale getirilir (Yılmaz, 2007). Dolayısıyla özelde balık popülasyonlarının genelde sucul ekosistemin sağlık durumunu ortaya koymak amacıyla histolojik araştırmaların yapılması oldukça önemlidir. İnsan beslenmesinde önemli yeri olan balıklar kirleticilere maruz kaldıklarında insan sağlığını da tehdit eder duruma gelirler (Uçar ve Atamanalp, 2009).

Biyolojik sistemlerde antioksidan savunmaya katılan farklı enzimler ve enzimatik olmayan bileşikler vardır. Bu enzimlerden SOD, süperoksit anyonunu ($O^{\cdot-2}$) H_2O_2 'ye dönüştürmektedir. CAT, H_2O_2 'yi suya indirgemektedir ve oksijen ile GSH-Px kullanarak hem H_2O_2 'yi hem de organik hidroperoksitleri (ROOH) detoksifiye etmektedir (Ansaldo ve ark., 2000). Balıklardaki karaciğer dokuları, su kirliliğinin diğer organlardan daha çevreci bir göstergesi olarak önerilmektedir (Yılmaz ve ark., 2006). Ortamda toksik maddelerin fazla miktarda bulunması, plazma membranına, hücresel bileşiklere ve enzimlere zarar verirken, reaktif oksijen radikalleri gibi sitotoksik türlerin üretilmesine de neden olmaktadır (Lowry ve ark., 1951). Örneğin; farklı balık türleri üzerinde ağır metal etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, en fazla etkilenen organın karaciğer olduğu, SOD aktivitesinin artarken CAT aktivitesinin azaldığı belirtilmiştir. SOD aktivitesindeki artış, hücrelerin süperoksit radikallerine karşı korunması için daha fazla proteinin gerekli olduğunu, buna karşılık CAT aktivitesindeki bir azalmanın ise hücreleri H_2O_2 'ye karşı koruma yeteneğinin azaldığını göstermektedir (Papagiannis ve ark., 2004). Tarımsal kimyasallardan olan pestisitlerin de sucul canlılar üzerinde oksidatif stresi artırıcı etkileri çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Farklı balık türlerine (*Oreochromis niloticus*, *Cyprinus carpio*) farklı pestisitlerin (2,4-D ve azinphosmethyl) uygulandığı bir çalışmada enzim aktiviteleri araştırılmış ve çalışma sonunda solungaç dokularında SOD aktivitesinin arttığı belirtilmiştir (Oruç ve ark., 2004). *Channa punctatus* türü üzerine pestisit uygulaması yapılarak karaciğer dokularındaki antioksidan enzim aktivitelerinin araştırıldığı bir başka çalışmada katalaz (CAT) aktivitesinin arttığı ve lipid peroksidasyonunun indüklendiği görülmüştür (Sayeed ve ark., 2003). *Oreochromis niloticus* ile yapılan bir araştırmada farklı konsantrasyon ve sürelerde pestisite maruz bırakılan balıklarda CAT ve SOD aktivitelerinde artış olduğu bildirilmiştir (Peixoto ve ark., 2006). Pestisit uygulamasının oksidatif stres ve antioksidan enzimler (SOD, CAT, GR ve

GPx) üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, *Oncorhynchus mykiss* türünün 7 günlük uygulama sonucunda antioksidan savunma sisteminin ortama adaptasyon göstererek cevap verdiği, 20-30 günlük uygulama sürelerinde antioksidan enzimlerde inhibisyon olduğu, daha uzun süreli uygulamalarda ciddi boyutlarda oksidatif hasara yol açtığı gözlenmiştir (Li ve ark., 2010). *Oreochromis niloticus* ile yapılan bir çalışmada paraquat adlı bir herbisit uygulanmış, sonuç olarak SOD aktivitesinde artış olduğu belirtilmiştir (Figueiredo-Fernandes ve ark., 2006). Diazinon isimli bir insektisit *Cyprinus carpio* ve *Oreochromis niloticus* türlerine uygulandığı farklı çalışmalarda, çeşitli dokularda SOD ve CAT aktivitelerinde artış olduğu bildirilmiştir (Durmaz ve ark., 2005; Oruç ve Usta, 2007). *Channa punctata* (Bloch)'nın deltametrin adlı insektisite maruziyeti sonucu, enzimatik olmayan antioksidan yapılarının zarar gördüğü ve glutasyon seviyesinin düştüğü kaydedilmiştir (Parves ve Raisuddin, 2006). *Oncorhynchus mykiss*' e pestisit uygulanan bir diğer çalışma ile balıkların CAT aktivitelerinde düşüş olduğu bildirilmiştir (Dorval ve Hontela, 2003). Çalışmamızda görülen karaciğer, solungaç ve bağırsak dokularında meydana gelen SOD1 immunoreaktivitesi, tarım kimyasallarının neden olduğu oksidan artışına cevap olarak oksidanları parçalamak suretiyle bu dokularda H₂O₂ seviyesini arttırdığını göstermektedir. Ayrıca karaciğer ve solungaç dokularında meydana gelen CAT immunoreaktivitesi, bu dokularda artan H₂O₂'nin parçalanması ile oksidan seviyesini düşürerek, oksidatif strese karşı balıkların cevap verdiği görülmektedir.

Sucul organizmalarda antioksidan sistemlerin içerdiği temel enzim (SOD, GPx, CAT) gruplarının reaktif oksijen türleri üzerinde inhibe edici etkilerinin olduğu ve pestisit gibi toksik etkili kimyasallardan kaynaklanan serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı hücresel sistemi koruyabildikleri ve söz konusu enzimlerin kirlilik çalışmaları ve ekotoksikolojik risk değerlendirmelerinde uygun ve güvenli indikatörler olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Alak ve ark., 2011). Çalışmamızda sularda azotlu bileşiklerin, antioksidan/oksidan denge durumu üzerinde etkisini görmek amacıyla balıklardan alınan kan örnekleri üzerinde TAS ve TOS ölçümleri yapılmıştır. Ölçümler sonucunda TAS seviyesinin kontrol grubuna kıyasla 15 mg/L ve 30 mg/L azotlu gübre uygulanan deney gruplarında artmış olduğu, TOS seviyesinde ise üç grup arasında anlamlı bir fark olmadığı

görülmüştür. Antioksidan enzim seviyelerinde görülen artışın, balıklar üzerinde meydana gelen oksidatif hasarı azalttığı düşünülmektedir.

Çalışmamız ile gübrelemenin sularda amonyak miktarını arttırması sonucu balıkların dokularında olumsuz etkilerinin bulunduğu ve gübre konsantrasyonu artışının balıklarda oksidatif stresi arttırdığı ortaya konmuştur. Uygulanan %33'lük azotlu gübrenin, *Capoeta capoeta*'ya ait karaciğer, solungaç ve bağırsak dokularında histopatolojik dejenerasyonlar, CAT ve SOD1 aktivitelerinde artış, antioksidan seviyelerinde artış olduğunun gözlenmesi, yüksek miktarda kimyasal gübre kullanımının balık gibi sucul organizmalar için toksik hasara yol açtığı ve sistemlerine zarar verdiği gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, tarım uygulamalarında kullanılan kimyasalların etkilerinin sucul canlılar açısından oksidatif stres oluşturduğunu ve bunun ortaya konmasında immuhistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlere başvurulabileceğini de ortaya koymuştur. Tarım uygulamalarında belirlenen yöntemler dışına çıkarak bilinçsiz ve yoğun kimyasal gübre uygulamasının sucul canlıların yaşamında olumsuz etkiye neden olabileceği sonucuna varıldı.

KAYNAKÇA

- Akbulut, C., Kaymak, G., Esmer, H. E., Yön, N. D., Kayhan, F. E., (2014). Balıklarda Ağır Metal ve Pestisitler Tarafından İndüklenen Oksidatif Stres Mekanizmaları. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 31(3), 155-160
- Akkoç, H., (2008). Miyokardiyal İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Dicle Tıp Dergisi*, 35(3), 211-215
- Akpoyraz, M., Durak, İ., (1995). Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 48(02), 253-262
- Akkuş, İ., (1995). Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. *Mimoza Basım, Yayın ve Dağıtım A.Ş.*, Konya
- Alak, G., Sönmez, A. Y., Hisar, O., (2011). Bazı Pestisitlerin Balıkların Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkileri. *Journal of the Faculty of Agriculture*, 42(1),91-93
- Algan, F. T. K., Bilen, S., (2005). Toprak Kirlenmesi ve Biyolojik Çevre. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 36(1), 83-88
- Anonymous, (2004). Türkiye Çevre Atlası. Çevresel Etki Değerlendirmesi ve Planlama Genel Müdürlüğü Çevre Envanteri Dairesi Başkanlığı, Ankara
- Ansaldo, M., Luquet, C. M., Evelson, P. A., Polo, J. M., Llesuy, S., (2000). Antioxidant Levels from Different Antarctic Fish Caught Around South Georgia Island and Shag Rocks. *Polar Biology*, 23(3), 160-165
- Aslan, N., Köse, E., Tokatlı, C., Emiroğlu, Ö., Çiçek, A., (2012). Katı Atık Depolama Sahalarının Sucul Sistemlere Etkileri: Yedigöller-Kütahya Örneği. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 2(1), 20-26
- Atamanalp, M., Bayır, A., Sirkecioğlu, A. N., Cengiz, M., (2003). Bir Dezenfektanın (Malahit Yeşili) Subletal Dozlarının Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Kan Parametreleri Üzerine Etkileri. *Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, (23)3, 177-187
- Atamanalp, M., Uçar, A., Alak, G., (2013). Balıkların Bağışıklık Sistemi Üzerine Çevresel Toksikantların Etkileri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 6(1), 124-127

- Atılgan, A., Coşkan, A., Saltuk, B., Erkan, M., (2007). Antalya Yöresindeki Seralarda Kimyasal ve Organik Gübre Kullanım Düzeyleri ve Olası Çevre Etkileri. *Ekoloji*, 15,62, 37-47
- Ayaz, A., Yurttagil, M., (2008). Besinlerdeki Toksik Öğeler II. Sağlık Bakanlığı Yayın, Ankara, 40
- Aydoğdu, N., Erbaş, H., Kaymak, K., (2007). Taurin, Melatonin ve N-Asetilsisteinin Kadmiyuma Bağlı Akciğer Hasarındaki Antioksidan Etkileri. *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 24:43-48
- Bahorun, T., Soobrattee, M. A., Luximon-Ramma, V., Aruoma, O. I., (2006). Free Radicals and Antioxidants in Cardiovascular Health and Disease. *Internet Journal of Medical Update*, 1(2), 25-41
- Benli, A.Ç.K., (2006). Subletal Amonyak Konsantrasyonlarının Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) ve Sazan (*Cyprinus Carpio*) Balıklarında Büyüme ve Kan Parametreleri İle Dokulara Etkisi. Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 1-216
- Boveris, A., Chance, B., (1973). The Mitochondrial Generation of Hydrogen Peroxide. General Properties and Effect of Hyperbaric Oxygen. *Biochemical Journal*, 134(3), 707-716
- Bragadóttir, M., (2001). Endogenous Antioxidants in Fish. A Literature Review Submitted in Partial fulfilment of the requirements for the degree of Master of Science in Food Science. Department of Food Science. University of Iceland. Reykjavik
- Chaudiere, J., Ferrai-Iliou, R., (1999). Intracellular Antioxidants: From Chemical to Biochemical Mechanism. *Food and Chemical Toxicology*, 37: 949- 962
- Chezian, A., Senthamilselvan, D., Kabilan, N., (2012). Histological Changes Induced by Ammonia and pH on the Gills of Fresh Water Fish *Cyprinus carpio var. communis* (Linnaeus). *Asian Journal of Veterinary Advances* 7 (7): 588-596
- Çakatay, U., Kayalı, R., (2006). Serbest Radikal Biyokimyasının Tarihsel Süreçteki Gelişimi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 37(4), 162-167
- Çapkin, E., Birincioglu, S., Altinok, I., (2009). Histopathological Changes in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) After Exposure to Sublethal

- Composite Nitrogen Fertilizers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(7), 1999-2004
- Çavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T., (1997). Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 3(4), 92-95
- Çaylak, E., Halifeoğlu, İ., Aydın, S., Telo, S., Bulmuş, Ö., Çelik, H., (2007). The Effects of Sulfur-Containing Compounds on Total Antioxidant Capacity Levels of Liver, Kidney and Brain in Lead-Exposed Rats. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 27:823-828
- Danışman, F., Bellitürk, K. (2007). Yapraktan Beslenme. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 11(1-2), 7-12
- Derviş, E., (2011). Oral Antioksidanlar. *Dermatoz*, 2(1), 263-267
- Dorval, J., Hontela, A., (2003). Role of Glutathione Redox Cycle and Catalase in Defense Against Oxidative Stress Induced by Endosulfan in Adrenocortical Cells Of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 192:191–200
- Dönmez, A. E., Kalay, M., Özkan, F., Koyuncu, C. E., (2006). FMC ve Malaşit Yeşili Sağaltım Dozlarının *Oreochromis niloticus* (L., 1758)'un Bazı Kan Parametrelerinde Meydana Getirdiği Değişimler. *E. U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, (23)1, 61-64
- Durmaz, H., Sevgiler, Y., Uner, N., (2005). Tissue-Specific Antioxidative and Neurotoxic Responses to Diazinon in *Oreochromis niloticus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 84: 215-226
- El-Shebly, A. A., Gad, H. A. M., (2011). Effect of Chronic Ammonia Exposure on Growth Performance, Serum Growth Hormone (GH) Levels and Gill Histology of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 1(4):183-197
- El-Sokkary, G. H., Nafady, A. A., Shabash, E. H., (2010). Melatonin Administration Ameliorates Cadmium Induced Oxidative Stress and Morphological Changes in The Liver of Rat. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73; 456-463
- Eraslan, F., İnal, A., Güneş, A., Erdal, İ., Coşkan, A., (2010). Türkiye'de kimyasal gübre üretim ve tüketim durumu, sorunlar, çözüm önerileri ve yenilikler.

- TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi, Ankara
- Erel, Ö., (2004). A Novel Automated Direct Measurement Method for Total Antioxidant Capacity Using a New Generation, More Stable Abts Radical Cation. *Clinical Biochemistry*, 37: 277-285
- Erel, Ö., (2005). A New Automated Colorimetric Method for Measuring Total Oxidant Status. *Clinical Biochemistry*, 38: 1103-1111
- Fenton, H. J. H., (1894). Oxidation of Tartaric Acid in Presence of Iron. *Journal of Chemical Society*, 65: 899–910
- Figueiredo-Fernandes, A., Fontainhas-Fernandes, A., Peixoto, F., Rocha, E., Reis-Henriques, M.A., (2006). Effects of Gender and Temperature on Oxidative Stress Enzymes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) Exposed to Paraquat. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 85: 97–103
- Freeman, B. A., Crapo, J. D., (1982). Biology of Disease: Free Radicals and Tissue Injury. *Laboratory Investigation; A Journal of Technical Methods and Pathology*, 47(5), 412-426
- Geldiay, R., Balık, S., (1988). Türkiye Tatlısu Balıkları IV Baskı. Ege Üniv. Fen Fak. Kitaplar Serisi, İzmir, 361-s367
- Gerschmann, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., Dweyer, P., Fenn, W.O., (1954). Oxygen Poisoning and X-irradiation: A Mechanism in Common. *Science*, 119: 623
- Gülen, B., Karaca, Ö., Kuş, M.A., Akpolat, N., Kuş, İ., (2011). Deneysel Kadmiyum Toksikitesinde Melatonin Hormonunun Karaciğer Üzerindeki Koruyucu Etkisi: İmmunohistokimyasal Bir Çalışma. *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*,1(2): 13-17
- Güler, Ç., Çobanoğlu, Z., (1994). Su Kirliliği. Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi, Ankara, 113
- Haktanır, K., (2009). Çevresel Değişimlerde Tarımın Etkileri ve Yönetim Arayışları. *Ankara Üniversitesi Çevre Bilimleri Dergisi*, 1(1), 1-6
- Halliwell, B., (1995). Antioxidant Characterization: Methodology and Mechanism. *Biochemical Pharmacology*, 49(10), 1341-1348
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C., (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford

- Hargreaves, J. A., (1998). Nitrogen Biogeochemistry of Aquaculture Ponds. *Aquaculture*, 166, 181-212.
- Harman, D., (1956). Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *Journal of Gerontology*, 11(3), 298-300
- Ježek, P., Hlavatá, L., (2005). Mitochondria in Homeostasis of Reactive Oxygen Species in Cell, Tissues, and Organism. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(12), 2478-2503
- Johansen, J. S., Harris, A. K., Rychly, D. J., Ergul, A., (2005). Oxidative Stress and the Use of Antioxidants in Diabetes: Linking Basic Science to Clinical Practice. *Cardiovascular Diabetology*, 4(1), 5
- Kabel, A. M., (2014). Free Radicals And Antioxidants: Role Of Enzymes And Nutrition. *World Journal of Nutrition and Health*, 2(3), 35-38
- Kaçar, B., Katkat, A. V., (2014). Gübreler ve Gübreleme Tekniği. Nobel Akademik Yayıncılık Eğitim Danışmanlık Tic. Ltd. Şti., Ankara
- Karaçal, İ., & Tüfenkçi, Ş., (2010). Bitki Beslemede Yeni Yaklaşımlar ve Gübre-Çevre İlişkisi. *Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi*, Ankara, 257-268
- Karaer, F., Gürlük, S., (2003). Gelişmekte Olan Ülkelerde Tarım- Çevre- Ekonomi Etkileşimi. *Doğuş Üniversitesi Dergisi*, 4(2), 197-206
- Karakuş, S., Gey, H., (2006). A Preliminary Study of Heavy Metals in Transcaucasian Barb (*Capoeta capoeta capoeta* Guldestaedt 1772) from the Kars Creek, Turkey. *Revue de médecine vétérinaire*, 157, 11, 551-556
- Karaman, M.R., Brohi, A.R., Güneş, A., İnal, A., Alpaslan, M., (2000). Yöresel Değişik Azotlu Gübre Uygulamalarının Tokat Bölgesinde Yetiştirilen Bazı Kışlık Sebzelerin Nitrat Akümülyasyonuna Etkisi. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 24: 1-9
- Karaman, S., (2006). Hayvansal Üretimden Kaynaklanan Çevre Sorunları ve Çözüm Olanakları. *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(2), 133-139
- Kasnak, C., Palamutoğlu, R., (2015). Doğal Antioksidanların Sınıflandırılması ve İnsan Sağlığına Etkileri. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 3(5), 226-234
- Kavas, G. Ö., (1989). Serbest Radikaller ve Organizma Üzerine Etkileri. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 9(1), 1-8

- Kavas, G. Ö., (1994). Reaktif Oksijen Metabolitlerine Fizyopatolojik Yaklaşım. Ankara Tıp Mecmuası, 47, 579-92
- Kaya, İ., Yılmaz, M., Koç, E., Deveci, H.A., Ersan, Y., Karapehlivan, M., (2014). Tebukonazol (fungusit) Uygulanan *Cyprinus Carpio* (L. 1758)'da Serum Total Antioksidan, Oksidan ve Sialik Asit Düzeylerinin İncelenmesi. Journal of Fisheries Sciences, 8(3): 214-219
- Kayhan, F. E., Yön, N. D., (2009). Bazı Ağır Metallerin Sucul Organizmalar Üzerinde Yarattığı Stres ve Biyolojik Yanıtlar. Journal of Fisheries Sciences, 3(2), 153-162
- Kılınç, K., Kılınç, A., (2002). Oksijen Toksisitesinin Aracı Molekülleri Olarak Oksijen Radikalleri. Hacettepe Medical Journal, 33, 110-118
- Kirk, R. S. and Lewis, J. W., (1993). An Evaluation of Pollutant Induced Changes in the Gills of Rainbow Trout Using Scanning Electron Microscopy. Environmental Technology, 14, 577-585
- Koca, N., Karadeniz, F., (2003). Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları ve Vücuttaki Antioksidan Savunma Sistemleri. Gıda Mühendisliği Dergisi, 16, 32-37
- Kopáni, M., Celec, P., Danišovič, L., Michalka, P., Biró, C., (2006). Oxidative Stress and Electron Spin Resonance. Clinica chimica acta, 364(1), 61-66
- Köleli, N., Kantar, Ç., (2005). Fosfat Kayası, Fosforik Asit ve Fosforlu Gübrelerdeki Toksik Ağır Metal (Cd, Pb, Ni, As) Konsantrasyonu. Ekoloji, 14, 55, 1-5
- Konukoğlu, D., (2007). Serbest Radikaller ve Önemleri. Türkiye Aile Hekimliği Dergisi, 1(4), 197-200
- Kulaksız, R., (2009). Farklı Antioksidanlar Eklenmiş Sulandırıcılarla Dondurulmuş Saanen Tekesi Spermalarının İn Vitro Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara
- Kuru, M., (1987). Omurgalı Hayvanlar. Atatürk Üniversitesi Yayınları, Erzurum, 735
- Lawson, T. B., 1995. Fundamentals of aquacultural engineering. Chapman-Hall, An International Thomson Publishing Company, USA, 335

- Li, Z., Zlabeka, V., Grabica, R., Lia, P., Machovaa, J., Veliseka, J., Randak, T., (2010). Effects of Exposure to Sublethal Propiconazole on the Antioxidant Defense System and Na⁺– K⁺-ATPase Activity in Brain of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology* 98: 297–303
- Loschen, G., Flohe, L., Chance, B., (1971). Respiratory Chain Linked H₂O₂ Production in Pigeon Heart Mitochondria. *FEBS Letters*, 18(2), 261-264
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-257
- Malik, E. Z., Gyore, K., Olah, J., (1986). Effect of Ammonia on Gill Tissues of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquacultura Hungarica*, 5, 97-105
- Mallet, M., Sims, I., (1994). Effect of Ammonia on the Early Life Stages of Carp (*Cyprinus carpio* L.) and Roach (*Rutilus rutilus*) Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish, Müller R. and Lloyd R. (Eds.), USA, 19, 221-228
- Mercan, U., (2004). Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. *YYU. Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15 (1-2), 91-96
- Mills, G. C., (1957). Hemoglobin Catabolism I. Glutathione Peroxidase, An Erythrocyte Enzyme which Protects Hemoglobin from Oxidative Breakdown. *Journal of Biological Chemistry*, 229(1), 189-197
- Nuhoğlu, Y., Öymen, T., (1993). Doğu Karadeniz Bölgesi (Bölümü) Su Kaynakları Kirliliği ile Balık Populasyonları Arasındaki İlişkinin İncelenmesi. *Ekoloji Çevre Dergisi*, (6), 28-33
- Oruç, E.Ö., Sevgiler, Y., Uner, N., (2004). Tissue-Specific Oxidative Stress Responses in Fish Exposed to 2,4-D and Azinphosmethyl. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 137: 43–51
- Oruç, E.Ö., Usta, D., (2007). Evaluation of Oxidative Stress Responses and Neurotoxicity Potential of Diazinon in Different Tissues of *Cyprinus carpio*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23: 48-55
- Öğüt, H., (2010). Balıklarda Stres. *Balık Biyolojisi Araştırma Yöntemleri*, Karataş, M. (ed), Nobel Kitap Dağıtım A.Ş., Ankara, 381-398

- Pande, R. K., Pande, S. K., (1988). Tolerance Measurement and Histopathological Observations on The Gills of *Mystus M. Vittatus* Under The Toxic Stress of The Fertilizer NPK. *Clean-Soil-Air-Water*, 16(5), 551-556
- Papagiannis, I., Kagalou, I., Leonardos, J., Petridis, D., and Kalfakakou, V., (2004). Copper and Zinc in Four Freshwater Fish Species From Lake Pamvotis (Greece). *Environmental International*, 30, 357-362
- Parves, S., Rasiuddin, S., (2006). Copper Modulates Non- Enzymatic Antioxidant in the Freshwater Fish *Channa punctata* (Bloch) Exposed to Deltamethrin. *Chemosphere* 68: 1324-1332
- Peixoto, F., Alves-Fernandes, D., Santos, D., Fontainhasfernandes, A., (2006). Toxicological Effects of Oxyfluorfen on Oxidative Stress Enzymes in *Tilapia Oreochromis niloticus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 85: 91-96.
- Pekiner, B. D., (2003). Vitamin E as an Antioxidant. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 32(4), 243-267
- Peyghan, R., Takamy, G. A., (2002). Histopathological, Serum Enzyme, Cholesterol and Urea Changes in Experimental Acute Toxicity of Ammonia in Common Carp *Cyprinus carpio* and Use of Natural Zeolite for Prevention. *Aquaculture International*, 10, 317-325
- Pham-Huy, L. A., He, H., Pham-Huy, C., (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science*, 4(2), 89
- Pourahmad, J., O'Brien, P.J., Jokar, F., Daraei, B., (2003). Carcinogenic Metal Induced Sites of Reactive Oxygen Species Formation in Hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 17, 803-810
- Ram, R. N., Sathyanesan, A. G., (1987). Histopathological Changes in Liver and Thyroid of The Teleost Fish, *Channa Punctatus* (Bloch), in Response to Ammonium Sulfate Fertilizer Treatment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 13(2), 185-190
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Osuna, C., Gitto, E., (2000). Actions of Melatonin in the Reduction of Oxidative Stress. *Journal of Biomedical Science*, 7(6), 444-458
- Reznick, A. Z., Packer, L., Sen, C. K., (1998). Strategies to Assess Oxidative Stress. *Oxidative Stress in Skeletal Muscle*, 43-58
- Savcı, S., (2012). An Agricultural Pollutant: Chemical Fertilizer. *International Journal of Environmental Science and Development*, 3(1):77-80

- Sayeed, I., Parvez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R., Raisuddin, S., (2003). Oxidative Stress Biomarkers of Exposure to Deltamethrin in Freshwater Fish, *Channa Punctatus* Bloch. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56: 295–301
- Schreck, C. B., Contreras-Sanchez, W., Fitzpatrick, M. S., (2001). Effects of Stress on Fish Reproduction, Gamete Quality, and Progeny. *Aquaculture*, 197, 3-24
- Sezer, K., Keskin, M., (2014). Serbest Oksijen Radikallerinin Hastalıkların Patogenezisindeki Rolü. *FÜ Sağ. Bil. Vet. Dergisi*, 28(1), 49-56
- Shindo, J., Okamoto, K., Kawashima, H., (2006). Prediction of the Environmental Effects of Excess Nitrogen Caused by Increasing Food Demand with Rapid Economic Growth in Eastern Asian Countries, 1961–2020. *Ecological Modelling*, 193, 703–720
- Soyergin, S., (2003). Organik Tarımda Toprak Verimliliğinin Korunması, Gübreler ve Organik Toprak İyileştiricileri. Atatürk Bahçe Kùltürleri Merkez Araştırma Enstitüsü, İzmir
- Sönmez, İ., Kaplan, M., Sönmez, S., (2008). Kimyasal Gübrelerin Çevre Kirliliği Üzerine Etkileri Ve Çözüm Önerileri. *Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Derim Dergisi*, 25(2):24-34
- Speare, D., Backman, S., (1988). Ammonia and Nitrite Waterborne Toxicity of Commercial Rainbow Trout. *The Canadian Veterinary Journal*, 29(8), 666
- Stegeman, J.J., Lech, J.J., (1991). Cytochrome P-450 Monooxygenase Systems in Aquatic Species. *Carcinogen Metabolism and Biomarkers for Carcinogen and Pollutant Exposure, Environmental Health Perspectives*, 90: 101-109
- Svobodova, Z., Lloyd, R. and Machova, J., (1993). Ammonia. Water quality and fish health. *EIFAC Technical Paper*, 54, 11-16
- Şahin, G., (2016). Türkiye'de Gübre Kullanım Durumu ve Gübreleme Konusunda Yaşanan Problemler. *Turkish Journal of Agricultural Economics*, 22(1), 19-32
- Tekkeş, Y., (2006). Streptozotosin ile Diabet Oluşturulmuş Farelerde Aspirin ve E Vitaminin Dokularda Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Sisteme Etkisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş

- Tekkeşin, M.S., Mutlu, S., Aksakallı, N., Olgaç, V., (2011). Expression of Heat Shock Proteins 27, 60 and 70 in Oral Carcinogenesis: An Immunohistochemical Study. *Türk Onkoloji Dergisi*; 26(3):115-120
- Toyokuni, S., (1999). Reactive Oxygen Species-Induced Molecular Damage and Its Application in Pathology. *Pathology International*, 49(2), 91-102
- Twitchen, D., Eddy, F. B., (1995). Sublethal Effects of Ammonia on Freshwater Fish. *Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fishes*. Chapter 12, P. 211-229
- Uçar, A., Atamanalp, M., (2009). Balıklarda Toksikopatolojik Lezyonlar II. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 40 (1), 95-101
- Urso, M. L., Clarkson, P. M., (2003). Oxidative Stress, Exercise, and Antioxidant Supplementation. *Toxicology*, 189(1), 41-54
- Üner, N., Oruç, E., Sevgiler, Y., (2005). Oxidative Stress-Related and Atpase Effects of Etoxazole in Different Tissues of *Oreochromis niloticus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 20(1), 99-106
- Verep, B., Ödün, N. A., (2016). Çay Tarımında Kullanılan Suni ve Doğal Gübrelerin Fırtına Vadisi (Çamlıhemşin-Rize) Behice Deresinin Fiziko-Kimyasal Su Kalitesine Etkisi. *Journal of Anatolian Environmental & Animal Sciences*, 1.(1), 1-13
- Wajsbrodt, N., Gasith, A., Diamant, A. and Popper, D. M., (1993). Chronic Toxicity of Ammonia to Juvenile Gilthead Seabream *Sparus aurata* and Related Histopathological Effects. *Journal of Fish Biology*, 42, 321-328
- Wright, R. 1995. Nitrogen excretion three end production, many physiological roles. *Journal of Experimental Biology*, 198, 273-281
- Yang, H.C. and Chun, S.K. 1986. Histopathological study of acute toxicity of ammonia on common carp, *Cyprinus carpio*. *Bulletin of Korean Fish Society*, 19,(3), 249- 256
- Yazıcı, C., Köse, K., (2004). Melatonin: Karanlığın Antioksidan Gücü. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 13(2), 56-65
- Yerer, M. B., Aydoğan, S., (2000). Oksidatif Stres ve Antioksidanlar. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 9(1), 49-53
- Yılmaz, H. R., Turkoz, Y., Yuksel, E., Orun, I., (2006). An Investigation of Antioxidant Enzymes Activities in Liver of *Cyprinus carpio* Taken from

- Different Stations in the Karakaya Dam Lake. International Journal of Science & Technology, 1(1), 1-6
- Yılmaz, N., (2007). İmmünohistokimyasal Analiz. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Türkiyede Sık Karşılaşılan Hastalıklar II Sempozyum Dizisi, 582, 123-124
- Yılmaz, M., Ersan, Y., Karaman, M., Koç, E., Necefoğlu, H., (2008). Toxic Effects of Cobalt Parahydroxy-Benzoate on Tissue Histopathology and Serum Proteins in *Capoeta capoeta capoeta*. Fresenius Environmental Bulletin, 17(9a), 1322-1327
- Yılmaz, M., Vural, S., Koç, E., Ersan, Y., (2014). Toxic Effects Of Nitrogen Fertilizer On Serum Proteins And Tissue Histopathology in Transcaucasian Barb, *Capoeta Capoeta* (GULDENSTTEADT 1773). Caucasian Journal of Science, 1(1): 26-36
- Young, I. S., Woodside, J. V., (2001). Antioxidants in Health and Disease. Journal of Clinical Pathology, 54(3), 176-186
- Yurdakoş, E., (2005). Stres Fizyolojisi. Medikal Açıdan Stres ve Çareleri Sempozyumu, İstanbul, 89-96
- Yüksel, A. N. (1979). Tarımda Kullanılan Azotlu Gübrelerin Kayıp Yolları ve Çevre Sularına Etkisi. Journal of the Faculty of Agriculture, 10(1-2), 179-194
- Zastawny, T. H., Altman, S. A., Randers-Eichhorn, L., Madurawe, R., Lumpkin, J. A., Dizdaroglu, M., Rao, G., (1995). DNA Base Modifications and Membrane Damage in Cultured Mammalian Cells Treated with İron İons. Free Radical Biology and Medicine, 18(6), 1013-1022

ÖZGEÇMİŞ

Bilgiler

Adı ve Soyadı: Seda VURAL AYDIN

Doğum Tarihi: 05.05.1986

Doğum Yeri: Aralık-IĞDIR

Akademik Unvanı: Öğretim Görevlisi

İş Telefonu: 04743516496 - 2706

İş Adresi: Kafkas Üniversitesi Kağızman Meslek Yüksekokulu Kağızman/KARS

E-postası: sedavural76@hotmail.com

Eğitim Durumu

Doktora (Üniversite-Enstitü, Yılı, Tez Adı):

Kafkas Üniversitesi - Fen Bilimleri Enstitüsü/Biyoloji Anabilim Dalı (2011-2017)

Tez adı: Azotlu Gübre Uygulanan *Capoeta capoeta* (Guldenstaedt 1773)'nın Dokularında Oksidatif Doku Hasarının İmmunohistokimyasal ve Antioksidan Seviyelerinin Biyokimyasal Yöntemlerle Belirlenmesi

Yüksek Lisans (Üniversite-Enstitü, Yılı, Tez Adı):

Kafkas Üniversitesi - Fen Bilimleri Enstitüsü/Biyoloji Anabilim Dalı (2009-2011)

Tez adı: Azotlu Gübrenin *Capoeta Capoeta Capoeta* (Guldenstaedt 1772)'nin Karaciğer, Bağırsak, Solungaç, Böbrek Histopatolojisi ve Serum Proteinleri Üzerine Etkileri

Lisans (Üniversite, Fakülte, Bölüm):

Pamukkale Üniversitesi- Fen-Edebiyat Fakültesi/Biyoloji Bölümü

Uzmanlık Alanı: Hidrobiyoloji