

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

**DİMETOAT UYGULANAN *CAPOETA CAPOETA* (GULDENSTAEDT 1773)'
NİN BAZI DOKU HİSTOPATALOJİSİ VE SERUM PROTEİNLERİ ÜZERİNE
ASKORBİK ASİT'İN KORUYUCU ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Erdi Anıl TANRIVERDİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Danışman
Doç. Dr. Muhitdin YILMAZ**

**KARS
2014**

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

**DİMETOAT UYGULANAN *CAPOETA CAPOETA* (GULDENSTAEDT 1773)'
NİN BAZI DOKU HİSTOPATALOJİSİ VE SERUM PROTEİNLERİ ÜZERİNE
ASKORBİK ASİT'İN KORUYUCU ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Erdi Anıl TANRIVERDİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Danışman
Doç. Dr. Muhitdin YILMAZ**


**KARS
2014**

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Erdi Anıl TANRIVERDİ'nin Doç. Dr. Muhitdin YILMAZ'ın danışmanlığında yüksek lisans tezi olarak hazırladığı "Dimetoat uygulanan *Capoeta capoeta* (Guldenstaedt 1773)' nın bazı doku histopatolojisi ve serum proteinleri üzerine askorbik asit'in koruyucu etkilerinin incelenmesi" adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek .0y... birliği... ile kabul edilmiştir.

16.10.2014

	Adı Soyadı
Başkan	: Doç. Dr. Muhitdin YILMAZ
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Yusuf ERSAN
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Hamit USLU

İmza

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun .../.../2014 gün ve .../... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Doç. Dr. Muzaffer ALKAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Çalışmada; Dimetoat uygulanan *Capoeta capoeta* (Guldenstaedt 1773)'nın bazı doku histopatolojisi ve serum proteinleri üzerine askorbik asit' in koruyucu etkileri incelenmiştir.

Tez konumun seçiminde, tezimin hazırlanmasında ve sonuçlandırılmasında yol gösterici olan, yoğun çalışmalarından bana zaman ayırarak engin tecrübe ve birikimlerinden yararlanma fırsatı veren, değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Muhtdin YILMAZ'a ve laboratuvar çalışmalarında destek ve katkılarını esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Yusuf ERSAN'a, Yrd. Doç. Dr. Evren KOÇ'a ve Arş. Gör. Duygu TANRIKULU'na ve her zaman maddi manevi desteklerini esirgemeyen aileme teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÇİZELGELER DİZİNİ	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
RESİMLER DİZİNİ	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Histoloji	3
2.1.1. Bağırsak	3
2.1.2. Karaciğer	3
2.1.3. Böbrek	4
2.2. Dimetoat	5
2.3. Askorbik asit	6
2.4. <i>Capoeta capoeta</i> (Guldenstaedt, 1773)'nın Sistematikteki Yeri	7
2.4.1. Familya ve Cins Özellikleri	7
2.4.2. <i>Capoeta capoeta</i> (Guldenstaedt, 1773)	8
2.5. Çalışma Alanı Hakkında Genel Bilgi	9
3. MATERYAL VE METOD	10
3.1. Deney Düzenegi	10
3.2. Histopatolojik Çalışmalar	10
3.3. Balıklarda Kan Alma Yöntemleri	10
3.3.1. Kalpten Kan Alınması	11
3.3.2. Kuyruktan Kan Alınması	11

3.4. Total Protein Tayini	12
3.5. Elektroforetik Çalışmalar	13
3.5.1. %30'luk Akrilamid Çözeltisi	13
3.5.2. Stoklama Jel Tamponu	13
3.5.3. Ayırma Jel Tamponu	14
3.5.4. Yürütme Tamponu	14
3.5.5. Numune Tamponu	14
3.5.6. Jelin Boyanması İşlemi	14
3.5.7. Jelden Boya Çıkarma İşlemi	15
3.5.8. Diğer Kimyasallar ve Özellikleri	15
3.5.9. Kesikli Tampon Sistemli Jelin Hazırlanması	16
3.5.9.1. Ayırma jelin hazırlanması	16
3.5.9.2. Stoklama jelin hazırlanması	16
3.5.10. Ayırma Jelin Plağa Dökülmesi	17
3.5.11. Stoklama Jelin Plağa Dökülmesi	18
3.5.12. Serum Numunelerinin Sulandırılması ve Jele Yükleme İşlemi	19
4. BULGULAR	21
4.1. Makroskobik bulgular	21
4.2. Mikroskobik bulgular	21
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	30
6. KAYNAKLAR	36
7. ÖZGEÇMİŞ	40

ÖZET

Bu çalışmada, Kars Çayı'ndan yakalanan *Capoeta capoeta* (Guldenstaedt 1773) bireyleri üzerine bir pestisit olan Dimetoat'ın histopatolojik ve elektroforetik etkileri ve buna karşı Askorbik asit (C vitamini)'in koruyucu etkileri araştırılmıştır. Kars Çayı'ndan yakalanan balıklar laboratuvar ortamında 300'er L'lik tanklarda 10 gün süreyle ortama adaptasyonları sağlandıktan sonra 10'ar balık bulunan 4 grup oluşturuldu. I. gruptaki balıklar normal su ortamına, II. gruptaki balıklar 100 mg/L AA, III. gruptaki balıklar 2mg/L DM ve IV. gruptaki balıklar ise 100 mg/L AA ve 2 mg/L DM içeren su ortamına alınarak 10 gün süreyle bekletildi. Bu süre sonunda elektroforetik ve histopatolojik çalışmalar için balıklardan kan ve doku örnekleri alındı. Doku örnekleri %10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edilerek rutin histolojik yöntemlerle parafin bloklar hazırlandı. 3-5 µ kalınlığında kesitler alınarak tamamı hematoksilin ve eosin boyama metoduna göre boyanarak mikroskopta incelendi. Elde edilen serum örnekleri ise Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)'nde yürütüldü.

Serum numunelerinin SDS-PAGE'den elde edilen elektroforegramında kontrol grubundaki balıkların protein bandlarına kıyasla, 100 mg/L AA ve 2 mg/L DM uygulanması sonucu 82 kD, 72 kD, 69 kD, 49 kD ve 36 kD'luk bandlarda kalınlaşmalar, 100 kD, 97 kD, 76 kD, 56 kD ve 30 kD'luk bandlarda incelmeler, 93 kD, 46 kD, 44 kD ve 26 kD'luk bandların ise yeni sentezlendiği saptandı.

DM ve AA uygulaması ile oluşturulan gruplardan elde edilen karaciğer, bağırsak ve böbrek dokularında yapılan histopatolojik incelemelerde DM'a bağlı olarak dejenerasyon, nekroz, piknotik nükleus ve hücre infiltrasyonları tespit edildi.

Sonuç olarak DM uygulamasının *Capoeta capoeta*'da toksik etki meydana getirdiği ve buna karşı AA'in kısmen iyileştirici etkisinin olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Dimetoat, Askorbik asit, *Capoeta capoeta*, serum protein, SDS-PAGE, histopatoloji.

ABSTRACT

In this study, Dimethoate (a pesticide)'s histopathological and electrophoretic effects on *Capoeta capoeta* (Guldenstaedt 1773) individuals captured from Kars River and against that ascorbic acid (vitamin C)'s protective effects were investigated. After providing their adaptations to the environment in 300 liter tanks in the laboratory, the fish caught from Kars River were divided into 4 groups (each including 10 fish). The fish were kept in different water containing mediums: group I in normal water medium, group II in 100 mg/L AA, group III in 2 mg/L DM and group IV in 100 mg/L AA and 2 mg/L DM, and then they were steeped in these water mediums for 10 days. After this period, blood and tissue samples were taken from the fish for electrophoretic and histopathological studies. Tissue samples were detected in 10% formaldehyde solution and paraffin blocks were prepared by routine histological methods. Sections taken into 3-5 μ thick, all stained according to hematoxylin and eosin staining methods, were examined under a microscope. Obtained serum samples were carried out in Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE).

Compared to the serum samples obtained from SDS-PAGE electropherogram in the control group of fish protein bands, as a result of the application of 100 mg/L AA and 2 mg/L DM, thickening in 36 kD band, thinning in 100 kD, 97 kD, 76 kD, 56 kD and 30 kD bands was observed, also 93 kD, 46 kD, 44 kD and 26 kD bands were detected to newly synthesized.

In the histopathological examinations depending on DM on liver, intestine and kidney tissues obtained from the group formed by application of DM and AA, degeneration, necrosis, pyknotic nuclei and cell infiltrates were detected.

As a result, DM application was found to create toxic effects on *Capoeta capoeta*, whereas AA was found to have a healing effect on it.

Key Words: Dimethoate, ascorbic acid, *Capoeta capoeta*, serum proteins, SDS-PAGE, histopathology.

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 3.4.1 : Total protein tayin prosedürü	12
Çizelge 3.5.9.1 : Değişik konsantrasyonlarda ayırma jeli hazırlama prosedürü	16
Çizelge 3.5.9.2 : Değişik konsantrasyonlarda stoklama jeli hazırlama prosedürü	17

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1 : Dimetoat kimyasal formülü	5
Şekil 2 : Askorbik asit kimyasal formülü	6

RESİMLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Resim 2.1.1 : <i>Poecillia reticulata</i> bağırsak dokusu	3
Resim 2.1.2 : <i>Poecillia reticulata</i> karaciğer dokusu	4
Resim 2.1.3 : <i>Poecillia reticulata</i> böbrek dokusu	5
Resim 2.3.2 : <i>Capoeta capoeta</i> (Siraz balığı)	9
Resim 4.1 : DM ve AA'e maruz bırakılan <i>Capoeta capoeta</i> 'nın SDS-PAGE yöntemiyle elde edilen serum proteinlerinin elektroforegramı	23
Resim 4.2 : <i>Capoeta capoeta</i> kontrol grubu bağırsak dokusu	24
Resim 4.3 : <i>Capoeta capoeta</i> kontrol grubu karaciğer dokusu	24
Resim 4.4 : <i>Capoeta capoeta</i> kontrol grubu böbrek dokusu	25
Resim 4.5 : <i>Capoeta capoeta</i> DM grubu bağırsak dokusu	25
Resim 4.6 : <i>Capoeta capoeta</i> DM grubu böbrek dokusu	26
Resim 4.7 : <i>Capoeta capoeta</i> DM grubu karaciğer dokusu	26
Resim 4.8 : <i>Capoeta capoeta</i> AA grubu bağırsak dokusu	27
Resim 4.9 : <i>Capoeta capoeta</i> AA grubu böbrek dokusu	27
Resim 4.10 : <i>Capoeta capoeta</i> AA grubu karaciğer dokusu	28
Resim 4.11 : <i>Capoeta capoeta</i> DM+AA grubu bağırsak dokusu	28
Resim 4.12 : <i>Capoeta capoeta</i> DM+AA grubu böbrek dokusu	28
Resim 4.13 : <i>Capoeta capoeta</i> DM+AA grubu karaciğer dokusu	29

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**Simgeler**

kg	Kilogram
gr	Gram
mg	Miligram
µg	Mikrogram
L	Litre
ml	Mililitre
dl	Desilitre
µl	Mikrolitre
km	Kilometre
m	Metre
cm	Santimetre
mm	Milimetre
µ	Mikron
rpm	Devir / dakika
°	Derece
C	Santigrant
sn	Saniye
dk	Dakika
µm	Mikromol
M	Molar

ppm	Milyonda bir kısım
%	Yüzde
kD	Kilodalton
V	Voltaj
mA	Amper
HCl	Hidroklorik Asit
CH₃COOH	Asetik Asit

Kısaltmalar

SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi
TEMED	N,N,N',N' – Tetra methylethylen diamine
dH₂O	Distile su
MHI	Mononükleer hücre infiltrasyonu
AA	Askorbik asit
AS	Askorbik sülfat
AP	Askorbat-2-monofosfat
DM	Dimetoat
CPF	Klorpirifos
TBARS	Tiobarbitürik asit-reaktif maddeler
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
CAT	Katalaz
SOD	Süperoksit dismutaz
LPO	Lipid peroksidasyonu

1. GİRİŞ

İnsanlar yüzyıllarca çevreyi denetim altına alma çabası içerisinde olmuşlardır. Ancak günümüzde ürün alma, yaşama standardı, yerleşme vb. açılardan akıl almaz olanaklara kavuşurken, çevre üzerindeki etkisi artmış, kendi varlığını tehlikeye düşürür duruma gelmiştir [1]. İnsan nüfusunun hızla arttığı dünyada açlık sorununun çözülebilmesi için tarımsal üretimi arttırmak büyük önem arz etmektedir. Tarımsal üretim artarken, tarım ilaçlarının sıkça kullanılması sonucu çevreye saçılan endüstriyel atıklar ve diğer toksik maddeler arttıkça toplum sağlığına olumsuz etkileri tehlikeli boyutlara ulaşmaktadır [2]. Tarım üretiminin artmasıyla birlikte bitki hastalıklarına, zararlı böceklerle ve yabancı otlara karşı farklı zirai mücadele yöntemleri geliştirilmektedir. Bu mücadelede en büyük paya sahip olan ise kimyasal mücadeledir [3].

Besin maddelerinin üretimi, hazırlanması, depolanması ve tüketimi sırasında onların besin değerini azaltan veya hasara uğratan zararlıları (böcek, kemirici, yabancı ot, mantar, toprak kurdu vb.) öldürmek için kullanılan kimyasal maddelere pestisit denir [2].

Pestisitlerin kullanılmadığı durumlarda ürünlerde % 60'lara varan oranlarda kalite ve verim düşüklüğü olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle, ürün kaybına sebep olan zararlı organizmaları kontrol etmek amacıyla tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi, ülkemizde de bitki koruma ürünlerinin kullanılması kaçınılmazdır. Ancak, pestisitlerin kullanımı insan sağlığına ve çevreye olumsuz etkileri gibi birçok sorunu da beraberinde getirmektedir. Yoğun ve bilinçsiz bir şekilde kullanılmaları sonucunda gıdalarda, toprak, su ve havada pestisitlerin kendisi ya da dönüşüm ürünleri kalabilmektedir [3].

Su ortamlarından göl, nehir, deniz ve okyanuslar insanlar tarafından uzun bir süredir görmezden gelinerek sınırsız kapasitedeki atık bölgeleri olarak görülmektedir. Endüstriyel atık suların, zirai kaynaklı suların ve evsel atık suların sahil sularına geniş ölçüde deşarjı dünyanın birçok kesiminde giderek yaygınlaşmaktadır. Bunun sonucu olarak, sahil ve iç kesimlerdeki su ortamlarında kirlilik hızla artmaktadır [4]. Özellikle doğal su kaynaklarında meydana gelen kirlilik su kaynaklarının sürekliliğini etkileyecek boyutlara ulaşmıştır. Böylece suyun fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri olumsuz yönde değişmiştir [5].

Pestisitler su ortamına, uygulama sırasında bulaşmakta ya da tarım, orman sahalarından yağmur suları ile taşınmaları sonucu geçmekte, suya geçtikten sonra da uzak mesafelere taşınabilmektedirler. Pestisitlerin balıklara etkileri değişik şekillerde görülür. Direkt olarak öldürme söz konusu olabileceği gibi yumurta koymayı ve üremeyi durdurmak suretiyle de balık popülasyonu üzerinde etkili olabilmektedirler. Dokularda meydana getirdikleri zararlar ile balıklarda duyarlılık görülür ve diğer çevresel etkilere göre daha çok etkilenirler [6].

Organofosfor sınıfındaki insektisitler sucul ortamdaki canlıların vücuduna; solungaçlar vasıtasıyla, sindirim sistemiyle ve vücut yüzeyinden girerler. Buradaki dokularda birikerek vücutta toksik etki meydana getirdiği bildirilmiştir [7].

Hayvansal proteine olan gereksinimin karşılanması için bütün dünya ülkelerinde olduğu gibi, ülkemizde de deniz ve iç su balıklarından daha fazla yararlanabilmek için, yeni yetiştirme teknikleri ve yem içerik çalışmaları yapıyor olsada, balıkların hastalıklara karşı korunması çalışmaları ve tedavileri büyük önem arz etmektedir [8].

Çeşitli mekanizmalar sonucu ortaya çıkan serbest radikallere karşı vücutta doğal bir savunma mekanizması vardır. Bu savunma mekanizmasını oluşturan bileşiklere “antioksidanlar” denir [9].

Antioksidan özelliğe sahip bazı vitaminler, serbest radikallerin hasarlarından hücreleri koruyarak ve serbest radikal oluşumlarını önleyerek antioksidan savunmada önemli görevler alırlar. En önemli antioksidan vitaminler E, A ve C (askorbik asit) vitaminleridir. C vitamini, adrenal hormonların karaciğerde yıkılmalarını önleyerek bu hormonların etkilerinin devamlılığının sağlanmasında önemlidir [10].

Bu çalışmada, Kars Çayı’ndan yakalanan *Capoeta capoeta* (Guldenstaedt 1773) bireyleri üzerine bir pestisit olan Dimetoat’ın histopatolojik ve elektroforetik etkilerinin saptanması ve buna karşı askorbik asit (C vitamini)’in koruyucu etkilerinin saptanması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Histoloji

2.1.1. Bağırsak

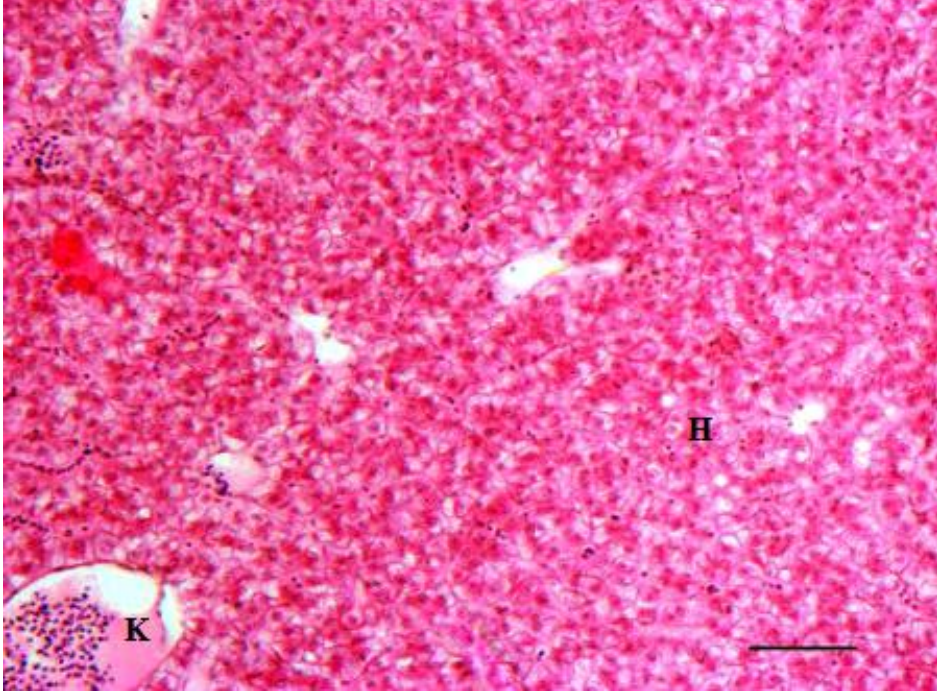
Bağırsakların vücut boşluğunda düzenlenmesi ve uzunluğu balık türleri arasında çeşitlilik gösterir (>1 bağırsak uzunluğu/ balık boyu karnivor balıklarda, >20 bağırsak uzunluğu/balık boyu herbivor balıklarda). Mukozayla kaplı olan bağırsak, emilim yüzeyini arttırabilmek için mikrovilluslarla birlikte kıvrımlar oluşturmuştur. Bağırsağın başlangıç kısmına karaciğerden gelen safra ve pankreatik kanallar açılır. İlk kısımda yağ emilimi gerçekleşir ve orta kısmında ise pinositozla makromoleküllerin (protein ve karbonhidrat) alınması gerçekleşir [11, 12].



Resim 2.1.1. *Poecilia reticulata* bağırsak dokusu. Muskularis mukoza (M) ve yağ dokusu (A) (10 μ m).[12]

2.1.2. Karaciğer

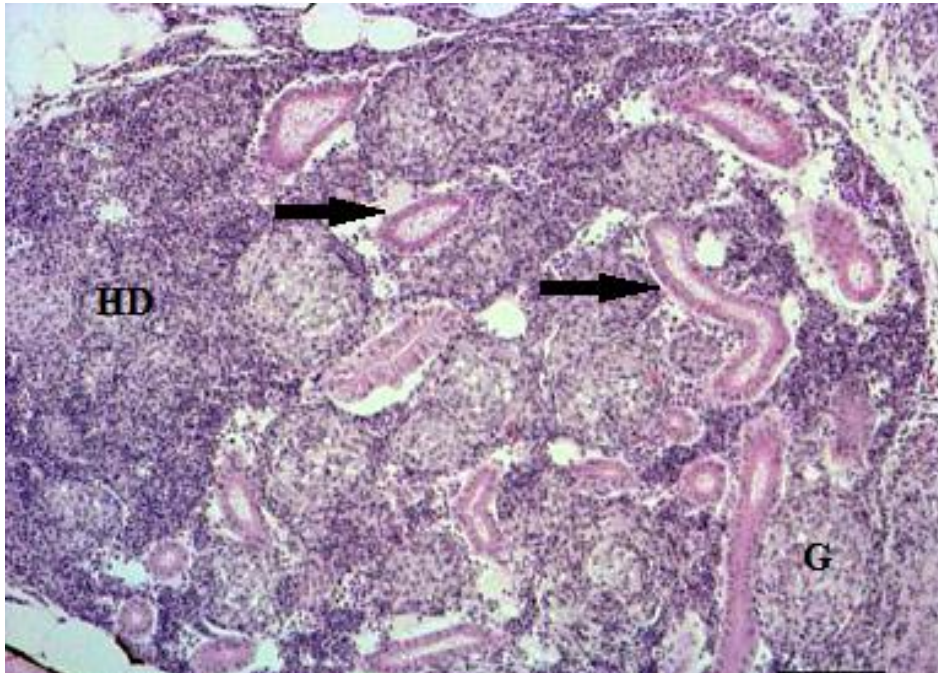
Tübüler lobüllerden oluşan karaciğer başlıca sinüzoidler, karaciğer hücreleri (hepatosit), safra kanalları ve kan damarlarından meydana gelmiştir. Safra üretimi ve salgınımıyla birlikte çeşitli proteinlerin sentezi gerçekleşir. Ayrıca hepatositlerde glukojen, yağ, protein ve vitaminler depolanır [11, 12, 13].



Resim 2.1.2. *Poecilia reticulata* karaciğer dokusu. Hepatosit (H) ve kan damarı (K) (50 μ m).[12]

2.1.3. Böbrek

Kemikli balıkların ergin şekillerinde mezonefrik böbrek tipi görülür. Böbrekler nefronlardan meydana gelir ve her bir nefron malpigi cisimciği ve böbrek tübüllerinden oluşur. Malpigi cisimciğinde sıkıca birbirine sarılmış arteriollerden oluşan glomerulus bowman kapsülüyle sarılmıştır. Böbrekler kanı filtre eder ve bununla birlikte suyun, hormonların, besinlerin ve diğer maddelerin tutulmasını ve geri emilimini gerçekleştirir [11, 12, 13].

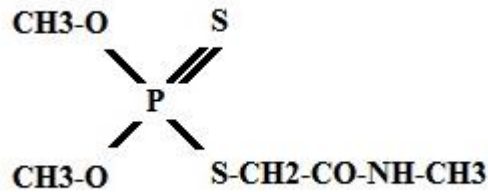


Resim 2.1.3. *Poecillia reticulata* böbrek dokusu. Renal tübül (Ok), hematopoetik doku (HD) ve renal korpüskül ile glomerulus (G) (10 μ m).[12]

2.2. Dimetoat

Dimetoat (DM), organofosfor sınıfından bir insektisittir. DM akarları, afidleri ve yaprak arılarını öldürmek için kullanılan bir böcek öldürücüdür. DM vücuda mide yolu, solunum ve diğer organofosforlar gibi dermal yolla emilim şeklinde nüfuz eder [14, 15].

Kimyasal formülü;

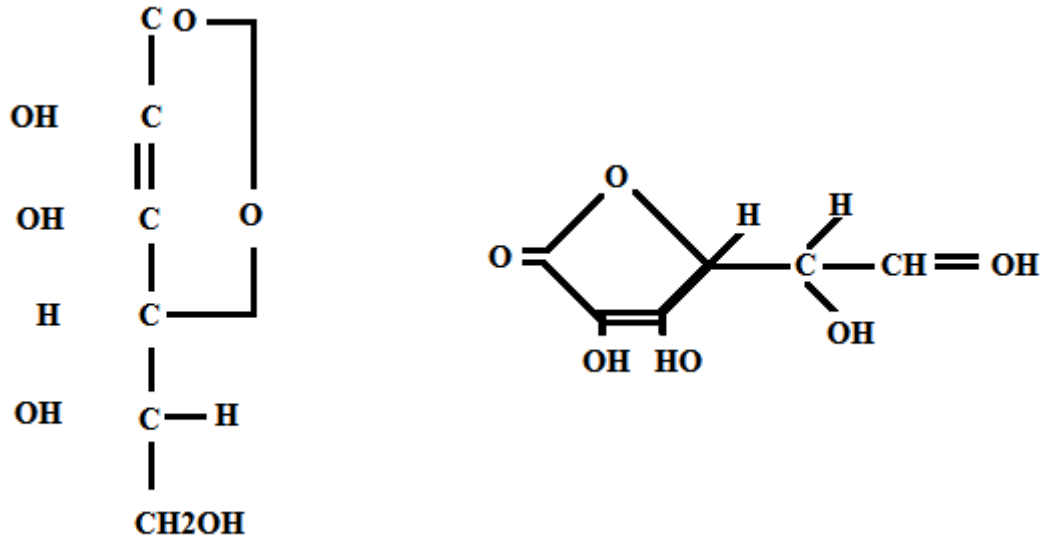


Şekil 1. Dimetoat [16]

DM organizmada asetil kolin esteraz gibi önemli sinir sistemi enzimini inhibe eder. Bu enzim özellikle nörotransmitter madde alımında önemli bir etkiye sahiptir. Bu pestisitinin inhibisyon etkisi asetil kolin esterazda geri dönüşümsüz olup uzun süre etkisini göstermektedir [17]. DM'nin toprakta, suda ve çevrede kalıcılığı düşük seviyededir (yarı ömrü 4-16 gün). DM'nin açık sulardan uzaklaşması buharlaşma ve fotoliz gibi kimyasal bozunmalar veya mikrobiyal fonksiyonlar ile mümkün olabileceği kaydedilmektedir [18].

2.3. Askorbik asit (C vitamini)

İnsan sağlığı için önemi her geçen gün daha fazla anlaşılan askorbik asit (AA), uluslararası terminolojide “Vitamin C” olarak da adlandırılmaktadır. Altı karbonlu bir yapıya sahip olup glukozu benzer. Kapalı formülü $C_6H_8O_6$ olan bir ketolaktondur. Molekül ağırlığı 176.1, açık formülü ise Şekil 2’ de görüldüğü gibi iki formda gösterilmektedir [19].



Şekil 2. Askorbik asit [19].

Suda eriyen vitaminlerden olan AA, özellikle yeşil renkli taze sebze ve meyvelerde bulunmaktadır, insanlarda ve diğer canlılarda vitamin C’nin dışarıdan alınması zorunlu iken, bazı memeliler ve sıçanlar glukoz üzerinden vitamin C sentezleyecek enzim sistemlerine sahiptirler [19].

Böbreküstü bezlerin adrenal kortekslerinde C vitamini konsantrasyonunun artması kortikosteroidlerin sentez ve salınımını önlemekle beraber, kandaki C vitamini artışının da immun sistemini kortikosteroidlerin baskısından koruyarak strese adaptasyonun sağlanmasında önemli rol oynayabileceği öngörülmektedir [10]. Yapılan çalışmalarda C vitamininin balıklar için son derece önemli olduğu ortaya konmuştur. C vitamininin eksikliğinde birçok metabolik fonksiyon etkilenmektedir. Bunların yanı sıra kollojen oluşumu ve yaraların iyileşmesi, detoksifikasyon reaksiyonları ve bağışıklık sistemi etkilenmektedir [20].

2.4. *Capoeta capoeta* (Guldenstaedt 1773)'nın Sistematikteki Yeri

Regnum (Alem)	: Animalia
Subregnum (Alt alem)	: Metazoa
Phylum (Şube)	: Chordata
Subphylum (Alt şube)	: Vertebrata
Superclass (Üst sınıf)	: Pisces
Class (Sınıf)	: Osteichthyes
Subclass (Alt sınıf)	: Actinopterygii
Superordo (Üst takım)	: Teleostei
Order (Takım)	: Cypriniformes
Family (Aile)	: Cyprinidae
Genus (Cins)	: <i>Capoeta</i>
Species (Tür)	: <i>Capoeta capoeta</i> [21]

2.4.1. Familya ve cins özellikleri

Ülkemizde yaşayan kemikli balıkların, özellikle de tatlı su balıklarının büyük bir kısmını Cyprinidae familyası oluşturmaktadır. Kura-Aras Havzasında oldukça yaygın bir familyadır. Bu familya üyelerinde baş çıplak, vücut ise sikloit tip pullarla örtülüdür. Ağızda maksiller (maxiller) diş bulunmamaktadır. Bazı türlerde ağız protraktil (körüklü) karakterde olup, tıpkı bir körüklü hortum şeklinde ileriye doğru uzayıp kısalabilmektedir. Yağ yüzgeci (adipöz doku) bulunmamaktadır. Bu familyanın en karakteristik özelliği olarak farinks dişlerinin varlığı gösterilebilir. Bu dişler genellikle operkulumun altında ve 4. solungaç yaylarının gerisindeki faringien kemikler üzerinde olup sıra, sayı ve şekilleri türlere göre büyük farklılıklar gösterir. Bu nedenle, cinslerin ve türlerin ayırımında önemli diagnostik özellikler olarak dikkate alınırlar. Sırtta daima tek dorsal yüzgeç vardır. Ventral yüzgeçler ise, bütün cins ve türlerde abdominal tiptedir. Hava keseleri mevcut olup, daima bir boğumla iki loba ayrılmıştır. Ayrıca pneumatofor adı verilen bir kanal sayesinde özofagus ile devamlı irtibat

halindedir. Omur şeridinin ilk dört omuru birbiriyle az çok kaynaşarak Weber kemikleri denilen özel bir formasyon meydana getirmişlerdir. Mide civarında pilorik çekum denilen kör bağırsaklar bulunmaz. Genellikle bıyiksız görünümde olsalarda bazen bir veya iki çift bıyık taşıyan temsilcilerine rastlanmaktadır. Ağız konumu itibariyle terminal, yukarıya yönelik veya alt durumlu olabilir.

Çoğunlukla sürüler halinde yaşarlar. Üreme zamanı ilkbahar ve yaz aylarıdır. Bu zamanda özellikle erkeklerin daha parlak ve süslü bir görünüm kazandığı, özellikle baş ve vücutları üzerinde küçük üreme tüberküllerinin meydana geldiği dikkati çekmektedir.

Ekonomik önemi olan bu familyanın bazı temsilcileri çabuk büyümeleri, yapay döllenme yoluyla yetiştirilmelerinin nispeten kolay olması gibi nedenlerle doğal yaşam alanlarının dışındaki birçok ülkelere insanlar tarafından taşınmışlardır.

Esas itibariyle, Eski Dünya Kıtaları adını verdiğimiz Asya, Avrupa ve Afrika' da yayılış göstermektedirler. Bununla beraber, Amerika'nın Kuzeye yakın bölgelerinde de bulunmaktadır. Daha da genelleştirecek olursak, Madagaskar, Avustralya, Yeni Zelanda, Güney Amerika, Kuzey Kanada ve Alaska, Grönland ve İzlanda hariç olmak üzere bütün dünyaya dağılmışlardır. Madagaskar ve Amazon civarındaki mevcudiyetleri insanlar tarafından çeşitli maksatlar için taşınmalarıyla mümkün olmuştur. Bu familya dünya üzerinde 15000'e yakın tür ile temsil edilirse de, Türkiye'de 30 cins ve 70 türü bulunmaktadır [21, 22].

2.4.2. *Capoeta capoeta* (Guldenstaedt 1773)

Vücut yuvarlak olup, kısmen iri pullarla örtülmüştür. Baş, boyun, vücut yüksekliğinden biraz daha büyük veya ona eşit olabilir ve kuyruksuz vücut boyunda 4,3-4,8 defa bulunur. Üzerleri boynuzsu bir madde ile çevrelenmiş ve iyi gelişmiş dudaklar vardır. Ağız köşelerinde bir çift kısa bıyık yer alır. Dorsal'in serbest kenarı hafifçe içeriye doğru kavisli ve sonuncu basit ışının kaideden itibaren 2/3'ü testere şeklinde dişlenmiştir. Aynı ışının serbest ucu ise, tırtıksız, ince ve esnektir.

Renk sırtta koyu esmer, karın bölgesinde kirli sarıdır. Henüz erginlik çağına ulaşmamış genç fertlerde vücut üzerinde siyahımsı renkli küçük benekler görülse de erginlerde bu benekler tamamen kaybolur ve bütün vücut homojen bir görünüş kazanır. Uzunluğu en fazla 70 cm kadardır.

Esas yayılış alanı Aras ve Kura nehir sistemleri olan bu tür ülkemizde Kuzeydoğu Anadolu bölgesinde yoğun şekilde yaşamakta olup, söz konusu nehirlerin sınırlarımız içerisinde kalan kaynak ve kollarında bilinmektedir. Yöredeki insanlar besin olarak tüketirler. Bu nedenle ekonomik önemi vardır [22].



Resim 2.3.2 : *Capoeta capoeta* (Siraz balığı, Guldenstaedt 1773)

2.5. Çalışma Alanı Hakkında Genel Bilgi

Uzunluğu yaklaşık 93 km olan Kars Çayı, Allahuekber dağlarından Arpaçay baraj gölüne kadar uzanır. Sarıkamış Çayı, Kekeç Çayı, Katranlı Çayı, Bayburt Suyu, Susuz Çayı, Çıldır Göluyağı, Karahan Çayı ve Tazekent Suyu olarak isimlendirilen yan kolların birleşmesinden oluşur. Tipik bir tatlı su ekosistemi olan Kars Çayı biyolojik çeşitlilik açısından büyük öneme sahiptir. Amatör olarak balıkçılık yapılabilen Kars Çayı, morfolojik özellikleri nedeniyle çeşitli türlerin habitatı olduğu gibi, özellikle balıklar için uygun bir yaşama ortamıdır. Kars Çayı'nda birçok atık birikmektedir. Evsel atıklar, endüstriyel atık suları, tarımsal sular ve kanalizasyon suları, çiftliklerden gelen hayvansal gübreler ve bunlarla gelen pestisitler çaydaki metal yükünü de arttırmaktadır [23, 24]. Çayda sıkça görülen balık türleri; *Leuciscus cephalus orientalis*, *Barbus capito capito*, *Carassius carassius*, *Capoeta capoeta* ve *Silurus glanis*. Bu türler arasında hakim olan tür ise *Capoeta capoeta* olarak bildirilmektedir [23].

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Deney Düzenegi:

Bu çalışmada, Kars Çayı'nda yaşayan ve ağırlıkları 120-170 g arasında değişen 40 tane *Capoeta capoeta* kullanıldı. Balık örneklerinin toplandığı nehir suyunun kalitesi pH 8.1-8.3, çözülmüş oksijen miktarı 4.95-10.51 mg/L ve sıcaklığı 16.5-18.2 °C olarak bildirilmektedir [25]. Balıklar Kars Çayı'ndan yakalanarak laboratuvar ortamında 300'er L'lik tanklara alındı. 10 gün süreyle ortama adaptasyonları sağlandıktan sonra 10'ar balık bulunan 4 grup oluşturuldu. I. gruptaki balıklar normal su ortamına, II. gruptaki balıklar 100 mg/L AA (Adler, Türkiye) içeren su ortamına, III. gruptaki balıklar 2mg/L DM (Cansagor Dimethoate 40EC) içeren su ortamına ve IV. gruptaki balıklar ise 100 mg/L AA ve 2 mg/L DM içeren su ortamına alınarak 10 gün süreyle bekletildi. Çalışma süresi sonunda elektroforetik ve histopatolojik çalışmalar için balıklardan kan ve doku örnekleri alındı. Alınan kan numuneleri +4 °C ve 4000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek serumun ayrılması sağlandı. Alınan serumlar analizler yapılncaya kadar -20 °C'de saklandı. Numunelerin protein konsantrasyonları biüret yöntemi ile ölçüldü [26]. Doku örnekleri ise histopatolojik inceleme için %10'luk formalin solüsyonuna alınarak tespit edildi.

3.2 Histopatolojik Çalışmalar:

Formalin solüsyonunda 24 saat tespit edilen böbrek, bağırsak ve karaciğer doku örneklerinden 3-5 µ kalınlığında kesitler alındı. Elde edilen kesitlerin tamamı Hematoksilen – Eosin boyama yöntemi ile boyanarak ışık mikroskobu (Olimpus) altında incelendi.

3.3. Balıklarda Kan Alma Yöntemleri

Balıkların kalplerinden ve kuyruklarından yeterli miktarda kan alabilmek için aşağıda belirtilen işlemlerden yararlanıldı.

Canlı: Kan alınacak numune canlı iken başı yukarıda ve kuyruğu aşağıda olacak şekilde tutulur ve bir vuruşta kuyruğu kesilerek dorsal aort damarından kan alımı gerçekleştirildi.

1. Canlı iken;

a- Kalpten

b- Kuyruk kesilerek

3.3.1 Kalpten Kan Alınması

Siraz balıkları canlı iken, elektroşok, anestezi veya başa darbe ile vurularak bayıltıldıktan hemen sonra balık sol tarafına yatırıldı. Diğer bir kişinin yardımı ile balık karın ve kuyruk kısmından tutulur. Sağ solungaç kaldırıldıktan sonra *cleithrum* kemiğinin oluşturduğu kemerin hemen önünden alt üçte bir mesafeden 1.3 numaralı hipodermik iğne ile yatay düzleme 40-45 derecelik bir açı yapacak şekilde direkt kalbe girilip enjektörle yeterli miktarda (3-4 mL) kan alınır. Ayrıca, laparotomi yapılan bir balıktan hipodermik iğne ile kalbe girilip balığın ağırlığı ile orantılı olarak istenilen miktarda kan alınır [26].

3.3.2. Kuyruktan Kan Alınması

Balıklar, başlarının hemen arkasından kuyruk kısmı aşağıda kalacak şekilde statife bağlı bir kıskaçla tespit edilirler. Pedünkül hemoskülatör ile kan damarlarını kapatamayacak şekilde sıkıştırılıp hareketsiz hale getirildikten sonra keskin bir bıçak ile kuyruk tek darbeye kesilir ve dorsal aorttan akmakta olan kan normal plastik tüplere direkt alınır [26].

Hangi yöntemle olursa olsun, balıktan kan alma işlemi en fazla 45 saniyede tamamlanmalıdır.

2. Elektroşokla

a- Kalpten

b- Kuyruk kesilerek.

Elektroşok: Kan almadan önce balıklar bireysel olarak içerisinde 20 L su bulunan kovalara alınır. Elektroşok (medica) ile suya 5-10 sn 5 voltluk elektrik akımı verilerek balıklar hareketsiz hale getirilir.

3. Anestezi edilerek

a- Kalpten

b- Kuyruk kesilerek

Anestezi: Anesteziye tabi tutulacak balıklarda içerisinde 20 L su bulunan ve 0.4 mL Chinaldin ($C_{10}H_9N$) karıştırılan kovalara tek tek bırakılır, 15-45 saniyede hareketsiz hale getirilir.

4. Başlarına darbe

a- Kalpten

b- Kuyruk kesilerek

Darbe: Bir yardımcı tarafından başın arka kısmından ve kuyruk kısmından tutulan balığın başına uygun ağırlıkla bir cisimle darbe yapılır.

5. Laporatomisi

a- Kalpten

Laporatomisi: Bir yardımcı tarafından sırt üstü yatırılan ve hareketsiz hale getirilen balığın göğüs ve karın boşluğu arzu edilen şekilde dişli pens ve bisturi ile açılır.

3.4. Total Protein Tayini

Derin dondurucudan çıkarılan serum numunelerinin çözülmesi beklenildi ve total protein tayini işlemine geçildi. Analiz öncesi her serum numunesi serum fizyolojikle 1:10 oranında sulandırıldı. Numunelerin total protein tayini biüret metoduyla yapıldı [27].

Çizelge 3.4.1. Total protein tayin prosedürü.

Çözeltiler	1-Kör tüpü	2-Standart tüpü	3-Numune tüpü
Albumin standardı (10mg/ml)	--	0.1 mL	--
Serum (Numune)	--	--	0.1 mL
%0,9 NaCl	1.4 mL	1.3mL	1.3 mL
Biüret çözeltisi	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL

Çizelge 3.4.1' de verilen sıraya göre kör, standart ve numune tüpleri hazırlandı. Bir numaralı tüp protein taşımayan “kör tüpüdür”. Tüpler hazırlanırken biüret çözeltisi en son ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Oda sıcaklığında 30 dk bekletildikten sonra kör tüpü ile spektrofotometre 540 nanometre dalga boyunda sıfır absorbansa ayarlandı. Daha sonra standart ve numunelerin absorbansları ölçüldü.

Numunenin Protein Konsantrasyonlarının Hesabı:

Numunenin Absorbansı

Numune Protein Konsantrasyonu (mg/ml): _____ x10

Standartın Absorbansı

3.5. Elektroforetik Çalışmalar

Biüret metoduna göre total protein tayini yapılan serum numuneleri Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE), vertikal slab jel elektroforez sistemi kullanılarak Laemmli [28] ve O'Farrell [29] metotlarına göre yapıldı.

3.5.1. % 30'luk Akrilamid Çözeltisi

Hassas terazide 7.5 g Akrilamid ve 200 mg Bisakrilamid tartılarak bir miktar distile suda eritildi. Total hacim 25 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti oda sıcaklığında koyu renkli şişede 2-3 ay dayanıklıdır. Akrilamid çözeltisinin nörotoksik etkili olması nedeniyle çalışırken eldiven kullanılmalıdır.

SDS-Poliakrilamid jel solüsyonu için pH ve molariteleri farklı stoklama ve ayırma jel tamponları hazırlandı.

3.5.2. Stoklama jel tamponu (0.5 M Tris-HCl , pH 6.8)

Hassas terazide 1.5 g Tris ve 100 mg SDS tartılarak yaklaşık 10 mL dH₂O'da eritildi. Daha sonra pH'sı 6.8 olana kadar HCl çözeltisinden (1M) ilave edildi (yaklaşık 1M HCl' den 7mL). Total hacim dH₂O ile 25 mL'e tamamlandı ve +4°C'de muhafaza edildi.

3.5.3. Ayırma jel tamponu (3 M Tris-HCl, pH 8.8)

Hassas terazide 9.075 g Tris ve 0.2 g SDS tartılarak 7.5 mL dH₂O'da eritildi. Daha sonra tamponun pH'ı 1M HCl çözeltisi ile 8.8'e ayarlandı. Total hacim dH₂O ile 25 mL'ye tamamlandı ve +4°C'de muhafaza edildi. 1M HCl çözeltisi, 11.7M'lık stok HCl'den 8.55 mL alındı ve total hacim dH₂O ile 100 mL'ye tamamlanmak suretiyle hazırlandı.

3.5.4. Yürütme tamponu (0.025 M Tris, 0.192 M Glisin , pH: 8.3)

3.03 g Tris, 14.4 g Glisin ve 1g SDS hassas terazide ayrı ayrı tartıldı ve ilk önce Tris ve Glisin 750 mL dH₂O'da eritildi, sonra SDS eklenerek pH 8.3'e ayarlandı. Total hacim distile suyla 1000 mL'ye tamamlanarak +4 °C'de muhafaza edildi.

3.5.5. Numune tamponu (0.0625 M Tris- HCl, pH: 6.8)

Stoklama jel tamponu (0.5 M Tris- HCl, pH 6.8)	1.25 mL
SDS	195 mg
Gliserol (%99'luk)	1 mL
2- Merkaptolanol	0.5 ml
Bromophenol blue	1-2 mg

Distile suyla 10 mL'ye tamamlandı ve +4°C'de muhafaza edildi.

3.5.6. Jelin boyanması işlemi

Boyama işlemi için önce Coomassie blue çözeltisi hazırlandı.

Boyama çözeltisi:

Coomassie Brilliant Blue R.250	125 mg (%0.025)
Ethanol	200 mL (%40)
Asetik Asit (CH ₃ COOH)	35 mL (%7)

Total hacim distile suyla 500 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan bu boyama solüsyonu 20-40 defa kullanılabilir. Jeller bu boya solüsyonunda 2-4 saat bekletilmek suretiyle boyanırlar. Her

jel için kendi hacminin 5-10 katı hacminde boya solüsyonu kullanıldı. Boyama esnasında hafifçe çalkalama işlemi jellerin daha iyi boyanmasını sağladı. Boyama işlemi çalkalamalı benmari su banyosunda 56-60°C'de bekletilmek suretiyle daha kısa sürede (20 dk) tamamlanabilir. Bu esnada sık sık çalkalama işlemi yapılmalıdır.

Bu yöntem her çizgide 0.1-0.5 mg proteini boyayabilir.

3.5.7. Jelden boya çıkarma işlemi

Jeli boyadan çıkarma işleminde iki metot vardır. Bunlar;

1. Metot;

Methanol %40'lık

Asetik asit (CH₃COOH) %7'lik

Bu solüsyonda jeller 1 saat süreyle bekletilerek ve ara sıra çalkalamak suretiyle boya çıkarma işlemi gerçekleştirilir. Protein bantları dışındaki jel kısımlarının daha iyi beyazlaması isteniyorsa süre daha uzun tutulmalıdır.

2. Metot;

Methanol %5'lik

Asetik asit (CH₃COOH) %7,5'luk

Yapılan bu çalışmada boyadan çıkarma işleminde ikinci metot kullanıldı. Bu solüsyonda jellerin boyadan çıkarma işlemi bir gecede tamamlandı. Ancak, bu süre içinde boyadan çıkarma solüsyonu 2-3 defa değiştirilerek daha iyi sonuç elde edildi.

3.5.8. Diğer kimyasallar ve özellikleri

1. TEMED (N,N,N',N' – Tetrametiletildiamin):

Hazır preparat olarak minimum %99'luk hazır çözeltisi bulunmaktadır. Bu çözelti koyu renkli şişede +4 °C'de konsantre halde süresiz bekletilebilir.

2. %1'lik Amonyum persülfat:

Poliakrilamid jel çözeltisine polimerizasyon için ilave edilen bir ajandır. Karışıma çok az ilave edilmesi nedeni ile 5mL'lik veya daha az hacimde, özellikle deneyden hemen önce hazırlandı. Bu çözeltinin stabil olmaması nedeniyle her deneme için tazesı hazırlandı.

3.5.9. Kesikli tampon sistemli jelin hazırlanması

Kesikli jel sistemi, proteinlerin stoklandığı ve birbirinden ayrıldığı iki farklı konsantrasyonda iki ayrı jelden oluşmaktadır. Bu jelin hazırlanması için ayırma ve stoklama çözeltileri gereklidir.

3.5.9.1. Ayırma jelin hazırlanması

Çizelge 3.5.9.1. Değişik konsantrasyonlarda ayırma jeli hazırlama prosedürü.

Ayırma jelin son konsantrasyonları (%)							
Stok çözeltisi (ml)	20	17.5	15	12.5	10	7.5	5
Poliakrilamid çözeltisi (%30)	20	17.5	15	12.5	10	7.5	5
Ayırma jel tamponu	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75
%1 Amonyum persülfat	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
TEMED	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Distile Su	5.49	7.99	10.49	12.99	15.49	17.9	20.49

Toplam hacim 30 mL olacak şekilde hazırlanır. Bu jel hazırlanırken dikkat edilmesi gereken husus; %1'lik amonyum persülfatın çözeltiliye en son katılmasıdır. Çünkü çözeltiliye amonyum persülfat ilavesinden sonra polimerizasyon işlemi başlamakta ve kısa sürede gerçekleşmektedir.

3.5.9.2. Stoklama jelin hazırlanması

Total hacim 10 mL olacak şekilde hazırlanır. Bu çözeltiyi de hazırlarken %1'lik amonyum persülfat'ın en son ilave edilmesine dikkat edilmelidir.

Çizelge 3.5.9.2. Değişik konsantrasyonlarda stoklama jeli hazırlama prosedürü.

Stok çözeltiler (mL)	Stoklama Jelin Son Konsantrasyonları (%)			
	6	5	4	3
% 30 Poliakrilamid	2	1.67	1.33	1
Stok Jel Tamponu	2.5	2.5	2.5	2.5
% 1 Amonyum persülfat	0.5	0.5	0.5	0.5
TEMED	0.075	0.075	0.075	0.075
Distile Su	4.925	5.265	5.595	6.425

3.5.10. Ayırma jelin plağa dökülmesi işlemi

Plağa ilk önce ayırma jel dökülür. Proteinlerin birbirinden ayrılması %10'luk ayırma jelde yapılmıştır. %10'luk jel çözeltisi için;

%30'luk Poliakrilamid çözeltisi	10 mL
Ayırma jel tamponu	3.75 mL
%1'lik Amonyum persülfat	0.75 mL
TEMED	0.01 mL
Distile Su	15.49 mL

Yukarıdaki miktarlar 30 mL jel çözeltisi hazırlamak için gerekli olan miktarlardır. Ayırma jel çözeltisinin toplam hacminin 10 mL olması yeterlidir. Bunun için verilen bu miktarlar 2/3 oranında azaltıldı. Beher içerisine 1:2 ayırma jel tamponu konuldu ve arkasından 5.163 mL dH₂O ilave edildi. Daha sonra 0.0033 mL TEMED ilave edildi. Eğer jel kalınlığı 1 mm'den küçük ise, ortamdaki oksijen uzaklaştırılmalıdır. Bunun için çözeltiyi bir kaç dakika vakum etmek yeterlidir. Aksi takdirde, ortamdaki oksijen polimerizasyonda gecikmeye neden olacaktır. Polimerizan ajan olarak % 1'lik amonyum persülfat kullanılmıştır.

Amonyum persülfat ilave edildikten sonra çözelti hafifçe karıştırılır. Hazırlanan ayırma çözelti 10 mL'lik enjektöre alınır ve vakit kaybetmeksizin düzenekteki boşluğa doldurulma işlemine geçilir. Ayırma jel çözeltisi köpürtülmeksizin düzenekteki işaretli yere kadar doldurulur. Jelin üst yüzeyinin keskin ve düzgün bir çizgi haline geldikten hemen sonra hava ile temasını kesmek için jel yüzeyinde ince bir tabaka oluşturacak kadar dH₂O ilave edilir. %1'lik Amonyum persülfat, 50 mg alınarak 5 mL dH₂O'da çözmek suretiyle hazırlandı. Polimerize olan ayırma jelin üzeri naylon bir poşetle hava almayacak şekilde kapatıldı ve +4 °C'de bir gece bekletildi. Böylece polimerize olmamış akrilamid ve bisakrilamidlerin polimerizasyonu sağlandı. Tam polimerizasyon sonrası akrilamid ve bisakrilamidin nörotoksitesisi ortadan kalkar, dolayısıyla bu aşamadan sonra jellerle direk temas edilebilir.

3.5.11. Stoklama jelin plağa dökülmesi işlemi

Proteinlerin stoklanması %4'lük stoklama jel üzerinde yapılmıştır. %4'lük stoklama jel solüsyonu hazırlamak için, bir mikropipetle aşağıdaki çözeltilerden uygun miktarlarda alındı ve total hacim 3.5 mL'ye tamamlandı.

Buna göre;

%30'lük Akrilamid çözeltisi	0.468 mL
Stoklama jel tamponu (pH 6.8, 0.5 M)	0.833 mL
%1'lik Amonyum persülfat	0.25 mL
TEMED	0.015 mL
Distile Su	1.95 mL
Toplam Hacim:	3.5 mL

Jel yüzeyindeki distile su boşaltıldı ve iki jelin kolay kaynaşması için ayırma jel yüzeyi stoklama tamponla yıkandı. Daha sonra numune yükleme çukurlarını oluşturmak için tarak cam levhalar arasına yerleştirildi. Tarağın kenarından stoklama jel çözeltisi bir enjektörle yavaş bir şekilde plağa aktarıldı. Ancak jel içinde hava kabarcığı bulunmamasına dikkat edildi. Bu arada tarak yerleştirildikten sonra protein uygulanacak kanallar cam kalemlerle işaretlendi. Stok stoklama jel solüsyonu polimerize olduktan sonra tarak alındı ve kanal aralıkları da bir lanset yardımıyla düzeltilti. Protein yükleme çukurları yürütme tamponuyla

bir kaç defa yıkanarak jel artıkları temizlendi. Sonra elektroforez tankları yürütme tamponu ile (Tris-Glisin pH 8.6) dolduruldu ve plaktaki lastik conta ve klempler çıkarıldı. Jel tanka yerleştirilerek plağın alt kısmında oluşan hava kabarcıkları enjektör yardımıyla uzaklaştırıldı. Bu işlemlerden sonra serum numunelerinin hazırlanmasına geçildi.

3.5.12. Serum numunelerinin sulandırılması ve jele yükleme işlemi

1 ve 6,7 numaralı jel çukuruna molekül ağırlıkları bilinen standart proteinler applike edildi. 2 numaralı jel çukuruna kontrol grubu *Capoeta capoeta* serum numunesi, 3 numaralı jel çukuruna 100 mg/L dozda AA *Capoeta capoeta* serum numunesi, 4 numaralı jel çukuruna 2 mg/L dozda DM verilen *Capoeta capoeta* serum numunesi, 5 numaralı jel çukuruna 100 mg/L dozda AA ve 2 mg/L dozda DM verilen *Capoeta capoeta* serum numunesi aktarıldı. Standart olarak, molekül ağırlıkları farklı olan 3 protein kullanıldı. Bunlar; tripsinojen (24 kD), yumurta albumini (45 kD), sığır albumini (66 kD) şeklindedir. Bu standart proteinlerin her birinden 1'er mg alındı ve 1 mL dH₂O'ya 1 mg/mL'lik standart hazırlandı. 1 mg/mL standarttan 200 µL alınıp 200 µL dH₂O ile sulandırıldı. Böylece son protein konsantrasyonu 0.5 µg/µL oldu. Daha sonra sample tamponla 1/2 oranında sulandırıldı. Jele bu standart proteinlerin her birinden 5 µg uygulandı.

Daha sonra total protein konsantrasyonu bilinen serum numuneleri total proteinlerinin gr/dL cinsinden miktarlarına göre sulandırılması işlemine geçildi. *Capoeta capoeta*'dan alınan serum numuneleri sulandırılarak son protein konsantrasyonları 4 µg/µL'ye ayarlandı.

En sonunda her bir numune tüpünden 200 µL serum alındı ve her birinin üzerine 200 µL sample tampon ilave edilerek son protein konsantrasyonu 2 µg/µL'ye ayarlandı.

Hazırlanan serum numuneleri bir beher içerisine bir miktar su konularak 100 °C'de 3 dk süreyle kaynatıldı. Numune tamponundaki 2-merkaptoetanol proteinlerdeki disülfid bağlarını açar ve denatüre olmalarını sağlar. Böylece serum proteinleri tek polipeptidler haline gelmiş olur. Her jel çukuruna 20'şer µL numune uygulandı. Böylece 40 µg protein jele yüklenmiş olur. Numuneler plaktaki yerlerine uygulandıktan sonra proteinler 200 V ve 30 mA'de yürütüldü.

Elektroforez de proteinleri yürütme işlemine yaklaşık 3.5 saat devam edildi. Sürenin sonunda jel tanktan alınarak boyama solüsyonda boyama işlemine geçildi. Bu arada plak üzerindeki stoklama jeli kesilerek atıldı. Jeli içinde 250 mL boyama solüsyonu olan bir kaba bırakıldı.

Jel, 56-60 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 20-30 dk inkübe edildi. Bu esnada kap içindeki boya çözültisi hafifçe çalkalanarak jelin daha çabuk boyanması sağlandı.

Bu işlem tamamlandıktan sonra her jel, boyadan çıkarma işlemi için %5 metanol ve %7.5 asetik asit bulunan bir kaba alınarak protein bantları dışındaki jel kısımlarının şeffaflaşması sağlandı. Bu işlem, jellerin su banyosunda 55-60°C'de 60-70 dk bekletilmek suretiyle yapıldı. Bu esnada jeller hafifçe çalkalandı. Ancak, boyadan çıkarma işlemi esnasında boyadan çıkarma çözültisi bir kaç defa yenilendi. Bu işlemlerden sonra jeller %7'lik asetik asit içinde muhafaza edildi. Sonra jellerin fotoğrafları çekildi. Proteinlerin moleküler ağırlığı Weber ve ark. (1972)'lerinin metoduna göre hesaplandı [30].

4. BULGULAR

4.1. Makroskobik bulgular

Çalışmanın yapıldığı süre içerisinde, tanklardaki balıkların hareketlerinde yavaşlama gözlemlendi. DM ve DM+AA bulunan gruplarda yem alma isteğinin diğerlerine oranla azaldığı tespit edildi. Çalışma esnasında 2 günde bir olmak üzere tanklardaki su ve maddeler yenilendi. 10.günün sonunda DM bulunan tanktaki balıklardan 2, DM+AA bulunan tanktaki balıklardan 2 tane olmak üzere toplam 4 balığın öldüğü tespit edildi.

4.2. Mikroskobik bulgular

Serum numunelerinin SDS-PAGE'den elde edilen elektroforegramında kontrol grubundaki balıkların protein bantlarına göre; 100 mg/L AA bulunan grupta 82 kD, 72 kD, 69 kD, 49 kD, 36 kD ve 30 kD'luk protein bantlarında kalınlaşmalar, 100 kD ve 56 kD'luk protein bantlarında incelmeler, 93 kD, 44 kD ve 26 kD'luk protein bantlarının ise yeni sentezlendiği saptandı. 2 mg/L DM bulunan grupta 82 kD, 72 kD ve 36 kD'luk protein bantlarında kalınlaşmalar, 100 kD, 76 kD, 56 kD ve 30 kD'luk protein bantlarında incelmeler, 46 kD'luk protein bandının ise yeni sentezlendiği saptandı. 100 mg/L AA ve 2 mg/L DM bulunan grupta 82 kD, 76 kD ve 36 kD'luk protein bantlarında kalınlaşmalar, 100kD, 97 kD, 56 kD ve 30 kD'luk protein bantlarında incelmeler, yine aynı grupta 46 kD ve 26 kD'luk protein bantlarının ise yeniden sentezlendiği saptandı (Resim 4.1.).

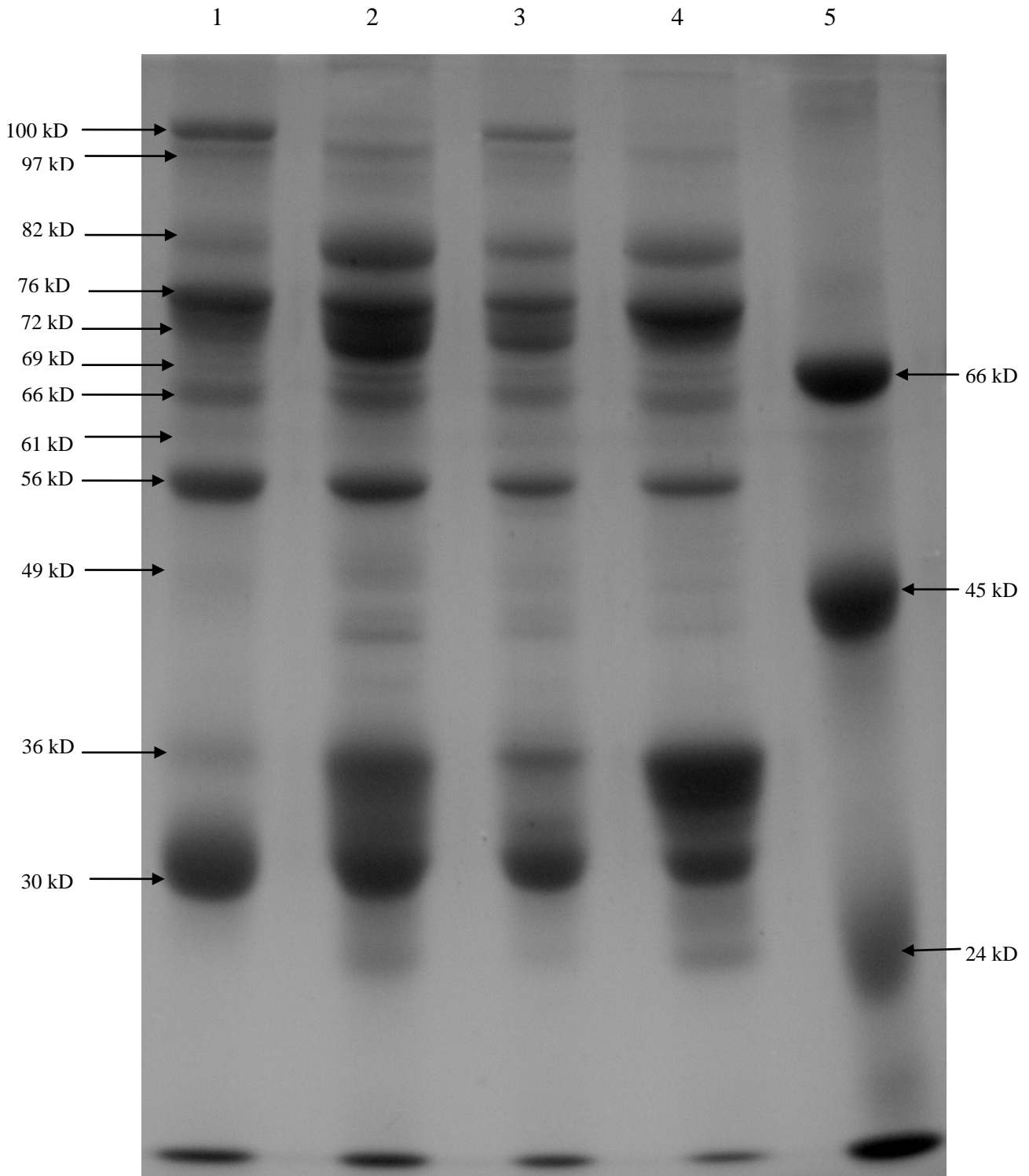
Kontrol grubu ince bağırsak preparasyonları incelendiğinde, bağırsağın villusları ve düz kas dokusu genel olarak görülmektedir. Aynı zamanda bağırsağın koruyucu epiteli olan tek katlı silindirik epitel ve epitelyum içinde yerleşmiş goblet hücreleri net bir şekilde izlenmektedir. (Resim 4.2.). Kontrol grubu karaciğer preparasyonlarında, karaciğeri oluşturan temel yapısı olan Vena centralis ve çevresindeki hepatositler net olarak gözlenmektedir (Resim 4.3.). Kontrol grubu böbreği oluşturan tüm preparasyonlarda proksimal ve distal tubulusları oluşturan epitel hücreleri genel olarak iyi bir şekilde izlenmektedir (Resim 4.4.).

DM grubu bağırsaklardan alınan kesitlerdeki preparasyonlarda villuslarda yırtılmalar, epitelde bozulmalar ve goblet hücrelerinin dağılımı azalmış olduğu net bir şekilde izlenmektedir (Resim 4.5.). DM grubu böbrek preparasyonlarında böbrek dokusunda izlenen proksimal ve distal tubuluslar, aralarında yoğun bir şekilde izlenen mononükleer hücreler net olarak görülmektedir. Yine bowman kapsülü iki farklı biçimde (birinde bozulmakta, diğerinde daha

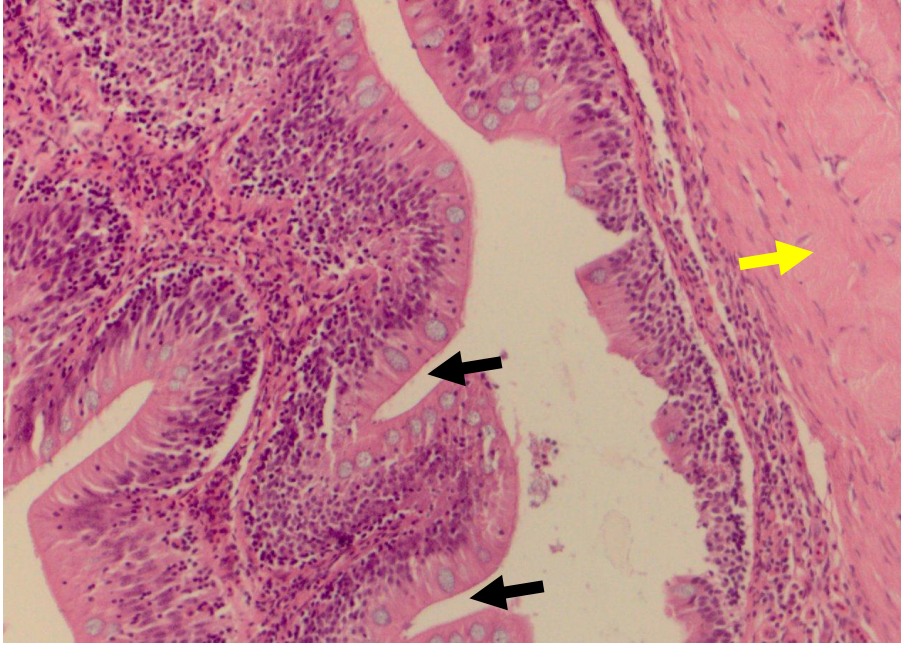
düzgün bir şekilde) gözlenmektedir (Resim 4.6). DM grubu karaciğeri oluşturan Vena centralis ve çevresinde ışınsal yapının 1. zondan itibaren kaybolduğu hepatositler izlenirken, Vena centralisden perifere doğru tanımlanan zon 2 ve zon 3'deki hepatik hücrelerde dejenerasyonlar; piknotik nükleus ve vakuolizasyon dikkat çekmektedir (Resim 4.7.).

AA grubu bağırsak preparasyonlarında balığın barsağındaki tek katlı silindirik epitel hücrelerinin sınırlarının kaybolduğu goblet hücrelerinin ise yoğun bir şekilde azaldığı ve yoğun infiltrasyonlar gözlenmektedir (Resim 4.8.). AA grubu böbrek dokusunun preparasyonlarında, DM uygulanan preparasyonlarda olduğu gibi proksimal ve distal tubuluslar, aralarında yoğun bir şekilde izlenen mononükleer hücreler pek fazla bir şekilde etkilemediği net olarak izlenmektedir (Resim 4.9.). AA grubu karaciğer dokusu preparasyonlarında, hepatik hücrelerin ışınsal yapısının bozulduğu ve safra yolu izlenmektedir. Bazı bölgelerde ise yoğunlaşmış alanlar tespit edildi (Resim 4.10.).

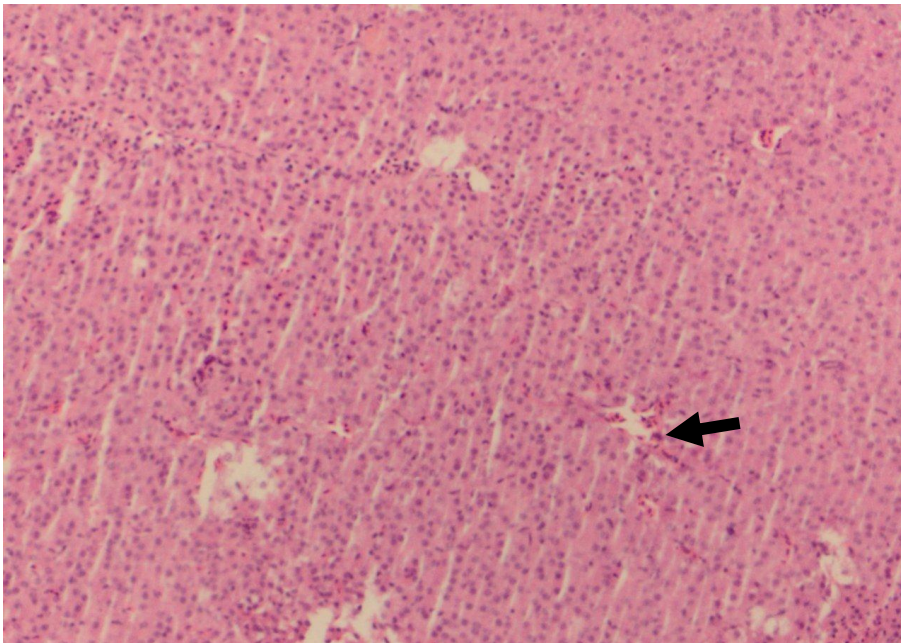
DM ve AA grubu bağırsak preparasyonlarında, kısmen DM'in zararlı etkisinin AA tarafından azaltıldığı dikkat çekmektedir, epitelyum ve goblet hücreleri rahatlıkla gözlenmektedir. Ayrıca infiltre alanlar izlenmektedir. Yine bazı bölgelerde de mukozayı oluşturan epitelde deskuamasyonlar gözlemlendi (Resim 4.11.). DM ve AA grubu böbreklerden alınan kesitlerde, Tübüller rahatlıkla izlenirken AA'in etkisine bağlı olarak infiltre alanlarda azalmalar bazı bölgelerde ise yoğunluklar gözlenmektedir (Resim 4.12.). DM ve AA grubu preparasyonlarda karaciğeri oluşturan Vena centralis ve çevresinde ışınsal yapının 1. zondan itibaren kaybolduğu hepatositler izlenirken, Vena centralisden perifere doğru tanımlanan zon 2 ve zon 3'deki hepatik hücrelerde dejenerasyonlar, piknotik nükleus ve vakuolizasyon dikkat çekmektedir. Ayrıca yine hepatik hücrelerde bozulmalar zon 2 ve zon 3 de kolaylıkla gözlenmektedir. AA'in karaciğerde pek etkili olmadığı gözlemlendi (Resim 4.13.).



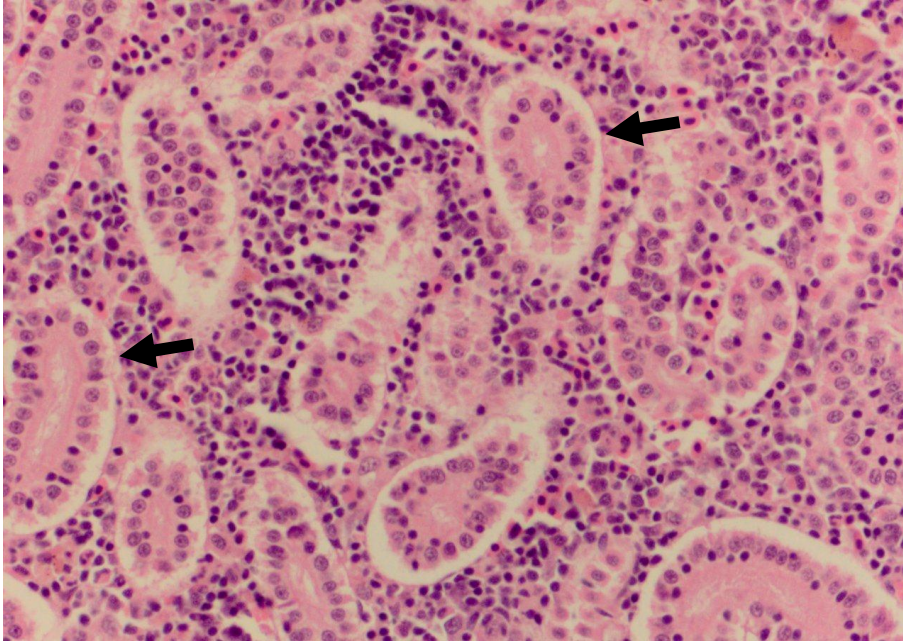
Resim 4.1. DM ve AA'e maruz bırakılan *Capoeta capoeta*'nın SDS-PAGE yöntemiyle elde edilen serum proteinlerinin elektroforegramı. 1) Kontrol grubu, 2) 100 mg/L AA grubu, 3) 2 mg/L DM grubu, 4) 100 mg/L AA+ 2 mg/L DM grubu, 5) Standart protein bandları.



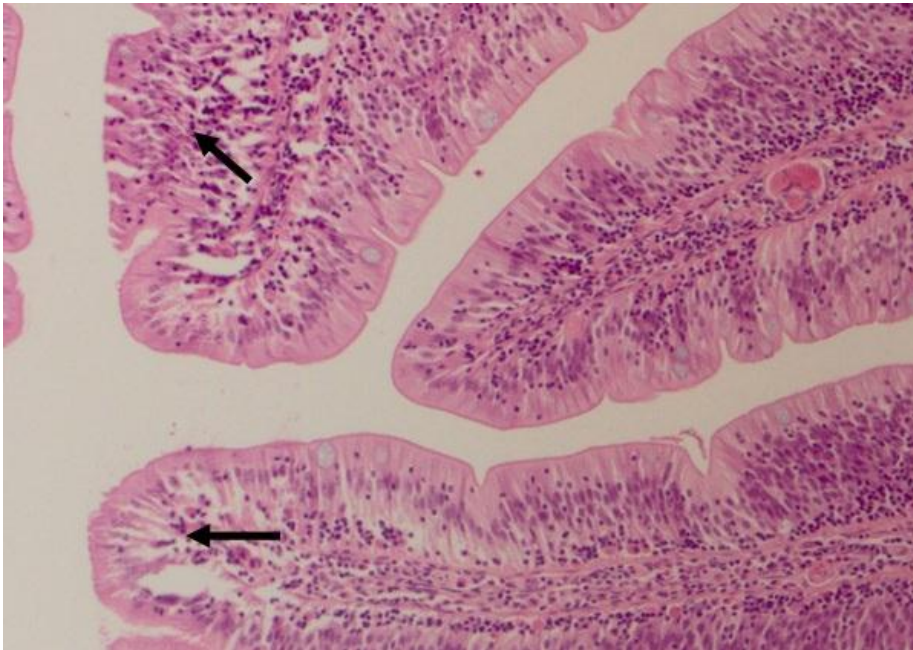
Resim 4.2. *Capoeta capoeta* kontrol grubu bağırsak dokusu. Bağırsağın villusları ve düz kas dokusu (sarı ok) görülmektedir. Aynı zamanda bağırsağın koruyucu epiteli olan tek katlı silindirik epitel ve epitelyum içinde yerleşmiş goblet hücreleri (siyah oklar) net bir şekilde izlenmektedir. H-EX4.



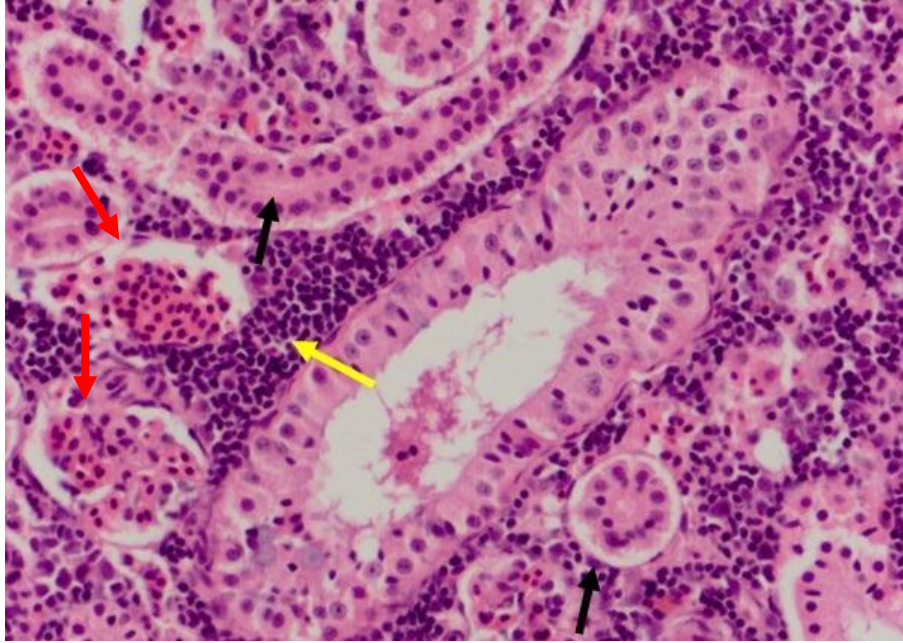
Resim 4.3. *Capoeta capoeta* kontrol grubu karaciğer dokusu. Karaciğer Vena centralis (siyah ok) çevresindeki hepatositler net olarak gözlenmektedir. H-EX4.



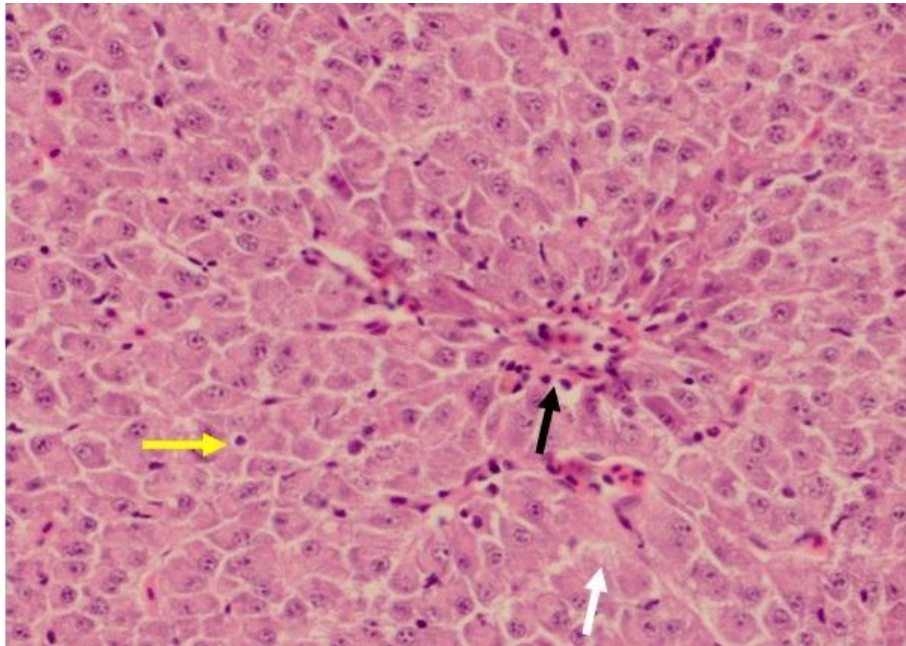
Resim 4.4. *Capoeta capoeta* kontrol grubu böbrek dokusu. Böbrekte izlenen proksimal ve distal tubuluslar (oklar), aralarında teğet geçmiş hücrelerle izlenmektedir. H-EX10.



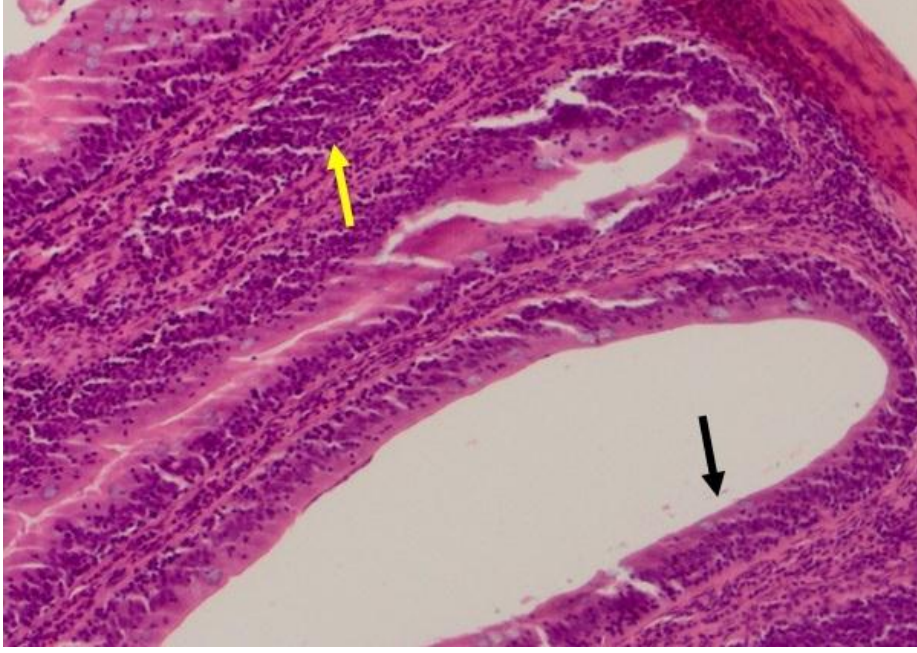
Resim 4.5. *Capoeta capoeta* DM grubu bağırsak dokusu. Bu deney grubunun preparasyonunda villuslarda yırtılmalar (oklar) epitelde bozulmalar ve goblet hücrelerinin dağılımı azalmış olduğu net bir şekilde izlenmektedir. H-EX4.



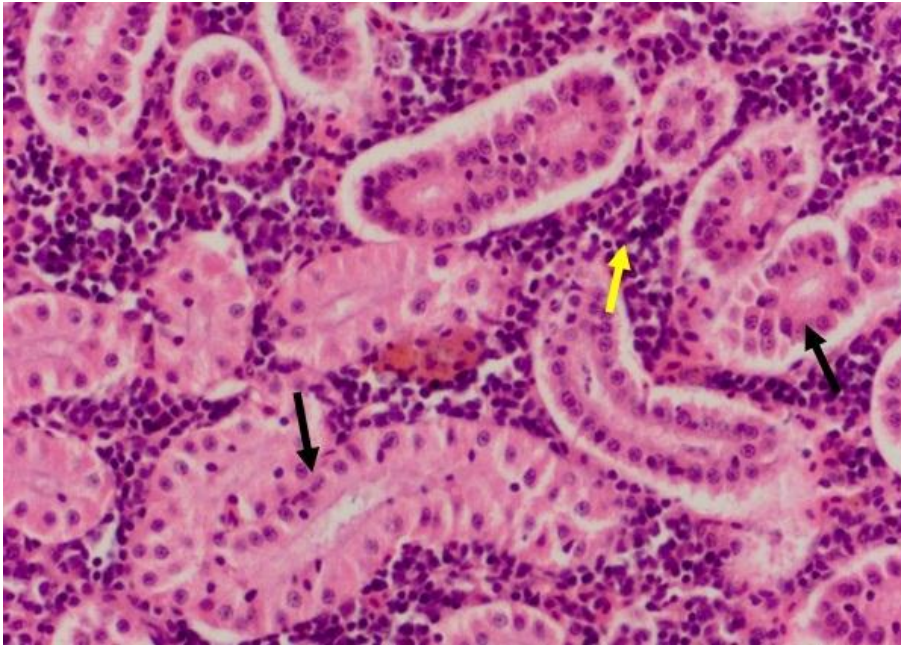
Resim 4.6. *Capoeta capoeta* DM grubu böbrek dokusu. Böbrekte izlenen proksimal ve distal tubuluslar (siyah oklar), aralarında yoğun bir şekilde izlenen mononükleer hücreler (sarı ok) net olarak görülmektedir. Yine bowman kapsülü iki farklı biçimde (birinde bozulmakta, diğesinde daha düzgün bir şekilde, kırmızı oklar) gözlenmektedir. H-EX10.



Resim 4.7. *Capoeta capoeta* DM grubu karaciğer dokusu. Vena centralis (siyah ok) ve çevresinde ışınal yapının 1. zondan itibaren kaybolduğu hepatositler izlenirken, Vena centralisten periferine doğru tanımlanan zon 2 ve zon 3'deki hepatik hücrelerde dejenerasyonlar; piknotik nükleus (sarı ok) ve vakuolizasyon (beyaz ok) dikkat çekmektedir. H-EX10.



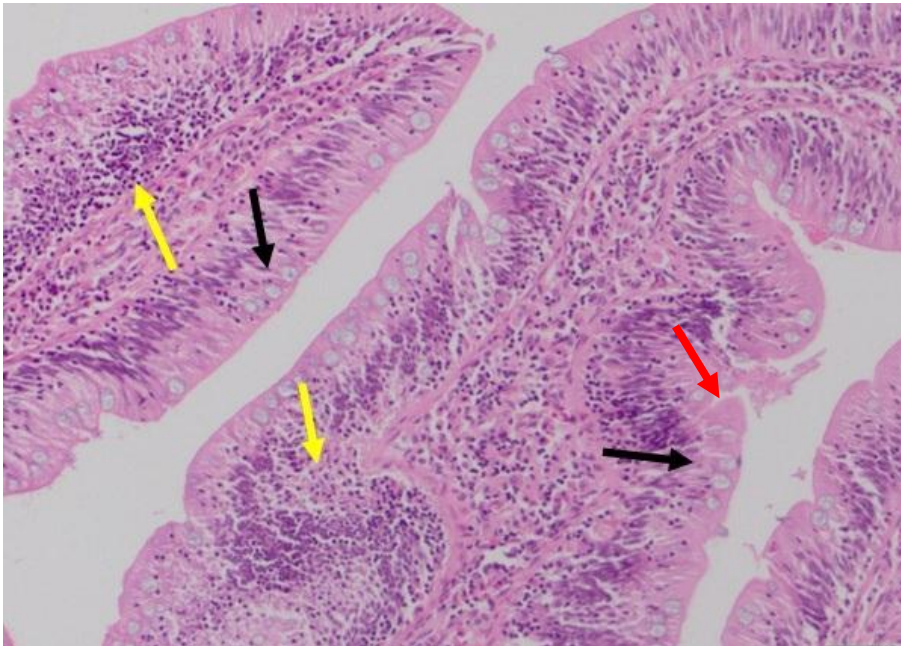
Resim 4.8. *Capoeta capoeta* AA grubu bağırsak dokusu. AA uygulanan balığın barsağındaki tek katlı silindirik epitel hücrelerinin sınırlarının kaybolduğu goblet hücrelerinin ise yoğun bir şekilde azaldığı (siyah ok) ve yoğun infiltrasyonlar (sarı ok) gözlenmektedir. H-EX4.



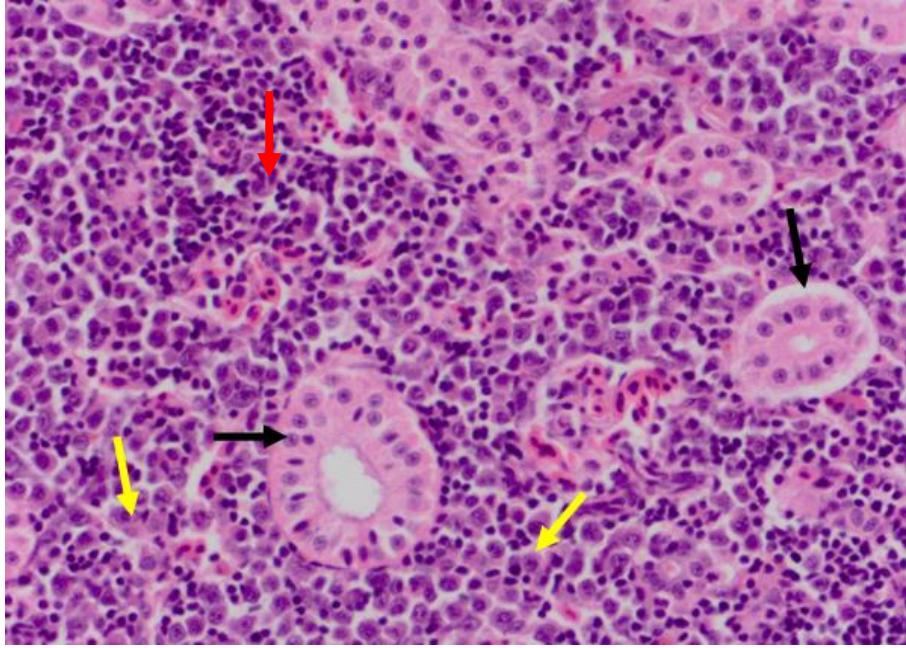
Resim 4.9. *Capoeta capoeta* AA grubu böbrek dokusu. DM uygulanan preparasyonlarda olduğu gibi proksimal ve distal tubuluslar (siyah oklar), aralarında yoğun bir şekilde izlenen mononükleer hücreler (sarı ok)'in fazla bir şekilde etkilenmediği net olarak izlenmektedir. H-EX10.



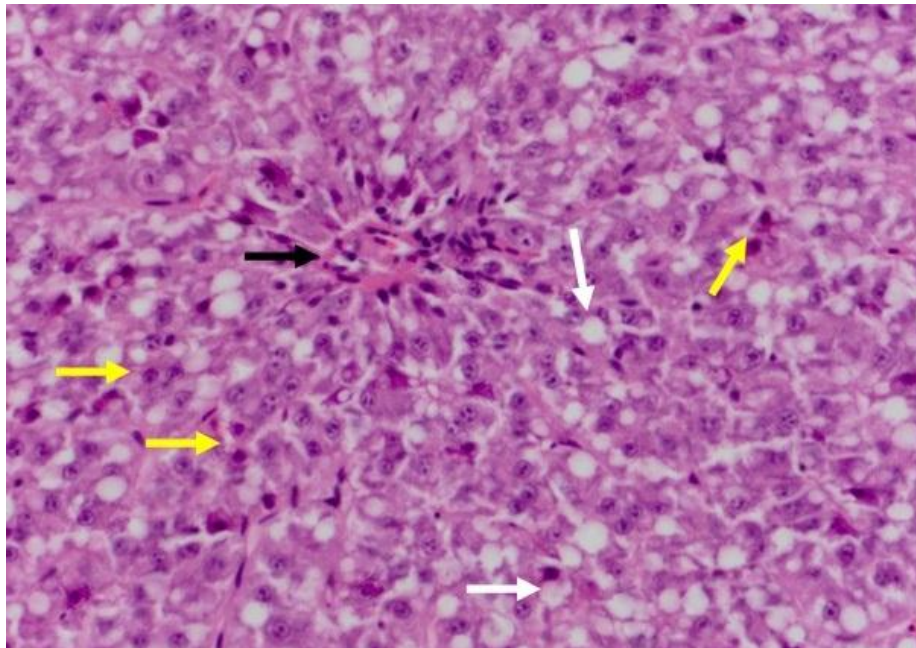
Resim 4.10. *Capoeta capoeta* AA grubu karaciğer dokusu. Karaciğerde hepatik hücrelerin ışınsal yapısının bozulduğu ve safra yolu (siyah ok) izlenmektedir. Bazı bölgelerde ise yoğunlaşmış alanlar tespit edildi (kırmızı ok). H-EX10.



Resim 4.11. *Capoeta capoeta* DM + AA grubu bağırsak dokusu. Kısmen DM'in zararlı etkisinin AA tarafından azaltıldığı dikkat çekmektedir, epitelyum ve goblet hücreleri (siyah oklar) rahatlıkla gözlenmektedir. Ayrıca infiltre alanlar (sarı oklar) izlenmektedir. Mukozayı oluşturan epitelde deskuamasyonlar (kırmızı ok) gözlendi. H-EX4.



Resim 4.12. *Capoeta capoeta* DM + AA grubu böbrek dokusu. Tübüller (siyah oklar) rahatlıkla izlenirken AA'in etkisine bağlı olarak infiltrate alanlarda (sarı oklar) azalmalar, bazı bölgelerde ise yoğunluklar (kırmızı ok) gözlenmektedir. H-EX10.



Resim 4.13. *Capoeta capoeta* DM + AA grubu karaciğer dokusu. Vena centralis (siyah ok) ve çevresinde ışınal yapının 1. zondan itibaren kaybolduğu hepatositler izlenirken, Vena centralisten periferde doğru tanımlanan zon 2 ve zon 3'deki hepatik hücrelerde dejenerasyonlar piknotik nükleus (sarı oklar) ve vakuolizasyon (beyaz oklar) dikkat çekmektedir. Ayrıca yine hepatik hücrelerde bozulmalar zon 2 ve zon 3 de kolaylıkla gözlenmektedir. AA'in karaciğerde pek etkili olmadığı gözlemlendi. H-EX10.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Clarias batrachus üzerine yapılan bir çalışmada, 45 µg/L DM ve 50 mg/L AA'e 30 ve 60 gün süreyle maruz bırakılan balıkların karaciğer enzim aktiviteleri ile karaciğerdeki histomorfolojik değişimlerle birlikte protein düzeyleri gözlemlenmiş, kontrol grubu ve AA uygulanan balıklarda hepatik hücrelerin normal olduğu, 30 gün süreyle DM'a maruz bırakılan grupta karaciğerde histopatolojik dejenerasyon ve kan damarlarında tıkanma, lökositik infiltrasyon, sitoplazmik vakuolizasyon ve piknotik nükleus kaydedilmiş, devam eden çalışmada 60. gün sonunda bulguların daha belirgin ve şiddetli olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, 30 gün boyunca DM maruz bırakılıp 30. günden itibaren AA takviyesi yapılan grupta ilerleyen süreçte 60. güne kadar iyileşmeler gözlemlenmiştir. Hepatik enzim içeriği kontrol grubuyla kıyaslandığında DM grubunda yükseldiği, protein seviyelerinin ise azaldığı bildirilmiştir. DM'a AA asit takviyesi yapıldığında 30 günden sonra karaciğer enzim seviyelerinde normalleşme olduğu bildirilmiştir [31].

Oreochromis niloticus ile klorpirifos (CPF)'un neden olduğu oksidatif strese karşı AA (200mg/100g yem)'in koruyucu etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, 12 µg/L (CPF1) ve 24 µg/L (CPF2) CPF subletal konsantrasyonları, AA takviye edilerek 96 saat boyunca beyin ve karaciğer dokularındaki oksidatif hasarları tespit edilmiştir. Tiobarbitürik asit-reaktif maddeler (TBARS) düzeyi ($P < 0.05$) CPF maruz kalan balık beyinde kontrol grubuna kıyasla önemli bir artış görülmesine karşın karaciğer TBARS seviyesinin değişmediği bildirilmiştir. Bu sonuçla, CPF'ye maruz kalan balıkların beyinde Lipid peroksidasyonu (LPO)'nun yükseldiği kaydedilmiştir. CPF1 ve CPF2'ye maruz kalınca, karaciğer ve beyin dokularında Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesinde önemli bir artış gözlemlenmiştir ($P < 0.05$). CPF2'ye maruz kalan balıklarda, Katalaz (CAT) aktivitesinde karaciğerde önemli bir artış gözlenirken ($P < 0.05$), beyinde azaldığı saptanmıştır. CPF1 ve CPF2 maruziyetinde, Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi karaciğerde azalırken beyinde artış gözlemlenmiştir. CPF'nin etkisiyle beyinde artan TBARS düzeyi AA etkisiyle azalma eğilimi göstermiş, GSH-Px, CAT ve SOD değerleri normal sınırlarına ulaştığı bildirilmiştir. AA'in CPF'ye bağlı Oksidatif stresi hafifletici etki gösterdiği kaydedilmiştir [32].

Letal (5.012 ppm) ve subletal (2.506 ve 1.253 ppm) konsantrasyonlarda sırasıyla 96 saat ve 60 gün boyunca DM (Rogor 30% EC) uygulanan *Puntius ticto*'nun solungaçlarındaki biyokimyasal değişimlerin incelendiği bir çalışmada, letal ve 2 subletal doza maruz kaldıktan sonra balıkların solungaçlarında protein içeriklerinin azaldığı saptanmıştır (-9.0839 ile -

24.037%). Glikojen içeriğinde letal ve subletal dozlarda azalmalar gözlemlenmiştir (-76.39 ile -81.56%). Kolesterol içeriği letal dozda (-32.14%) ve subletal dozlarda (-38.09 ile -51.98%) azalmalar saptanmıştır. AA içeriğinde ise letal (-77.28%) ve subletal dozlarda (-69.34 ile -87.30%) önemli ölçüde azalmalar olduğu kaydedilmiştir [33].

Labeo rohita ile yapılan bir çalışmada AA'in artan dozlarının büyüme, beslenme ve ümmün sistem üzerine etkileri araştırılmış, balıklar 60 gün boyunca 4 gruba ayrılarak incelendiği bildirilmiştir. 1. grup kontrol, 2. grup 500 mg/ Kg AA, 3. grup 1000 mg/Kg AA ve 4. grup 1500 mg/Kg AA takviyeli yemle beslendiği kaydedilmiştir. 1000 mg/Kg AA takviye edilen grupta spesifik büyüme oranı (SGR)'nda kontrol grubuna kıyasla artış olduğu saptanmıştır. AA takviyesinin, non-spesifik bağışıklık sisteminde hematolojik ve serolojik parametrelerinde değişikliklere neden olduğu ileri sürülmüştür. Fagositik aktivite (PR ve PI) ve solunum aktivitesinde ($P < 0.05$) AA takviyesinin artan dozlarında önemli ölçüde artış olduğu gözlemlenmiştir. *Aeromonas hydrophila* aşılama balıklarda, AA takviyesinin doz artırımıyla birlikte kontrol grubuna kıyasla *A. hydrophila* enfeksiyonuna karşı korumanın geliştiği ileri sürülmüştür [34].

Oncorhynchus mykiss'in ümmün sistemi üzerine glukun (Beta 1.3/1.6 glukun mayası) ve AA (askorbat-2-polifosfat)'in etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, 4 gruba ayrılan balıklara (1. grup 150ppm AA (kontrol dozu), 2. grup glukun + 150 ppm AA, 3. grup 1000 ppm AA, 4. grup glukun + 1000 ppm AA) ilk 4 hafta sadece kontrol dozu uygulanmıştır. Sonraki 2 hafta grup dozları uygulanan balıklarda spesifik olmayan bağışıklık sistemi incelenmiş, takip eden 4 hafta kontrol dozu uygulanmış ve tekrar 2 hafta grup dozları uygulanarak tekrar inceleme yapılmıştır. Makrofaj aktivitesi, oksidatif patlama, pinositoz ve lizozim seviyeleri incelenmiştir. Daha sonra balıklara bağırsak kırmızı ağız hastalığı aşılama, spesifik bağışıklık sisteminde lenfosit artışı ve antikor tepkisi incelenmiştir. Aşılamadan sonra her 2 haftada bir antikor titresi 16 hafta boyunca takip edilmiştir. Çalışma neticesinde oksidatif patlama, pinositoz ve lizozim seviyesinde AA'in önemli bir etkisinin olduğu fakat glukunun bir etkisinin olmadığı ileri sürülmüştür. Aşılamadan sonra glukun ve AA'in uygulandığı gruplarda antikor titresinin zirveye ulaştığı kaydedilmiştir [35].

Ictalurus punctatus yapılan bir çalışmada rutin diyetle (biyo flavonoid) AA diyeti arasındaki sinerjistik etkiler ve antioksidan etkileri araştırılmıştır. Saflaştırılmış kazein/jelatin rutin diyeti 2 dozda (0 ve 1000 mg/Kg), L-AA diyeti ise 3 dozda (0, 1500 ve 3000 mg/Kg) 16 hafta boyunca uygulanmış ve AA takviyesi bulunmayan gruplarda 10 (rutin bulunmayan grup) ve

12. haftalarda (rutin içeren grup) spinal kolumnusda deforme, dış kanama ve yüzgeçlerde aşınmalar gözlemlenmiştir. Bunlarla birlikte, vücut ağırlık artışı, yem alımı, hematokrit düzeyler ve hepatosomatik indeks (% karaciğer ağırlığı) de önemli değişimler kaydedilmiştir. Ayrıca karaciğer, fileto ve plazma AA konsantrasyonunda azalmaların olduğu bildirilmiştir. AA içeren diyet gruplarında karaciğer, fileto ve plazma AA konsantrasyonlarında korelasyon olduğu ileri sürülmüştür. AA ve rutin olmayan diyet uygulamasında ise balıklardan alınan fileto örneklerinde zorunlu oksidasyonla birlikte 2-tiobarbitürik asit (TBA) seviyesinde önemli artış olduğu kaydedilmiştir. Çalışma sonunda iki diyetin birlikte uygulanmasının sınırlı bir sinerjistik etki gösterdiği bildirilmiştir [36].

Salmo salar'ın bağışıklık sistemi ve hastalık direnci üzerine AA diyetinin etkilerinin araştırıldığı çalışmada, balıklar 6 ay boyunca 40, 400, 2000 ve 4000 mg AA/Kg' a eşdeğer askorbat-2-monofosfat (AP)'ın kademeli dozlarına maruz bırakılmıştır. Zimosanla uyarılmış makrofajlarda, büyüme, hematoloji ve asit fosfataz aktivitesine AP diyetinin bir etkisinin olmadığı, serumda ise hemolitik aktivitenin görüldüğü fakat kayda değer bulunmadığı bildirilmiştir. *Aeromonas salmonicida* aşılmasından sonra bakteriyel mücadelede 11 ve 17. haftalardan sonra yüksek AP seviyesinin balıkların spesifik antikor üretiminde önemli derecede artışa neden olduğu ve böylece hayatta kalma oranının arttığı kaydedilmiştir. Böbrekteki lizozim aktivitesi, serum kompliman aktivitesi ve serum demir değerlerinde artış olduğu kaydedilmekte, bu durumun ise AA'in lizozim aktivitesinde önemli bir rolünün olabileceği tahmin edilmektedir. Serumda demir artışı ve kompliman aktivitesinin ise spesifik olmayan hastalık direncinin bir göstergesi olabileceği ileri sürülmektedir [20].

Heteropneustes fossilis balıklarında DM (Rogor)'a karşı davranışsal değişimler ve akut toksisitesinin araştırıldığı bir çalışmada, tatlı su yayın balıklarının, LC₅₀ değerlerine; 15.92 mg/L 24 saat, 13.42 mg/L 48 saat, 12.39 mg/L 72 saat ve 11.34 mg/L 96 saat süreyle maruz bırakılan *H. fossilis* türünün alt ve üst sınırları belirlenmiştir. Buna göre; alt değerler 15.32 mg/L 24 saat, 12.18 mg/L 48 saat, 11.23 mg/L 72 saat ve 9.79 mg/L 96 saat olduğu, üst değerlerin ise 16.59 mg/L 24 saat, 14.72 mg/L 48 saat, 13.54 mg/L 72 saat ve 12.86 mg/L 96 saat olduğu kaydedilmiştir. Bu dozlara maruz bırakılan balıklarda davranışsal değişimler gözlemlenmiş, operkul hareketinde artış, halsizlik, uyuşukluk ve kas tetanisi olduğu bildirilmiştir. Ayrıca balıkların vücut renginde solmalar tespit edilmiştir. Diğer balık türlerine göre *H. fossilis* türünün LC₅₀ değerlerine daha duyarlı olduğu ileri sürülmektedir [37].

Cyprinus carpio DM (EC30) subletal konsantrasyonlarına maruz bırakıldığı ve böbrek histopatolojisindeki değişimlerin incelendiği bir çalışmada, 96 saat boyunca 0.96 mg/L (LC₅₀ değerinin 96 saat için %60'ı) konsantrasyonuna maruz kalan balıklar kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Balıkların böbreklerinde glomerulusta büzölmeler ve tübüler lümende genişlemeler olduğu ileri sürölmüştür. Ayrıca vakuolizasyon, deskuamasyon, hidropik şişlik, tübüler epitelyumunda hiyalin dejenerasyonunun gözlemlendiği kaydedilmiştir. Bazı doku örneklerinde ise kist oluşumu ve kanamanın da olduğu bildirilmiştir [38].

Yine *Cyprinus carpio* balıklarında askorbat metabolizması, AA ve askorbik sülfat (AS) emiliminin araştırıldığı bir çalışmada, aç bırakılan balıklar normal diyet grubu (karışık kuru yem- AA takviyesiz), AA (500 mg/Kg) takviyeli diyet grubu ve AS (1084 mg/Kg) takviyeli diyet grubu olarak 3 gruba ayrılmış ve balıklar 4 hafta boyunca incelenmiştir. Sindirim sisteminin çeşitli bölgelerinden örnekler ve dışkılarla yapılan deneyde, askorbat emiliminde belirgin bölgenin bağırsak anterior bölgesinin %20'lik ilk kısmı olduğu saptanmıştır. Harici işaretleme yöntemiyle AS'nin bağırsaklarda emiliminin olmadığı kaydedilmiştir. Balıklara AA takviyeli diyet uygulandığında plazma, hepatopankreas, böbrek, bağırsak, dalak ve beyin askorbat konsantrasyonunun diğer gruplardaki balıkların benzer dokularındaki konsantrasyondan daha yüksek olduğu bildirilmiştir [39].

AA diyeti uygulanan *Ictalurus punctatus*'nın bağışıklık sistemindeki değişimlerin incelendiği bir deneysel araştırmada, gölden yakalanan küçük balıklara 9 hafta boyunca 0, 100, 500, 1000 ve 4000 mg/Kg AA diyeti uygulanmış ve 9.hafta sonunda *Edwardsiella ictaluri* (bakteriyel patojen) aşılmalıdır. Aşılmalıdır 4 hafta sonra meydana gelen değişimler incelenmiştir. Balıklarda deneysel periyot sırasında AA eksikliğinde ve vücut ağırlıklarında önemli bir değişimin ($P < 0.05$) olmadığı bildirilmektedir. AA'in artan miktarına karşın kompliman hemolitik aktivitesinde ve antikor titresinde bir etkisi olmadığı ileri sürölmektedir. Bununla birlikte, 1000 mg/Kg AA diyeti uygulanan grupta *E.ictaluri*'ye karşı bir direnç artışı gözlemlendiği kaydedilmektedir [40].

Brachydanio rerio için subletal doz olan 0.025 µL/L DM (DM 500)'a maruz bırakılan balıklarla yapılan çalışmada karaciğer histopatolojisi incelenmiş, 8 saat maruziyetten sonra hücrelerde sitoplazmik granülasyon ve odaksal nekroz olduğu gözlemlenmiştir. 24 saat maruziyetten sonra yapılan incelemelerde ise, tipik poligonal hücre şekli ve hücre sınırlarının kaybolduğu, lateral çekirdek göçünün meydana geldiği, çekirdek boyutu ve şeklinin değiştiği, piknozi ve kromatin yoğunlaşmasının gerçekleştiği ve vakuolizasyonla birlikte granülasyonda

artış meydana geldiği bildirilmiştir. Bunların dışında 72 saat sonunda balıkların karaciğer hücrelerinde nekroz, hepatositlerde odaksal rejenerasyon ve kanalikuli olduğu kaydedilmektedir [41].

Cyprinus carpio yavrularında DM (30EC) akut toksisitesinin ve bununla birlikte davranış değişikliklerinin belirlendiği bir çalışmada, LC₅₀ değerlerini belirlemek için 24, 48, 72 ve 96 saat süreyle DM'a maruz bırakılan balıkların ölüm oranlarına göre letal konsantrasyonları sırasıyla 1.84, 1.78, 1.68 ve 1.61 mg/L olarak ölçülmüştür. Balıkların davranışsal hareketlerindeki değişimler gözlemlenmiş ve maruziyet süresi ve miktar arttıkça balıkların yüzme hareketlerinde düzensizlik, yüzeye çıkışlarda artış, operkul hareketlerinde azalma, bol mukoza salgılanması, çeviklikte azalma, denge durumunda normal pozisyonu koruyamama durumlarının olduğu kaydedilmektedir. DM maruziyeti sırasında oksijen tüketimini belirlemek için 24, 48, 72 ve 96 saat içinde oksijen miktarı ölçümleri yapılmış, bütün gruplarda balıkların oksijen tüketiminde düşüş olduğu bildirilmiştir [42].

Yapılan bu çalışmada, kontrol grubuna ait preparasyonları oluşturan bağırsak, böbrek ve karaciğer dokularının normal histolojik yapıyı yansıttığını gözledik.

Bu verilerin değerlendirilmesi sonucunda DM grubu bağırsaklarda villuslarda yırtılmalar, epitelde bozulmalar ve goblet hücrelerinin dağılımında azalma, böbrek dokusunda mononükleer hücrelerin varlığında artış, yine bowman kapsülünde bozulmalar gözlemlendi. Karaciğeri oluşturan Vena centralis ve çevresinde ışınal yapının 1. zondan itibaren kaybolduğu, Vena centralisten periferine doğru tanımlanan zon 2 ve zon 3'deki hepatik hücrelerde dejenerasyonlar; piknotik nükleus ve vakuolizasyon gözlemlendi.

AA grubu bağırsak preparasyonlarında balığın barsağındaki tek katlı silindirik epitel hücrelerinin sınırlarının kaybolduğu, goblet hücrelerinin ise yoğun bir şekilde azaldığı ve yoğun infiltrasyonlar gözlemlendi. AA grubu böbrek dokusunun preparasyonlarında, DM uygulanan preparasyonlarda olduğu gibi proksimal ve distal tubuluslar, aralarında yoğun bir şekilde izlenen mononükleer hücrelerin varlığını pek fazla bir şekilde etkilemediği net olarak izlendi. AA grubu karaciğer dokusu preparasyonlarında ise, hepatik hücrelerin ışınal yapısının bozulduğu gözlemlendi ve bazı bölgelerde ise yoğunlaşmış alanlar tespit edildi.

DM ve AA grubu bağırsak preparasyonlarında, kısmen DM'in zararlı etkisinin AA tarafından azaltıldığı dikkat çekmekteyken, epitelyum ve goblet hücreleri rahatlıkla gözlemlendi. Ayrıca infiltrat alanlar mevcut olup, yine bazı bölgelerde de mukozayı oluşturan epitelde

deskuamasyonlar gözlemlendi. DM ve AA grubu böbreklerden alınan kesitlerde, Tübüller rahatlıkla izlenirken AA'in etkisine bağlı olarak infiltre alanlarda azalmalar bazı bölgelerde ise hala yoğunluklar olduğu gözlemlendi. DM ve AA grubu preparasyonlarda karaciğeri oluşturan Vena centralis ve çevresinde ışınal yapının 1. zondan itibaren kaybolduğu hepatositler, Vena centralisten periferde doğru tanımlanan zon 2 ve zon 3'deki hepatik hücrelerde dejenerasyonlar piknotik nükleus ve vakuolizasyon dikkat çekmektedir. Ayrıca yine hepatik hücrelerde bozulmalar zon 2 ve zon 3 de kolaylıkla gözlenmektedir. AA'in karaciğerde pek etkili olmadığı kanaatine varıldı. Bulunan bu sonuçların yapılan literatür araştırmalarıyla uygunluk gösterdiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak yapılan bu araştırmada DM grubu dokularda bozulmalara sebep olurken yalnızca AA uygulanan grubun balığın organlarında çok etkili olmadığını, DM ve AA'in birlikte uygulandığı grupta ise bazı organlara iyileştirici etki yapabildiğini (bağırsaklarda kısmen DM nin etkisini azalttığı, böbreklerde DM'a bağlı oluşan infiltrasyon alanlarında kısmen gerileme gibi) bazılarında ise (karaciğer dokusunda dejenerasyonların, piknotik nükleusların ve vakuolizasyonun azalması gibi) etkisinin olmadığını söyleyebiliriz.

Serum numunelerinin SDS-PAGE'den elde edilen elektroforegramında kontrol grubundaki balıkların protein bandlarına göre; 100 mg/L AA bulunan grupta 82 kD, 72 kD, 69 kD, 49 kD, 36 kD ve 30 kD'luk protein bandlarında kalınlaşmalar, 100 kD ve 56 kD'luk protein bandlarında incelmeler, 93 kD, 44 kD ve 26 kD'luk protein bandlarının ise yeni sentezlendiği saptandı. 2 mg/L DM bulunan grupta 82 kD, 72 kD ve 36 kD'luk protein bandlarında kalınlaşmalar, 100 kD, 76 kD, 56 kD ve 30 kD'luk protein bandlarında incelmeler, 46 kD'luk protein bandının ise yeni sentezlendiği saptandı. 100 mg/L AA ve 2 mg/L DM bulunan grupta 82 kD, 76 kD ve 36 kD'luk protein bandlarında kalınlaşmalar, 100kD, 97 kD, 56 kD ve 30 kD'luk protein bandlarında incelmeler, yine aynı grupta 46 kD ve 26 kD'luk protein bandlarının ise yeniden sentezlendiği saptandı. AA uygulaması sonucunda genel olarak bulgular ışığında proteinlerin ekspresyonlarında artışlar gözlemlendi. DM uygulaması sonucunda yine protein ekspresyonlarında artarken DM ve AA birlikte uygulanması sonucunda ise bu proteinlerin ekspresyonlarında azalma yani normalleşme gözlemlendi. Bu durumda DM'a karşı AA'in kısmen iyileştirme etkisi gösterdiği sonucuna varıldı. Bu sonuçlara göre AA'in histopatolojik değişimlerde kısmen DM'ın zararlı etkisini azalttığı söylenebilir. DM'ın sucul ortamdaki canlılar üzerinde toksik etkiye yol açtığı ve hayatlarını tehdit edebileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Güler, Ç., Çobanoğlu, Z., “ Pestisitler ”. *Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi*, Ankara, No:52 : s9, ISBN 975-8088-69-6 (1997).
- [2] Bayar, A.S., “ Tatlı Su Balığı *Oreochromis niloticus*’ un Gonad Histolojisi Üzerindeki Piretroid Pestisit Deltamethrinin Etkileri ve E Vitaminin Etkisi “. Yüksek Lisans Tezi, *Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Diyarbakır (2013).
- [3] Tiryaki, O., Canhilal, R., Horuz, S., “ Tarım İlaçları Kullanımı ve Riskleri “. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 26(2) : 154-169 (2010).
- [4] Taylan, Z.S., Böke Özkoç, H., “ Potansiyel Ağır Metal Kirliliğinin Belirlenmesinde Akuatik Organizmaların Biokullanılabilirliği ”. *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, Cilt : 9, Sayı : 2, 17-33 (2007).
- [5] Göğtepe, S., “ Alüminyum Zehirlenmesinin *Capoeta capoeta capoeta* (Guldenstaedt 1772)’ nin Serum Proteinleri ve Solungaç Histopatolojisi Üzerine Etkileri ”. Yüksek Lisans Tezi, *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kars (2010).
- [6] Atamanalp, M., Cengiz, M., ” Bir Sentetik Piretroid İsektisit (Cypermethrin)’ in Sublethal Dozlarının *Capoeta capoeta capoeta* (Guldenstaedt, 1772)’ da Hemoglobin, Hematokrit ve Sediment Seviyeleri Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi “. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, Cilt : 19, Sayı : 1/2, 169-175 (2002).
- [7] Ganeshwade R.M., Sathe S.S., Sonawane S.R., “ Dimethoate Induced Histological Changes in The Intestine of Fresh Water Fish *Puntius ticto* “. *Trends In Fisheries Research DAMA International*, Vol. 2, Iss. 2, 17-22 (2013).
- [8] Atamanalp, M., Uçar, A., Alak, G., “ Balıkların Bağışıklık Sistemi Üzerine Çevresel Toksikantların Etkileri “. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 6 (1): 124-127 (2013).
- [9] Gökpınar, Ş., ve ark., “ Algal Antioksidanlar “. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, Cilt : 23, Ek : 1/1, 85-89 (2006).
- [10] Tuna Keleştemur, G., Yıldırım I., “ Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) Yavrularının Kan Vitamin C ve Malondialdehit Düzeylerine Karanlık

Periyodun Etkisi “. *Balikesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, Cilt : 12, Sayı : 2, 55-60 (2010).

[11] Timur, G., "Balık Anatomisi". *Nobel Yayın Dağıtım*, Ankara, s75, 86, 101-103 (2008).

[12] Sharon, G., Zilberg, D., “Atlas of Fish Histology and Histopathology”. *Arava Research and Development Centers*.

[13] Timur, M., "Balık fizyolojisi". *Nobel Yayın Dağıtım*, Ankara, s15, 97 (2006).

[14] Parikh, P.H., Rangrez, A., Adhikari-Bagchi, R., Desai, B.N., “ Effect of Dimethoate on Some Histoarchitecture of Fresh Water Fish *Oreochromis mossambicus* “. *The Bioscan* 5 (1) : 55-58 (2010).

[15] Marutirao, G.R., “ Histopathological Changes in The Ovary of Fresh Water Fish *Puntius ticto* Under Dimethoate Toxicity “. *The Bioscan* 8 (3) : 989-992 (2013).

[16] Sanderson, D.M., Edson, E.F., “Toxicological Properties of The Organophosphorus Insecticide Dimethoate “. *British Journal Of Industrial Medicine*, 21 : 52-64 (1964).

[17] Çoğun, H.Y., ve ark., “ *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)’da Dimethoat’ın Bazı Enzim Sistemlerine Toksik Etkileri “. *Anadolu Doğa Bilimleri Dergisi*, 4(2) : 33-36 (2013).

[18] Khogali, F.A., *et al.*, “ Histopathological and Hematological Effects of Dimethoate 40EC on Some Organs of Albino Mice ”. *J. King Saud Univ.*, Vol. 18, *Science* (2), pp. 73-87, Riyadh (2005).

[19] Özdener, H., Çelik C., “ Vitamin C'nin Metabolik ve Klinik önemi, Yeni Yaklaşımlar “. *Biyokimya, T Klin Tıp Bilimleri*, 13 : 200-210 (1993).

[20] Waagbo, R., Glette, J., Raa-Nilsen, E., Sandnes, K., “ Dietary Vitamin C, Immunity and Disease Resistance in Atlantic Salmon (*Salmo salar*)”. *Fish Physiology and Biochemistry*, Vol. 12, No. 1, pp 61-73 (1993).

[21] Kuru, M., “Omurgalı Hayvanlar”. *Atatürk Üniversitesi Yayınları*, Erzurum, No : 646, s735 (1987).

[22] Geldiay, R., Balık, S., “Türkiye Tatlısu Balıkları IV Baskı”, *Ege Üniv. Fen Fak. Kitaplar Serisi*, No : 9, İzmir, s361-s367(1988).

- [23] Karakuş, S., Gey, H., “ A Preliminary Study of Heavy Metals in Transcaucasian Barb (*Capoeta capoeta capoeta* Guldenstaedt, 1772) from The Kars Creek, Turkey “. *Revue Med. Vet.*, 157, 11, 551-556 (2006).
- [24] Vural, S., “ Azotlu Gübrenin *Capoeta capoeta capoeta* (Guldenstaedt, 1772)’ nin Karaciğer, Bağırsak, Solungaç, Böbrek Histopatolojisi ve Serum Proteinleri Üzerine Etkileri”. Yüksek Lisans Tezi, *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kars (2011).
- [25] Yılmaz, M., Ersan, Y., Karaman, M., Koç, E., Necefoğlu, H., “ Toxic Effects of Cobalt Parahydroxy-Benzoate on Tissue Histopathology and Serum Proteins in *Capoeta capoeta capoeta* ”. *Fresenius environmental bulletin*, 17(9a), 1322-1327 (2008).
- [26] Robert, R., Michael, J.D., “ Enzyme Assays ”, *Oxford University Pres. Newyork*: 225-332 (1993).
- [27] Laemmli, U.K., “ Cleavage of Structural Proteins During The Assemble, of The Head of Bacteriophage ”. T4, *Nature*, 227,680 (1970).
- [28] O’Farrell, P.H., “ High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Biological Properties and Significance ”. *Comp. Biochem. Physiol.*, 88 M, 497-501 (1975).
- [29] Weber, K., Pringle, J., Osborn, M., “ Mesurment of Molecular Weights by Electrophoresis on Sds- Acrylamide Gel”. *Meth. Enzymol.*, 26,3 (1972).
- [30] Vosyliene, M.Z., “The Effect of Heavy Metals on Haematological Indices of Fish (Survey) ”. *Acta Zoologica. Hydrobiologia*. Vol. 9, No.2, 76-82 (1999).
- [31] Dubey, S., *et. al.*, “Ameliorative Role of Vitamin-C Against Dimethoate Toxicity in Air Breathing Fish, *Clarias batrachus* “. *Global Journal of Bio-Science and Biotechnology*, Vol. 3(1), 46-50 (2014).
- [32] Özkan, F., *et. al.*, “The Protective Role of Ascorbic Acid (Vitamin C) Against Chlorpyrifos-Induced Oxidative Stress in *Oreochromis niloticus*”. *Fish Physiol Biochem*, 38:635–643 (2012).
- [33] Ganeshwade, R.M., “ Biochemical Changes Induced by Dimethoate (Rogor 30% EC) in The Gills of Fresh Water Fish *Puntius ticto* ”. *Journal of Ecology and the Natural Environment*, Vol. 4(7), pp. 181-185 (2012).

- [34] Tewary, A., Patra, B.C., “ Use of Vitamin-C as an Immunostimulant. Effect on Growth, Nutritional Quality and Immune Response of *Labeo rohita* “. *Fish Physiol Biochem*, 34:251-259 (2008).
- [35] Verlhac, V., *et al.*, “ Immunomodulation by Dietary Vitamin-C and Glucan in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) ”. *Fish & Shellfish Immunology*, 8:409–424 (1998).
- [36] Bai, S.C., Gatlin III, D.M., “ Dietary Rutin Has Limited Synergistic Effects on Vitamin-C Nutrition of Fingerling Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) ”. *Fish Physiology and Biochemistry*, Vol. 10, no. 3, pp 183-188 (1992).
- [37] Srivastava, A.K., “ Acute Toxicity and Behavioural Responses of *Heteropneustes fossilis* to an Organophosphate Insecticide, Dimethoate ”. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, Vol.1(4), 359-363 (2010).
- [38] Singh, R.N., “ Histopathological Alterations in The Kidney of *Cyprinus carpio* After Exposure to Dimethoate (EC 30%) “. *Indian J.Sci.Res.* 3(1):127-131 (2012).
- [39] Dabrowski, K., “ Absorption of Ascorbic Acid and Ascorbic Sulfate and Ascorbate Metabolism in Common Carp (*Cyprinus carpio*)”. *Journal of Comparative Physiology B*, 160: 549-561 (1990).
- [40] Liu, R., Plumb, J.A., Guerin, M., Lovell, R.T., “ Effect of Megalevels of Dietary Vitamin C on The Immune Response of Channel Catfish *Ictalurus punctatus* in ponds ”. *Diseases of Aquatic Organisms*, Vol. 7: 191-194 (1989).
- [41] Rodrigues, E. de L., Fanta, E., “ Liver Histopathology of The Fish *Brachydanio rerio* After Acute Exposure to Sublethal Levels of The Organophosphate Dimethoate 500”. *Revta bras. Zool.*, 15 (2): 441–450 (1998).
- [42] Singh, R.N., *et al.*, “Acute Toxicity and Behavioral Responses of Common Carp *Cyprinus carpio* to an Organophosphate (Dimethoate)”. *World Journal of Zoology*, 4 (2): 70-75 (2009).

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : **Erdi Anıl TANRIVERDİ**

Doğum Yeri : **ARTVİN**

Doğum Tarihi : **01.10.1989**

Medeni hali : **BEKAR**

Yabancı Dili: **İNGİLİZCE**

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : **AÇIK ÖĞRETİM LİSESİ – 2007**

Lisans : **NİĞDE ÜNİVERSİTESİ FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ BİYOLOJİ BÖLÜMÜ – 2012**

Yüksek Lisans : **KAFKAS ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ HİDROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI – 2014**