



**OKSİTETRASİKLİN ANTİBİYOTİĞİNİN GÖKKUŞAĞI
ALABALIĞI (*Oncorhynchus Mykiss*) KARACİĞERİNDE
GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİ
AKTİVİTESİ VE GEN EKSPRESYON
SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Yusuf Zekeriya BALIK

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

2016

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

OKSİTETRASİKLİN ANTİBİYOTİĞİNİN GÖKKUŞAĞI
ALABALIĞI (*Oncorhynchus Mykiss*) KARACİĞERİNDE
GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİ AKTİVİTESİ VE GEN
EKSPRESYON SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Yusuf Zekeriya BALIK

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2016

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**OKSİTETRASİKLİN ANTİBİYOTİĞİNİN GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI
(ONCORHYNCHUS MYKISS) KARACİĞERİNDE GLUTATYON S-
TRANSFERAZ ENZİMİ AKTİVİTESİ VE GEN EKSPRESYON SEVİYELERİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

Prof. Dr. Abdulkadir ÇİLTAŞ danışmanlığında Yusuf Zekeriya BALIK tarafından hazırlanan bu çalışma 11/01/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Dilim Dalı- Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği/oyçokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Abdulkadir ÇİLTAŞ

İmza:

Üye: Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ

İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr. Ahmet Necdet SİRKECİOĞLU

İmza:

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 21/01/2016 tarih ve 4/35 nolu kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP, projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 2015/150

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

OKSİTETRASİKLİN ANTİBİYOTİĞİNİN GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus Mykiss*) KARACİĞERİNDE GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİ AKTİVİTESİ VE GEN EKSPRESYON SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Yusuf Zekeriya BALIK

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

Danışman: Prof. Dr. Abdulkadir ÇİLTAŞ

Bu çalışmada, oksitetrasiklin antibiyotiğinin gökkuşığı alabalığı karaciğerindeki (*Oncorhynchus mykiss*) Glutatyon S-transferaz enzimi (GST) aktivitesi ve gen ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla oksitetrasiklin uygulanmış gökkuşığı alabalıklarından karaciğer dokuları üç, altı ve 12. Saatlerde alınmıştır. Oksitetrasikline maruz bırakılmayan grup kontrol grubu olarak belirlenmiştir. GST'nin en düşük enzim aktivitesi 12. Saatde tespit edilirken en yüksek enzim aktivitesi ise kontrol grubunda görülmüştür. Kontrol grubuyla kıyaslandığında 12. saatteki enzim aktivitesi değerlerinde çok önemli ($p<0,001$) bir düşüş olduğu gözlenirken, üçüncü ve altıncı saatteki düşüşün ise önemli ($p<0,05$) olduğu görülmüştür. GST'nin en düşük gen ekspresyon seviyesi 12 saatte tespit edilirken en yüksek gen ekspresyonu üçüncü saatde görülmüştür. Kontrol grubuyla kıyaslandığında üçüncü saatteki gen ekspresyon seviyesinde ($p<0,001$) çok önemli bir yükseliş olduğu gözlenirken altıncı ve 12. saatler arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. Sonuç olarak GST gen ekspresyonunu seviyeleriyle enzim aktivite değerleri arasında bir korelasyon olmadığı fikrine varılmıştır.

2016, 40 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Oncorhynchus Mykiss*, Karaciğer, GST, Oksitetrasiklin, Enzim Aktivitesi, Antibiyotik

ABSTRACT

Master Thesis

EFFECTS OF OXYTETRACYCLINE ANTIBIOTIC ON GLUTATION S-TRANSFERASE ENZYME ACTIVITY AND GENE EXPRESSION LEVELS IN RAINBOW TROUT LIVER

Yusuf Zekeriya BALIK

Atatürk Universty
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Agricultural Biotechnology
Animal Biotechnology Science

Supervisor: Prof. Dr. Abdulkadir ÇİLTAŞ

In this study, effect of oxytetracycline on glutation s-transferase enzyme activity and gene expression levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver, ivestigated. For this purpose, rainbow trout liver tissues from oxytetracycline applied were collected at third, sixth and 12th hours. The group was not exposed to oxytetracycline assigned as control. While the lowest enzyme activity of GST was at 12th, the highest enzyme activity was observed in control. While compared with the control group, at 12th hour of enzyme activity was highly significant ($p < 0.001$), third and sixth hours groups was significant ($p < 0.05$). The lowest gene expression level was found in 12th group and the highest level was third. While compared with the control group, at third hour of gene expression level was highly significant ($p < 0.001$), sixth and 12th hours groups was not significant. As a result, there was understood that no correlation between gene expression levels and GST enzyme activity.

2016, 40 pages

Keywords: *Oncorhynchus mykiss*, Liver, Glutation S-Transferase, Oxytetracycline, Antibiotic, Enzyme Activity.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın başlangıcından itibaren her aşamasında tecrübelerini benim ile paylaşan ve her alanda bana destek çıkan özgür ve düzeyli bir çalışma imkânı sunan danışmanım Sayın Prof. Dr. Abdulkadir ÇİLTAŞ'a içtenlikle teşekkür ederim.

Çalışmalarımın bütün safhalarında bölümümüzün tüm imkânlarını kullanmamızı sağlayan Sayın Doç. Dr. Ercüment AKSAKAL'a ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Ahmet Necdet SİRKECİOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Ayrıca değerli katkılarından dolayı Sayın Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ'e, Sayın Doç. Dr. Gonca ALAK'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehtap BAYIR'a, çalışmalarımın deneysel aşamalarında bilgi ve tecrübesinden faydalanmış bulunduğum, Sayın Dr. Enver Fehim KOÇPINAR'a Sayın Dok. Öğr. Yeliz DEMİR'e, laboratuvar ve tez çalışmalarında desteğini hiçbir zaman esirgemeyen her zaman yanımda olan değerli çalışma arkadaşım Muhammet Selçuk ŞAHİN'e, Tez çalışması sırasında bana destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli dostlarım; Onur VURAL'a, Esmâ YİĞİDER'e, Elif BASTEM'e, Mustafa YILGIN'a, Esra GÜNAYDIN'a, Sayın Arş. Gör. Sibel TURAN'a, Abdullah TUNÇ'a ve Ahmet KARAKUŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Her ihtiyacım olduğunda yanımda olan, maddi ve manevi anlamda bana sürekli destek olan babam Aydın BALIK'a ve annem Tacinur BALIK'a, yine benim en yoğun zamanlarımda bana koşulsuz destek veren eşim Duygu BALIK'a, kardeşlerime ve tüm aileme sonsuz ilgi ve sevgilerinden dolayı teşekkür ederim.

Yusuf Zekeriya BALIK

Ocak, 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	13
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	16
3.1. Materyal.....	16
3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar.....	16
3.1.2. Kullanılan kimyasallar.....	17
3.1.3. Denemede kullanılan balık materyali.....	17
3.1.4. Çalışmanın yürütüldüğü yer.....	17
3.2. Yöntem.....	18
3.2.1. Deneme tankları.....	18
3.2.2. Balıkların bakımı ve beslenmesi.....	18
3.2.3. Antibiyotiklerin verilmesi.....	18
3.2.4. Enzim aktivitesi ölçümü.....	18
3.2.5. GST Enzim çalışmalarında kullanılan çözeltilerin hazırlanışı.....	19
3.2.6. Homojenat hazırlanması.....	19
3.2.7. GST enziminin aktivite ölçümü.....	20
3.2.8. Bradford protein tayininin uygulanışı.....	21
3.2.9. Moleküler çalışmalar için örneklerin toplanması.....	22
3.2.10. Total RNA izolasyonu.....	22
3.2.11. RNA'nın kalitatif tayini.....	23
3.2.12. RNA'nın kantitatif tayini.....	23
3.2.13. RT-PCR (reverse transkriptaz) ile cDNA sentezi.....	24
3.2.15. Genlere spesifik primer ve TaqMan prob dizaynı.....	25

3.2.16. Real time PCR uygulamaları.....	27
3.2.17. Gen ekspresyon sonuçlarının analizi ve değerlendirilmesi	27
3.2.18. İstatistikî analizler	27
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	28
4.1. Glutasyon S-Transferaz enzimi aktivite sonuçları.....	28
4.2. Total RNA izolasyon Sonuçları	30
4.3. Glutasyon S-Transferaz gen ekspresyonu.....	31
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	34
KAYNAKLAR	35
ÖZGEÇMİŞ	41

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
6PGD	6 Fosfo glukonat dehidrogenaz
A ₂₆₀	260 dalga boyu
A ₂₈₀	280 dalga boyu
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
bp	Baz çift
BSA	Sığır serum albümini
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
CDNB	1-Kloro-2,4-di nitro benzen
ddH ₂ O	Deiyonize Distile Su
DEPC	Dietilpirokarbonat
dH ₂ O	Distile su
DNA	Deoksiribo nükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleik Asit
DTT	Di tiyo tritol
EC	Enzim kodu
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EtBr	Etidyum Bromür
EU/mg	Enzim ünitesi/miligram
EU/ml	Enzim ünitesi/mililitre
FDA	Amerikan Federal Besin ve ilaç Birliği
G	devir
g	Gram
G-250	Brillat mavisi
G6PD	Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	İndirgenmiş glutasyon

GSR	Glutasyon redüktaz
GSSG	Yükseltgenmiş glutasyon
GST	Glutasyon S-transferaz
h	Saat
HCl	Hidroklorik asit
K	Potasyum
kg	Kilogram
l	Litre
m	Metre
M	molar
MDA	Melondialdehit
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MOPS	Morfolino propan sülfonik asit
mRNA	Mesajcı / Haberci Ribonükleik Asit
NaCl	Sodyum Klorür
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit
NaOH	Sodyum hidroksit
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogram
nm	Nanometre
OD	Optik Dansitite
OTC	Oksitetrasiklin
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
Rpm	Dakikadaki Rotor Devir Sayısı
rpm	Revolutions Per Minute
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
SH	Tiyoller
TE	Tris EDTA

u/ μ l	Ünite/Mikrolitre
UV	Ultra Viole
V	Volt
v/v	hacim / hacim
w/v	Ağarlık/hacim
μ g/l	Mikrogram/Litre
μ g/ml	Mikrogram/Mililitre
μ l	mikrolitre



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Gökkuşığı alabalığının (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) genel görünümü	4
Şekil 1.2. Oksitetrasiklin antibiyotiğinin 2 boyutlu molekül yapısı	8
Şekil 1.3. Oksitetrasiklin antibiyotiğinin 3 boyutlu molekül yapısı	9
Şekil 1.4. Glutasyon metabolizmasında görev alan enzimler	10
Şekil 1.5. Glutasyon S transferaz enziminin 3 boyutlu molekül yapısı	12
Şekil 4.1. Glutasyon S-transferaz enzim aktivitesinin kontrol ve muamele grubu sonuçlarının karşılaştırılması	29
Şekil 4.2. İzole edilen RNA'ların agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri.....	31
Şekil 4.3. Oksitetrasiklin verilen balıklardan farklı saatlerde alınan gökkuşığı alabalığı (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) karaciğer dokusunun GST mRNA seviyesi.....	32

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Yıllar itibarıyla toplam su ürünleri üretim ve tüketimi (ton/yıl).....	1
Çizelge 1.2. Türler itibarıyla yıllara göre su ürünleri yetiştiriciliği (ton/yıl).....	2
Çizelge 1.3. Dünya genelinde en çok tanınan alabalık türleri	3
Çizelge 1.4. Ülkemizin yerel alabalık alt türleri	3
Çizelge 1.5. Su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılan antibiyotikler.....	6
Çizelge 3.1. Kullanılan alet ve ekipmanlar	16
Çizelge 3.2. Kullanılan kitler ve kimyasallar.....	17
Çizelge 3.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı	19
Çizelge 3.4. GST enziminin aktivite ölçüm kuvvet içeriği.....	20
Çizelge 3.5. Gökkuşaağı alabalığında kullanılan genlere ait primer ve probalar, dizilim bilgileri, ürün uzunluğu ve genbank erişim numaraları.....	26
Çizelge 4.1. Glutatyon S-Transferaz kolon istatistiği sonuçları	28
Çizelge 4.2. Total RNA konsantrasyonları (ng/μl) ve A ₂₆₀ / A ₂₈₀ (nm)oranları	31
Çizelge 4.3. β-AKTİN'e karşı rölatif GST gen ekspresyonu seviyesi sonuçları.....	32

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun artması hayvansal kökenli protein kaynaklarının yetersizliğine sebep olmaktadır. Bu açığın en düşük maliyetle ve en iyi seviyede giderilmesi için son yıllarda önem kazanan su ürünleri sektörü bu açığın giderilmesinde ön sıralarda yer almaktadır (Aydın and Karadurmuş 2012).

Bu sektör aynı zamanda günümüzde değişen şartlar göze alındığında su ürünleri sektörü, dengeli beslenme ve aynı zamanda beslenme problemlerinin çözümünde önemlidir (Tan vd 2014).

Ülkemiz gerek iklimsel gerek çevreyle ilgili özellikler bakımından incelendiğinde balık üretimi yönünden yüksek bir potansiyele sahip olduğu görülecektir. Özellikle son yıllarda alternatif üretim sahalarının geliştirilmesi kapsamında balık üretimi gittikçe önem kazanmaktadır (Aydın vd 2005; Akşit ve Kum 2008). Türkiye’de balık üretimi yıllık ortalama 700.000 tonlarda olup bunun sadece 150.000 tonu çiftliklerden yetiştiricilik yoluyla elde edilir, bu miktarın önemli bir kısmı ihraç edilmektedir (Gagneux and Varki 1999).Yıllar itibarıyla toplam su ürünleri üretim ve tüketimi Çizelge 1.1’de verilmiştir (Anonim 2015a).

Çizelge 1.1. Yıllar itibarıyla toplam su ürünleri üretim ve tüketimi (ton/yıl)

Yıllar	Üretim	İhracat	İthalat
2003	587.715	29.937	45.606
2004	644.492	32.804	57.694
2005	544.773	37.655	47.676
2006	661.991	41.973	53.563
2007	772.323	47.214	58.022

Çizelge 1.1. (devam)

2008	646.310	54.526	63.222
2009	622.962	54.354	72.686
2010	653.080	55.109	80.726
2011	703.545	66.738	65.698
2012	644.852	74.006	65.384
2013	607.515	101.063	67.530
2014	537.345	115.682	77.545

Ülkemizde Alabalıklar, yetiştiriciliği yapılan balıklar arasında en büyük üretim payına sahiptir. Türler İtibariyle Yıllara Göre Su Ürünleri Yetiştiriciliği Çizelge 1.2'de verilmiştir (Anonim 2015b). Ülkemizde su ürünleri yetiştiriciliğinde alabalık üretimi miktarı açısından birinci sırada yer almaktadır. Onu levrek ve çipura takip eder (Coşkun vd 2014).

Çizelge 1.2. Türler itibariyle yıllara göre su ürünleri yetiştiriciliği (ton/yıl)

Yıllar	Alabalık (İçsu)	Alabalık (Deniz)	Çipura	Levrek
2003	39.674	1.194	16.735	20.982
2004	43.432	1.650	20.435	26.297
2005	48.033	1.249	27.634	37.290
2006	56.026	1.633	28.463	38.408
2007	58.433	2.740	33.500	41.900
2008	65.928	2.721	31.670	43.270
2009	75.657	5.229	28.362	46.554
2010	78.165	7.079	28.157	50.796
2011	100.239	7.697	32.187	47.013
2012	111.335	3.234	30.743	65.512
2013	122.873	5.186	35.701	67.913
2014	107.983	5.610	41.873	74.653

Yaşama alanları bakımından berrak, serin ve oksijen yönünden zengin, temiz suları tercih eden alabalık, özellikle etinin çok lezzetli oluşuyla tanınır. Alabalık türleri sistematikte *Salmonidae* familyasında yer alırlar. Morfolojik yönünden yağ yüzgeci ile karakterizedirler. *Salmonidae* familyasındaki alabalıklar üç cinsin türleridir Bu cinsler; *Oncorhynchus*, *Salmo*, *Salvelinus*'dur (Aydın 2004).

Dünyada en fazla bilenen alabalık türleri Çizelge 1.3'de verilmiştir (Bruno and Poppe 1996).

Çizelge 1.3. Dünya genelinde en çok tanınan alabalık türleri

<i>Salmo salar</i> Linnaeus	Atlantik Salmonu
<i>Salvelinus alpinus</i> Linnaeus	Alp alabalığı
<i>Salmo trutta f.trutta</i> Linnaeus	Deniz alabalığı
<i>Salmo trutta f.fario</i> Linnaeus	Dere alabalığı
<i>Salhvelinus namaycush</i> Walbaum	Göl alabalığı
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Walbaum	Gökkuşacağı alabalığı
<i>Salvelinus fontinalis</i> Mitchill	Kaynak alabalığı

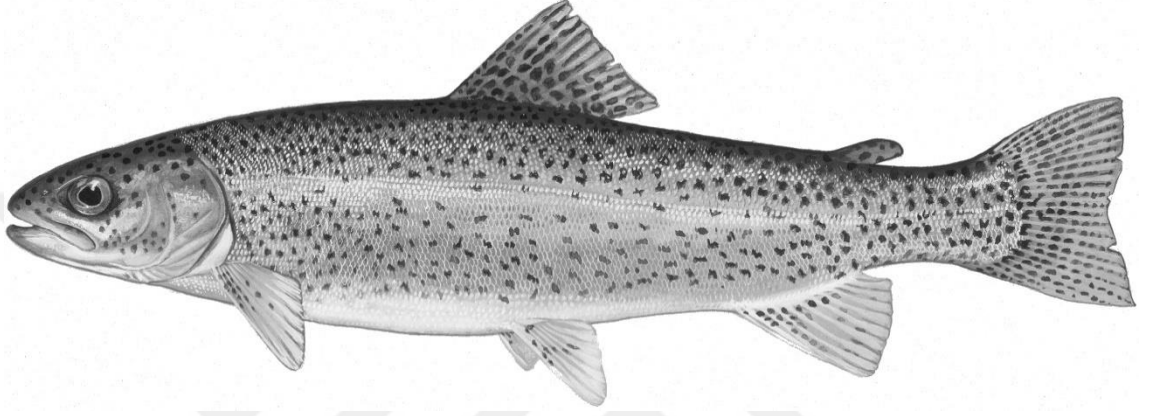
Ülkemizin yerel alabalık alt türleri ise Çizelge 1.4'de şöyle verilmiştir (Çelikkale 1994).

Çizelge 1.4. Ülkemizin yerel alabalık alt türleri

<i>Salmo trutta abanticus</i> Tortonese	Abant alabalığı
<i>Salmo trutta macrostigma</i> Dumeril	Anadolu Dağ alabalığı
<i>Salmo trutta caspius</i> Kessler	Aras alabalığı
<i>Salmo trutta f.lacustris</i> Linnaeus	Göl alabalığı
<i>Salmo trutta labrax</i> Pallas	Karadeniz alabalığı

Yetiştiriciliği yapılan alabalık türleri içerisinde en yaygın olanı Kuzey Amerika kökenli Gökkuşacağı alabalığı olmuştur.

Gökkuşığı alabalığı ile Kaynak alabalığı takribi olarak 120 yıl kadar önce Amerika'nın kuzeyinden Avrupa'ya getirilmelerine rağmen kültür koşullarına daha çok uyumundan dolayı Gökkuşığı alabalığı yetiştiriciliği büyük bir yükselme göstermiş ve hâlihazır da bir endüstri gelmiştir (Steffens 1981; Aydın 2004).



Şekil 1.1. Gökkuşığı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) genel görünümü (Anonymous 2015a)

Gökkuşığı alabalıkları derelerde, göllerde ve nehirlerde yaşamaktadırlar. Larva dönemlerinde zooplanktonları balık geliştikçe böcekleri, kabukluları ve diğer balıkları 'da yem olarak tüketmektedir. Yumurtlamaları bulunduğu su sıcaklığına bağlı olup farklı dönemlere denk gelse de genellikle doğal ortamları ilkbaharda olmaktadır (Yanık 2009). Kıyılarda yaşayan alabalık türleri ise Kış'ın başlarında yumurtlamaya başlarlar. Dişileri genellikle kumlu ve çakıllı yerlere yaptıkları yuvalarına 500-2500 yumurta (50-150 mg yumurta/L) bırakır, erkek balıklar ise bu yumurtaları hemen dölemektedirler. (Leitritz and Lewis 1980). Kuluçka süreleri ise 320-360 (Gün-Derece) arasında değişmektedir (Bohl 1982).

Gökkuşığı alabalığı büyüme oranları su sıcaklığına ve ortamdaki besinin varlığına bağlı olarak değişmektedir. Yabani olanları genellikle 3-4 yaşlarında cinsi olgunluğa ulaşmaktadırlar.

Büyüme ve olgunlaşma döneminde çevre koşullarından etkilenirler, soğuk bölgelerdeki sulara yaşayan balıklar sıcak bölgelerde yaşayanlara göre daha uzun yaşamaktadırlar (Behnke 1992). Fakat derelerde yaşayan gökkuşığı alabalıkları ilk yaşını doldurduğunda 100 g ve 3 yaşlarında ise 300-450 g civarında olabilirler (Yanık 2009).

Kültür balıkçılığının gelişmesi beraberinde bazı sorunların da ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Bu sorunların başında çeşitli hastalıklar, uygun olmayan alanlara kurulan tesislerin çevreye verdiği zarar ve bilinçsiz ilaç kullanımı gelmektedir (Savaş ve Türe 2007).

Balıklar, normal koşullar altında, doğal savunma mekanizmaları ile kendilerini hastalık etkenlerine karşı korurlar. Ancak, kültür balıkçılığında, hastalık determinantlarının (çevre, etken ve konakçı) yüksek derecede değişken olması, immun sistemin kolaylıkla baskılanmasına neden olmaktadır. İmmun sistemi baskılanmış olan balıklarda, potansiyel hastalık etkenleri aktif hale geçerek enfeksiyonlara neden olabilmektedir (Durmaz 2015).

Balıklarda görülen bakteriyel enfeksiyonların sağaltımında veya kontrolünde çeşitli ilaçlardan (Sulfanamid, Nitrofuran ve Antibiyotik) yararlanılmaktadır. Bunlar yemlere ve sulara katılarak veya enjeksiyon yolu ile kullanılırlar.

Kuluçka hanelerdeki veya havuzlardaki çok sayıda balığa enjeksiyon hem güç ve zaman alıcı hem de balıkları strese sokmaktadır. Balıkların yakalanması bile bazen ölümlere neden olmaktadır. Sulara ilacın katılması yolu ile sağıtım ve korunma da genellikle fazla etkili olamamakta aynı zamanda maliyeti çok arttırmaktadır. Çünkü antibiyotik banyosu dış yüzeylerdeki enfeksiyonlarda etkili olmasına karşın sistemik enfeksiyonlarda balık vücudunda istenilen dozaja ulaşılammamaktadır (Gürtürk 2009).

Su ürünleri yetiştiriciliğinde 50 yılı aşkın süredir antibiyotik kullanılmaktadır. Bakteriyel hastalıklardaki artışa paralel olarak anti bakteriyel kullanımı da hızla artmıştır. Antibiyotik kullanımına, alabalıklarda frunkulozis tedavisinde sülfonamidlerin ve bazı Gram negatif patojenlere karşı tetrasiklinlerin kullanımı oldukça eskidir (Inglis 2000).

İnsan gıdası olarak tüketilen balıklarda kullanılan antibiotik sayısı ve çeşitliliğine son yıllarda oldukça sınırlandırılmıştır (Baydan vd 2012).

Çizelge 1.5. Su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılan antibiyotikler

β- Laktamlar	Kinolonlar
Nitrofuranlar	Aminoglikozidler
Makrolidler	Sülfonamidler
Fenikoller	Tetrasiklinler

β- Laktamlar: Su ürünleri yetiştiriciliğinde başlıca; benzil penisilin ve amoksisilin, İngiltere’de 1990’dan beri, Japonya’da uzun yıllardır kullanım alanı bulmuştur. Oral olarak yemlerle beraber ya da daha az olarak enjeksiyon tarzında uygulanmıştır (Anonymous 2007a; Özdemir 2010).

Nitrofuranlar: Furazolidon ve nifurpirinolü içeren sentetik antibiyotiklerdir. Antibakteriyel ve antiprotozaal aktiviteye sahiptirler ve yaygın olarak balık ve karides yetiştiriciliğinde kullanılırlar (Samuelsen *et al.* 1991; Özdemir 2010).

Avrupa ve Kuzey Amerika’da, daha aktif bileşiklerin bulunması ve nitrofuranların karsinojen etkilerinin anlaşılması sonucunda kullanımları azalmıştır. Avrupa Birliği’nde hayvansal ürünlerde kullanımı yasaklanmıştır (Samuelsen *et al.* 1991; Özdemir 2010).

Makrolidler: Balık yetiştiriciliğinde kullanılan tek makrolid eritromisindir. Gram pozitif bakterilere, sarıkuyruklarda (*Seriola quinqueradiata*) streptokok infeksiyonlarına ve bakteriyel böbrek yetmezliğine (*Renibacterium salmoninarum*) karşı etkilidir (Anonymous 1997a; Özdemir 2010).

Fenikoller: Kloramfenikol, tiamfenikol ve florfenikolü içeren geniş spektrumlu antibiyotik grubudur. Kloramfenikol'ün insanlarda tifo tedavisinde olduğu gibi önemli kullanım alanları vardır.

Birçok ülkede yasaklanmış olmasına rağmen bazı ülkelerde kullanımı endişe yaratmaktadır. Avrupa ve ABD'de bunlara ilişkin kalıntı bulunmamasıdır, bu bölgelere ihraç edilecek ürünlerinde fenikol grubu antibiyotikler yönünden arı olması zorunludur (Anonymous 1997a; Özdemir 2010).

Kinolonlar: Sentetik antibakteriyellerdir. Birinci kuşak kinolonlar nalidiksik asit, oksolinik asit ve flumequin; ikinci kuşak kinolonlar ise florlu türevleri olan enrofloksasin ve sarafloksasini içermektedir. Bunlardan ilk kuşak Gram negatif bakterilere etkili iken florokinolonların daha geniş spektruma sahip olduğu bildirilmektedir (Björklund *et al.* 1991; Hansen *et al.* 1992; Samuelsen *et al.* 1992; Özdemir 2010).

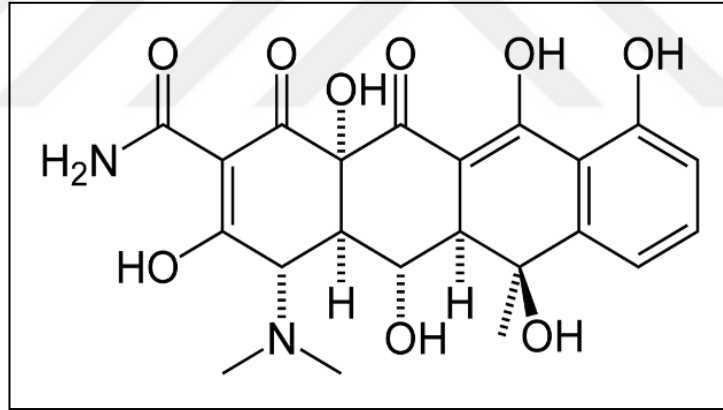
Aminoglikozidler: *Streptomyces* ve *micromonospora* türü mikroorganizmalardan elde edilen doğal ve yarı sentetik antibiyotiktir. Aminoglikozidler kimyasal açıdan oldukça sabit, geniş antibakteriyel aktiviteye sahip, hızlı bakterisidal ve betalaktam antibiyotiklerle sinerjik etkili antibiyotiktir (Gündüz vd 2004).

Sülfonamidler: Tek başlarına kullanılabilmesinin yanında daha çok trimetoprim veya ormetoprim ile beraber kullanıldıkları bildirilmektedir. *Furunkulozis*, Enterik kızıl ağız hastalığı (Enteric red mouth disease) ve *vibriosis* gibi hastalıkların kontrolünde genellikle yemlere katılarak kullanılmaktadır. Direnç gelişimi şekillenmesinin

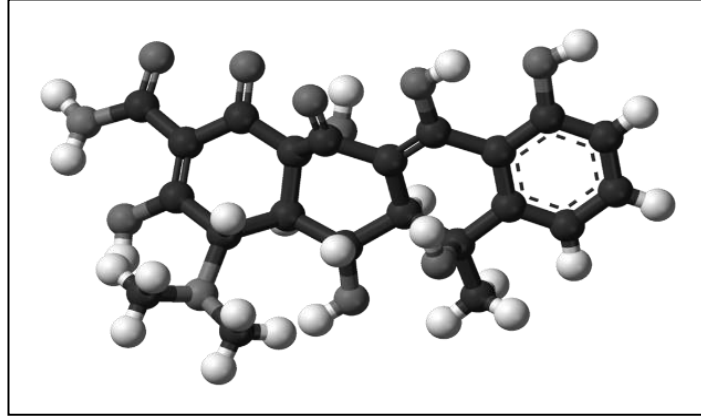
bileşenlerin tek başına kullanıldığında daha hızlı, kombinasyon formunda ise daha yavaş olduğu saptanmıştır (Samuelsen *et al.* 1994; Capone *et al.* 1996; Özdemir 2010).

Tetrasiklinler: Bu grupta en çok kullanılan antibiyotik oksitetrasiklin olduğu, bazı bölgelerde klortetrasiklin ve doksisisiklin kullanıldığı belirtilmektedir. Su ürünleri yetiştiriciliğinde en geniş kullanım alanı bulan antibiyotik oksitetrasiklidir (OTC). Ucuz olması bir avantajdır. Oral ya da banyo tarzında uygulanabilmektedir (Capone *et al.* 1996; Smith 1996; Özdemir 2010).

Oksitetrasiklin balıklardaki bakteriyel hastalıklara karşı oldukça etkili bir antibiyotik olmasına karşın, insan kullanımını açısından çeşitli yan etkileri nedeni ile tercih edilmemiştir (Kayaalp 1991).



Şekil 1.2. Oksitetrasiklin antibiyotikinin 2 boyutlu molekül yapısı (Anonymous 2007b)



Şekil 1.3. Oksitetrasiklin antibiyotikinin 3 boyutlu molekül yapısı (Anonymous 2007c)

Oksitetrasiklin Amerikan Federal Besin ve İlaç Birliği (FDA) tarafından akuakültür’de kullanımına izin verilen ilk antibiyotiktir (Reed *et al.* 2004). Ayrıca Norveç, İtalya ve Japonya gibi birçok ülkede bakteriyel balık hastalıklarının sağaltımında kullanılmasına izin verilmiş bir antibiyotik olduğu rapor edilmektedir (Björklund 1991; Malvisi *et al.* 1996; Balta vd 2005).

FDA balıklarda sadece sulfamerazin, oksitetrasiklin dihidrat, sulfadimetoksin-ormetoprim ve florfenikolün yasal olarak kullanımına izin verir. Türkiye’de ise florfenikol, sulfadiazin+trimetoprim, oksitetrasiklin, amoksisilin, oksolinik asit, enrofloksasin etken maddelerini çevreleyen ruhsatlı 35 balık preparatı vardır (Baydan vd 2012).

Oksitetrasiklin su ürünleri yetiştiriciliğinde dünya çapında en çok kullanılan antibiyotik olduğu bu sebeple balık etinde kalıntı problemi açısından en önemli grup olduğu açıklanmaktadır (Smith *et al.* 1994).

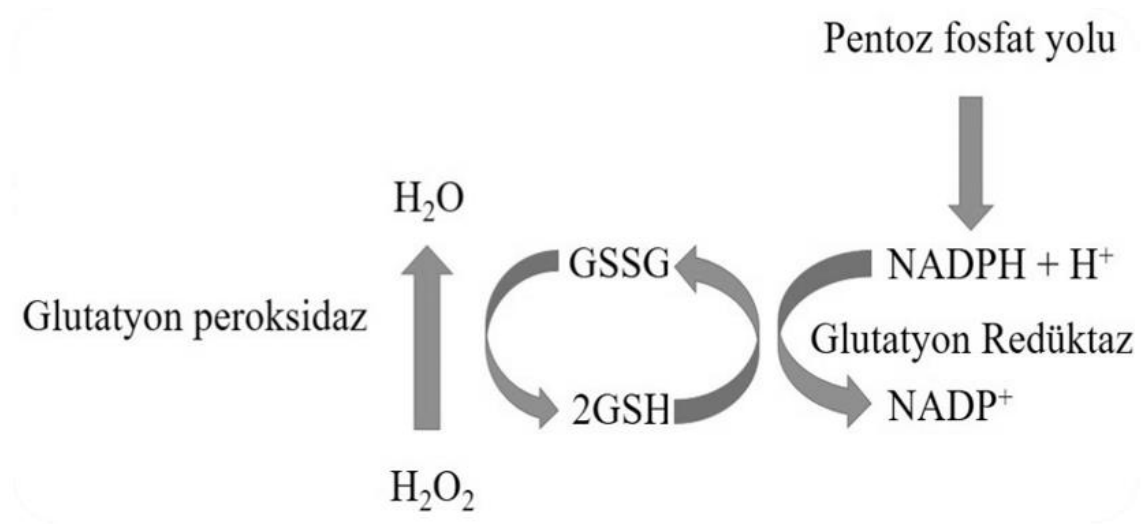
Gökkuşluğu alabalığında sindirilen oksitetrasiklinin yalnızca %7-9’unun barsak pasajında absorbe olduğu belirtilmektedir (Cravedi *et al.* 1987; Özdemir 2010). Çökelti halindeki oksitetrasiklinler genellikle mikrobiyel yıkımlanmaya uğramamakta ve ancak bu çökeltinin hemen üzerindeki su tabakasına difüzyonu ile azalmaktadır.

Oksitetrasiklinlerin kullanımını takiben en az 2 ay süreyle deniz suyunda bulunabildiği bildirilmektedir (Samuelsen 1989).

Balıklarda arınma sürelerinin tespiti ile ilgili çalışmalar, yaygın kullanımı nedeniyle daha çok oksitetrasiklin üzerinde yoğunlaşmış olsa da diğer antibiyotik grupları ve kemoterapötiklerin arınma süreleri ile ilgili çalışmalar da vardır (Grondel *et al.* 1987).

Enzimler, canlı organizmalardaki bütün kimyasal reaksiyonları çabuklaştıran ve hiçbir yan ürünün oluşturmadan %100'lük bir ürün avantajı sağlayan biyolojik katalizörlerdir (Leninger *et al.* 2000).

Pentoz fosfat yolu bazen pentoz yan yolu, heksoz mono fosfat yolu veya fosfoglukonat oksidatif yolu olarak da adlandırılır. Bu reaksiyon serisinin aydınlatılmasında ilk adım 1931 yılında Otto Warburg tarafından atılmış ve tamamı Fritz Lipmann, Frank Dinckens, Bemard Horecker ve Efrahim Rucker isimli biyokimyacılar tarafından ortaya konulmuştur (Keha ve Küfrevioğlu 2002).



Şekil 1.4. Glutatyon metabolizmasında görev alan enzimler (Dağdelen 2015'den modifiye edilmiştir)

İndirgenmiş glutatyon (GSH) glisinden ve glutamik asid sisteinden oluşur. Tripeptittir ve intraselüler konsantrasyonunda azdır. Önemli bir indirgeyici ajandır. Antioksidan olan glutatyon, hücrenin oksido-redüksiyon dengesini sürdürüp hücreleri endojen ve ekzojen kaynaklı oksidanların zararlı etkilerinden korumaktadır (Mitchel and Russol 1987; Compoti 1987).

Proteinlerdeki SH gruplarının korunması ve bazı reaksiyonlarda koenzim olarak görev alması ile beraber amino asitlerin transportunda, protein ve DNA sentezinde de önemli rol oynar (Ziegler 1985). Glutatyon dokularda birbiriyle dengede bulunan, GSH ve okside glutatyon (GSSG) olmak üzere iki şekilde bulunur (Arrick and Nathan 1984).

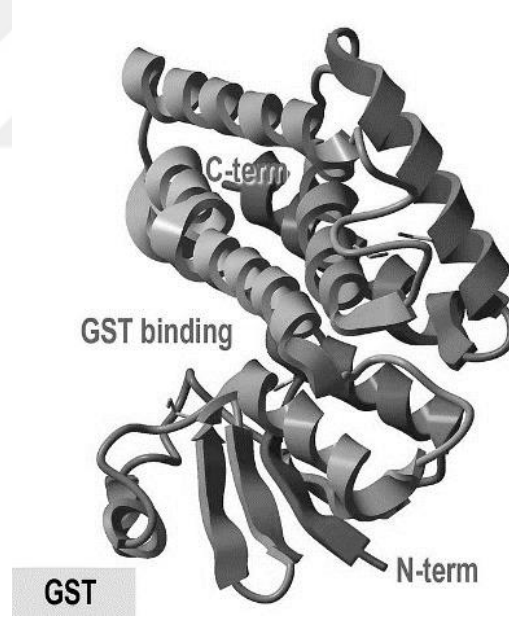
GSH'nin hücresel seviyesi γ -glutamil transpeptidaz, aminoasit transporterları, glutatyon sentetaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktazı içeren çoklu bir enzim sistemi tarafından korunur (Cnubben *et al.* 2001).

Glutatyon S-transferaz (GST) (EC.2.5.1.18), detoksifikasyon metabolik yolunda son ürün olan merkapturik asit oluşumundaki ilk basamağı katalizleyerek homeostasisi sağlayan çok işlevli bir enzimdir (Andersson *et al.* 1988; Arı ve Dere 2003). GST, memelilerde, böceklerde, balıklarda, kuşlarda, halkalı solucan, yumuşakcalar ve birçok mikroorganizmada bulunmaktadır. En sık rastlandığı dokular, başta karaciğer olmak üzere, incebağırsak, kalınbağırsak, böbrek gibi birçok organın sitosölü ve membranıdır (Habıg *et al.* 1974).

GST enziminin biyokimyasal, immünolojik ve yapısal özellikleri baz alınarak GSTP1, GSTM1 ve GSTT1 gibi birkaç gruba ayrılır ve GST genleri tarafından kodlanır. GST'ler dokuya spesifik bir biçimde eksprese edilir (Berhane *et al.* 1994; Karagianni *et al.* 2013).

GST, çok substratlı bir enzimdir (Anton *et al.* 1990). GST, besinlerle alınan toksik maddelerin eliminasyonunu yapar. Prostaglandinlerin izomerizasyonu, hem, bilirubin, safra tuzları ve yağ asitleri gibi nonsubstrat ligandları GSH ile bağlayarak taşınmasını da sağlamaktadır (Boyer 1989).

Ayrıca reaktif elektrofilik bileşiklerin vücuda zarar vermesini, aynı tür bileşikleri birbirine kovalent bağlayarak'ta önleyebilmektedir (Puchalski *et al.* 1990). GST'ın etkilediği bu ksenobiyotik akseptörler içinde nitrojenli, halojenli bileşikler, organofosfatlar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar yer almaktadır. Ksenobiyotikler, bu enzim sistemi ile oksijenlenir, oksijenatlı ürünlerin sonraki mekanizması, daha fazla oksijenasyon ve bu ürünlerin suda daha kolay çözünür hale gelmesidir (Goodman and Gilman 1980).



Şekil 1.5. Glutatyon S transferaz enziminin 3 boyutlu molekül yapısı (Anonymous 2007d)

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Gever (2010), toplam 75 adet gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) kullanarak bir kontrol ve dört deney grubu oluşturulmuştur. Deney gruplarındaki balıklara farklı dozaj ve sürelerde oksitetrasiklin banyo şeklinde uygulanarak solungaçlarda meydana gelen etkileri klinik ve histopatolojik olarak incelenmiştir. Klinik olarak, dört deney grubuna ait balıklarda oksitetrasiklin uygulamasından sonra balıklarda hareketlerinde yavaşlama, dengesiz yüzme hareketleri, renklerinde açılma, solungaçlarda solgunluk ve filamentlerde kopmalar gözlenmiştir. Histopatolojik olarak, lamellalarda hipertrofi ile başlayan ve daha ilerleyen dozajlarda solungaçların distal lamellalarının birbirine yapışması sonucu primer lamellalarda gelişen hiperplazi gözlenmiştir. Primer lamellalarda ödem ve sekonder lamellalarda ayrılmalar görülmüştür. Artan dozaj ve sürelerle bağlı olarak patolojik etkilerin derecesi de artmıştır.

Yonar *et al.* (2011), Balıklarda propolis oksitetrasiklin kaynaklı oksidatif stres ve immünoşpresyon üzerine etkisi araştırılmıştır. Balıklara 14 gün boyunca (100 mg/kg) dozunda oksitetrasiklin uygulanmış. Antibiyotik uygulanan balıkların kan karaciğer böbrek dalak ve kalp dokularında lipit peroksidasyonunun indeksi olarak malondialdehit seviyesinde önemli bir yükselme ve antioksidan enzim aktivitelerinde (süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz) ve düşük molekül ağırlıklı antioksidan (redükte glutatyon) düzeylerinde azalma gözlenmiştir. OTC ayrıca lökosit sayıları oksidatif radikal üretimi (Nitrobluetetrazolium aktivitesi) total plazma proteini ve immün globulün seviyeleri ve fagositik aktivite gibi spesifik ve non-spesifik immün sistem parametreleri üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. Tedavi öncesi, sonrası ve esnasında propolis desteği (50 mg/kg), dokulardaki OTC kaynaklı oksidatif strese bağlı, malondialdehit seviyesini önemli derecede azalmıştır. Ayrıca propolis glutatyon ve katalaz, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz aktivitesi seviyesini önemli derecede artırmıştır. Propolis tedavisi baskılanmış immün sistem parametrelerini önemli derecede yükseltmiştir. Sonuç olarak oksitetrasiklin tedavisinin öncesi tedavi dönemi ve sonrasında uygulanan propolis takviyesi'nin OTC kaynaklı oksidatif stres ve immünoşpresyonu azalttığı gözlenmiştir.

Budak *et al.*(2014a), yaptıkları çalışmada antioksidan sistem üzerine böbrek de uzun süreli aşırı demir yükünün etkisini ve enzimatik ve moleküler seviye arasındaki olası ilişkiyi belirlemeye çalışmışlardır. Glutasyon seviyesinin azalması oksidatif stres için bir belirteç olduğunu vurgulamışlardır. Sıçan böbreklerinde uzun vadeli aşırı demir yükü ile azaldığı görüldüğünü tespit etmişlerdir. Renal mRNA seviyelerinde G6PD 6PGD GPx belirgin bir demir mevcudiyetinden etkilendiği GST ve GSR nin ise herhangi bir değişiklik olmadığını gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak, G6PD, 6PGD, GSR GPX ve GST gen ifadesi aktivitesini enzim ilişkili olmadığını rapor etmişlerdir.

Oliveira *et al.* (2013), Zebra balığı gelişimi ve biyomarkır aktivitesi üzerine amoksilin ve oksitetrasiklin subletal etkilerini değerlendirmek için çalışma yapmışlardır. Amoksilin (48h EC50=132.4mg/l) yumurtaların erken çıkmasına sebep olmuştur. Oksitetrasiklin (72h EC50=127.6mg/l) ise yumurtaların geç çıkmasına sebep olduğu görülmüştür. Ayrıca her iki antibiyotikte katalazı inhibe etmiş ve yetişkin balıklarda glutasyon s transferazı da indüklemişlerdir. Laktat dehidrogenazın indüklenmesine ise sadece oksitetrasiklin sebep olmuştur. Antibiyotiklerin kısa vadede etkileri ve balık popülasyonlarında ki fizyolojik bozuklukların meydana gelmesi yüksek doz kullanıldığında gözlenmiştir.

Yonar (2012), Gökkuşığı alabalığında oksidatif stress ve imminosupresyona bağlı olarak oksitetrasiklinin likopen üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla bu çalışmayı yapmıştır. Likopen ile tedavi öncesi ve sonrası doku melondialdehit seviyesi ile OTC kaynaklı oksidatif stress'in önemli ölçüde azaldığını belirtmiştir. Glutasyon-S-transferaz aktivitesi önemli ölçüde azalmış iken süperoksit dismutaz, katalaz ve glutasyon peroksidaz aktivitenin yanısıra glutasyon seviyesi önemli derecede, likopen uygulaması ile arttığını rapor etmiştir. Balıklarda OTC ile baskılanmış bağışıklık sistem parametrelerindeki artış likopen uygulaması ilişkili olduğunu görmüştür.

Elia *et al.* (2014), Sazan kasının oksitetrasiklin yeminden yararlanabilirliği karaciğer ve böbrek de antibiyotiğin antioksidan sisteme etkilerini araştırmışlardır. OTC ile terepötik seviyede (75 mg/kg⁻¹) ve yüksek dozda (150, 300 mg/kg⁻¹) 10 gün boyunca balıkları

tedavi etmişlerdir. Karaciğerde süperoksit düsmutaz, katalaz glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve glutatyon aktivitesini önemli derecede düşürdüğünü ve yalnızca melondialdehit ve glutatyon s transferaz aktivitesini yüksek bulmuşlardır.

Banni *et al.* (2015), dört gün boyunca midyeye verilen oksitetrasiklin antibiyotiği ile (1 ve 100 ug / L) tedavi etmek için hücresel ve moleküler parametreler üzerine sıcaklığın (16°C ve 24°C) interaktif etkilerini değerlendirmek için bu çalışmayı yapmışlardır. MDA seviyesindeki artış GST aktivitesinde azalma görüldüğünü tespit etmişlerdir.

Li *et al.* (2015), Yavru Sazanların tributyltin (TBT) ile kronik tedavisiden sonra hepatik glutatyon antioksidan savunma sistemine ve ilişkili gen ekspresyonuna cevaplarını araştırmışlardır. GPx, GR ve GST içeren GSH ile ilişkili enzim aktivitelerini balık karaciğerinde tespit etmişlerdir. Malondialdehit seviyeleri oksidatif hasarı belirlemek için ölçülmüşlerdir. Bu çalışmanın sonucu olarak TBT'ye maruz kalan kronik sazan karaciğerde reaktif oksijen türleri strese neden olduğunu ve mRNA ekspresyon düzeyleri ilgili enzim düzeylerine göre daha hassas olduğunu bulmuşlardır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar

Çizelge 3.1. Kullanılan alet ve ekipmanlar

NO	ALET
1	Derin Dondurucular
2	Destile Su Cihazı
3	Elektroforez Cihazı
4	Otoklav
5	Güç Kaynağı
6	Hassas Terazı
7	Kar Üretme Makinesi
8	Manyetik Karıştırıcı
9	pH Metre
10	Mini Santrifüj
11	Soğutmalı Santrifüj
12	UV Görüntüleme Cihazı
13	Mikrodalga Fırın
14	Falkon Tüpler
15	Ependorf Tüpler
16	Vortex
17	PCR
18	Spektrofotometre
20	Mikropipet Takımı
21	Isıtıcı Blok
22	Derin Dondurucu (-86)
23.	Ultratoraks
24.	Elektroforez Cihazı
25.	Mikropipet Seti
26.	Nanodrop
27.	Qiacube (Rna İzolasyon Robotu)
28.	Real-Time PCR

3.1.2. Kullanılan kimyasallar

Çizelge 3.2. Kullanılan kitler ve kimyasallar

KİMYASALLAR
Agaroz
Etanol
Etidyum bromür
Fas start tag
Okside glutasyon
Qazol
Tris-HCl
NADPH
Serum albumin
NaOH
HCl
Fosforik asit
Superscript
RNA later
TritonX-100
EDTA

3.1.3. Denemede kullanılan balık materyali

Çalışmada Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi İç Su Balıkları Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilen, herhangi bir kimyasallara ve hastalığa maruz kalmamış 230±20 g'lık 28 adet gökkuşuğu alabalığı kullanılacaktır.

3.1.4. Çalışmanın yürütüldüğü yer

Enzim çalışmaları ve Moleküler çalışmalar Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Deneme tankları

Araştırmada 1 m çap ve derinliği olan, su tahliyesi eğik boru sistemiyle yapılan fiberglas tanklar kullanılmıştır. Suyun tahliyesi tankların tabanında bulunan plastik süzgeçler vasıtasıyla ve tanklar üzerinde bulunan eğik borular yardımıyla günde 2 kere olmak üzere yapılmıştır.

Dört adet fiberglas tanka rastgele ve eşit sayıda (7 adet) gökkuşağı alabalığı dağıtılmış ve 15 günlük aklimitasyona tabi tutulmuştur. Denemede dakikada 1.5 litrelik akış hızına sahip kaynak suyu kullanılacaktır. Balıklar bir kontrol, üç muamele olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Oral yolla Oksitetrasiklin uygulandıktan sonra herhangi bir anestezi uygulandıktan öldürülen muamele gruplarından üç, altı, 12 saatlerde karaciğer örnekleri alınmıştır.

3.2.2. Balıkların bakımı ve beslenmesi

Deneme balıklarına günlük canlı ağırlıklarının %3.5'i kadar yem verilmiştir (Çiltaş 2000).

3.2.3. Antibiyotiklerin verilmesi

Yemlere emdirilen 100 mg/kg dozundaki oksitetrasiklin bir gün süre ile aç bırakılan balıklara verilmiştir (Yonar *et al.* 2011).

3.2.4. Enzim aktivitesi ölçümü

Kontrol ve muamele gruplarından alınan 1 gram dokular tampon çözeltiler içerisinde de homojenize edilip (ultratoraks) yardımıyla parçalandı ve santrifüj edilmiştir.

Daha sonra Bradford protein tayini ve enzim aktivitesi çalışmaları yapılmıştır. Enzim aktivite ölçümlerinden alınan sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.2.5. GST Enzim çalışmalarında kullanılan çözeltilerin hazırlanışı

Glutatyon S-transferaz (GST) enzimi çalışmalarında kullanılan çözeltiler;

Çizelge 3.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı

1. 600 mM K Fosfat (pH=7,3) (Enzim aktivite ölçümünde kullanılan tampon):	4,08 tartılıp 20 ml saf suda çözülür ph:7.3 e ayarlanır son hacim saf su ile 30 ml ye tamamlanır.
2. 20 mM GSH Çözeltisi (Enzim aktivite ölçümünde kullanılan çözelti):	0,018 g alınır ve 3 ml saf suda çözülür.
3. 25 mM CDNB Çözeltisi (Enzim aktivite ölçümünde kullanılan çözelti):	0,015 g alınır ve 3 ml etanolde çözülür. Işık geçirmeyen cam şişede saklanır.

3.2.6. Homojenat hazırlanması

Alınan doku örnekleri %0,9 NaCl ile 3 kez yıkanmıştır. Belirlenen miktarda örnek tartılmış ve 10 hacim (w/v) 0,1 mM EDTA , %0,1 Triton X-100 (v/v) (ph:7,8) ile 100 mM Tris-HCL tamponunda homojenize edilmiştir.

Homojenatlar 10000 rpm de 30 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatantları alınmış ve ölçümlerde kullanılmıştır (Bu süre zarfında örnekleri içeren tüpler buz üzerinde tutulmuştur).

3.2.7. GST enziminin aktivite ölçümü

GST aktivite ölçümü, Çizelge 3.4'deki pipetleme prosedürüne göre 1 ml'lik kuvarz küvetler kullanılarak spektrofotometrik olarak 340 nm dalga boyunda 3 dakika süreyle 3'er kez ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri ile enzim aktivitesi (EU/ml) hesaplandı. Daha sonra protein tayini sonuçları ile birleştirilerek spesifik aktivite (EU/mg) hesaplanmıştır.

Çizelge 3.4. GST enziminin aktivite ölçüm küvet içeriği

	Kör küveti	Numune küveti
Stok aktivite Çözeltileri	Hacim(µl)	Hacim(µl)
K Fosfat tamponu	200	200
Homojenat	-	1
Distile su	730	729
CDNB	20	20
GSH	50	50

$$EU/ml = \frac{\Delta OD}{\epsilon} \times \frac{V_T}{V_H} \times S_F$$

ΔOD : Dakika başına optik dansite değeri ($\Delta A_{numune} - \Delta A_{kör}$)

ϵ : $9,6 \text{ mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

V_T : Deney çözeltisinin toplam hacmi

V_H : Deneyde numune olarak kullanılan homojenatın hacmi

Bu formülden dakika başına OD değişimi bulunarak EU/ml cinsinden enzim aktivitesi hesaplanmıştır. Daha sonra spesifik enzim aktivitesi her numune için mg protein başına düşen enzim ünitesi olarak hesaplanmıştır.

Spesifik enzim aktivitesi;

$$A = \frac{\Delta OD}{\epsilon} \times \frac{V_T}{V_H} \times \frac{1}{(\text{mg protein/ml})}$$

A : Spesifik enzim aktivitesi (EU/mg protein)

ΔOD : Dakika başına optik dansite değeri ($\Delta A_{\text{numune}} - \Delta A_{\text{kör}}$)

ϵ : 9,6 mmol⁻¹ x cm⁻¹

V_T : Deney çözeltisinin toplam hacmi

V_H : Deneyde numune olarak kullanılan homojenatın hacmi

3.2.8. Bradford protein tayininin uygulaması

Bu yöntemde sığır serum albümini (BSA) yardımıyla tespit edilen standart grafik yardımıyla bütün numunedeki protein miktarı BSA eşit olarak tespit edilmiştir. Bunun için 100 mg commensie brillant blue G-250 50 ml %95'lik etanol de çözülerek 100 ml %89'luk fosforik asit eklenmiştir. Devamında çözeltinin hacmi saf su ile 1 litreye eşitlenmiştir ve reaktif hazırlanmıştır.

Balıklardan elde edilen doku homojenatları (100 µl homojenat 900 µl dH₂O) olacak şekilde 100 kat seyreltilmiştir. Bir kontrol (yedi örnek) ve üç muamle grubu (21 örnek (7x3)) ve kıyaslama yapılacak olan bir kör ile beraber 29 adet deney tüpü kullanılmıştır ve protein tayini yapılmıştır.

Kör: 4900 µl Coommassie Blue boyası+100 µl dH₂O

Numune: 4900 µL Coommassie Blue boyası+90 µL dH₂O+10 µL süpernatant

Son hacim 5000 µl (5 mL) olacak şekilde ayarlanarak en az 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Standart grafik çizildi. Numunelerin protein miktarı standart grafikten elde edilen eşitlik yardımıyla hesaplanmıştır.

3.2.9. Moleküler çalışmalar için örneklerin toplanması

Moleküler analizler de kullanılacak örnekler için balık karaciğerleri steril şartlarda çıkarılıp RNA Later solüsyonu içerisine konularak çalışılncaya kadar -80°C 'de muhafaza edilmiştir.

3.2.10. Total RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonu Qiagen-Qiacube izolasyon robotunda yapılmıştır.

1. -80°C 'de saklanan doku örnekleri, çıkarıldıktan sonra karda çözdürüldü. Çözünen doku örneklerinden 100 mg alınarak önceden içlerine demir bilye atılmış olan steril ependorf tüplerine koyulmuştur.
2. Üzerine 1ml (1000 μl) Qiazol Lysis Reagent eklenmiştir.
3. Tissue Lyser cihazında 3+3 dakika boyunca 40 Hz'de parçalama işlemi yapılmıştır.
4. Daha sonra örnek üzerine 200 μl kloroform ilave edilmiştir.
5. 15 saniye vortex işleminden sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 12000 G'de 15dakika santrifüj edildi. Santrifüj edildikten sonra yaklaşık 500 μl en üst fazdan alındı ve 2ml'lik steril ependorf tüpüne aktarılmıştır.
6. Örnekler daha sonra Qiagen-Qiacube RNA izolasyon robotuna yerleştirildi ve 40 dakika işlemden sonra RNA izolasyon robotundan çıkarılan örnekler bir daha ki kullanıma kadar -80°C saklanmıştır.

3.2.11. RNA'nın kalitatif tayini

RNA'nın saflığının tespit etmek için Agaroz jel elektroforezi (Thermo elektroforez cihazı) uygulanmıştır. Aşağıda belirtilen protokol uygulanmıştır.

1. Jel için 0,8 gr agaroz, 4,38 ml 20x MOPS, 66,5 ml ddH₂O ve 15,6 µl formamid erlenmayere koyularak mikrodalga fırında 3-4 dakika kaynatılıp musluk altında biraz soğutulduktan sonra üzerine 12,8 µl EtBr (etidyum bromür) eklenerek hazırlanmıştır.
2. 0,2'lik ependorf tüplere 3,5 µl ddH₂O, 0,5 µl 20x MOPS solüsyonu, 5 µl formamid üzerine elde edilen RNA örneklerinden 1µl alınarak 65°C'de 15 dakika süreyle etüvde inkübasyona bırakılmıştır.
3. Jel donduktan sonra elektroforez kütetine 1x MOPS solüsyonundan jelin üzerini kaplayacak şekilde yavaşça dökülmüştür.
4. Daha sonra örnekler jel yükleme tamponu Brom Fenol Blue ile boyanarak kuyucuklara yüklendi ve elektroforez işlemi 90 V'da 30 dakika elektrik akımı verilerek yapılmıştır.
5. Daha sonra ultraviyole (UV) Görüntüleme Sisteminde bant gözlemlenmesi yapılarak görüntülenmiştir.

3.2.12. RNA'nın kantitatif tayini

İzole edilen RNA'ların kantitatif analizi Nanodrop Spektrofotometre ile (OD₂₆₀ ve OD₂₈₀ nm'de) ölçüm yapılmıştır. RNA preparasyonlarının yaklaşık saflığını 260 ve 280 nm'deki absorbanların oranıyla (A_{260}/A_{280}) kontrol edilmiştir.

3.2.13. RT-PCR (reverse transkriptaz) ile cDNA sentezi

SuperScript™ III RT kiti ile cDNA protokolü aşağıda verilmiştir.

İzole edilen RNA'lar udrop Plate nanodrop spektrofotometre ile ölçülerek cDNA sentezinde kullanılacak konsantrasyonları hesaplanmıştır.

1. Elde edilen izole mRNA örnekleri buz üzerinde 5 dakika tutularak çözündürüldü. Daha sonra santrifüj yapılmıştır.
2. Kullanılacak olan kimyasallarla birlikte hacim 13 µl olacağı için 0,2 ml'lik PCR tüpleri kullanılmıştır.
3. PCR tüpü'ne 1 µl 50 µM Oligo dT₂₀, 1 µl 10 mM dNTP Mix (pH=7.0 olan dATP, dGTP, dCTP ve dTTP'nin her birinden 10 mM), 11-x µl ddH₂O ve 1mg total RNA'dan x µl konularak hafif pipetaj yapılmıştır (Toplam örnek miktarı 13 µl olacağı için ddH₂O miktarı 11-x µl'dir).
4. Hazırlanan karışım 65°C'de 5 dakika ısıtıldı ve buz üzerinde en az 1 dakika inkübe edilmiştir.
5. Daha sonra kısa süreli (5-10 saniye) santrifüj yapılmış ve üzerine 4 µl 5xFirst-Strand Buffer 1 µl, 0.1 M DTT, 1 µl SuperScript III RT (200 units/µl) ve 1 µl RNAase OUT™ eklenerek tekrar yavaşça pipetaj yapılmıştır.
6. 50°C'de 45 dakika inkübasyonu takiben 70°C'de 15 dakika tekrar inkübe edilecektir. cDNA sentezi bu şekilde tamamlandı ve -20°C'de muhafaza edilmiştir.
7. cDNA sentezi tamamlandıktan sonra örnekler -20°C de saklanmıştır.
8. Sentezlenen cDNA'nın kontrolü RT-PCR ile sentezlenen cDNA'lar referans gen olarak kullanılacak Beta Aktin (GenBank erişim numarası AF057040.1) gen bölgesine spesifik primerlerle PCR'da kontrol edildi. Elde edilen PCR ürünü agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve görüntüleme sisteminde fotoğraflandırılarak değerlendirilmiştir.

3.2.15. Genlere spesifik primer ve TaqMan prob dizaynı

Primer dizaynını yapmak için National Center for Biotechnology Information (NCBI) databazı kullanılmıştır. Sanal ortamda Chrome tarayıcısı kullanılarak (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) adresine gidilerek organizma seçilmiştir. İstenilen baz dizilimine ulaşıp değerlendirilmeye alınmıştır. Chrome tarayıcısı kullanılarak primer dizayn programı (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) kullanılarak genlerim maksimum 60-15 bp lik kısmına spesifik primerler oluşturulmuştur. Primerlerin ilgili bölgeye spesifiklikleri <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> kullanılarak kontrol edilmiştir.



Çizelge 3.5. Gökkuşığı alabalığında kullanılan genlere ait primer ve prob lar, dizilim bilgileri, ürün uzunluğu ve genbank erişim numaraları

Gen		Primer ve Prob	Sekans (5'→3')	Ürün Uzunluğu (bp)	Genbank Erişim No	Kaynak
GST		Forward	TGGCTGACGTTATTGTCTTCC	112 bp	NM_001160559.1	Aksakal 2015 (Yanyınlanmayan veri)
		Reverse	CTGGGTCTGTCCTTCACCATA			
		Prob	FAM_ CGGCGCGTTACCCCAA ACTG _TAMRA			
β-Actin		Forward	TGGCCGTACCACCGGTAT	79 bp	AF254414	Johansen and Overturf (2005)
		Reverse	GCAGAGCGTAGTCCTCGTAGATG			
		Prob	Cy5_ CTCCGGTGACGGCGTGACCC _BQ2			

3.2.16. Real time PCR uygulamaları

Gen ekspresyonunun kantitatif tayini Qiagen Rotor GeneQ marka Real-Time PCR cihazı kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen cDNA'lar üzerinde ilgili genlere ait bölgelerin amplifikasyonu TaqMan prob iki primer arasındaki bölgeye bağlanacak şekilde tasarlanmıştır. Bu yöntemde 5' ucunda flouresan işaretli Reporter ve 3' ucunda da Quencher boya kullanılmıştır. Reaksiyon esnasında serbest kalan reporter boya ışınım yapar. Bu ışınım, her döngüde kopan prob sayısı ile orantılı olarak artmaktadır. Böylece oluşan ürünün miktarı kantitatif olarak ölçülmektedir.

PCR işlemi 25 µl lik hacimlerde gerçekleştirilmiş olup 1 µl forward ve reverse primer, 0,5 µl TaqMan prob ve 12,5 µl FastStart TaqMan Probe Master (Applied Biosystems), 4 µl ddH₂O, cDNA 5 µl içerir.

3.2.17. Gen ekspresyon sonuçlarının analizi ve değerlendirilmesi

Real-Time PCR verileri, kontrol grubu ve kontrol genine karşı hedef genin ekspresyonundaki değişimin belirlendiği efficiency ($E^{(-\Delta\Delta Ct)}$) (Pfaffl 2001) metoduna göre analiz edilmiştir.

$$\text{Hedef Gen Oranı} = \frac{E_{\text{hedef gen}}^{\Delta CP \text{ hedef (kontrol-örnek)}}}{E_{\text{referans gen}}^{\Delta CP \text{ referans(kontrol-örnek)}}$$

3.2.18. İstatistiki analizler

Araştırma sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS 22 paket programı kullanılmıştır. Veriler One-way ANOVA testine tabi tutulmuş, örnekler arasındaki farklılıklar Duncan's çoklu karşılaştırma testine tabi tutularak değerlendirilmiştir. Sonuçlar ortalama ± standart hata şeklinde verilerek analiz edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

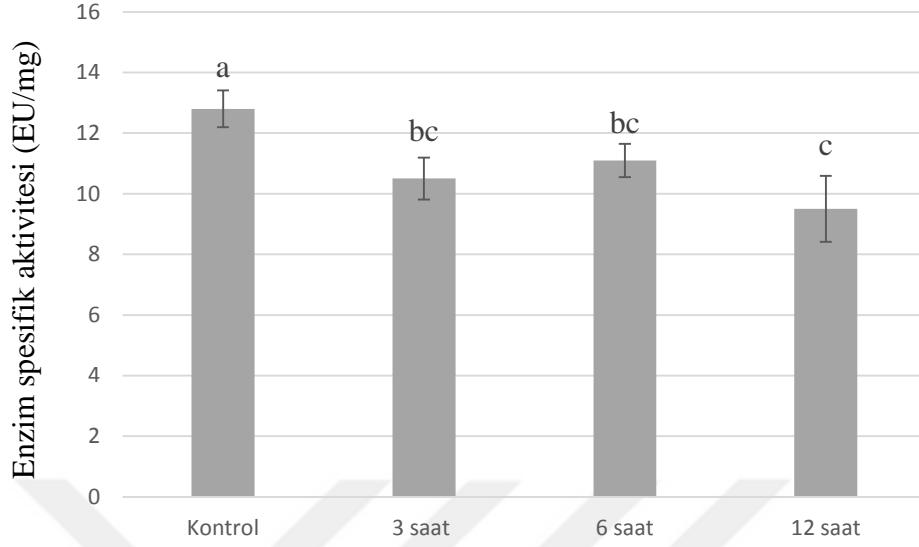
4.1. Glutasyon S-Transferaz enzimi aktivite sonuçları

Çizelge 4.1. Glutasyon S-Transferaz kolon istatistiği sonuçları

	Enzim spesifik aktivitesi (EU/mg)
Kontrol Grubu	12,8±0,6 ^a
3. saat	10,5±0,7 ^{bc}
6. saat	11,2±0,5 ^{bc}
12. saat	9,5±1,1 ^c

Her bir parametre için farklı harflerle işaretlenmiş ortalamalar birbirinden farklı olan grupları göstermektedir, $p<0,05$. $n=7$

Kontrol grubu balıkların karaciğer dokularındaki glutasyon s transferaz enzimi aktivitesi 12,8±0,6 EU/mg olarak bulunmuştur. Oksitetrasiklin uygulanan grupta ise sırasıyla üç, altı ve 12 saatlerdeki enzim aktivite seviyeleri sırasıyla 10,5±0,7 EU/mg, 11,2±0,5 EU/mg, 9,5±1,1 EU/mg bulunmuştur. Bunlardan en düşük enzim aktivitesi 12. Saatde tespit edilirken en yüksek enzim aktivitesi ise kontrol grubunda görülmüştür. Kontrol grubuyla kıyaslandığında 12 saatteki enzim aktivitesi değerlerinde çok önemli ($p<0,001$) bir düşüş olduğu gözlenirken, altıncı ve üçüncü saatteki düşüşün ise önemli ($p<0,05$) olduğu görülmüştür. Sadece deneme grupları karşılaştırma yapıldığında altıncı ve üçüncü saat ile 12 saat arasındaki farkın önemli ($p<0,05$) üç ve altıncı saatler arasındaki farkın ise istatistiki olarak önemsiz olduğu görülmüştür.



Şekil 4.1. Glutasyon S-transferaz enzim aktivitesinin kontrol ve muamele grubu sonuçlarının karşılaştırılması

GST farklı kimyasalların ve endojenik reaktif bileşiklerin detoksikasyonuna birincil bir rol oynarlar (Sherratt and Hayes 2001). Şekil 4.1’de oksitetrasiklin uygulamasını takiben üçüncü saatten itibaren GST aktivitesinin azaldığı görülmektedir. Literatürde sonuçlarımızı destekleyen yönde veriler olduğu gibi bunun tersine çalışmalarda mevcuttur.

Elia *et al.* 2014 yaptığı çalışmada sazan balığına uyguladığı oksitetrasiklin’in Karaciğerde Süperoksit düsmutaz, katalaz glutasyon peroksidaz, glutasyon redüktaz ve glutasyon enzim aktivitesini önemli derecede düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızın aksine Glutasyon s-transfeaz ve MDA aktivitesinde ise artış olduğunu bulmuşlardır.

Oliveira *et al.* 2013 10 mg/lt oksitetrasiklin banyosu uyguladıkları zebra balıklarında GST aktivitesinde artış tespit ederken 100 ve 150 mg/lt dozunda düşüş olduğunu belirtmişlerdir. Bu araştırmaya benzer olarak, WenNa *et al.* 2010 japon balıklarıyla yaptıkları bir çalışmada düşük konsantrasyonlu oksitetrasiklin banyosunda GST

aktivitesinde artış tespit ettiklerini, yüksek konsantrasyonlarda ise düşüş olduğunu bildirmişlerdir.

Başka bir çalışmada ise, Özcan ve Sarıyyüpoğlu 2013 oksitetrasiklin verilen balıklarda kontrol grubu ile deneme saatleri arasında GST seviyesinde azalmalar görüldüğünü bildirmişlerdir. Yine benzer bir şekilde Banni *et al.* 2015 oksitetrasiklinin GST aktivitesinde azalmaya sebep olduğunu söylemişlerdir.

Tetrasiklinlerin reaktif oksijen türlerini nasıl etkilediği ile ilgili mekanizmalar tam olarak bilinmemekle birlikte, Asha *et al.* 2007 tetrasiklinin sıçanların karaciğer ve pankreaslarında, antioksidant enzimler ve GSH seviyesini düşürerek, önemli oksidatif stres oluşturduğunu bildirmişlerdir. GST'ler GSH'ı substrat olarak kullanarak hücreden ROS detoksifikasyonunu katalize ederler (Budak *et al.* 2014b). Oksitetrasiklinin oral yolla uygulanmasından sonraki bir ila üçüncü saatten itibaren, oksitetrasiklin konsantrasyonu serum tepe noktasına ulaşmaktadır (Özaras vd 2002). Buna bağlı olarak GST aktivitesinin, muhtemelen karaciğerdeki yoğun GSH tüketimine bağlı olarak azaldığı düşünülmektedir.

4.2. Total RNA izolasyon Sonuçları

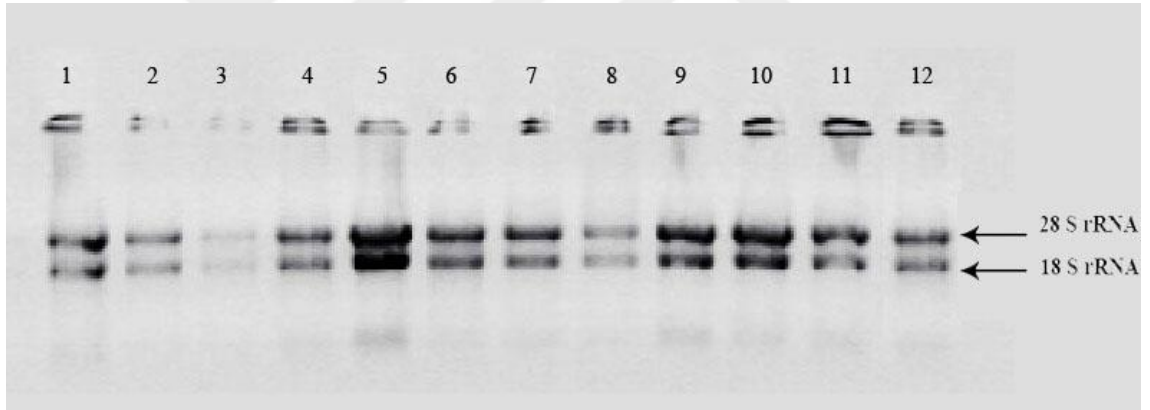
Çizelge 4.2'de RNA'nın 260/280 absorbasns oranları görülmektedir.

Örneklerden elde ettiğimiz RNA izolasyonunun saflık sonuçları 2,0'a yakın olması saflık derecelerinin kabul edilebilir düzeyde olduğunu göstermektedir.

Total RNA örneklerinin elektroforez de yürütme sonucunda 18s rRNA ve 28s rRNA bantları elde edilmiştir (Şekil 4.2).

Çizelge 4.2. Total RNA konsantrasyonları (ng/μl) ve A₂₆₀ / A₂₈₀ (nm) oranları

		KARACİĞER	
		Konsantrasyon (ng/μl)	Safılık A ₂₆₀ / A ₂₈₀ (nm)
Kontrol Grubu	1	2352	2,98
	2	2447	2,13
	3	2015	2,97
3. Saat	1	2447	2,57
	2	2640	2,93
	3	2377	2,08
6. Saat	1	2624	2,83
	2	2611	2,96
	3	2652	2,85
12. Saat	1	2650	2,06
	2	2660	2,06
	3	2517	2,84

**Şekil 4.2.** İzole edilen RNA'ların agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri

4.3. Glutatyon S-Transferaz gen ekspresyonu

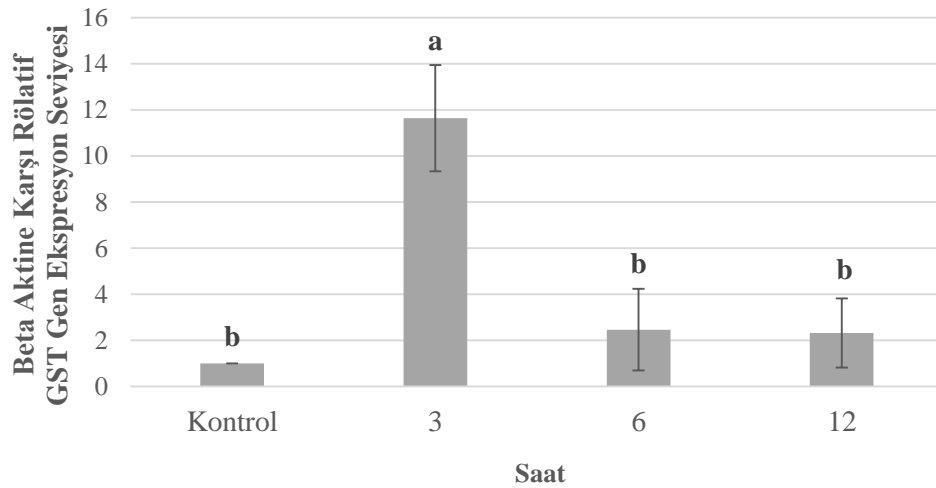
Araştırmada oksitetrasikline maruz bırakılan Gökkuşığı alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) farklı saatlerde alınan karaciğer dokularında gen ekspresyon seviyelerine bakılmıştır (Şekil 4.3). Oksitetrasikline maruz bırakılmayan grup kontrol grubu olarak belirlenmiştir. Oksitetrasiklin uygulandıktan sonraki üç, altı ve 12 saatlerde alınan örnekler deneme grupları olarak kullanılmıştır.

Kontrol grubu balıkların karaciğer dokularındaki glutatyon s transferaz gen ekspresyon seviyesi 1 ± 0 olarak kabul edilmiştir. Oksitetrasiklin uygulanan grupta ise sırasıyla üç, altı ve 12 saatlerdeki gen ekspresyon seviyeleri sırasıyla $11,635\pm 2,30$ ng/ml, $2,4\pm 1,7$ ng/ml, $2,3\pm 1,5$ ng/ml bulunmuştur. En düşük gen ekspresyon seviyesi 12 saatte tespit edilirken en yüksek gen ekspresyonu üçüncü saatde görülmüştür. Kontrol grubuyla kıyaslandığında üç saatteki gen ekspresyon seviyesinde ($p<0,001$) çok önemli bir yükseliş olduğu gözlenirken altıncı ve 12 saatler arasındaki fark önemsizdir.

Çizelge 4.3. β -AKTİN'e karşı rölatif GST gen ekspresyonu seviyesi sonuçları

	Gen ekspresyon oranı
Kontrol Grubu	1 ± 0^b
3. Saat	$11,635\pm 2,30^a$
6. Saat	$2,460\pm 1,77^b$
12. Saat	$2,321\pm 1,50^b$

*Her bir parametre için farklı harflerle işaretlenmiş ortalamalar birbirinden farklı olan grupları göstermektedir, $p<0,05$. $n=3$



Şekil 4.3. Oksitetrasiklin verilen balıklardan farklı saatlerde alınan gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) karaciğer dokusunun GST mRNA seviyesi

Şelik 4.3'ten de görüleceği üzere oksitetrasiklinin serum tepe noktasına eriştiği üçüncü saatte gen ekspresyon seviyesi de en üst seviyeye ulaşmıştır. Daha sonraki dönemlerde serum yarılanma ömrü olan 12. Saate doğru gen ekspresyon seviyelerinin de normale dönmeye başladığı anlaşılmaktadır.

Literatürde oksitetrasiklin ve GST gen ekspresyonu üzerindeki etkisine dair kaynaklara rastlanamamıştır. Fakat farklı maddelerin GST gen ekspresyonuyla ilişkisi üzerine makaleler mevcuttur.

Li *et al.* 2015 tributyltine maruz kalan sazanlarda karaciğerde oksidatif strese bağlı olarak GST mRNA ekspresyon düzeylerinde artış görüldüğünü bildirmiştir. Bir başka çalışmada ise Ku *et al.* 2014, triclosana maruz bırakılan sarı kedi balıklarında (*Pelteobagrus fulvidraco*) GST mRNA ekspresyon seviyelerinde artış olduğunu tespit etmişlerdir. Gutiérrez *et al.* 2013 ise Cylindrospermopsin uygulanan Tilapialarda (*Oreochromis niloticus*) GST mRNA ekspresyon seviyelerinde yükselme olduğunu rapor etmiştir.

mRNA seviyeleriyle enzim aktivite değerleri arasında her zaman korelasyon olmadığı farklı yazarlarca belirtilmiştir (Olsvik *et al.* 2005; Craig *et al.* 2007; Jin *et al.* 2010). Bu çalışmalarla sonuçlarımız uyum göstermektedir.

Oksitetrasiklinin serum tepe noktasına ulaştığı üçüncü saatte GST gen ekspresyonunu sitümleri ettiği, serum konsantrasyonunun düşmeye başladığı takip eden saatlerde ise GST gen ekspresyonu seviyelerinin azaldığı görülmüştür. Buna aşırı GSH tüketimine bağlı GST aktivitesindeki düşüşün sebep olduğu düşünülmektedir. Zira farklı kaynaklarda da belirtildiği üzere düşük oksitetrasiklin dozlarında GST enzim aktivitelerinde yükselmeler olduğu rapor edilmiştir (Asha *et al.* 2007; Elia *et al.* 2014).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Oksitetrasiklin antibiyotiğinin yüksek konsantrasyonlarında GST gen ekspresyonunu sitümile ettiği, ROS detoksifikasyon mekanizmasında GST'nin substratı olarak kullanılan GSH'ın aşırı tükertimine bağlı olarak GST enzim aktivitesinde akut bir düşüşe rastlanmıştır.

GST gen ekspresyonunu seviyeleriyle enzim aktivite değerleri arasında bir korelasyon olmadığı fikrine varılmıştır.

Bu mekanizmanın daha iyi aydınlatılması için farklı konsantrasyonlardaki oksitetrasiklin dozlarının da denenmesinin uygun olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Akşit, D., Kum, C., 2008. Gökkuşığı Alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)'nda sık görülen patojen mikroorganizmaların tespiti ve antibiyotik duyarlılık düzeylerinin belirlenmesi. YYÜ Veteriner Fakülte Dergisi 19(1): 1-7.
- Andersson, C., Soderstrom, M., Mannervik, Biochem B.J., 1988. 249, 819-823.
- Anonim, 2015a. <http://www.tarim.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/BSGM.pdf> (01.08.2015).
- Anonim, 2015b. <http://www.tarim.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/BSGM.pdf> (01.08.2015).
- Anonymous, 1997a. GESAMP (IMO/FAO/UNESCO/IOC/WMO/WHO/IAEA/ UN/ UNEP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection). Towards safe and effective use of chemicals in coastal aquaculture. Reports and Studies, GESAMP. No. 65. Rome, FAO. p: 40.
- Anonymous, 2007a. GESAMP (IMO/FAO/UNESCO-IOC/WMO/WHO/IAEA/UN/ UNEP) Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection). Towards safe and effective use of chemicals in coastal aquaculture. Reports and Studies, GESAMP. No. 65. Rome, FAO. p: 40.
- Anonymous, 2007b. <https://en.wikipedia.org/wiki/Oxytetracycline#/media/File:Oxytetracycline-2D-skeletal.png>
- Anonymous, 2007c. <https://en.wikipedia.org/wiki/Oxytetracycline#/media/File:Oxytetracycline-3D-balls.png>
- Anonymous, 2007d. https://en.wikipedia.org/wiki/Glutathione_S-transferase#/media/File:GST-wiki.jpg
- Anonymous, 2015a. https://en.wikipedia.org/wiki/Trout#/media/File:Rainbow_Trout.jpg
- Anton E.P., Johannes B.G., Arne Vander, J.M., Gerard, J., 1990. Biochemistry., 265, 47-54.
- Arı, F., Dere, E., 2003. Benzen'in Karaciğer Glutatyon S-transferaz Enzim Aktivitesine In Vitro Etkisi. Fen Bilimleri Dergisi, 24(1).
- Arrick B.A., Nathan C.F., 1984. Glutathion metabolism as a determinant of the therapeutic efficacy. Cancer Res; 44:4224- 32.
- Asha, K. K., Sankar, T. V., and Nair, P. G., 2007. Effect of tetracycline on pancreas and liver function of adult male albino rats. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 59(9), 1241-1248.
- Aydın, F., 2004. Alabalık Biyolojisi ve Yetiştirme Teknikleri. A.Ü. Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü. 06110 Ankara.
- Aydın, F., Köksal, G., Demir, N., Bekcan, S., Kırkağaç, M., Gözğözoğlu, E., Erbaş, S., Deniz, H., Maltaş, Ö., Arpa, H., 2005. Su Ürünleri Yetiştiriciliği ve Politikalar. Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongresi, S.791.
- Aydın, M., Karadurmuş, U., 2012. Consumer behaviours for sea food in ordu province. Yunus Araştırma Bülteni, (3):18-23.

- Balta, F., Serezli, R., Kayış, Ş., Akhan, S., ve Yandı, İ. 2005. Gökkuşluğu Alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) Oksitetrasiklin HCl'nin nötrofillerin fagositik aktivitesine ve bazı kan parametrelerine etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi, 1, 7-11.
- Banni, M., Sforzini, S., Franzellitti, S., Oliveri, C., Viarengo, A., and Fabbri, E., 2015. Molecular and cellular effects induced in *Mytilus galloprovincialis* treated with oxytetracycline at different temperatures. PloS one, 10(6), e0128468.
- Baydan, E., Yurdakök, B., Aydın, F.G., 2012 Antibiotic Use in Fish Türkiye Klinikleri J Vet Sci;3(3):45-52.
- Behnke, R. J., 1992. Native trout of western North America. American Fisheries Society monograph USA. no. 6.
- Berhane, K., Widersten, M., Engstrom, A., Kozarich, J. W., and Mannervik, B., 1994. Detoxication of base propenals and other alpha, beta-unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases. Proc Natl Acad Sci U S A, 91(4), 1480-1484.
- Björklund, H. V., Raberg, C. M., Bylund, G., 1991. Residues of oxolinic acid and oxytetracycline in fish and sediments from fish farms. Aquacult. 97: 85-96.
- Björklund, H.V., 1991. Oxytetracycline and oxolinic acid as antibacterials in aquaculture-analysis, Pharmacokinetics and environmental impacts. Academic Disertation. Department of Biology Abo Akademi University. Abo, Finland. 1-4p.
- Bohl, M., 1982. Zucht und Produktion von Süßwasserfischen. DLG-Verlag. 336s. Frankfurt (Main).
- Boyer, T.D., 1989. The Glutathione S-transferases: An Update Hepatology, 9 (3), 486-96.
- Bruno D.W., Poppe, T.T., 1996. A colour atlas of salmonid diseases. Academic Press Ltd.;194. London.
- Budak, H., Gonul, N., Ceylan, H., and Kocpinar, E. F., 2014b. Impact of long term Fe 3+ toxicity on expression of glutathione system in rat liver. Environmental toxicology and pharmacology, 37(1), 365-370.
- Budak, H., Kocpinar, E. F., Gonul, N., Ceylan, H., Erol, H. S., and Erdogan, O., 2014a. Stimulation of gene expression and activity of antioxidant related enzyme in Sprague Dawley rat kidney induced by long-term iron toxicity. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, 166, 44-50.
- Capone, D.G., Weston, D.P., Miller, V., Shoemaker, C., 1996. Antibacterial residues in marine sediments and invertebrates following chemotherapy in aquaculture. Aquacult. 145: 55-75.
- Cnubben N.H.P., Rietjens I.M.C.M., Wortelboer H., Zanden J., Bladeren P.J., 2001. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. Environmental Toxicology and Pharmacology. 10:141-152.
- Compoti M., 1987. Glutathione depleting agents and lipid peroxidation in the aging rat. Com Biochem Phys. 88:177- 180.
- Coşkun, F., Patrona, K., Metin, A., 2014. Su Ürünleri Yetiştiriciliği Sektör Raporu, Ankara.

- Craig, P.M., Wood, C.M., McClelland, G.B., 2007. Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Compar. Physiol.* 293, 1882–1892
- Cravedi, J. P., Chouber, G., Delous, G., 1987. Digestibility of chloramphenicol, fresh water fish farm: influence of effluent treatment systems. *Aquacult.* 120: 319-325.
- Çelikkale, M.S., 1994. İçsu Balıkları ve Yetiştiriciliği. Cilt, I. K.T.Ü. Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi. Yayın No: 2. 419 s, Trabzon.
- Çiltaş, A.K., 2000. *Stenotrophomonos malthophilia*, *Brevibacillus agri*, *Micrococcus lylae* suşlarının patojenitesi ile gökkuşağı alabalığı üzerinde oluşturulan enfeksiyonların laboratuvar ve klinik yönden araştırılması. Doktora Tezi, A. Ü. Fen Bil. Enst., Erzurum.
- Dağdelen, B., 2015. İnflamasyonun oksidatif stres üzerine etkisinin fare böbrek dokusunda transkriptomik ve proteomik seviyede araştırılması. Y.lisans tezi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Erzurum
- Durmaz, Y., 2015. Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Balıklarda *Flavobacterium Psychrophilum* İnfeksiyonları.
- Elia, A. C., Ciccotelli, V., Pacini, N., Dörr, A. J. M., Gili, M., Natali, M., and Abete, M. C., 2014. Transferability of oxytetracycline (OTC) from feed to carp muscle and evaluation of the antibiotic effects on antioxidant systems in liver and kidney. *Fish physiology and biochemistry*, 40(4), 1055-1068.
- Gagneux, P., Varki, A., 1999. Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. *Glycobiology*, 9 (8): 747–755.
- Gever, P., 2010. Oksitetrasiklin Uygulanan Gökkuşağı Alabalığı (*Oncorhynchus Mykiss* Walbaum, 1792)'nda Solungaçların Histolojik Yönden İncelenmesi. Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, 17s, Elazığ.
- Goodman, A., Gilman, A.G., 1980. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 7rd Ed., 1638.
- Grondel, J. L., Nouws ,R.V., Dejong, M., Schutte, R., Driessens, F.,1987. Pharmacokinetics and tissue distribution of oxytetracycline in carp, *Cyprinus carpiol* , following different routes of adminastration, *Journal Of Fish Diseases* , 10 :153-163.
- Gutiérrez-Praena, D., Jos, A., Pichardo, S., Puerto, M., and Cameán, A. M., 2013. Influence of the exposure way and the time of sacrifice on the effects induced by a single dose of pure *Cylindrospermopsis* on the activity and transcription of glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase enzymes in *Tilapia* (*Oreochromis niloticus*). *Chemosphere*, 90(3), 986-992.
- Gündüz, T., Arısoy, A., Algün, Ü., ve Özbakkaloğlu, B., 2004. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının aminoglikozidlere in-vitro duyarlılıkları. *ANKEM Derg*, 18(4), 224-227.
- Gürtürk, S., Schlotfeldt, H. J., Burgu, İ., 2009. A. Ü. Veteriner Fakültesi Viroloji Kürsüsü Balık Hastalıkları-Kültür Balıkçılığında Yemleme-Kasetlerde Balık Yetiştiriciliği Balıklarda Bakteri-Parazit Ve Mantar Hastalıkları, 223s, Ankara.
- Habig H.W., Pabst J.M., Jakoby W.B., *J. Biological Chemistry* 1974. 249 (22), 7130-7139.

- Hansen, P. K., Lunestad, B. T., Samuelsen, O. B., 1992. Effects of oxytetracycline, oxolinic acid and flumequine on bacteria in an artificial marine fish farm sediment. *Can. J. Microbiol.* 38: 1307-1312.
- Inglis, V., 2000. Antibacterial chemotherapy in aquaculture: review of practice, associated risks and need for action. In Report and proceedings of the SEAFDEC/FAO/CIDA meeting 63 on the use of chemicals in aquaculture in Asia, 20-22 May 1996, Iloilo, Philippines. Iloilo, Philippines, Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center. p: 7-22.
- Jin, Y., Zhang, X., Shu, L., Chen, L., Sun, L., Qian, H., and Fu, Z. 2010. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 78(7), 846-852.
- Johansen, K.A., Overturf, K., 2005. Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar. Biotechnol.* 7, 576–587.
- Karagianni, P., Rallis, D., Fidani, L., Porpodi, M., Kalinderi, K., Tsakalidis, C., and Nikolaidis, N., 2013. Glutathion-S-Transferase P1 polymorphisms association with broncopulmonary dysplasia in preterm infants. *Hippokratia*, 17(4), 363-367.
- Kayaalp, O., 1991. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. Cilt 1 Feryal Matbaa, Ankara 1068s.
- Keha E, Küfrevioğlu Öİ., 2002. Biyokimya, Aktif yayınevi, Erzurum.
- Ku, P., Wu, X., Nie, X., Ou, R., Wang, L., Su, T., and Li, Y., 2014. Effects of triclosan on the detoxification system in the yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*): Expressions of CYP and GST genes and corresponding enzyme activity in phase I, II and antioxidant system. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 166, 105-114.
- Leitritz, E., Lewis R.C., 1980. Trout and salmon culture (hatchery methods). California Fish Bulletin Number 164, Oakland, California, USA.
- Leninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., 2000. Principles of Biochemistry. 2nd edn., Worth Publishers Inc., Newyork,; 558-560.
- Li, Z.H., Li, P., and Shi, Z.C., 2015. Responses of the hepatic glutathione antioxidant defense system and related gene expression in juvenile common carp after chronic treatment with tributyltin. *Ecotoxicology*, 24(3), 700-705.
- Malvisi, J., Rocca, G.D., Anfossi, P. and Giorgetti, G., 1996. Tissue distribution and residue depletion of oxytetracycline in sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) oral administration, *Aquaculture*, 147: 159-168.
- Mitchell, J.B., and Russo, A. 1987. The role of glutathione in radiation and drug induced cytotoxicity. *The British journal of cancer. Supplement*, 8, 96.
- Oliveira, R., McDonough, S., Ladewig, J.C., Soares, A.M., Nogueira, A.J., and Domingues, I., 2013. Effects of oxytetracycline and amoxicillin on development and biomarkers activities of zebrafish (*Danio rerio*). *environmental toxicology and pharmacology*, 36(3), 903-912.
- Olsvik, P.A., Kristensen, T., Waagbø, R., Rosseland, B.O., Tollefsen, K.E., Baevefjord, G., Berntssen, M.H., 2005. mRNA expression of antioxidant enzymes (SOD, CAT and GSH-Px) and lipid peroxidative stress in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to hyperoxic water during smoltification. *Comp. Biochem. Phys. C* 141, 314–323.

- Özaras, R., Tabak, F., Öztürk, R., 2002. Antibiyotikler III. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar. Sempozyum Dizisi, s. 55-82
- Özcan, M., Sarıeyyüpoğlu, M., 2013. Elazığ İlindeki Bazı Alabalık İşletmelerinde İzole Edilen *Flavobacterium psychrophilum*'un Antibakteriyel Duyarlılıklarının İncelenmesi. Yunus Araştırma Bülteni, (2).
- Özdemir, E., 2010. Gökkuşluğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus Mykiss* Walbaum 1792) Bazı Antibiyotik Kalıntılarının Saptanması. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 8s, Ankara.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9):2003-2007.
- Puchalski, R.P., Fahl W.E., 1990. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87,2443-2447.
- Samuelsen, O. B., Lunestad, B. T., Evrik, A., Fjeldes, S., 1994. Stability of antibacterial agents in an artificial marine aquaculture sediment studied under laboratory conditions. *Aquacult.* 126: 283-90.
- Samuelsen, O. B., Lunestad, B. T., Husevag, B., Holleland, T., Evrik, A., 1992. Residues of oxolinic acid in wild fauna following medication in fish farms. *Dis. Aquat. Org.* 12:111-119.
- Samuelsen, O. B., 1989. Degradation of oxytetracycline in seawater at two different temperatures and light intensities, and the persistence of oxytetracycline in the sediment from a fish farm. *Aquaculture*, 83(1), 7-16.
- Samuelsen, O.B., Solheim, E., Lunestad, B.T., 1991. Fate and microbiological effects of furazolidone in a marine aquaculture sediment. *Sci. Tot. Environ.* 108(3): 275-83.
- Savaş H., Türe M., 2007 Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Yunus Araştırma Bülteni, 7:2
- Sherratt, P. J., and Hayes, J. D., 2001. 9 Glutathione S-transferases. Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics, 319.
- Smith, P., 1996. Is sediment deposition the dominant fate of oxytetracycline used in marine salmonid farms: a review of available evidence. *Aquacult.* 146: 157-69.
- Smith, P., Donlon, J., Coyne, R., Cazabon D. J., 1994. Fate of oxytetracyclin in a fresh water fish farm: influence of effluent treatment systems. *Aquaculture*, 120(3), 319-325.
- Steffens, W., 1981. *Moderne Fischwirtschaft*. Verlag J. Neumann-Neudamm. 375 s, Melsungen. Berlin. Basel. Wien.
- Tan, S., Seki, Z., Akbulut, M., 2014. Doğal Kaynakların Kullanımı ve Sürdürülebilirliği Açısından Su Ürünleri Sektörünün Mevcut Durumu ve Swot Analizi. Türkiye tr22 bölgesi örneği. *Girişimcilik ve Kalkınma Dergisi* (9:1)
- WenNa, M., ShuYing, L., XiaoRong, W., and ShiXiang, G., 2010. Antioxidant responses in liver of goldfish under oxytetracycline exposure. *Journal of Agro-Environment Science*, 29(5), 833-838.
- Yanık, T., 2009. Gökkuşluğu Alabalığı ve Alabalıkların Morfolojik Özellikleri Arazi Çalışmaları. Doğal Alabalık Çalıştayı Sürdürülebilir Yetiştiricilik, Koruma Ve Balıklandırma, Trabzon

- Yonar, M. E. 2012. The effect of lycopene on oxytetracycline-induced oxidative stress and immunosuppression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, W.) Fish and shellfish immunology, 32(6), 994-1001.
- Yonar, M. E., Yonar, S. M., Silici, S., 2011. Protective effect of propolis against oxidative stress and immunosuppression induced by oxytetracycline in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, W.). Fish and shellfishim.
- Ziegler, DM., 1985. Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation. Ann Rew Biochem; 54:305-2229.



ÖZGEÇMİŞ

29.08.1991 yılı Bursa'nın İznik ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Kadir Koyutürk İlköğretim okulunda tamamladı. 2009 yılında İznik Şehit Sedat Pelit Lisesinden mezun oldu. 2009-2013 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji bölümünü bitirip aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalında yüksek lisans eğitimine başlamıştır.

