



**LİNURON'un GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI
(*Oncorhynchus mykiss*) SOLUNGAÇ ve
KARACİĞER DOKULARI ÜZERİNDE
HİSTOPATOLOJİK ve BİYOKİMYASAL
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Arzu GERGİT

Yüksek Lisans Tezi

Su Ürünleri Anabilim Dalı

Yrd. Doç. Dr. Ahmet TOPAL

2016

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LİNURON'un GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus mykiss*) SOLUNGAÇ ve KARACİĞER DOKULARI ÜZERİNDE
HİSTOPATOLOJİK ve BİYOKİMYASAL ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

Arzu GERGİT

SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ERZURUM
2016

Her Hakkı Saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**LINURON'UN GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus Mykiss*) SOLUNGAÇ VE
KARACİĞER DOKULARI ÜZERİNDE HİSTOPATOLOJİK VE BİYOKİMYASAL
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yrd. Doç. Dr. Ahmet TOPAL danışmanlığında, Arzu GERGİT tarafından hazırlanan bu çalışma 11/01/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (3./...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Gonca ALAK

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ahmet TOPAL

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 14/01/2016 tarih ve 03/27 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

LİNURON'un GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus mykiss*) SOLUNGAÇ ve KARACİĞER DOKULARI ÜZERİNDE HİSTOPATOLOJİK ve BİYOKİMYASAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Arzu GERGİT

Atatürk Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ahmet TOPAL

Bu çalışmada, yabancı otlarla mücadele amacı ile sıkça kullanılan, etken maddesi linuron olan herbisit in gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nın karaciğer ve solungaç dokuları üzerindeki histopatolojik ve biyokimyasal etkileri araştırıldı. Bu amaçla bir kontrol grubu ve üç muamele grubu (30, 120 ve 240 µg/L) olmak üzere gökkuşığı alabalıklarına linuron ile 21 gün süreyle muamele edildi.

Belirlenen süre sonunda histopatoloji ve antioksidan enzim aktivite analizleri için doku örnekleri alındı. Lipit peroksidasyon (LPO), total glutatyon (GSH), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) düzeylerinin dokulardaki analizleri spektrofotometrik yöntemle belirlendi. Karaciğer dokusunda 30 µg/L konsantrasyonda SOD aktivitesi ve GSH seviyesi artarken, CAT aktivitesi bir miktar düşmüştür. 120 ve 240 µg/L konsantrasyonda ise CAT ve SOD aktiviteleri ile GSH düzeylerinde azalma görülmüştür. Solungaç dokusunda ise 30 µg/L konsantrasyonda GSH seviyesi ve SOD aktivitesi düşmüş, 120 ve 240 µg/L konsantrasyonda ise GSH seviyeleri ile SOD aktiviteleri değişmemiştir. Histopatolojik olarak karaciğer dokularında dejeneratif ve nekrotik değişiklikler görülürken, solungaç dokularında ise hücresel infiltrasyonlar ve dejeneratif değişiklikler gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, linuron'un yüksek konsantrasyonda gökkuşığı alabalığı solungaç ve karaciğer dokularında toksik etkilere sebep olabileceği tespit edilmiştir.

2016, 62 sayfa

Anahtar Kelimeler: Linuron; Gökkuşığı alabalığı; toksisite; antioksidan enzim; histopatoloji; karaciğer; solungaç

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF HISTOPATHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL EFFECTS OF GILL AND LIVER TISSUES OF THE LINURON RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)

Arzu GERGİT

Atatürk University
Graduate School of Agriculture Faculty
Department of Fishery Sciences

Supervisor: Assistant. Prof. Dr. Ahmet TOPAL

In this study, for the purpose of weed control, histopathological and biochemical effects of gill and liver tissues of the linuron rainbow trout whose active ingredient is herbicide linuron. For this purpose, a control group and three treatment groups (30, 120 and 240 µg/L) was treated for 21 days with linuron including the rainbow trout. Tissue samples were taken for histopathology at the end of the specified period and antioxidant enzyme activity assays.

Lipid peroxidation (LPO), total glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) analyzes were determined by spectrophotometric method in tissue levels. While activity of SOD and GSH level increased in Liver tissue at 30 µg/L concentration level, CAT activity has fallen slightly.

A decrease in CAT and SOD activities in the GSH levels were observed in 120 and 240µg/L concentration. While GSH levels and SOD activity in the gill tissues within 30µg/L concentration were decreased, SOD activities and GSH levels in 120 and 240µg/L concentration were unchanged. Whilst degenerative and necrotic changes were seen in liver tissue within the histopathologic diagnosis, the cellular infiltrates and degenerative changes in the gill tissues were observed. Consequently, rainbow trout in the highest concentration of linuron can cause toxic effects in gills and lung tissues.

2016, 62 pages

Keywords: Linuron; rainbow trout; toxicity; antioxidant enzymes; histopathology; liver; gill

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince tez çalışmamda konunun belirlenmesinden tamamlanmasına kadar yapıcı ve yönlendirici fikirleri ile daima bana yol gösteren, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, sabır ve hoşgörü ile bana destek olup emeği geçen, öğrencisi olmaktan mutluluk duyduğum tez danışmanım değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Ahmet TOPAL'a,

Çalışmalarım esnasında gerekli yardımı ve yakın ilgiyi esirgemeyen ve fiziki imkân sağlayan Su Ürünleri Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Muhammed ATAMANALP başta olmak üzere tüm hocalarım ve arkadaşlarıma,

Tez çalışması sırasında biyokimyasal analizlerin yapılmasında yardım ve emeğini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Mesut Bünyamin HALICI'ya ve Sayın Yrd. Doç. Dr. H. Serkan EROL'a, Histopatoloji analizlerinin yapılmasında emeği geçen Sayın Arş. Gör. Dr. Serdar ALTUN ve Sayın Yunus AKTÜRK'e,

Çalışmam boyunca desteğini esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Ali Çağlar GÜLLÜCE'ye, yaşamımın her alanında olduğu gibi tez çalışmam süresince de maddi manevi yardım ve desteklerini esirgemeyen ve benim bugünlere gelmemi sağlayan başta kıymetli babam Hadi GERGİT ve annem Suna GERGİT'e ayrıca kardeşim Berk GERGİT'e sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Arzu GERGİT

Ocak, 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Pestisitlerin Sınıflandırması	3
1.2. Kirletici Maddelerin Canlılar Üzerine Etkileri.....	3
1.2.1. Kirleticilerin biyokimyasal etkileri	4
1.2.2. Kirletici maddelerin organ seviyesinde etkileri.....	4
1.3. Herbisit	6
1.3.1. Linuron herbisiti	6
1.4. Serbest Radikaller (SR)	8
1.4.1. Serbest oksijen radikalleri ve reaktif oksijen türleri.....	10
1.4.2. Serbest radikallerin kaynakları	11
1.4.2.a. Biyolojik kaynaklar	11
1.4.2.b. İntrasellüler kaynaklar	12
1.5. Serbest Radikallerin Etkileri	12
1.5.1. Nükleik asitler ve DNA üzerine etkileri.....	12
1.5.2. Proteinler üzerine etkileri	12
1.5.3. Membran lipidleri üzerine etkileri (lipid peroksidasyonu).....	13
1.6. Antioksidan Savunma Sistemi.....	14
1.7. Antioksidan Enzimler	15
1.7.1. Katalaz (CAT)	16
1.7.2. Glutasyon (GSH)	16
1.7.3. Glutasyon peroksidaz (GPx).....	17
1.7.4. Süperoksit dismutaz (SOD).....	18
1.8. Oksidatif Stres	18

2. KAYNAK ÖZETLERİ	20
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	23
3.1. Materyal.....	23
3.1.1. Araştırma yeri.....	23
3.1.2. Deneme ortamı	23
3.1.3. Balık materyali	24
3.1.4. Uygulanan kimyasal	24
3.2. Yöntem	24
3.2.1. Deneme planı.....	24
3.2.2. Enzim aktivite ölçümü.....	25
3.2.2.a. Deneylerde kullanılan kimyasallar	25
3.2.2.b. Deneylerde kullanılan cihazlar	26
3.2.2.c. Doku homojenatlarının hazırlanması.....	26
3.2.3. Deneylerde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları	27
3.2.4. Lipid peroksidasyon seviyesinin ölçümü (LPO)	30
3.2.5. Total glutatyon miktarı ölçümü (GSH)	31
3.2.7. Katalaz aktivitesi ölçümü (CAT)	33
3.2.8. Histopatolojik İşlemler	34
3.2.8.a. Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi.....	34
3.2.9. İstatistiksel Analizler	35
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	36
4.1. Histopatolojik Sonuçlar	36
4.2. Biyokimyasal Sonuçlar.....	38
4.2.1. LPO seviyesi.....	38
4.2.2. SOD aktivitesi	40
4.2.3. GSH seviyesi	42
4.2.4. CAT aktivitesi	44
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	46
5.1. Tartışma.....	46
5.2. Sonuç ve Öneriler	50
KAYNAKÇA	52
ÖZGEÇMİŞ	62

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

%	Yüzde değeri
μ	Mikron
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
cm	Santimetre
Cu	Bakır
dk	Dakika
Fe	Demir
g	Gram
kg	Kilogram
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
Mn	Manganez
nm	Nanometre
°C	Santigrat Derece
Zn	Çinko

Kısaltmalar

AChE	Asetilkolinesteraz
AR	Androjen alıcı
AzMe	Azinfosmetilin
CAT	Katalaz
CbE	Karboksilesteraz
CYP 1A	Sitokrom P450-1A

DDT	Dikloro difenil trikloroethan
DHT	Dihidrotestesteron
DNA	Deoksiribonükleik asit
EC	Emülsiyon konsantre ilaçlar
EDTA	Etilen diamin tetraasetik ait
FLUT	Flutamide
G	Granüller
GPx	Glutatyon peroksidaz
GR	Glutatyon redüktaz
GSH	Glutatyon
GSSG	Okside Glutatyon
GST	Glutatyon –S- Transferaz
HCL	Hidroklorik asit
KCL	Potasyum Klorür
LC ₅₀	Letal konsantrasyon %50
LIN	Linuron
LPO	Lipit peroksidasyonu
M.Ö	Milattan önce
MDA	Malondialdehit
NBT	Nitroblue tetrazolium
SC	Solüsyon konsantre ilaçlar
SOD	Süperoksit dismutaz
SP	Suda çözünabilir toz ilaçlar
SR	Serbest radikaller
TBA	Tiyobarbitürik asit
WP	Islanabilir toz ilaçlar
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
DPT	Devlet Planlama Teşkilatı
EPA	Çevreyi Koruma Ajansı
WSSA	Amerika Yabani Ot Bilimi Derneği
OMAF	Ontario Gıda Tarım Bakanlığı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. 2014 su ürünleri üretiminin bölgesel dağılımı.....	1
Şekil 1.2. Linuron'ın molekül yapısı.....	7
Şekil 1.3. Glutasyon'un molekül yapısı	16
Şekil 3.1. MDA miktarının hesaplanmasında kullanılan standart grafik.....	30
Şekil 3.2. GSH miktarının hesaplanmasında kullanılan standart grafik	32
Şekil 4.1. Kontrol grubuna ait karaciğer histolojik yapısı.	30
Şekil 4.2. Kontrol grubuna ait solungaç histolojik yapısı.....	30
Şekil 4.3. Karaciğer dokusu LPO seviyeleri.....	38
Şekil 4.4. Solungaç dokusu LPO seviyeleri.....	39
Şekil 4.5. Karaciğer dokusu SOD aktivitesi	40
Şekil 4.6. Solungaç dokusu SOD aktivitesi	41
Şekil 4.7. Karaciğer dokusu GSH aktivitesi	42
Şekil 4.8. Solungaç dokusu GSH aktivitesi	43
Şekil 4.9. Karaciğer dokusu CAT aktivitesi	44
Şekil 4.10. Solungaç dokusu CAT aktivitesi	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Tarım ilaçlarının balıklardaki genel etkileri.	5
Çizelge 1.2. Biyolojik olarak önemli olan bazı SR'ler	9
Çizelge 1.3. Antioksidan enzimler	15



1. GİRİŞ

Su ürünleri temelinde balık- çevre- insan ilişkisinden oluşan multidisipliner bir alandır. Türkiye’de su ürünleri denilince akla ilk olarak yetiştiricilik ve avlanma gelmektedir. (Karademir 2012). Su ürünleri sektöründe yer alan ürünlerin hem ucuz ve hem de kaliteli hayvansal proteini sağlaması nedeniyle insanoğlunun beslenmesi açısından gittikçe önemli bir hal almıştır. Su ürünlerinin 1984 yılından itibaren yaklaşık olarak yıllık %11 ve üzerinde büyüme göstermesiyle, gıda ürünleri arasında gelişimi hızlı olan bir sektör haline gelmesine neden olmuştur (Çavdar 2009).

Ülkemizde TÜİK verilerine göre 2014 yılı su ürünleri üretimi; 2013 yılına göre %5,8 azalma göstererek 607 515 ton olarak gerçekleşmiştir. Üretimin %48,6’sını deniz balıkları, %7,2’sini diğer deniz ürünleri, %5,8’ini iç su ürünleri ve %38,4’ünü de diğer yetiştiricilik ürünleri oluşturmuştur (TÜİK 2015).



Şekil 1.1. 2014 Su Ürünleri Üretiminin Bölgesel Dağılımı (TÜİK 2015)

Gelişen teknoloji, hayatımızı kolaylaştırıcı birçok yeniliği beraberinde getirmekle beraber “çevre sorunları” başlığı altında, çözülmesi çok zor olan birçok sorunun da ortaya çıkmasına sebebiyet vermiştir. Gelişen endüstrinin modern faaliyetleri

neticesinde özellikle tarımda olmak üzere çevreye devamlı olarak yüksek miktarlarda farklı özelliklere sahip kimyasallar salınmaktadır. Bunlardan en yaygın olanı pestisitlerdir. Tarımsal faaliyetler ve giderek yaygınlaşan modern endüstrileşme bitki ve hayvanlara direkt etki yapmakla kalmayıp, beraberinde besin zincirinde biyo-akümüasyona neden olmakta ve böylece zincir boyunca aktarılacak su ekosistemine ulaşarak ekolojik dengenin bozmasına sebebiyet vermektedir (McEvenand and Stephenson 1979).

Sisteme giren her bir pestisit, sudaki faunayı ve florayı olumsuz yönde etkilemektedir (Amdur *et al.* 1991). Pestisitler, çok farklı taşınma yollarıyla göl, deniz, akarsu hatta atmosfere kadar yeraltı ve yer üstü suları ile taşınarak doğal dengenin bozulmasına neden olmakta en önemlisi ise yiyecek ağlarına girerek insan sağlığını tehdit eden boyutlara varabilecek geniş bir kirliliğe neden olmaktadır (Boran 2010).

Pestisitlerin sucul canlılara etkileri organizmalara göre farklılıklar gösterebilmektedir. Ölümden yumurta bırakma ve üremeyi yavaşlatıp hatta durdurarak balık popülasyonlarında azalmalara kadar bir takım olumsuzluklar gözlemlenebilmektedir. Ayrıca balık dokularında hasarlara sebebiyet verdiğinden balıklarda duyarlılığa yol açıp kısa süreli açlık durumlarından oldukça fazla etkilenmelerine neden olmaktadır (Toros ve Maden 1991). Balıklarda meydana gelme ihtimali yüksek olabilecek toksik ve histopatolojik etkiler; kimyasala maruz kalma süresine, bireyin duyarlılığına, kimyasalın dozuna ve çeşidine bağlı olarak değişim göstermektedir (Tomlin 2000; Gunasekara 2007).

Pestisitlerin organizmalarda meydana getirdikleri etkilerin araştırılmasında bir takım yöntemler bulunmaktadır. Bu yöntemler arasında en iyi ve en güvenilir sonucu veren, toksikolojik testlerdir. Toksikolojik testler neticesinde ortaya çıkan sonuçlar analiz edilir ve var olan pestisitlerin organizmalar üzerindeki olumsuz etkileri belirlenmiş olur. Ortaya çıkan olumsuz etkiler neticesinde gerekli önlemler alınır (Ünsal 1998).

1.1. Pestisitlerin Sınıflandırması

Tarımsal faaliyetler zirai mücadeleyi beraberinde getirerek fungusit, insektisit, herbisit bakterisit olmak üzere yaklaşık 12.000 kimyasal madde kullanılmaktadır (DPT 2001; EPA 2003). Pestisitler; formülasyon şekillerine, fiziksel yapılarına, görünüşlerine, aktif maddelerine ve bunların zehirlilik özelliklerine, kullanım yöntemlerine göre farklı sınıflandırmaya tabii tutulmalarda genellikle etkili oldukları zararlı grup ve içerdikleri formülasyona göre sınıflandırılır (Koren *et al.* 1996).

1.2. Kirletici Maddelerin Canlılar Üzerine Etkileri

Herhangi bir toksik kimyasal canlı vücuduna girdikten sonra enzimler vasıtasıyla reaksiyona girerek maddelerin yapıları değiştirip hücre içinde bazı yapısal farklılıklara neden olmaktadır. Tüm organizmalarda çeşitli reaksiyonların gerçekleştiği sırada metabolit adı verilen bileşikler oluşturularak vücuttan dışarı atılabilir veya vücutta depolanabilirler. Bu durum organlarda fizyolojik olarak solunum veya osmoregülasyonda bozulmalar şeklinde kendini göstermektedir. Canlılarda, toksik maddenin vücuda alınımını takiben çeşitli aşamalardan geçmektedir. Bu aşamalar toksikokinetik ve toksikodinamik faz olarak iki grupta toplanabilir (Aldrich 1980).

Toksikokinetik fazda; vücut içine alınan toksik maddenin hareketleri incelenmektedir. Bu hareket dolaşım sistemi içine alınma, buradan diğer dokulara dağılma ve vücuttan atılma olarak gerçekleşmektedir (Parlak vd 2009).

Toksikodinamik fazda ise; toksik maddenin etkilenmiş hedef molekül veya doku üzerindeki etki gücü incelenmektedir. Çevresel açıdan önemli olan bazı toksik maddeler örneğin; bazı pestisitler yüksek oranda lipofilik (yağda çözünen) ve yüksek dayanıklılığa sahip oldukları için çok yavaş bir toksikokinetiğe sahip olmasını sağlar. Böylece çok yavaş bir birikime sahip olurken muamele durdurulsa bile vücuttan atılımı yavaş olmaktadır. Toksik maddelerin absorpsiyonu, vücutta dağılım ve atılması çevresel açıdan büyük önem taşımaktadır Kirleticilerin canlılar üzerinde birçok noktada etkileri

gözlemlenebilmektedir. Bunlar; biyokimyasal etki, fizyolojik etki, organ seviyesinde meydana gelen etkileri şeklindedir (Parlak vd 2009).

1.2.1. Kirleticilerin biyokimyasal etkileri

Kirletici maddeler canlı vücuduna alındıktan sonra vücut içerisinde birtakım değişiklikler meydana gelmektedir. Canlıda meydana gelen bu değişiklik canlıyı kirletici maddenin kötü etkilerinden koruma amacı ile karşımıza çıkan ilk tepki olan koruyucu tepkidir. Bu koruyucu tepkiye ek olarak kirletici maddelerin oluşturduğu zararın giderilmesi için diğer bazı mekanizmalar bulunmaktadır. Örneğin stres proteinlerinin salınması bu amaçla olmaktadır. Kirletici maddeler sebebiyle ortaya çıkan enzim ya da fonksiyon değişikliği her zaman zararlı olmayabilir. Bu değişiklikler bazı durumlarda canlıda görünür bir zararlı etki yaratmaz nadir de olsa olumlu değişiklikler olarak kabul edilmektedir. Ancak bu durum çok sıra dışı olup genellikle ortaya çıkan zarar organizmanın sağlığını olumsuz yönde etkiler hatta ölümlere neden olabilir. Kirletici maddelerin sebep olduğu değişiklikler bazı kimyasal maddelere özgü olabileceği gibi genel etki şeklinde de ortaya çıkabilir. Bütün bu durumları göz önünde tutarak biyokimyasal etkileri iki grup altında toplamak mümkündür. Bunlardan birincisi, koruyucu fonksiyonu olanlar diğeri ise kirleticilerin moleküler hareket şeklini temsil edenlerdir (Parlak vd 2009).

1.2.2. Kirletici maddelerin organ seviyesinde etkileri

Kirletici maddeler organizmanın solunum epiteli veya dış yüzeyinden alındıktan sonra kana geçer ve bu yolla organlara dağılır. Bu dağılım ya tesadüfi olarak yapılır veya belirli metabolik yollar izlenerek olmaktadır. Dolayısıyla ekotoksikolojide ‘kritik hedef organ konsantrasyonu’ olarak bilinen kavram ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, küçük organizmalarda tüm canlılardaki kirletici madde konsantrasyonu analiz edildiğinde bazı hataların yapılma olasılığı yüksektir. Çünkü kimyasal madde vücudun özgün organlarında lokalize olmuşsa tüm vücuttaki madde konsantrasyonunu temsil etmez. Öte yandan organların detoksifikasyon kapasitesi aşıldığında kimyasal maddeler hücre

ölümlerine ve organ iflasına sebep olabilmektedir. Organ seviyesindeki etkinin belirlenmesinde en iyi örnek solunum organlarındaki etkidir. Solunum kapasitesi de balıklarda ve omurgasızlarda ölçülebilmektedir. Solunum tepkisi çabuk ortaya çıktığından kısa süre içinde kirlilik etkisini ortaya koymak için kullanılabilir. Çeşitli kimyasallara maruz kalan çoğu organizmada oksijen tüketim hızı için belirgin bir doz-cevap ilişkisi bulunmaktadır (Parlak vd 2009).

Çizelge 1.1. Tarım ilaçlarının balıklardaki genel etkileri (Parlak vd 2009).

Kronik	Akut
Kanser riski	Zehirlenmeler
Larval anormallikler	Anormal davranışlar
Üreme sistemi üzerine olumsuz etkileri	
Endokrin bozukluklar	
Nörolojik hasar	
Anemi	

Vücuda giriş yapan kimyasallar değişik organlarda toksik etki yaratabilir. Genellikle herhangi bir kimyasala maruz kalan balıklarda önemli ölçüde organ ve dokularda histopatolojik değişimler meydana gelebilmektedir. Örneğin balıkların solungaç lamellerinde ödem oluşumu, lamellerin birleşmesi, epitelyum hücrelerinde şişkinlik gibi doku ve organ bozuklukları gözlemlenebilmektedir (Altınok ve Çapkın 2007). Kimyasalların göstermiş oldukları toksisite özelliğide birbirinden farklıdır. Bazı kimyasallar oldukça yüksek dozlarda güvenilirlik sağlar iken bazıları çok küçük dozlarda bile çok tehlikeli olabilmektedir (Parlak vd 2009).

1.3. Herbisit

Herbisit, genel anlamda yabancı otların yok edilmesinde veya bu tarz otların normal gelişimini önlemede kullanılan zirai ilaçlara denilmektedir (Baird *et al.* 1971). İlk olarak 1896 yılında bulunmuş olup 1990'lı yıllardan itibaren de çeşitli kimyasallar geliştirilerek günümüze kadar kullanımı süre gelmiştir (EPA 1998). Herbisitler, tüm dünyada yabancı otların kontrolünde kullanılarak tarımsal uygulamaların birer parçası olarak kabul edilmektedir. Ancak ne yazık ki bu herbisitlerin tarımsal üretimi ve verimi iyileştirmek için bilinçsiz kullanımı, hedeflenmeyen organizmalar, özellikle de akuatik yaşam formları ve çevreleri üzerinde olumsuz etkilere neden olabilmektedir (Battaglin 2003; Scrubner 2005).

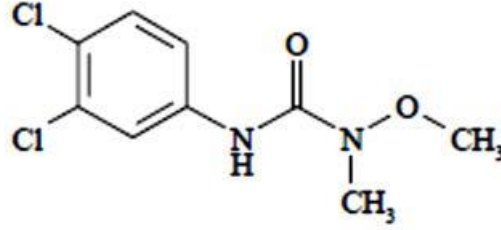
Türkiye'deki herbisit kullanımı, Dünyada kullanım miktarının oldukça altındadır. Dünya'da kullanılan tarım ilaçlarının gruplara göre dağılımı incelendiğinde herbisitler, %47'lik bir oran ile ilk sırayı alırken, bunu %29'luk dilimini insektisitler, %19'luk pay ile de fungisitler yer almaktadır. Dünya nüfusunun giderek artmasıyla tarım alanlarının yüzölçümü de giderek azalmaktadır. Bu durum da birim alandan alınan ürün miktarının arttırılmasını zorunlu hale getirmiştir. Tarımsal faaliyetler adına yapılan zirai mücadelelerde kullanılan en yaygın yöntemlerin başında herbisitler ile yapılan mücadele yöntemi yer almaktadır (Erkin ve Kışmır 1996).

Herbisitlerin ekosistemde yer alan canlılar üzerindeki toksik etkileri belirlemek adına birçok bilimsel çalışma yapılmasına rağmen, henüz akuatik ekosistem üzerine nasıl bir etkisinin olduğu konusunda toksikolojik anlamda bilgiler oldukça sınırlıdır (Medina *et al.* 1994; Piska and Waghray 1997)

1.3.1. Linuron herbisiti

Linuron ($C_9H_{10}Cl_2N_2O_2$), N-(3,4-diklorofenil)- N-metoksi-N-metilüre olan herbisittir. Kısmen suda çözülen ve çözücülerde az miktarda çözünebilen kokusuz ve renksiz katı

kristal şeklindedir (Kidd and James 1991). Ayrıca çok düşük uçuculuğa da sahiptir (Bergin 2013).



Şekil 1.2. Linuron'ın molekül yapısı (U.S. EPA 1995)

Linuron, mısır, havuç, patates, meyve ağaçları, buğday, yulaf ve arpa gibi tarla ve bahçe ürünlerinde çeşitli yıllık yabancı otları kontrol etmek için kullanılmaktadır (Du Pont 1991; Tomlin 1994). Linuron ayrıca geniş yapraklı yabancı otları, çayır çimi, koruma altındaki alanların yıllık otlarını kontrol etmek için ve aynı zamanda ekin olmayan kullanım alanları için de kullanımı söz konusudur (WSSA 1989). Linuron bitki kökleri tarafından emilir, kloroplastlarda elektron transferini önleme yoluyla fotosentez etkisini azaltarak sonunda bitki ölümünü gerçekleştirerek işlevini tamamlamaktadır (U.S.EPA 1984). Linuron genel olarak toprağa uygulandığında çok etkilidir çünkü yapraklar yoluyla absorpsiyon ve translokasyon zayıftır (Bayer and Yamaguchi 1965). Linuronun fitotoksitesitesi, linuronun farklılık gösteren tutumu, translokasyonu ve farklı bitki türleri ile metabolizmasının sonucudur (OMAF 1989).

Linuronun yaygın kullanımına karşın yüzey suyu konsantrasyonlarının ölçümleri oldukça azdır ancak, litre başına mikrogramı düşürmek için nanogramda seyrettiği tespit edilmiştir. Linuronun ayrıca, içme suyu ve gıda kalıntılarında da bulunduğu tespit edilmiştir (Ames *et al.* 1993). Dolayısıyla söz konusu kimyasalın çevresel maruziyet potansiyeli konusunda hem insan sağlığını hem de doğal yaşamı tehdit etme riski ile ilgili endişeler giderek artmaktadır. Linuronun toksikolojik etkilerini inceleyen mevcut araştırmaların çoğu, linuronun bir anti-androjenik bileşik olarak faaliyeti üzerine odaklanmıştır (Schuler *et al.* 2008). In vitro çalışmalarda linuronun, memelilerde,

balıklarda androjen alıcılara (AR) karşı androjen bağlamı rekabetçi bir şekilde engellediğini göstermiştir (Bauer *et al.* 1998; Kojima *et al.* 2004). Linuronun ayrıca, farelerde erkek üreme sağlığı üzerinde olumsuz etkilerinin yanında hücresel tümör oluşumları, testosteron üretiminde azalma ve bunun takiben anormal üreme gelişimleri göstermiştir (Cook *et al.* 1993; Wilson *et al.* 2009).

Linuron kullanarak akuatik ortamların kirlenmesi doğrudan uygulama yoluyla veya dolaylı olarak sprey ile taşınımı, sızdırma, yüzey akışı olayları ve ıslak/kuru birikimi nedeniyle oluşur. Bu ortamda aşırı kirlilik; dökülmeler, ekipman yıkama işlemlerinden kaynaklanabilir (O'Neill and Bailey 1987). Linuronun akuatik organizmalardaki biyobirikimi ve biyo-konsantrasyonu hakkındaki veriler sınırlıdır. Yapılan birtakım çalışmalar sonunda elde edilen veriler ışığında linuronun biyo-konsantrasyon için düşük veya orta potansiyele sahip olduğu ortaya çıkmıştır.

1.4. Serbest Radikaller (SR)

Serbest radikaller, orbitalde bir veya birden fazla eşleşmemiş elektron bulunduran atom veya moleküllere denilmektedir. Atom çekirdeklerinin tamamını kapsayan ve içerisinde elektronların yer aldığı boşluklara da orbital adı verilmektedir (Gutteridge 1994). Serbest radikaller, dış orbitalde bir ya da birden çok eşleşmemiş elektron bulundurduğundan, kısa ömürlü moleküllerdir. SR'ler yer alan orbitallerin spinleri birbirine göre ters yönde olup iki elektron yer almaktadır (Halliwell 1984; Kayış 2010). Bu elektronlar üst kısımlarına nokta konularak ifade edilmektedir (Mercan 2004; Kayış 2010). Radikallerin elektrik yükleri; negatif, pozitif ya da nötr olabilmektedir. Serbest radikaller, dış orbital elektron konfigürasyonlarının yanında, termodinamik özellik gösteren yapısı ve lokal olarak kinetik reaktivite özellikleri göz önünde bulundurularak değerlendirilirler (Akkuş 1995; Sen 1995).

SR'ler 3 yolla oluşmaktadır (Cheesman and Slater 1993; Wu and Cederbaum 2003; Kayış 2010).

1. Normal bir moleküle elektron transferi ile; radikal özelliği olmayan bir molekül, tek elektron transferi ile dış orbitalinde ortak olmayan elektron içeren radikal forma dönüşebilmektedir.
2. Kovalent bağların homolitik kırılması ile; kovalent bağlı molekülün bölünme sonrasında her bir parçasında ortak elektronların biri kalmaktadır.
3. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi ile; radikal özelliği bulunmayan bir molekülden tek bir elektron kaybı sırasında dış orbitalinde ortaklanmamış elektron alarak radikal formu oluşturmaktadır.

SR'ler en fazla elektron transferi sonucu meydana gelmektedir (Halliwell and Gutteridge 1999; Kayış 2010) ve reaktif nitrojen, reaktif oksijen türleri ve diğer reaktifler olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır (Song 2004; Kayış 2010).

Çizelge 1.2. Biyolojik olarak önemli olan bazı SR'ler (Halliwell and Gutteridge 2000)

Radikal Olmayanlar	Radikal Olanlar
Hidrojen peroksit	Hidroksil
Ozon	Nitrik oksit
Hipoklorik asit	Alkoksil
Peroksinitrit	Hidroperoksit
Singlet oksijen	Süperoksit

Oksijen metabolizmasındaki ürünlerin uzaklaştırılması enzimatik olan ve enzimatik olmayan hücresel savunma mekanizmaları ile kontrol edilmektedir (Wickens 2001; Kayış 2010).

SR'ler eşleşmemiş elektronlarından dolayı yüksek enerjiye sahip olma özelliklerinin yanında hem tehlikeli hem kullanışlı yanları bulunmaktadır. Bu nedenle yaşam için

gereklilik arz etmektedir. SR'ler elektron transferi ile birlikte enerji üretiminde ve birçok metabolik olaylarda önemli ürünlerdir. Ancak zincir reaksiyonu kontrolsüz bir davranış gösterir ise hücrelerde hasara neden olarak yaşlanma ve dejeneratif hastalıklara neden olacağı bilinmektedir (Akkuş 1995)

1.4.1. Serbest oksijen radikalleri ve reaktif oksijen türleri

Aerobik canlılar yaşamlarını devam ettirebilmeleri için oksijeni kullanma zorunluluğu nedeniyle, aerobik canlılar oksijenin toksik olan metabolik ürünleri ile birlikte yaşamak durumundadır. Oksijen, canlı organizmaları meydana getiren moleküllerin yapısına yer alması, besin kaynağında bulunan maddelere temel elementlik sağlaması ve aerobik organizmalardaki oksidasyon reaksiyonunda görev alması nedeniyle oldukça önemlidir (Thurnham 1990; Erenel vd 1992).

Normal metabolizmada O_2 'nin %98'i oksidazlar vasıtasıyla suya dönüştürülmektedir. Geriye kalan kısım ise oksijenazlar ile hücre içindeki organellerin yapı ve fonksiyonlarını değiştirerek, hücre membranlarında oksidatif yıkım sonucu toksik ürünlere dönüştürülür. O_2 metabolizması ürünlerinin azaltılması; glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimatik katalaz (CAT), ve (süperoksit dismutaz (SOD)), ve nonenzimatik (glutatyon (GSH) ve tokoferol) hücresel savunma sistemleri ile kontrol sağlanmaktadır (Wohaieb and Godin 1987; Wickens 2001).

Metabolik olaylarda oksijen dört elektron kabul etmektedir. Oksijenin bir tane elektron almasıyla süperoksit anyonu, iki tane elektron almasıyla hidrojen peroksit, üç tane elektron almasıyla hidroksil radikali ve dört tane elektron almasıyla H_2O_2 meydana gelmektedir (Özdem ve Sadan 1994; Wickens 2001).

Süperoksit radikali: Oksijenin dış orbitalinde iki elektron bulunmaktadır. Buradaki elektronlar dış orbitalde yer aldığından spinleri aynı yönde olduğu durumlarda enerji seviyeleri oldukça düşüktür. Süperoksit radikali oksitleyici özelliği taşıyormuş gibi

davranış göstererek bir tane daha elektron alarak, oluşan peroksil anyonu iki proton daha alarak hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturabilmektedir (Kılınç 1986).

Hidrojen peroksit: Hücreler için oldukça toksik özellikte olmasının yanında metal iyonları ile birlikte reaksiyona girdiğinde serbest radikallere hasar vermektedir (Erenel vd 1992).

Hidroksil radikali: Oksijen radikalleri içerisinde yer alan en fazla reaktif özellik gösteren ve aynı zamanda oldukça toksik etkisi olan radikaldir (Kılınç 1986; Erenel vd 1992). Reaktivitenin yüksek olması nedeniyle toksik etki göstermesinin yanı sıra normal biyolojik fonksiyonlar için üretilmeleri de gerekmektedir. Fagositoz gibi birçok enzimatik tepkimenin gerçekleşmesi için OH üretilerek katalaz olayına doğrudan katılabilmektedir (Kılınç 1986).

1.4.2. Serbest radikallerin kaynakları

Serbest radikaller, oksijenin metabolizmal basamaklarında indirgenmesi ile meydana gelmektedir. Ayrıca organik maddelerin çürümesi, plastik maddelerin işlenmesi gibi endüstriyel faaliyetlerde oksijenin kısmi redüksiyonu ile meydana gelmektedir (Thomas 1995). Ayrıca hava kirliliği, sigara dumanı gibi çevresel etmenlerle karşılaşılması radikal oluşumunu tetiklemektedir (Işık 2007; Wickens 2001). Serbest radikallerin kaynakları iki grup altında toplanabilmektedir (Halıcı 2007).

1.4.2.a. Biyolojik kaynaklar

Radyasyon, aktive olmuş fagositler, antineoplastik ajanlar, alışkanlık yapan maddeler (alkol ve uyuşturucular), çevresel ajanlar, stres biyolojik kaynaklar arasında sayılabilir (Akkuş, 1995).

1.4.2.b. İntrasellüler kaynaklar

Küçük moleküllerin otooksidasyonu, enzimler ve proteinler, mitokondrial elektron transportu intraselüler kaynaklar olarak bilinmektedir (Akkuş, 1995).

1.5. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller etkilerini; canlılar için önemli olan başta DNA olmak üzere, proteinler, karbonhidratlar ve yağlarda hasar meydana getirerek gösterirler. Bunun sonucunda da meydana gelen metabolik ve yapısal değişiklikler, çeşitli hasar ve hastalıkların oluşmasına neden olmaktadır (Erol 2015).

1.5.1. Nükleik asitler ve DNA üzerine etkileri

SR'ler, nükleik asitlerde tek veya çift dal kırıklıklar ve çapraz bağlanmalar yaparak mutasyonlara neden olmaktadır. Oksijen radikalleri DNA'da bulunan baz çiftlerine etki ederek birçok modifikasyonlara neden olmaktadır (Halliwell and Gutteridge 2001; Cooke *et al.* 2003; Evans 2004; Bakır 2014). İyonize olan radyasyonlarla meydana gelen SR'ler DNA'yı etkileyip hücrede ölüme yol açarlar. Aynı zamanda lipid peroksidasyonu sonucunda meydana gelen malondialdehit nadiren de olsa DNA'da mutasyona sebebiyet vererek yaşam ve beslenme gibi çeşitli faktörlerinde bir araya gelmesiyle farklı genetik hastalıklara ve kansere sebebiyet verebilmektedir (Akkuş 1995).

1.5.2. Proteinler üzerine etkileri

Proteinler, serbest radikallerden lipitlere göre daha az etkilenirler (Erol 2015). Serbest radikallerde bulunan proteinlerin hasarlardan dolayı ne derecede etkileneceği proteinde bulunan aminoasit kompozisyonuna bağlı olup radikalın toksisitesine ve proteinin lokalizasyonuna göre değişerek vermiş olduğu zararın boyutlarıda değişmektedir (Kavas

1989; Erenel vd 1992). Zarar sonucu karbon merkezli radikaller ve sülfür radikalleri oluşmaktadır (Nordberg and Arner 2001; Netto *et al.* 2002; Kayış 2010) İmmunoglobulin G gibi çok fazla miktarda disülfid bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulmaktadır (Freeman and Crapo 1982; Bakır 2014).

1.5.3. Membran lipidleri üzerine etkileri (lipid peroksidasyonu)

Lipit peroksidasyonu çoklu doymamış yağ asitlerinin radikaller ile meydana getirdikleri oksidasyon ile başlayan ve otokatalitik zincir reaksiyonu ile devam edip sonucunda canlıda biyolojik hasara sebebiyet veren reaksiyondur. Serbest radikallerin zararlı etkilerinden en fazla etkilenen membran lipidleri olup, hücre membranında bulunan yağ asitlerinin doymamış bağları ve kolesterol, serbest radikaller ile kolayca reaksiyona girerek peroksidasyonun oluşmasına neden olurlar (Weiss and Lobuglio 1982; Freeman and Crapo 1982; Cheesman and Slater 1993; Halliwell and Gutteridge 1999). Meydana gelen peroksidasyon oksidatif hasara neden olup membranın akışkanlığını azaltmaktadır (Kavas 1989). Dolayısıyla canlıda meydana getirdiği hasarın geri dönüşü yoktur (Davies *et al.* 1987)

Lipit peroksidasyonu, hücre membranında birtakım değişiklikler meydana gelerek sonuçlanmaktadır. Bunlar kısaca;

- Membranın yapı taşı olan lipidlerin akışkanlıklarının bozulması
- Tiyol gruplarında oksidasyon oluşturarak membran üzerinde yer alan lipit-protein ilişkisinde deformasyon
- MDA hücre membranlarında iyon alışverişine etki ederek bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açarak iyon geçirgenliğinin değişimi ve enzim aktivesinin inhibe olması gibi olumsuz değişikliklere neden olmaktadır (Moslen 1994; Kayış 2010).

1.6. Antioksidan Savunma Sistemi

Reaktif oksijenlerin oluşumu ve bu oluşumda meydana gelen hasar veya hasarların önlenmesi için vücutta bir takım farklı savunma sistemleri yer almaktadır. ‘Antioksidan savunma sistemi’ veya ‘antioksidanlar’ diye anılan bu sistem; serbest radikalleri nötraliz hale getirerek, oluşturdukları hasarın tamir edilmesine yardımcı olur ve vücudun oluşan hasardan minimum şekilde etkilenmesi ya da vücudun tekrardan yenilenmesini sağlar (Arosio *et al.* 2000).

Antioksidanlar etkilerini iki şekilde göstermektedir (Winston 1991; Murray *et al.* 1993; Hermes *et al.* 2001; Kayış 2010);

1. Serbest Radikallerin oluşumunun engellenmesi

- a-Başlatıcı reaktif türleri uzaklaştırarak
- b-Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırarak
- c-Oksijenin konsantrasyonunu azaltarak

2- Serbest Radikallerin etkisiz hale getirilmesi

- a- Zincir kırıcı etki: Reaktif oksijen türlerini ve zincirleme reaksiyon başlatacak olan diğer maddeleri kendilerine bağlayıp reaksiyon zincirini kırarak fonksiyonlarını önleyici etki şeklindedir.
- b- Bastırıcı etki: Reaktif oksijen türleri ile etkileşip onlara birer proton ekleyerek aktivite kaybına neden olan etki şeklinde olup flavinoidler, vitaminler örnek gösterilebilir.
- c- Toplayıcı etki: Reaktif oksijen türlerini etkileyerek onları tutmayı ve daha minimum reaktif moleküllerine çevirmeye yönelik etki şeklindedir.
- d- Onarıcı etki: Oksidatif zarar görmüş biyomoleküller onararak hasarı yok etme etkisidir.

Antioksidan enzimler, enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Çizelge 1.3).

Çizelge 1.3. Antioksidan enzimler

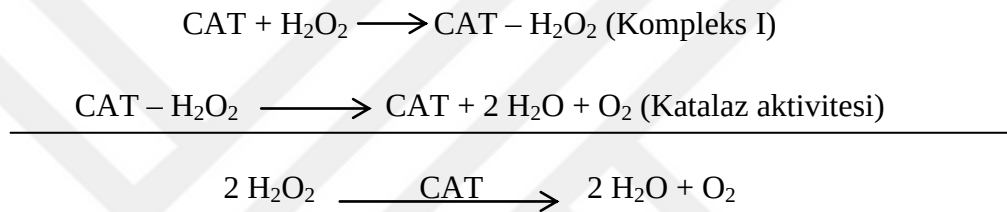
Enzimatik Antioksidanlar	Enzimatik olmayan antioksidanlar
Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz Sistem	E vitamini (α - tokoferol)
SOD (Süperoksit dismutaz)	B-Karoten
CAT (Katalaz)	Ubikinon
GPx (Glutasyon peroksidaz)	C Vitamini (askorbik asit)
GR	Albumin
GST	GSH (Glutasyon)
	Melatonin
	Ürik asit
	Flavonoidler
	Bilurubin

1.7. Antioksidan Enzimler

Biyokatalizör olan enzimlerin katalizleme gücü oldukça yüksektir. Organizmalardaki yapım ve yıkım tepkimelerinin tümü enzim katalizörlüğünde meydana gelmektedir. Dolayısıyla enzimler canlılarda oldukça önemlidir. Ayrıca enzimler genellikle organizma dışı aktivite gösterdiğinden önemi daha da artmaktadır. En önemli antioksidan enzimleri: organik peroksitleri detoksifasyona uğratan glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve hidrojen peroksit (H_2O_2)'i suya indirgeyen katalaz (CAT), süperoksit anyonunu H_2O_2 'e dönüştüren süperoksik dismutaz (SOD)'dır. Bu enzimler serbest radikalleri etkisiz hale getirerek organizma aktif oksijenden ve serbest radikallerden etkilenmez (Hıgashi *et al.* 1974)

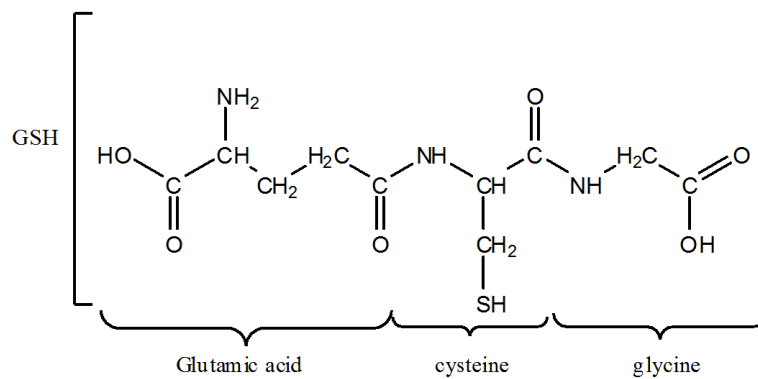
1.7.1. Katalaz (CAT)

Katalaz (CAT), tüm canlı hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunup doğada da oldukça yaygındır. Ayrıca oksidoredüktazların hidroperoksidazlar sınıfında yer almaktadır (Hıgashı *et al.* 1974). Bu enzimin en önemli görevi H_2O_2 'i moleküler oksijen ve suya katalizlemesidir. CAT, hem elektron alıcı hem de verici olup substrat olarak da H_2O_2 'i kullanmaktadır. Söz konusu bu enzim H_2O_2 'nin hücrel bileşiklere zarar vermesini engellemektedir (Erol 2015).



1.7.2. Glutatyon (GSH)

Glutatyon birçok hücrede bulunan bir tripeptittir (Şekil 1.3). L-sistein, L-glutamat ve L-glisinden iki aşamada sentezlenir. Meydana gelen peptit bağlarının her biri için bir molekül ATP harcanmaktadır (Küfrevioğlu 2007).



Şekil 1.3. Glutatyon'un molekül yapısı (Perpetuo *et al.* 2011)

Glutasyon; eritrosit proteinlerinde ve hemoglobin de mevcut olan sistein rezidülerini indirgenmiş şekilde bulundurarak sülfhidril tamponu görevini üstlenmektedir. GSH'ın hücre içi derişimi hücrenin tipine göre 0,5-10 mM arasında değişmektedir (Reed 2000). GSH; kan hücreleri, beyin, böbrekler, sindirim sistemi gibi pek çok organ ve dokuda bulunup asıl kaynağı karaciğerdir. Eksikliği ise mitokondri başta olmak üzere tüm hücresel fonksiyonlarında bozulmalardan kaynaklanmaktadır (Faintuch *et al.* 1999). Hücrelerde toplam glutasyonun %5'i okside glutasyon (GSSG) olup geriye kalan %95'lik kısım ise GSH şeklinde bulunmaktadır. Glutasyonun başlıca görevleri arasında sisteinin taşınımı, ksenebiyotiklerde oluşan detoksifikasyon, DNA'nın sentezi gibi canlılar için önemli olan fizyolojik olaylarda görev almaktadır (Sen 1997). Bununla birlikte hücre içerisinde yer alan tiyollerin yarısını meydana getiren Glutasyon; C ve E vitaminleri gibi eksojen kaynaklı antioksidantların kullanılabilirliğini de arttırmaktadır. Canlı dokularında ve hücre içerisinde GSH içeriğinin azalmasına neden olan birtakım etkenler bulunmaktadır. Bu etkenler; hücre içerisinde glutasyon sentezinin sınırlandırılması, glutasyon kullanımının artması, okside olan glutasyonun hücre içerisinde redüksiyonunun azaltılması şeklindedir (Sen and Packer 2000).

Oksidatif strese karşı savunma sisteminin en önemli basamağını glutasyon oluşturmaktadır (Ahmed vd 2000). Oksidatif stres zayıfladığında adaptasyon mekanizması devreye girerek GSH seviyesini artırmaktadır. Bunun tam aksi durumunda ise zayıflayan adaptasyon mekanizması ile giderek artan okside glutasyon oluşumundan dolayı GSH seviyesinde azalma görülmektedir (Zhang *et al.* 2005).

1.7.3. Glutasyon peroksidaz (GPx)

Hücrelerde suda çözülebilen, düşük molekül ağırlığına sahip olan moleküllere glutasyon denilmektedir (Travacio *et al.* 2000). Ayrıca organik hidroperoksitlerin ve hidrojen peroksit indirgenmesinden sorumlu enzimi olup mitokondri, hücre membranında ve sitozol de yer almaktadır (Deaton and Marlin 2003). Molekül ağırlığı yaklaşık 85.000 dalton'dur Yapı olarak da birbirine benzeyen dört subüniteden meydana gelen tetramerik bir enzimdir (Pioruńska *et al.* 1999). Glutayon peroksidaz intraselüler

anlamda lipidleri proksidasyondan koruyan en önemli enzimdir. Hücrede özellikle de sitoplazmada bulunan bu enzim hücrenin fonksiyonunu korumasının yanı sıra yapısını da korumaktadır. Ayrıca bu enzimin görevi lipid peroksidasyonu sonucu oluşan hasarlardan koruma sağlamaktır (Tsai 1975) Büyük hücrel antioksidan enziminin aktivasyonu için selenyum önemli bir kofaktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Selenyum eksikliğinde glutatyon peroksidaz aktivitesinde azalma görülür bununla birlikte lipid peroksidasyonunda da artış gözlenmektedir (Steenvoorden 1997; Arteel *et al.* 1999)

1.7.4. Süperoksit dismutaz (SOD)

1968 yılında ilk olarak Fridovich ve Mc Cord tarafından saptanan süperoksit dismutaz enzimi, süperoksit radikalının H_2O_2 ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen bir enzim olarak görev yapmaktadır (Mruk *et al.* 2002). Tiplerine göre SOD'lar 3 şekilde sınıflandırılabilir. Bunlar; manganez (Mn) SOD, çinko/ bakır (Zn/Cu) SOD ve demir (Fe) SOD şeklindedir. Zn/Cu SOD, kloroplastlarda, bazı bakterilerde ve ökaryot hücrelerin sitozolünde yer almaktadır. Prokaryot ve ökaryot hücrelerinin mitokondrilerinde Mn-SOD, prokaryotlarda ise Fe-SOD bulunur (Olsvik *et al.* 2005).

1.8. Oksidatif Stres

Serbest radikaller, organizmalarda sürekli olarak oluşturulup ve antioksidan savunma sistemi tarafından ortadan kaldırılan moleküllerdir (Storey 1996). Bu sistemde serbest radikallerin oluşumu ile antioksidan savunma sistemi tarafından ortadan kaldırılması arasında var olan dengeye oksidatif denge denilmektedir (Oruç 2010). Antioksidan savunma mekanizmasının yetersiz oluşu yada serbest radikal oluşumunun artması sebebiyle oksidatif dengenin serbest radikaller yönüne kayması ile oksidatif stres oluşmaktadır (Hermes *et al.* 2001; Serafini and Del 2004; Kayış 2010). Oksidatif stres genellikle hücre metabolizması ile ilişkili olup DNA'daki iplik kırılmaları, özel proteinlerin membranlarında hasarların meydana gelmesi, lipidlerin peroksidasyonu gibi bozuklukları tetiklemektedir (Halliwell and Aruoma 1991). Protein karbonilasyonu ve

lipit peroksidasyonu gibi iki biyokimyasal düzensizlikte oksidatif stresten kaynaklanmaktadır (Almroth *et al.* 2005).

Tarımsal mücadele ve tarımsal faaliyetlerde kullanılan herbisitlerin balıklar üzerinde meydana getirdiği toksik ve histopatolojik çalışmalar oldukça azdır. Bu nedenle bu çalışmada ülkemizde kullanımı oldukça yaygın olan ve etken maddesi linuron olan herbisitlin gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) üzerinde oluşturduğu toksisitenin belirlenmesi ve bu etken maddenin balıktaki karaciğer ve solungaç dokularında meydana getirdiği histopatolojik ve biyokimyasal etkilerin incelenmesi amaçlanmıştır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Tamsyn (2014), linuronun in vivo ve in vitro ortamlarda balıkların üreme fonksiyonları üzerine etkilerini araştırmışlardır. En yüksek konsantrasyona maruz kalan balıklarda total heparik kolesterolde belirgin azalma gözlemlendiği, total kolesterol ile linuron konsantrasyonu arasında negatif korelasyon olduğu belirlenmiştir. Ayrıca kolesterol biyosentezinin engellenmesinin, linuron tarafından androjen sinyalinin bozulması sonucu olduğu ortaya çıktığı, bunlara ek olarak antioksidan enzimler dahil olmak üzere hücrel stres yanıtlarında yer alan transkrip sayısında artış olduğu gözlemlenmiştir.

Boran *et al.* (2010), yaptıkları çalışmada, karbaril ve maneb pestisitlerinin gökkuşağı alabalığı solungaç, karaciğer, dalak ve böbrek dokuları üzerine histopatolojik etkileri incelenmiş ve solungaç dokularında lamellar ödem, epitel hücrelerinde nekroz; karaciğer, dalak ve böbrek dokularında ise nekroz ve inflamasyon tespit edilmiştir.

Nwani *et al.* (2010), yaptıkları çalışmada, tatlı su balığı olan *Channa punctatus*'ta atrazin ve glyphosate herbisitleri ile carbosulfan insektisitinin toksik etkileri incelenmiş ve sonuçta balıkların carbosulfan insektisitine diğer herbisitlerden daha hassas olduğu, doza ve zamana bağlı olarak mortalite oranında artış olduğu ve pestisitlere cevap olarak davranışta meydana gelen değişikliklerin strese neden olduğu rapor edilmiştir.

Topal *et al.* (2015b), glyphosate herbisitinin gökkuşağı alabalığı karaciğer dokusunda akut ve kronik etkilerini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda, glyphosate herbisitinin balıklarda yüzme performansını etkilediğini, karaciğerde histopatolojik hasara ve antioksidan enzim aktivitelerinde olumsuz etkilere sebep olduğunu tespit etmişlerdir.

Ortiz-Ordóñez *et al.* (2011), yerbimat herbisitinin *Goodea atripinnis* balıkları solungaç ve karaciğer dokuları üzerinde biyokimyasal ve histolojik etkilerini incelemişler ve sonuç olarak her iki dokuda LPO düzeyi ve CAT aktivitesinin arttığı ve histopatolojik hasarların oluştuğunu rapor etmişlerdir.

Kan *et al.* (2012), deltamethrin pestisitinin *Oreochromis niloticus* balıklarının solungaç ve karaciğer dokularında meydana getirdiği histopatolojik etkileri incelemişler ve deltamethrin pestisitinin solungaç dokularında hipertrofi, hiperplazi, tipik solungaç lezyonları, karaciğer dokularında ise yağ dejenerasyonu, vakoular dejenerasyonu gibi histopatolojik hasarlara neden olduğunu tespit etmişlerdir.

Çinkılığlu (2007), yaptığı çalışmada, organofosfor grubundan olan insektisid ve avisid fenthion bulunduran antioksidant ve GSH öncüsü NAC'nin düşük (0,5mg/kg) ve yüksek (400mg/kg) dozlarını *Cyprinus carpio*'da beyin dokusunda GSH redoks durumu, antioksidant enzim aktivitesi ve lipid peroksidasyonu ile AChE enzim aktivitesi üzerine etkilerini incelemiştir. Sonuçlar doğrultusunda, fenthionun oksidatif strese bağlı toksisitesinde NAC'nin düşük dozda GSH redoks kapasitesi ile GST ve SOD gibi antioksidant enzimlerin aktivitesini artırdığı, oksidatif stresi azalttığı, yüksek dozda ise NAC'nin beyinde GST aktivitesi ile protein düzeyini olumsuz etkileyerek oksidatif strese neden olduğu belirlenmiştir.

Işık (2007), yaptığı çalışmada, tarımsal mücadelede oldukça yaygın kullanılan parathion metil ve diazinonun farklı dozlarda gökkuşağı alabalıklarının solungaç, karaciğer ve kas dokularındaki GSH ve LPO düzeyleri ile antioksidan enzim aktiviteleri SOD, GSH-Px, GR ve GST üzerine etkileri incelenmiştir. Bu süreler sonunda, farklı dozlarda LPO düzeyi artış gösterirken, GSH düzeyinde azalma ve antioksidan enzim aktiviteleri düzeyinde ise farklı etkilere neden olduğu tespit edilmiştir.

Ferrari *et al.* (2007), azinfos metilin (AzMe) ve karbarile'nin gökkuşağı alabalıkları böbrek ve karaciğer dokuları üzerine etkilerini araştırmışlardır. Karboksilesteraz (CbE), CAT ve GST enzimlerinin yanı sıra GSH ve Sitokrom P450-1A (CYP1A) seviyeleri de karaciğer ve böbrek dokularında tespit edilmiştir. Kimyasala maruz kalan tüm gruplarda karaciğer CbE enziminin belirgin şekilde inhibe olduğu, karaciğer ve böbrek GSH seviyelerinin azaldığı, karbarilin CAT enziminin artmasına neden olduğu ve AzMe'nin ise CAT enzimini azalttığı rapor edilmiştir. Ayrıca, karbarile'nin GST ve CYP1A enzimlerini artırdığı, AzMe'nin ise bu enzimleri etkilemediği tespit edilmiştir.

Farombi *et al.* (2008), butachlor herbisitinin Africa kedi balıkları üzerindeki etkilerini incelemişler ve bu herbisit solungaç, karaciğer ve böbrek dokuları LPO düzeyleri ile SOD ve CAT enzim aktivitelerinde artışa neden olduğunu tespit etmişlerdir.

Kiparissis *et al.* (2003) tarafından yapılan yapılan çalışmada, bir fungusit olan vinclozolin ve cyproteran aserat'ın *Oryzias latipes* balıklarında gonad gelişimi üzerine histopatolojik etkileri araştırılmış ve araştırma sonucunda erkek balıklarda spermatogenesisin etkilendiği, ovaryum kanallarında daralma olduğu ve çift cinsiyet (testis-ova) oluşumunda artış olduğu rapor edilmiştir.

Jiraungkoorskul *et al.* (2002), tarafından yapılan yapılan çalışmada, Nil Tilapiyası (*Oreochromis niloticus*) glyphosate herbisitinin subletal konsantrasyonlarına maruz bırakılmış ve organlarda meydana gelen histopatolojik değişiklikler gözlemlenmiştir. Solungaçlarda hiperplazi, karaciğerde hepatosit boşlukların oluşumu ve piknoz gözlenmiştir.

Oropesa *et al.* (2009), simazine herbisitinin sazan balıkları hepatopankreas dokuları GSH ve MDA düzeylerinde artışa neden olduğunu rapor etmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırma yeri

Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi İç Su Balıkları Uygulama ve Araştırma Merkezinden gökkuşağı alabalıkları temin edilmiş olup, Akvaryum Balıkları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan Toksikoloji Deneme Ünitesi'nde deneme kurulmuştur.

3.1.2. Deneme ortamı

Araştırmada 1 m çap ve 1 m derinliği olan, su tahliyesi eğik boru sistemiyle yapılan fiberglas tanklar kullanıldı. Balıkların sıçramasını önlemek için tankların üzeri ağlarla kapatıldı (Esenbuğa 2013). Filtre sisteminden geçirilen su, kg balığa 0,5 l/dk.'dan az olmamak şartıyla tanklara dağıtıldı ve deney boyunca 400 L'lik fiberglas tanklarda sıcaklık 10-12°C, pH 7,2±0,5, çözülmüş O₂ miktarı 8,4±0,4 mg/l, su sertliği 181,6±4,23 mg/l olarak ölçüldü.

Çalışmada, daha önce toksik maddeye maruz kalmamış ve enfeksiyon geçirmemiş gökkuşağı alabalıkları kullanıldı. Her bir tank içerisine 150± 6,75 gr ağırlığında 15± 0,48 cm uzunluğunda ve cinsiyet ayrımı yapılmaksızın 10 adet balık konuldu. Balıkları 15 günlük adaptasyon süreci boyunca %45 proteinli ticari alabalık yeminden, günlük olarak canlı ağırlığın %2'si oranında yemleme yapıldı. Yemleme sabah ve akşam olmak üzere günde 2 kez yapıldı. Tanklar her gün tahliye borusu yardımıyla sifonlanarak yem ve dışkı artıklarının ortamdaki uzaklaştırılması sağlandı.

3.1.3. Balık materyali

Gökkuşığı alabalığı *Salmonidae* familyasına ait bir tür olup, anavatanı Kuzey Amerika'dan Avrupa'ya getirilmiş bir alabalık türü olup dünyada yüzlerce yıldır kültürü yapılan ve ülkemizde de yetiştiriciliği en fazla yapılan ıslah edilmiş bir türdür (Alpbaz 2005). Yapılan çalışmada, ekonomik öneme sahip, adaptasyon kabiliyeti yüksek, temini kolay ve geniş duyarlılığa sahip gökkuşığı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*) kullanılmıştır.

Gökkuşığı alabalığının sınıflandırılması;

Alem: Animalia (Hayvanlar)

Şube: Chordata (Kordalılar)

Sınıf: Actinopterygii (Işınsal yüzgeçliler)

Takım: Salmoniformes

Familya: Salmonidae (Somongiller)

Cins: *Oncorhynchus*

Tür: *Oncorhynchus mykiss*

3.1.4. Uygulanan kimyasal

Etken maddesi Linuron olan Aragorn (450 SC) herbisiti Ertar Kimya firmasından temin edilmiş olup, ticari formülasyonu ($C_9H_{10}Cl_2N_2O_2$), N-(3,4-diklorofenil)- N-metoksi-N-metilüre şeklindedir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Deneme planı

Deney prosedürü aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. Her bir grupta 10 adet gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) kullanılarak 4 deney grubu oluşturulmuş olup bu gruplardan bir tanesi kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Uygulama dozları belirlenirken linuron'nun LC₅₀ değerinden (3 mg/L) yararlanılmıştır (Oulmi *et al.*, 1995; Patterson, 2004; Uren *et al.*, 2015).

- a) Kontrol
- b) 30 µg/L Linuron (LC₅₀'nin %1)
- c) 120 µg/L Linuron (LC₅₀'nin %4)
- d) 240 µg/L Linuron (LC₅₀'nin %8)

Balıklar 15 günlük bir aklımasyon periyodundan sonra denemeye alınmış ve linuron'nun 3 farklı dozu 21 gün süre boyunca 12 saatte bir suda çözülerek tank suyuna ilave edilip, balıkların kimyasala maruziyeti sağlanmıştır. Kontrol grubuna ise hiçbir muamele yapılmadan, diğer balıklar ile aynı şartlar altında (sıcaklık, nem, güneş ışığı, karanlık vb.) muhafaza edilmiştir. Belirlenen 21 gün süre sonunda tanklarda bulunan balıklar servikal dislokasyonla öldürülüp histopatolojik ve biyokimyasal incelemeler için karaciğer ve solungaç doku örnekleri alınmıştır. Histopatolojik incelemeler için dokular %10'luk formalin solüsyonuna alınmıştır. Biyokimyasal incelemeler için de dokular -20°C'de muhafaza edilmiştir. Burada muhafaza edilen dokuların enzim aktivitelerini ölçmek üzere karaciğer ve solungaç dokularından homojenatlar hazırlanmıştır. Karaciğer ve solungaç dokusu homojenatlarından elde edilen süpernatantlarda süreroksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) enzim aktiviteleri ile GSH ve LPO miktarları literatürlere dayalı, uygun metotlar kullanılmak suretiyle tespit edilmiştir. Tüm ölçümler oda sıcaklığında, üç tekerrür olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Enzim aktivite ölçümü

3.2.2.a. Deneylerde kullanılan kimyasallar

Biyokimya ölçümlerinde kullanılan bütün kimyasal malzemeler Sigma Chemicals Company'den temin edilmiş olup; potasyum klorür (KCL), etanol, sodyum hidroksit

(NaOH), hidroklorik asit (HCL), etilen diamin tetraasetik asit (EDTA), hidrojen peroksit (H₂O₂), n- bütanol, piridin, tiyobarbitürik asit (TBA), sodyum hidroksit (NaOH) ve sıvı azot kullanıldı.

3.2.2.b. Deneylerde kullanılan cihazlar

Deney esnasında kullanılan aletler ve cihazlar;

UV-visible spektrofotometre	: BIO-TEK EPOCH, GEN 5 Yazılımı ile birlikte
Soğutmalı santrifüj	: Hettich Universal R 320
Hassas terazi	: Denver Instrument TP-303
pH metre	: OHAUS Starter 3100 pH Metre
Manyetik karıştırıcılar	: Heidolph Hei-Standard
Buzdolabı	: Vestel tek kapılı buzdolabı
Otomatik pipetler	: Eppendorf Research Pipette set 1 ve set 2
Derin dondurucu	: Sanyo MDF - 235
Çalkalayıcı su banyosu	: GFL 1083
Distile su cihazı	: GFL 2012/4
Vorteks	: Heidolph Standard ve IKA MS-3 Digital
Homojenizatör	: Qiagen TissueLyser LT

3.2.2.c. Doku homojenatlarının hazırlanması

Karaciğer ve solungaç dokuları bir havan içinde sıvı azot ile öğütülerek toz haline getirilmiştir. Her bir balık grubu dokularından 0,025 g tartılmış, üzerlerine 1,5 ml tampon çözeltilerden (her parametre için farklı bir tampon sistemi) ilave edilerek 1/60 (w/v) oranında seyreltilmiştir. Bu homojenatlar daha sonra homojenizatörde 10 dakika süreyle buz üzerinde homojenize edilmiştir. Homojenatlar soğutmalı santrifüj kullanılarak her enzim için literatürlerde belirtilen hızlarda 4°C’de santrifüj edilmiş ve hazırlanan bu süpernatantlarda biyokimyasal ölçümler yapılmıştır (Erol 2015).

3.2.3. Deneylerde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları

Lipid Peroksidasyon Seviyesinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

1. LPO Homojenat Tamponu (%10 KCl):

10 g KCl alınarak bir miktar saf suda çözündürülerek toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı.

2. LPO Ölçüm Karışımı:

a) %20 Asetik asit: 13 ml %100'lük glasiyel asetik asit alınıp, üzerine 65 ml saf su eklenmiştir.

b) %0.08 Tiyobarbütirik asit (TBA): 0,48 g TBA alınıp 1-2 damla 5 M NaOH çözeltisi ilavesi ile bir miktar saf suda çözündürüldü. Ardından toplam hacimi 60 ml ye tamamlandı.

c) %8 Sodyum dodesil sülfat (SDS): 0,8 g SDS alınıp bir miktar saf suda çözündürüldü ve hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır.

Glutasyon Seviyesinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

1. GSH Miktarını Ölçmek İçin Gereken Çözelti (10 mM DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)):

0,03963 g DTNB alınıp ve bir miktar metil alkolde çözülerek hacmi yine metil alkol ile birlikte 10 ml ye tamamlandı.

2. GSH Homojenat Tamponu (pH 7,4, 50 mM, Tris - HCl Tamponu):

1,514 g Tris-HCl 200 ml saf suda çözdürüldü ve pH'sı bir pH metre vasıtasıyla 7,4'e ayarlanarak hacmi saf su ile 250 ml ye tamamlandı.

3. GSH Ölçüm Tamponu (pH 8,2, 200 mM, 0,2 mM EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) içeren Tris-HCl Tamponu):

0,0146 g EDTA ve 6,05 g Tris-HCl alınarak 200 ml saf suda çözdürülüp, pH'sı bir pH metre vasıtasıyla 8,2'ye ayarlanarak hacmi saf su ile 250 ml ye tamamlandı.

Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

1. SOD Homojenat Tamponu (pH 7,8, 50 mM, 10 mM EDTA içeren Fosfat Tamponu):

a. 0,73 g EDTA ve 7 g KH_2PO_4 alınıp 200 ml saf suda çözüldü, pH 7,8'e ayarlanarak hacmi saf su ile 250 ml'ye tamamlandı.

2. SOD Ölçüm Karışımı:

a) 1,2 g / L BSA (Bovine Serum Albumine): 0,0061 g tartılıp, bir miktar saf suda çözülerek ve hacmi saf su ile 6 ml'ye tamamlanmıştır.

b) 0,6 mM EDTA: 0,0035 g EDTA alınarak, bir miktar saf suda çözüldü ve hacmi saf su ile 20 ml'ye tamamlandı (1-2 damla 5M NaOH ile çözünmektedir).

- c) 0,3 mM Ksantin: 0,0018 g Ksantin alınarak bir miktar saf suda çözülüp hacmi saf su ile 40 ml'ye tamamlandı.
- d) 0,4 M Na_2CO_3 : 0,5088 g alınarak bir miktar saf suda çözüldü ve hacmi saf su ile 12 ml'ye tamamlandı.
- e) 150 μM NBT (Nitro blue tetrazolium): 0,0024 g NBT (Nitroblue tetrazolium) alınarak bir miktar saf suda çözülerek hacmi saf su ile 20 ml'ye tamamlandı.

3. SOD Enziminin Aktivitesini Ölçmek İçin Gereken Çözelti (167 U/L Ksantin oksidaz):

- a) 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 0,7928 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ alınıp, bir miktar saf suda çözülerek hacmi saf su ile 3 ml ye tamamlanmıştır. Bu çözelti her seferinde taze olarak hazırlanıp $+4^\circ\text{C}$ 'de saklanarak soğuk olarak kullanılmıştır.
- b) Orijinal ambalajından (0,3 U enzim ihtiva eden enzim ve 1 ml sinde 32 mg protein) 34.79 μl alınarak ve üzerine 2 ml soğuk 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çözeltisi eklendi.
- c) 0.8 mM CuCl_2 : 0,0108 g CuCl_2 alınıp, bir miktar saf suda çözülerek hacmi saf su ile 100 ml ye tamamlandı.

Katalaz Aktivitesini Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

1. CAT Ölçüm Karışımı (40 mM, pH 7'de H_2O_2 içeren 50 mM Fosfat Tamponu):

1020 μl H_2O_2 ve 1,7 g KH_2PO_4 200 ml saf suda çözülüp, pH'sı 7,0'a ayarlanarak 250 ml'ye tamamlandı.

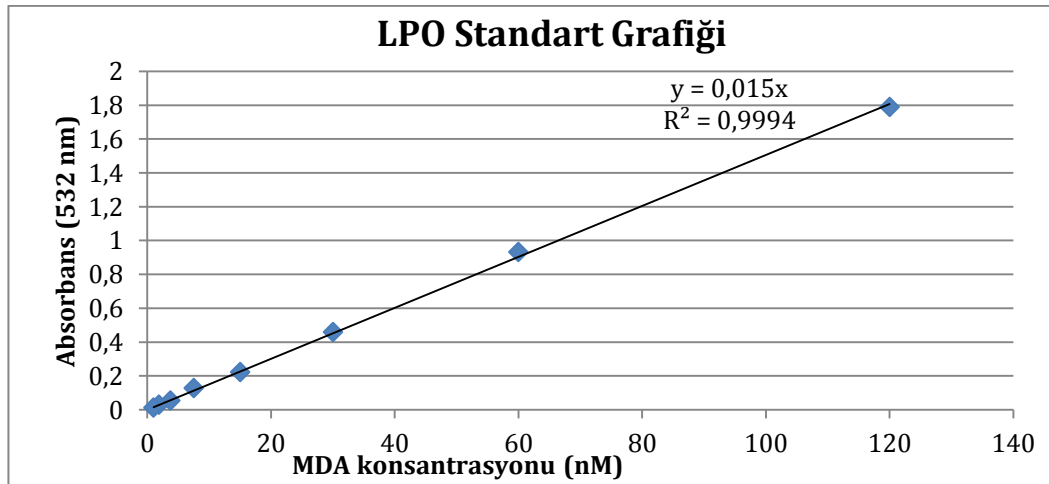
2. CAT Homojenat Tamponu (50 mM pH 7.8, %1 Triton X-100 içeren Fosfat Tamponu):

1,6 g KH_2PO_4 ve 2.6 ml Triton X-100 alınıp 200 ml saf suda çözdürüldü ve, pH'sı 7,8'e ayarlanarak 250 ml'ye tamamlandı.

3.2.4. Lipid peroksidasyon seviyesinin ölçümü (LPO)

Ölçüm prensibi: Hücre zarında serbest radikallerin meydana getirdiği ve aynı zamanda LPO'nun son ürünlerinden olan MDA düzeyini belirlemek için kullanılan yöntemlerin çoğu MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile oluşturduğu reaksiyonu temel alınmaktadır. İki molekül TBA bir molekül MDA ile sabit kırmızı renk oluşturmak üzere reaksiyona girmektedir. LPO ölçümü, Ohkawa *et al.* (1979) metoduna göre MDA'nın asidik ortamda TBA ile meydana getirdiği rengin 532 nm'de ölçülmesi prensibine dayanarak yapılmıştır (Ohkawa *et al.* (1979)).

Ölçüm: 0,025 g doku üzerine 1,5 ml %10 KCl ilave edilerek homojenize edildi. Homojenatlar, 5000 g 4°C'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra oluşan bu süpernatantlar LPO miktarının belirlenmesinde kullanıldı. Kapaklı deney tüplerinin içerisine 100 µl %8 sodyum dodesil sülfat (SDS), 250 µl homojenat, 750 µl %20 asetik asit, 750 µl %0,08 TBA ve 150 µl distile su pipetlenerek vortekslenmiştir. Oluşan karışım 100°C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra üzerine 2,5 ml n-bütanol ilave edilerek ölçüm yapılmıştır.



Şekil 3.1. MDA miktarının hesaplanmasında kullanılan standart grafik

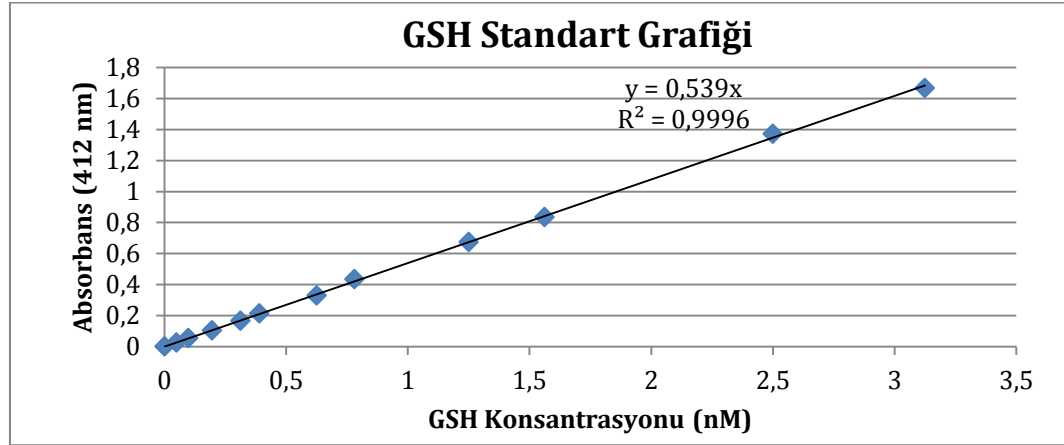
Miktarın hesaplanması: Meydana gelen kırmızı renk miktarları 532 nm’de 96 kuyulu kuartz plate kullanılarak okunmuş olup seyreltme katsayıları dikkate alınarak önceden hazırlanan MDA çözeltisi kullanılarak oluşturulan standart grafikten yararlanarak ölçümler yapıldı (Şekil 3.2). Numunelerin LPO miktarları, nmol MDA/g doku olarak tarif edilmiştir.

3.2.5. Total glutatyon miktarı ölçümü (GSH)

Ölçüm prensibi: Ölçüm ortamındaki DTNB [5,5'-Ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)] disülfid bir kromojen olup sülfhidril gruplu bileşiklerce kolayca indirgenmektedir. Meydana gelen sarı renk 412 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülebilmektedir (Sedlak *et al.* 1968).

Ölçüm: Sedlak *et al.* (1968)’in geliştirdiği yöntem esas alınarak gerçekleştirilmiştir. 0.025 g doku üzerine 1,5 ml 50 mM Tris-HCl ilave edilip pH 7,4’e ayarlanarak homojenize edildi. Homojenatlar, 12.000 g 4°C’de 10 dakika santrifüj edilip ve oluşan süpernatantlar GSH seviyesinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Deney tüpleri içerisine 1500 µl ölçüm tamponu (pH=8,2, 0,2 mM EDTA içeren 200 mM Tris-HCl) 100 µl DTNB, 500 µl süpernatant ve 7900 µl metanol pipetlenerek vortekslendi. Karışım 37°C’de 30 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra ölçümleri alındı.

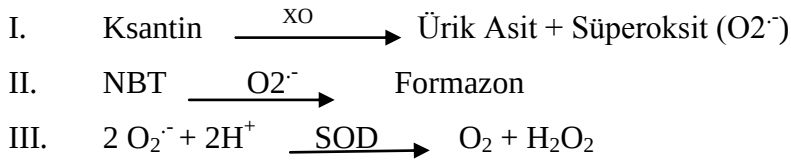
Miktarın hesaplanması: Oluşan sarı rengin 412 nm’de absorbansları 96 kuyulu kuartz plate kullanılarak okundu. Seyreltme katsayıları dikkate alınıp önceden hazırlanan GSH stok çözeltisi kullanıldı ve daha sonra oluşturulan standart grafikten (Şekil 3.3) yararlanarak hesaplamalar yapıldı. Numunelerin GSH miktarları, nmol/mg doku olarak tarif edildi. Her bir faktörün etkisi 3 tekrar yapılarak belirlendi.



Şekil 3.2. GSH miktarının hesaplanmasında kullanılan standart grafik

3.2.6. Süperoksit dismutaz aktivitesi ölçümü (SOD)

Ölçüm prensibi: Ksantin, XO enzimi aracılığıyla ürik aside çevrilirken oluşan süperoksit radikalleri, şayet ortamda NBT (nitrobluetetrazolium) bulunuyorsa, NBT ile etkileşime girerek formazon boyası oluşturmaktadır. Bu bileşik 560 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermektedir. Buna rağmen ortamda SOD enzimi bulunuyorsa süperoksit radikalleri bu enzim tarafından H_2O_2 'ye çevrildiği için formazon oluşumu azalacak, buna bağlı olarak da 560 nm'de ölçülen absorbans azalacaktır. Absorbanstaki azalmanın miktarı SOD aktivitesini vermektedir. Özetle; SOD aktivitesi aşağıda verilen II nolu reaksiyonun inhibe edilme derecesiyle ölçülebilmektedir (Sun *et al.* 1988).



Ölçüm: SOD aktivitesi Sun *et al.* (1988) tarafından tarif edilen yöntemle göre ölçülmüştür. Karaciğer ve solungaç dokuları homojenize edildikten sonra 18.000 g'de 1 saat santrifüj edilmiştir. Deney tüpüne 980 µl ölçüm karışımı (0,3 mM ksantin, 0,6 mM EDTA, 150 µM NBT, 0,4 M Na_2CO_3 , 1,2 g/L BSA), 200 µl supernatant, 20 µl XO

eklendikten sonra karıştırılarak yaklaşık 20 dakika inkübasyon bırakılmış ve 400 µl 0,8 mM CuCl₂ ilave edilerek reaksiyon sonlandırılmıştır.

Aktivitenin hesaplanması: Oluşan formazon miktarları 560 nm’de kuartz plate kullanılarak okunmuştur. Seyreltme katsayıları dikkate alınarak aşağıdaki geliştirilen formülden aktivite değerleri (EÜ) elde edilmiş ve SOD aktivitesi mmol/dakika/mg doku olarak tarif edilmiştir. Her bir faktörün etkisi 3 tekrar yapılarak verilmiştir.

$$\text{EU/mg doku} = \frac{\Delta A_{\text{kör}} - \Delta A_{\text{numune}}}{\Delta A_{\text{kör}}}$$

3.2.7. Katalaz aktivitesi ölçümü (CAT)

Ölçüm Prensipleri: Aktivite, ölçüm ortamındaki H₂O₂’nin CAT vasıtasıyla suya dönüşümü sağlanırken meydana gelen absorbands azalmasının 240 nm’de ölçülmesi esasına dayanmaktadır Aebi (1984).

Ölçüm: CAT’ın aktivitesi’nin belirttiği metoda göre ölçülmüştür. 0,025 g doku alınmış, üzerine 1,5 ml 50 mM K-fosfat tamponu (pH 7) ilave edilerek homojenize edilmiştir. Oluşan homojenat 10.000 g’de 4°C’de 60 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar katalaz aktivitesi ölçümünde enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

Kuartz plate içerisine H₂O₂ çözeltisinden 100 µl konularak numune çözeltisinden 200 µl ilave edildiği anda kronometre çalıştırılmıştır. Kuartz plate, okuyucuda 240 nm dalga boyunda 15 saniye aralıkla 3 dakika süreyle ölçülerek absorbands azalması köre karşı kaydedilmiştir.

Aktivitenin hesaplanması: Ölçümler, lineer olarak absorbands azalması olan aralıkta dakika başına absorbands azalması olarak hesaplanmıştır. Işık yolu (b)= 10mm, azalma

katsayısı ($\epsilon_{H_2O_2}$), 0,00394 (mmol⁻¹ x mm⁻¹) alınarak $A = \epsilon.b.c$ formülünden 240 nm’de, dakikada 1 mmol H₂O₂’in harcanmasını sağlayan enzim miktarı (=EÜ) hesaplanmıştır. Formülde seyreltme faktörleri dikkate alınmış, 25 mg doku için mmol/min= 60/25 x A/0,00394 şeklinde oluşturulan formülde bütün aktiviteler yerine konularak absorbans değerlerinden hesaplanmıştır. CAT aktivitesi, µmol/dakika/mg doku olarak tarif edilmiştir. Deneyler 3 paralel tekrar halinde yapılmıştır.

3.2.8. Histopatolojik İşlemler

Balıklardan alınan solungaç ve karaciğer doku örnekleri %10’luk tamponlu formalin solüsyonu içerisinde 1 gün süre ile tespit olması için bekletildi. Daha sonra doku örnekleri küçültüldü ve kasetlere alındı. Tespit sonrası dokular en az bir gece akan çeşme suyunda yıkandı. Sonra dokuların dehidrasyon ve şeffaflaştırma işlemleri için otomatik takip cihazı (Shandon Citadel 2000, ABD) kullanılarak sırasıyla %70, %80, %90 ve %100’lük alkolde 2’şer saat, yine ksilol solüsyonlarında birer saat ve parafinde 56°C 2’şer saat bekletildikten sonra bloklayma işlemi yapıldı. Bloklanmış dokulardan mikrotomda 5 mikronluk kesitler alınarak lamlara transfer edilmiştir.

3.2.8.a. Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi

Lamlar 1 saat süre ile 56°C etüvde parafinin erimesi için bekletildi. Bu işlem sonunda etüvden çıkarılarak şalelerde sırasıyla 5 dakika. ksilol I’ de, 5 dk. ksilol II’ de, 3’er dk. %100, %96, %80, %70, %60 alkolde, sonra 5 dk. distile suda bekletilerek Mayer’s Hematoksilen (Merck) solüsyonuna batırıldı ve 3 dk. bekletildi. Çeşme suyu ve asit alkol solüsyonu kullanılarak fazla boya deklöre edildi. Daha sonra Eozin (Riedel Haen) solüsyonuna alındı 3 dk. bekletildikten sonra sırasıyla %60, %70, %80, %96, %100 lük alkollerden 3’er dk. geçirilerek 10 dk. ksilole alındı ve entellan damlatılarak, lamelle kapatıldı. Hemotoksilen-Eozin ile boyanan preparatlar Olympus BX51 (DP72 kamera ataçmanlı) marka ışık mikroskopunda incelendi. Görülen lezyonlar orta ve şiddetli olarak iki başlık altında nitelendirildi.

3.2.9. İstatistiksel Analizler

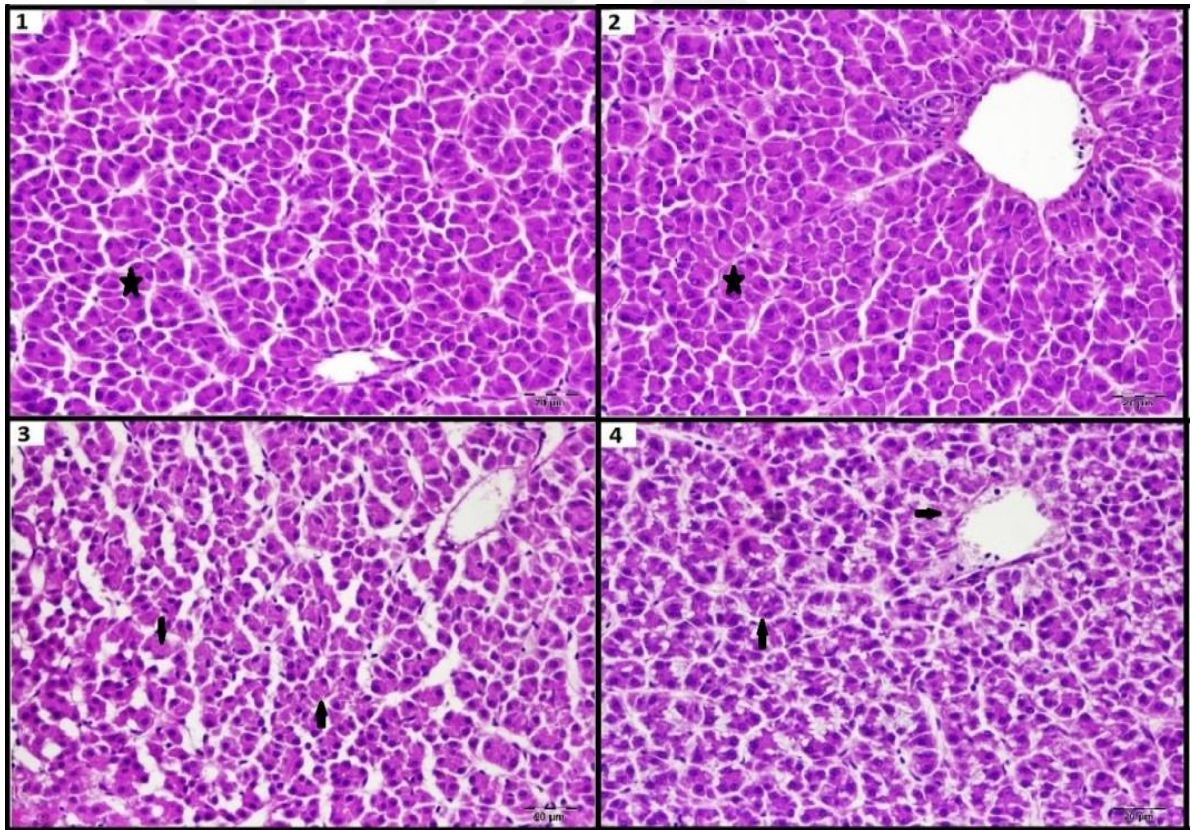
İstatistiksel analizler IBM SPSS 20.0 yazılım programı kullanılarak yapılmıştır (SPSS 2011). Bütün ölçümlerde istatistiksel farklılıklar ve önem seviyeleri “One-way Analysis of Variance (ANOVA)” testi ile belirlenmiş ve $p < 0.05$ seviyesindeki sonuçlar önemli kabul edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalarda Duncan testi uygulanmıştır.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

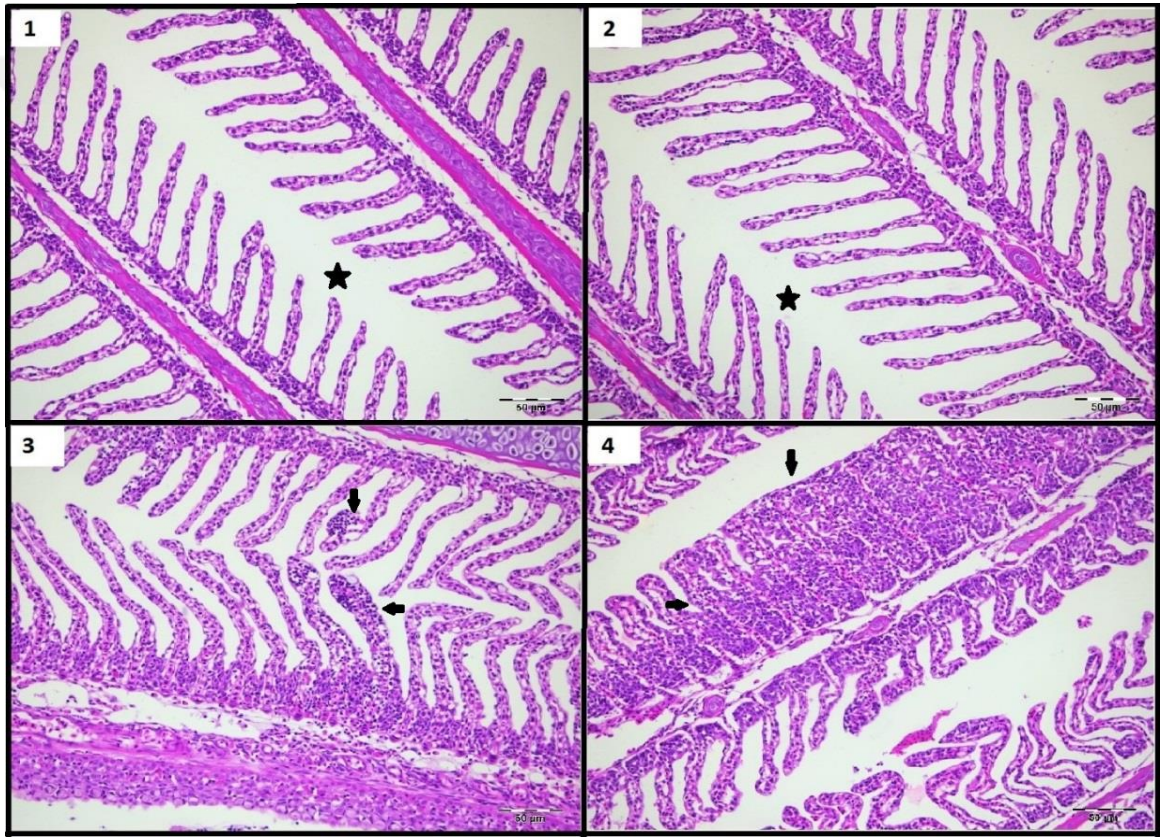
4.1. Histopatolojik Sonuçlar

Kontrol grubuna ait karaciğer dokularında yapılan histopatolojik incelemelerde herhangi bir patolojik bulguya rastlanmamıştır (Şekil 4.1.1). Toksik madde uygulanan diğer gruplarda yapılan değerlendirmede ise 30 µg/L linuron uygulanan grupta herhangi bir patolojik değişiklik gözlenmezken (Şekil 4.1.2), 120 ve 240 µg/L linuron uygulanan gruplarda konsantrasyona bağlı olarak şiddetli dejeneratif ve nekrotik değişiklikler gözlemlenmiştir (Şekil 4.1.3, Şekil 4.1.4).



Şekil 4.1. (1) Kontrol grubuna ait karaciğer histolojik yapısı. 20 µm. H.E. (yıldız) (2) 30 µg/L linuron uygulanan grubun normal histolojik görünümü. 20 µm. H.E.(yıldız) (3) 120 µg/L linuron uygulanan grubun karaciğer hepatositlerinde orta düzeyde dejeneratif ve nekrotik değişiklikler. 20 µm. H.E.(oklar) (4) 240 µg/L linuron uygulanan grubun karaciğer hepatositlerinde şiddetli dejeneratif ve nekrotik değişiklikler. 20 µm. H.E.(oklar)

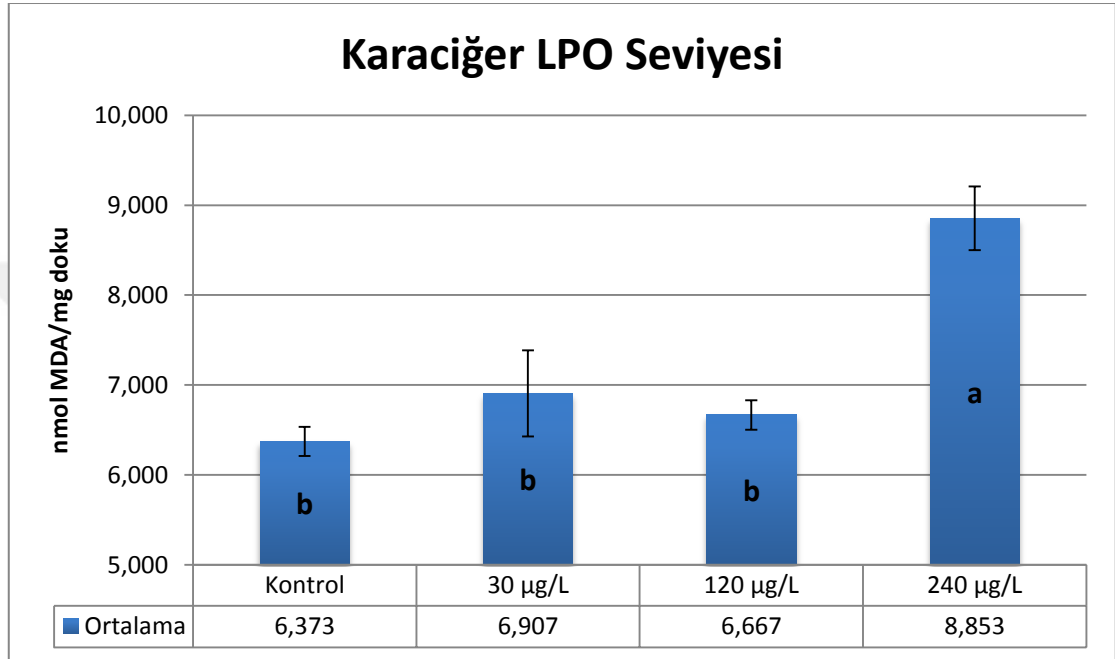
Benzer sonuçlar solungaç dokusu içinde gözlemlenmiştir. Karaciğerde olduğu gibi kontrol ve 30 $\mu\text{g/L}$ uygulanan konsantrasyonda herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanmamıştır (Şekil 4.2.1). 120 ve 240 $\mu\text{g/L}$ linuron uygulanan gruplarda ise konsantrasyon artışına paralel olarak orta ve şiddetli düzeyde hücresel infiltrasyonlar ile şiddetli dejeneratif değişiklikler kaydedilmiştir (Şekil 4.2.3, Şekil 4.2.4).



Şekil 4.2. (1). Kontrol grubuna ait solungaç histolojik yapısı. 20 μm . H.E.(yıldız) (2) 30 $\mu\text{g/L}$ linuron uygulanan grubun normal histolojik görünümü. 20 μm . H.E.(yıldız) (3) 120 $\mu\text{g/L}$ linuron uygulanan grubun solungaçlarında hücresel infiltrasyonlar ve lamellerde orta düzeyde dejeneratif değişiklikler. 20 μm . H.E.(oklar) (4) 240 $\mu\text{g/L}$ linuron uygulanan grubun solungaçlarında yoğun hücresel infiltrasyonlar ve şiddetli dejeneratif değişiklikler. 20 μm . H.E.(oklar)

4.2. Biyokimyasal Sonuçlar

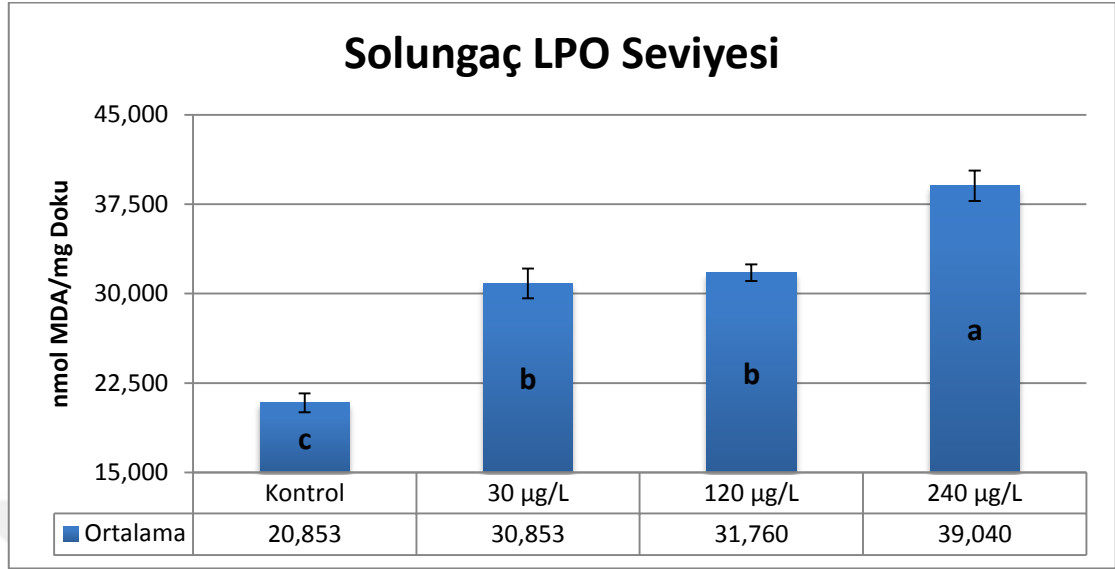
4.2.1. LPO seviyesi



Şekil 4.3. Karaciğer dokusu LPO seviyeleri

*Duncan testine göre şekildeki farklı harfler gruplar arası farkı göstermektedir.

Şeki 4.3 incelendiğinde, karaciğer dokusu kontrol grubu, 30 ve 120 µg/L konsantrasyonları ile kıyaslandığında MDA miktarı arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Diğer taraftan 240 µg/L uygulanan grubun MDA miktarı diğer gruplarla kıyaslandığında dikkat çekici şekilde arttığı belirlenmiştir ($p<0.05$).

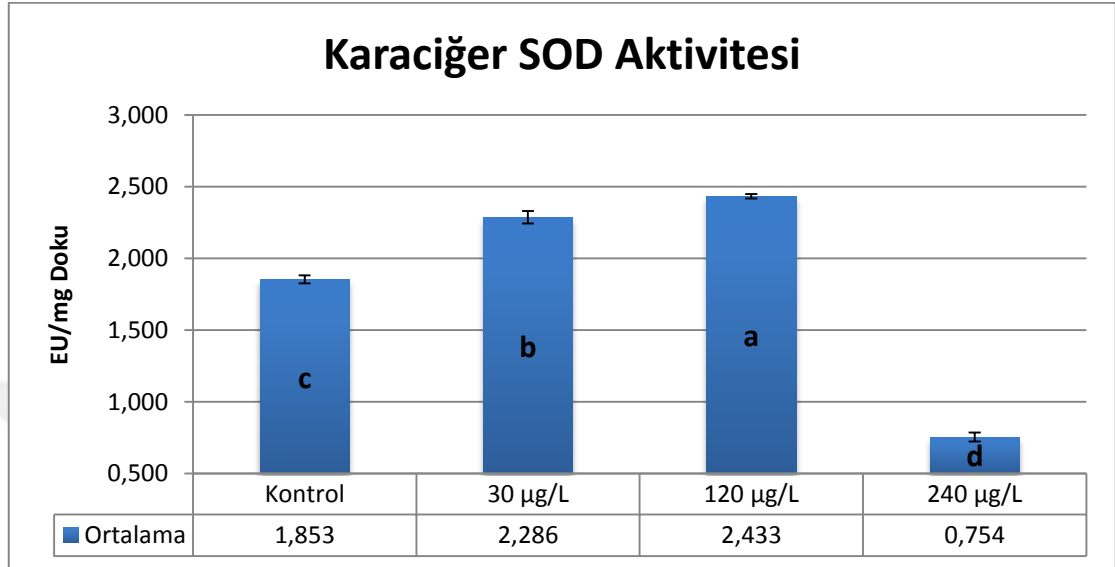


Şekil 4.4. Solungaç dokusu LPO seviyeleri

*Duncan testine göre şekildeki farklı harfler gruplar arası farkı göstermektedir.

Şekil 4.4 incelendiğinde, kontrol grubu ile diğer tüm gruplar kıyaslandığında LPO seviyelerinin önemli oranda arttığı gözlenmiştir ($p < 0.05$). 240 µg/L konsantrasyonda uygulanan grubun diğer gruplardan dikkate değer şekilde yüksek olduğu gözlenmiştir ($p < 0.05$).

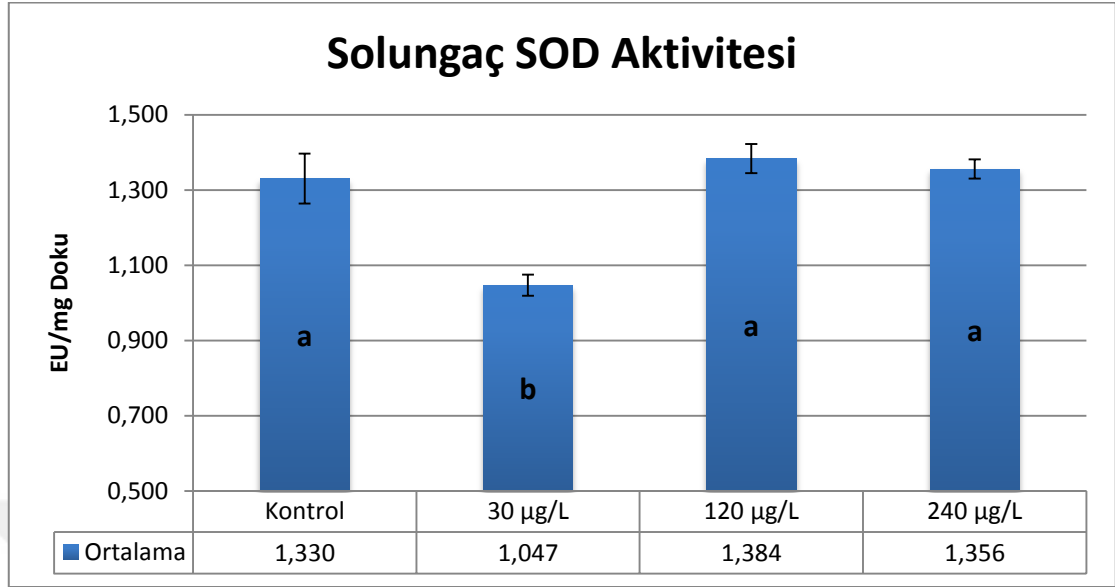
4.2.2. SOD aktivitesi



Şekil 4.5. Karaciğer dokusu SOD aktivitesi

*Duncan testine göre şekildeki farklı harfler gruplar arası farkı göstermektedir.

Şekil 4.5 incelendiğinde kontrol grubu, 30 ve 120 µg/L konsantrasyonları ile kıyaslandığında karaciğer SOD aktivitesi belirgin şekilde arttığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Bu sonucun aksine yine kontrol grubu ile 240 µg/L konsantrasyonu kıyaslandığında SOD aktivitesinin önemli oranda inhibe olduğu gözlenmiştir ($p < 0.05$).

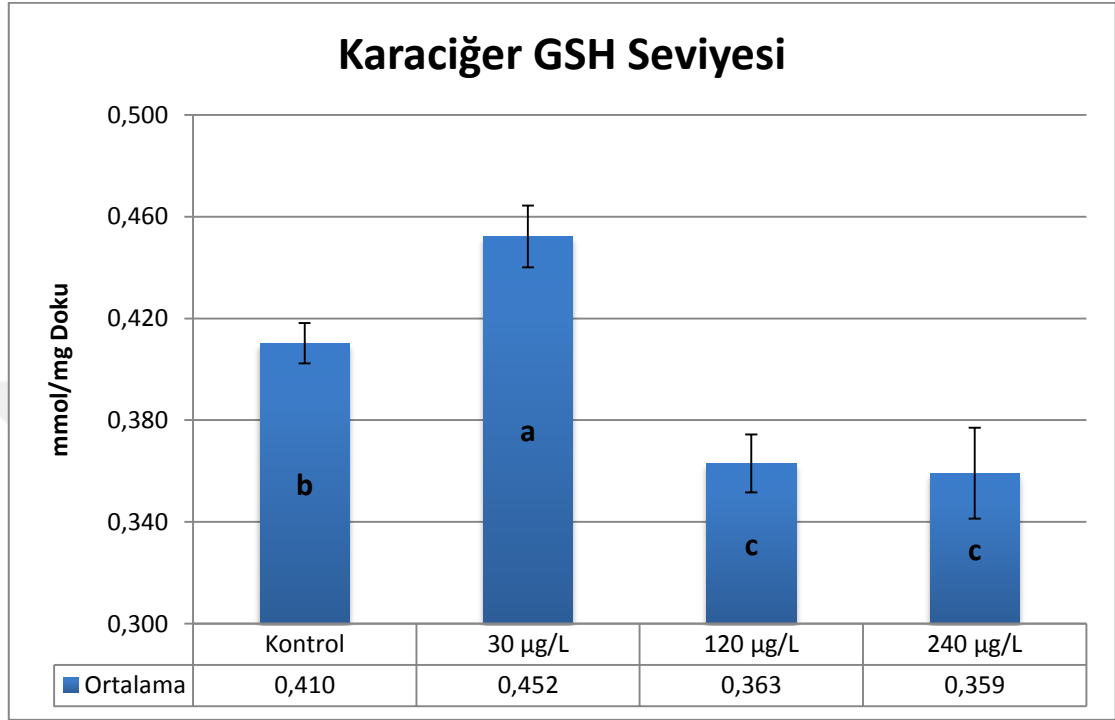


Şekil 4.6. Solungaç dokusu SOD aktivitesi

*Duncan testine göre şekildeki farklı harfler gruplar arası farkı göstermektedir.

Şekil 4.6 incelendiğinde solungaç dokusu kontrol grubu, 120 ve 240 µg/L konsantrasyonları ile kıyaslandığında SOD aktivitesinde anlamlı bir fark gözlenmezken ($p>0.05$), 30 µg/L konsantrasyonda aktivite azalmasının istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$).

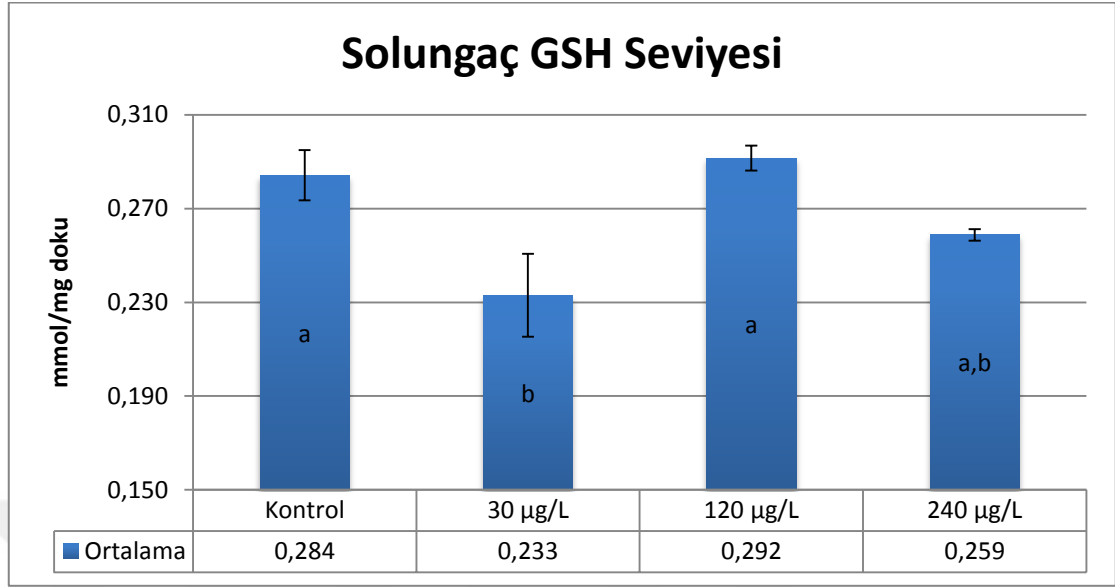
4.2.3. GSH seviyesi



Şekil 4.7. Karaciğer dokusu GSH aktivitesi

*Duncan testine göre şekildeki farklı harfler gruplar arası farkı göstermektedir.

Şekil 4.7 incelendiğinde karaciğer dokusu kontrol grubu ile 30 µg/L konsantrasyonu kıyaslandığında GSH seviyesinin anlamlı şekilde arttığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Bunun aksine 120 ve 240 µg/L konsantrasyonlarda uygulanan grupların GSH seviyesi kontrol grubuna kıyasla önemli derecede azaldığı gözlenmiştir ($p < 0.05$).

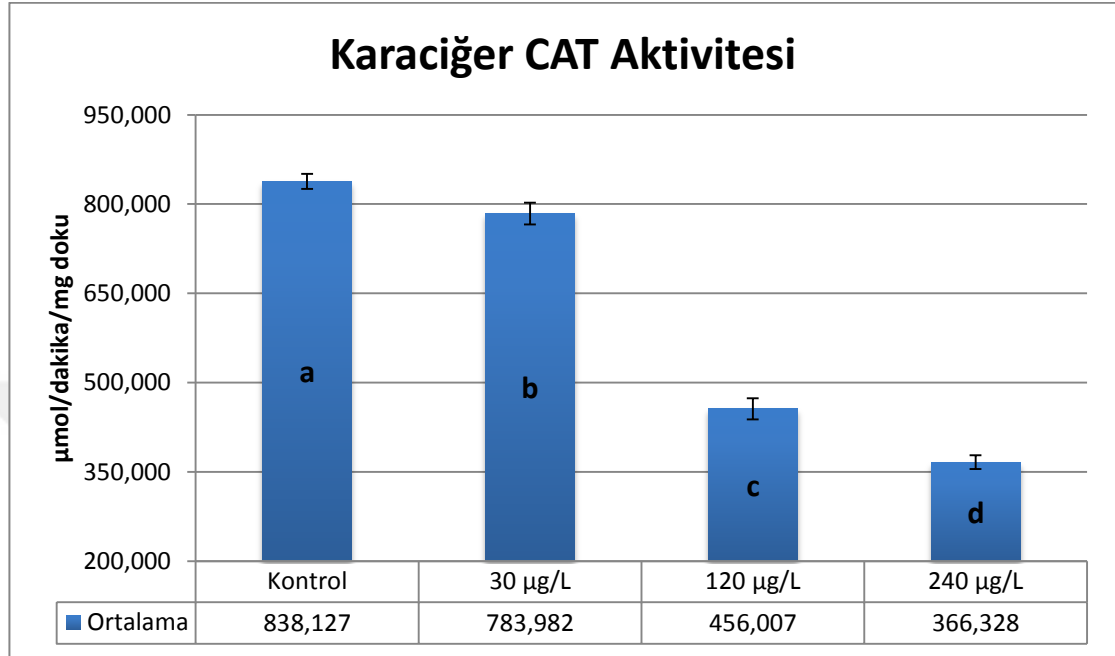


Şekil 4.8. Solungaç dokusu GSH aktivitesi

*Duncan testine göre şekildeki farklı harfler gruplar arası farkı göstermektedir.

Şekil 4.8 incelendiğinde solungaç kontrol grubu ile 30 µg/L konsantrasyonu kıyaslandığında GSH seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde düştüğü gözlenmiştir ($p < 0.05$). Diğer taraftan 120 ve 240 µg/L konsantrasyonda ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0.05$).

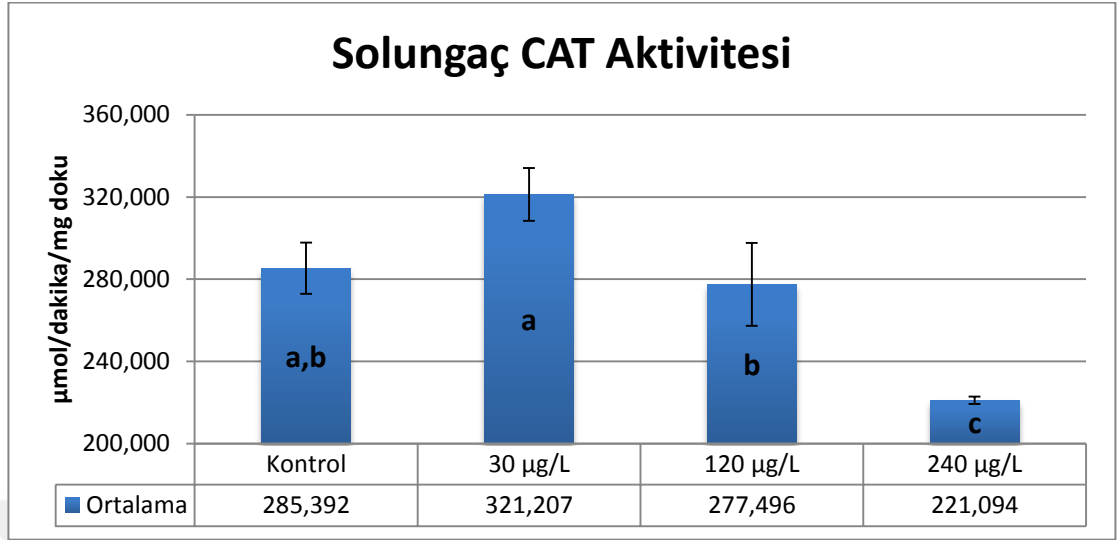
4.2.4. CAT aktivitesi



Şekil 4.9. Karaciğer dokusu CAT aktivitesi

*Duncan testine göre şekildeki farklı harfler gruplar arası farkı göstermektedir.

Şekil 4.9 incelendiğinde karaciğer dokusu kontrol grubu diğer gruplar ile kıyaslandığında CAT aktivitesinin dikkat çekici şekilde düştüğü gözlenmiştir ($p < 0.05$). İnhibisyon en fazla 240 µg/L dozda gerçekleşirken, diğer gruplarla da kıyaslandığında farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$).



Şekil 4.10. Solungaç dokusu CAT aktivitesi

*Duncan testine göre şekildeki farklı harfler gruplar arası farkı göstermektedir

Şekil 4.10 incelendiğinde solungaç dokusu kontrol grubu, 30 ve 120 µg/L konsantrasyonları ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farkın bulunmadığı ($p>0.05$), fakat bu iki konsantrasyon arasındaki farkın anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Ayrıca 240 µg/L konsantrasyondaki düşüş, diğer gruplarla kıyaslandığında anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1. Tartışma

Linuron ve daha birçok herbisit tarım alanlarında giderek fazla kullanılmaya başlanmıştır ve hedef olmayan organizmalarda fizyolojik ve morfolojik değişikliklere neden olduğu tesbit edilmiştir (Tate *et al.* 1997; Gilreath *et al.* 2000; Kolpin *et al.* 2006). Bu kimyasalların hedef olmayan canlılar üzerine etkilerinin araştırılması oldukça önemlidir (Parlak vd 2009). Bu anlamda, tarımsal ilaçların besin zinciri yoluyla canlılara ulaşp canlılarda ne gibi etkiler göstereceği ve bu etki mekanizmasının nasıl işlediğini tespit etmek amaçlanmıştır; dolayısıyla yapılan bu çalışmada linuron adlı herbisitinin gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)’nın karaciğer ve solungaç dokuları üzerinde antioksidan enzim (GSH, CAT ve SOD) aktiviteleri ile lipid peroksidasyonu ürünü olan MDA seviyelerindeki değişimler istatistiksel olarak belirlenmiş ve histopatolojik analizler yapılmıştır.

Fiziksel, çevresel ve birçok faktörün etkisi sonucu serbest radikaller, canlılarda çeşitli hastalıkların meydana gelmesinde önemli rol oynarlar. Pek çok doku hasarı ya da hastalığın meydana gelmesi antioksidan savunma mekanizmasının yetersiz kalmasından kaynaklanmakta bu durum lipid peroksidasyon ürünleri ve serbest radikal artıştan kaynaklanmaktadır (Halliwell and Gutteridge 1984; Ikeda and Long 1990; Janssen *et al.* 1993). Serbest radikallerin artışı, oksidatif stresi tetiklemekle birlikte temel olarak oksidatif stres, biyolojik sistemlerde prooksidanlar ile antioksidanlar arasındaki dengenin, prooksidanlar lehine bozulması olarak tanımlanmaktadır (Bhuvaramurthy *et al.* 1996; Berk *et al.* 2008; Dal 2011).

Toksik maddelere maruz kalma, ekzojen ve endojen reaktif oksijen türleri arasında bir dengesizlik oluşturarak antioksidan savunma sisteminde azalmaya neden olur. Bu durum biyolojik mekanizmada dokuların hasara uğraması, oksidatif stres, dejeneratif hastalıkların başlaması ile kendini gösterir (Vaglio *et al.* 1999). Oksidatif hasarı canlı

doku ve hücrelerinde gösteren ve bununla ilgili en çok kabul gören parametrelerden birisi dokulardaki lipid peroksidasyonu (LPO) seviyesidir. LPO düzeyi, hücre ve dokularda yapılan birtakım uygulamalar sonucu meydana gelen oksidatif hasarların belirlenmesinde kullanılan önemli bir parametredir (Monteiro *et al.* 2006; Kaplan *et al.* 2012; Erol 2015). Bu çalışmada, karaciğer dokusunun 240 µg/L uygulanan grupta, solungaç dokularında ise doza bağlı olarak LPO seviyesinin yükseldiği görülmüştür. Serbest radikal ve LPO üretiminin dokularda sitotoksik etkinin oluşmasında rol alabileceği belirtilmiştir (Ahmad *et al.* 2000). Benzer bir çalışmada, çevresel kirleticilerin LPO üretimine sebep olabileceği rapor edilmiştir (Monteiro *et al.* 2006).

Enzimatik anlamda antioksidan savunma sisteminin ilk basamağında SOD enzimi görev yapmaktadır. Serbest radikallerin hem hasara neden olmasından hem de bizzat kendisinin yıkıcı etkiye sahip olmasından dolayı süperoksit radikalının bertaraf edilmesinde SOD enzimi oldukça önemlidir. Bu enzimin aktivitesi, hücre ve dokularda antioksidan savunma sisteminin mekanizması ve durumu hakkında bilgi vermektedir (Oruç ve Üner 2000; Halıcı *et al.* 2012; Erol 2015). Solungaç dokularında SOD aktivitesi değişmezken, 30 ve 120 µg/L linurona maruz kalan karaciğer dokularında SOD aktivitesinin belirgin bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. 240 µg/L dozunda ise enzimin inhibe olduğu görülmüştür. Toksik kimyasalların serbest radikal üretimine sebep olması SOD enziminin inhibe olmasına sebep olabilir (Kavitha and Venkateswara 2008). Benzer bir çalışmada ise glyphosate herbisitinin SOD enzimini azaltarak orta derecede oksidatif strese neden olabileceği rapor edilmiştir (Lushchak *et al.* 2009). SOD aktivitesinin artması ise hücre içerisinde süperoksit radikallerinin yükseldiğini göstermektedir (Oruç ve Üner 2000). Dolayısıyla, SOD aktivitesi antioksidan savunma sistemine direkt olarak, oksidatif strese ise indirekt olarak katkıda bulunur (Halıcı *et al.* 2012), ve SOD enzimi, oksidatif hasarın olumsuz etkilerini önlemek için bir refleks olarak aktive olur (Topal *et al.* 2015a).

Bütün hücreler oksidatif stresten dolayı hücreler arası hasarı önlemek ve biyolojik reaktiflerin detoksifikasyonu için önleyici bir sisteme sahiptirler (Reed 2000). Oksidatif strese karşı savunma sisteminin en önemli basamaklarından birini glutatyon (GSH)

oluşturmaktadır (Ahmed vd 2000). Çalışmamızda, 30 µg/L linurona maruz kalan karaciğer dokularında GSH düzeyleri anlamlı bir şekilde artmış olmasına rağmen, 120 ve 240 µg/L konsantrasyonlarında GSH düzeyleri önemli bir şekilde azalmıştır. Solungaç dokularında ise 30 µg/L dozunda GSH seviyesinin anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür. Canlı dokularında ve hücre içerisinde GSH içeriğinin azalmasına neden olan birtakım etkenler bulunmaktadır. Bu etkenler; hücre içerisinde glutatyon sentezinin sınırlandırılması, glutatyon kullanımının artması, okside olan glutatyonun hücre içerisinde redüksiyonunun azaltılması şeklindedir (Sen and Packer 2000). Oksidatif stres zayıfladığında adaptasyon mekanizması devreye girerek GSH seviyesini artırmaktadır. Bunun tam aksi durumunda ise zayıflayan adaptasyon mekanizması ile giderek artan okside glutatyon oluşumundan dolayı GSH seviyesinde azalma görülmektedir (Zhang *et al.* 2005).

Yapılan benzer bir çalışmada paraquat herbisitinin *O. mykiss*'e uygulandıktan sonra alınan karaciğer dokusunda toplam GSH seviyesinin verilen tüm dozlarda ve geçen sürede arttığı bildirilmektedir (Stephensen *et al.* 2002). Farklı bir çalışmada ise, 2,4-dichlorophenol etkisine bırakılan *C. auratus*'tan alınan karaciğer dokusunda ilk günde azalan GSH seviyesi ile GSH/GSSG'nin, ilerleyen günlerde artış göstermesi diğer detoksifikasyon mekanizmaları ile ilişkili ya da yeni kurulan GSH dengesi ile ilgili olabileceği bildirilmiştir (Zhang *et al.* 2005).

Katalaz aktivitesinin balıklarda bir indikatör olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir (Atli *et al.* 2006). Bu enzim aktivitesinin ölçülmesi antioksidan mekanizmanın hangi yönde işlediğinin bilinmesinin yanı sıra antioksidan savunma gücünün belirlenmesinde de önemlidir (Erol 2015). Bu çalışmada, karaciğer dokularında CAT aktivitesinin doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde azaldığı, solungaç dokularında ise 240 µg/L konsantrasyonda anlamlı bir şekilde düşüşün olduğu tespit edilmiştir. CAT aktivitesindeki bu azalmanın enzimi inhibe eden süperoksit radikallerinin akışından dolayı olabileceği rapor edilmiştir (Sayeed *et al.* 2003). Bir başka çalışmada ise, CAT enziminin azalmasının hücrede H₂O₂ birikimine sebep olacağı ve buna bağlı olarak gen

ekspresyonunda değişikliklere ve hücre ölümüne yol açabileceği bildirilmiştir (Calviello *et al.* 2006).

Karaciğer diğer organlardan farklı olarak kirleticilerin toplanıp yeniden dağıtımı, detoksifikasyonunda önemli rol oynayıp kirleticilerin neden olduğu patolojik etkilerin aktif noktası olarak davranır (El-Shahawi *et al.* 1998). Balıklarda karaciğer, kimyasal maddeleri bağlayarak toksik etkilerinin giderilmesinde görevi olan glutatyon ve metallothionein gibi bağlayıcı özelliği olan proteinlerin sentez yeridir (Sağlamtimur vd 2003). Bu yüzden, çevresel kirleticilere maruz kalan karaciğer dokularında histopatolojik değişiklikler meydana gelebilir ve karaciğer histolojisi hepatik yapı ve fonksiyonu ile çevresel faktörler arasında etkileşimi belirlemek için bir model olarak kullanılabilir. Ayrıca karaciğer histopatolojisi kimyasal toksisitenin bir indikatörüdür (Riba *et al.* 2005; Capkin *et al.* 2009). Bu çalışmada, 30 µg/L linuron uygulanan grupta herhangi bir patolojik değişiklik izlenmemesine karşın, 120 ve 240 µg/L linuron uygulanan gruplarda toksik maddenin dozuyla doğru orantılı olan şiddette dejeneratif ve nekrotik değişikliklere rastlanmıştır. Bu sonuçlar, literatürde yapılan bir çalışmayla benzerlik göstermektedir. Oulmi *et al.* (1995), yaptıkları çalışmada linuronun gökkuşaağı alabalığı karaciğer dokularında, hepatositlerde değişiklikler, hücre çoğalması, glikojen azalması, lipit birikimi gibi histopatolojik bulguları gözlemlemiştir (Oulmi *et al.* 1995). Diğer herbisitlerle yapılan çalışmalarla bulgularımız paralellik göstermektedir (Neskovic *et al.* 1996; Jiraungkoorskul *et al.* 2003; Ayoola 2008a). Örneğin glyphosate herbisitine maruz kalan farklı balık türlerinin karaciğer dokularında, vakouilleşme, nüklear piknosiz (Jiraungkoorskul *et al.* 2003), yağ dejenerasyonu, hepatik nekrosiz ve lökosit infiltrasyonu (Ayoola 2008a) ve karaciğer hasarı tespit edilmiştir (Neskovic *et al.* 1996). Karaciğerin yapısı üzerinde meydana gelen histopatolojik değişiklikler, bu organın fonksiyonlarını etkileyebilir ve bu hasarlar linuron konsantrasyonlarına genel bir stres cevabı olarak düşünülebilir.

Solungaçlar iyon dengesi, osmoregülasyonun düzenlenmesi ve solunum gazlarının transportunda önemli bir role sahip olduğundan dolayı sucul canlılarda hayati bir organdır. Balıklar solungaçları aracılığı ile çevreyle çok yakın ilişki içerisinde olmaları

nedeniyle sucul kirleticilerle çok yakın hale gelmektedir (Pratap et al. 1989). Toksik kimyasallar sucul organizmaların osmoregülasyon fonksiyonunu bozarak ve oksijen tüketimini azaltarak solungaç dokularına hasar vermektedir. Solungaç dokularında meydana gelen histopatolojik değişiklikler gaz değişiminde bozukluklara neden olmaktadır (Ghate and Mulherkar 1979; Peebua *et al.* 2008). Bu çalışmada, kontrol grubu solungaç dokularında herhangi bir histopatolojik bir bulguya rastlanmazken, 30 µg/L linuron uygulanan grup kontrole benzerlik gösterdi. 120 ve 240 µg/L linuron uygulanan gruplarda artan doza bağlı olarak orta ve şiddetli düzeyde hücresel infiltrasyonlar ve şiddetli dejeneratif değişiklikler gözlenmiştir. Bu sonuçlar literatürde diğer herbisitlerle yapılan çalışmalara benzerlik göstermektedir (Shiogiri *et al.* 2012; Ayoola 2008b; Jiraungkoorskul *et al.* 2003). Bu değerlendirmeler ışığında linuronun solungaç dokularında olumsuz etkilere sebep olabileceğini söyleyebiliriz.

5.2. Sonuç ve Öneriler

Karaciğer dokusundan elde edilen bulgular göz önüne alındığında, 30 µg/L konsantrasyon uygulanan grubun SOD aktivitesi ve GSH seviyesi artar iken, CAT aktivitesi bir miktar düşmüştür. Bu şekilde hücre, uygulanan maddenin meydana getirdiği oksidatif stresi engelleyerek hasarı azaltmıştır. Aynı şekilde 120 µg/L uygulanan grupta SOD aktivitesi artarken, dozun artmasına bağlı olarak GSH harcanarak seviyesi azalmış, CAT aktivitesi ise belirgin şekilde inhibe olmuştur. Artan SOD aktivitesi süperoksit radikallerini hidrojen peroksit dönüşümünü sağlamış, GSH ile oluşan bu peroksitler etkisiz hale getirilerek dokuyu hasarı oluşumunu engellemek için yeterli olmuştur. Bu süreçte GSH seviyesi azalsa da karaciğer dokusu önemli bir GSH kaynağı olduğundan artan strese karşı önemli bir savunma gerçekleştirmiştir. Bu sonuçların aksine 240 µg/L dozda süperoksit radikallerini hidrojen peroksit dönüşümünü sağlayarak, savunmanın ilk ve en önemli basamağını oluşturan SOD enziminin aktivitesi önemli düzeyde inhibe olmuştur. Ayrıca GSH rejenerasyonu ve CAT aktivitesi önemli seviyede düşmüş olup, bunun sonucunda doku hasarı önemli miktarda artmıştır. Tüm bu mekanizmalar bir bütün halinde göz önünde bulundurulduğunda uygulanan maddenin 30 ve 120 µg/L konsantrasyonlarda meydana

getirdiği toksisite karaciğer dokusu tarafından tolere edilebilir iken, 240 µg/L konsantrasyonunda meydana gelen düşüşler sebebiyle hasar engellenememiştir. Solungaç dokusu antioksidan bulguları değerlendirildiğinde 30, 120 ve 240 µg/L konsantrasyonlarda uygulanan maddenin dokuda hasar oluşturduğu gözlemlenmiştir.

Bir tarım ülkesi olan yurdumuzda oldukça yaygın olarak kullanılan Linuron in vivo veya in vitro çalışma alanlarına alınıp sucul canlılar üzerindeki etkilerini belirlemek ve ortaya koymak adına oldukça önemlidir. Bu çalışmadaki verilerin su canlıları üzerinde risk faktörü oluşturup oluşturmadığını belirlemek için herbisit kullanımına bir ışık tutacağının kanısındayız.

Pestisitlerin kullanımını tamamen kaldırmak ya da kullanımını yasaklamak daha etkili ve daha ekonomik bir başka yol buluncaya kadar günümüz şartları altında mümkün değildir. Fakat gerekli tedbirleri almak suretiyle tarım ilaçlarının su ve toprak kirliliği açısından meydana getirdiği birtakım sorunları minimize etmek mümkündür. Bu durum göz önünde bulundurularak alınabilecek önemler şöyle sıralanabilir:

1. Öncelikle kimyasal ve biyolojik anlamda çabuk parçalanabilen, parçalandığı zamanda bitki, su, toprak, gıda gibi ortamlarda en düşük düzeyde artık madde bırakmasıyla birlikte toksik özellik göstermeyen herbisit ilaçları kullanılmalıdır.
2. Bitkiye ya da birim alana uygulanacak tarım ilacının uygulama sayısı ve dozu en düşük düzeye indirgenmelidir.
3. Ülkemizde giderek kullanımı yaygınlaşan tarım ilaçlarıyla ilgili toksikolojik çalışmalar yapılmasının yanı sıra alıcı kaynak olanlarda da bu maddelerin konsantrasyonları izlenip kirlilik durumları ortaya konulmalıdır.
4. Toksik maddeler besin zincirinin basamaklarında bulunan tüm canlıları etkilemekte dolayısıyla bu tarz çalışmalar besin zincirinin her basamağındaki canlılar kullanılarak yaygınlaştırılmalı ve veri tabanı oluşturulmalıdır.
5. İlaçlamalarda hava araçları değil, daha lokal etkili ekipmanlar kullanılmalıdır.
6. Su kaynakları dikkate alınarak bunlara ulaşımı engellenecek şeklide ilaçlama yapılmalıdır.

KAYNAKÇA

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. İçinde: Lester P (editör). Methods in Enzymology, 1. Baskı. Academic Press,: 121-126.
- Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H.S., Jain, S.K., Athar, M., 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus Bloch*) is a biomarker of paper mill effluent exposure. Biochem Biophys Acta. 1523: 37-48.
- Ahmed, R.S., Seth, V., Pasha, S.T., Banerjee, B.D., 2000. Influence of dietary ginger (*Zingiber officinales*) on oxidative stress induced by malathion in rats. Food and chemical toxicology, 38: 443-450.
- Akkuş, I., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, Konya.
- Aldrich, W.N., 1980. The need to understand mechanisms. The Scientific Basis of toxicity assesment. Elsevier/North Holland biomedical Press, 305-319, Amsterdam.
- Almroth, B.C., Sturve, J., Berglund, A., Forlin, L., 2005. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*). Measured as protein carbonyls TBARS, as Biomarkers. Aquatic Toxicology, 73: 171-180.
- Altınok, İ., Çapkın, E., 2007. Histopathology of *Rainbow Trout* exposed to sublethal concentrations of methiocarb or endosulfan. toxicologic pathology. 35,3, 405-410.
- Amdur, M.O., Doull, J., Klassen, C.D., 1991. Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons, Pergamon Press, New York 1033, 565-623.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., 1993. Oxidants, antioxidants and the generative diseases of aging. United Stated of America. 90, 7915-7922.
- Alpbaz, A., 2005. Su Ürünleri Yetiştiriciliği. İzmir, 541, Türkiye.
- Arteel, G., Briviba, K., Sies, H., 1999. Protection against peroxyxynitrite, FEBS Letture., 445: 226-230.
- Arosio, B., Gagliano, N., 2000. Fusaro, Aloe-Emodin quinone pretreatment reduces acute liver injury induced by carbon tetrachloride, Pharmacol and Toxicol, 87: 229-233.
- Atli, G., Alptekin, O., Tükel, S., Canli, M., 2006. Response of catalase activity to Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 143(2):218-224.
- Ayoola, S.O., 2008a. Histopathological Effects of Glyphosate on Juvenile African Catfish (*Clarias gariepinus*). American-Eurasian J. Agric. And Environment. Science., 4 (3): 362-367.
- Ayoola, S.O., 2008b. Toxicity of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juvenile. African journal of agricultural research. 3 (12), pp. 825-834.
- Baird, D. D., Upchurch, R.P., Homesley, W. B., Franz, J., 1971. Introduction of new broad spectrum postemergence herbicide class with utility for herbaceous perennial weed control. Proceeding of the 26 th North Central Control Conferance, 64-68. Kansas City, United Stated of America.
- Bakır, M., 2014. Akut pankreatit oluşturan sıçanlarda karvakrolün karaciğer üzerine etkileri. Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi. Erzurum.

- Battaglin, W.A., Thurman, E.M., Kalkhoff, S.J., Porter, S.D., 2003. Herbicides and transformation products in surface waters of the Midwestern United States. Water Researches associate. 39, 743–756.
- Boran, H., 2010. Maneb ve karbaril aktif maddelerini içeren pestisitlerin Gökkuşığı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*) üzerine olan histopatolojik etkilerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi. Trabzon.
- Bauer, R., Meyer, H., Sauerwein, H., 1998. Stahlschmidt-Allner, application of an androgen receptor assay for the characterisation of the androgenic or antiandrogenic activity of various phenylurea herbicides and their derivatives. Analyst, 123, 2485–2487.
- Bayer, P.E., Yamaguchi, S., 1965. Adsorption and distribution of diuron-C14. Weeds 13:232–235.
- Bergin, R., 2013. 2012 Status report pesticide contamination prevention. California environmental protection agency, Department of Pesticide Regulation, Environmental Monitoring Branch, Sacramento, PCPA12. <http://www.cdpr.ca.gov> (13.08.2015).
- Berk, M., Dean, O., Dodd, S., Brush, A., 2008. Glutathione a novel treatment target in psychiatry. Trends in Pharmacological Science, 29(7), 346-351.
- Bhuvarahamurthy, V., Balasubramanian, N., Govindasamy, S., 1996. Effect of radiotherapy and chemoradiotherapy on circulating antioxidant system of humsn uterine cervical carcinoma. Moleculer and Cellular Biochemistry, 158(1), 17-23.
- Calviello, G., Piccioni, E., Boninsegna, A., Tedesco, B., Maggiano, N., Serini, S., Wolf, Palozza, F.I., 2006. DNA damage and apoptosis induction by the pesticide mancozeb in rat cells. Involvement of the oxidative mechanism. Toxicology pharmacol. 211, 87–96.
- Capkin, E., Birincioğlu, S., Altınok, I., 2009. Histopathological changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after exposure to sublethal composite nitrogen fertilizers. ecotoxicology and environmental safety. 721999–2004.
- Cheeseman, K.H., Slater, T.F., 1993. An introduction to free radical biochemistry. Jolly;49(3), 481-93.
- Cook, J., Mullin, L., Frame, S., Biegel, L. 1993, Investigation of a mechanism for leydig cell tumorigenesis by linuron in rats. Toxicology Pharmacol. 119, 195–204.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroğlu, M., Lunec, J., 2003. Oxidative DNA damage mechanisms, mutation and disease. Faseb., 17 (110), 1195-1214.
- Çavdar, Y., 2009. Su Ürünü Yetiştiriciliğinde Desteklemeler. Yunus araştırma bülteni. 9(1):13.
- Çinkıloğlu, E., 2007. *Cyprinus Carpio*'da Beyin dokusunda fenthionun antioksidant savunma sistemi, lipid peroksidasyonu ve asetilkolinesteraz enzim aktivitesine N-Asetilsistein modülatörlüğünde etkileri. Yüksek Lisans Tezi Çukurova Üniversitesi. Adana.
- Dal, F., 2011. Oksidatif stresin hücre döngüsü fazları üzerindeki etkileri. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Üniversitesi. İstanbul.
- Davies, K., Goldberg, A., 1987. Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. Journal of biological chemistry, 26(2): 8220-8226.

- DPT., 2001. Devlet planlama teşkilatı, sekizinci beş yıllık kalkınma planı, kimya sanayi özel ihtisas komisyonu raporu, tarım ilaçları alt komisyonu raporu. 975.19.27374, Ankara.
- Du Pont, F., Lampman, B.M., , Metcalf, R.L., 1985. Modelecosystem studies of the environmental fate of five herbicides used in conservation tillage. Agriculture environment. Contamination toxicology. 14(6):693–704.
- Deaton, C.M., Marlin, D.J., 2003. Seven year follow up of workers exposed to 1, 2 dibromo 3 chloroprpane, Joccup 28, 1145-1150.
- El-Shahawi M.S., Al-Yousuf M.H., 1998. Heavy metal contamination in liver and skin tissues of lethrinus lentijan fish family. Lethrinidae (*teleost*) from the arabian food science and Nutr., 49: 447-451.
- EPA., 1998. Environmental protection agency. Pesticide tolerance petitions filing triasulfuron, 5/98, 29401-29409.
- EPA., 2003. Pesticide product information system. Environmental protection agency, viwed on december 11.
- Erenel, G., Erbas, D., Arıcıoglu, A., 1992. Serbest radikaller ve antioksidan sistemler. Gazi Tıp Dergisi. 3: 243-250.
- Erol, H.S., 2015. (*Maclura pomifera*) bitkisinden izole edilen osajin maddesinin ratlarda indometazin ile oluşturulan gastrik hasar üzerine etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi. Erzurum.
- Erkin, E., Kışmır, A., 1996. Dünya’da ve Türkiye’de tarım ilaçlarının kullanımı. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, tarımsal araştırmalar genel müdürlüğü, koruma ve kontrol genel müdürlüğü, II. ulusal zirai mücadele ilaçları sempozyumu, 18-20 Kasım, Ankara, 3-11,Türkiye.
- Esenbuğa, H., 2013. Sodium Dodecyl Sulphate’ın farklı dozlarının gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)’nın yüzme performansı, hematoloji parametreleri ve bazı antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkileri. Atatürk Üniversitesi. Erzurum.
- Evans, M., Cooke, M., 2004. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. 26 (5), 533-42.
- Faintuch, J., Aguilar, P.B., Nadalın, W., 1999. Relevance of nacetylcysteine in clinical practice. fact, myth or consequence nutrition, 15: 177-179.
- Farombi, E.O., Ajimoko, Y.R., Adelowon, O.A., 2008. Effect of butachlor on antioxidant enzyme status and lipid peroxidation in fresh water African catfish (*Clarias gariepinus*). Int J environ result public health. 5: 423–427.
- Ferrari, A., Venturino, A., Ana, M., 2007. Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes, Pesticide biochemistry and physiology 88: 134–142.
- Freeman, B., Crapo, J.D., 1982. Free radicals and tissue injuryty. Lab. Invest., 47,412-426.
- Gilreath, J.P., Chase, C.A., Locascio, S.J., 2000. Influence of sub-lethal glyphosate rates on leaf mineral concentration of tomato. Hort science 35, 1078-1082.
- Ghate, H.V., Mulherkar, L., 1979. Histological changes in the gills of two freshwater prawn species exposed to copper sulphate.. Exp. Biology., 17, 838-840.
- Gunasekara, A.S., 2007. Environmental fate of carbaryl. Environmental monitoring branch department of pesticide regulation 1001 I. Street californi environmental protection agency sacramento, CA 95812, United Stated of America.

- Gutteridge, J.M.C., 1994. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-Biological Interactions*, 91, 133-140, 1994.
- Halıcı M., 2007. Bazı likenlerden izole edilen maddelerin sıçanlarda indometazin ile oluşturulan ülser modelinde antiülserojen mekanizmalarının araştırılması. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı. Erzurum.
- Halıcı, M., Imik, H., Koç, M., Gümüş, R., 2012. Effects of alphasulphoic acid, vitamins E and C upon the heat stress in Japanese quails. *J Anim Physiol Anim Nutr* 96(3):408–415.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., 1990. *Methods Enzymology*, 186:1-85
- Halliwell, B., Aruoma, O.I., 1991. DNA Damage by oxygen-derived species its mechanism and measurement in mammalian systems. *Federation of european biochemical societies letters*, 281: 9-19.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1984. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *The Lancet*, 23: 1396-1397.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. *Free radicals and medicine*. Third edition, Oxford University press., 936, New York.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2000. *Free radicals in biology and medicine*, Third Edition, Oxford New York.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2001. *Free radicals in biology and medicine*. Third Edition, Oxford Science Publications, 22-24.
- Hermes-Lima, M., Zenteno-Savin, T., 2001. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Biochemistry. Physiol. Part C*, 133,537-556.
- Higashi, T., Kawamata, T., 1974. Studies on rat liver catalase. VII. Double-Labeling of catalase by ¹⁴C-leucine and ³H-d aminolevulinic acid, *biochemistry*, 76: 703-708, Tokyo.
- Ikeda, Y., Long, D.M., 1990. The molecular basis of brain injury and brain edema. The role of oxygen free radicals. *Neurosurgery*, 27 (1): 1-11.
- Işık, İ., 2007. Bazı zirai mücadele ilaçlarının balıkların solungaç karaciğer ve kas dokularındaki antioksidan enzim aktiviteleri glutatyon ve lipid peroksidasyon seviyeleri üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi. Van.
- Janssen, Y.M.W., Houten, B.V., Borm, P.J.A., Mossmon, B.T., 1993. Biology of disease, cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab. Invest.*, 69 (3): 261-274.
- Jiraungkoorskul, W., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Sahaphong, S., Vichasri- Grams, S., Pokethitiyook, P., 2002. Histopathological effects of roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Science Asia*, 28, 121-127.
- Jiraungkoorskul, W., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Sahaphong, S., Vichasri-Grams, S., Pokethitiyook, P., 2003. Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environment toxicology*. 18, 260–267.
- Kan Y., Cengiz E.I., Uğurlu P., Yanar M., The protective role of vitamin E on gill and liver tissue histopathology and micronucleus frequencies in peripheral erythrocytes of *Oreochromis niloticus* exposed to deltamethrin. *Environ toxicol pharmacology*. 2012;34(2):170-9.

- Kaplan, K.A., Odabasoglu, F., Halici, Z., Halici, M., Cadirci, E., Atalay, F., Aydın, O., Çakır, A., 2012. Alpha-lipoic acid protects against indomethacin-induced gastric oxidative toxicity by modulating antioxidant system. *Food Science* 77(11):224-230.
- Karademir, M., 2012. Su Ürünleri kooperatiflerinde karşılaşılan sorunlar ve çözüm önerileri. Yüksek Lisans Tezi. Marmara Üniversitesi. İstanbul.
- Kavas, G., 1989. Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri, Türkiye klinikleri, 9: 1-8.
- Kavitha, P., Venkateswara, R.J., 2008. Toxic effects of chlorpyrifos on antioxidant enzymes and target enzyme acetylcholinesterase interaction in mosquito fish, (*Gambusia affinis*). *Environ toxicol pharmacology*. 26: 192–198.
- Kayış, T., 2010. Diazinonun subletal konsantrasyonlarının *Pimpla turionella*'nın eşey oranı ve bazı biyokimyasal parametreleri üzerinde etkileri. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi. Adana.
- Küfrelioğlu, Ö., Keha, E., Biyokimya. 6. Baskı. Erzurum, Aktif Yayınevi, 2007: 348-470.
- Kılınç, K., 1986. Oxygen radicals. Their production, function and toxic effects. *Biyokimya dergisi*, 9(3): 59-76.
- Kidd, H., James, D.R., 1991. The agrochemicals handbook, 3 rd ed. The royal society of chemistry information services, Cambridge, United Kingdom.
- Kiparissis, Y., Metcalfe, T., Balch, G., Metcalfe, C., 2003. Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology* 63(4):391–403.
- Kojima, H., Katsura, E., Takeuchi, S., Niiyama, K., Kobayashi, K. 2004. Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using chinese hamster ovary cells. *Environment. Health Perspect.*, 112, 524–528.
- Kolpin, D.W., Thurman, E.M., Lee, E.A., Meyer, M.T., Furlong, E.T., Glassmeyer, S.T., 2006. Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States. *Science of the Total Environment* 354, 191-197.
- Koren, H., Bisesi, M. 1996. Handbook of environmental health and safety, Lewis publishers, Florida.
- Lushchak, O.V., Kubrak, O.I., Storey, J.M., Storey, K.B., Lushchak, V.I., 2009. Low toxic herbicide roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere*. 76: 932–937.
- Meeven, F.L., Stephenson, G.L., 1979. The use and significance of pesticides in the environment, John Wiley and Sons Public., New York 538.
- Medina, H.S.G., Lopata, M. E., Bacila, M., 1994. The response of sea-urchin egg embryogenesis towards the effect of some pesticides. *Arquivos de biologia tecnologia* 37 (4): 895-906.
- Mercan, U., 2004. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi. 15 (1-2), 91-96.
- Monteiro, D.A., De Almeida, J.A., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide folisuper 600 (*methyl parathion*). *Comp Biochemistry Physiology C Toxicol Pharmacology* 143(2):141–149.

- Moslen, M.T., 1994. Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. In free radicals in diagnostic medicine. A systems approach to laboratory technology, Clinical correlations, and antioxidant therapy, Armstrong, D. (ed.), pp. 17-27. Plenum Pres, New York.
- Mruk, D., Silvestrini, B., Meng-yun Mo, Cheng, C., 2002. Antioxidant superoxide dismutase-a review. Its function, regulation in the testis, and role in male fertility, *Contraception*, 65: 305-311.
- Murray, R.K., Mayes, P.A., Granner, D.K., Radwell, V.W., 1993. Harper'in Biyokimyası. Çevirenler: Prof.Dr. Gülriz Menten, Prof.Dr. Biltan Ersöz. Barış Kitapevi.
- Neskovic, N., Poleksic, V., Elezovic, I., Karan, V., Budimir, M., 1996. Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, (*Cyprinus carpio*) bulletin of environmental contamination and toxicology 56:295-302.
- Netto, L., Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Vercesi, A.E., 2002. Thiol enzymes protecting mitochondria against oxidative damage. *Methods enzymol.*, 348, 260-270.
- Nordberg, J., Arner, E., 2001. Reactive oxygen species, Antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free radical Biology*. 31, 1287-1312.s
- Nwani, C.D., Nagpure, N.S., Kumar, R., Kushwaha, B., Lakra, W.S., Lethal concentration and toxicity stress of carbosulfan, glyphosate and atrazine to freshwater air breathing fish (*Channa punctatus*) *Int Aquatic Res* (2010) 2: 105-111.
- O'Neill, H.J., Bailey, H., 1987. 1986 New brunswick pesticide survey. A survey of tree streams draining agricultural areas. Report I/L-AR-WQB-87-132. Environment Canada, inland waters and lands directorate, water quality branch, Atlantic region, moncton, NB.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95: 351-358.
- Olsvik, P., Kristensen, T., Waagbø, R., Rosseland, B., Tollefsen, K., Baeverfjord, G., berntssen, M., 2005. mRNA expression of antioxidant enzymes SOD, CAT, GSH-Px and lipid peroxidative stress in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to hyperoxic water during smoltification. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 143: 263-274.
- Omaf (Ontario Ministry of Agriculture and Food). 1989. 1990 Guide to weed control. Publication 75. Queen's Printer for Ontario, Toronto.
- Oropesa, A.L., Garcia-Camero, J.P., Soler, F., 2009. Glutathione and malondialdehyde levels in common carp after exposure to simazine. *Environ Toxicol Pharmacol*. 27: 30-38.
- Ortiz-Ordóñez, E., Uribe-Galicia, E., Ruiz-Picos, R.A., Duran, A.G., Trejo, Y.H., Sedeno-Diaz, J.E., Lopez-Lopez, E., Effect of yerbimat herbicide on lipid peroxidation, catalase activity, and histological damage in gills and liver of the freshwater fish *Goodea atripinnis*. *Arch Environment Contamination Toxicology*. 2011;61(3):443-52.
- Oruç, E.Ö., 2010. Oxidative stress, steroid hormone concentrations and acetylcholinesterase activity in (*Oreochromis niloticus*) exposed to chlorpyrifos. *pesticide biochemistry and physiology*, 96: 160-166.

- Oruç, E.Ö., Üner, N., 2000. Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. *Comp Biochem Physiol C Toxicology Pharmacology* 127(3):291–296.
- Oulmi, Y., Negele, R.D., Braunbeck, T., 1995. Cytopathology of liver and kidney in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after long-term exposure to sublethal concentrations of linuron. *Diseases of Aquatic Organisms*, 21: 35-52.
- Özdem, S., Sadan, G., 1994. Serbest oksijen radikallerinin olusum ve klinik açıdan önemi, Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi. *Dergisi.*, 11 (1): 63-71.
- Parlak, H., Arslan, Ö., Boyacıoğlu, M. ve Karaaslan, M., 2009. Ekotoksikoloji. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi yayınları No: 79 Ders Kitabı Dizini No: 39.
- Patterson, M., 2004. Linuron. Analysis of risks to endangered and threatened salmon and steelhead. Technical report prepared for environmental field branch, Office of pesticide programs, United States environmental protection agency. Washington, DC.
- Peebua, P., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., Singhakaew, S., 2008. Histopathological alterations of Nile tilapia, (*Oreochromis niloticus*) in acute and subchronic alachlor exposure. *Journal of environmental biology* 29(3) 325-331.
- Perpetuo, E., Souza, C., Nascimento, C., 2011. Progress in molecular and environmental bioengineering from analysis and modeling to technology applications. 1. Baskı. 605-632. University of Sao Paulo, Brazil.
- Pioruńska-Stolzmann, M., Batko, J., Majewski, W., 1999. Lipid profile, lipase and glutathione peroxidase activities in the serum of patients with atherosclerosis. *Medical science monitor*, 5: 900-903.
- Piska, M.B., Waghray, S., 1997. Toxic effects of dimethoate on primary production of lake ecosystem. *Indian journal of environmental health* 33(1): 126-127.
- Pratap, H.B., Lock R., Bonga, S.E., 1989. Effect of waterborne and dietary cadmium on plasma ions of the teleost (*Oreochromis mossambicus*) in relation to water calcium levels, *Arch. Environment. Contamination. Toxicology*, 18: 568-575.
- Reed, D., 2000. Mechanisms of chemically induced cell injury and cellular protection. In Hodgson E, Smart RC, editors. *Introduction to biochemical toxicology*. 221–253, Wiley NewYork.
- Riba, I., Blasco, J., Jimenez-Tenorio, N., Gonzalez de Canales, M.L., Angel Del Valls, T., 2005. Heavy metal bioavailability and effects. II. Histopathology bioaccumulation relationships caused by mining activities in the gulf of cadiz *Chemosphere*. 58, 671–682, Spain.
- Sağlamtimur, B., Cıçık, B., Erdem, C., 2003. Farklı ortam derişimlerinin etkisinde bakır ve bakır + kadmiyum karışımının tatlı su çipurasının (*Oreochromis niloticus*) solungaç, karaciğer, böbrek ve kas dokularındaki bakır birikimi üzerine etkileri, *Türk Veteriner Anim. Science*, 27: 813-820.
- 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 ecotoxicol environment*. 56(2):295–301.
- Schuler, L., Rand, G., 2008. Aquatic risk assessment of herbicides in freshwater ecosystems of south Florida. *Environment contamination toxicol*, 54, 571–583.

- Scrubner, E.A., Thurman, E.M., Goolsby, D.A., Meyer, M.T., Battaglin, W.A., Kolpin, D.W., 2005. Summary of significant results from studies of atrazine herbicides and their degradation products in surface water, groundwater, and precipitation in the midwestern united states during the 1990s. In U.S. Geological survey scientific investigations report, 2005–5094. United State of America.
- Sedlak, J.F., Lindsay, R.H., 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical biochemistry*, 25: 192-205.
- Sen, C.K., 1995. Oxidants and antioxidants in exercise., 79 (3): 675-686.
- Sen, C.K., 1997. Nutritional biochemistry of cellular glutathione. *Nutritional biochemistry*, 8: 660-662.
- Sen, C.K., Packer, L., 2000. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *American journal of clinical nutrition*, 72: 653-669.
- Serafini, M., Del Rio, D., 2004. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease. Is the total antioxidant capacity the right tool. *Redox report*, 9:3, 145-152.
- Shiogiri, N.S., Paulino, M.G., Carraschi, S.P., Baraldi, F.G., Cruz, C., Fernandes, M.N., 2012. Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish (*Piaractus mesopotamicus*). *Environmental toxicology and pharmacology* 34388–396.
- SPSS, 2011., Statistical packages for the social sciences.
- Song, O., 2004. Oxidative Stress. A Theoretical model or biological reality. *Biologies*, 327, 649-662.
- Steenvoorden, D., Beijersbergen van Henegouwen, G., 1997. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection, *Photochemistry photobiology*. *Biology*, 41: 1-10.
- Stephensen, E., Sturve, J., Forlin, L., 2002. Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. *Comparative biochemistry and physiology*, 133: 435- 442.
- Storey, K., Oxidative stress. *Animal adaptations in nature*. *Braz Med Biology Res* 1996; 29:1715–1733.
- Sun, Y., Oberley, L., Li, Y., 1988. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry*, 34: 497-500.
- Tamsyn, M., Uren, W., Mandy, H., Eduarda, M., 2014. The herbicide linuron inhibits cholesterol biosynthesis and induces cellular stress responses in brown trout November 10.
- Tate, T.M., Spurlock, J.O., Christian, F.A., 1997. Effect of glyphosate on the development of pseudosuccinea columella snails. *Environment Contamination Toxicology*. 33:286-9.
- Thomas, M., 1995. The role of free radicals and antioxidants. how do we know that they are working. *Critical Food Science*. 35 (1): 21-39.
- Thurnham, D.I., 1990. Antioxidants and prooxidants in malnourished populations. *proceedings society*, 49: 247-259.
- Tomlin, C., 1994. The pesticide manual. A world compendium. 10th ed. Incorporating the agrochemicals handbook. British crop protection council and royal society of chemistry, Thornton heath, United Kingdom.

- Tomlin, C.D.S., 2000. The pesticide manual. 12th Ed. British Crop protection council. surrey, 133-134. United Kingdom.
- Topal, A., Atamanalp, M., Oruç, E., Halıcı, M.B., Şişecioğlu, M., Erol, H.S., Gergit, A., Yılmaz, B., 2015a. Neurotoxic effects of nickel chloride in the rainbow trout brain: Assessment of c-Fos activity, antioxidant responses, acetylcholinesterase activity, and histopathological changes. *Fish Physiol Biochem.* Jun;41(3):625-34.
- Topal, A., Atamanalp, M., Uçar, A., Oruç, E., Kocaman, E.M., Sulukan, E., Akdemir, F., Beydemir, Ş., Kılınç, N., Erdoğan, O., Ceyhan, S.B., 2015b. Effects of glyphosate on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) transcriptional and enzymatic analyses of antioxidant defence system, histopathological liver damage and swimming performance. *Ecotoxicol environment Saf.* Jan;111:206-14.
- Toros, S., Maden, S., 1991. Tarımsal Savaşım yöntem ve ilaçları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları. No: 1222, Ders Kitabı No: 352, s.332.
- Travacio, M., Polo, J.M., Llesuy, S., 2000. Chromium VI. induces oxidative stress in the mouse brain. *Toxicology*, 150: 137-146.
- Tsai, A., 1975. Lipid peroxidation and glutathione peroxidase activity in the liver of cholesterol-fed rats. *The Journal of Nutrition*, 105: 946-951.
- TÜİK, 2015. 2013 Yılı su ürünleri istatistikleri. <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=15933> (05.06.2015).
- U.S.EPA, 1995. Reregistration Eligibility Decision. Linuron environmental protection agency, office of prevention, pesticides and toxic substances, office of pesticide programs, government printing office, 738-R-95-003, Washington, DC.
- U.S.EPA 1984. U.S. Environmental Protection Agency. Pesticide fact sheet: Linuron. USEPA, Office of Pesticide Program, Washington, DC.
- Uren, W., Perry, M.H., Santos E.M., 2015. The herbicide linuron inhibits cholesterol biosynthesis and induces cellular stress responses in brown trout. *Environment Science Technology*. 5: 3110-3118.
- Ünsal, M., 1998. Kirlilik deneyleri ve yöntemler ve sonuçların değerlendirilmesi. T.C. Tarım ve Orman Köyişleri Bakanlığı Bodrum su ürünleri araştırma enstitüsü müdürlüğü, Yayınları. No:11.168s.
- Vaglio, A., Landriscina, C., 1999. Changes in liver enzyme activity in the teleost (*Sparus aurata*) in response to cadmium intoxication ecotoxology environment. *Safety*, 43: 111-116.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullas, M., 2003. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants, ecotoxicology. *Environment. Safety*, 64: 178-179.
- WSSA (Weed Science Society of America), 1989. Herbicide handbook. 6th ed. Amerika Yabani Ot Bilimi Derneği. Champaign.
- Weiss, S.J., Lobuglio, A.F., 1982. Phagocyte-Generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab. Inves.*, 47: 5-18.
- Wickens, AP., 2001. Ageing and free radical theory. *Respiration physiology*, 128:379-391.
- Wilson, V.S., Lambright, C.R., Furr, J.R., Howdeshell, K., 2009. The herbicide linuron reduces testosterone production from the fetal rat testis during both in utero and in vitro exposures. *Toxicology*. 186: 73-77.

- Winston, G.W., 1991. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Biochemistry physiology*, 100 C, 173-176.
- Wohaieb, S.A., Godin, D.V., 1987. Starvation related alterations in free radical tissue defense mechanisms in rats. *Diabetes*, 36: 169-173.
- Wu, D., Cederbaum, A.I., 2003. Alcohol, oksidative stres and radical damage. *Alcohol Result Health*, 27:4, 277-284.
- Yücel, Ü. 2007. Pestisitlerin insan ve çevre üzerine etkileri. Nükleer araştırma ve eğitim merkezi, Nükleer Kimya Bölümü, Ankara.
- Zhang ,J.F., Liub, H., Sun, Y.Y., Wang, X.R., Wu, J.C., Xue, Y.Q., 2005. Responses of the antioxidant defenses of the Goldfish (*Carassius auratus*) exposed to 2,4-dichlorophenol. *Environmental toxicology and pharmacology* 19: 185–190.



ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Erzurum’da doğdu. İlk ve orta öğretimini Erzurum’da tamamladı. 2010 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Mühendisliği Bölümünden 2014’de başarıyla mezun oldu. 2015’de Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde başladığı Yüksek lisans öğretimini Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı’nda 2016’da tamamladı.

