

***CYPRINUS CARPIO*'DA İMİDACLOPRİD'İN OLUŞTURACAĞI
OKSİDATİF STRESE KARŞI FERULİK ASİT'İN KORUYUCULUK
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖNDER ŞAHİN

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SU ÜRÜNLERİ
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
2019**

***CYPRINUS CARPIO*'DA İMİDACLOPRİD'İN OLUŞTURACAĞI
OKSİDATİF STRESE KARŞI FERULİK ASİT'İN KORUYUCULUK
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖNDER ŞAHİN

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

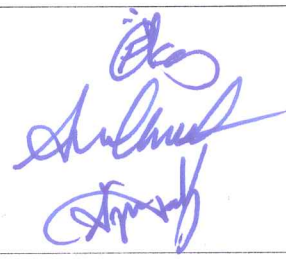
**SU ÜRÜNLERİ
ANABİLİM DALI**

**Danışman
Prof. Dr. Ferbal ÖZKAN YILMAZ**

**MERSİN
AĞUSTOS - 2019**

ONAY

Önder ŞAHİN tarafından Prof. Dr. Ferbal ÖZKAN YILMAZ danışmanlığında hazırlanan "Cyprinus carpio'da İmidacloprid'in Oluşturacağı Oksidatif Strese Karşı Ferulik Asit'in Koruyuculuk Etkisinin Araştırılması" başlıklı bu çalışma aşağıda imzalan bulunan jüri üyeleri tarafından 28 /08 /2019 tarihinde yapılan Tez Şavunma Sınavı sonucunda oy birliği ile Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Unvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Prof. Dr. Ferbal ÖZKAN YILMAZ	
Üye	Prof. Dr. Arzu ÖZLÜER HUNT	
Üye	Doç. Dr. Argun Akif ÖZAK	

Yukarıdaki jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 20/09/2019 tarih ve 26/1408 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
 - Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
 - Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
 - Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi
- beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

28/08/2019

Önder ŞAHİN

ÖZET

CYPRINUS CARPIO'DA İMİDACLOPRİD'İN OLUŞTURACAĞI OKSİDATİF STRESE KARŞI FERULİK ASİT'İN KORUYUCULUK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Bu araştırmada, İmidacloprid'in subletal derişiminin *Cyprinus carpio*'da antioksidan enzim sistemi üzerine etkilerine karşı, yeme katılan ferulik asitin koruyuculuk özelliğı incelenmiştir. Bu amaçla 2,80 mg/L imidocloprid ortam derişimi etkisinde bulunan balıklar ‰5 oranında ferulik asit ilave edilen yem ile beslenmişlerdir. Kontrol grubu, Ferulik asit (FA), imidocloprid (IM), ve IM+FA grublarını içeren bu çalışmada 4. ve 10. günlerde karaciğer ve beyin doku örnekleri alınmıştır. Katalaz (CAT) ve superoksit dismutaz (SOD) enzim aktiviteleri ile malondialdehit (MDA) ve protein karbonil (PCO) düzeyleri spektrofotometrik yöntemler ile belirlenmiştir. İmidacloprid uygulanan grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, Karaciğer ve beyin dokuları CAT aktivitelerinin 4. günde değışim göstermediğı, 10. günde ise arttığı saptanmıştır. IM, her iki dokunun SOD aktivitesinde 4. günde artma, 10. günde azalma yönünde etki yapmıştır. İncelenen dokularda MDA ve PCO düzeyleri deney peryotlarında IM etkisiyle kontrole oranla artmıştır. FA+IM grubunun bireylerinin 4. gün enzim aktiviteleri, IM grubu ile kıyaslandığında istatistiki fark bulunmamıştır. Bununla birlikte 10. günde FA uygulamasının enzim aktivitelerinde ve MDA ile PCO miktarlarında 10. günde iyileştirme etkisi olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Cyprinus carpio*, imidocloprid, ferulik asit, antioksidan sistem

Danışman: Prof. Dr. Ferbal ÖZKAN YILMAZ, Mersin Üniversitesi, Su Ürünleri Anabilim Dalı, Mersin

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE EFFECT OF FERULIC ACID AGAINST OXIDATIVE STRESS CAUSED BY IMIDACLOPRID IN CYPRINUS CARPIO

In this study, the protective effect of ferulic acid in the feed was investigated against the effects of sublethal imidacloprid (IM) concentration on the antioxidant enzyme system in *Cyprinus carpio*. For this purpose, the fish which were affected by 0,28 mg/L imidocloprid medium concentration were fed with feed containing 5 ‰ of ferulic acid. Liver and brain tissue samples were taken at 4th and 10th days in this study, which included control group, ferulic acid (FA), imidocloprid (IM), and IM+FA groups. Catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) enzyme activities and malondialdehyde (MDA) and protein carbonyl (PCO) levels were determined by spectrophotometric methods. In imidocloprid treated group, CAT activities of liver and brain tissues did not change at 4th day but increased at 10th day. Both tissue SOD activities increased on day 4 and decreased on day 10. The MDA and PCO levels in the examined tissues were increased compared to control with IM effect during the experimental periods. FA+IM group did not show statistical difference when compared to IM group on day 4 enzyme activities. However, it was determined that FA application had an effect of improving tissue enzyme activities and MDA and PCO levels on day 10.

Key Words: *Cyprinus carpio*, imidocloprid, ferulic acid, antioxidant system

Advisor: Prof. Dr. Ferbal ÖZKAN YILMAZ, Mersin University, Department of Fisheries, Mersin.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her konuda bilgi ve desteğini almaktan çekinmediğim, araştırmanın planlanmasından yazılmasına kadar tüm aşamalarında yardımlarını esirgemeyen, teşvik eden, aynı titizlikte beni yönlendiren değerli danışman hocam Prof. Dr. Ferbal ÖZKAN YILMAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel çalışmalarım esnasında yardımını ve zamanını esirgemeyen Mersin Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Arzu ÖZLÜER HUNT' a, enzim analizlerinde yardımcı olan Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden Arş. Gör. Metin YILDIRIM' a' teşekkür ederim.

Bu çalışma Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından **2017-2-TP2-2522** no'lu proje ile desteklenmiştir.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
KISALTMALAR ve SİMGELER	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	5
2.1. Imidocloprid Uygulamaları ile Yapılan Araştırmalar	5
2.2. Ferulik Asit ile Yapılan Araştırmalar	10
3. MATERYAL ve YÖNTEM	13
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	13
3.2. Kullanılan Cihazlar	14
3.3. Deney Uygulamaları	14
3.4. Biyokimyasal Analizler	16
3.4.1. Katalaz aktivitesi tayini	16
3.4.2. Superoksit dismutaz aktivitesi tayini	16
3.4.3. Malondialdehid düzeyinin belirlenmesi	17
3.4.4. Protein karbonil düzeyinin belirlenmesi	18
3.4.5. Protein analizi	19
3.4.6. İstatistiksel analizler	20
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	21
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	29
5.1. TARTIŞMA	29
5.2. SONUÇ	33
KAYNAKLAR	35
ÖZGEÇMİŞ	43

TABLÖLER DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 3.1. Deney Akvaryumlarındaki Suyun Bazı Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	15
Tablo 3.2. Malondialdehid Yöntemi	18
Tablo 3.3. Protein Ölçümü	20
Tablo 4.1. <i>C. carpio</i> 'nun karaciğer dokusu CAT aktivitesi (U/mg Protein) üzerine, 2,80 mg/L Imidocloprid ve yeme katılan %0,5 FA uygulamalarının etkileri	21
Tablo 4.2. <i>C. carpio</i> 'nun beyin dokusu CAT aktivitesi (U/mg Protein) üzerine, 2,80 mg/L Imidocloprid ve yeme katılan %0,5 FA uygulamalarının etkileri	22
Tablo 4.3. <i>C. carpio</i> 'nun karaciğer dokusu SOD aktivitesi (U/mg Protein) üzerine, 2,80 mg/L Imidocloprid ve yeme katılan %0,5 FA uygulamalarının etkileri	23
Tablo 4.4. <i>C. carpio</i> 'nun beyin dokusu SOD aktivitesi (U/mg Protein) üzerine, 2,80 mg/L Imidocloprid ve yeme katılan %0,5 FA uygulamalarının etkileri	24
Tablo 4.5. <i>C. carpio</i> 'nun karaciğer dokusu MDA düzeyi (nmol/mg Protein) üzerine, 2,80 mg/L Imidocloprid ve yeme katılan %0,5 FA uygulamalarının etkileri	25
Tablo 4.6. <i>C. carpio</i> 'nun beyin dokusu MDA aktivitesi (nmol/mg Protein) üzerine, 2,80 mg/L Imidocloprid ve yeme katılan %0,5 FA uygulamalarının etkileri	26
Tablo 4.7. <i>C. carpio</i> 'nun karaciğer dokusu PCO (nmol/mg Protein) üzerine, 2,80 mg/L Imidocloprid ve yeme katılan %0,5 FA uygulamalarının etkileri	27
Tablo 4.8. <i>C. carpio</i> 'nun beyin dokusu PCO (nmol/mg Protein) üzerine, 2,80 mg/L Imidocloprid ve yeme katılan %0,5 FA uygulamalarının etkileri	28

KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simge	Tanım
ALT	Alanin amino transferaz
AST	Aspartat amino transferaz
ASS	Antioksidan savunma sistemi
ACP	Asit fosfataz
ALP	Alkalen fosfataz
°C	Santigrat derece
Ca	Kalsiyum
CaCO ₃	Kalsiyum karbonat
cm	Santimetre
Cu ₂ SO ₄ ·5H ₂ O	Bakır(II)sülfat pentahidrat
CuSO ₄	Bakır sülfat
g	Gram
CAT	Katalaz
SOD	Superoksit Dismutaz
GSH-Px	Glutathion peroksidaz
GST	Glutathion S transferaz
GSH	Glutathion
G6PD	Glukoz 6 Fosfat Dehidrojenaz
GDH	Glutamat dehidrojenaz
8-OHdG	8-hidroksi-2-deoksiguanozin
AChE	asetilkolinesteraz
iNOS)	indüklenebilir nitrik oksit sentaz
TNF-α)	Tümör nekrozis faktör-alfa
H ₂ SO ₄	Sülfürik asit
HCl	Hidroklorik asit
kg	Kilogram
L	Litre
LC	Letal konsantrasyon
LPO	Lipid peroksidasyon
LOO·	Lipid peroksil
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
Mg	Magnezyum
Mn	Mangan
MT	Metallothionein
Na	Sodyum
Na ₂ CO ₃	Sodyum karbonat
Na ₂ HPO ₄	Disodyumfosfat
NaH ₂ PO ₄	Sodyum dihidrojenfosfat
Na-K	Tartarat çözeltisi

NaOH	Sodyum hidroksit
NH₃	Amonyak
nm	Nanometre
NO	Nitrik oksit
NO₂	Azot dioksit
O₂	Superoksit
OH	Hidroksil
IM	İmidacloprid
ROT	Reaktif oksijen türleri
ROO	Peroksil
sp.	Tür
SPSS	İstatistik programı
TBARS	Tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri
TCA	Trikloroasetik asit
Triton-X-100	İyonik olmayan, yüzey aktif, organik bir biyolojik deterjan
U	Unit (Birim)
DNPH	2,4-dinitrophenylhydrazine
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TBA	Tiobarbitürik Asit
NBT	Nitroblue Tetrazolium Klorür
BSA	Bovine Serum Albumin
K	Potasyum

1.GİRİŞ

Pestisitler, genellikle zararlı böcekler, yabancı otlar, yumuşakçalar şeklinde olabilecek tarım sektöründeki haşere popülasyonuna karşı kullanılırlar. Tarımda böcek ilacının yaygın olarak kullanılması, bir dizi toksikolojik ve çevresel sorunları ortaya koymaktadır[1]. Pestisitler, genellikle kalıcı olan ve toprak-bitki-gıda veya su-su organizma-gıda gibi biyolojik zincirler yoluyla biyolojik olarak biriktirilebilen, çevrede artan bir şekilde bulunan kirleticilerdir[2].

Bu pestisitler, kimyasalların topraktan transfer edilmesiyle veya doğrudan hedef organizmalara püskürtülmesi yollarıyla su ortamına sulara ulaşabilir ve insanlar için büyük ekonomik önemi olan balık ve karides gibi hedef olmayan organizmaları etkileyebilir[3]. Son yıllarda, pestisitlerin ekolojik ortamda hedef olmayan organizmalar üzerindeki etkileri dünya çapında endişe kaynağı olmuştur [4]. Modern eko-tarımın gelişimi, yalnızca bilimsel gelişme kavramını oluşturmak için nesnel bir gereklilik değil, aynı zamanda tarımda sürdürülebilir kalkınma stratejisini uygulamada kaçınılmaz bir seçimdir[5].

Neonikotinoidler, insektisidlerin son 30 yılda geliştirilen en yeni sınıfı olup tarım zararlılarına karşı mücadelede önem kazanarak organofosforlu, organoklorlu ve piretroid bileşiklerin yerini almaya başlamışlardır. Imidacloprid, neonikotinoid bileşenler sınıfına ait yeni bir insektisittir. İnsektisit olarak dünya üzerinde hızla artan bir kullanıma sahiptir [6]. Imidacloprid (IM), nörotoksik böcek ilacı olup, etki şekli, nikotininkine benzer ve reseptör bölgesi için asetilkolin ile rekabet eder[7]. Çeşitli çalışmalar, imidacloprid hedef olmayan organizmalardan olan balıklarda olumsuz etkilere sahip olduğunu göstermiştir [8-10]. Bununla birlikte, imidacloprid'in balık üzerindeki toksisite etkileri ile ilgili araştırmalar sınırlıdır [11].

Pestisitlerin ve çevresel kimyasalların toksik etkilerinden birisi de serbest radikal oluşumudur. Pestisitler oksidatif stresi uyarak Reaktif oksijen türleri (ROT) üretimini tetiklemekte ve antioksidanlar ve ROT temizleyici enzim sistemlerinde değişikliklere neden olmaktadır[12]. Lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA hasarı gibi pestisit kaynaklı moleküler mekanizmalardan birisidir. Dış kabuğunda bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron bulunan bir molekül, serbest radikal olarak adlandırılır [13]. Serbest radikaller, hidroksil ($\text{OH}\cdot$), süperoksit ($\text{O}_2\cdot$), nitrik oksit ($\text{NO}\cdot$), azot dioksit ($\text{NO}_2\cdot$), peroksil ($\text{ROO}\cdot$) ve lipid peroksil ($\text{LOO}\cdot$) gruplarını içerir. Serbest radikallere genellikle oksidanlar denir ve organizmalarda kolaylıkla serbest radikal reaksiyonlarına neden olabilirler [14]. Reaktif oksijen türleri (ROT) olarak bilinen bu moleküllerin başlıca zararları membran lipitleri (lipit peroksidasyon), DNA ve protein gibi hücresel makromoleküllerin değişmesiyle sonuçlanır[15]. Bu hasarlar yapı değişimi ile hücre ölümüne sebep olacak şekilde biyolojik işlev kaybına yol açabilir ve patofizyolojik durumlar ortaya çıkabilir [16]. Doğrudan veya dolaylı tüm çevresel değişimler, suçul

organizmalarda farklı derecelerde strese neden olarak ROT üretimi ve eliminasyonu arasındaki dengeyi bozabilmektedir [17].

Organizmalarda, reaktif oksijen türlerini (ROT) ve diğer prooksidanları, düşük molekül ağırlıklı serbest radikal gidericiler ve antioksidan enzimlerle sürekli etkisizleştiren bir sistem bulunmaktadır. Reaktif oksijen türlerine karşı hücre içi ve hücre dışı, enzim ve nonenzim (enzim olmayan) savunma mekanizmasına antioksidan savunma sistemi (ASS) denilmektedir. Katalaz (CAT), Süperoksit dismutaz (SOD), serbest radikalleri yok etme yeteneğinde olan enzimatik ASS elemanlarındandır. Diğer omurgalılarda olduğu gibi balıklar da enzimatik ve enzimatik olmayan ASS'ne sahiptirler[18].

Lipidler, serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Lipid peroksidasyonu, çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFAs) oksidatif parçalanma sürecidir[19]. Malondialdehit (MDA) başlıca ve en çok çalışılan bir peroksidasyon ürünüdür. Toksik bir molekül olan MDA, hücrede DNA ve proteinler gibi makro moleküllere zarar vererek hücrenin fonksiyonunu kaybetmesine, membran bütünlüğünün yok olmasına ve permabilitenin artmasına neden olabilmektedir[20].

Oksidatif strese bağlı olarak oluşan DNA ve protein hasarının lipidlerdeki hasardan daha önemli olduğu ileri sürülmektedir [21]. Reaktif oksijen türlerinin üretimine neden olan tüm reaksiyonlar ve ajanlar protein oksidasyonuna yol açabilmektedir [16]. Proteinlerde meydana gelen oksidatif değişiklikler, proteinlerin rol oynadığı çeşitli hücre fonksiyonları etkiler. Reseptörlerin, sinyal ileti mekanizmalarının, yapısal proteinlerin, taşıma sistemlerinin ve enzimlerin rol oynadığı hücre fonksiyonları oksidatif protein hasarından etkilenir [21]. ROT'un proteinlerle etkileşimi sonucunda histidin, prolin, arjinin ve lizin gibi çok sayıda aminoasit kalıntısında ve/veya peptid omurgasında meydana gelen hasar sonucunda protein karbonil oksidasyonu (PCO) ürünleri meydana gelir. Protein oksidasyonunun en yaygın olarak ölçülen ürünü protein karbonilleridir. Protein oksidasyonu, ROT ile doğrudan veya oksidatif stresin sekonder ürünleri ile reaksiyonu sonucu dolaylı olarak indüklenen, proteinlerin kovalent modifikasyonu olarak tanımlanmaktadır[22]. Serbest radikallerin oksidan etkisi sonucu meydana gelen oksidatif protein modifikasyonu ve bunun sonucu oksitlenmiş proteinlerin fazla miktarda birikmesi, hücre ve doku hasarına bağlı olarak çeşitli patolojik durumlara neden olabilmektedir[23].

Dünyada en hızlı büyüyen sektörlerden birisi olan su ürünleri sektörü, içerisinde modern yetiştiricilik uygulamaları, besin formülasyonlarında çeşitli alternatifler oluşmasına neden olmaktadır. Tarım uygulamalarının yoğunlaşmasının artması sonucunda, su ürünleri yetiştiriciliği sektöründe kirletici ajanlar ve hastalık salgınları, önemini arttırmıştır [24]. Su ürünleri yetiştiriciliği endüstrisinde, antibiyotikler ve kirlenme önleyici maddeler ve terapötik

ilaçları da içeren çok çeşitli kimyasallar kullanılmaktadır [25]. Kimyasal maddelerin birikimi ile oluşabilecek riskler nedeniyle, balık yetiştiriciliği sektöründe, balık sağlığı en önemli konu olup, halk sağlığını doğrudan ilgilendirmektedir.

Balık sağlığı yönünden özellikle hastalıkları önleme yollarının araştırılması, doğal yem kaynaklarının önemini gün geçtikçe arttırmaktadır. Fonksiyonel gıda kavramı bu nedenlerle güncel bir konu olmuştur. Fonksiyonel gıdalar, genellikle gıda içerisine dışarıdan fonksiyonel özelliğe sahip çeşitli bileşenin eklenmesiyle elde edilebilir. Günümüzde en çok kullanılan fonksiyonel gıda bileşenlerinden birisi antioksidanlardır. Antioksidan maddeler, okside bileşiklerin oksidasyonunu önleyerek, hastalık oluşumunu azaltma özelliğine sahiptirler. Antioksidanlar, vücuttaki reaksiyonlarda ara ürün olarak oluşan veya dışardan alınan serbest radikallerin eşlenmemiş elektronu yanına kendilerinden bir elektron vererek onları kararlı hale getirebilen biyoaktif bileşiklerdir [26]. Bir hücrenin normal metabolik durumunda, serbest radikallerin oluşumu ile antioksidanlar tarafından nötrleştirilmesi arasında bir denge vardır. Bu dengenin oksidanlar yönünde bozulması oksidatif stres olarak tanımlanır [27]. Serbest radikallerin üretiminin artması, antioksidanların inaktif ya da yetersiz olması gibi nedenlerle bozulması “Oksidatif Stres” oluşturarak, hücresel yapı ve moleküllerde oksidan maddelerin birikimine ve çeşitli fizyolojik olayların aksamasına neden olabilir [28]. ROT’ların yararlı ve zararlı etkileri arasındaki hassas dengenin korunması çok önemlidir. Antioksidanlar, serbest radikalleri yakalama ve nötralize etme yeteneği ile serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önlerler[29].

Son yıllarda, oksidatif stres ve ROT üretimi ile antioksidan savunma arasındaki dengesizliğe bağlı olarak, hastalıkların ortaya çıkması bağlamında, potansiyel uygulamaları nedeniyle yeni antioksidanların keşfedilmesine ve kullanımına büyük ilgi gösterilmektedir [29].

Antioksidan enzim aktivitelerinde geçici artışlar ve serbest radikal seviyelerindeki değişiklikler kontaminantlara maruz kalındığında gözlenmekle birlikte, genel olarak, balıklarda antioksidan sistemin düzenlenmesi ile ilgili bilgiler sınırlı düzeydedir. Oksidatif stresin birçok hastalık durumunda önemli rol oynadığının tespit edilmesiyle, antioksidanlar üzerine çalışmalara ilgi artmıştır. Doğal antioksidanların terapötik kullanımı konusunda bilimsel açıdan büyük ilgi vardır [30]. Doğal antioksidanlar arasında polifenoller çok önemli bir rol oynamaktadır. Diyetteki polifenollerin serbest radikal temizleme, metal şelasyon, enzimatik aktivitenin modülasyonu ve sinyal iletim yollarının değiştirilmesi gibi çeşitli biyolojik etkilerle sağlığa faydalı olduğu düşünülmektedir[31].

Fenolik bileşikler, suda çözünen antioksidanların en önemli grubunu oluşturmaktadır [32].Yüksek oranda meyve ve sebzelerde bulunur ve sağlık üzerine olumlu etkiye sahiptirler. Fenolik bileşikler temel olarak fenolik asitler ve flavonoidler olarak bilinir. Fenolik asitler, bitkilerdeki en basit fenolik bileşenlerdir. Hidroksibenzoik asit ve hidroksisinamik asit olmak

üzere iki alt gruptan oluşur ve flavonoidlerin öncül maddeleridir [33]. Son yıllarda bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesini ortaya koyan çok sayıda çalışmalar yapılmıştır [34-36]. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular, bu bileşenlere olan ilgiyi daha da artırmıştır.

Ferulik asit (FA) (4-hidroksi-3-metoksisinamik asit; $C_{10}H_{10}O_4$), bitki dokularında bulunan, fenilalanin ve tirozin metabolizması sırasında oluşan bir fenolik bileşiktir[37]. Serbest radikaller üzerinde etkin bir rolü olması nedeniyle bazı ülkelerde (Japonya) oksidasyonu önlemek için gıda katkı maddesi olarak onaylanmıştır [38]. FA, güçlü bir membran antioksidandır ve serbest radikal zincir reaksiyonlarını sona erdirdiği kanıtlanmıştır [39].

Tarım ilaçlarının rastgele kullanılması, çevre ve doğal kaynakların kirlenmesine ve dolayısıyla hayvan ve insan sağlığına olumsuz etkilere neden olmaktadır [40]. Tarımda yaygın olarak kullanılan ve sucul ortama girerek balıklar için büyük bir tehdit oluşturan pestisitler, oksidatif reaksiyonları katalizleyerek; hidrojen peroksit, süperoksit ve hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumuna yol açarlar [41]. Bu radikaller, oldukça yüksek reaktif bileşikler olup protein ve lipid gibi önemli biyolojik moleküllerin oksidasyonuna ve işlevlerinin bozulmasına neden olurlar [16].

Karaciğer, vücuda giren yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve yok edilmesinde önemli işlevi bulunan bir organdır. Dolayısıyla ilgili metabolik enzimlerin, değişmiş metabolizmaya yanıtında merkezi bir rolü vardır[42]. Çoklu doymamış yağ asitleri ve yüksek oranda oksidatif metabolik aktiviteye sahip olması nedenleriyle merkezi sinir sistemi (MSS), ROT'un zararlı etkisine özellikle duyarlıdır [43]. Beyin, yüksek oksijen tüketimi nedeniyle en savunmasız organlar arasında bulunur ve hücre membran lipidleri, oksitlenebilir çoklu doymamış yağ asitleri bakımından yüksektir [44].

Bu çalışmada bir neonikotinoid insektisit olan imidacloprid'in 2,80 mg/L subletal derişiminin *Cyprinus carpio*'da oluşturacağı oksidatif strese karşı ferulik asitin koruyuculuk etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla %0 5 ferulik asit katkılı yemle beslenen balıklarda karaciğer ve beyin dokularında CAT ve SOD aktiviteleri ile MDA ve Protein karbonil düzeyleri belirlenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. İmidacloprid ile Yapılan Çalışmalar

El-Gendy vd.[6], yaptıkları bir çalışmada, oral yolla uygulanan imidacloprid'in sıçanların karaciğer dokusunda CAT, SOD, Glutathion S-transferaz (GST) ve Glutathion Peroksidaz (GSH-Px) aktivitelerinde ve lipid oksidasyonunun artışı neden olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte, Glukoz 6-Fosfat Dehidrojenaz (G6PD) aktivitesi değişmeden kalırken, Glutathion (GSH) içeriği azaldı. Bununla birlikte, sonuçlar C vitamini uygulaması ile karaciğerde LPO'yu düşürdüğünü, imidaklopridin neden olduğu oksidatif hasarı iyileştirici etki gösterdiği, oksidatif strese karşı C vitamininin koruyucu etkisi olduğu rapor edilmiştir. Imidacloprid temel sitotoksik etki mekanizması içerisinde oksidatif stresin önemli bir yer tuttuğu bildirilmektedir.

Yapılan bir çalışmada, intravenöz imidacloprid uygulaması ile sıçan karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonu ve SOD aktivitesinin arttığı, GSH miktarının ve GSH-Px aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada, beyin dokusunda LPO ve SOD aktivitesinde herhangi bir değişim belirlenmediği, artan GSH miktarına bağlı olarak GSH-Px aktivitesinin arttığı her iki dokuda da CAT aktivitesi değişmediği bildirilmiştir[45].

Neonikotinoid insektisit olan imidacloprid (11,2 mg/L) ile piretroid insektisit cyfluthrin (0,88 mg/L) iki ayrı kimyasal ve karışım olarak (0,44 mg/L cyfluthrin + 5,6 mg/L imidacloprid ve 0,88 mg/L cyfluthrin+11.2 mg/L imidacloprid) *C.carpio*'larda 1, 7 ve 15 gün süreyle uygulanmıştır. Balık karaciğer, beyin dokularında MDA, glutathion ve protein karbonil düzeyleri araştırılmıştır. Pestisit uygulamalarının beyin dokusu glutatyon miktarını azalttığı, karaciğer dokusunda 7. günde arttırdığı belirtilmiştir. Pestisitlerin ayrı ayrı ve karışımı ile yapılan uygulamalarının etkisinde MDA ve PCO düzeylerinin süreye bağlı olarak arttığı belirtilmiştir [46].

Priya vd[8], insektisit İmidakloprid'in *Channa punctatus*'un subletal derişimlerinin serum biyokimyasal parametreleri üzerine etkisini değerlendirmek üzere yaptıkları çalışmada, glikoz, protein, albumin, globulin, kolestrol, kreatinin düzeylerini belirlemişlerdir. 96 saatlik uygulama sonuçları kontrol grup ile karşılaştırılmıştır. Serum kolestrol ve kreatinin düzeyleri önemli ölçüde artmıştır. Öte yandan, serum protein, albumin ve globulin düzeyleri önemli oranda azaltılmıştır. Araştırmacılar, İmidakloprid insektisitinin denenen balıklarının serum biyokimyasal profilleri üzerinde önemli etkisi olduğu sonucuna varmışlardır.

Yapılan bir çalışmada *Clarias batrachus* bireyleri butachlor, imidacloprid ve sodyum fluorür'ün letal derişimlerine (72 saat) ve subletal derişimlerine (21 gün) maruz bırakılmış, karaciğer ve kaslardaki protein değişiklikleri analiz edilmiştir. Imidacloprid ve sodyum florür, letal derişimlerde önemli protein kaybına neden olurken, subletal toksisitesi orta derecede

bulunmuştur. Fakat butachlor subletal derişimi, letal derişim kadar etkili protein kaybına neden olmuştur. Imidacloprid letal derişim uygulamasında kaslarda %19 ve karaciğerde %49, subletal derişim uygulamasında kaslarda %5, karaciğerde %27 oranlarında protein kaybı olmuştur. Sodyum flüorür letal derişim uygulamasında kaslarda %36, karaciğerde %43 ve subletal derişimde ise kaslarda %3, karaciğerde %17 oranlarında saptanmıştır. Butahlor letal derişim uygulamasında kaslarda %53, karaciğerde %50; subletal derişim uygulamasında kaslarda %36 ve karaciğerde %29 oranlarında protein kaybı belirlenmiştir [47].

Dokulardaki bazı biyokimyasal parametrelerin düzeyindeki değişiklikleri değerlendirmek için *Oreochromis mossambicus* ve *Labeo rohita* bireyleri İmidacloprid (IMI) ve Curzate (CZ)'nin subletal derişimlerine ($LC_{50} / 10$ ve $LC_{50} / 20$) 21 gün maruz bırakılmıştır. IMI, kloronikotinil grup olarak anılan bir grup böcek ilacına ait bir nikotinoid insektisittir, CZ iki mantar ilacı karışımıdır (Cymoxanil (%8) ve mencozeb (%64)). Uygulama sonunda serum alanin amino transferaz (ALT), aspartat amino transferaz (AST), alkalın fosfataz (ALP) ve glutamat dehidrojenaz (GDH) aktiviteleri artmış olup, bu da karaciğer hasarının göstergesi olarak belirtilmiştir. Bu araştırma sonucunda, curzate ve imidacloprid'in *O. mossambicus* ve *L. rohita* için potansiyel olarak toksik olduğu rapor edilmiştir [48].

Soujanya vd.[40], sıçanların karaciğerinde oksidatif stres, histopatolojik değişiklikler üzerine imidacloprid'in oral yoldan 4 hafta süreyle uygulanmasının etkileri üzerine yaptıkları çalışmada, C vitamininin imidacloprid kaynaklı oksidatif strese karşı koruyup koruyamayacağını ortaya koyan bir çalışma yapmışlardır. İnsektisit uygulaması sonucu; Serum alanin transaminaz ve aspartat transaminazında önemli oranda bir artış, toplam proteinde azalma olduğunu, karaciğerde ise glutatyon derişiminde bir azalma olduğunu belirtmişlerdir. Histolojik olarak karaciğerde belirgin genişleme, santral ven tıkanıklığı, portal ven ve sinüzoidal boşluklar, vakuolasyon/yağ derişimi ve dejenere olmuş hepatositler gözlemlemişlerdir. Karaciğerin ultra ince kesitleri, şişmiş çekirdekler, çeşitli boyut ve şekillerde mitokondriyum, bozulmuş kromatin ve kaba endoplazmik retikulum gözlemlemişlerdir. C vitamini ile birlikte uygulanan imidaclopridin neden olduğu değişikliklerin azaldığını, C vitamininin koruyucu rolü olduğu şeklinde rapor etmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada imidacloprid (IM) ve curzate (CZ) toksisitesini değerlendirmek için *L. rohita* bireylerine, 96 saat LC_{50} derişimleri uygulanmıştır. Balıkların kuyruk atış frekansları ve ölüm oranları izlenmiştir. Kuyruk atış frekansı genelde 48. saatte zirve yapmış sonra azalmıştır. Ölüm oranı, maruz kalma süresine bağlı olarak artmıştır. Letal derişimlere maruz kalan balıkların bu anormal derişimlerinin zamana bağlı olduğunu belirtilmiştir. İmidacloprid'in balıklar için Curzate'ye kıyasla daha etkili olduğunu saptanmıştır[9].

Ouadir vd. [1], bir insektisit olan Imidacloprid'in tatlı su balığı *L. rohita*'nın hematolojik ve serum biyokimyasal profili üzerine etkisini değerlendirmek üzere bir çalışma yapmışlardır.

Kısa süreli (2, 4 ve 8) ve uzun süreli (16, 32 ve 64 günlük) deney koşullarında 120 mg/L'lik bir ölümcül doz uygulanmıştır. Imidacloprid derişimlerine maruz kalan balıklarda hemoglobin, eritrosit (RBC), hematokrit ve trombosit değerleri önemli ölçüde azalmıştır. Aynı çalışmada hiperglisemi, hiperkalsemi ve hipoprotonemi gözlenmiştir; Bu sonuç toksikanı nötralize etmek için balıkların yüksek enerji talebi gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır. Deneyde Serum ALT, AST ve laktat dehidrogenazdaki (LDH) belirgin artışı ise, *Labeo rohita*'da karaciğer fizyolojisinin bozulması şeklinde rapor edilmiştir.

Ansoar-Rodriguez vd. [10], imidacloprid insektisitinin *Oreochromis niloticus*'da, DNA hasarını değerlendirmek için bir çalışma yapmışlardır. IM'in 250, 125 ve 62.5 µg/L derişimleri etkisini comet ve mikronukleus testleri ile değerlendirmişlerdir. maruz bırakılan *O. niloticus* eritrositlerinin genetik materyali üzerindeki etkisini değerlendirdi. İnsektisit IM'nin, tüm derişimlerde primer DNA hasarını ve test edilen en yüksek derişimde kromozomal düzeyde hasar meydana getirdiğini, yine yüksek derişimlerde, mikronukleus ve diğer nükleer anormallikler oluşturduğu şeklinde bulgular bulmuşlardır. Araştırmacılar, bu çalışma ile hedef olmayan bir organizmada IMI'nin potansiyel risk gösterebileceğini ortaya koymuşlardır.

Kırıcı vd.[41], yaptıkları çalışmada *Capoeta capoeta umbla*'da imidacloprid ve lambda-cyhalothrin pestisitlerinin böbrek dokusu glikoz 6-fosfat dehidrogenazenzimi üzerine etkilerini *in vitro* olarak araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, imidacloprid ve lambda-cyhalothrin pestisitlerin G6PD enzimini etkili bir şekilde inhibe ettiği, lambda-cyhalothrin'in imidacloprid'den daha toksik olduğu belirtilmiştir.

Anthony Reddyvd.[49], *L. rohita*'ya imidacloprid içerikli ticari insektisit (Confidor) subletal derişimlerini uygulamışlardır. Elde edilen statik LC₅₀ değerlerini, 24, 48 ve 96 saat boyunca 14.260 mg / L, 13.710 mg / L ve 11.900 mg/L olarak bulmuşlardır. Solungaç, karaciğer ve böbrek dokuları üzerinde histopatolojik değişiklikleri araştırmışlardır. Yüksek derişim etkisiyle, balığın primer ve sekonder solungaç lamellerinde hasarlar gözlenmiştir. Sekonder solungaç lamellerinin uçlarında kısalma ve füzyon, primer solungaç lamellerin uçlarında topaklaşma ve nekrozlar saptamışlardır. Karaciğerde gözlenen patolojik değişiklikler, hepatositlerin şekli ve büyüklüğünde değişiklik, hepatik hücrelerin yırtılması ve dejenerasyonu, daha fazla sayıda vakuol oluşumu olduğunu hücre zarının dejenerasyonu, hemopoietik doku ve böbrek tübüllerinin hasarı ve çekirdeğin hipertrofisi olarak belirtmişlerdir.

Ge vd. [49], yaptıkları çalışmada, zebra balığı üzerinde imidaclopridin farklı derişimlerinin(0,3, 1,25, ve 5 mg/mL) 7, 14, 21 ve 28 günlük maruz kalmadan sonra toksisitesini değerlendirmişlerdir. Bunun için CAT, SOD, ROT, GST ve MDA seviyeleri ile DNA hasarını saptamışlardır. SOD ve GST aktivitelerinin ilk günlerde önemli oranda arttığını ancak maruz kalma süresi sonuna doğru azaldığını bulmuşlardır. İmidaclopridin yüksek derişimlerde (1,25 ve 5 mg/L) 21. günde aşırı ROT üretimine neden olduğunu ve belirgin şekilde MDA

içeriğini arttırdığını, DNA hasarının aynı şekilde derişime ve süreye bağılı olarak arttığını rapor etmişlerdir.

İnsektisid imidaklopridin *O. niloticus*'un karaciğeri üzerindeki olası etkilerini araştırmak için yapılan bir çalışmada, karaciğer üzerindeki histopatolojik değişiklikler ve ısı şoku proteinlerinin (HSP70) üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. IM'nin tüm derişimlerinde karaciğerde en sık görülen değişiklikler hidropik dejenerasyon, piknotik çekirdekler ve hücre sınırlarının kaybedilmesi idi. Statatoz ve artmış HSP70 seviyeleri, en yüksek IMI derişimine sahip hepatositlerde tespit edilmiş olduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak, test edilen IM derişiminin, karaciğerin morfofizyolojik bütünlüğünü korumak için *O. niloticus*'un karaciğeri ve aktif savunma mekanizmalarında histopatolojik değişiklikler oluşturduğu belirlenmiştir [51].

Imidacloprid'in tatlı su balığı olan *Rasbora daniconius*'da oksijen tüketimine etkisini incelemek için yapılmış bir çalışmada balıklar 96 saat sublethal derişime (0,8 mg/L) maruz bırakılmıştır. Oksijen tüketim oranını kontrol ile karşılaştırıldığında düşüş göstermiştir. Imidacloprid, balıklara karşı pestisit toksisitesini değerlendirmede biyolojik gösterge olarak kullanılabilecek bir parametre olan solunum metabolizmasını değiştirmiştir. Kontrol grupta toplam oksijen tüketimi 2,78 ml O₂/hayvan/saat iken, pestisit uygulanan gruplarda 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca toplam oksijen tüketimi sırasıyla 2,37, 1,71, 0,86 ve 0,76 ml O₂/hayvan/saat olmuştur. Dolayısıyla oksijen tüketimi, kontrol grubuna kıyasla, 96 saate kadar azalma eğilimi göstermiştir [52].

Patel vd.[53], imidacloprid ve curzate pestisitlerinin *O. mossambicus* ve *L. rohita*'nın solungaç ve böbreklerinde histopatolojik değişiklikleri üzerindeki etkisini değerlendirmek için bir çalışma yapmışlardır. Dokulardaki histolojik zararlar, derişim ve süre artışı ile yoğunlaşmıştır. Böbrekte gözlenen histopatolojik değişiklikler tübüler epitel hücrelerinin şiddetli nekrozu, bowman kapsülünün kalınlaşması ve glomerüllerin büzülmesi ile birlikte fokal nekroz ve kanamalar, hemoliz bulunan renal tübüllerde ciddi dejeneratif ve nekrotik değişiklikler olduğu belirtilmiştir. Her iki solungacın sekonder lamellerin kıvrılması, bunu takiben düzensizlik, ikincil lamellerdeki histolojik değişiklikler daha belirgin olarak gözlemlendiği rapor edilmiştir. Sonuç olarak, mevcut histolojik araştırmaların bulgularını, imidacloprid ve curzate'in *O. mossambicus* ve *L. rohita*'nın solungaçlara ve böbreklere ağır hasar vermesine neden olduğu şeklinde belirtilmiştir.

İmidaclopridin subletal derişimlerinin *O. niloticus*'da genotoksik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, balıklar 24 ve 96 saat süreyle 50 ve 100 mg/L imidacloprid ortam derişiminemaruz bırakılmışlardır. Genotoksik etkinin incelenmesi amacıyla belirlenen süreler sonunda balık eritrositlerine mikronükleus testi uygulanmıştır. Mikronükleus frekanslarının kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, doza ve süreye bağılı olarak önemli derecede arttığı saptanmıştır [54].

Topal vd.[11], bir neonicotinoid böcek öldürücü olan imidacloprid'in Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) beyin dokusunda 21 günlük uygulamanın, 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) aktivitesi, oksidatif stres ve asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesi üzerindeki nörotoksik yanıtları araştırmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre, 5 mg/L imidacloprid'e maruz kalan balıklarda 8-OHdG aktivitesinin değişmediğini, ancak 10 mg/L ve 20 mg/L imidaclopridin 8-OHdG aktivitesini kontrol grubuna kıyasla belirgin olarak arttırdığını bildirmişlerdir. Beyin dokuları antioksidan enzim aktivitelerinde (süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz) ve malondialdehit düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış olduğunu ve yüksek derişim imidacloprid'in, asetilkolin esteraz enzim aktivitesinde belirgin bir düşüşe neden olduğunu rapor etmişlerdir.

Gökkuşluğu alabalığı (*O. mykiss*)'nda imidaclopridin üç derişimi (5, 10 ve 20 mg/L) 21 gün süreyle kronik uygulanmıştır. Karaciğer ve solungaç dokularında antioksidan enzimler ile malondialdehit ve 8-hidroksi-2-deoksiguanozin düzeyleri araştırılmıştır. 8-OHdG ve MDA düzeyleri artan derişime paralel olarak önemli oranda artmıştır. Bununla birlikte yine artan derişim etkisiyle antioksidan enzim düzeylerinin de arttığı saptanmıştır [55].

Özdemir vd. [56], *C. carpio*'da 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca 140 mg/L ve 280 mg/L imidacloprid derişimlerini uygulamışlardır. Akut insektisit toksisitesinin, solungaçlarda ve karaciğerde histopatolojik lezyonlara neden olduğunu; solungaçlar ve karaciğer dokularında 8-hidroksi-2-deoksiguanozin, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve Tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α) aktivasyonunu, beyin dokusu iNOS, kaspaz-3, CYP1A ve metallothionein (MT1) genlerinin aktivasyonunun arttırdığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar, imidaclopridin *C. carpio*'nun dokularında ciddi histopatolojik lezyonlara, enflamasyona ve oksidatif strese neden olduğunu rapor etmişlerdir.

Vieira vd. [57], *Prochilodus lineatus*'a uyguladıkları 1,25, 12,5, 125 ve 1250 μ g/L imidacloprid derişimlerinin, balıkların farklı organlarında biyokimyasal, genotoksik ve fizyolojik etkilerini değerlendirmişlerdir. İnsektisit, *P. lineatus*'un farklı dokularında biyotransformasyon ve antioksidan enzimlerin aktivitesinde önemli değişikliklere neden olduğunu bildirmişlerdir. Karaciğer, solungaç ve böbreklerde lipoperoksidasyon ve protein karbonilasyonu gibi oksidatif hasar ve beynin beyninde kanıtlandığı için dokuların redoks dengesi etkilenmiştir. Tüm IM derişimlerine maruz kalan balıklarda kanda glikoz azaldığını ve enerjetik talepte bir artış olduğunu belirtmişlerdir. Balık eritrositlerinde comet testi ile yapılan çalışmalarda DNA hasarı olduğu saptanmıştır. Elde edilen sonuçları Entegre Biyobelirteç Tepki (IBR) endeksine entegre ettiklerini ve IM maruziyetinden en çok etkilenen organların karaciğer ve böbrek olduğunu ve bunu solungaçların takip ettiğini kanıtlamışlardır.

Inyang ve Korogbegha[58], *Heterobranchus bidorsalis*'e 14 gün süreyle 0,28, 0,42 and 0,56 mg/L imidacloprid derişimlerini uygulamışlardır. Kanda kırmızı kan hücresi, beyaz kan

hücresi, trombositler, hemoglobin, lenfositler ve nörofiller ile böbrekte alkalen fosfataz ve asit fosfataz üzerine etkilerini incelemişlerdir. Artan derişime bağılı olarak hemoglobin düzeyi ve böbrek enzim aktiviteleri azalmıştır.

2.2. Ferulik Asit ile Yapılan Çalışmalar

Rukkumani vd [59], farelerde alkol ve çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) ile oluşturulan oksidatif stres üzerine ferulik asitin koruyucu rolünü araştırdıkları çalışmada oksidatif stres belirteçleri olan TBARS ve hidroksiperoksit düzeyleri ferulik asit kullanımıyla önemli oranda azaldığını belirtmişlerdir.

Srinivasan vd.[38], yaptıkları bir çalışmada sıçanlarda karbon tetraclorür (CCl₄) kaynaklı toksisite üzerinde fenolik bileşik olan ferulik asitin koruyucu etkisi olduğunu rapor etmişlerdir. Karaciğerde alanin transaminaz, aspartat transaminaz, alkalın fosfataz, gamma-glutamil transferaz enzim aktiviteleri ve lipid peroksidasyon ürünü olan tiyobarbitürik asit reaktif maddeler, hidroperoksitler, nitrik oksit, protein karbonil içeriğı, antioksidan statüsü (süperoksit dismutaz, katalaz, Glutasyon peroksidaz ve indirgenmiş glutasyon), FA'nın koruyucu rolünü izlemek için biyolojik belirteç olarak kullanılmıştır. CCl₄ ile muamele edilen gruplarda aktiviteri azalan antioksidanlar, FA ile önemli oranda iyileştirilmiştir. FA'nın normal sıçanlara verilmesi zararlı etkilere neden olmamıştır. Araştırmacılar FA'nın yan etkileri olmayan etkili bir antioksidan olduğunu ve doğal terapi için geçerli araştırmada büyük bir kazanç sağlayabileceğini belirtmişlerdir.

Yeh ve Yen [60], sıçanlarda fenolik asitlerin antioksidan sistem üzerindeki modülatör etkilerini araştırmak amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Sıçanlara ardışık 14 gün süreyle 100 mg/kg'lık bir dozajda gentisik asit, gallik asit, ferulik asit ve p-kumarik asit oral yoldan uygulanmıştır. Hepatik süperoksit dismutaz, glutasyon peroksidaz ve katalaz aktiviteleri, 4 fenolik asitin hepsinin uygulanmasından sonra kontrol grubuna kıyasla daha fazla bulunmuştur. Fenolik asitler uygulanmış sıçanlardan elde edilen karaciğer homojenatları, kontrol farelerinden elde edilenlerden daha yüksek oksijen radikal absorbsiyon kapasitesine sahip olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar, fenolik asitlerle karaciğerdeki faz II antioksidan enzimlerin ve oksidatif durumunun modülasyonunun, mutajenez ve oksidatif hasara bağılı etkilere karşı korunmada önemli bir rol oynayabileceğı şeklinde rapor etmişlerdir.

Maoka vd. [61], Ferulik asit (FA) (% 0,01-0,5) ve gama-orizanol (OZ) (% 0,05-0,5) takviyesinin *Pagrus major* üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Ferulik asit ve gama-orizanol ile desteklenen yemler ile 98 gün beslenen balıklarda kontrol grubuna göre pigmentasyonun daha koyu olduğunu ve karaciğer MDA düzeyinin daha düşük olduğunu belirtmişlerdir.

Karbon tetraklorid (CCl_4) ile indüklenen akut karaciğer hasarına karşı ferulik asitin koruyuculuk özelliği üzerine bir araştırma yapılmıştır [35]. CCl_4 etkisi ile serum Aminotransferaz aktivitesi ve karaciğer malondialdehit düzeyi önemli oranda yüksek iken, indirgenmiş glutatyon derişimi düşük bulunmuştur. Tümör nekroz faktörü- α -mRNA ekspresyonu anlamlı olarak artmıştır. FA uygulaması bu artışları zayıflatmıştır. Araştırmacılar, FA'nın oksidatif hasar ve iltihap sinyali yollarının azaltılması yoluyla CCl_4 ile oluşturulan akut karaciğer hasarından koruduğu şeklinde rapor etmişlerdir.

Zebra balığı (*Danio rerio*) embriyolarında karbon iyonu ışınlama ve ferulik asitin (FA) oksidatif stresin indüksiyonu ve gen ekspresyonunun değişimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Zebra balığı embriyoları yedi gruba ayrılmıştır. Kontrol grubu; 1 Gy, 3 Gy ve 7 Gy ışına grupları ve üç FA ön-muamele edilmiş ışınlama grubu. Işınlanmış gruplarda, zebra embriyolarının ve oksidatif stresinde artış bulunmuştur. Malondialdehit (MDA) içeriği artmış, azalmış glutatyon (GSH) içeriği azalmış ve antioksidan enzim aktivitelerinde (CAT ve SOD) değişiklikler saptanmıştır. Bununla birlikte bu antioksidan proteinleri kodlayan genlerin aktivitesi de önemli ölçüde değişmiştir. Bir antioksidan olan FA ile yapılan ilave, mortalite, morfoloji, antioksidan enzim aktiviteleri ve MDA ve GSH içeriğindeki değişikliklerle ve mRNA ekspresyon seviyelerinde değişikliklerin işaret ettiği ışınlamayla indüklenen oksidatif hasarı azalttığı rapor edilmiştir [62].

Ferulik asit (FA) takviyesinin, *O. niloticus*'da büyüme performansı, antioksidan kapasitesi ve etin bazı fiziksel özelliklerine etkilerinin araştırılmıştır [63]. 0, 50, 100, 200 ve 400 mg/kg FA ile takviye edilmiş beş diyet hazırlanmıştır. Ağırlık anlamlı şekilde artarken, besin çevirim oranı, viscerosomatik indeks ve hepatosomatik indeks, 100 mg/kg FA içerikli yem grubunda önemli ölçüde azalmıştır. FA desteği hepatik ve serum SOD ve CAT aktivitelerini iyileştici etki yapmış ve MDA içeriğini azaltmıştır. Ayrıca, FA ilavesiyle serum triasilgliserol, kolesterol, düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol içerikleri, alanin aminotransferaz ve aspartat transaminaz aktiviteleri azalırken, serum yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol içeriği, alkalın fosfataz ve lizozim aktiviteleri artmıştır. Bu sonuçlar, diyet takviyesi takviyesinin tilapyadabüyüme performansını ve antioksidan kapasitesini arttırdığını ve et ve serum biyokimyasal parametrelerinin bazı fiziksel özelliklerini geliştirdiğini ortaya koymuştur. Tilapya için optimum diyet FA düzeyi diyetle 100 mg/kg olarak belirtilmiştir.

Yu vd.[64], ferulik asit katkılı yemlerin tilapya yavrularında büyüme parametreleri, antioksidan kapasiteleri ve serum parametreleri üzerine etkilerini ortaya koyan bir çalışma yapmışlardır. Büyüme performansı, antioksidan enzimlerin aktiviteleri ve serum biyokimyasal parametrelerinin FA ilaveli yemlerin, önemli ölçüde arttığını belirtmişlerdir.

Wen ve Ushio[65],*D. rerio* bireylerini ferulik asit ilaveli yemle beslemişlerdir. Ferulik asit uygulamasından sonra 30 gün boyunca gözlemişler, genişletilmiş bir kesit alanı ile birlikte artan

vücut ağırlığı ile vücut kütle indeksine belirlemişlerdir. Miyojenik transkripsiyonel faktörlerin (MyoD, myogenin ve serum yanıt faktörü), nispi mRNA ekspresyon seviyelerinin ve kas hipertrofisinde yer alan sarkomerik ünite proteinlerini kodlayan hedef genlerini (iskelet alfa-aktin, miyosin, tropomyosin ve troponin I) araştırmışlardır. Ferulik asidin kas büyümesini destekleme kabiliyeti sayesinde fonksiyonel gıda katkı maddeleri ve diyet takviyeleri olarak potansiyel uygulamalarını önermişlerdir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

• İmidacloprid	Sigma Aldrich
• 1-Butanol	Riedel de Haen
• Amonyum Sülfat	Sigma
• Asetik Asit	Merck
• Asetonitril	Merck
• Bakır Klorür	Sigma
• Bakır Sülfat Pentahidrat	Merck
• Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma
• Disodyum Hidrojen Fosfat	Merck
• 2,4 Dinitrophenylhydrazine	Sigma
• Etil Alkol (Etanol)	Merck
• Etil Asetat	Sigma
• Etilendiamintetraasetikasit (EDTA)	Merck
• Ferulik Asit	Sigma
• Folin Ciocalteu's Fenol Reagent	Sigma
• Hidrojen Peroksit	Merck
• Hidro Klorik Asit (HCl)	Sigma
• Ksantin	Sigma
• Ksantin Oksidaz	Sigma
• Nitroblue Tetrazolium Klorür (NBT)	Sigma
• Piridin	Riedel de Haen
• Potasyum Dihidrojen Fosfat	Merck
• Potasyum Sodyum Tartarat	Merck
• Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma
• Sodyum Hidroksit	Merck
• Sodyum Karbonat	Merck
• Sodyum Klorür	Merck
• Tetrametoksipropan	Aldrich
• Tiobarbitürik Asit (TBA)	Merck
• TCA	Merck

3.2. Kullanılan Cihazlar

- Soğutmalı Mikrosantrifuj (Sigma,2-16K)
- Derin Dondurucu (Regal, RDD 1145)
- Etüv (Binder)
- Spektrofotometre (Analytikjena-SPECORD 50)
- Hassas Terazı (Mettler Toledo)
- Buzdolabı (Regal, RBD 4602 NCF)
- Benmari Memmert WB 22
- Vorteks (REAX)
- Mini santrifüj (Eppendorf)
- Distile Su Cihazı (Millipore)
- Mikropipet Seti (Gilson- Pipetman- P20-P100-P1000)
- Homojenizatör (IKA Ultra Turrax T-25)
- Oksijenmetre Mettler-Toledo MO 128
- pH Metre (Mettler Toledo)
- Spektrofotometrik Analiz Küvetleri (Hellma)

3.3. Deney Uygulamaları

Araştırmada materyal olarak $60,10 \pm 2,22$ g ağırlık ve $16,20 \pm 0,28$ cm boya sahip *C. carpio* bireyleri kullanılmıştır. Deney, MEÜ. Su Ürünleri Fakültesi Temel Bilimler Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır. Deney uygulamaları 40x100x40 cm boyutlarında cam akvaryumlarda gerçekleştirilmiştir. Balıklar 15 gün süreyle ortam koşullarına uyum için bekletilmiştir. Adaptasyon süresince balıklar günde 2 kez, toplam biyo kütleşimim %2'si oranında hazır pelet yem ile beslenmişlerdir. Laboratuvarda 12/12 saat aydınlık/karanlık periyodu uygulanmış ve akvaryumlar merkezi havalandırma sistemi ile havalandırılmıştır.

Deneyda 5 adet cam akvaryum kullanılmıştır. Akvaryumlardan herbirine 12 adet balık konulmuştur. Deneyde 60 balık kullanılmıştır. Akvaryumlarda evaporasyon, presibitasyon ve adsorbsiyon gibi nedenlerle kullanılan çözeltilerin derişiminde değişimler olabileceği için, suları güneşırı (2 gün ara ile) dinlendirilmiş ve kloru uçurulmuş su ile değiştirilmiştir. Akvaryumlardan biri, imidaclopridin yüksek derişiminin çözündürölmesinde kullanılan asetonitril miktarının kontrolü için kullanılmıştır. *C. Carpio* için 96 saatlik LC₅₀ değerinin 280

mg/L olduğu önceki yapılan çalışmalarda belirtilmiştir[66]. Bu araştırmada, subletal derişim olarak 2,80 mg/L kullanılmıştır.

Deney grupları;

Grup 1 : (Kontrol Grup 1) Çeşme suyu içeren akvaryum + Normal ticari yem ile besleme

Grup 2 : (Kontrol Grup 2) Çeşme suyu + 1 ml Asetonitril + Normal ticari yem ile besleme

Grup 3 : Çeşme suyu içeren akvaryum + Ferulik asit ilave yem ile besleme

Grup 4 : İmidacloprid ilave edilen su bulunan akvaryum + Normal ticari yem ile besleme

Grup 5 : İmidocloprid ilave edilen su bulunan akvaryum + Ferulik asit ilave yem ile besleme

Araştırmada Çamlı A.Ş.'nin sazan balıkları için ürettiği yemler kullanılmıştır. Ticari yem, ferulik asit (% 0,5) ile karıştırılarak ve peletler şeklinde yeniden oluşturulmuştur. Kontrol yem, ferulik asit ilave edilmeksizin, benzer şekilde işlem yapılarak kullanılmıştır. Deney süresince Grup 3 ve Grup 5'te bulunan balıklar, % 0,5 oranında Ferulik asit ilave edilen yem ile beslenmişlerdir. Balıklara günde ağırlıklarının %2 oranında yem verilmiştir.

Deney ve kontrol akvaryumlarındaki suyun bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri Tablo 3.1 'de gösterildiği şekilde belirlenmiştir.

Tablo 3.1. Deney Akvaryumlarındaki Suyun Bazı Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Sıcaklık	23 ± 1 °C
pH	7,35 ± 0,76
Çözünmüş Oksijen	6,8 ± 0,55 mg/L
Toplam Sertlik	229 ± 0,51 mg/L CaCO ₃
Alkalinite	332 ± 0,50 mg/L CaCO ₃

Belirlenen deney periyotlarında (4. gün ve 10. gün) her gruptan 6'şar birey alınarak her birey bir tekrar olacak şekilde kullanılmıştır. Beyin omurilik bağlantısı kesilerek öldürülen bu balıkların karaciğer ve beyin dokuları buz üzerinde ayrı eppendorf tüplere alınarak hızla -20 °C'de dondurulmuştur. Biyokimyasal analizlere başlamadan önce karaciğer doku örnekleri %08'lik serum fizyolojik çözeltisi içerisinde 10000 devir/dakika hızda 3 dakika süre ile homojenize edilmiştir. Isınma nedeniyle meydana gelebilecek enzim aktivite kaybını önlemek üzere örnekler buz içerisinde homojenize edilmişlerdir. Homojenatlar +4 °C'de 13000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiş, elde edilen süpernatant, CAT, SOD enzim aktiviteleri ile MDA, protein karbonil ve protein düzeylerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.4. Biyokimyasal Analizler

3.4.1. Katalaz Aktivitesi Tayini

Doku CAT aktivitesi tayini Aebi [67] tarafından belirtilen yöntemle göre yapılmıştır. Yöntemin esası, hidrojen peroksit (H_2O_2) substratının CAT ile enzimatik yıkılmasının 240 nm’de izlenmesidir.

Kullanılan Reaktifler:

Potasyum Dihidrojen Fosfat Çözeltisi (A): 0,681 g KH_2PO_4 bidistile suda çözülerek 100 mL’ye tamamlanır.

Disodyum Hidrojen Fosfat Çözeltisi (B): 2,77 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ bidistile suda çözülerek 155 mL’ye tamamlanır.

Fosfat Tamponu (50 mM, pH 7,0): A/B oranı 1/1,55 olacak şekilde karıştırılarak hazırlanır ve pH 7’ye ayarlanır.

Hidrojen Peroksid Çözeltisi (30 mM): 34 µl %30 luk H_2O_2 10 mL’ye fosfat tamponu ile tamamlanır.

Deneyin Yapılışı:

Kuvartz spektrofotometre küvetlerine 10 µl 10.000 g süpernatant fraksiyonu ve üzerlerine 1990 µl fosfat tamponu ilave edilir. Örnek küvetine 1 mL 30 mM H_2O_2 ilave edilir ve hemen karıştırılarak örneğin absorbansındaki azalma köre karşı 1 dakika boyunca 240 nm’de izlenir. Spesifik aktivitesi ünite/mg protein cinsinden hesaplanır.

3.4.2. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Tayini

Oksidatif yolla enerji üretimi sırasında oluşan endojen ve eksojen kaynaklı toksik süperoksit radikallerinin suya ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandıran SOD enzim aktivitesinin ölçüm prensibi, ksantin varlığında ksantin oksidazın açığa çıkardığı süperoksit radikallerinin nitroblue tetrazolium (NBT) ile 560 nm’de absorblanan rengin ölçülmesine dayanır[68].

Kullanılan Reaktifler:

Sodyum Hidroksid Çözeltisi (0,1 N): 0,4 g NaOH bidistile suda çözülerek 100 mL’ye tamamlanır.

Stok Ksantin Çözeltisi (3 mM): 4,6 mg ksantin tartılıp, 1 mL 0,1 N NaOH çözeltisinde hafif ısı uygulaması ile çözülerek bidistile su ile 10 mL’ye tamamlanır. Çözelti +4 °C’de bir hafta dayanıklıdır.

Ksantin Çözeltisi (0,3 mM): Stok ksantin çözeltisinden 1 mL alınarak bidistile su ile 10 mL'ye tamamlanır. Her deney günü taze olarak hazırlanır.

Etilendiamintetraasetik Asid Çözeltisi (0,6 mM): 22,32 mg $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ bidistile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlanır.

Sodyum Karbonat Çözeltisi (400 mM): 4,24 g Na_2CO_3 bidistile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlanır.

BSA Çözeltisi (1 g/L): 10 mg BSA bidistile suda çözülerek 10 mL'ye tamamlanır.

Nitroblue Tetrazolium Klorür (NBT) Çözeltisi (0,15 mM): 1,226 mg NBT bidistile suda çözülerek 10 mL'ye tamamlanır. Her deney günü taze olarak hazırlanır.

SOD Çalışma Reaktifi: 10 mL 0,3 mM ksantin, 5 mL 0,6 mM Na_2EDTA , 3 mL 400 mM Na_2CO_3 , 1,5 mL 1 g/L BSA, 5 mL 0,15 mM NBT karıştırılarak her deney günü taze olarak hazırlanır.

Amonyum Sülfat Çözeltisi (2 M): 26,428 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bidistile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlanır.

Ksantin Oksidaz Çözeltisi (167 U/L): 2 mg ksantin oksidaz soğutulmuş $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çözeltisinde çözülerek 1 mL'ye tamamlanır.

Bakır Klorür Çözeltisi (0,8 mM): 13,64 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ bidistile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlanır.

Deneyin Yapılışı:

2,85 ml SOD reaktifi örnek ve kör tüpüne aktarılır. Örnek tüpüne 100 µl süpernatant ilave edilir ve her iki tüpe de 50 µl ksantin oksidaz eklenir. Tüpler 25 °C'de 20 dakika inkübe edildikten sonra tüplere 100 µl CuCl_2 çözeltisi eklenir. En son aşama olarak da kör tüpüne 100 µl süpernatant eklenerek karıştırılır. Kör ve örnek tüplerinin 560 nm'de absorbanları ayrı ayrı ölçülüp SOD aktivitesi tespit edilir. Spesifik aktivite U/mg protein cinsinden ifade edilir.

3.4.3. Malondialdehid Düzeyinin Belirlenmesi

Lipid peroksidasyon ürünlerinden en stabili olan MDA'nın tiobarbitürik asit ile reaksiyonu sonucu oluşan pembe kırmızı rengin absorbanı spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi esasına dayanmaktadır. Yagi vd.[69]'nin tiobarbitürik asit reaksiyon metodu ile tayin edilmiştir.

Kullanılan Reaktifler:

Stok tetrametoksipropan çözeltisi: 0,92 gr tetrametoksipropan 1 mL'de çözülür.

Günlük tetrametoksipropan çözeltisi: 10 mL'lik stok çözelti 100 mL'ye distile su ile tamamlanır. Çalışma sırasında günlük çözelti tekrar 1/10 oranında seyreltilir.

SDS çözeltisi: 8,1 gr SDS tartılıp 100 mL'ye distile su ile tamamlanır ve çözülür.

Asetik Asit çözeltisi: 20 mL asetik asit distile su ile 100 mL'ye tamamlanır ve pH'sı 3,5'e ayarlanır.

TBA çözeltisi: 0,8 gr TBA tartılıp 100 mL'ye distile su ile tamamlanır ve ısıtılarak çözülür.

n-bütanol-piridin çözeltisi (15:1): Stok piridin 1 mL'si 15 mL n-bütanol ile karıştırılır.

Deneyin yapılışı:

MDA miktarını ölçmek için çözeltiler kör ve örnek olmak üzere farklı tüplere aşağıdaki şekilde eklenir (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Malondialdehid Yöntemi

	Kör	Standart	Örnek
Standart (1/10 seyreltilmiş) (µL)	-	50	-
Örnek (µL)	-	-	50
SDS çöz. (µL)	100	100	100
Asetik Asit çöz. (µL)	750	750	750
TBA çöz. (µL)	750	750	750
Distile su (µL)	400	350	350

Tüpler 95 °C'de 30 dakika süre ile inkübe edilir. Musluk suyunda soğutulur. 500 µL distile su eklenir. 2,5 mL n-bütanol-piridin karışımı eklenip tüpün kapağı kapatılarak karışımlar beyazlaşınca kadar vortekslenir. 4000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenir. Süpernatant fazdan 1 mL alınıp 532 nm'de köre karşı spektrofotometrik olarak ölçülür. Sonuçlar standart grafikten değerlendirilir.

3.4.4. Protein Karbonil Düzeyinin Belirlenmesi

Oksidatif stres sonucu proteinler üzerinde oluşan karbonil gruplarının tayini Levine vd.[70] yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Bu metoda göre protein karbonil grupları 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) ile reaksiyona girerek stabil 2,4-dinitrophenyl (DNP) hydrazone oluşturmaktadır.

Kullanılan Reaktifler:

HCl (2 N)

2,4- DNPH (10 mM-2M HCl'de hazırlanır) 10 mM DNPH çözeltisi Özkütlesi 1.19 gr/mol olan % 37'lik HCl çözeltisinden 2 N HCl stok çözeltisi hazırlanır. Örnekler ışıktan korunarak

0.0198 g DNPH tartılır. Bir behere konarak folyoya sarılır. Stoktan birer ml konarak karanlık ve sıcakta çözülür.

TCA (%20)

Etanol / Etil asetat çözeltisi (1:1 (v/v))

NaOH (1N)

Deneyin Yapılışı:

0,5 ml supernatant + 0,5 ml TCA (%20)

Oda sıcaklığında 1-2 dakika bekletilir. 4000 rpm'de 7-8 dakika santrifüjlenir.

Üst faz atılır, çökelti + 0,5 ml DNPH (mM)

Tüpler folyolu ve ağızları kapalı olarak her 5 dakikada bir vortex'lenerek 30 dakika karanlıkta bekletilir. + 0,5 ml TCA (%20)

Spatül yardımı ile çözeltiler karıştırılır. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilir. 4000 rpm'de 7-8 dakika santrifüjlenir.

Üst faz atılır, çökelti + 1 ml Etanol / Etilasetat (1:1 (v / v)

3 kez bu işlem tekrarlanır. Her reaktif ekleme işleminden sonra 5 dakika bekletilerek spatül yardımıyla karıştırılır. 4000 rpm'de 7-8 dakika santrifüjlenir.

3. yıkamadan sonra üst faz atılır, çökelti + 1,5 ml 1 N NaOH

Spatül ve karıştırıcı yardımıyla çözülür. 37°C'lik su banyosunda 15-20 dakika bekletilir.

4000 rpm'de 7-8 dakika santrifüjlenir.

Üst faz 360 nm'de okunur.

Karbonil grup içerikleri nmol karbonil/mg protein cinsinden hesaplanır.

3.4.5. Protein Analizi

Doku protein miktarları CAT, SOD enzim aktiviteleri ile MDA düzeylerini hesaplamak amacıyla çalışılmıştır. Yöntem alkali şartlarda proteinlerin peptid bağlarındaki nitrojenler ile tirozin atıklarının, bakır ile bakır-peptid bağı protein kompleksini oluşturmaları ve bakır tarafından okside olan halkaların fosfotungustik asit-molibdik asit ayırıcını (Folin-Ciocalteu ayırıcı) heteropolimolibdenum mavisine indirgemeleri sonucunda oluşan mavi rengin şiddetinin 750 nm dalga boyunda spektrofotometrede belirlenmesi prensibine dayanmaktadır [71].

Kullanılan Reaktifler:

A Reaktifi: 0.1 N NaOH çözeltisi kullanılarak %2'lik Na_2CO_3 çözeltisi hazırlanır.

B₁ Reaktifi: %1'lik $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi hazırlanır.

B₂ Reaktifi: %2'lik Na-K-Tartarat çözeltisi hazırlanır.

B Reaktifi: B₁ ve B₂ eşit hacimde karıştırılır.

C Reaktifi: 50 mL B reaktifine 1mL A reaktifi eklendi. Reaktif taze hazırlanmalı ve bekletilmeden kullanılmalıdır.

D Reaktifi: 1 mL Folin-Ciocalteus-Phenol Reaktifi, 5 mL distile su ile karıştırılır.

Protein standart çözeltisi: 250 mg/100 mL bovin serum albümin (BSA) 20, 40, 80, 160, 320, 640 µg/mL protein içerecek şekilde seyreltilerek çalışma standartları hazırlanır.

Deneyin Yapılışı:

Protein ölçmek için çözeltiler kör ve örnek olmak üzere farklı tüplere aşağıdaki şekilde eklenir (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Protein Ölçümü

	Kör tüpü	Örnek tüpü	Standart
Numune (µL)	-	300	-
Distile su (µL)	300	-	-
Standart (µL)	-	-	300
C reaktifi (µL)	3000	3000	3000
Vortekslenerek karanlık dolapta 20 dakika bekletilir.			
D reaktifi(µL)	300	300	300

Tüpler vortekslenerek 20-30 dakika oda ısısında inkübe edilir. Spektrofotometrede 750 nm'de numunenin ve standardın absorbanası köre karşı okunur. Her bir örnek için doku protein miktarı, BSA standart çözeltileri ile hazırlanan standart eğrisine göre ve dilüsyon faktörüyle çarpılarak hesaplanır.

3.5. İstatiksel Analizler

Deney verilerinin istatistiksel analizlerinde; deney grupları ortalamaları arasındaki farklar, OneWay-Anova varyans analizi yöntemiyle, önem kontrolü Duncan testi uygulanarak yapılmıştır. 4. ve 10. günün karşılaştırılmasında t testi uygulanmıştır. Deney verileri aritmetik ortalama $\pm$ standart hata ($\bar{X} \pm S\bar{X}$) şeklinde hesaplanmıştır. Önemlilik derecesi olarak $P < 0.05$ kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

C. carpio'da imidacloprid'in subletal derişimi ve ferulik asit uygulamalarının etkisinde karaciğer ve beyin dokularında CAT, SOD ve Lipid Peroksidasyon ürünü olarak MDA ve protein oksidasyonunun en yaygın olarak ölçülen ürünü olarak protein karbonil düzeyleri belirlenmiştir. Deney süresince balıklarda mortalite gözlenmemiştir.

Imidoclopridin 2,80 mg/L derişimi ve yeme katılan %0,5 FA'nın 10 günlük uygulanması sonucu *C. carpio* karaciğer CAT aktivitesinde ki değişim Tablo 4.1. de sunulmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, Ferulik asit uygulaması 4. ve 10. günlerde önemli fark oluşturmamıştır ($P>0.05$). 2,80 mg/L imidocloprid ortam derişimi, kontrol grubuna göre 4. gün yaklaşık %13, 10.gün yaklaşık %32 oranlarında önemli ($P<0,05$) artışa neden olmuştur. IM+FA grubunda bulunan balıkların karaciğer CAT aktivitesi, imidocloprid uygulanan grupla kıyaslandığında 4. günde önemli fark bulunmamıştır ($P>0,05$). 10. günde ise önemli azalmaya neden olmuştur. Deney peryotları olan 4. ve 10. günlerin birbiri ile karşılaştırılması durumunda, IM uygulaması 10. günde 4. güne kıyasla %10 oranında bir artışa neden olmuştur. ($P>0,05$).

Tablo 4.1. *C. carpio*'nun karaciğer dokusu CAT aktivitesi (U/mg Protein) üzerine, 2,80 mg/L Imidocloprid ve yeme katılan %0,5 FA uygulamalarının etkileri

Gruplar	SÜRE (GÜN)	
	4	10
	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\bar{X} \pm S\bar{x}$
Kontrol 1	33,61±2,23 ^{ax}	31.07±1,80 ^{ax}
Kontrol 2	33,93±3,16 ^{ax}	32,28±1,50 ^{ax}
FA (% 0,5)	32,57±2,18 ^{ax}	30,64±1,01 ^{ax}
IM (2,80 mg/L)	37,30±1,22 ^{ax}	41,03±1,70 ^{by}
IM+FA	35,36±1,82 ^{ax}	38,53±1,22 ^{cy}

* : Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P<0,05$ düzeyinde istatistiksel ayrım bulunmaktadır. a, b, c harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı, x, y harfleri ise aynı grup içerisinde süreler arasındaki ayrımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır.

Imidoclopridin 2,80 mg/L derişimi ve yeme katılan %0,5 FA in 10 günlük uygulanması sonucu *C. carpio* beyin CAT aktivitesindeki değişim Tablo 4.2 de sunulmuştur. Kontrol grubu ile FA uygulanan grup karşılaştırıldığında 4. ve 10. günlerde önemli bir fark gözlenmemiştir ($P>0,05$). 2,80 mg/L imidocloprid derişimi, kontrol grubuna göre 4. gün yaklaşık %15, 10.

günde ise %50 oranında önemli ($P>0,05$) artışa neden olmuştur. IM+FA grubunda bulunan balıkların beyin CAT aktivitesi IM uygulanan grup ile karşılaştırıldığında 10. Günde %10 oranında azalma yönünde etki bulunmuştur. ($P<0,05$). Deney periyotları karşılaştırıldığında, IM uygulanan gruptaki *C. carpio* bireylerinin beyin CAT aktivitesinde 10. günde 4. güne kıyasla %19 oranında artış tespit edilmiştir. Aynı karşılaştırma IM+FA grubunda yapıldığında artış oranı 10. günde 4. güne oranla %10 olarak saptanmıştır.

Tablo 4.2. *C. carpio*'nun beyin dokusu CAT aktivitesi (U/mg Protein) üzerine, 2,80 mg/L Imidocloprid ve yeme katılan %0,5 FA uygulamalarının etkileri

Gruplar	SÜRE (GÜN)	
	4	10
	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\bar{X} \pm S\bar{x}$
Kontrol 1	32,26±1,62 ^{ax}	29,90±1,02 ^{ax}
Kontrol 2	30,66±1,29 ^{ax}	31,54±1,04 ^{ax}
FA (% 0,5)	31,50±1,41 ^{ax}	30,28±1,40 ^{ax}
IM (2,80 mg/L)	37,14±1,89 ^{bx}	44,67±0,91 ^{by}
IM+FA	36,19±1,91 ^{abx}	40,60±1,05 ^{cy}

* : Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P<0,05$ düzeyinde istatistiksel ayrım bulunmaktadır. a, b, c harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı, x, y harfleri ise aynı grup içerisinde süreler arasındaki ayrımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır.

2,80 mg/L imidocloprid ve yeme katılan %0,5 ferulik asitin 10 günlük uygulaması sonucu *C. carpio* karaciğer SOD aktivitesi üzerine etkileri Tablo 4.3'de sunulmuştur. FA uygulanan grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında 4. ve 10. günlerde önemli fark oluşmamıştır ($P>0,05$). 2,80 mg/L imidocloprid derişimi, kontrol grubuna göre 4. gün %30 artışa neden olurken 10. günde ise %30 oranında azalmaya neden olmuştur. IM+FA grubunda bulunan balıkların SOD enzim aktivitesi IM uygulanan grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel yönden önemli bir fark oluşturmamıştır ($P>0,05$). Deney periyotlarının karşılaştırılmasında, IM uygulanan gruptaki bireylerin karaciğer SOD enzim aktivitesinde 10. günde 4. güne oranla %44 oranında azalma bulunmuştur. Aynı karşılaştırma IM+FA grubunda yapıldığında 10. günde 4. güne oranla enzim aktivitesinde %37 azalma tespit edilmiştir.

Tablo 4.3. *C. carpio*'nun karaciğer dokusu SOD aktivitesi (U/mg Protein) üzerine, 2,80 mg/L Imidocloprid ve yeme katılan %0,5 FA uygulamalarının etkileri

Gruplar	SÜRE (GÜN)	
	4	10
	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\bar{X} \pm S\bar{x}$
Kontrol 1	7,76±0,37 ^{ax}	7,57±0,72 ^{ax}
Kontrol 2	7,72±0,47 ^{ax}	7,93±0,55 ^{ax}
FA (% 0,5)	7,02±0,19 ^{ax}	6,99±0,37 ^{ax}
IM (2,80 mg/L)	9,17±0,53 ^{bx}	5,44±0,42 ^{by}
IM+FA	8,29±0,41 ^{bx}	5,09±0,34 ^{by}

* : Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0,05 düzeyinde istatistiksel ayrım bulunmaktadır.

a, b, c harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı, x, y harfleri ise aynı grup içerisinde süreler arasındaki ayrımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır.

2,80 mg/L imidocloprid ve yeme katılan %0,5 ferulik asitin 10 günlük uygulaması sonucu *C. carpio* beyin dokusu SOD enzim aktivitesi Tablo 4.4'de sunulmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, FA grubu enzim aktivitelerinde 4. ve 10. günlerde önemli bir fark gözlenmemiştir (P>0,05). IM uygulanan grup kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, beyin dokusu SOD enzim aktivitesinde 4. gün yaklaşık olarak %38 artış gözlenirken, 10. gün %32 azalma görülmektedir. IM+FA grubunda bulunan *C. carpio* bireylerinin enzim aktivitesi, IM uygulanan grup ile karşılaştırıldığında 4. gün %12 oranında azalma, 10. gün %25 artış gözlemlenmiştir. Deney periyotları birbiri ile karşılaştırıldığında, IM grubunda 10. günde 4. güne oranla beyin SOD enzim aktivitesinde %50 azalma belirlenmiştir. IM+FA grubunda bu azalma %28 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.4. *C. carpio*'nun beyin dokusu SOD aktivitesi (U/mg Protein) üzerine, 2,80 mg/L Imidocloprid ve yeme katılan %0,5 FA uygulamalarının etkileri

Gruplar	SÜRE (GÜN)	
	4	10
	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\bar{X} \pm S\bar{x}$
Kontrol 1	5,78±0,46 ^{ax}	6,25±0,32 ^{ax}
Kontrol 2	5,50±0,47 ^{ax}	6,02±0,22 ^{ax}
FA (% 0,5)	5,28±0,52 ^{ax}	5,9±0,40 ^{ax}
IM (2,80 mg/L)	8,02±0,37 ^{bx}	4,19±0,30 ^{by}
IM+FA	7,01±0,30 ^{cx}	5,08±0,28 ^{cy}

* : Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0,05 düzeyinde istatistiksel ayırım bulunmaktadır.

a, b, c harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayırımı, x, y harfleri ise aynı grup içerisinde süreler arasındaki ayırımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır.

C. carpio karaciğer dokusu MDA düzeyi üzerine, 2,8 mg/L IM ve yeme katılan %0,5 FA uygulamalarının etkileri Tablo 4.5'de sunulmuştur. FA uygulanan grupta 10. günde MDA düzeyinde %32 oranında önemli azalma saptanmıştır. (P<0,05). IM grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında MDA düzeyleri 4. gün %40, 10. gün %92 oranlarında önemli artış saptanmıştır (P<0,05). IM+FA uygulanan grupta yer alan *C. carpio* bireylerinin karaciğer MDA düzeyi IM uygulanan grupta yer alan bireylerle karşılaştırıldığında, 4. gün önem ifade eden azalma belirlenmemesine karşın, 10. gün %22 oranında önemli bir azalma tespit edilmiştir (P<0,05). Deney periyotlarının karşılaştırılmasında IM uygulanan gruptaki balıkların karaciğer MDA düzeyinde 10. günde 4. güne oranla %31 oranında önemli bir artış (P<0,05) belirlenmiştir. IM+FA uygulaması yapılan grupta 10. günde 4. güne oranla %10 oranında artış belirlenmiştir.

Tablo 4.5. *C. carpio*'nun karaciğer dokusu lipid peroksidasyonu (MDA; nmol/mg Protein) üzerine 2,80 mg/L Imidocloprid ve yeme katılan %0,5 FA uygulamalarının etkileri

Gruplar	SÜRE (GÜN)	
	4	10
	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\bar{X} \pm S\bar{x}$
Kontrol 1	13,22±0,98 ^{ax}	12,88±1,03 ^{ax}
Kontrol 2	13,12±0,96 ^{ax}	13,26±1,06 ^{ax}
FA (% 0,5)	12,49±0,80 ^{ax}	8,41±1,12 ^{by}
IM (2,80 mg/L)	18,70±0,83 ^{bx}	24,67±0,90 ^{cy}
IM+FA	17,17±0,76 ^{bx}	19,20±0,88 ^{dy}

* : Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0,05 düzeyinde istatistiksel ayrım bulunmaktadır.

a, b, c, d harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı, x, y harfleri ise aynı grup içerisinde süreler arasındaki ayrımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır.

C. carpio'nun beyin dokusu MDA düzeyi (nmol/mg Protein) üzerine, 2,80 mg/L Imidocloprid ve yeme katılan %0,5 FA uygulamalarının etkileri Tablo 4.6 da verilmiştir. FA uygulanan grup, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 10. günde MDA düzeyinde %26 oranında önemli azalmaya saptanmıştır. (P<0,05). IM grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında MDA düzeyleri 4. Gün yaklaşık % 54 10. gün %107 oranlarında önemli artış saptanmıştır (P<0,05). IM+FA uygulanan grupta yer alan *C. carpio* bireylerinin beyin MDA düzeyi IM uygulanan grupta yer alan bireylerle karşılaştırıldığında, 4. gün istatistiki önem ifade eden azalma belirlenmemesine karşın, 10. gün %27 oranında önemli bir azalma tespit edilmiştir (P<0,05). Deney periyotlarının karşılaştırılmasında, IM uygulanan gruptaki balıkların beyin dokusu MDA düzeyinde 10. günde 4. güne oranla %42 oranında önemli bir artış (P<0,05) belirlenmiştir. IM+FA uygulaması yapılan grupta 10. günde 4. güne oranla %13 oranında artış belirlenmiştir.

Tablo 4.6. *C. carpio*'nun beyin dokusu lipid peroksidasyonu (MDA; nmol/mg Protein) üzerine, 2,80 mg/L imidocloprid ve yeme katılan %0,5 FA uygulamalarının etkileri

Gruplar	SÜRE (GÜN)	
	4	10
Kontrol 1	11,11±0,66 ^{ax}	11,77±0,42 ^{ax}
Kontrol 2	10,77±0,67 ^{ax}	11,60±0,58 ^{ax}
FA (% 0,5)	10,99±0,47 ^{ax}	8,62±0,40 ^{by}
IM (2,80 mg/L)	17,13±0,61 ^{bx}	24,38±1,01 ^{cy}
IM+FA	16,88±0,62 ^{bx}	19,16±0,77 ^{dy}

* : Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0,05 düzeyinde istatistiksel ayrım bulunmaktadır. a, b, c harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı, x, y harfleri ise aynı grup içerisinde süreler arasındaki ayrımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır.

Imidoclopridin 2,80 mg/L derişimi ve yeme katılan %0,5 FA in 10 günlük uygulanması sonucu *C. carpio*'nun karaciğer dokusu PCO değerlerinde ki değişim Tablo 4.7 de sunulmuştur. Kontrol grubu ile FA uygulanan grup karşılaştırıldığında PCO değerlerinde önemli bir fark gözlenmemiştir (P>0,05). 2,80 mg/L imidocloprid derişimi, kontrol grubuna göre 4. gün yaklaşık %32, 10. günde ise yaklaşık %77 oranında önemli (P>0,05) artışa neden olmuştur. IM+FA grubunda bulunan balıklar IM uygulanan grup ile karşılaştırıldığında 4. günde önemli fark bulunmamıştır. 10. günde ise IM+FA uygulanan bireylerin karaciğer PCO değerlerinde %25 oranında azalma saptanmıştır. Deney günleri karşılaştırıldığında, IM uygulanan gruptaki *C. carpio* bireylerinin karaciğer PCO değerlerinde 10. günde 4. güne kıyasla %22 oranında artış tespit edilmiştir. Aynı karşılaştırma IM+FA grubunda ve FA gruplarında yapıldığında önemli bir artış oranı saptanmamıştır.

Tablo 4.7. *C. carpio*'nun karaciğer dokusu protein oksidasyonu (PCO; nmol/mg Protein üzerine, 2,80 mg/L imidocloprid ve yeme katılan %0,5 FA uygulamalarının etkileri

Gruplar	SÜRE (GÜN)	
	4	10
	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	$\bar{X} \pm S\bar{X}$
Kontrol 1	4,19±0,14 ^{ax}	3,82±0,24 ^{ax}
Kontrol 2	3,86±0,15 ^{ax}	4,02±0,29 ^{ax}
FA (% 0,5)	3,70±0,28 ^{ax}	3,50±0,18 ^{ax}
IM (2,80 mg/L)	5,56±0,27 ^{bx}	6,78±0,35 ^{by}
IM+FA	5,10±0,22 ^{bx}	5,03±0,24 ^{cx}

* : Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0,05 düzeyinde istatistiksel ayrım bulunmaktadır.

a, b, c harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı, x, y harfleri ise aynı grup içerisinde süreler arasındaki ayrımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır.

Imidoclopridin 2,80 mg/L derişimi ve yeme katılan %0,5 FA in 10 günlük uygulanması sonucu *C. carpio*'nun beyin dokusu PCO düzeyi üzerindeki etkileri Tablo 4.8 de gösterilmiştir. Kontrol grubu ile FA uygulanan grup karşılaştırıldığında PCO değerlerinde önemli bir fark gözlenmemiştir (P>0,05). 2,80 mg/L imidocloprid ortam derişimi, kontrol grubuna göre 4. gün yaklaşık %45, 10. günde ise yaklaşık %90 oranında önemli (P<0,05) artışa neden olmuştur. IM+FA grubunda bulunan balıkların PCO değerleri, IM uygulanan grup ile karşılaştırıldığında 4. günde önemli fark belirlenmemesine karşın, 10. günde IM+FA uygulanan bireylerin beyin PCO değerlerinde yaklaşık %23 oranında azalma saptanmıştır. Deney periyotları karşılaştırıldığında, IM uygulanan gruptaki *C. carpio* bireylerinin beyin PCO değerlerinde 10. günde 4. güne kıyasla %38 oranında önemli (P<0,05) artış tespit edilmiştir.

Tablo 4.8. *C. carpio*'nun beyin dokusu protein oksidasyonu (PCO; nmol/mg Protein) üzerine, 2,80 mg/L Imidocloprid ve yeme katılan %0,5 FA uygulamalarının etkileri

Gruplar	SÜRE (GÜN)	
	4	10
	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	$\bar{X} \pm S\bar{X}$
Kontrol 1	2,75±0,20 ^{ax}	2,93±0,19 ^{ax}
Kontrol 2	2,66±0,16 ^{ax}	2,82±0,15 ^{ax}
FA (% 0,5)	2,60±0,12 ^{ax}	2,38±0,19 ^{ax}
IM (2,80 mg/L)	4,03±0,07 ^{bx}	5,57±0,20 ^{by}
IM+FA	3,90±0,20 ^{bx}	4,28±0,18 ^{cx}

* : Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0,05 düzeyinde istatistiksel ayrım bulunmaktadır.
a, b, c harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı, x, y harfleri ise aynı grup içerisinde süreler arasındaki ayrımı belirtmek amacıyla kullanılmıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. Tartışma

Dünya genelinde, pestisit üretimi ve uygulaması son yıllarda giderek artmıştır. Uygulanan pestisitlerin büyük bir kısmının, hedef dışı organizmalara toksisite ve birikim gibi etkiler oluşturabileceği bir gerçektir. Çevre ve insan sağlığı, kirlenmiş toprak, yüzey ve yeraltı sularına doğrudan veya dolaylı maruz kalmalar nedeniyle risk içermektedir. Bu nedenle uygulanan pestisitlerin ekosistemler üzerindeki olası olumsuz etkilerini izlemeye ve değerlendirmeye ihtiyaç duyulmaktadır[72].

Yeni bir umut verici insektisit olan, imidacloprid [1-(6-kloro-3-piridilmetil)-N-nitroimidazolidin-2-ilidenamin] piyasaya 1991 yılında piyasaya sürülmüş ve o zamandan beri artan miktarlarda kullanılmaktadır. Genelde mahsuller üzerindeki böceklerini kontrol etmek için(örneğin, yaprak bitleri, yaprakçıklar, thrips, beyaz sinekler, termitler) kullanılan sistemik bir insektisittir [73]. Imidacloprid, merkezi sinir sistemindeki sinaptik iletimde önemli bir rol oynayan nikotinik asetilkolin reseptörlerinde (nAChR'ler) agonistler olarak görev yapan neonikotinoid bir pestisit grubudur[74]. Aşamalı iptal sürecinde olan diğer insektisitler için olası bir alternatif olarak kabul edilmektedir[72]. Bununla birlikte, imidacloprid, arılara yüksek toksisitesi ve bu toksisitenin birçok ülkedeki arıcılık işletmeleri üzerindeki olumsuz etkisinden dolayı araştırma ve pestisit gelişiminde hızla sıcak bir sorun haline gelmiştir. Her ne kadar imidacloprid suda kullanılmak üzere tasarlanmamış olsa da, uygulamadan sonra su damlacıklarına veya akma ile su kütlelerine girmesi, artan kullanımına bağlı olarak imidaclopridin suda yaşayan organizmalar üzerindeki etkilerini arttırmıştır [75; 76]. Balıklar ve diğer su organizmaları gibi hedef olmayan hayvanlar gibi çok düşük derişimlerde bile potansiyel olumsuz etkiler konusunda endişeler yaratmaktadır [77].

Organizmalarda çevresel strese karşı oluşan biyokimyasal tepkiler, çevre kirliliğinin erken uyarı işaretleri olarak kullanılan, biyolojik belirteçleri olarak bilinir. Reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimi ve yok edilmesi tipik olarak organizmalarda dinamik bir dengede bulunur ve süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) kısa bir süre içinde ROT'u ortadan kaldırabilir[78]. Bu denge eksojen bir kirletici madde tarafından yok edildiğinde, fazla üretilen ROT, oksidatif strese, lipid peroksidasyonuna ve hücresel hasara neden olabilir. Son lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA), organizmalarda görülen oksidatif hasarı değerlendirmek için sıklıkla kullanılır [50; 57]. Oksidatif stres sonucu oluşan protein karbonil ürünleri protein oksidasyonunun en yaygın kullanılan belirteci olup toksik maddelerin sonucunda oluşan oksidatif stresi değerlendirmede kullanılır [79]. Protein karbonil

indüksiyonunun genel oksidatif stres için bir taşıyıcı biyobelirteç görevi görebileceği öne sürülmüştür [80].

Bu çalışmada imidaclopridin 2,8 mg/L subletal derişimi etkisiyle, *C. carpio*'nun karaciğer ve beyin dokuları CAT enzim aktiviteleri süreye bağlı olarak artmıştır. SOD aktiviteleri ise 4. Gün artmış, ancak 10. günde her iki dokuda da azalmıştır. Çeşitli çalışmalarda, imidacloprid uygulanan balıklarda antioksidan enzimler üzerinde farklı etkiler rapor edilmiştir. Açıl [55], *O. mykiss*'da IM'nin farklı derişimlerinin etkisiyle karaciğer ve solungaç dokularında SOD ve CAT düzeylerinde artış olduğunu belirtmiştir. Ge vd. [50], *D. rerio*'nun karaciğer dokusu CAT ve SOD aktivitelerinin imidaclopridin farklı derişimlerinin (0,3, 1,25, ve 5 mg/mL) etkisiyle ilk günlerde önemli oranda arttığını ancak maruz kalma süresi sonuna doğru azaldığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar stresör bir madde etkisiyle balıklarda radikal üretiminde bir artış meydana geldiğini ve oksidatif strese karşı korumak amacıyla SOD sentezini tetiklemiş olabileceğini bildirmişlerdir [50]. Shukla vd. [81], IM ortam derişimi etkisiyle *D. rerio* karaciğer ve beyin dokularında CAT enzim aktivitelerinde artma, SOD aktivitesinde ise azalma yönünde bulguları rapor etmişlerdir. SOD-CAT sistemi oksijen toksisitesine karşı ilk savunmayı sağlar. SOD enziminin, üretilen süperoksit radikallerini hidrojen peroksitlere dönüştürerek serbest radikal kaynaklı zarara karşı koruma sağladığı bilinmektedir. Kirletici maddelere maruz kaldığında genellikle SOD ve CAT aktivitelerinde eşzamanlı bir indüksiyon yanıtı gözlenir [82; 83]. Organizmalarda artan SOD aktivitesi ROT seviyelerinin oksidatif strese dayanabileceği aralıktaki olduğunu gösterir. Maruz kalma süresi arttıkça, SOD aktivitesi artan ROT miktarına bağlı olarak inhibe olur [84].

Antioksidan enzimlerin aktivitesi, kontaminantların baskısı altında indüklenebilir veya inhibe edilebilir. Oksidatif stres altında, enzim aktivitelerinde farklılıklar görülebilir. Stres başlangıcında aktiviteler uyarılır, ancak stres uzun sürerse, enzim inhibisyonu başlar [85]. Bu olay, stres yoğunluğuna, türlerinin hassasiyetine bağlı olarak değişebilir [86]. Artan CAT ve SOD aktiviteleri, kimyasallara maruz kalındığında detoksifikasyon mekanizmasına doğru muhtemel bir değişimi göstermektedir. Bu durum, *C. carpio*'da SOD'ın aktivitesini arttırarak süperoksit anyon radikalının toksik etkisine karşı kendisini korumasını, CAT aktivitesi artış ise, daha yüksek düzeyde peroksit seviyesinin varlığına işaret etmektedir [87]. Bu çalışmada CAT ve SOD enzim aktivitelerinde görülen artış, IM derişimi etkisiyle *C. carpio*'nun karaciğer ve beyin dokusunda süperoksit radikallerinin ve hidrojen peroksit oluşumunun artmış olabileceğini ihtimalini göstermektedir. Maruz kalma süresi sonunda (10. gün) CAT aktivitesi yükselmiş, SOD aktivitesi kontrol grubuna göre düşmüş ve hatta inhibe olmuş olması, hücrede H_2O_2 dengesini korumak için fazla H_2O_2 'yi elimine etmek için CAT enziminin gerekli olduğunu göstermiştir [50; 81].

Bu çalışmada 2.8 mg/L imidacloprid ortam derişimin etkisinde *C. carpio*'nun karaciğer ve beyin dokusunda lipid peroksidasyonun göstergesi olan MDA düzeyi, deney süresine bağlı olarak artmıştır. Malondialdehit, hücre zarı fosfolipidlerine ve dolaşımdaki lipitlere oksidatif ataktan kaynaklanan LPO ürünlerinden biridir ve seviyesi, doğrudan kirletici maddelerin neden olduğu oksidatif hasarın derecesini yansıtmaktadır [88]. MDA içeriğinin (bir LPO endeksi) ölçümü kirleticilerin oksidatif hasara neden olma potansiyelinin göreceli bir ölçüsünü sağlar[89].Yapılan çalışmalar, imidaclopride maruz kalan çeşitli balık türlerinde doku MDA düzeyini arttırdığını göstermiştir. Neonikotinoid insektisit olan imidacloprid (11.2 ppm) *C. carpio*'da karaciğer, beyin dokularında MDA ve PCO düzeylerinin süreye bağlı olarak arttığı belirtilmiştir [46]. Ge vd. [50],*D. rerio*'nun karaciğer dokusu MDA düzeyinin imidacloprid uygulaması ile etkiye kalma süresine bağlı olarak arttığını bildirmişlerdir.*O. mykiss* (karaciğer, beyin) uygulanan imidacloprid derişimlerinin etkisiyle lipid peroksidasyonun arttığı belirtilmiştir [11; 55].Yapılan çalışmalarda araştırmacılar, kimyasalların oluşturduğu toksisitenin ROT üretiminin artmasına ve bu olayın MDA düzeyinde bir artışa neden olabileceği şeklinde açıklama yapmışlardır [50]. Bu açıklamalar doğrultusunda, yapılan bu çalışmada *C. carpio*'da karaciğer ve beyin dokusunda lipid peroksidasyon ürünü olan MDA düzeyinin artması, IM ortam derişiminin etkisiyle ROT üretiminin artmasına bağlanabilir.

Bu çalışmada 2.8 mg/L imidacloprid ortam derişimin etkisinde *C. carpio*'nun karaciğer ve beyin dokusunda protein oksidasyonunun göstergesi olan PCO düzeyi, deney süresine bağlı olarak artmıştır.Vieira vd. [57], imidacloprid uygulamasının *P. lineatus*'nun farklı dokularında protein karboksil düzeyini arttırdığını rapor etmişlerdir. İmidacloprid uygulamasının *C. carpio*'da karaciğer, beyin dokularında PCO düzeylerinin süreye bağlı olarak arttığı rapor edilmiştir [46]. Benzer şekilde *C. punctata*'ya, uygulanan deltamethrin, endosulfan ve paraquat insektisitlerinin karaciğer böbrek ve solungaç dokularında protein karbonil düzeyinin arttığı bildirilmiştir [80].Protein oksidasyonu, reaktif oksijen türleriyle (ROT) doğrudan reaksiyonlarla veya oksidatif stresin ikincil yan ürünleri ile dolaylı reaksiyonlarla indüklenen bir proteinin kovalent modifikasyonu olarak tanımlanır[90]. Proteinlerin oksidatif modifikasyonları konformasyon, yapı, çözünürlük, proteolize duyarlılık ve enzim aktiviteleri dahil, fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirebilir. Oksidatif stres, oksidan oluşumu, antioksidan sistemlerin organizmalarda ROT'u elimine etme kabiliyetini aştığında meydana gelir.Artan protein oksidasyon seviyeleri, organizmalarda hastalıklar dahil olmak üzere çeşitli biyolojik sonuçlarla ilişkilendirilmiştir[16].Proteinlerin oksidatif modifikasyonu da oksidatif stresin birçok sonucundan biridir [16]. Oksidatif strese neden olan süreçte, üretilen reaktif oksijen türlerinden biri olan yüksek reaktif hidroksil radikalının (OH), proteinlerde karbonil gruplarının oluşumundan sorumlu olduğu düşünülmektedir [91; 92].İmidaclopride maruz kalmanın

ardından *C. carpio*'nun karaciğer ve beyin dokularında belirlenen PCO seviyesindeki artış, aşırı ROT üretimine bağlanabilir [93].

Yem katkı maddelerinin, yüksek verimli ve sağlıklı hayvan elde etmenin ve ekonomik refaha kavuşmanın temel koşullarından olduğu bilinmektedir. Son yıllarda, beslenmenin hastalıklarının önlenmesindeki rolünün önemli olduğu gösterilmiştir[94]. Bu bağlamda, antioksidanlar, özellikle doğal kaynaklardan türetilenler, daha önemli duruma gelmiştir[95].

Antioksidanlar, eşleşmemiş bir elektrona sahip atomlar veya atom grupları olarak tanımlanan, toksik serbest radikalleri nötralize ederler. Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddelerdir [96]. Normal, sağlıklı bir organizmada, reaktif oksijen türleri (ROT) şeklinde proksidanların üretimi, çeşitli antioksidan savunma seviyeleri tarafından kontrol altında tutulur. Çeşitli besin takviyelerinde bulunan antioksidanlar, çeşitli hastalık koşullarında bu ROT'unötrleştirerek faydalı etkiler oluşturlar. Bu serbest radikaller oldukça dengesiz veya reaktiftir ve nükleik asitler, lipitler ve proteinler gibi hücre bileşenlerine doğrudan zarar verebilir. Organizma, radikal kaynaklı hasarı önlemek için süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) dahil olmak üzere birkaç strese yanıt enzimine sahiptir. Fenolik asitler, ROT ile indüklenmiş hücre hasarını, serbest radikal temizleme aktiviteleri ile SOD ve CAT enzim aktivitelerinin düzenlenmesine yardımcı olurlar[196; 97].

Yapılan çalışmada IM+FA uygulaması yapılan grup bireylerinde IM toksisitesini azaltma olduğu yönünde bulgular belirlenmiştir. Karaciğer ve beyin dokuları CAT ve SOD enzim aktivitelerinde ve MDA ve PCO düzeylerindedeyin 10. gününde toksisite azaltıcı etkileri saptanmıştır. Bunun yanı sıra sadece ferulik asit uygulanan grupta MDA düzeyi kontrol grubuna göre azalmıştır. Çok çeşitli tahıllarda, sebzelerde ve meyvelerde bulunan bir molekül olan ferulik asit (4-hidroksi-3-metoksisinamik asit, FA), bitkilerde en bol bulunan hidroksisinamik asittir [63]. Yapılan çalışmalarda Ferulik asitin sahip olduğu fenolik hidroksil grubu ile lipit peroksidasyonundan koruma özelliğine [95] ve serbest radikal temizleme yoluyla antioksidan özelliklere sahip olduğu ortaya konmuştur [38; 97].

Fenolik Asitler, bitkilerde doğal olarak ortaya çıkan aromatik karboksilik asitlerdir. Fenolik asit terimi, en az bir karboksilik asit fonksiyonelliğine sahip bir fenol halkasını tarif eder[98; 99]. Bununla birlikte, bunlar, hidroksibenzoik ve hidroksisinamik asit yapılarını içeren ayrı iki organik asit grubunu belirtir. Hidroksisinamik asit türevleri, antioksidanlar olarak önemli yararlar sağlayabilen bir fenolik asit kategorisidir[100]. Meyvelerde, sebzelerde ve kepekli tahıllarda, hidroksisinamik asitler esas olarak bağlanmış, konjuge ve esterlenmiş formlarda bulunur [101]. Fenolik bileşikler, serbest radikal temizleme, metal şelasyonu ve protein bağlanması dahil olmak üzere birçok farklı mekanizma ile antioksidanlar olarak görev yapabilir [102].

Fenolik bileşiklerinin antioksidan etkisi, serbest radikalleri temizleme [103], metal iyonlarla bileşik oluşturma (metal şelatlama) vetekli oksijen oluşumunu engelleme veya azaltma gibi özelliklerinden ve genellikle fenol radikalının dirençli kararlılığından kaynaklanmaktadır[103]. Bu bileşikler, lipitlerin ve diğer biyomoleküllerin (protein, karbohidrat, nukleik asitler) serbest radikallerce okside olmalarını engellemek için aromatik halkalarındaki hidroksil gruplarında bulunan hidrojeni verebilmektedirler. Fenolik bileşikler indirgen ajan, hidrojen verici, tekli oksijen yakalayıcı ve metal kelatör olmaları nedeniyle önemli antioksidanlar arasında sayılmaktadır [103; 104]. Bu çalışmada ferulik asit ilaveli yemlerin, CAT ve SOD aktivitelerinde iyileştirici etkileri, MDA ve PCO düzeylerini düşürmesi, yukarıda belirtilen antioksidan özelliklerine bağlanabilir.

Bununla birlikte, sağlık açısından bakıldığında, güçlü antioksidanların aynı zamanda hücresel bileşenlerin oksidatif hasarına yol açan proksidan davranış sergileyebileceği bilincinde olunmalıdır[105]. Polifenollerin antioksidan/prooksidant özellikleri, bir hücrenin fonksiyonel sonucunu belirlemede önemli olabilir. Biyolojik tepki, bir hücre içinde mevcut olan oksidatif duruma bağlı olarak faydalı veya zararlı olabilir [106]. Bazı çalışmalar, fenolik bileşiklerin miktarına bağlı olarak, antioksidan veya proksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir[107; 108]. Hidroksisinamik asitlerin, düşük derişimlerde, çok iyi antioksidan potansiyele sahip olduğu ve daha yüksek derişimlerde proksidan davranış göstermeye başlayabileceği bilinmelidir[109]. Bu nedenle, çeşitli diyet formülasyon preparatlarında olası kullanımları için optimum koşulları bulmak, balık sağlığı açısından oldukça önemlidir.

5.2. Sonuç

Pestisitler, amacına uygun olarak uygun dozlarda ve koşullarda kullanıldıklarında oldukça yararlıdır. Fakat yanlış ve aşırı dozlarda kullanımı hem insan sağlığına zarar vermekte, hem de çevre kirliliğini arttırarak diğer canlıları da olumsuz yönde etkilemektedir.

Bir organizmanın yabancı bileşiklere biyolojik yanıtı, absorpsiyon ve dağılımını takiben hücresel ve biyokimyasal seviyelerde toksik kaynaklı değişikliklerle başlar, bu da hücrelerin, dokuların, fizyolojinin ve davranışının yapısında ve fonksiyonunda değişikliklere neden olur. Toksik maddeler tarafından tetiklenebilen ROS üretiminin artması, hücre içi oksidatif strese ve bunun hücre hasarına neden olmaktadır.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre, *C. carpio*'da imidacloprid (2,8 mg/L) uygulamasının, karaciğer ve beyin dokularında antioksidan enzim sistemlerinden CAT ve SOD enzim aktiviteleri ile MDA ile PCO düzeylerinde artışa neden olmuştur. Ferulik asit ilaveli yem ile beslenen gruplarda imidacloprid etkisiyle oluşan toksisitenin azaldığı yönünde sonuçlar

belirlenmiştir. Bununla birlikte sadece FA uygulamasının, doku MDA ile PCO miktarlarında 10. günde azalma yönünde etkisi olduğu belirlenmiştir.

Oksidatif stres parametreleri, su kirliliğinin çevresel bir göstergesi olarak daha sık çalışılan bir konudur. Toksik maddeler, enzim aktivitesini etkileyerek balıklarda fizyolojik bozulmalara neden olmaktadır. Pestisitler, oksidatif stresi uyarır ve antioksidan enzimler bir savunma mekanizması olarak indüklenir. Oksidanların üretimi ile bu oksidanların antioksidanlar tarafından temizlenmesi arasındaki denge, balıkların çeşitli organlarındaki lipid peroksidasyon derecesini belirlemektedir.

İmidacloprid, neonikotinoidler olarak adlandırılan postsinaptik nikotinik asetilkolin reseptörlerinin bir agonistidir ve bu nedenle merkezi sinir sisteminin bozulmasına neden olur. IM'nin kullanımında ve satışında gözlenen artış göz önüne alındığında, sulardaki miktarının artmasının olasılığını ve IM'nin kronik etkilerine maruz kalan balıklara zarar verebileceği, konunun önemini arttırmaktadır. Bu nedenle, insanlar, hayvanlar ve özellikle de suda yaşayan hayvanlar dahil, hedef dışı organizmalarda IM maruziyetinin potansiyel olumsuz etkileri daha fazla ilgi çekmektedir. Balıklarda IM toksisitesini değerlendirmek, hem insanlar, hem hayvanlar gibi hedef olmayan organizmalar için de önemlidir.

Oksidatif stresin birçok hastalık durumunda önemli rol oynadığının tespit edilmesiyle, antioksidanlar üzerine çalışmalara ilgi artmıştır. Doğal antioksidanların terapötik kullanımı konusunda bilimsel açıdan büyük ilgi vardır. Doğal antioksidanlar arasında polifenoller çok önemli bir rol oynamaktadır. Fenolik bileşikler, suda çözünen antioksidanların en önemli grubunu oluşturmaktadır. Yüksek oranda meyve ve sebzelerde bulunur ve sağlık üzerine olumlu etkiye sahiptirler. Fenolik bileşikler temel olarak fenolik asitler ve flavonoidler olarak bilinir. Son yıllarda bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesini ortaya koyan çok sayıda çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular, bu bileşenlere olan ilgiyi daha da artırmıştır. Bir fenolik asit olan ferulik asit, bitkilerde yaygın olarak bulunmaktadır. Fenolik bileşikler, miktarına bağlı olarak antioksidan aktiviteye sahiptirler.

Bununla birlikte, Polifenollerin antioksidan/prooksidant özellikleri, bir hücrenin fonksiyonel sonucunu belirlemede önemli olabilir. Düşük derişimlerde, çok iyi antioksidan potansiyele sahip olduğu ve daha yüksek derişimlerde proksidan davranış göstermeye başlayabileceği bilinmelidir. Bu nedenle, çeşitli yem formülasyon preparatlarında olası kullanımları için optimum koşulları bulmak, balık sağlığı açısından oldukça önemlidir.

6. KAYNAKLAR

- [1].Quadir, S., Latif, A., Ali, M., Iqbal, F.(2014). Effects of imidacloprid on the haematological and serum biochemical profile of *Labeo rohita*.*Pakistan Journal of Zoology*,46 (4), 1085-1090.
- [2].Qadir, S., Bukhari, R. and Iqbal, F. (2015). Effect of Sub Lethal Concentration of Imidacloprid, on Proximate Body Composition of *Labeo rohita*.*Iranian Journal of Fisheries Sciences* 14(4), 937-945.
- [3]. Adhikari, S., Sarkar, B., Chatterjee, A., Mahapatra, C.T. and Ayyappan, S. (2004). Effects of cypermethrin and carbofuran on certain hematological parameters and prediction on their recovery in a freshwater Teleost, *Labeo rohita* (Hamilton). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58, 220-226.
- [4]. Dutta, H.M., Dalal, R. (2008). The effect of endosulfan on the ovary of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*): A histopathological study. *International Journal of Environmental Research*, 2, 215-224.
- [5].Amin, A., Indulkar, S.T. (2017). Chronic Effects of imidacloprid pesticide, on carcass composition of common carp fingerlings.*International Journal of Agricultural Science and Research (IJASR)*, 7 (2), 343-348.
- [6]. El-Gendy, K.S., Aly, N.M., Mahmoud, F.H., Kenawy, A., El-Sebae, A.H. (2010). The role of vitamin C as antioxidant in protection of oxidative stress induced by imidacloprid.*Food and Chemical Toxicology*,48, 215-221.
- [7].Tyor, A.K.,Harkrishan. (2016). Effects of imidacloprid on viability and hatchability of embryos of the common carp (*Cyprinus carpio* L.).*International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 4 (4), 385-389.
- [8].Priya, B.P., Vijaya, R., Avasn, M.Y. (2012). Acute toxicity effect of imidacloprid insecticide on serum biochemical parameters of fresh water teleost *Channa punctatus*, *Intrtnational Journal of Integrative sciences Innovation Technology*, 1 (2), 18-22.
- [9].Desai, B., Parikh, P. (2013). Biochemical alterations on exposure of imidacloprid and curzate on fresh water fish *Oreochromis mossambicus* and *Labeo rohita*. *Indian Journal of Forensic Medicine and Toxicology*, 7 (2), 53-59.
- [10].Ansoar-Rodriguez, Y., Christofolletti, C.A., Marcato, A.C., Correia, J.E., Correa Bueno, O., Malaspina, O., Fontanetti, C.S. (2015). Genotoxic potential of the insecticide Imidacloprid in a non-target organism (*Oreochromis niloticus* - Pisces). *Journal of Environmental Protection*, 6, 1360-1367.
- [11].Topal, A., Alak, G., Ozkaraca, M., Cilingir-Yeltekin, A., Selim Comaklı, S., Acıl, G., Kokturk, M., Atamanalp, M. (2017). Neurotoxic responses in brain tissues of rainbow trout exposed to imidacloprid pesticide: Assessment of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine activity, oxidative stress and acetylcholinesterase activity, *Chemosphere*, 175, 186-191.
- [12].Jabłońska-Trypuć, A. (2017). Pesticides as Inducers of Oxidative Stress. *Reactive Oxygen Species*, 3(8), 96-110.
- [13].Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., (2007). *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. Oxford, UK. Clarendon Press.

- [14].Genestra, M. (2007). Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. Review. *Cellular Signaling*, 19, 1807-1819.
- [15].Dorval, J., Hontela, A. (2003). Role of glutathione redox cycle and catalase in defense against oxidative stress induced by endosulfan in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 192, 191-200.
- [16].Berlett, B.S., Stadtman, E.R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress, *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (33), 20313-20316.
- [17].Gonzalez, P. M., Malanga, G., Puntarulo, S. (2015).Cellular oxidant/antioxidant network: Update on the environmental effects over marine organisms *The Open Marine Biology Journal*, 9, 1-13.
- [18].Trenzado, C., Hidalgo, M. C., Garcia-Gallego, M., Morales, A.E., Furne, M., Domezain, A., Domezain, J., Sanz, A. (2006). Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccari* and trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture*, 254, 758-767.
- [19].Repetto, M., Semprine, J., Boveris, A. (2012). Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination. In: Lipid peroxidation, (Ed. by Catala, A.). New Delhi, Intech, pp 1-28.
- [20].Del Rio, D., Stewart, A.J., Pellegrini N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 15, 316-328.
- [21].Reznick, A.Z., Packer, L. (1994). Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzymology*, 233, 263-357.
- [22]. Gülbahar, Ö. (2007). Protein oksidasyonun mekanizması, önemi ve yaşlılıkla ilgisi. *Türk Geriatri Dergisi*, 10 (1), 43-48.
- [23].Büyükgüzel, E. (2013). Protein oksidasyonun biyokimyasal ve moleküler mekanizması. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 3 (1), 40-51.
- [24].Bondad-Reantaso, M.G., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R., Ogawa, K., Chinabut, S., Adlard, R., Tan, Z., Shariff, M. (2005). Disease and health management in Asian aquaculture. *Veterinary Parasitology*, 132, 249-272.
- [25].Weston, D.P. (1996). Environmental considerations in the use of antibacterial drugs in aquaculture. In: Baird D, Beveridge M, Kelly L, Muir J. (Eds.) *Aquaculture and Water Resources Management*, 140-165.
- [26].Meral, R., Doğan, İ.S., Kanberoğlu, G.S. (2012).Fonksiyonel gıda bileşeni olarak antioksidanlar, *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2 (2), 45-50.
- [27].Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health, *International Journal of Biomedical Science*, 4, 89-96.
- [28]. Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., Dhama, K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed Research International*, 76, 12-64.

- [29].Itagaki, S., Kurokawa, T., Nakata, C., Saito, Y., Oikawa, S., Kobayashi, M., Hirano, T., Iseki, K. (2009). In vitro and in vivo antioxidant properties of ferulic acid: A comparative study with other natural oxidation Inhibitors, *Food Chemistry*, 114, 466-471.
- [30].Cornelli, U. (2009). Antioxidant use in nutraceuticals. *Clinics in Dermatology*, 27, 175-194.
- [31].Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26 (8), 1001-1043.
- [32].Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56 (11), 317-333.
- [33].Bourne, L.C., Rice-Evans, C. (1998). Bioavailability of ferulic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 25, 222-227.
- [34].Yen-Hung, Y., Ya-Ting, L., Hung-Sheng, H., Deng-Fwu, H. (2009). Dietary caffeic acid, ferulic acid and coumaric acid supplements on cholesterol metabolism and antioxidant activity in rat, *Journal of Food and Drug Analysis*, 17, 123-132.
- [35].Kim, H.Y., Park, J., Lee, K.H., Lee, DU., Kwak J.H, et al. (2011). Ferulic acid protects against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice, *Toxicology*, 282, 104-111.
- [36].Masek, A., Chrzescijanska, E., Latos, M., Zaborski. M. (2016). Antioxidant potential of hydroxycinnamic acids in advanced oxidation processes, *International Journal of Electrochemical Science*, 11, 8848-8860.
- [37].Paiva, L.B., Goldbeck, R., Santos, W.D., Squina, F.M.(2013). Ferulic acid and derivatives: molecules with potential application in the pharmaceutical field. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4 (3), 395-411.
- [38].Srinivasan, M., Sudheer, A.R., Menon, V.P. (2007). Ferulic acid: therapeutic potential through its antioxidant property. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 40 (2), 92-100.
- [39].Prasad, N.R., Srinivasan, M., Pugalendi, K.V., Menon, V.P. (2006). Protective effect of ferulic acid on γ -radiation induced micronuclei, dicentric aberration and lipid peroxidation in human lymphocytes, *Mutation Research*, 603, 129-134.
- [40]. Soujanya, S., Lakshman, M., Kumar, A.A.. Reddy, A.G. (2013). Evaluation of the protective role of vitamin C In: Imidacloprid-induced hepatotoxicity in male albino rat, *Journal of Naturel Science, Biology and Medicine*, 4, 63-7.
- [41].Kırıcı, M., Kırıcı, M., Işık, M., Atamanalp, M. (2015). İmidacloprid ve Lambda-cyhalothrin'in *Capoeta capoeta umbla* böbrek dokusunda Glikoz 6-Fosfat Dehidrogenaz enzimi üzerine in vitro etkileri, *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 2, 8-14.
- [42].Lasram, M.M., Annabi, A.B., Elj, N., Selmi, S., Kamoun, A., El-Fazaa, S., Gharbi, N. (2009). Metabolic disorders of acute exposure to malathion in adult wistar rats, *Journal of Hazardous. Materials*, 163, 1052-1055.
- [43].Mehta, A., Verma, R S., Srivastava, N. (2009). Chlorpyrifos induced alterations in the levels of hydrogen peroxide, nitrate and nitrite in rat brain and liver. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 94, 55-59.

- [44].Gupta, R.C. (2004). Brain regional heterogeneity and toxicological mechanisms of organophosphates and carbamates. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 14, 103-143.
- [45].Duzguner, V., Erdogan, S.(2010). Acute oxidant and inflammatory effects of imidacloprid on the mammalian central nervous system and liver in rats, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 97 (1), 13-18.
- [46].Serbes, D. (2011). Cyfluthrin, imidacloprid ve karışım uygulamalarının *Cyprinus carpio*'da beyin ve karaciğer dokularında glutatyon, malondialdehit ve protein karbonil düzeylerine etkileri. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana.
- [47]. Rajput, V., Singh, S.K., Arpita, Kirti, Abhishek. (2012). Comparative toxicity of butachlor, imidacloprid and sodium, flüoride on protein profile of the walking cat fish *Clarias batrachus*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2, 121-124.
- [48].Desai, B., Parikh, P. (2014). Behavioural responses to acute exposure of Imidacloprid and Curzate on *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). *International Journal of Open Scientific Research*, 2 (1), 1-12.
- [49].Anthony Reddy, P., Veeraiah, K., Tata Rao, S., Vivek, C. (2015). The Effect Of Confidor on Histology of The Gill, Liver and Kidney of Fish *Labeo rohita* (Hamilton). *International Journal of Bioassays*, 4 (02), 3682-3685.
- [50].Ge, W., Yan, S., Wang, J., Zhu, L., Chen, A., Wang, J. (2015). Oxidative stress and DNA damage induced by imidacloprid in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 1856-1862.
- [51].Ansoar-Rodriguez, Y., Christofoletti, C.A., Correia, J.E., de Souza, R.B., Moreira-de-Sousa, C., Marcato, A.C., Bueno, O.C., Malaspina, O., Silva-Zacarin, E.C., Fontanetti, C.S. (2016). Liver alterations in *Oreochromis niloticus* (Pisces) induced by insecticide imidacloprid: Histopathology and heat shock protein in situ localization. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 51 (12), 881-887.
- [52].Gaikwad S.B., Reddy K.R, (2016) Toxicity of imidacloprid insecticide influenced by ph and temperature on the freshwater fish *Rasbora daniconius* (Ham 1822). *Journal of Atoms and Molecules, Chennai*, 6 (2), 961-965.
- [53].Patel, B., Upadhyay A., Parikh, P. (2016). Histological changes in the tissues of *Oreochromis mossamicus* and *Labeo Rohita* on exposure to Imidacloprid and Curzate. *International Journal of Research in Applied, Natural and Social Sciences*, 4 (5), 147-158.
- [54].Soysaldı, F. 2016. İmidaclopridin *Oreochromis niloticus* (L., 1758) üzerine genotoksik etkisinin mikronükleus testi ile araştırılması, Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Nevşehir.
- [55].Açıl, G. 2017. Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) solungaç ve karaciğer dokularındaki 8-Hidroksi-2-Deoksiguanozin(8-OHdG) ve antioksidan parametreler üzerine imidacloprid'in etkileri. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.
- [56].Özdemir, S., Altun, S., Arslan, H. (2017). Imidacloprid Exposure Cause the Histopathological Changes, Activation of TNF- α , iNOS, 8-OHdG Biomarkers, and Alteration of Caspase 3, iNOS, CYP1A, MT1 Gene Expression Levels in Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Toxicology Reports*, 27 (5), 125-133.

- [57].Vieira, C.E.D., Pérez, M.R., Acayaba,R.D., Raimundo, C.C.M., Dos Reis Martinez, C.B. (2018). DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*.*Chemosphere*, 195, 125-134.
- [58].Inyang I.R., Korogbegha, T.F. (2018).Haematological and biochemical responses of *Heterobranchus bidorsalis* to imidacloprid.*Annals of Ecology and Environmental Science*, 2 (2),41-46.
- [59].Rukkumani, R., Aruna, K., Varma, P.S., Menon, V.P. (2004). Influence of ferulic acid on circulatory prooxidant antioxidant status during alcohol and PUFA induced toxicity.*Journal of Physiology and Pharmacology*, 55(3), 551-561.
- [60].Yeh, C.T., Yen, G.C. (2006). Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistance-associated protein 3 mRNA expression. *The Journal of Nutrition*, 136 (1), 11-15.
- [61].Maoka, T., Tanimoto, F., Sano, M., Tsurukawa,K., Tsuno, T., Tsujiwaki, S., Ishimaru, K., Takii K. (2008). Effects of dietary supplementation of ferulic acid and gamma-oryzanol on integument color and suppression of oxidative stress in cultured red sea bream, *Pagrus major*.*Journal of Oleo Science*, 57, 133-137.
- [62].Si, J., Zhang, H., Wang, Z, Wu, Z, Lu, J, Di, C, Zhou, X, Wang X. (2013). Effects of (12)C(6+) ion radiation and ferulic acid on the zebrafish (*Danio rerio*) embryonic oxidative stress response and gene expression. *Mutation Research*, 745-746, 26-33.
- [63].Yu, L., Wu, F., Liu, W., Tian, J., Lu, X., Wen, H. (2017). Semisynthetic ferulic acid derivative: An efficient feed additive for Genetically Improved Farmed Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research*, 48, 5017-5028.
- [64].Yu, L.J., Wu, F., Jiang, M., Yang, C.G., Liu, W., Tian, J., Lu, X., Wen, H. (2018). Ferulic acid: A natural compound as an efficient feed additive for GIFT (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Nutrition*. 24, 27-35.
- [65]. Wen, Y., Ushio, H. (2017). Ferulic acid promotes hypertrophic growth of fast skeletal muscle in zebrafish model.*Nutrients*, 9 (10), 1-13.
- [66].Fossen, M.(2006). Environmental Fate of Imidacloprid, California Department of Pesticide Regulation. <<http://www.cdpr.ca.gov/docs/emppm/pubs/fatememo/Imidclprdfate>.
- [67].Aebi, H. (1974). Catalase In: Bergmeyer U, (Ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*. New York and London Academic Press, 673-677.
- [68].Sun, Y., Oberley, L.W., Ying, L.A. (1988). Simple Method for Clinical Assay of Superoxide Dismutase. *Clinical Chemistry*, 34, 497-500.
- [69].Yagi, K. (1998). Simple procedure for specific enzyme of lipid hydroperoxides in serum or plasma. *Methods in Molecular Biology*, 108, 107-110.
- [70].Levine R L., Williams, J.A., Stadtman, E.R., Shacter, E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins, *Methods in Enzymology*, 233, 346-357.
- [71].Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent.*Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.

- [72].Tisler, T., Jemec, A., Mozetic, B., Trebse, P. (2009). Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. *Chemosphere*, 76, 907-914.
- [73].Tomizawa, M., Casida, J.E. (2005). Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, 247-268.
- [74]. Di Muccio, A., Fidente, P., Barbini, D.A., Dommarco, R., Seccia, S., Morrica, P. (2006). Application of solid-phase extraction and liquidchromatography-mass spectrometry to the determination of neonicotinoid pesticide residues in fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1108 (1), 1-6.
- [75].Jemec, A., Tisler, T., Drobne, D., Sepcic, K., Fournier, D., Trebse, P., (2007). Comparative toxicity of imidacloprid, of its commercial liquid formulation and of diazinon to a non-target arthropod, the microcrustacean *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 68, 1408-1418.
- [76].Kurwadkar, S.T., Dewinne, D., Wheat, R., McGahan, D.G., Mitchell, F.L. (2013). Time dependent sorption behavior of dinotefuran, imidacloprid and thiamethoxam. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 48, 237-242.
- [77].El-Sayed, Y.S., Saad, T.T., El-Bahr, S.M. (2007). Acute intoxication of deltamethrin in monosex Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, with special reference to the clinical, biochemical and haematological effects. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 24, 212-217.
- [78].Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullos, M. (2006).Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64, 178-189.
- [79].Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, 329, 23-38.
- [80]. Parvez, S., Raisuddin, S.(2005). Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 20, 112-117.
- [81].Shukla, S., Jhamtani, R.C., Dahiya, M.S., Agarwal, R. (2017). Oxidative injury caused by individual and combined exposure of neonicotinoid, organophosphate and herbicide in zebrafish. *Toxicology Reports*, 4, 240-244.
- [82]. Dimitrova, M.S.T., Tsanova, V., Velcheva, V. (1994). Combined effect of zinc and lead on the hepatic superoxide dismutase-catalase system in carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 108, 43-46.
- [83].Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez, B., Raisuddin, S. (2003). Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of River Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. and Schn.). *Science of The Total Environment*, 309, 105-115.
- [84].Shao, B., Zhu, L.S., Dong, M., Wang, J., Wang, J.H., Xie, H., Zhang, Q.M., Du, Z.Q., Zhu, S.Y. (2012). DNA damage and oxidative stress induced by endosulfan exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology*, 21, 1533-1540.
- [85]. Annabi Berrahal, A., Nehdi, A., Hajjaji, N., Gharbi, N., El-Fazâa, S. (2007). Antioxidant enzymes activities and bilirubin level in adult rat treated with lead. *Comptes Rendus Biologies*, 330, 581-588.

- [86] Awoyemi, O.M., Bawa-Allah, K.A., Otitolaju, A.A. (2014). Accumulation and anti-oxidant enzymes as biomarkers of heavy metal exposure in *Clarias gariepinus* and *Oreochromis niloticus*. *Applied Ecology and Environmental Sciences*, 2 (5), 114-122.
- [87]. Fernandes, C., Fontainhas-Fernandes, A., Ferreira, M., Salgado, M. A. (2008). Oxidative stress response in gill and liver of *Liza saliens*, from the Esmoriz-Paramos Coastal Lagoon Portugal. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 55 (2), 262-269.
- [88]. Banerjee BD, Seth V, Bhattacharya A. (1999). Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicology Letters*, 107, 33-47.
- [89]. Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M.J., Valavanidis, A. ((2007). Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Marine Pollution Bulletin*, 54, 1361-1371.
- [90]. Zhang, W., Xiao, S., Ahn, D.U. (2013). Protein oxidation: basic principles and implications for meat quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 1191-201.
- [91]. Farber, J.M., Levine, R.L. (1986). Sequence of a peptide susceptible to mixed-function oxidation: probable cation binding site in glutamine synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, 261, 4574- 4578.
- [92]. Oliver, C.N., Ahn, B.W., Moerman, E.J., Goldstein, S., Stadtman, E.R. (1987). Age-related changes in oxidized proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 5488-5491.
- [93]. El-Shenawy, N.S., El-Salmy, F., Al-Eisa, R.A., El-Ahmary, B. (2010). Amelioratory effect of Vitamin E on organophosphorus insecticide diazinon-induced oxidative stress in mice liver. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 96, 101-7.
- [94]. Agbor, G.A., Moumbegna, P., Oluwasola, E.O., Nwosu, L.U., Njoku, R.C., Kanu, S., Emekabasi, E.I., Akin, F., Obasi, A.P., Abudei, F.A. (2011). Antioxidant capacity of some plant foods and beverages consumed in the Eastern Region of Nigeria. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines*, 8, 362-369.
- [95]. Maurya, D.K., Devasagayam, T.P.A. (2010). Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. *Food Chemical Toxicology*, 48, 3369-3373.
- [96]. Elliot, J.G. 1999. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Technology*, 53(2), 46-48.
- [97]. Ghosh, S., Basak, P., Dutta, S., Chowdhury, S., Sil, P.C. (2017). New insights into the ameliorative effects of ferulic acid in pathophysiological conditions. *Food and Chemical Toxicology*, 103, 41-55
- [98]. Robbins, R.J. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2866-2887.
- [99]. Kumar, N., Pruthi, V. (2014). Potential applications of ferulic acid from natural sources *Biotechnology Reports*, 4, 86-93.

- [100].Tsao, R. (2010).Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols *Nutrients*, 2,1231-1246.
- [101]. Kylli, P., Nousiainen, P., Biely, P., Sipila, J., Tenkanen, M., Heinonen, M. (2008). Antioxidant potential of hydroxycinnamic acid glycoside esters.*Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 4797-4805.
- [102].Amorati, R., Pedulli, G.F., Cabrini, L., Zambonin, L., Landi, L., (2006). Solvent and pH effects on the antioxidant activity of caffeic and other phenolic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (8), 2932-2937.
- [103].Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Bolwell, P.G.; Bramley, P.M.; Pridham, J.B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic. Res.* **1995**, 22, 375-383.
- [104].Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds.*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3954-3962.
- [105].Galati, G., O'Brien, P.J.(2004). Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 37, 287-303.
- [106].Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M. (2004). The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44, 239-267.
- [107].Yoshino, M., Murakami, K. (1998). Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization. *Analytical Biochemistry*, 257, 40-44.
- [108].Halliwell, B. (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476 (2), 107-112.
- [109].Kyselova Z. (2011). Toxicological aspects of the use of phenolic compounds in disease prevention.*Interdisciplinary Toxicology*, 4, 173-83.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı :Önder ŞAHİN

Doğum Tarihi :10.02.1988

E-mail :ebow2805@gmail.com

Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	Çukurova Üniversitesi	2012
Yüksek Lisans			
Doktora			

Görevler :

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl

ESERLER (Makaleler ve Bildiriler)

1.Ozkan Yılmaz, F.,Onder, S., Özlüer Hunt, A., Yıldırım, M., Berkoz, M., Yalın, S. "Protective role of ferulic acid against lipid peroxidation and protein oxidation induced by imidacloprid in liver tissue of *Cyprinus carpio*" 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-12), 26-29 June 2018, Ankara Turkey.